



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**
Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Correlación entre ubiquitinación y cambios
conformacionales de la proteína tau en la
patología neurofibrilar de la Enfermedad de
Alzheimer”**

T E S I S

Que presenta

VANESSA JEANETH IBARRA BRACAMONTES

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño
Dr. Francisco García Sierra

Ciudad de México

Agosto, 2023

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias bajo la asesoría del Dr. Benjamín Florán Garduño y en el Departamento de Biología Celular bajo la supervisión del Dr. Francisco García Sierra en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Durante su elaboración se contó con una beca con número 215216 proporcionada por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT).

Agradecimientos

- Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT-México), por la beca proporcionada para la realización de este trabajo.
- Al Colegio de Profesores del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias por brindarme la oportunidad de realizar un posgrado de alto nivel.
- Al Dr. Francisco García Sierra y al Dr. Benjamín Florán Garduño por la dirección y supervisión tan certera para el desarrollo de este proyecto y por el apoyo profesional y personal que me brindaron durante todo el doctorado.
- A mis asesores Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, Dr. Porfirio Nava Domínguez y Dr. Hernán Cortés Callejas por su valiosa participación y sus aportaciones durante el desarrollo del trabajo de esta tesis.
- A los técnicos Celso Sánchez Islas y Jaime Escobar por la ayuda técnica e invaluable amistad.
- A mis compañeros y grandes amigos del laboratorio 25 de Biología Celular Fanny, Paquito, Jarero, Graciela, Sheyla; y del extinto laboratorio 2 de Neurociencias Alejandra, Flor, Erick, Eduardo y Mike, por todos los momentos vividos.
- A mis padres José y Laura Elena, y hermanos Martha, José, Laura, Claudia y Carlos por su apoyo incondicional y ejemplo a seguir.
- A mi esposo Dagoberto y mi hijo Matías por su amor que me alienta a seguir adelante todos los días.

Índice

Contenido

Agradecimientos	3
Índice	4
Abreviaturas	7
Resumen.....	9
Abstract	10
1 Introducción	11
1.1 Demencia.....	11
1.1.1 Demencia tipo Alzheimer	11
1.1.2 Demencia multiinfarto	11
1.1.3 Demencia mixta.....	12
1.2 Enfermedad de Alzheimer.....	12
1.2.1 Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer.....	12
1.2.2 Neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer.....	14
1.2.3 Marañas neurofibrilares.....	15
1.2.4 Componente neurítico	16
1.2.5 Proteína tau.....	17
1.2.6 Modificaciones post-traduccionales de la proteína tau.....	17
1.2.7 Cambios conformacionales de la proteína tau	19
1.2.8 Ubiquitinación de la proteína tau	20
2 Justificación	23
3 Hipótesis.....	24
4 Objetivo General	25
4.1 Objetivos Particulares	25
5 Métodos	26
5.1 Tejido Cerebral	26
5.2 Inmunohistoquímica	26
5.3 Análisis de Microscopía Confocal y Epifluorescencia.....	28
5.4 Cuantificación en MNFs	29
5.5 Cuantificación en Neuritas	29

5.6	Análisis Estadístico	29
6	Resultados	30
6.1	Análisis Inmunohistoquímico de Marañas Neurofibrilares.....	30
6.1.1	La ubiquitina es un componente conspicuo que se presenta en las MNFs del tejido cerebral de sujetos con la EA	30
6.1.2	El cambio conformacional temprano de tau reconocido por el anticuerpo Alz-50 está ampliamente presente en las MNFs del hipocampo de pacientes con EA	31
6.1.3	El cambio conformacional tardío de tau reconocido por el anticuerpo Tau-66 se presenta en menos MNFs del hipocampo de individuos con EA.....	34
6.1.4	El cambio conformacional tardío de tau detectado por el anticuerpo Tau-66 se presenta con baja frecuencia en MNFs.....	36
6.1.5	Ubiquitina se asocia al cambio conformacional temprano de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 en mayor grado que al cambio conformacional tardío reconocido por el anticuerpo Tau-66.....	37
6.1.6	La ubiquitinación de tau se presenta con más incidencia en MNFs compuestas de tau fosforilada presentando el cambio conformacional temprano detectado por el anticuerpo Alz-50.....	44
6.1.7	La molécula de la proteína tau que exhibe el cambio conformacional temprano revelado por el anticuerpo Alz-50, conserva su extremo amino intacto.....	48
6.2	Caracterización de la expresión de ubiquitina en la patología neurítica de tau en el hipocampo de sujetos con la EA	51
6.2.1	En el componente neurítico, el patrón de expresión de ubiquitina y su asociación con las modificaciones de la proteína tau es similar al presentado en las MNFs.....	51
6.2.2	El cambio conformacional temprano de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 es el marcador que se presenta con mayor frecuencia en la patología neurítica de la EA.....	53
6.2.3	Ubiquitina se asocia al cambio conformacional temprano de tau en mayor grado que al cambio conformacional tardío en el componente neurítico del tejido cerebral	54
6.3	Análisis de Correlación entre el Diagnóstico Clínico y la Ubiquitina en la Patología Fibrilar..	58
6.3.1	En la demencia mixta se incrementa la expresión de ubiquitina en las MNFs y el componente neurítico.....	58
6.3.2	El género masculino presenta una mayor cantidad de ubiquitinación en las MNFs y en el componente neurítico	59
6.3.3	El contenido de ubiquitina en MNFs y en el componente neurítico no depende de la edad.....	59
6.3.4	La expresión de ubiquitina en las MNFs es directamente proporcional a la epicrisis de los casos con demencia.....	60

6.3.5	La hipertensión afecta de manera notable la expresión de la ubiquitina en las MNFs y el componente neurítico	65
7	Discusión	67
8	Conclusiones.....	74
9	Bibliografía	75
10	Apéndice.....	79

Abreviaturas

Aa.:	Aminoácido
AcM:	Anticuerpo Monoclonal
ALS:	Sistema Autofagia-Lisosoma
APO-E:	Apolipoproteína E
APP:	Proteína Precursora Amiloide
Asp:	Ácido Aspártico
A β :	Péptido Beta-Amiloide
C:	Carboxilo
Cy5:	Cyanine 5
E1:	Enzima de Activación
E2:	Enzima de Conjugación
E3:	Enzima de Ligación
EA:	Enfermedad de Alzheimer
FHA:	Filamentos Helicoidales Apareados
FITC:	Fluoresceín Isotiocianato
Glu:	Ácido Glutámico
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
KDa:	Kilodaltons
Lys	Lisina
MAP:	Proteína Asociada a Microtúbulos
MBD:	Dominio de Unión a Microtúbulos
MID:	Demencia Multiinfarto
MNF:	Maraña Neurofibrilar
MPT:	Modificación Post-traducciona
N:	Amino

NA:	Apertura Numérica
PBS:	Buffer Salino de Fosfatos
PFA:	Paraformaldehído
PRD:	Región Rica en Prolinas
Ser:	Serina
SF:	Filamentos Rectos
SFB:	Suero Fetal Bovino
SNC:	Sistema Nervioso Central
SSC:	Buffer Salino de Citratos
TBS:	Buffer Salino de Tris
Thr:	Treonina
TR:	Rojo de Tiazina
TRITC:	Tetrametil Rodamina Isotiocianato
Tx:	Tritón
UPS:	Sistema Ubiquitina-Proteasoma

Resumen

En este estudio se investigó la relación entre la ubiquitinación de la proteína tau y los cambios conformacionales detectados por los anticuerpos Alz-50 y Tau-66 en las marañas neurofibrilares y el compartimento neurítico. La proteína tau es conocida por su implicación en la enfermedad de Alzheimer y se ha observado que su agregación y sus modificaciones postraduccionales están asociadas con la progresión de esta enfermedad.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, se analizaron muestras de tejido cerebral para identificar y cuantificar la ubiquitinación de la proteína tau, así como los cambios conformacionales.

Los resultados del estudio revelaron que la ubiquitinación de la proteína tau estaba predominantemente asociada con el cambio conformacional temprano detectado por el anticuerpo Alz-50. Esto sugiere que la ubiquitinación puede desempeñar un papel crucial en las etapas iniciales de la agregación de tau y en la formación de marañas neurofibrilares.

Estos hallazgos proporcionan una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes a la patología de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer. Además, destacan la importancia del marcador Alz-50 para identificar los cambios conformacionales tempranos de tau y su asociación con la ubiquitinación, lo que puede abrir nuevas vías de investigación para el desarrollo de terapias dirigidas a la modulación de este proceso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras patologías neurodegenerativas relacionadas.

Por otro lado, se examinó la posible correlación entre la ubiquitinación en la patología fibrilar y diversos factores como la edad, el sexo, la neuropatología, el grado de demencia y las comorbilidades. Lo que se observó es que podría haber una correlación entre el diagnóstico de la enfermedad y el grado de ubiquitinación, lo que sugiere que la ubiquitinación de tau podría ser un marcador útil para evaluar la severidad de la enfermedad y su progresión.

Abstract

In this study, the relationship between tau protein ubiquitination and conformational changes detected by Alz-50 and Tau-66 antibodies in neurofibrillary tangles and the neuritic compartment was investigated. The tau protein is known to be involved in Alzheimer's disease and its aggregation and post-translational modifications have been shown to be associated with the progression of this disease.

Using immunohistochemistry techniques, brain tissue samples were analyzed to identify and quantify tau protein ubiquitination, as well as conformational changes.

The results of the study revealed that tau protein ubiquitination was predominantly associated with the early conformational change detected by the Alz-50 antibody. This suggests that ubiquitination may play a crucial role in the early stages of tau aggregation and in the formation of neurofibrillary tangles.

These findings provide a deeper understanding of the mechanisms underlying tau protein pathology in Alzheimer's disease. In addition, they highlight the importance of the Alz-50 marker to identify early tau conformational changes and their association with ubiquitination, which may open new avenues of research for the development of therapies aimed at modulating this process in the treatment of Alzheimer's disease and other related neurodegenerative pathologies.

On the other hand, the possible correlation between ubiquitination in fibrillar pathology and various factors such as age, sex, neuropathology, degree of dementia, and comorbidities was examined. What was observed is that there could be a correlation between the diagnosis of the disease and the degree of ubiquitination, which suggests that tau ubiquitination could be a useful marker to assess the severity of the disease and its progression.

1 Introducción

1.1 Demencia

La demencia es una condición o conjunto de signos que se distingue por la disminución gradual de la capacidad cognitiva, que abarca la memoria, el razonamiento, la orientación, la habilidad de adquirir conocimientos, el lenguaje, la concentración y la capacidad de tomar decisiones adecuadas [1, 2].

La pérdida de neuronas es la causa fundamental detrás del desarrollo de la demencia. Sin embargo, debido a que esta pérdida no ocurre de manera uniforme en todo el cerebro, la progresión de los síntomas varía en cada tipo de demencia, aunque en etapas avanzadas los síntomas se vuelven más similares entre sí en la mayoría de ellas [2].

Existen diversos tipos de demencia, que comparten una sintomatología similar, pero son causados por diferentes factores. El grupo más amplio está conformado por las demencias seniles, y dentro de este grupo se distinguen tres tipos principales: la demencia tipo Alzheimer, la demencia multiinfarto y la demencia mixta [3].

1.1.1 Demencia tipo Alzheimer

La demencia tipo Alzheimer es la forma más prevalente de demencia y constituye aproximadamente el 60-80% de los casos diagnosticados [3, 4]. Se distingue por la presencia de degeneración neurofibrilar y la formación de placas seniles, que consisten en la acumulación de material amiloide principalmente en la corteza cerebral. Estos procesos conducen a la degeneración y muerte de las células nerviosas, lo que caracteriza esta enfermedad [5].

1.1.2 Demencia multiinfarto

La demencia multiinfarto (MID - Multi-Infarct Dementia) es una forma de demencia vascular que se desarrolla debido a la presencia de múltiples infartos cerebrales. Los infartos cerebrales son interrupciones del flujo sanguíneo en el cerebro que pueden ser

causados por bloqueos en los vasos sanguíneos o por hemorragias. Estos infartos o accidentes cerebrovasculares pueden dañar áreas importantes del cerebro y provocar la aparición de síntomas de demencia [1, 2].

En la MID, los infartos cerebrales ocurren de manera repetida y afectan diferentes áreas cerebrales. A medida que los infartos se acumulan, se produce un daño progresivo en las células neuronales, lo que lleva a una disminución de la función cognitiva. Los síntomas pueden variar según las áreas del cerebro afectadas por los infartos [2].

El tratamiento se basa en la prevención de nuevos infartos cerebrales y en el control de los factores de riesgo vascular, como la hipertensión arterial, la diabetes y las enfermedades cardíacas [2].

1.1.3 Demencia mixta

El término demencia mixta se utiliza para describir la presencia simultánea de dos o más tipos diferentes de demencia en una persona. Comúnmente, se refiere a la combinación de demencia tipo Alzheimer y demencia vascular [1].

1.2 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónica y progresiva que afecta al sistema nervioso central y se manifiesta como un deterioro gradual de la memoria, el pensamiento y el comportamiento de una persona [2]. Es la forma más común de demencia y se caracteriza por la degeneración progresiva de la corteza cerebral, lo que resulta en una pérdida gradual y continua de las funciones cognitivas, mientras que la capacidad motora se mantiene relativamente preservada [5].

1.2.1 Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer

1.2.1.1 Prevalencia

La EA es frecuente en individuos de edad avanzada, y el riesgo de desarrollarla aumenta a medida que se envejece. Según datos a nivel mundial, hasta el año 2020 más de

50 millones de personas vivían con demencia, y se estima que entre el 60% y el 80% de los casos de demencia son atribuibles a la EA [4].

Según el portal de la Secretaría de Salud de México, se estima que en la actualidad alrededor de un millón 300 mil personas mayores de 65 años padecen EA, cifra que representa entre 60 y 70 por ciento de los diagnósticos de demencia. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas cifras pueden subestimar la verdadera prevalencia, ya que muchos casos pueden no haber sido diagnosticados.

1.2.1.2 Incidencia

La frecuencia de la EA también se incrementa con la edad. Se ha observado que la tasa de incidencia se duplica aproximadamente cada cinco años después de los 65 años. No obstante, también se han documentado casos de inicio temprano en individuos menores de 65 años, aunque son menos comunes [3, 5].

1.2.1.3 Etiología

Aunque no se conoce con certeza su origen, se han descubierto cuatro loci genéticos en los cromosomas 21, 14, 1 y 19 que están relacionadas con la EA. Estos genes desempeñan un papel en la producción de la proteína precursora amiloide (APP - Amyloid-beta Precursor Protein), las presenilinas 1 y 2, y el genotipo de la apolipoproteína E (APO-E), respectivamente [6].

1.2.1.4 Factores de riesgo

La edad representa el factor de riesgo primordial en el desarrollo de la EA. Existen otros factores de riesgo que incluyen antecedentes familiares de la enfermedad, presencia del gen APO-E ϵ 4, baja actividad mental y física, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes tipo 2, obesidad y lesiones cerebrales traumáticas [5, 7].

1.2.1.5 Disparidades de género y raza

Se ha observado que las mujeres tienen un mayor riesgo de desarrollar la EA en comparación con los hombres. Además, se han encontrado disparidades raciales en la enfermedad, con una mayor prevalencia entre las poblaciones afroamericanas e hispanas en comparación con las poblaciones caucásicas [4, 7].

1.2.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de la EA se realiza mediante el examen neuropatológico *postmortem* del cerebro. Sin embargo, en la práctica clínica, se utilizan criterios clínicos y pruebas de neuroimagen para realizar un diagnóstico probable de la EA durante la vida de una persona [3, 8].

1.2.1.7 Impacto global

La EA tiene un impacto considerable tanto en la salud pública como en los sistemas de atención médica. Con el aumento de la esperanza de vida en muchas regiones del mundo, se prevé un incremento en el número de personas afectadas por esta enfermedad, lo que plantea un desafío para los sistemas de atención médica y la sociedad en general [4].

1.2.2 Neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por cambios macroscópicos y microscópicos en el cerebro.

1.2.2.1 Características macroscópicas

Atrofia cerebral: En la EA, se observa una reducción del tamaño del cerebro debido a la pérdida de células neuronales y conexiones sinápticas. La atrofia cerebral es especialmente evidente en regiones clave para la memoria y el pensamiento, como el hipocampo y la corteza cerebral [5, 9].

Reducción del peso cerebral: El cerebro de las personas con EA suele tener un peso reducido en comparación con un cerebro sano de la misma edad [1].

Surcos y circunvoluciones: A medida que el cerebro se atrofia, los surcos y las circunvoluciones cerebrales pueden aparecer más prominentes o irregulares [1].

1.2.2.2 Características microscópicas

A nivel microscópico, la característica distintiva de la EA es la presencia de dos tipos de lesiones neuropatológicas en el parénquima cerebral.

Placas amiloides: Son depósitos extracelulares cuyo componente principal es el péptido beta-amiloide (A β), el cual es generado a partir de la proteína precursora del

amiloide (APP) a través de vías endoproteolíticas catalizadas por una serie de complejos enzimáticos llamados secretasas [5].

Marañas neurofibrilares (MNFs): Son agregados insolubles que se forman dentro de las células nerviosas y están compuestas de una proteína llamada tau, que desempeña un papel crucial en la estabilización de los microtúbulos en las neuronas [9, 10].

Además de la presencia de placas amiloides y MNFs, la EA implica una degeneración y muerte progresiva de las células nerviosas en áreas clave del cerebro, especialmente en el hipocampo y la corteza cerebral [10]. Esta pérdida neuronal contribuye con los síntomas cognitivos y el deterioro de la función cerebral.

También se ha observado una respuesta inflamatoria en el cerebro de personas con EA. Esta inflamación involucra la activación de células de respuesta inmune, como la microglia, el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias y el daño neuronal secundario [11].

Otro elemento característico de la enfermedad es el componente neurítico, el cual también está compuesto principalmente de la proteína tau y que será descrito más adelante.

1.2.3 Marañas neurofibrilares

Las MNFs fueron identificadas inicialmente como "neurofibrillas", las cuales formaban agregados en el citoplasma de las neuronas [12]. Estas fibrillas anormales son polímeros conocidos como filamentos helicoidales apareados (FHA). Los FHA reciben su nombre debido a que están compuestos por dos filamentos enrollados en forma helicoidal uno alrededor del otro, y pueden ser observado mediante técnicas de microscopía electrónica. Entre las intersecciones de estos filamentos, existe un espacio longitudinal de aproximadamente 65-80 nm, mientras que el ancho varía, siendo de 27-34 nm en la parte más ancha y de 10-15 nm en la parte más estrecha. A medida que se acumulan, los FHA se agrupan y dan origen a agregados más grandes, que finalmente conforman las MNFs [13-15].

Además de los FHA, durante el desarrollo de la EA se pueden observar en el interior de las neuronas otro tipo de estructuras filamentosas llamadas filamentos rectos (SF - Straight Filaments). Estos SF presentan una menor periodicidad en comparación con los FHA [16].

La acumulación de las MNFs en áreas específicas del cerebro correlaciona con el grado de demencia de la persona. Así, a mayor número de MNFs, mayor grado de demencia. El principal constituyente de los FHA y los SF es la proteína tau [9, 12].

1.2.4 Componente neurítico

El componente neurítico en la EA se refiere a las alteraciones que ocurren en las prolongaciones neurales en el cerebro de personas afectadas por esta enfermedad. Algunas prolongaciones acumulan también agregados de la proteína tau y dependiendo de donde aparezcan, estas acumulaciones pueden clasificarse como neuritas distróficas e hilillos del neuropilo.

1.2.4.1 *Neuritas distróficas*

Las neuritas distróficas son estructuras anormales consideradas marcadores neuropatológicos de la enfermedad y se asocian con la degeneración neuronal y la formación de placas neuríticas. Estas estructuras consisten en fragmentos de dendritas o axones que presentan cambios morfológicos y acumulaciones anormales de la proteína tau, muchas de ellas sin que presenten FHA [16].

1.2.4.2 *Hilillos del neuropilo*

Los hilillos del neuropilo, son agregados anormales de tau a lo largo de toda la extensión de axones o dendritas, apareciendo discontinuamente y por lo general esta proteína se acumula en forma de FHA. Tanto los FHA como los SF se encuentran en estas estructuras y estos agregados contribuyen a la disfunción neuronal y la pérdida de sinapsis en el cerebro [16].

1.2.5 Proteína tau

La proteína tau, descubierta por Weingarten y colaboradores (cols.) (1975), es una proteína termoestable que pertenece al grupo de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP - Microtubule Associated Proteins) [17]. Su función principal es estabilizar los microtúbulos de las prolongaciones axonales al interactuar con la tubulina, con lo que participa en la regulación de la estabilidad dinámica de estas estructuras, manteniendo así la forma celular [12, 18].

En cuanto a su estructura, se ha observado que la proteína tau es intrínsecamente desordenada, es decir, se encuentra en un estado desplegado en su forma nativa. Su cadena polipeptídica es altamente flexible y presenta poca estructura secundaria definida. La proteína tau consta de tres dominios principales: en el extremo amino (N-) terminal se encuentra el dominio de proyección, involucrado en la interacción con la membrana plasmática neuronal; una región rica en prolinas (PRD – Proline-Rich Domain), que contiene sitios específicos de fosforilación; y un dominio de unión a microtúbulos (MBD - Microtubule Binding Domain) compuesto por tres (3R) o cuatro (4R) repeticiones de 31 o 32 aminoácidos (aa.) ubicados en la parte carboxilo (C-) terminal de la molécula [17, 18].

1.2.6 Modificaciones post-traduccionales de la proteína tau

En la EA, la proteína tau experimenta una serie de cambios posteriores a su síntesis que provocan la pérdida de su afinidad por los microtúbulos y, además, adquiere la capacidad de agregarse en el citoplasma, formando los FHA que eventualmente se convierten en las MNFs [19]. Estas modificaciones post-traduccionales (MPT) incluyen procesos como la fosforilación, acetilación, glicosilación, truncación, ubiquitinación, entre otras.

1.2.6.1 Fosforilación

Una de las MPT más investigada de la proteína tau es la fosforilación. La unión de la proteína tau a los microtúbulos está regulada por ciclos de fosforilación y desfosforilación. En la isoforma más larga de la proteína tau, existen 80 sitios potenciales de fosforilación. Algunos residuos de Treonina (Thr) o Serina (Ser) son particularmente relevantes, ya que

actúan como blancos para varias cinasas y se ha observado una fosforilación anormal de estos residuos en múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA [20, 21].

Se ha descrito que una fosforilación secuencial de diversos residuos relevantes como son Thr231, Ser235, Ser262 y Ser396/404, conllevan a que la proteína tau pierda su afinidad hacia el microtúbulo y se redistribuya en el citoplasma con una nueva capacidad para agregarse [22].

1.2.6.2 Truncación en Glutámico 391

Wischnik y cols. (1988) describieron que la proteína tau asociada a los FHA insolubles y resistentes a la pronasa presentaba un corte específico en la posición Ácido Glutámico (Glu) 391, lo que resultaba en la pérdida del extremo C-terminal de la proteína. Este fenómeno de truncamiento fue identificado mediante el uso del anticuerpo monoclonal (AcM) MN423 [23]. Investigaciones posteriores lograron identificar una subunidad mayoritaria en estos filamentos, la cual consistía en un fragmento de tau de aproximadamente 90-92 aa. de longitud y con un peso molecular de 12.5 kilodaltons (kDa) [24].

Se observó que la sobre expresión de este fragmento de la proteína tau en cultivos celulares llevaba a la muerte celular por apoptosis, lo que evidenció su alta toxicidad [25]. Es importante destacar que hasta el momento se desconoce la identidad de la proteasa responsable de esta truncación.

1.2.6.3 Truncación en Aspártico 421

Binder y cols. (2003), demostraron un segundo truncamiento de la proteína tau asociada a los FHA. Este corte se localizó específicamente en el residuo Ácido Aspártico (Asp) 421 del extremo C-terminal de la molécula de tau. La presencia de esta truncación en la proteína tau es detectada por el AcM TauC-3. Estudios realizados *in vitro* descubrieron que la caspasa-3, una enzima involucrada en la vía apoptótica, es la responsable de este corte [26, 27].

Además, se observó que la tau truncada en Asp421 presenta una tasa de polimerización más alta que la tau de longitud completa, lo que significa que tiene una mayor facilidad para agregarse [27]. Utilizando modelos celulares, se encontró que la sobre

expresión de la tau truncada en Asp421 en células de neuroblastoma conlleva a anomalías en la estructuración del citoesqueleto y finalmente induce la muerte celular por apoptosis [25].

1.2.7 Cambios conformacionales de la proteína tau

Las MPT de la proteína tau como el truncamiento junto con la fosforilación anormal son importantes porque pueden inducir cambios conformacionales locales dependientes de fosforilaciones específicas [28], así como cambios estructurales, los cuales implican el plegamiento de la porción N terminal sobre el tercer dominio repetido. De ellos se conocen dos principales:

1.2.7.1 *Cambio conformacional reconocido por el anticuerpo Alz-50*

Uno de los cambios conformacionales más tempranos y anormales descritos para tau fue detectado por el anticuerpo conformacional Alz-50, una inmunoglobulina (Ig) M pentamérica que reconoce los primeros aa. del extremo N-terminal (5-15) cuando se pliegan sobre un grupo de aa. (312–322) que abarcan el tercer dominio repetido de la molécula. Cuando se mapeó el sitio de reconocimiento, se descubrió que el epítipo de Alz-50 era discontinuo a lo largo de la molécula de tau, y la única forma en que el anticuerpo podría haber sido reactivo, sería cuando ambos epítopos se encuentran cerca uno del otro; es decir, en una molécula que presenta un plegamiento [29, 30].

En una caracterización histopatológica por inmunofluorescencia múltiple en el cerebro de pacientes con la EA, se encontró que la molécula de tau que experimenta el cambio conformacional reconocido por Alz-50 colocalizó con marcadores tempranos de la progresión de la enfermedad, entre ellos la truncación de tau en el Asp421, por lo que se le denominó cambio conformacional temprano [31].

1.2.7.2 *Cambio conformacional reconocido por el anticuerpo Tau-66*

Posteriormente, se generó otro anticuerpo conformacional mediante inmunización de ratones con filamentos de tau ensamblados *in vitro*, al cual se le denominó Tau-66 [32]. Cuando se probó el AcM Tau-66 de tipo IgM en tejido cerebral, se observaron distintas poblaciones de MNFs, reconociendo estructuras en una etapa más avanzada del

procesamiento proteolítico de tau, por lo que este anticuerpo se categorizó como detector de un cambio conformacional tardío en la molécula de tau. Al realizar el mapeo del sitio de reconocimiento de este anticuerpo, se encontró que su epítoto se localizó en la zona rica en prolinas (aa. 155-244) y, coincidentemente con el anticuerpo Alz-50, el segundo epítoto discontinuo estaba ubicado en el tercer dominio repetido (aa. 305-314). Por lo que se concluyó que este anticuerpo también reconoce un cambio conformacional de la molécula que se encuentra plegada en su extremo N-terminal [32, 33].

1.2.8 Ubiquitinación de la proteína tau

La ubiquitinación es una MPT que modula múltiples vías celulares, incluido el mantenimiento en la homeostasis de proteínas celulares [34, 35]. Consiste en la adición de una pequeña proteína (de 76 aa. de longitud) llamada ubiquitina a una proteína blanco específica. Esta modificación proteica es realizada por una maquinaria enzimática compuesta por tres tipos de enzimas: la enzima de activación (E1), la enzima de conjugación (E2) y la enzima de ligación (E3).

El proceso de ubiquitinación sigue una serie de pasos que implican la activación de la ubiquitina, su transferencia a la E2 y finalmente su unión a la proteína blanco [34, 36, 37]. Los pasos del mecanismo de ubiquitinación son los siguientes:

1. Activación de la ubiquitina: La ubiquitina es activada por la E1. En este paso, la E1 se une a una molécula de ubiquitina y consume una molécula de ATP para formar una conjugación tioéster entre el grupo C-terminal de la ubiquitina y un residuo de cisteína en la E1. Este proceso genera una forma activada de ubiquitina-E1.
2. Transferencia de la ubiquitina a la enzima E2: La ubiquitina-E1 activada se transfiere a la enzima E2. La E2 se une a la E1 mediante una interacción similar a la formación de unión tioéster, donde el residuo de cisteína de la E2 se une al grupo C-terminal de la ubiquitina activada. Esto genera una forma activada de ubiquitina-E2.
3. Transferencia de la ubiquitina de E2 a la proteína blanco: La ubiquitina unida a la E2 es transferida a la proteína objetivo por la ligasa E3. La E3 interactúa tanto con la E2 como con la proteína blanco y facilita la transferencia de la ubiquitina desde la E2 a un residuo

de Lisina (Lys) en la proteína en cuestión. Esta transferencia de ubiquitina se realiza mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el grupo C-terminal de la ubiquitina y el residuo de Lys de la proteína blanco.

4. Poliubiquitinación: En algunos casos, la ubiquitinación puede implicar la adición de múltiples moléculas de ubiquitina a la proteína blanco, formando así una cadena de ubiquitina. Estas cadenas de ubiquitina pueden tener diferentes topologías, como la monoubiquitina (una sola molécula de ubiquitina), la poliubiquitina en cadena lineal (ubiquitinas unidas en serie) o la poliubiquitina en cadena ramificada. La formación de estas cadenas de ubiquitina es mediada por diferentes ligasas E3.
5. Reconocimiento y degradación: La ubiquitina unida a la proteína blanco sirve como señal de reconocimiento para las proteínas del sistema proteasomal, una maquinaria de degradación intracelular.

En cerebros humanos diagnosticados con EA, es común encontrar agregados de tau que han sido modificados con ubiquitina [38-41]. Aunque el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS –Ubiquitin-Proteasome System) y el sistema autofagia-lisosoma (ALS – Autophagy-Lysosome System) normalmente regulan la eliminación de agregados de proteínas mal plegadas para mantener la proteostasis, en la EA se observa un deterioro clave en el funcionamiento del UPS [42]. Esto conlleva a la acumulación de niveles elevados de proteínas tau ubiquitinadas que no son degradadas. La evidencia respalda la idea de que la tau ubiquitinada es un componente de las lesiones patológicas en los cerebros con EA [40]. Estos agregados de tau pueden inducir estrés proteotóxico y agravar la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo [43].

Se han identificado varios sitios de ubiquitinación en la proteína tau. Un análisis proteómico pionero señaló tres residuos de Lys en tau como posibles sitios de ubiquitinación, estos son Lys254, Lys311 y Lys353 [44]. Recientemente, utilizando espectrometría de masas se identificaron un total de 28 sitios de ubiquitinación en la molécula de tau en muestras de cerebro humano con EA, la mayoría de estos sitios se

encuentran en el PRD y en el MBD [45]. La ubiquitinación en estos sitios específicos podría tener un impacto en la función y la estabilidad de la proteína tau.

Con el fin de comprender y caracterizar mejor la ubiquitinación de tau junto con la evolución de la EA, en un estudio previo realizado en este laboratorio, se investigó si la ubiquitinación de tau se asociaba a otras modificaciones de la molécula que se relacionan a etapas particulares en la maduración de las MNFs en el hipocampo de individuos con EA. Mediante la utilización de inmunomarcaje con diversos anticuerpos dirigidos a diferentes MPT de tau, se descubrió que alrededor del 30% del total de las MNFs estaba asociada a ubiquitina [46]. Estos hallazgos se interpretaron como un intento fallido de la ubiquitinación de tau para ser procesada por el UPS.

En este estudio se corroboró que la presencia de ubiquitina se relacionaba con marcadores específicos de tau fosforilada. Por otro lado, también se estableció una fuerte conexión entre la ubiquitina y el evento de truncamiento conocido en la posición de Asp421. Estos resultados sugirieron que la proteína tau en las MNFs puede estar sometida tanto a procesos apoptóticos como proteosomales. Contrariamente, la inmunoreactividad de la ubiquitina presentó una conexión débil con el truncamiento de tau en el Glu391, lo que indica que este evento de proteólisis podría ser independiente de la actividad proteosomal [46]. En consecuencia, se podría concluir que la ubiquitinación específica de la proteína tau tiene lugar en las MNFs en las etapas tempranas e intermedias de su desarrollo.

2 Justificación

La ubiquitina es uno de los principales marcadores de degradación de proteínas en las células y se ha observado que se asocia covalentemente con el material neurofibrilar insoluble en la patología de la EA. Previamente, en un trabajo realizado por García-Sierra y cols. (2012) se estudió la asociación de la ubiquitina con la proteína tau modificada por hiperfosforilación y truncación en la patología neurofibrilar de la EA. La fosforilación y la truncación de tau conducen a que la proteína pierda su conformación nativa y forme uno de dos plegamientos conocidos, el cambio conformacional temprano reconocido por el anticuerpo Alz-50 y el cambio conformacional tardío reconocido por el anticuerpo Tau-66. Por esta razón, en el presente estudio se pretendió evaluar la relación entre la ubiquitinación de tau y el desarrollo de sus cambios conformacionales durante la progresión de la enfermedad.

3 Hipótesis

La ubiquitinación en la EA es una MPT que sufre la proteína tau en las etapas iniciales de la progresión de la enfermedad, por lo que se debe asociar a otras modificaciones tempranas, como sería el cambio conformacional reconocido por el anticuerpo Alz-50.

4 Objetivo General

Determinar la relación que existe entre la ubiquitinación de la proteína tau y sus cambios conformacionales que se presentan en la EA.

4.1 Objetivos Particulares

1. Determinar la expresión de los cambios conformacionales reconocidos por los anticuerpos Alz-50 y Tau-66, y los patrones de asociación con ubiquitina durante la maduración de las MNFs.
2. Evaluar la progresión de los cambios conformacionales reconocidos por los anticuerpos Alz-50 y Tau-66 en la EA, y su co-existencia con ubiquitina en el componente neurítico del tejido cerebral.
3. Analizar la distribución de la ubiquitina en los elementos neuropatológicos y su contribución en la EA.

5 Métodos

5.1 Tejido Cerebral

Se utilizaron secciones de hipocampo de 30 μm de grosor de cerebros obtenidos postmortem de sujetos que padecieron de EA y de demencia mixta. Las secciones se obtuvieron por criotomía y en flotación, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en Buffer Salino de Fosfatos (PBS) y se mantuvieron a 4 ° C.

El tejido se adquirió del Hospital Psiquiátrico Bohnice, en la República Checa, el cual fue obtenido y manejado de acuerdo a lo señalado por la Declaración de Helsinki y su uso para la investigación fue aprobada formalmente por el comité de ética local del Centro Psiquiátrico de Praga, República Checa, de acuerdo con las Leyes 129-2003 y 130-2003 [47]. Las características de los casos se presentan en la tabla 1.

5.2 Inmunohistoquímica

Las secciones de hipocampo de 30 μm de espesor se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos para eliminar el fijador. Se pre-trataron con Buffer Salino de Citratos (SSC) en baño María en ebullición por 15 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, con la finalidad de inducir la exposición de sitios antigénicos presentes en el tejido y se lavaron nuevamente con PBS. Posteriormente, se realizó un tratamiento con Sudán Black B al 0.1% en etanol al 70% por 10 minutos para bloquear la autofluorescencia basal del tejido. En este tratamiento se realizaron lavados con etanol al 70% por 10 minutos, antes y después de la exposición a la solución de Sudán. Para el bloqueo de sitios inespecíficos, las muestras se incubaron en una solución de leche descremada al 1% y suero de caballo al 3% en Buffer Salino de Tris (TBS) con Tritón (Tx) al 0.2% por 20 minutos a temperatura ambiente. Se dio un lavado de 5 minutos con TBS-tritón al 0.2% y se realizó la inmunotinción sencilla, doble o triple, según el caso. Los anticuerpos primarios, diluidos en TBS-tritón al 0.2%, se incubaron durante toda la noche a 4 ° C. Las características y diluciones de los diferentes anticuerpos utilizados se enlistan en la tabla 2.

Tabla 1. Características de los casos utilizados en el estudio

Caso	Género	Edad	Neuropatología	Epikrisis	Muerte	Comorbilidades
10	F	87	C	0	ICB	A
11	F	91	C	0	ICB	A, H
12	F	64	AD	# #	ICB	A, H, O, D
50	M	83	AD + MID	#	ICB	A, H
58	M	78	AD + MID	#	ICB	A
60	M	78	AD + MID	# # #	ICB	A, H
82	M	88	AD	# #	ICB	A, H
99	F	99	AD	# # #	ICB	A, H, O
102	M	77	AD + MID	# # #	BN	A
109	F	85	AD + MID	# # #	ICB	A
115	M	80	AD	# #	ICB	A, O
117	F	81	AD + MID	# #	BN	A
121	F	88	AD + MID	# # #	ICB	A, H, D
136	F	94	AD + MID	# # #	ICB	A, H, D
137	F	84	AD + MID	0	ICB	A
140	F	77	AD	# # #	ICB	A
179	F	82	AD	# # #	ICB	A, D
180	F	81	AD	# # #	ICB	A
192	F	82	AD	# #	BN	A
198	F	77	AD + MID	#	ICB	A, H, D
199	M	86	AD + MID	# #	ICB	A, H
201	F	82	AD + MID	# # #	ICB	A, H
205	M	87	AD + MID	# # #	ICB	A
212	M	95	AD + MID	# # #	ICB	A, H
229	F	75	AD	# # #	ICB	A

F: Femenino

M: Masculino

MID: Multi-Infarct Dementia

ICB: Insuficiencia Cardíaca Bilateral

BN: Bronconeumonía

A: Aterosclerosis universal grado III

H: Hipertensión arterial

O: Obesidad proporcional

D: Diabetes mellitus no-insulinodependiente

Tabla 2. Características de los anticuerpos utilizados en el estudio

Anticuerpo	Epítotope	Especie	Dilución	Referencia
Anti-ubiquitina	Mono y Poli-ubiquitina	Conejo-Policlonal	1:200	Millipore Corp.
Alz-50	Cambio conformacional de tau (5-15; 312-322)	Ratón IgM	1:5000	Carmel, 1996 [29]
Tau-66	Cambio conformacional de tau (155-244; 305-314)	Ratón IgM	1:10000	Ghoshal, 2001 [32]
PHF-1	Fosforilación de tau (396, 404)	Ratón IgG	1:10000	Otvos, 1994 [48]
Tau-13	Extremo N terminal de tau (9-18)	Ratón IgG	1:5000	García-Sierra, 2003 [31]

Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tx al 0.2% y después con PBS- Tx al 0.2%. En seguida, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG o anti-IgM acoplados a FITC, TRITC o Cy5 durante 120 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad a una concentración de 1:100 en PBS- Tx al 0.2%. Por último, las muestras se lavaron varias veces con PBS- Tx al 0.2% y se montaron con medio Vectashield.

En algunos experimentos, las tinciones sencillas compuestas por proteína ubiquitina o tau se contratiñeron con Rojo de Tiazina (TR) al 0.001% para corroborar la naturaleza fibrilar de las proteínas agregadas.

5.3 Análisis de Microscopía Confocal y Epifluorescencia

Los cortes de tejido procesados fueron analizados por epifluorescencia a través de una lente 20X (Apertura Numérica [NA]: 0.5) y una lente Planor-Fluor 40X (NA: 0.75) de un microscopio Nikon Eclipse-80i (NikonCorp., Tokio, Japón). Las imágenes se registraron con una cámara Nikon digital sight-DG-Ri1 controlada con el software Nikon NIS-Elements AR-3.0-SP7 incluido en el sistema (Nikon). Para el marcaje múltiple, seccionamiento óptico, colocación y el análisis crítico de estructuras inmunomarcadas, se utilizó un microscopio de láser confocal Leica-TCP-SP8 con una lente 63X (NA: 1.4) OIL PH3 CS2 HC PL APO (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Las longitudes de onda de excitación y emisión

fueron: FITC (488 y 525 nm), TRITC (540 y 570 nm) y Cy5 (673 y 707 nm). Las imágenes resultantes se obtuvieron y analizaron utilizando el software Leica Confocal-LAS-AF Lite versión 2.x.

5.4 Cuantificación en MNFs

Se determinó cuantitativamente el número de estructuras inmunomarcadas contando directamente los objetos en un área de muestreo que cubre 86 mm² en el hipocampo. El número de estructuras se expresó como la media y el error estándar en 5 sub-áreas muestreadas. La cuantificación de la colocalización se expresó como la proporción de MNFs doblemente marcados (positivos a ubiquitina y anticuerpos dependientes de la conformación tau) con respecto al número total de MNFs.

5.5 Cuantificación en Neuritas

Para la determinación de la patología neurítica, las imágenes registradas de la misma área se procesaron digitalmente con el software ImageJ para calcular la proporción de neuritas inmunomarcadas y el programa Nikon NIS-Elements AR-3.0-SP7 para el análisis de las colocalizaciones. Los patrones de colocalización se analizaron y expresaron como el porcentaje de neuritas doblemente marcadas con respecto al área total ocupada por las estructuras fluorescentes (con marca simple o doble).

5.6 Análisis Estadístico

Para las comparaciones de parámetros entre 2 grupos, se utilizó la prueba paramétrica de "t" de Student. Las diferencias entre varios grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía y una posterior prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism v3.0.

6 Resultados

6.1 Análisis Inmunohistoquímico de Marañas Neurofibrilares

Para realizar este trabajo, se utilizó el tejido cerebral proveniente del antiguo Centro Psiquiátrico de Praga, el cual corresponde a una población de 25 individuos que desarrollaron la EA y casos de demencia mixta (Tabla 1). El tejido cerebral de esta población de sujetos fue utilizado previamente en estudios de nuestro grupo de trabajo [46]. En el presente trabajo se evaluó la asociación de diversos marcadores neuropatológicos en el tejido cerebral, a través del análisis de los patrones de colocación entre una batería diversa de anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados con diferentes porciones de la molécula tau y contra ubiquitina (Tabla 2).

El estudio se enfocó en el análisis anatómico de la formación del hipocampo, debido a que esta región es una de las que primordialmente son más afectadas en la EA y particularmente en el área CA1 se ha encontrado que pueden existir MNFs con diferente grado de maduración, con lo cual se favorece el análisis de la progresión de los cambios que sufre la proteína tau durante su agregación en la forma de MNF [49].

6.1.1 La ubiquitina es un componente conspicuo que se presenta en las MNFs del tejido cerebral de sujetos con la EA

En el cerebro de los pacientes con EA se ha descrito que la tau anormalmente agregada se encuentra ubiquitinada, y se ha evidenciado que esta modificación se puede encontrar en diversas estructuras fibrilares que conforman la patología neurofibrilar de la enfermedad. Con el fin de comprender y caracterizar mejor la ubiquitinación de tau durante la evolución de la EA, se realizó un inmunomarcaje con el anticuerpo policlonal anti-ubiquitina (Tabla 2) que detecta tanto a la ubiquitina en forma monomérica, como a cadenas de poli-ubiquitina. En el panel A de la Figura R1, podemos observar una imagen panorámica representativa del tejido cerebral de un caso que padeció la EA, obtenida por inmunofluorescencia y microscopía confocal, la cual corresponde al área CA1 del

hipocampo donde se muestra una cantidad considerable de estructuras neurofibrilares, principalmente MNF, reconocidas por el anticuerpo anti-ubiquitina. A mayor amplificación (Figura R1, paneles B y C), se aprecia la apariencia compacta y fibrilar de una MNF dentro de la célula, con la típica silueta en forma de flama que dibuja la morfología de las neuronas piramidales del hipocampo. En el panel C, se puede apreciar una MNF (flecha) que muestra haces fibrilares menos compactos de FHA que ocupan el área del soma neuronal. En el panel D, se puede identificar claramente el espacio ocupado por el núcleo neuronal rodeado por los haces de la MNF. De estas imágenes se confirma que la ubiquitina está presente en un número considerable de MNFs intracelulares, como previamente se ha descrito por otros autores [38, 46].

6.1.2 El cambio conformacional temprano de tau reconocido por el anticuerpo Alz-50 está ampliamente presente en las MNFs del hipocampo de pacientes con EA

Durante la progresión de la EA, la proteína tau sufre de cambios en su estructura molecular que implican plegamientos de la proteína sobre sí misma. Esta particularidad de tau se evidenció al generarse anticuerpos que reconocieron epítopes discontinuos y alejados uno del otro, como el anticuerpo Alz-50 [29], que demostró un cambio conformacional de la proteína tau, el cual involucra el acercamiento del extremo N-terminal sobre el tercer dominio repetido. Este plegamiento patológico se asoció con las etapas iniciales de la EA [31].

Para corroborar la presencia de este cambio conformacional de tau en la patología neurofibrilar de estos casos, similarmente se analizó el tejido cerebral por inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando el AcM Alz-50 (Tabla 2). El análisis reveló que en el área CA1 del hipocampo existe una gran cantidad de MNFs, así como otras estructuras neurofibrilares (neuritas distróficas e hilos de neuropilo), compuestas de la proteína tau, presentando el cambio conformacional temprano en su molécula (imagen panorámica de un caso representativo en el panel A de la Figura R2). En el panel B se muestran MNFs que exhiben la distintiva forma de flama, y a mayor aumento (panel C) se puede apreciar la proyección apical de la neurona (flecha) y algunos agregados fibrilares

distribuidos de forma perinuclear. Estos últimos, son característicos de las etapas iniciales de la formación de las marañas (panel D, cabeza de flecha). Debido a su apariencia fibrilar compacta, estas MNFs decoradas por Alz-50 son de tipo intracelular.

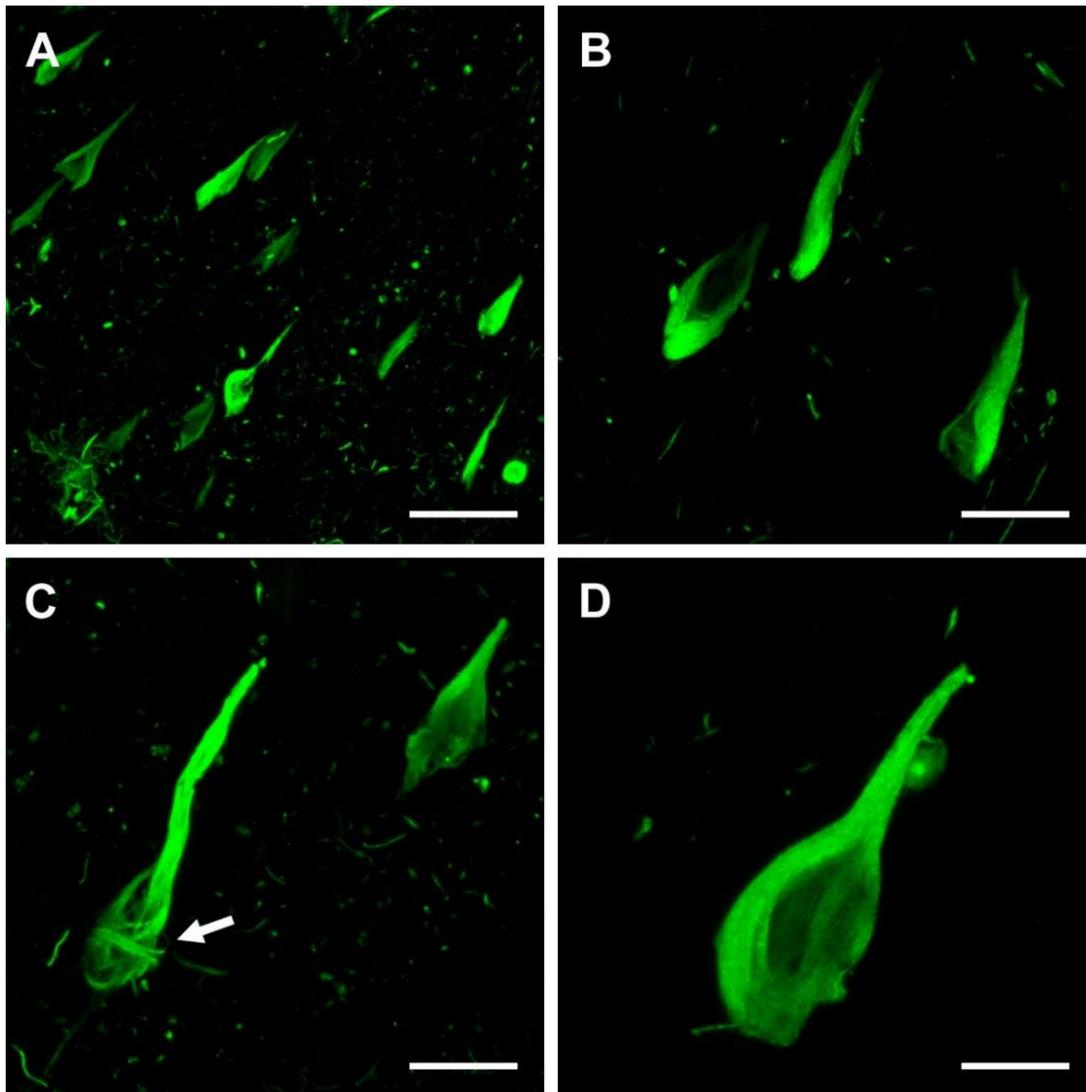


Figura R1. MNFs asociadas a ubiquitina presentes en el hipocampo de individuos con EA. Imágenes de microscopía confocal que muestran inmunomarcado sencillo con el anticuerpo policlonal anti-ubiquitina. A) Imagen panorámica representativa de MNFs ubiquitinadas en el área CA1 del hipocampo. B) MNFs intracelulares que presentan la típica forma de flama. C) La flecha señala los haces de FHA en el soma de una neurona. D) MNF donde se puede identificar el espacio ocupado por el núcleo neuronal. Barras: A) 58 μm , B) 23 μm , C) 24 μm y D) 12 μm .

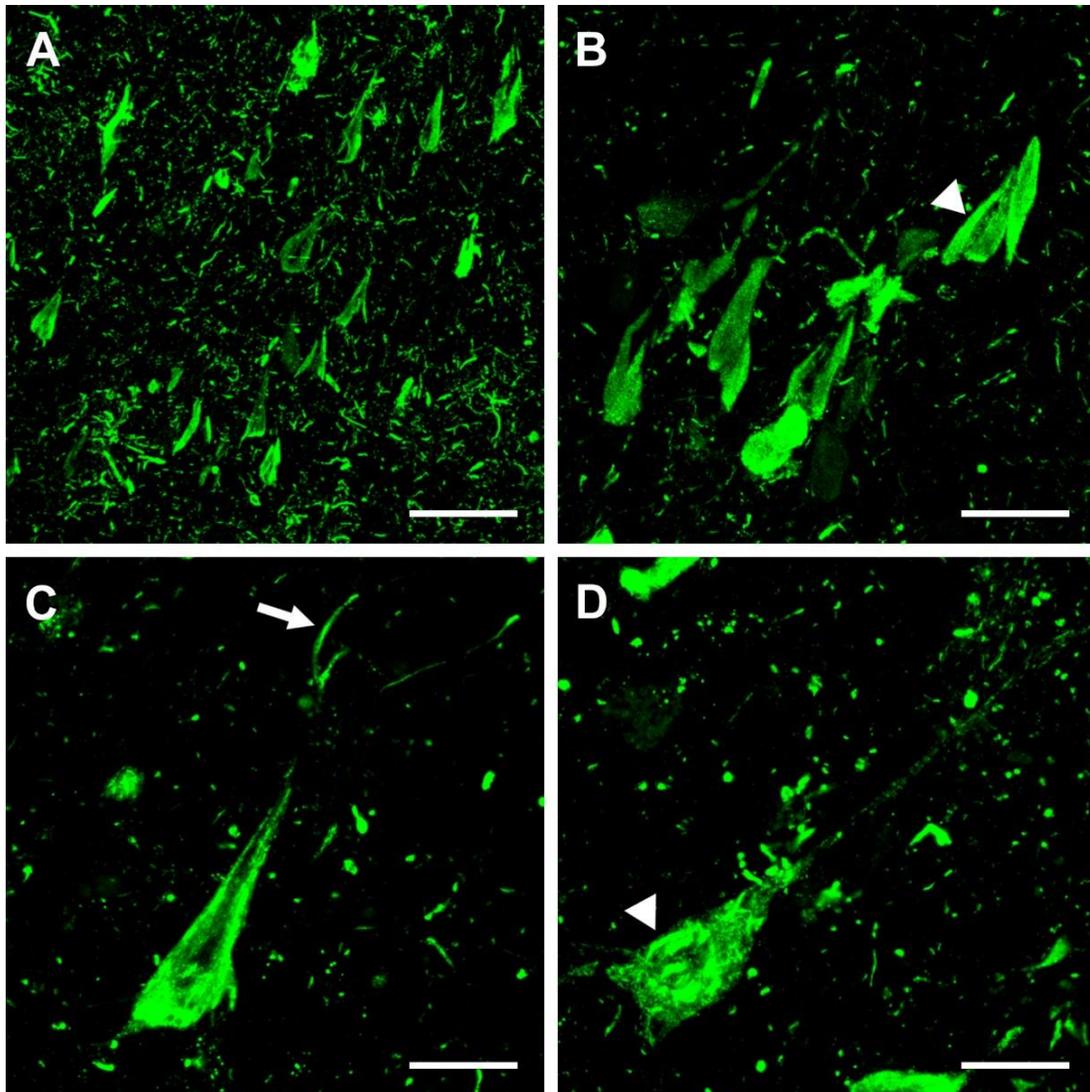


Figura R2. MNFs compuestas de tau con cambio conformacional reconocido por el AcM Alz-50 presentes en el hipocampo de individuos con EA. A) Imagen de microscopía confocal panorámica representativa de MNFs en el área CA1 del hipocampo que presenta inmunomarcaje sencillo con el AcM Alz-50. B) MNFs intracelulares que presentan la típica forma de flama. C) MNF donde se puede apreciar la proyección apical de la neurona (flecha). D) MNF donde se puede identificar algunos agregados fibrilares distribuidos de forma perinuclear (cabeza de flecha). Barras: A) 65 μm , B) 22 μm , C) y D) 15 μm .

6.1.3 El cambio conformacional tardío de tau reconocido por el anticuerpo Tau-66 se presenta en menos MNFs del hipocampo de individuos con EA

Existe un segundo cambio conformacional de la proteína tau que no depende de sus extremos N- y C-terminal, el cual se encuentra asociado con MNFs presentes en etapas intermedias y avanzadas de la enfermedad [31]. En este cambio conformacional la zona rica de prolinas se asocia al tercer dominio repetido [50]. Para conocer el patrón de agregación y distribución de esta molécula conformacionalmente alterada, se realizaron inmunotinciones con el AcM Tau-66 (Tabla 2) y se analizaron por microscopía confocal.

En la imagen panorámica de la Figura R3 se aprecia la inmunoreactividad de Tau-66 en el área CA1 del hipocampo de un caso representativo con EA, la cual se observa en MNFs y en un material más amorfo y de forma punteada sobre el espacio citoplásmico. Para analizar este patrón de agregación, se realizó una contratinción con el colorante rojo de tiazina (TR - Tiazin Red), un colorante que se une a agregados fibrilares de las proteínas (tau y amiloide- β), desarrollando una conformación β -plegada. Con esta estrategia se pudo corroborar la presencia de tau conformacionalmente alterada (positiva a la detección con Tau-66) en MNFs. Además, en este procedimiento se introdujo como tercer marcador al AcM PHF-1 (Tabla 2), para identificar a la proteína tau hiperfosforilada; puesto que, como se ha demostrado previamente, este sitio de fosforilación se presenta en moléculas de tau asociada a MNFs en diferente grado de maduración corroborándose por su detección diferencial con TR. Con esta estrategia metodológica pudimos discernir entre dos tipos de agregados de tau reconocidas por el anticuerpo Tau-66: 1) agregados citoplásmicos de tau de tipo granular-amorfo, y 2) estructuras fibrilares y compactas que presentaron una conformación β -plegada al ser positivas al TR (MNF), como se muestran en las Figuras R3 y R4. Con este marcaje múltiple fue más fácil discernir entre estructuras fibrilares y agregados amorfos de tau positivos a Tau-66.

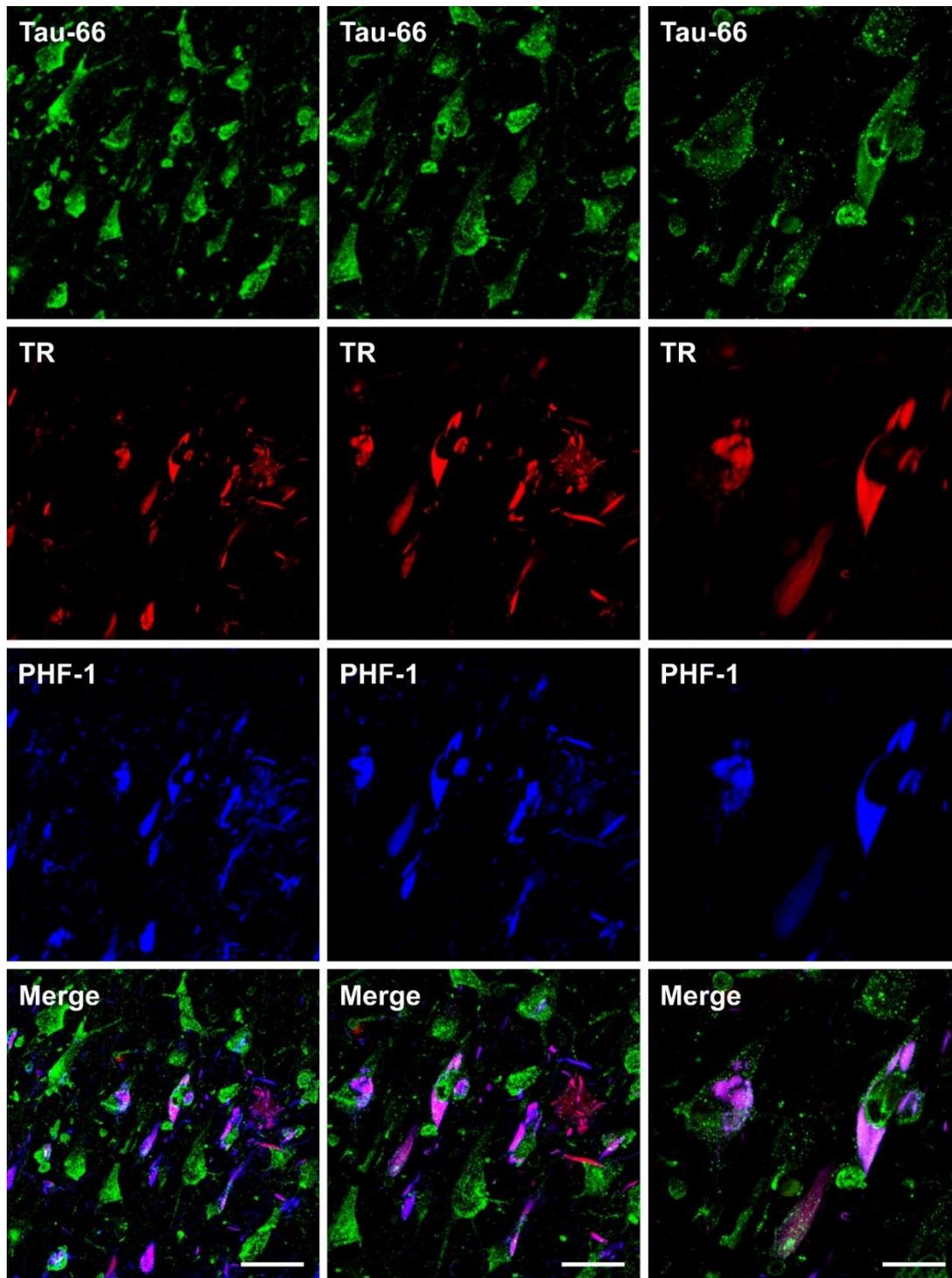


Figura R3. MNFs compuestas de tau con cambio conformacional reconocido por el AcM Tau-66 presentes en el tejido cerebral de individuos con EA. En la imagen panorámica se aprecia la inmunoreactividad de Tau-66 en el área CA1 del hipocampo de un caso representativo con EA, contrateñido con el colorante TR que reconoce estructuras con conformación β -plegada y marcadas con el AcM PHF-1 que reconoce tau fosforilada. En la imagen se observan MNFs y un material amorfo y granular en el espacio citoplásmico de neuronas. Barras: A) 65 μm , B) 30 μm , C) 12 μm .

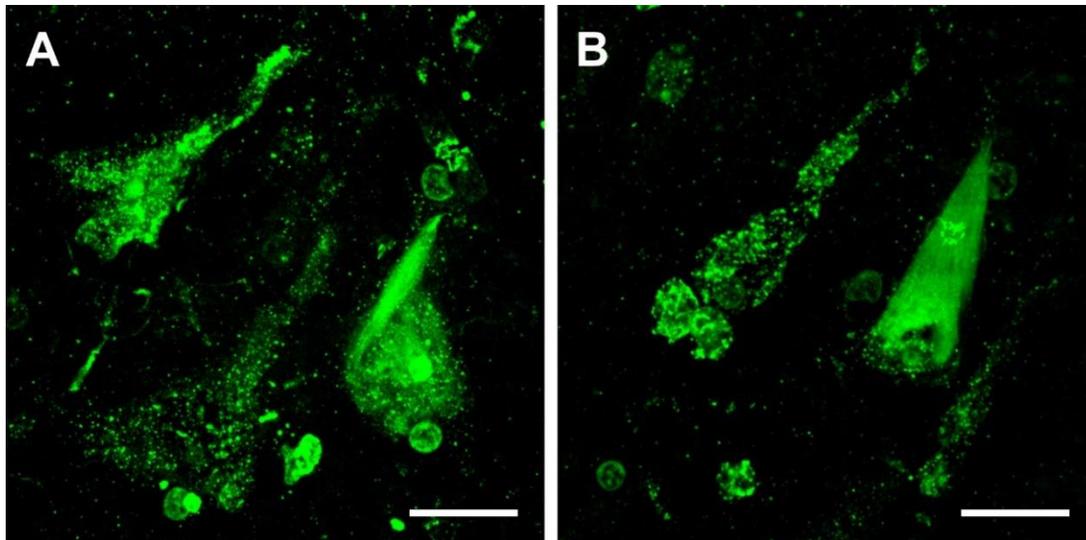


Figura R4. MNFs compuestas de tau con cambio conformacional reconocido por el AcM Tau-66 presentes en el tejido cerebral de individuos con EA. Imágenes de microscopía confocal donde se aprecia la inmunoreactividad de Tau-66 en el área CA1 del hipocampo de un caso representativo con EA. Barras: A) y B) 12 μ m.

6.1.4 El cambio conformacional tardío de tau detectado por el anticuerpo Tau-66 se presenta con baja frecuencia en MNFs

Para dar representatividad a las observaciones por inmunomarcaje, se cuantificaron las poblaciones de MNFs y se compararon entre su condición de ser reconocidas por cada uno de los anticuerpos utilizados. En la Figura R5, se presenta el análisis gráfico de la cuantificación de MNFs expresada en un área de 0.086 mm². No se presentó diferencia significativa entre el número de MNFs compuestas de tau fosforilada (positivas a PHF-1) y aquellas con tau presentando el cambio conformacional temprano (positivas a Alz-50). El número de MNFs ubiquitinadas es significativamente menor a las que presentaron las modificaciones previas de la proteína tau ($P < 0.001$).

La diferencia más significativa, sin embargo, se observó en el número de MNFs compuestas por tau con cambio conformacional tardío (positivas a Tau-66), siendo mucho menor que los grupos con anticuerpos α -ubiquitina, PHF-1 y Alz-50 ($P < 0.001$). Este resultado corrobora que ésta modificación se presenta con menor frecuencia.

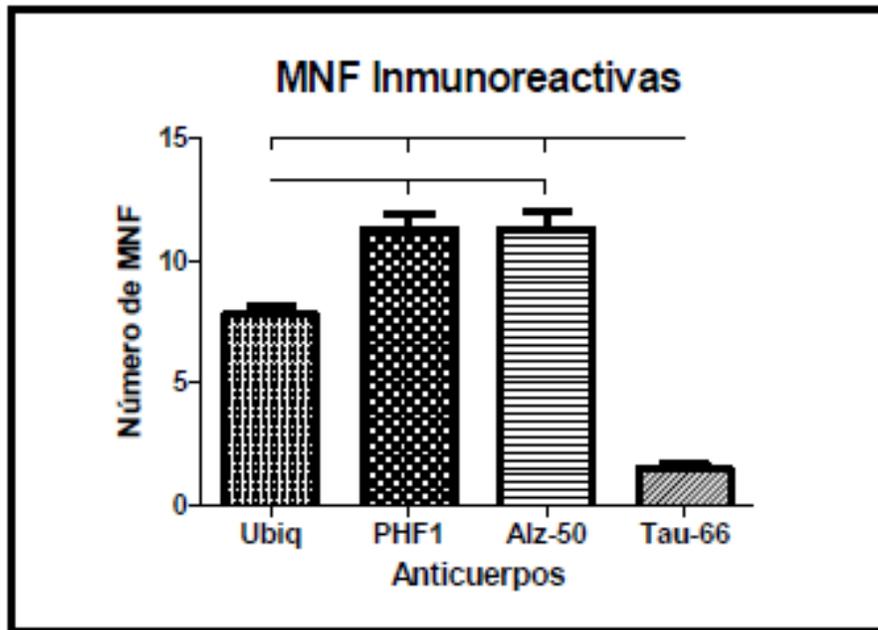


Figura R5. Cuantificación de MNFs que presentan diferentes modificaciones de la proteína tau. Las MNFs inmunorreactivas se contaron en la región CA1 del hipocampo y se expresaron como el número de estructuras en un área de 0.086 mm². En el eje x tenemos a los diferentes anticuerpos utilizados y en el eje y las medias de cada parámetro con su error estándar. Las diferencias significativas se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para determinar diferencias específicas entre todos los anticuerpos. (P <0.001).

6.1.5 Ubiquitina se asocia al cambio conformacional temprano de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 en mayor grado que al cambio conformacional tardío reconocido por el anticuerpo Tau-66

Para definir mejor la naturaleza de las estructuras neurofibrilares (MNFs) en el tejido cerebral de los individuos con EA que forman parte de este estudio, se evaluó la asociación entre ubiquitina y las MPT de tau, para lo cual las secciones de tejido se procesaron para doble marcaje inmunofluorescente. En la Figura R6, observamos la asociación de los eventos de ubiquitinación (canal verde) y fosforilación de tau (canal rojo) de típicas marañas intracelulares en forma de flama, en las cuales predominó la asociación de estos dos marcadores en todas ellas (amarillo en canal de colocalización), como previamente se describió [46].

En el caso del cambio conformacional temprano reconocido por el anticuerpo Alz-50 (canal rojo) y su asociación con ubiquitina (canal verde), observamos que las estructuras reconocidas son predominantemente MNFs intracelulares y los patrones de asociación

fueron más variables dentro de estas estructuras. Como se muestra en la Figura R7, encontramos MNFs que exhiben una sola MPT (cabeza de flecha), o MNFs con expresión de estos dos marcadores (amarillo) a intensidades variables. También encontramos estructuras donde la colocalización se da de manera parcial (flecha), es decir, ambos marcadores coexisten en la misma MNF, sin estar presentes en la misma molécula de tau.

Por otro lado, en el caso de la asociación de ubiquitina (canal verde) y el cambio conformacional tardío detectado por el anticuerpo Tau-66 (canal rojo), se presentó una baja colocalización de estos marcadores (Figura R8, panel A) y las MNFs se presentaron como poblaciones independientes. No obstante, en algunos casos en la misma célula se observó que coexistían MNFs compuestas de ubiquitina colocalizando solo parcialmente con tau presentando el cambio conformacional tardío (Figura R8, panel B).

Estas observaciones apoyan la hipótesis de la asociación de ubiquitina con marcadores tempranos de la progresión de la EA [46].

El análisis cuantitativo de la asociación de ubiquitina con las diferentes modificaciones de tau se muestra en la gráfica A de la Figura R9, donde se obtuvo el porcentaje de MNFs compuestas por tau conformacionalmente alterada y que presentaron ubiquitinación. Los resultados nos indican que existió una proporción similar de MNFs ubiquitinadas que presentaron a tau fosforilada (positivas a PHF1) y a tau conformacionalmente alterada reconocida por el anticuerpo Alz-50 (58.3% y 58.2%, respectivamente). Contrariamente, se encontró una población significativamente menor de MNFs ubiquitinadas que estuvieran compuestas estructuralmente por filamentos de tau presentando el cambio conformacional tardío reconocido por Tau-66 (15.8%). El análisis de varianza utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey mostró que las diferencias tienen una significancia de: $P < 0.001$.

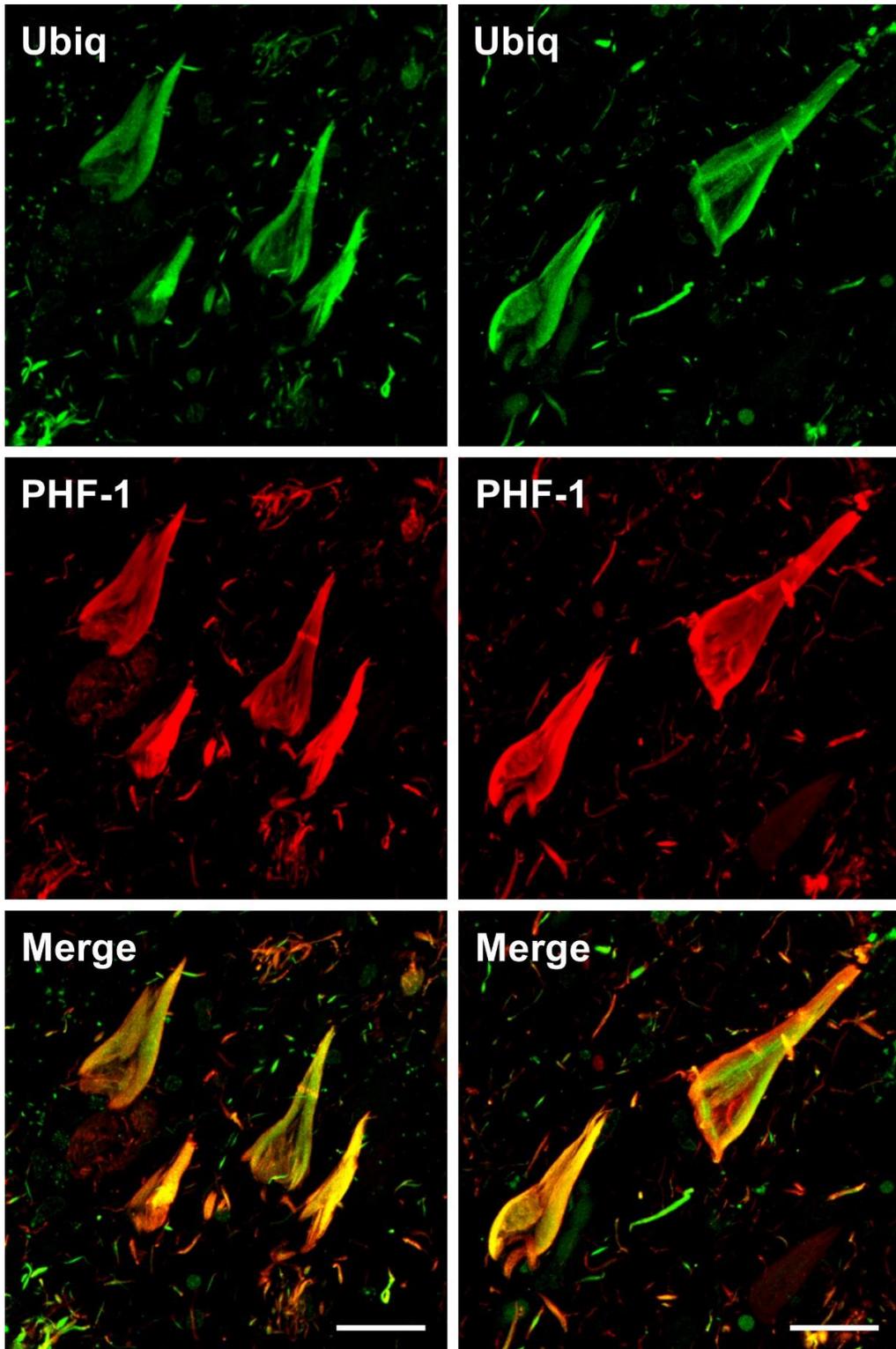


Figura R6. La ubiquitina se asocia a la tau fosforilada en las MNFs. Inmunofluorescencias de doble marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina y el marcador de tau fosforilada PHF-1. Barras: A) 24 μm y B) 16 μm .

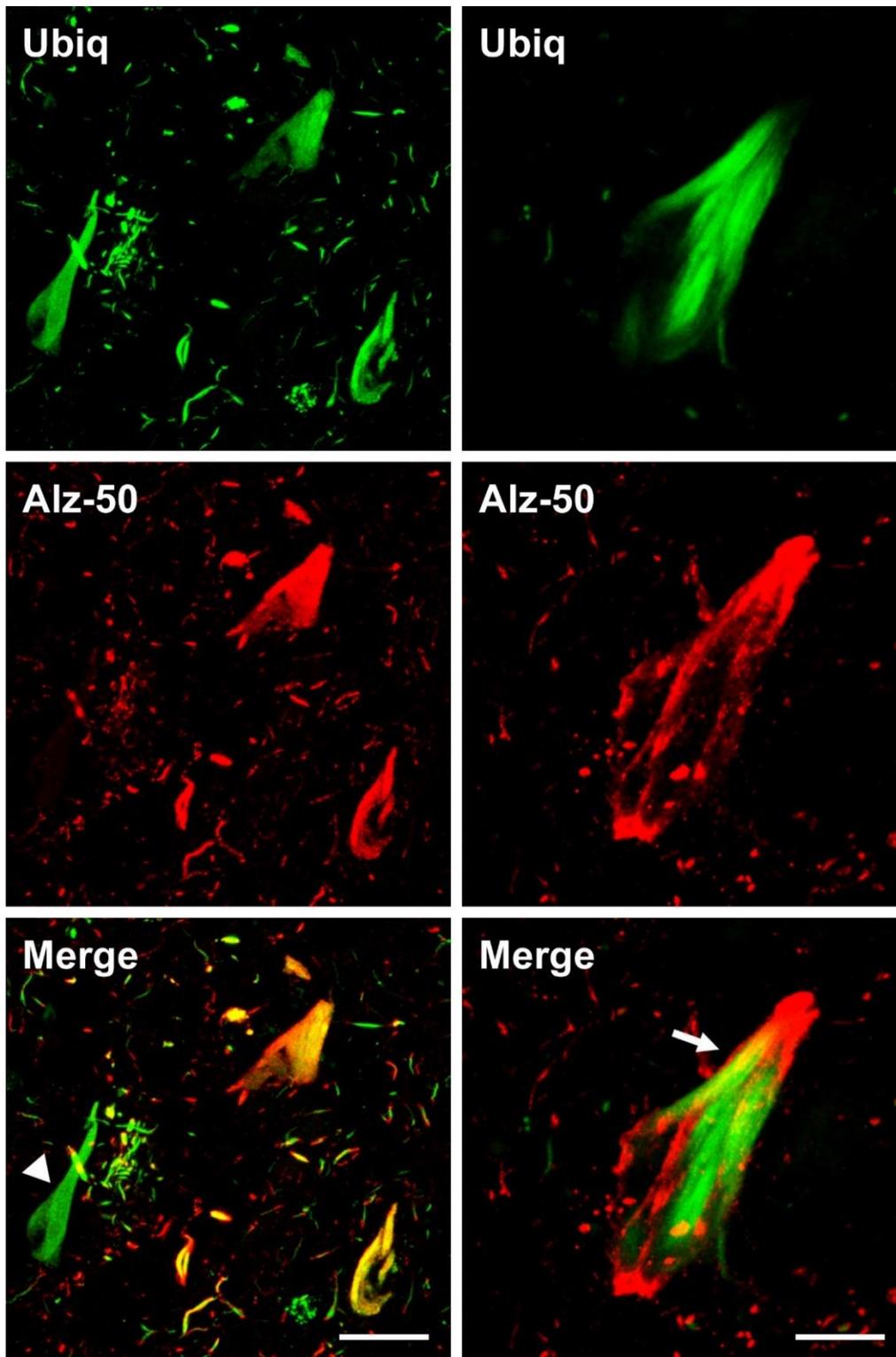


Figura R7. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 en MNFs. Inmunofluorescencias de doble marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina y el AcM Alz-50. Barras: A) 29 μm y B) 12 μm .

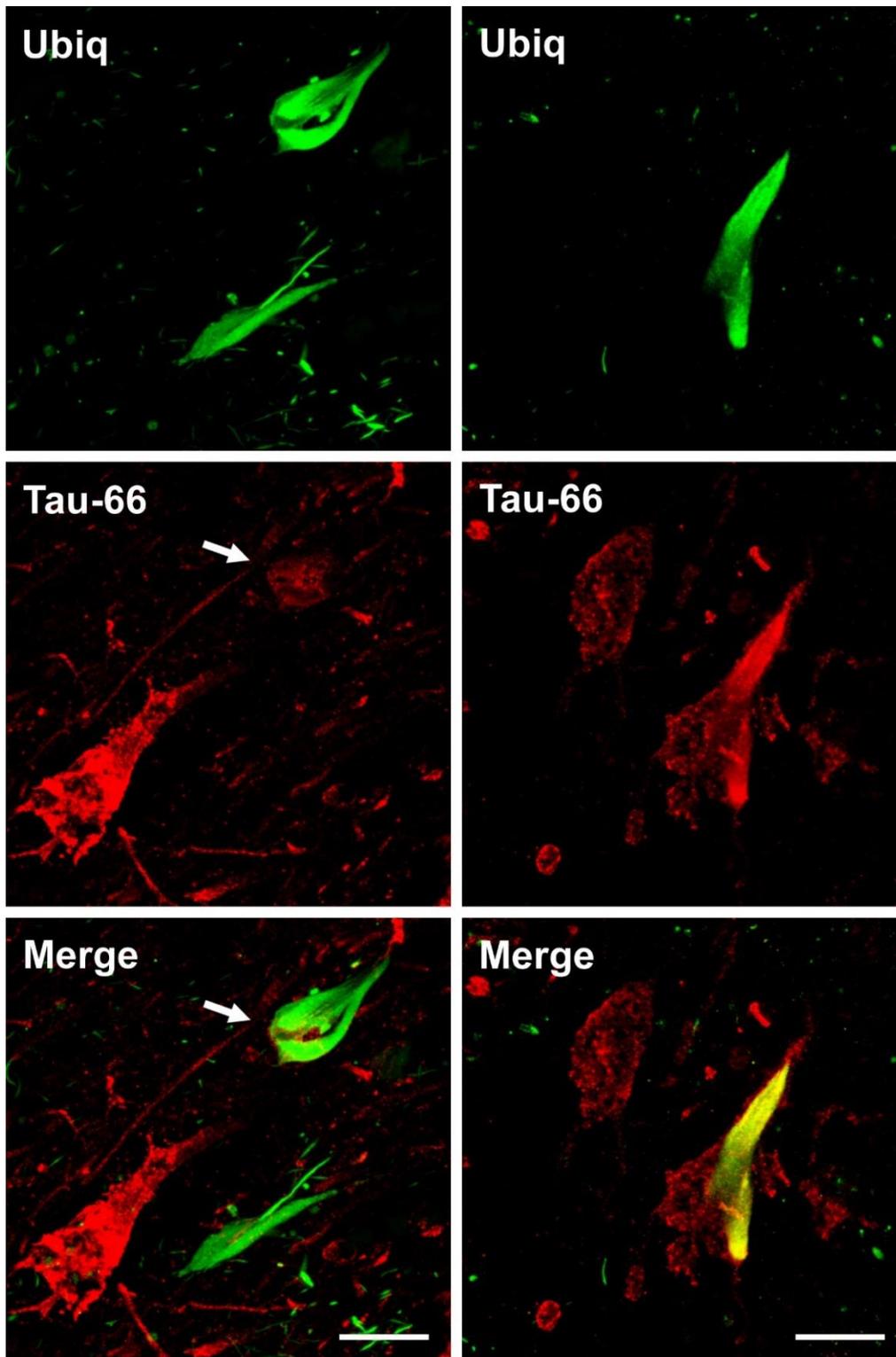


Figura R8. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Tau-66 en MNFs. Inmunofluorescencias de doble marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina y el AcM Tau-66. Barras: A) 23 μm y B) 12 μm .

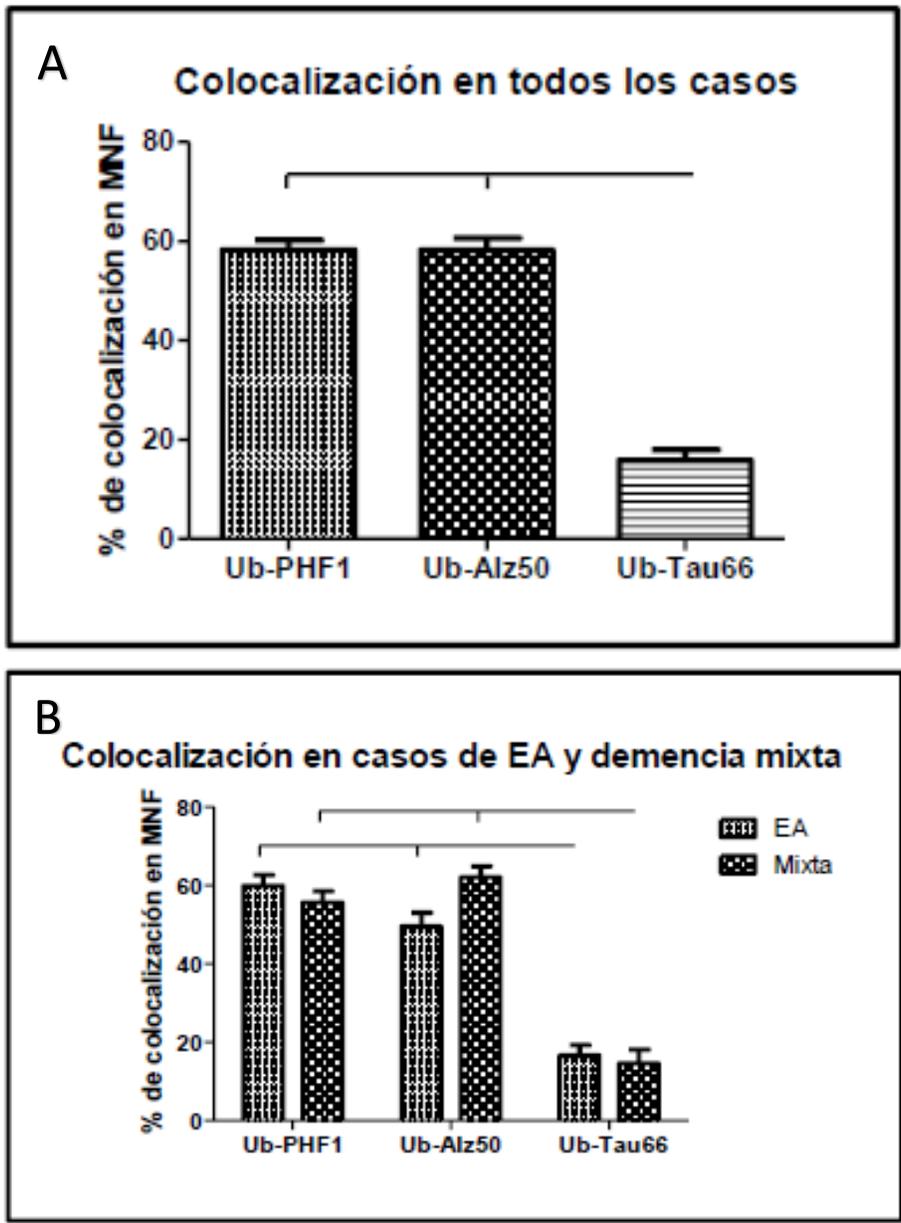


Figura R9. Análisis cuantitativo de las asociaciones de ubiquitina con las distintas modificaciones de tau. A) En todos los casos dementes se determinó el porcentaje de colocalización de los pares de anticuerpos. La cantidad de MNFs que presentaron colocalización de los anticuerpos Ubiquitina-Tau66 fue significativamente menor con respecto a las otras combinaciones ($p < 0.001$). B) La población de casos se separó en casos con EA y demencia mixta y se observó el mismo patrón ($p < 0.001$). Las diferencias significativas se calcularon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey.

Estas observaciones se obtuvieron tomando como universo la totalidad de los casos evaluados. Sin embargo, recordemos que el conjunto de casos no es homogéneo, por lo que el grupo de pacientes con demencia se dividió en casos con EA y casos con demencia mixta. En ambos grupos, comparativamente se analizaron los patrones de asociación descritos previamente. En la gráfica B de la Figura R9 nuevamente observamos que, para ambos grupos de casos, hay una reducción significativa de la asociación entre ubiquitina y tau con cambio conformacional tardío (Ub-Tau66) ($P < 0.001$). Estos resultados corroboran que la ubiquitinación de tau se asocia más específicamente a su cambio conformacional temprano (Alz-50).

De manera específica, en el grupo de pacientes que se diagnosticaron sólo con EA, el patrón de colocalización fue Ub-PHF1>Ub-Alz50>Ub-Tau66, con porcentajes de colocalización de: 59.9%, 49.6% y 16.6%, respectivamente. Mientras que, para el grupo diagnosticado con demencia mixta, se observó un aumento en la cantidad de MNFs que presentaron asociación entre la conformación temprana de tau y ubiquitina, cambiando el patrón a Ub-Alz50>Ub-PHF1>Ub-Tau66, con porcentajes de colocalización de: 62.1%, 55.7% y 14.6%, correspondientemente. Al realizar un análisis inferencial con la prueba "t" de Student para comparar dos grupos, sólo en la población Ub-Alz50 se presentó una diferencia significativa entre ambos grupos ($P < 0.05$).

Estos resultados parecen indicar que la densidad de MNFs compuestas de tau con cambio conformacional temprano y que además presentaron ubiquitinación, aumentaron cuando la demencia estaba compuesta de dos factores causales como sucede en la demencia mixta.

6.1.6 La ubiquitinación de tau se presenta con más incidencia en MNFs compuestas de tau fosforilada presentando el cambio conformacional temprano detectado por el anticuerpo Alz-50

Debido a que la fosforilación de la proteína tau se ha considerado parte del mecanismo clave para el plegamiento de la molécula, resultó interesante conocer si esta conformación fosfo-dependiente facilitaba la ubiquitinación de tau. Para ello, se realizaron experimentos de triple marcaje incluyendo PHF-1 para establecer de una mejor manera la asociación entre ubiquitina, los cambios conformacionales y la fosforilación.

De manera técnica, la colocación máxima de los fluoróforos verde (para ubiquitina), rojo (para cambio conformacional) y azul (para fosforilación) en este sistema, se traduce en un pseudocolor blanco cuando se fusionan las imágenes. La variedad en la paleta de colores se produce cuando coexisten dos o tres etiquetas, dependiendo de la proporción relativa de las diferentes marcas.

Tal como podemos visualizar en la imagen panorámica (panel A) de la Figura R10, existe diversidad en los niveles de asociación entre estos tres marcadores, desplegando una gran variedad de colores en las MNFs. En el canal de colocación observamos una triple asociación en MNFs positivas a Alz-50 y compuestas de ubiquitina y tau fosforilada. Pero también encontramos marañas negativas a ubiquitina y que sólo se componen de tau fosforilada con el cambio conformacional temprano (color morado). En el panel B de mayor aumento, podemos observar como una misma maraña se compone de diversas moléculas de tau con diferentes modificaciones.

Por otro lado, en la Figura R11 se muestra el análisis comparativo, ahora con el cambio conformacional tardío de la molécula de Tau (reconocido por Tau-66). En este caso se observó que hay menor diversidad de combinación de colores, lo cual indica una menor tasa de colocación. No obstante, aunque más baja, sí existieron casos de MNFs presentando todos los marcadores en conjunto.

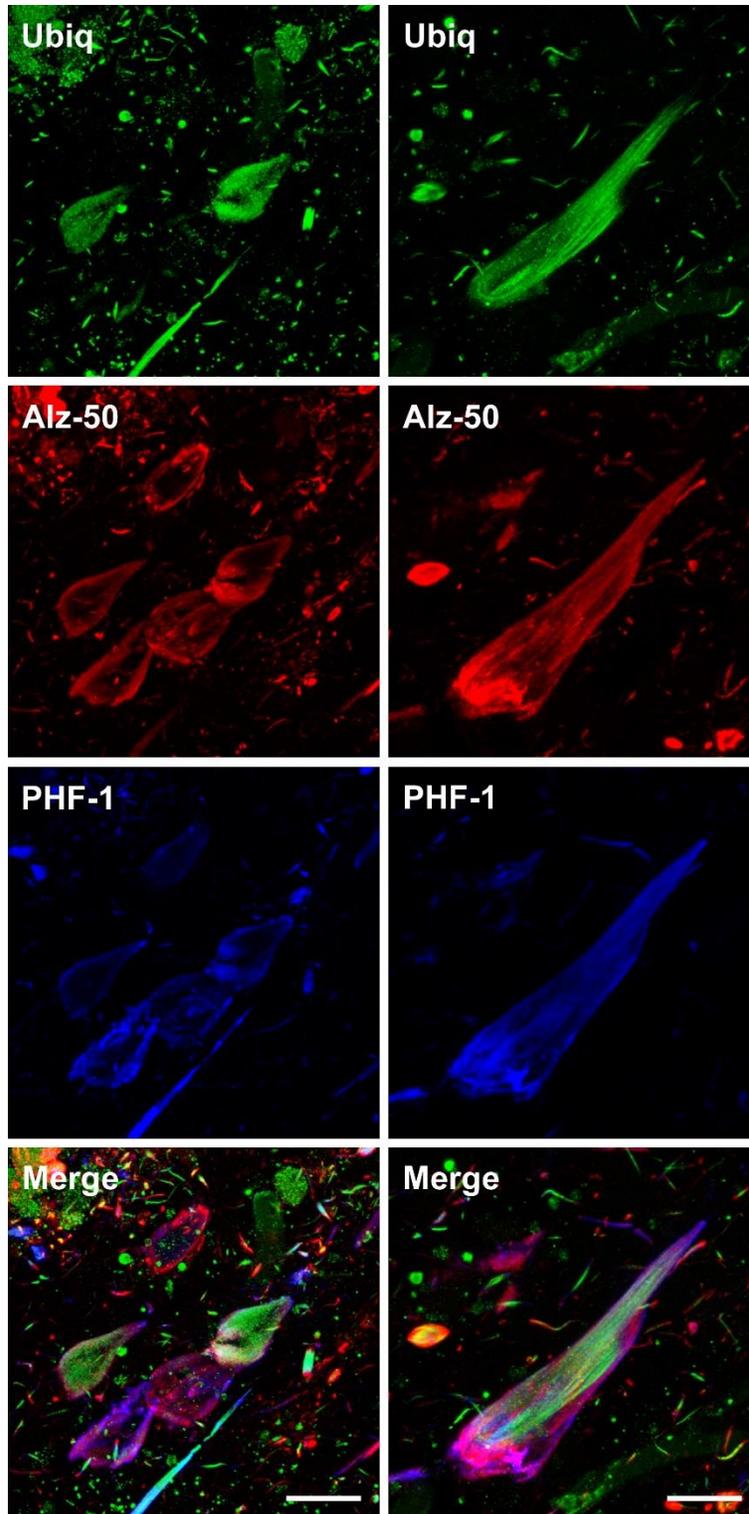


Figura R10. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 y el marcador fosforilación en MNFs. Inmunofluorescencias de triple marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina, el AcM Alz-50 y PHF-1 donde se observa diversidad en los niveles de asociación entre los tres marcadores. Barras: A) 23 μm y B) 12 μm .

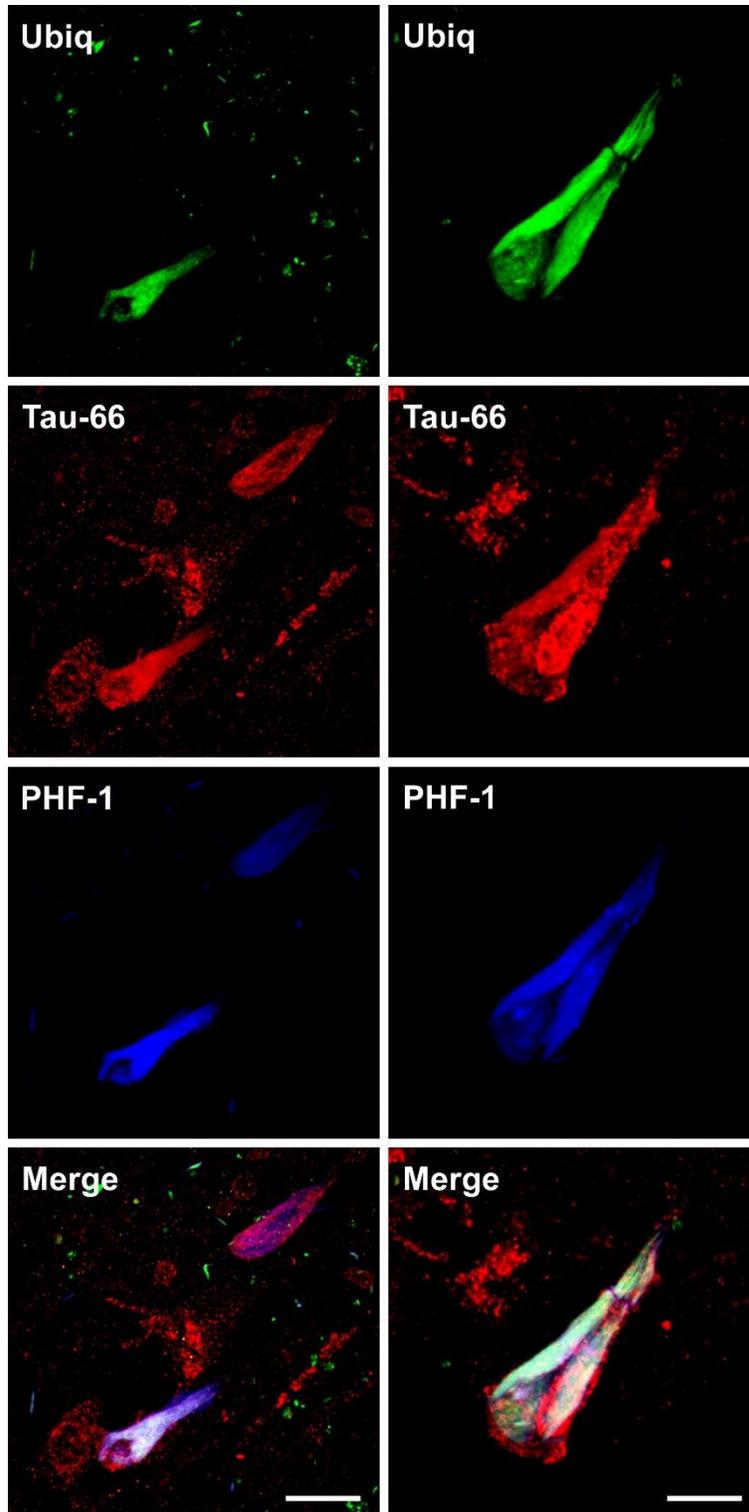


Figura R11. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Tau-66 y el marcador fosforilación en MNFs. Inmunofluorescencias de triple marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina, el AcM Alz-50 y PHF-1 donde se observa escasa cantidad de MNFs que presentan asociación entre los tres marcadores. Barras: A) 35 μm y B) 12 μm .

En la gráfica de la Figura R12, se muestra la cuantificación del triple marcaje de MNFs, donde se evaluó la asociación de ubiquitina con los cambios conformacionales y la forforilación de tau. Como se observa claramente en la gráfica, la población de MNFs que presenta la asociación entre ubiquitina y forforilación de tau con el cambio conformacional temprano (Ub-Alz50-PHF1), con un 49.1% de colocalización, es significativamente mayor que la asociación de estos dos marcadores con el cambio conformacional tardío (Ub-Tau66-PHF1), que correspondió a un 6.8%. El análisis estadístico utilizando la prueba "t" de Student tuvo una diferencia significativa de: $P < 0.0001$.

Estos resultados sugieren que la ubiquitinación de la proteína tau podría estar más asociada con las primeras etapas de agregación y progresión de tau en la enfermedad.

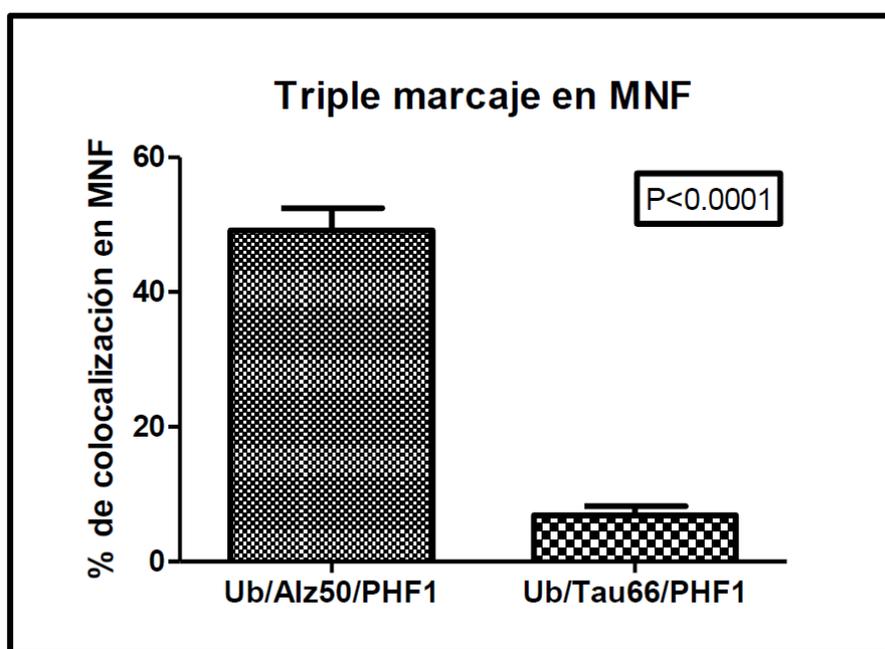


Figura R12. Cuantificación de la asociación de la ubiquitinación con los cambios conformacionales de tau y el marcador de fosforilación en MNFs. Se determinó el porcentaje de colocalización de los tripletes de anticuerpos. La cantidad de MNFs que presentaron colocalización de los anticuerpos Ub/Alz-50/PHF-1 fue significativamente mayor con respecto a la combinación Ub/Tau-66/PHF-1 ($p < 0.001$). Las diferencias significativas se calcularon mediante la prueba t de Student.

6.1.7 La molécula de la proteína tau que exhibe el cambio conformacional temprano revelado por el anticuerpo Alz-50, conserva su extremo amino intacto.

En un estudio previo, donde se evaluó el perfil molecular de tau durante la evolución de las MNFs, se demostró que cuando la proteína presentaba el cambio conformacional temprano, la molécula de tau conservaba sus extremos N- y C-terminal, mientras que la conformación tardía carecía de estas terminaciones [31]. Tomando en cuenta lo anterior y para confirmar la estrecha asociación entre ubiquitina y la inmunorreactividad de Alz-50 en las lesiones neurofibrilares, se realizaron experimentos de triple marcaje incluyendo ahora el anticuerpo Tau-13, que reconoce los primeros aa. del extremo N- de tau.

Como se muestra en la Figura R13, donde observamos una imagen panorámica del área CA1 del hipocampo (panel A), el color púrpura muestra la asociación entre el cambio conformacional temprano de tau, detectado por Alz-50 (rojo), y la molécula de tau que conserva su extremo N- intacto, detectado por Tau-13 (azul). A su vez, podemos ver ejemplos de MNFs donde predomina la ubiquitinación (verde) y otras donde la asociación de los tres marcadores es evidente (blanco), como se observa en la amplificación mostrada en el panel B de la Figura R13.

Por otro lado, es interesante notar la ausencia de pseudocolor morado en las imágenes de la Figura R14, donde se evaluó si la molécula de tau que presenta el cambio conformacional reconocido por Tau-66, contiene su extremo N- intacto (Tau-13) y si se encuentra ubiquitinada. En general, en la mayoría de las MNFs no se presentan los tres marcadores en cuestión, sin embargo, hubo algunos ejemplos escasos de triple marcaje como se observa en la amplificación presentada en el panel B de la Figura R14. Estos resultados confirman lo antes publicado acerca de la naturaleza del epítipo de Alz-50 que mantiene su extremo N- intacto y su estrecha asociación con ubiquitina.

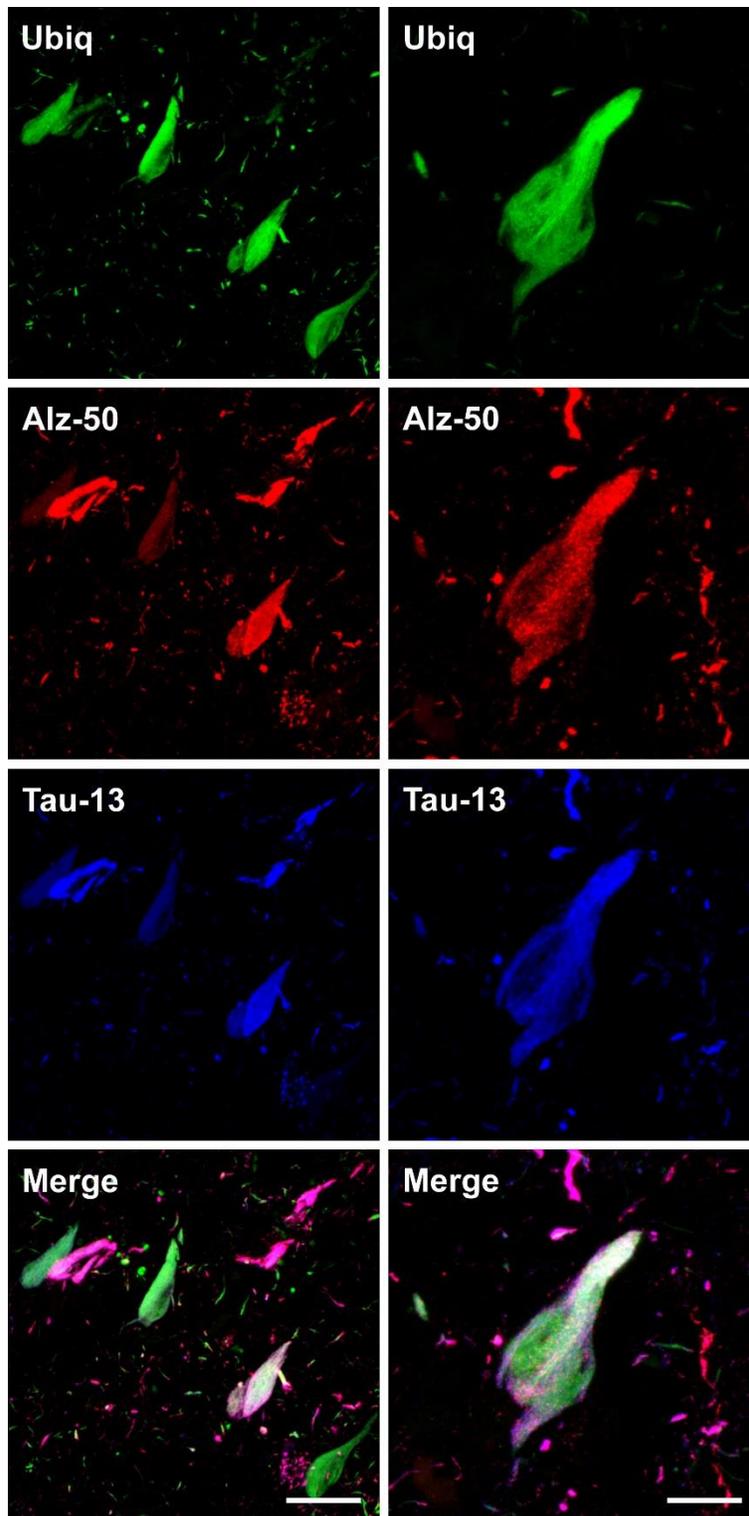


Figura R13. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 y un marcador del extremo N-terminal de la molécula de tau en MNFs. Inmunofluorescencias de triple marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina, Alz-50 y Tau-13 donde se observa colocalización entre los tres marcadores. Barras: A) 29 μm y B) 12 μm .

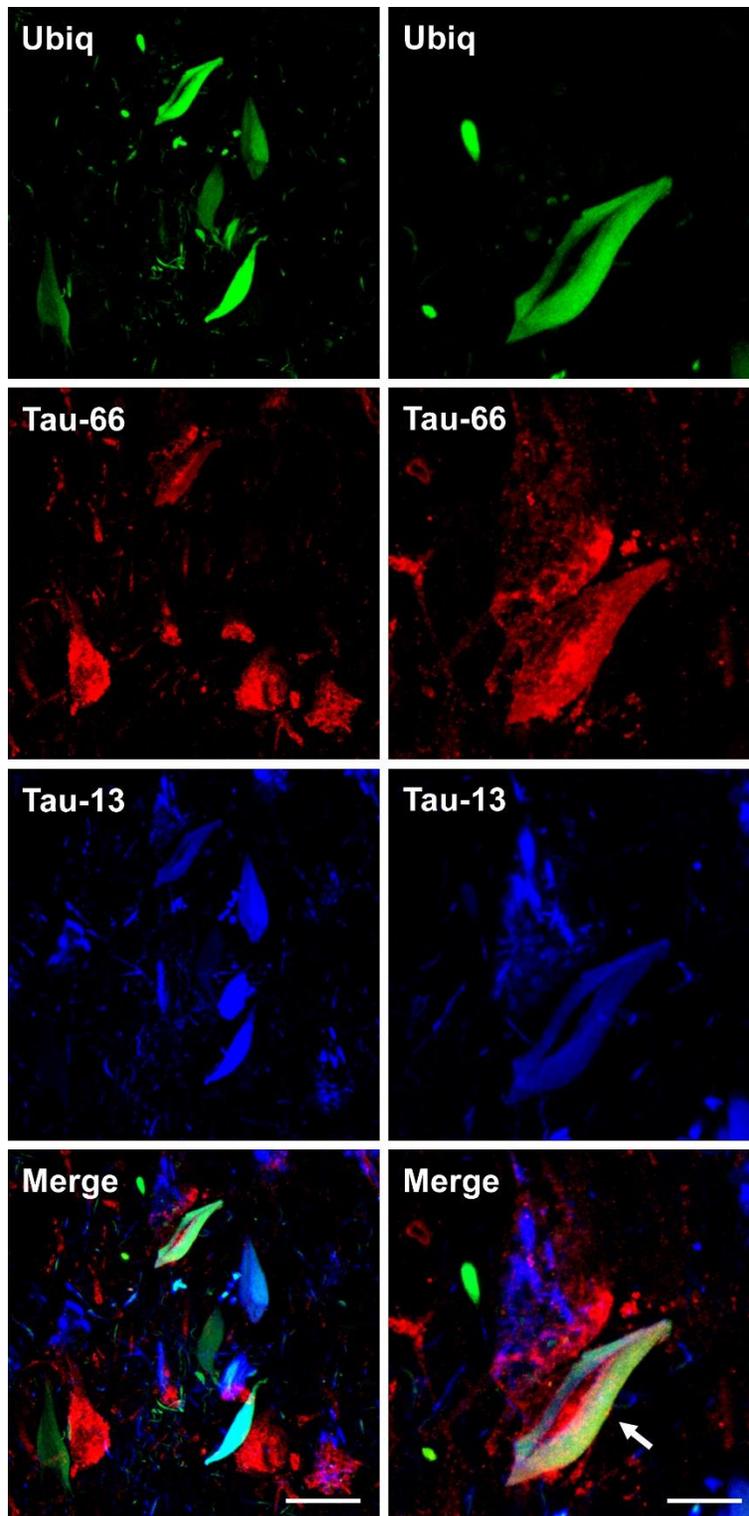


Figura R14. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Tau-66 y un marcador del extremo N-terminal de la molécula de tau en MNFs. Inmunofluorescencias de triple marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina, Tau-66 y Tau-13 donde se la colocalización se da principalmente entre ubiquitina y el marcador del extremo N- de tau. Barras: A) 29 μm y B) 12 μm .

6.2 Caracterización de la expresión de ubiquitina en la patología neurítica de tau en el hipocampo de sujetos con la EA

Las neuritas distróficas también forman parte de la degeneración fibrilar de las células neuronales en la EA. Éstas se forman por acumulación fibrilar y no fibrilar de la proteína tau en las terminaciones de los procesos neuronales como los axones y dendritas. A lo largo de estas prolongaciones y con distribución azarosa, tau también se puede acumular anormalmente y formando los llamados hilillos de neuropilo. Dado que se ha descrito acumulación de tau y ubiquitina en la patología neurítica de los cerebros con EA [38], en el presente estudio se investigó si la relación entre la ubiquitinación y los cambios conformacionales de tau observados en las MNFs también se conservan en el compartimento neurítico.

Con este fin, se analizó el componente neurítico y los elementos distróficos en la misma zona del hipocampo y en los mismos cortes de tejido, tal y como se realizó para las MNFs, evaluándose la coexpresión de las diferentes MPT de tau. Para este análisis, las imágenes se procesaron digitalmente utilizando el software ImageJ (descrito en la sección de métodos), con el que se obtuvo el porcentaje de área de tinción correspondiente al inmunomarcaje de neuritas.

6.2.1 En el componente neurítico, el patrón de expresión de ubiquitina y su asociación con las modificaciones de la proteína tau es similar al presentado en las MNFs

Para caracterizar la presencia y distribución de los marcadores de tau en el compartimento neurítico del tejido cerebral, se utilizaron las mismas tinciones sencillas que se usaron para el estudio en marañas.

En la Figura R15, observamos varias MNFs reconocidas por los diversos anticuerpos hacia tau y ubiquitina, sin embargo, es fácil de detectar la gran cantidad de patología neurítica que se encuentra en todo el neuropilo.

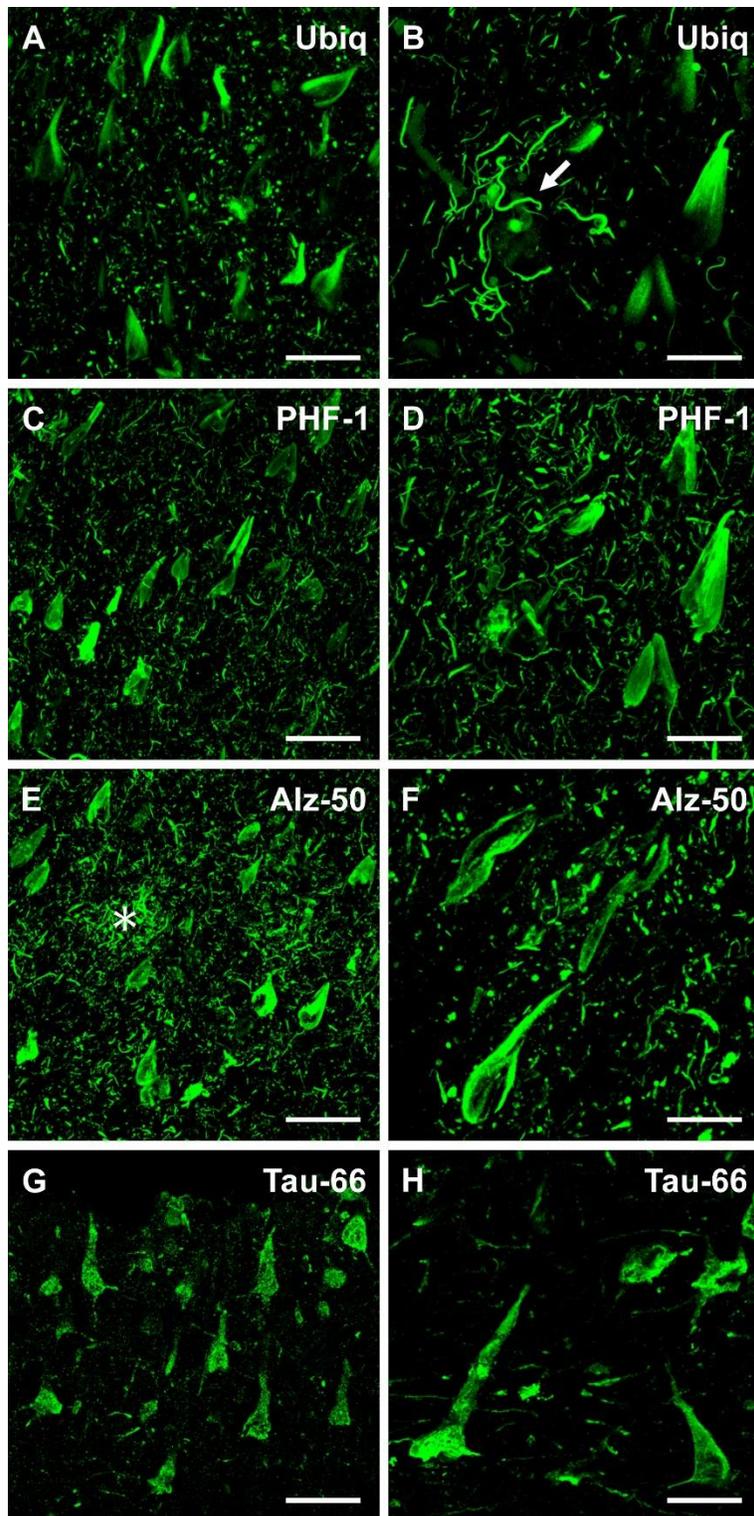


Figura R15. Inmunorreactividad de las diferentes modificaciones de tau en el componente neurítico del tejido cerebral de individuos con EA. Se analizó el componente neurítico y los elementos distróficos en la zona CA1 del hipocampo y se detectó una gran cantidad de patología neurítica en el neuropilo. Barras: A), C), E) y G) = 65 μm ; B), D), F) y H) = 30 μm .

De manera similar, se encontró una gran cantidad de neuritas conformadas por tau fosforilada, así como elementos fibrilares más finos distribuidos en el neuropilo, como se muestra en la imagen panorámica del panel C de la figura R15. Como se observa en la ampliación del panel D, mientras algunas de estas neuritas aparecían intactas, la mayoría parecía ser distrófica, es decir, estaban segmentadas y dispersadas de forma variable.

Por otro lado, la caracterización del anticuerpo Alz-50 en el componente neurítico mostró abundante cantidad de neuritas conformadas de tau con cambio conformacional temprano. Esta tinción fibrilar fina hizo que las placas neuríticas (asterisco) fueran más visibles y la mayoría de las neuritas distróficas localizadas en la vecindad de la placa parecían comparables en forma y distribución a las conformadas por tau fosforilada, aunque de manera más numerosa, como se observa en la imagen panorámica del panel E de la Figura R15. En la imagen aumentada del panel F se visualiza mejor la morfología de las estructuras etiquetadas por Alz-50.

De igual forma, se analizó la expresión del cambio conformacional tardío detectado por el anticuerpo Tau-66 en el compartimento neurítico (paneles G y H de la Figura R15). A diferencia de los otros marcadores, el anticuerpo Tau-66 no reconoció muchos procesos neuríticos en el neuropilo. Incluso estos elementos irregulares eran raros en la periferia de la placa y, como resultado, las placas generalmente eran inaparentes en las preparaciones de Tau-66.

6.2.2 El cambio conformacional temprano de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 es el marcador que se presenta con mayor frecuencia en la patología neurítica de la EA

Se cuantificó la patología neurítica de acuerdo a lo descrito en métodos y se comparó estadísticamente entre los diversos marcadores.

Como podemos observar en la Figura R16, el cambio conformacional temprano de la proteína tau (positivo a Alz-50) se presenta con mayor significancia en el componente neurítico exhibiendo un 50% de contribución en la marca total por área ocupada por este componente ($P < 0.001$). No se encontró diferencia significativa entre la detección de ubiquitina y tau fosforilada (positiva a PHF-1). En cambio, el porcentaje de tinción del

cambio conformacional tardío (Tau-66) fue significativamente menor que los demás anticuerpos ($P < 0.001$).

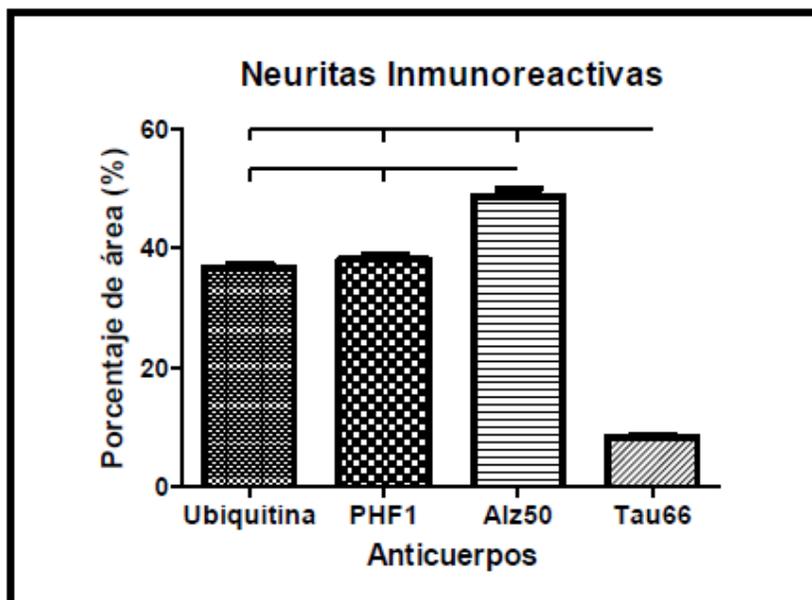


Figura R16. Cuantificación de las estructuras neuríticas que presentan las diferentes modificaciones de la proteína tau. Las neuritas inmunorreactivas se cuantificaron en la región CA1 del hipocampo y se expresaron como el porcentaje de área de tinción. En el eje x tenemos a los diferentes anticuerpos utilizados y en el eje y las medias de cada parámetro con su error estándar. Las diferencias significativas se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para determinar diferencias específicas entre todos los anticuerpos. ($P < 0.001$).

6.2.3 Ubiquitina se asocia al cambio conformacional temprano de tau en mayor grado que al cambio conformacional tardío en el componente neurítico del tejido cerebral

Para corroborar la posible asociación de ubiquitina con los cambios conformacionales en el componente neurítico, se analizó el doble marcaje fluorescente para ubiquitina con los anticuerpos Al-50 y Tau-66 de forma independiente. Se encontró una mayor asociación entre ubiquitina y el cambio conformacional temprano (Ub-Alz50), la cual fue significativamente más grande con respecto a su asociación con el cambio conformacional tardío (Ub-Tau66). La prueba "t" de Student reveló una $P < 0.05$ (Figura R17).

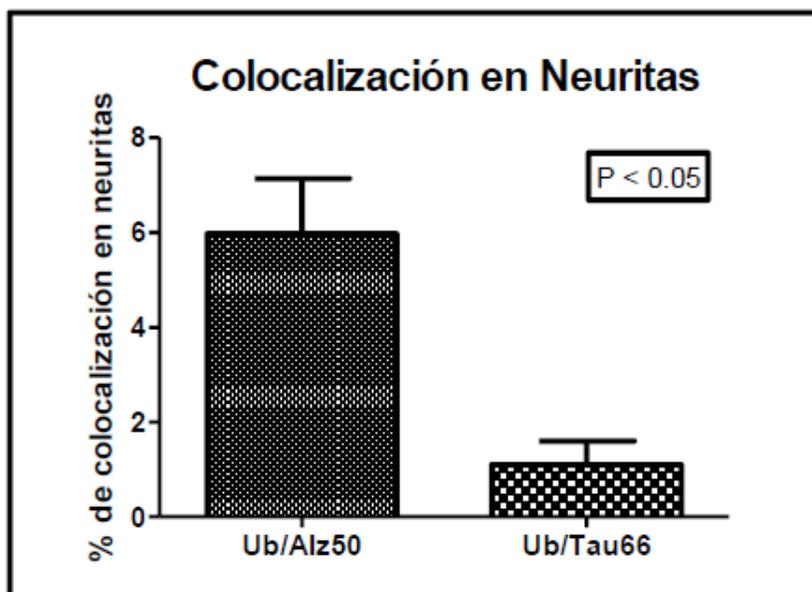


Figura R17. Cuantificación de la asociación de la ubiquitinación con los cambios conformacionales de tau en las Neuritas. Se determinó el porcentaje de colocalización de los pares de anticuerpos. La carga de neuritas que presentaron colocalización de los anticuerpos Ub/Alz-50 fue significativamente mayor con respecto a la combinación Ub/Tau-66 ($p < 0.05$). Las diferencias significativas se calcularon mediante la prueba t de Student.

Para examinar la contribución de tau fosforilada en esta asociación, se realizó triple marcaje fluorescente incluyendo al anticuerpo PHF-1. En la imagen panorámica de la Figura R18 se puede apreciar que la interacción entre ubiquitina (verde), tau con el cambio conformacional temprano (rojo) y tau fosforilada (azul) es variable al observar una gran variedad de pseudocolores, que nos indica diferente contribución de cada marcador y por lo tanto diverso grado de madurez, entendiéndose como procesamiento postraduccional de la proteína tau. Aunque existen neuritas que exhiben un solo marcador, la asociación más común que se encontró fue de tau con cambio conformacional temprano y su fosforilación, al predominar en la imagen los colores magenta y púrpura.

Sin embargo, en la Figura R19 se demuestra menos asociación entre ubiquitina (señal verde), tau con cambio conformacional tardío (señal en rojo) y fosforilación en sus residuos Ser396/404 (señal azul) en los elementos neuríticos del neuropilo. Aquí se encontró poca inmunorreactividad con el anticuerpo Tau-66 en las estructuras distróficas y la colocalización fue más predominante entre tau ubiquitinada y fosforilada, como se observan en las placas neuríticas decoradas en color cian.

Con todos estos resultados se puede concluir que tanto en MNFs como en el componente neurítico, ubiquitina se asocia con marcadores tempranos de la enfermedad como la fosforilación y el cambio conformacional temprano de tau detectado por el anticuerpo Alz-50.

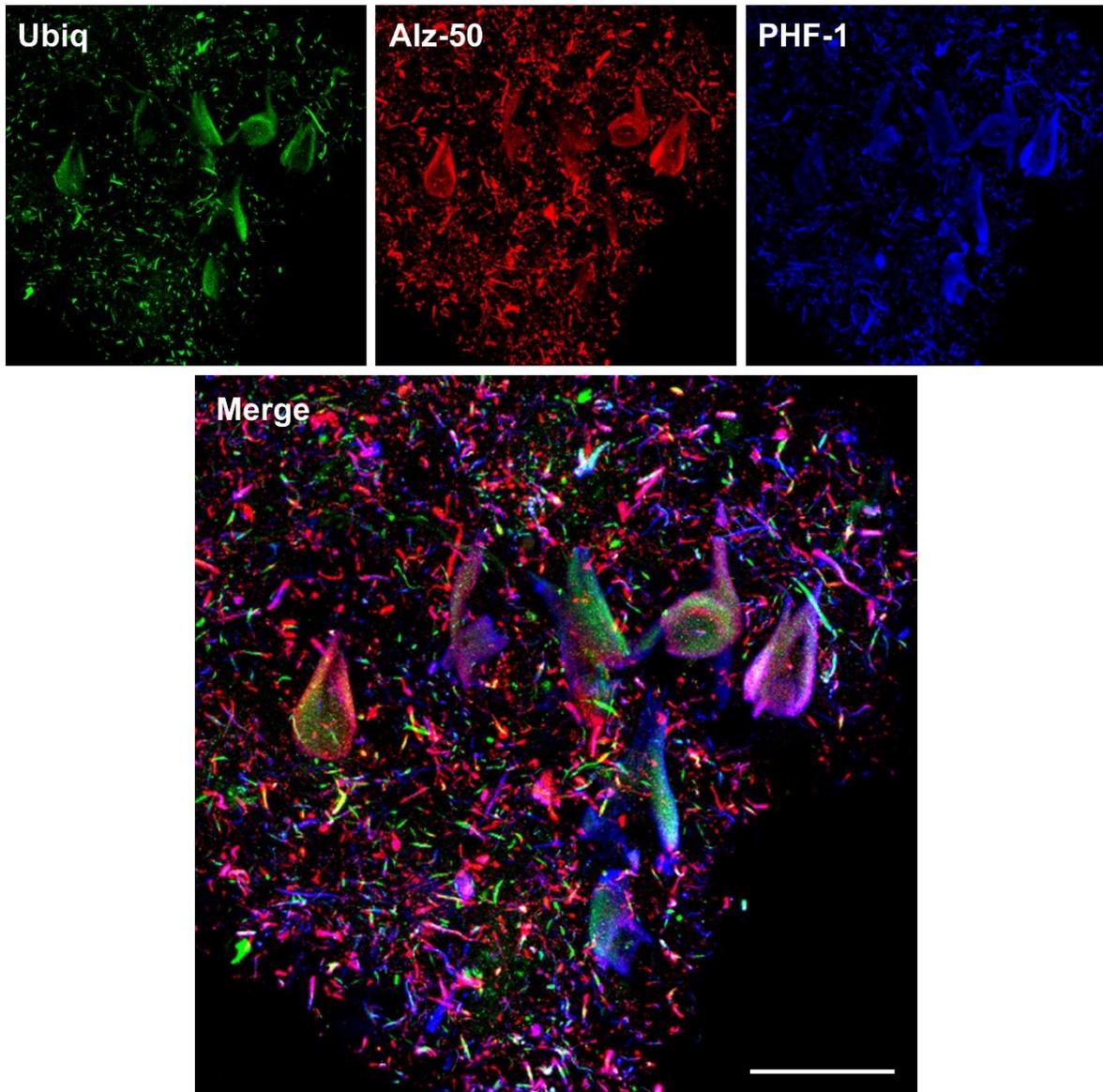


Figura R18. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Alz-50 y el marcador fosforilación en el componente neurítico. Inmunofluorescencias de triple marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina, el AcM Alz-50 y PHF-1 donde se observa diversidad en los niveles de asociación entre los tres marcadores. Barras: 35 μ m.

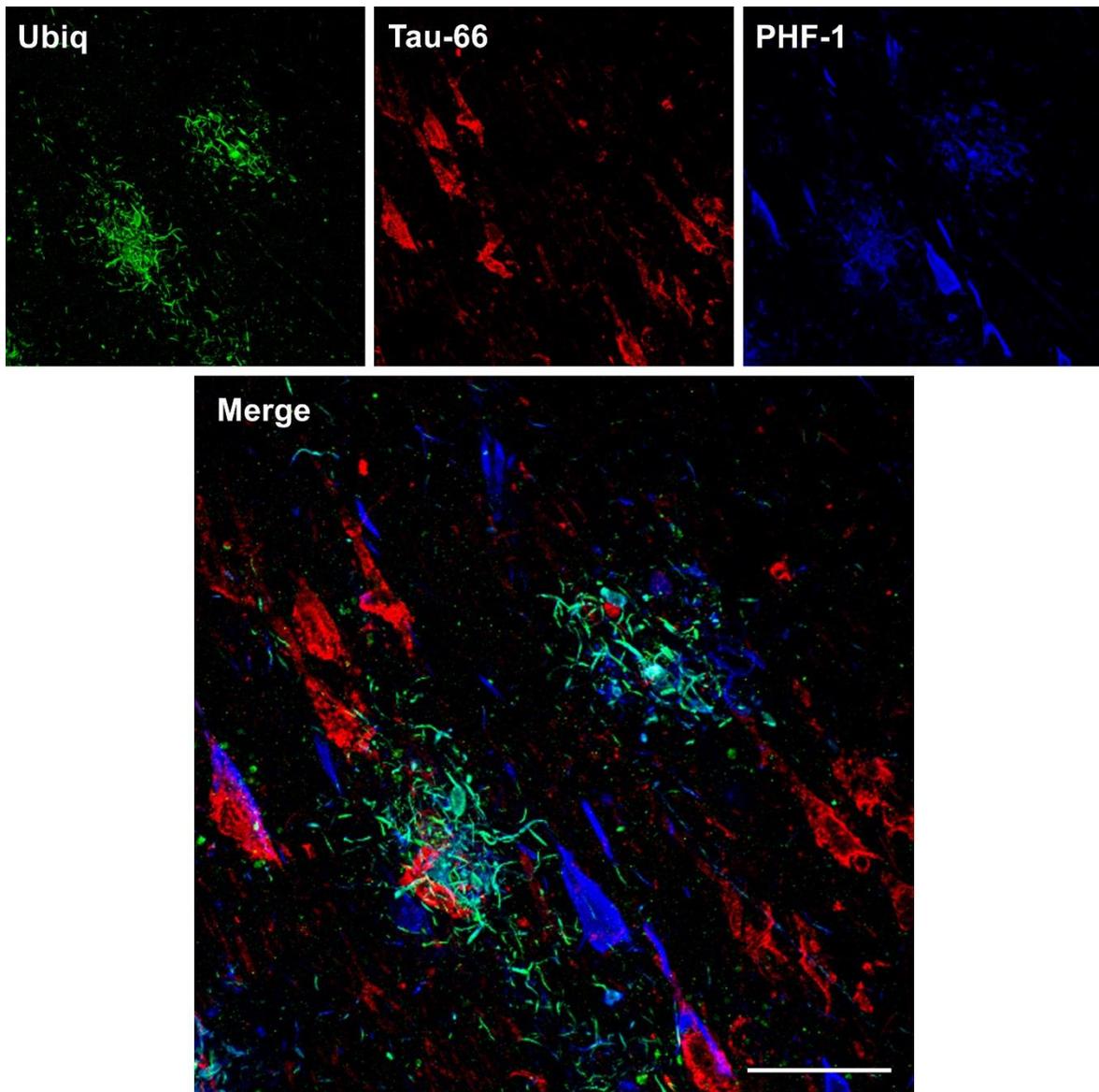


Figura R19. Asociación de la ubiquitinación con el cambio conformacional de tau detectado por el anticuerpo Tau-66 y el marcador fosforilación en el componente neurítico. Inmunofluorescencias de triple marcaje analizadas mediante microscopía confocal utilizando la combinación de los anticuerpos anti-ubiquitina, Tau-66 y PHF-1 donde se observa que la mayor asociación se da entre la ubiquitina y la fosforilación de tau. Barras: 50 μ m.

6.3 Análisis de Correlación entre el Diagnóstico Clínico y la Ubiquitina en la Patología Fibrilar

Como se demostró en los apartados anteriores, la ubiquitina es una molécula notablemente presente en las MNFs y el compartimento neurítico del tejido cerebral de sujetos que padecieron EA. Realizar un estudio que correlacione el diagnóstico clínico con la cantidad de estructuras asociadas a ubiquitina en la EA es de gran relevancia, ya que esto podría ofrecer información valiosa para un diagnóstico temprano y comprender la evolución de la enfermedad. Además, la ubiquitina podría ser utilizada como un potencial biomarcador para esta condición.

Para realizar esta correlación, se utilizaron los datos obtenidos a partir del análisis inmunohistoquímico tanto de las MNFs como del compartimento neurítico, que incluyó cuantificaciones de las estructuras ubiquitinadas.

6.3.1 En la demencia mixta se incrementa la expresión de ubiquitina en las MNFs y el componente neurítico

La neuropatología desempeña un papel crucial en el estudio y comprensión de la enfermedad de la EA. Además, es fundamental para el diagnóstico definitivo de la enfermedad, debido a que el examen postmortem del cerebro de individuos con EA revela la presencia y distribución de las lesiones neuropatológicas características.

Como mencionamos antes, el grupo de casos con los que contamos se pueden dividir en casos diagnosticados con EA y casos con demencia mixta. Cuando una persona presenta tanto la EA como la demencia vascular, los síntomas y el curso de la enfermedad pueden ser más complejos.

Con base en eso, se determinó si la asociación de la ubiquitina en las estructuras neurofibrilares depende del diagnóstico clínico y neuropatológico de la demencia. Como se muestra en las gráficas de la Figura R20, la población total de los casos se dividió de acuerdo a su diagnóstico postmortem en EA y demencia mixta y se incluyeron casos control no dementes. Como lo podíamos esperar, en la demencia mixta se presentó la mayor densidad

de estructuras neurofibrilares, siendo significativamente superior para el número de marañas ($P < 0.01$) y para la carga del componente neurítico ($P < 0.05$).

Por lo que podemos inferir que el componente vascular y la presencia de accidentes cerebrovasculares confiere un ambiente favorable en el parénquima cerebral para que se presente una mayor ubiquitinación en las células neuronales.

6.3.2 El género masculino presenta una mayor cantidad de ubiquitinación en las MNFs y en el componente neurítico

Aunque la EA afecta tanto a hombres como a mujeres, el género juega un papel importante ya que existen diferencias significativas en términos de prevalencia, riesgo, manifestación clínica y respuesta al tratamiento. Por tal motivo se evaluó la diferencia en la densidad de MNFs y neuritas distróficas conteniendo ubiquitina entre ambos géneros.

De un total de 25 casos que se analizaron, el 64% correspondió al género femenino (16 casos) y el 36% al género masculino (9 casos). En las gráficas de la Figura R21, se presenta el análisis cuantitativo del marcaje de ubiquitina en MNFs y neuritas distróficas. Se observó que, en ambos casos, aunque más evidente en las MNFs, la cantidad de ubiquitina asociada a la neuropatología fibrilar fue significativamente más predominante en hombres. Por la prueba "t" de Student se encontró una significancia de $P < 0.0001$.

6.3.3 El contenido de ubiquitina en MNFs y en el componente neurítico no depende de la edad

La edad es el factor de riesgo más relevante para desarrollar la EA, y la prevalencia con la que se presenta esta, aumenta considerablemente con el envejecimiento. Por lo tanto, se analizó la densidad de la patología neurofibrilar (MNFs y neuritas distróficas) conteniendo ubiquitina en función de la edad. Los 25 casos con los que contamos tuvieron un rango de edad que osciló entre 64 y 99 años, con una media de 83 años y una mediana de 82 años. Cabe mencionar que para este estudio se contó con 2 casos control no dementes, uno de 87 años y el otro de 91, y los datos obtenidos de estos casos se incluyeron en la gráfica.

Como podemos observar en la gráfica de la Figura R22 correspondiente a las MNFs ubiquitinadas, la población de 70 a 79 años fue la que presentó una mayor densidad de éstas, la cual fue significativamente mayor a las demás poblaciones ($P < 0.001$) aplicando la prueba de Tukey. En cuanto a la expresión de ubiquitina en el componente neurítico, no se encontró diferencias significativas entre las poblaciones de diversas edades. Por lo tanto, podemos decir que la cantidad de ubiquitina presente en las lesiones neurofibrilares del soma de las neuronas no depende de la edad del individuo.

6.3.4 La expresión de ubiquitina en las MNFs es directamente proporcional a la epicrisis de los casos con demencia

La epicrisis es un diagnóstico clínico-patológico más integral que en la EA puede incluir información relevante sobre el diagnóstico, la progresión, los síntomas presentados por el paciente, los tratamientos utilizados y su efectividad, así como las recomendaciones futuras para el manejo de la enfermedad. También puede contener información sobre las evaluaciones cognitivas realizadas, los resultados de las pruebas de imagen cerebral y otros estudios complementarios.

Al contar con la información del grado de epicrisis que se diagnosticó para el conjunto de los casos evaluados, analizamos la relación con la expresión de ubiquitina en la patología neurofibrilar. Los resultados del análisis cuantitativo se presentan en las gráficas de la Figura R23. Los datos obtenidos indicaron que en el caso de las MNFs existe un aumento progresivo entre el número de éstas y el grado de demencia o sintomatología, siendo significativamente diferente para todos los parámetros ($P < 0.05$), excepto entre el nivel I y II. En el componente neurítico hay una ligera tendencia creciente, pero sin diferencia significativa.

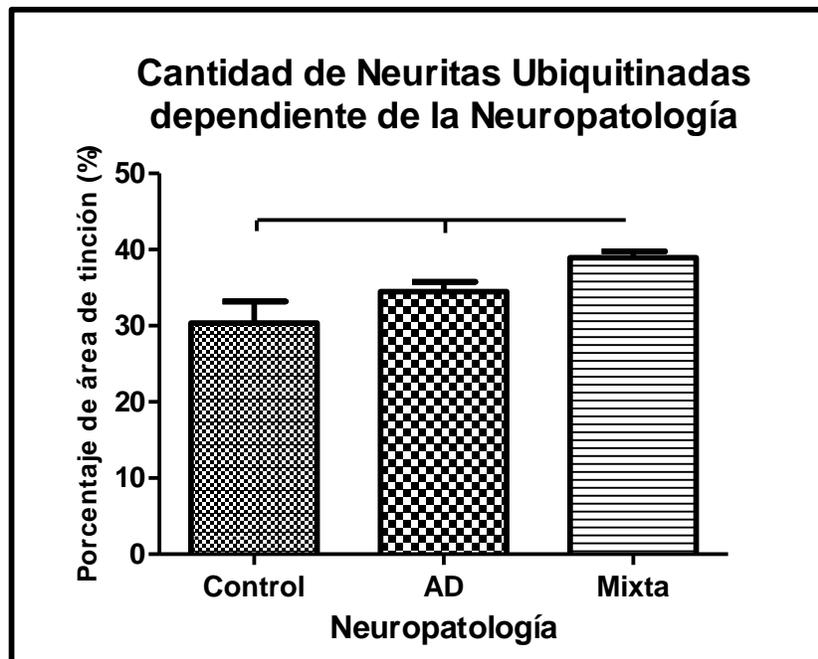
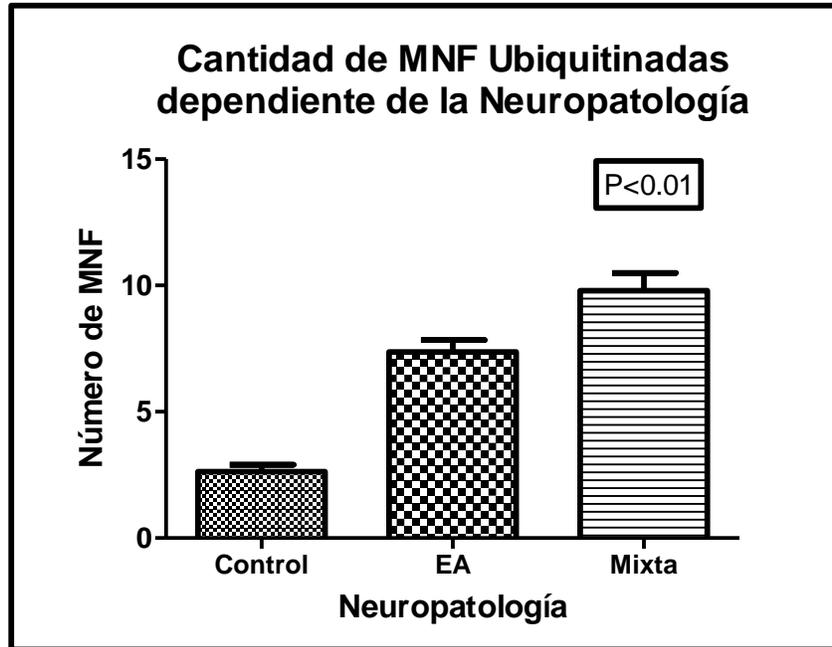


Figura R20. Ubiquitinación de las estructuras neuropatológicas de la EA dependiente de la Neuropatología. Gráficas comparativas del número de MNFs y neuritas conteniendo ubiquitina en casos control, EA y demencia mixta. Los datos obtenidos indicaron que la cantidad de ubiquitina presente en las lesiones neurofibrilares fue mayor en la población con demencia mixta, observándose en MNFs una diferencia significativa entre todas las poblaciones ($p < 0.01$), mientras que en el componente neurítico la diferencia sólo se presentó para la población con demencia mixta ($p < 0.05$). Las diferencias significativas se calcularon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey.

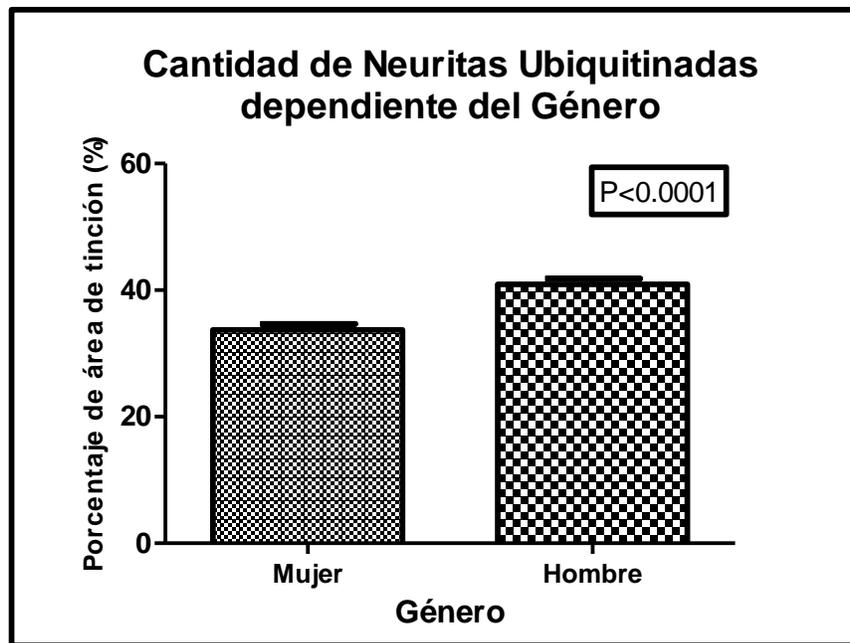
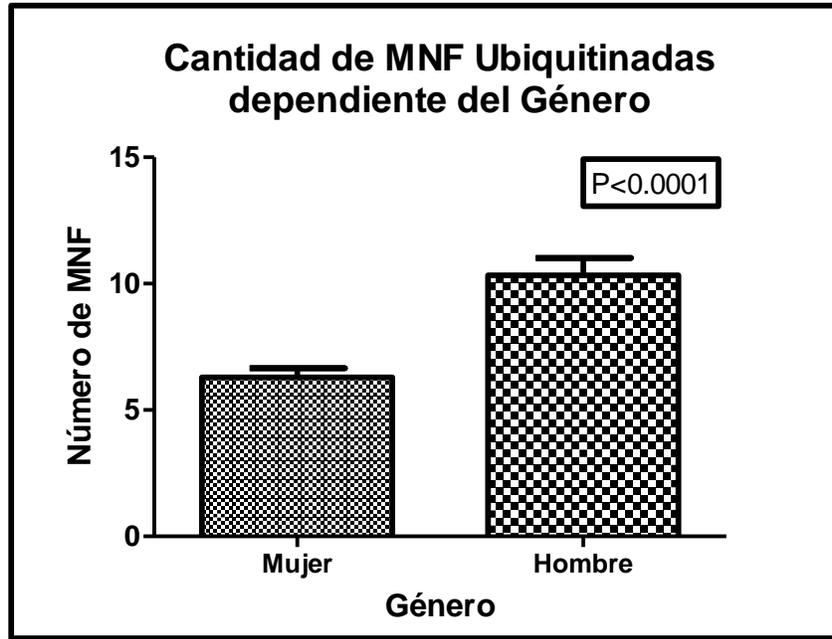


Figura R21. Ubiquitinación de las estructuras neuropatológicas de la EA dependiente del Género. Gráficas comparativas del número de MNFs y neuritas conteniendo ubiquitina entre hombres y mujeres. Los datos obtenidos indicaron que la cantidad de ubiquitina presente en las lesiones neurofibrilares fue mayor en la población masculina, tanto en MNFs como en el componente neurítico. El análisis de varianza con la prueba t de Student mostró una $P < 0.0001$ para ambos grupos.

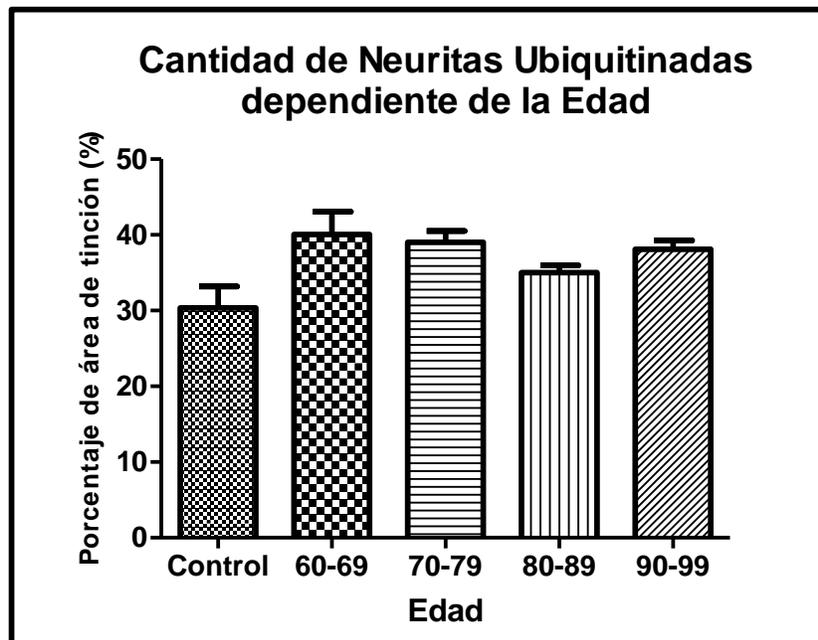
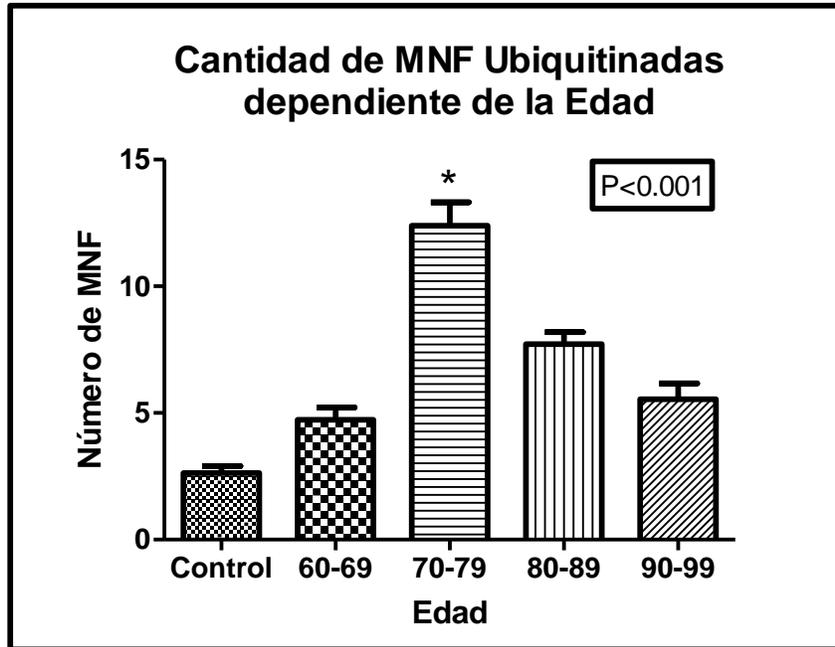


Figura R22. Ubiquitinación de las estructuras neuropatológicas de la EA dependiente de la Edad. Gráficas comparativas del número de MNFs y neuritas conteniendo ubiquitina en varios grupos de edades. Los datos obtenidos indicaron que la cantidad de ubiquitina presente en las lesiones neurofibrilares del soma de las neuronas no depende de la edad del individuo. En el caso de las MNFs existe una diferencia significativa entre el grupo de edad de 70-79 años y los demás grupos ($P < 0.001$), mientras que en el componente neurítico no se encontró diferencias entre los grupos.

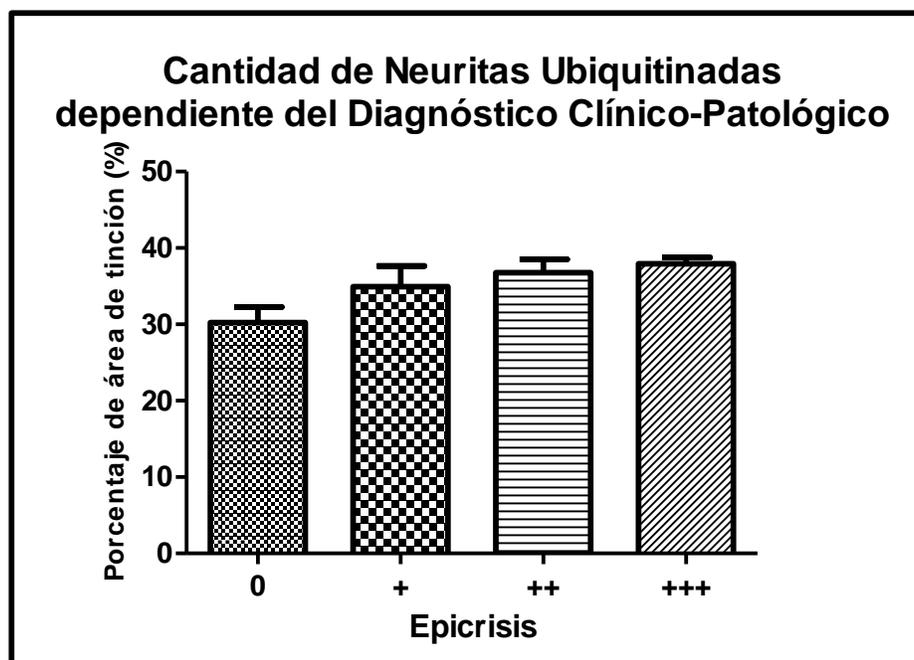
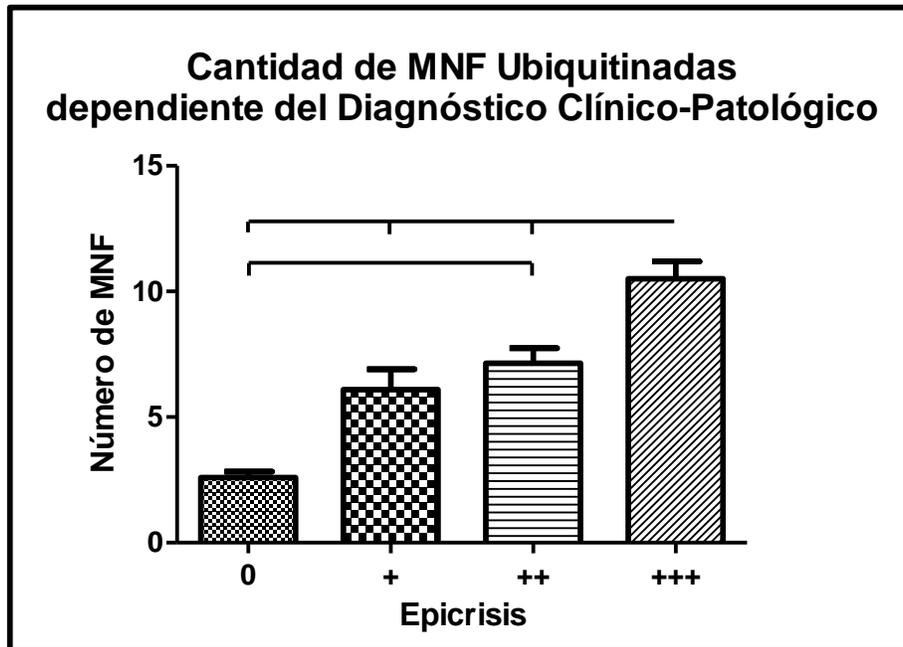


Figura R23. Ubiquitinación de las estructuras neuropatológicas de la EA dependiente del Diagnóstico Clínico-Patológico. Gráficas comparativas del número de MNFs y neuritas conteniendo ubiquitina donde se presentan cuatro grados de epicrisis. Los datos obtenidos indicaron que en el caso de las MNFs existe una correlación entre el número de éstas y el grado de demencia. El análisis de varianza con la prueba de Tukey arrojó una $P < 0.05$, excepto entre el nivel I y II. En el componente neurítico existe una ligera tendencia creciente, pero sin diferencia significativa.

6.3.5 La hipertensión afecta de manera notable la expresión de la ubiquitina en las MNFs y el componente neurítico

Las comorbilidades, como la diabetes, obesidad, aterosclerosis e hipertensión, son condiciones médicas adicionales que una persona puede tener junto con una enfermedad primaria, y pueden influir en el desarrollo y la progresión de la EA, aumentando el riesgo, empeorar los síntomas, complicar el diagnóstico, o afectar la respuesta al tratamiento de llevarse a cabo.

Por esta razón se evaluó la influencia que pudieran tener estas condiciones en la expresión de la ubiquitina en la patología neurofibrilar ya descrita. En la Figura R24, se muestra comparativamente el número de MNFs conteniendo ubiquitina en diversos grupos de riesgo clasificados como: Diabetes/obesidad, Arteroesclerosis, e Hipertensión. Al realizar el análisis de varianza con la prueba de Tukey, se encontró que en el grupo de pacientes con hipertensión se presentó un número significativamente mayor de MNFs y carga de componente neurítico con respecto a los otros grupos ($P < 0.05$ para ambos).

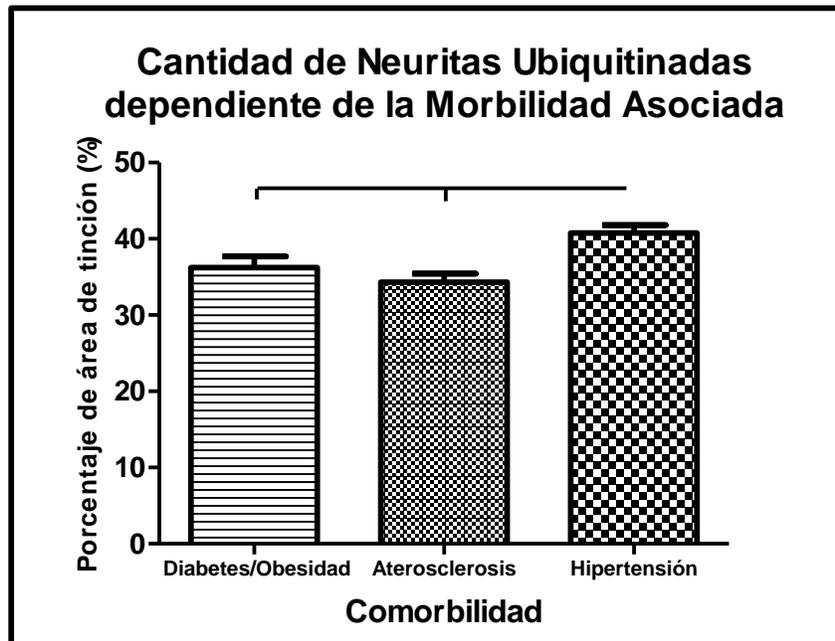
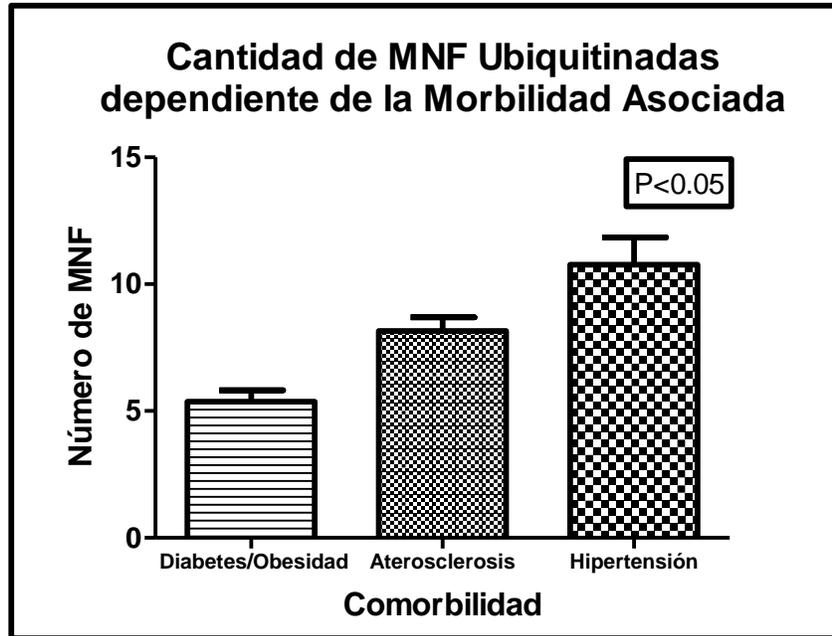


Figura R24. Ubiquitinación de las estructuras neuropatológicas de la EA dependiente de Morbilidades Asociadas. Gráficas comparativas del número de MNFs y neuritas conteniendo ubiquitina en diversos grupos de riesgo clasificados como: Diabetes/obesidad, Arteroesclerosis, e Hipertensión. Se encontró que en el grupo de pacientes con hipertensión se presentó un número significativamente mayor de MNFs y de carga de componente neurítico con respecto a los otros grupos. El análisis de varianza con la prueba de Tukey arrojó una $P < 0.05$ para ambos.

7 Discusión

La homeostasis de proteínas es fundamental para mantener todas las funciones celulares. Múltiples mecanismos están interconectados para preservar el equilibrio de las proteínas, comenzando con su síntesis, siguiendo con el desempeño de sus diversas funciones y terminando con su degradación. Cuando uno o más de esos mecanismos fallan, la capacidad funcional de la célula se ve afectada, dando lugar a diversas patologías.

Existe un fuerte vínculo entre las enfermedades neurodegenerativas y el desequilibrio de la proteostasis, ya que la formación de agregados proteicos es el origen de muchas de ellas, como es el caso de la EA [34, 51]. El mecanismo de agregación de Tau sigue siendo una interrogante y se ha propuesto la contribución de diversas modificaciones post-traduccionales aberrantes y pro-agregativas como la fosforilación y la proteólisis, que promueven el ensamblaje de tau soluble, primero en forma de FHA y posteriormente en MNF [19, 52].

La fosforilación secuencial en diferentes residuos de Ser/Thr, puede inducir cambios conformacionales locales [28] y estructurales en la molécula de tau, que implican un plegamiento del extremo N-terminal, incluso en estructuras aparentemente inertes como las MNFs [31, 53, 54]. Una vez que esta molécula cambia su conformación, puede exponer epítopes que inicialmente no eran accesibles y se convierte en un blanco potencial para la acción de distintas proteasas que a su vez pueden continuar con el proceso proteolítico e inducir otro reordenamiento estructural de la molécula. Tal es el caso de las conformaciones secuenciales detectadas por los anticuerpos Alz-50 y Tau-66 durante la formación y maduración de las MNFs [31, 33].

Los cambios en la conformación nativa de una proteína pueden estar sujetos a degradación por diferentes sistemas proteolíticos, incluidos el proteosomal, lisosomal y el asociado a la apoptosis, en un intento de eliminar estas moléculas anormales y citotóxicas para la célula [36, 55, 56]. Otro grupo de procesos involucrados en la degradación y el reciclaje de proteínas mal plegadas está conformado por el ALS [42, 57].

La proteína tau es una molécula sujeta a ser procesada por el UPS y se han encontrado alteraciones de este sistema en los cerebros de pacientes con EA [40, 41]. Sin embargo, no existe suficiente evidencia para explicar mejor cuándo y cómo los cambios estructurales de tau promueven su ubiquitinación y degradación en la EA, o si, por el contrario, la gran cantidad de ubiquitina asociada a tau, es el resultado de la degradación fallida de los agregados de tau por el complejo proteosomal [51, 58].

En un trabajo previo [46], se demostró que la ubiquitinación de tau es un proceso que ocurre en las etapas tempranas e intermedias de la EA, pero no parece ocurrir en las etapas más avanzadas de progresión de este padecimiento, aun cuando tau conserva la región de los dominios repetidos con sitios potenciales de ubiquitinación. En el presente trabajo buscamos dilucidar una posible relación entre ubiquitinación, fosforilación y los cambios conformacionales de Tau durante la maduración de las MNFs. Esto debido a que los cambios conformacionales de tau podrían representar una señal inductora para la ubiquitinación y la activación del UPS.

Lo que encontramos es que cuando tau desarrolla el cambio conformacional temprano reconocido por Alz-50, la molécula también experimenta un mayor nivel de fosforilación y ubiquitinación, claramente demostrado por una alta colocalización observada entre estas modificaciones en la misma MNF. Esto se puede explicar en el sentido de que una molécula de tau completa podría exponer todos sus sitios de ubiquitinación putativos y al adoptar la conformación con el extremo N-terminal plegado, probablemente promovida por fosforilación anormal, puede inducir ubiquitinación y estar comprometida a la degradación por proteasoma. Una situación opuesta se observa con el cambio conformacional tardío de tau, debido a una reducción muy significativa en la señal de colocalización entre ubiquitina y Tau -66.

Como hemos mencionado anteriormente, la conformación Tau-66 adoptada por tau está estrechamente asociada con la pérdida de los extremos N- y C-terminal [31], lo cual se demostró en este trabajo cuando no se presentó colocalización entre Tau-66 y Tau-13 (un marcador de los primeros aminoácidos del extremo N-terminal) en la misma MNF (Figura R14).

La escasa colocalización entre Tau-66 y ubiquitina en las MNFs (Figura R9) también se corroboró cuando la población completa de casos se dividió entre sujetos diagnosticados con EA y otros casos con demencia mixta (EA + demencia vascular). Esta observación implica que la patología agregativa de tau se puede desarrollar a través de un procesamiento común, independientemente de factores externos, como podría ser el componente vascular anormal con todas las vías de estrés asociadas a esta anomalía.

Al analizar la molécula de tau y tratar de elucidar por qué no se presenta una asociación entre ubiquitina y tau desarrollando el cambio conformacional tardío, nos podemos apoyar en la información obtenida en un trabajo reciente donde se realizó un análisis cuantitativo del ubiquitiloma cerebral en casos de EA, en donde se obtuvo la caracterización actualizada de 28 sitios de ubiquitinación, en los que se describieron 15 nuevos residuos de Lys [45].

Cuando tau desarrolla la conformación temprana detectada por Alz-50 se encontró el nivel más alto de ubiquitinación en MNFs (Figura R9), lo cual se puede explicar por la disponibilidad total de residuos propensos a la ubiquitinación en una molécula de tau de longitud completa. Sin embargo, esta situación no es la misma para la molécula de tau que adopta la conformación Tau-66 porque 7 de los 15 nuevos residuos de ubiquitinación abarcan la región rica en prolina (Lys163, Lys180, Lys190, Lys224, Lys228, Lys234, Lys240) [45], y curiosamente, el epítipo discontinuo de Tau-66 ubicado en la región rica en prolina (aa. 155–244) hace contacto con su epítipo complementario, ubicado en el tercer dominio repetido, para desarrollar la conformación plegada de esta molécula [32]. Por este cambio, se puede suponer que estos sitios de ubiquitinación son de menor accesibilidad para que se produzca esta modificación en la conformación de tau que reconoce el anticuerpo Tau-66.

Por otro lado, también analizamos el componente neurítico y las neuritas distróficas en la misma área del hipocampo que presentó a las MNFs. Se pretendió analizar si la proteína que se acumula en estas estructuras patológicas cursa por los mismos procesos de modificación que se observan en el compartimento somático de las neuronas [59, 60]. Algunas modificaciones como la hiperfosforilación de tau, cambios conformacionales, e

incluso ubiquitinación han sido reportadas previamente, pero no la secuencia, asociación y temporalidad de aparición de estas modificaciones en esta molécula anormalmente agregada. Por lo tanto, hasta antes de este estudio, no había evidencia clara sobre asociaciones específicas entre cambios conformacionales, ubiquitinación, fosforilación y truncamiento de tau agregada en estos elementos neuríticos.

Lo que se encontró en el presente estudio fue que una cantidad importante de patología neurítica presentó mayor reconocimiento por el anticuerpo Alz-50 en comparación a una más reducida cantidad de estos elementos reconocidos por el anticuerpo Tau-66 (Figura R16). Esto parece indicar que al igual a como ocurrió en las MNFs, el cambio conformacional predominante de tau en las estructuras neuríticas anormales preserva sus extremos N- y C-terminal intactos. Además, no solo se redujo la cantidad de neuritas positivas para Tau-66, sino que también su ubiquitinación fue significativamente menor que la de las estructuras inmunoreactivas a Alz-50 (Figura R17). Por lo tanto, se puede concluir que los patrones de asociación entre ubiquitinación y modificaciones estructurales de tau en el componente neurítico probablemente reflejan lo observado en las primeras etapas de la formación y maduración de MNFs.

La ubiquitinación en el componente neurítico es limitada en cantidad [61] y está relacionada con modificaciones tempranas e intermedias de la molécula de tau [46], probablemente porque en este compartimento no se desarrollan tan activamente los mecanismos de transformación y procesamiento de las moléculas, en comparación al ambiente que se presenta en el soma de las células.

Para las interpretaciones, también es importante considerar que en el compartimento neurítico y en las terminales distróficas, se han encontrado otras proteínas distintas de tau, como los neurofilamentos de densidades variables y otras moléculas, que también podrían estar sujetas a la ubiquitinación [62]. De hecho, algunos elementos de la patología neurítica fueron inmunoreactivos a los anticuerpos hacia ubiquitina, pero no a los que reconocen a tau.

Finalmente, como se muestra en la figura D1, podemos concluir que la molécula de tau sufre importantes cambios conformacionales durante su proceso de agregación, y esas

alteraciones podrían verse influenciadas por múltiples procesos de proteólisis de proteínas mal plegadas. En este modelo que describe hallazgos previos, ahora incorporamos y precisamos el momento en que se presenta la ubiquitinación de tau como parte de un proceso secuencial de cambios conformacionales que contribuyen con la insolubilidad y agregación de esta molécula en la EA.

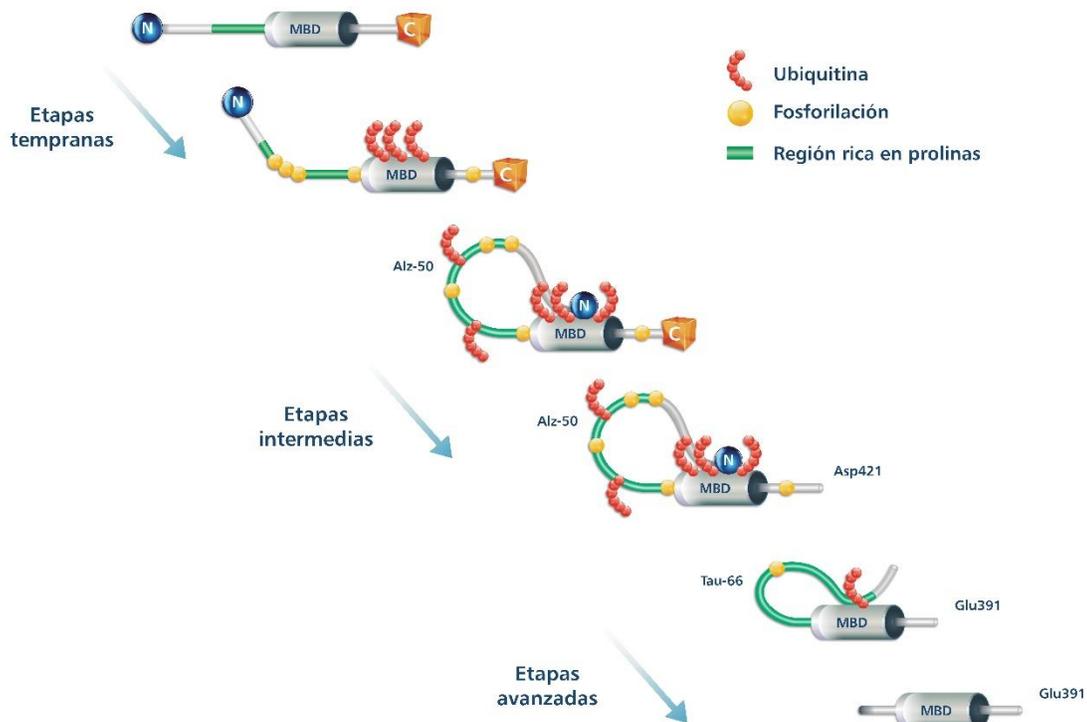


Figura D1. La marca de ubiquitina se asocia con el cambio conformacional temprano de la proteína tau durante la maduración de las MNFs en la EA. En las primeras etapas de formación de las MNFs, tau es fosforilada y ubiquitinada en los residuos disponibles que no se encuentran ocultos cuando tau adopta la conformación reconocida por Alz-50 y se asocia a la trucción en el Asp-421 del extremo C-terminal en las etapas intermedias de la EA. A medida que maduran las MNFs, tau sufre un segundo plegamiento del extremo N-terminal, en el que la región rica en prolina se pone en contacto con el tercer dominio repetido, lo que hace que el acceso de esta región sea más difícil para la ubiquitina. Eventos posteriores de proteólisis eliminan los extremos N- y C-terminal de tau, produciéndose un truncamiento en Glu-391, un marcador de procesamiento avanzado de tau en las últimas etapas de maduración de las MNFs.

Por otro lado, para este estudio se contó con la información del historial clínico de los casos evaluados, de donde pudimos obtener algunas variables como género, edad, neuropatología, epicrisis y morbilidades asociadas, las cuales se analizaron con respecto a la expresión de ubiquitina en la patología neurofibrilar. Al correlacionar estas variables clínicas y patológicas se buscó identificar patrones, asociaciones o tendencias significativas que puedan ayudar a comprender mejor la enfermedad, determinar su pronóstico y guiar la toma de decisiones clínicas.

Ciertas enfermedades pueden tener una mayor incidencia en hombres que en mujeres, o pueden presentarse con mayor frecuencia en determinados grupos de edad. Tal es el caso de la EA, donde las estadísticas muestran que las mujeres tienen una mayor prevalencia de la enfermedad en comparación con los hombres y el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta significativamente con la edad [4, 63].

Los hallazgos que obtuvimos en el análisis de estas variables fueron interesantes, ya que contrario a lo esperado, tanto en las marañas como en el compartimento neurítico, observamos una mayor expresión en hombres que en mujeres (Figura R21), a pesar de haber contado con un mayor número de casos femeninos. Probablemente factores hormonales y genéticos podrían estar involucrados en esta disparidad. A su vez, la edad no fue un factor determinante para la expresión de ubiquitina en la patología neurofibrilar (Figura R22).

En el caso de la neuropatología, donde contamos con una población diagnosticada con EA y una población con demencia mixta, observamos que el componente vascular tuvo mayor incidencia en la expresión de ubiquitina tanto en MNFs como en neuritas (Figura R20). La interacción entre las lesiones neuropatológicas de ambas condiciones puede llevar a una aceleración del deterioro cognitivo y a una mayor disfunción en los mecanismos moleculares de las células neuronales en comparación con cada tipo de demencia por separado [64].

Dentro de la información que pudimos obtener del historial clínico de los casos, se contó con un diagnóstico clínico-patológico que se dividía en cuatro grados de epicrisis. Cuando se analizó la gradualidad de la sintomatología con respecto a la cantidad de lesiones

ubiquitinadas en el tejido cerebral, se encontró que en las MNFs había una correlación directamente proporcional entre el número de éstas y el grado de demencia (Figura R23). Estos hallazgos pueden tener implicaciones importantes en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de una enfermedad, así como en la comprensión de los mecanismos subyacentes de la enfermedad.

Otra variable que se evaluó fue la presencia de comorbilidades en el diagnóstico de la enfermedad. Las morbilidades asociadas que se presentaron fueron diabetes/obesidad, aterosclerosis e hipertensión, donde la hipertensión parece afectar de manera notable la expresión de ubiquitina (Figura R24). Esto podría deberse a que la hipertensión arterial puede dañar los vasos sanguíneos y afectar el flujo sanguíneo hacia el cerebro [64], lo que conduce a una condición parecida a la demencia mixta, ya que la hipertensión crónica es un factor de riesgo para desarrollar MID.

Es importante destacar que estas comorbilidades no causan directamente la EA, pero pueden aumentar el riesgo de desarrollarla y afectar la progresión de la enfermedad [65]. Mantener un estilo de vida saludable, controlar adecuadamente estas condiciones médicas y recibir atención médica regular son medidas importantes para reducir el riesgo y manejar la EA de manera efectiva.

Todos estos descubrimientos pueden contribuir al avance del conocimiento básico de la enfermedad y ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y personalizadas.

8 Conclusiones

- ❖ La ubiquitinación está mayormente asociada a la molécula de tau que presenta el cambio conformacional temprano.
- ❖ La ubiquitinación puede ser un marcador que determine etapas tempranas-intermedias de la Enfermedad de Alzheimer.
- ❖ La ubiquitinación puede ser un marcador que ayude a diferenciar entre Enfermedad de Alzheimer y Demencia vascular.
- ❖ La ubiquitinación puede ser un marcador que contribuya al diagnóstico clínico-patológico.

9 Bibliografía

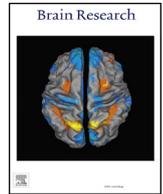
1. Gonzalo-Sanz, L., *Diccionario de medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra*. 2001, Madrid: Espasa Calpe.
2. Gale, S.A., D. Acar, and K.R. Daffner, *Dementia*. *Am J Med*, 2018. **131**(10): p. 1161-1169.
3. Garre-Olmo, J., [*Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias*]. *Rev Neurol*, 2018. **66**(11): p. 377-386.
4. *2021 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimers Dement*, 2021. **17**(3): p. 327-406.
5. Scheltens, P., et al., *Alzheimer's disease*. *Lancet*, 2021. **397**(10284): p. 1577-1590.
6. Saunders, A.M., et al., *Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases*. *Lancet*, 1993. **342**(8873): p. 710-1.
7. Launer, L.J., et al., *Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia*. *Neurology*, 1999. **52**(1): p. 78-84.
8. Porsteinsson, A.P., et al., *Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021*. *J Prev Alzheimers Dis*, 2021. **8**(3): p. 371-386.
9. Gomez-Isla, T., et al., *Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Ann Neurol*, 1997. **41**(1): p. 17-24.
10. Arnold, S.E., et al., *The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease*. *Cereb Cortex*, 1991. **1**(1): p. 103-16.
11. Akiyama, H., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2000. **21**(3): p. 383-421.
12. Binder, L.I., et al., *Tau, tangles, and Alzheimer's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1739**(2-3): p. 216-23.
13. Kidd, M., *Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease*. *Nature*, 1963. **197**: p. 192-3.
14. Mandelkow, E., et al., *Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease*. *Brain Pathol*, 2007. **17**(1): p. 83-90.
15. Goedert, M., et al., *Molecular dissection of the paired helical filament*. *Neurobiol Aging*, 1995. **16**(3): p. 325-34.
16. Goedert, M., M.G. Spillantini, and R.A. Crowther, *Tau proteins and neurofibrillary degeneration*. *Brain Pathol*, 1991. **1**(4): p. 279-86.
17. Weingarten, M.D., et al., *A protein factor essential for microtubule assembly*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(5): p. 1858-62.
18. Delacourte, A. and A. Defossez, *Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments*. *J Neurol Sci*, 1986. **76**(2-3): p. 173-86.

19. Martin, L., X. Latypova, and F. Terro, *Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease*. *Neurochem Int*, 2011. **58**(4): p. 458-71.
20. Alonso, A.C., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules*. *Nat Med*, 1996. **2**(7): p. 783-7.
21. Alonso, A.D., et al., *Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(1): p. 298-303.
22. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
23. Wischik, C.M., et al., *Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(13): p. 4884-8.
24. Novak, M., J. Kabat, and C.M. Wischik, *Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament*. *EMBO J*, 1993. **12**(1): p. 365-70.
25. Fasulo, L., G. Ugolini, and A. Cattaneo, *Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K*. *J Alzheimers Dis*, 2005. **7**(1): p. 3-13.
26. Gamblin, T.C., et al., *Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(17): p. 10032-7.
27. Guillozet-Bongaarts, A.L., et al., *Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging*, 2005. **26**(7): p. 1015-22.
28. Luna-Munoz, J., et al., *Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2005. **8**(1): p. 29-41.
29. Carmel, G., et al., *The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(51): p. 32789-95.
30. Jicha, G.A., et al., *Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau*. *J Neurosci Res*, 1997. **48**(2): p. 128-32.
31. Garcia-Sierra, F., et al., *Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2003. **5**(2): p. 65-77.
32. Ghoshal, N., et al., *Tau-66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2001. **77**(5): p. 1372-85.
33. Ghoshal, N., et al., *Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. *Exp Neurol*, 2002. **177**(2): p. 475-93.
34. Lehman, N.L., *The ubiquitin proteasome system in neuropathology*. *Acta Neuropathol*, 2009. **118**(3): p. 329-47.
35. Al Mamun, A., et al., *Exploring the Promise of Targeting Ubiquitin-Proteasome System to Combat Alzheimer's Disease*. *Neurotox Res*, 2020. **38**(1): p. 8-17.

36. McKinnon, C. and S.J. Tabrizi, *The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(17): p. 2302-21.
37. Oddo, S., *The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(2): p. 363-73.
38. Perry, G., et al., *Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(9): p. 3033-6.
39. Perry, G., et al., *Immunochemical properties of ubiquitin conjugates in the paired helical filaments of Alzheimer disease*. *J Neurochem*, 1989. **52**(5): p. 1523-8.
40. Baner, C., et al., *Tau and ubiquitin immunoreactivity at different stages of formation of Alzheimer neurofibrillary tangles*. *Prog Clin Biol Res*, 1989. **317**: p. 837-48.
41. Manetto, V., et al., *Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(12): p. 4501-5.
42. Zhang, Y., et al., *The role of ubiquitin proteasomal system and autophagy-lysosome pathway in Alzheimer's disease*. *Rev Neurosci*, 2017. **28**(8): p. 861-868.
43. Myeku, N., et al., *Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling*. *Nat Med*, 2016. **22**(1): p. 46-53.
44. Cripps, D., et al., *Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 10825-38.
45. Abreha, M.H., et al., *Quantitative Analysis of the Brain Ubiquitylome in Alzheimer's Disease*. *Proteomics*, 2018. **18**(20): p. e1800108.
46. Garcia-Sierra, F., et al., *Ubiquitin is associated with early truncation of tau protein at aspartic acid(421) during the maturation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Brain Pathol*, 2012. **22**(2): p. 240-50.
47. Mirra, S.S., et al., *The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. *Neurology*, 1991. **41**(4): p. 479-86.
48. Otvos, L., Jr., et al., *Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404*. *J Neurosci Res*, 1994. **39**(6): p. 669-73.
49. Garcia-Sierra, F., et al., *The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old*. *Acta Neuropathol*, 2000. **100**(1): p. 29-35.
50. Basurto-Islas, G., et al., *Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008. **67**(5): p. 470-83.
51. Keller, J.N., K.B. Hanni, and W.R. Markesbery, *Impaired proteasome function in Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2000. **75**(1): p. 436-9.
52. Ye, H., et al., *The Role of Post-Translational Modifications on the Structure and Function of Tau Protein*. *J Mol Neurosci*, 2022. **72**(8): p. 1557-1571.

53. Mondragon-Rodriguez, S., et al., *Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease*. Int J Exp Pathol, 2008. **89**(2): p. 81-90.
54. Jarero-Basulto, J.J., et al., *Proteolytic cleavage of polymeric tau protein by caspase-3: implications for Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(12): p. 1145-61.
55. Wang, Y., et al., *Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4153-70.
56. Tai, H.C. and E.M. Schuman, *Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(11): p. 826-38.
57. Kizilarlanoglu, M.C. and Z. Ulger, *Role of autophagy in the pathogenesis of Alzheimer disease*. Turk J Med Sci, 2015. **45**(5): p. 998-1003.
58. Keck, S., et al., *Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2003. **85**(1): p. 115-22.
59. Hoover, B.R., et al., *Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration*. Neuron, 2010. **68**(6): p. 1067-81.
60. Schmidt, M.L., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaque neurites and neuropil threads*. Lab Invest, 1991. **64**(3): p. 352-7.
61. Iwatsubo, T., et al., *Lack of ubiquitin immunoreactivities at both ends of neuropil threads. Possible bidirectional growth of neuropil threads*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 277-82.
62. Perry, G., et al., *Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton*. J Neurosci, 1991. **11**(6): p. 1748-55.
63. Niu, H., et al., *Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis*. Neurologia, 2017. **32**(8): p. 523-532.
64. Zlokovic, B.V., *Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(12): p. 723-38.
65. Schindler, S.E. and T.K. Karikari, *Comorbidities confound Alzheimer's blood tests*. Nat Med, 2022. **28**(7): p. 1349-1351.

10 Apéndice



Research report

Early but not late conformational changes of tau in association with ubiquitination of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease brains



Vanessa J. Ibarra-Bracamontes^a, Jaime Escobar-Herrera^b, Zdena Kristofikova^c, Daniela Rípova^c, Benjamín Florán-Garduño^a, Francisco Garcia-Sierra^{b,*}

^a Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico

^b Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico

^c National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- In the NFTs of AD, tau undergoes abnormal conformational changes and ubiquitination.
- Early Alz-50-recognized conformation of tau is more susceptible to ubiquitination.
- Ubiquitination is scarce in Tau-66-recognized conformation in tau-composed NFTs.
- The occurrence of these modifications may predict the maturation of tau pathologies.

ARTICLE INFO

Keywords:

Tau conformational changes
Ubiquitination
Neurofibrillary tangles
Alzheimer's disease
Neuritic pathology

ABSTRACT

In Alzheimer's disease, tau protein undergoes post-translational modifications including hyperphosphorylation and truncation, which promotes two major conformational changes associated with progressive N-terminal folding. Along with the development of the disease, tau ubiquitination was previously shown to emerge in the early and intermediate stages of the disease, which is closely associated with early tau truncation at aspartic acid 421, but not with a subsequently truncated tau molecule at glutamic acid 391. In the same group of cases, using multiple immunolabeling and confocal microscopy, a possible relationship between the ubiquitin-targeting of tau and the progression of conformational changes adopted by the N-terminus of this molecule was further studied. A comparable number of neurofibrillary tangles was found displaying ubiquitin, an early conformation recognized by the Alz-50 antibody, and a phosphorylation. However, a more reduced number of neurofibrillary tangles were immunoreactive to Tau-66 antibody, a late tau conformational change marker. When double-labeling profiles of neurofibrillary tangles were assessed, ubiquitination was clearly demonstrated in tau molecules undergoing early N-terminal folding, but was barely observed in late conformational changes of the N-terminus adopted by tau. The same pattern of colocalization was visualized in neuritic pathology. Overall, these results indicate that a more intact conformation of the N-terminus of tau may facilitate tau ubiquitination, but this modification may not occur in a late truncated and more compressed folding of the N-terminus of the tau molecule.

1. Introduction

In Alzheimer's disease (AD), the tau protein is the fundamental component of paired helical filaments (PHFs) that pathologically accumulate in the cytoplasmic space of hippocampal neurons and the cerebral cortex (Delacourte and Defossez, 1986; Goedert et al., 1988; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986). It is

well known that tau undergoes several post-translational modifications that facilitate its loss of function and promote its abnormal self-aggregation (Binder et al., 2005; Grundke-Iqbal et al., 1986; Martin et al., 2011; Mondragon-Rodriguez et al., 2009; Novak et al., 1993). Spanning along the molecule, several Ser/Thr residues are susceptible to being abnormally phosphorylated (Fig. 1) and, if this occurs, tau will not only detach from the microtubules, but will also begin to pathologically self-

* Corresponding author at: Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, CP 07360 Ciudad de México (CDMX), Mexico.

E-mail address: fgarcia-sierra@cell.cinvestav.mx (F. Garcia-Sierra).

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146953>

Received 9 April 2020; Received in revised form 3 June 2020; Accepted 6 June 2020

Available online 08 June 2020

0006-8993/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

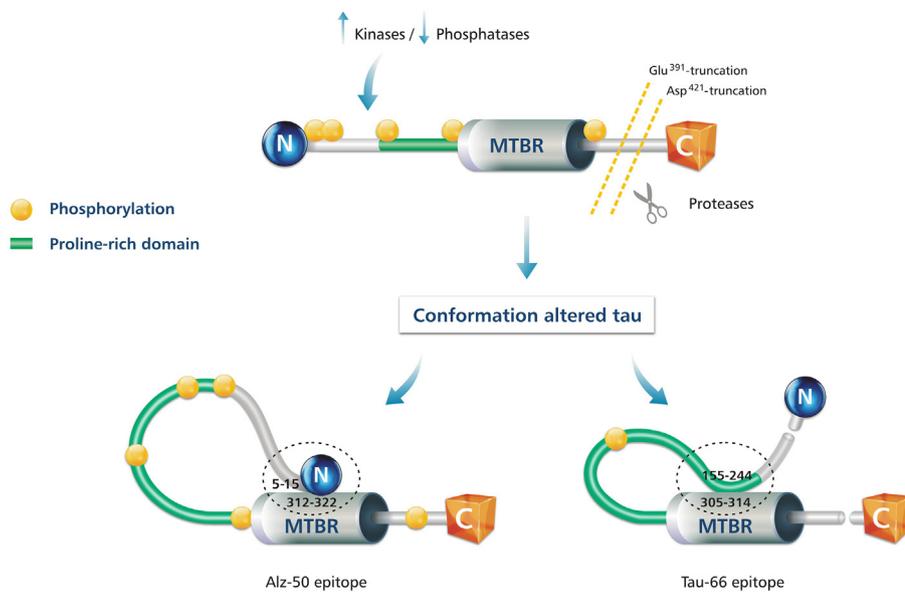


Fig. 1. Diagrammatic representation of conformational changes adopted by tau during NFTs formation and maturation. Native tau in an extended random coil conformation may undergo abnormal phosphorylation produced by unbalanced activity of kinases and phosphatases, as well as proteolytic cleavage in the C-terminus. The basic structure of tau undergoing these modifications may turn into complex conformations involving the bending of the N-terminus over the third repeated domain of the molecule creating the Alz-50 epitope. Once the intact molecule of tau formed this early conformation, proteolysis occurring in both extremes of the molecule, very likely produced by caspases, may drive the conformation of tau to change into a more compact organization by approaching the proline-rich region to the third repeated domain. This conformation is recognized by Tau-66 antibody and succeeds the Alz-50-recognized change. Tau-66-adopted conformation by tau is prevalent in intermediate and late-stage NFTs, where Asp⁴²¹- and Glu³⁹¹ truncations are commonly observed.

aggregate (Alonso et al., 1996; Gustke et al., 1992; Khatoon et al., 1994). Endogenous proteolysis of the carboxyl (C)-terminus of tau is another alternative modification with abnormal properties that substantially increases aggregation and toxicity. In this regard, two cleavage sites have already been reported, which occur at the C-terminal end: one is generated at the position of aspartic acid 421 (Asp-421) by the action of caspase-3 (Gamblin et al., 2003) and the other is processed by an unknown enzyme, which occurs in glutamic acid 391 (Glu-391) (Novak et al., 1993; Wischik et al., 1988) (Fig. 1).

Tau truncation is important because it, together with abnormal phosphorylation, may induce both local (Luna-Munoz et al., 2005) and structural conformational changes in the tau molecule, involving a large and complex misfolding of the N-terminus (Binder et al., 2005; Carmel et al., 1996; Garcia-Sierra et al., 2008).

One of the earliest abnormal conformational changes described for tau was detected by the conformation-dependent antibody Alz-50, which is a pentameric IgM that recognizes the first amino acids of the N-terminus (5–15) when they fold over a group of amino acids spanning the third repeat domain (312–322) (Binder et al., 2005; Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1997). When mapped, the Alz-50 epitope was found to be discontinuous along the tau molecule, and the only way the antibody could have been reactive was to arise when both epitopes are closely approximated (Carmel et al., 1996) (Fig. 1). Several years later, another conformation-dependent antibody, referred to as Tau-66, was generated by immunization of mice with *in vitro*-assembled tau filaments (Ghoshal et al., 2001). In a comparative characterization between the conformation-dependent antibodies Alz-50 and Tau-66 by multiple immunofluorescence, it was found that the tau molecule undergoing the conformational change recognized by Alz-50 preserved both the N- and C-termini intact in most of the early neurofibrillary pathologies observed in AD brain tissue (Garcia-Sierra et al., 2003). When the IgM-type monoclonal antibody Tau-66 was tested in brain tissue, distinct populations of neurofibrillary tangles (NFTs) were observed, which decorated structures at a more advanced stage of proteolytic processing of tau (Garcia-Sierra et al., 2003; Ghoshal et al., 2001; Ghoshal et al., 2002). Although the conformation-dependent antibody Tau-66 recognizes an N-folded conformational change, its discontinuous epitope located at the third repeat domain (305–312) almost overlaps with that of Alz-50; however, the remaining epitope is located in the proline-rich zone (155–244) (Ghoshal et al., 2001). Under the same multilabeling analysis, the tau molecule exhibiting the conformational change recognized by Tau-66 was found to be free of both the N- and C-termini in large amounts of NFTs (Fig. 1). From all

this information, a model of structural changes and processing of tau along the evolution of the disease emerged, and it was concluded that the N-terminus experienced successive conformational changes associated with the C-terminus proteolysis, which was initially generated by caspase-3 (Basurto-Islas et al., 2008; Garcia-Sierra et al., 2003; Guillozet-Bongaarts et al., 2005).

On the other hand, it has been demonstrated in the brains of AD patients that abnormally aggregated tau is also ubiquitinated, and several potential ubiquitination sites along the molecule have been identified (Abreha et al., 2018; Cripps et al., 2006; Lehman, 2009; Manetto et al., 1988; Perry et al., 1987; Perry et al., 1989).

To better understand and characterize the ubiquitination of tau along with the evolution of AD in patients' brains, we previously found that this modification occurs at intermediate stages of the disease, in close association with either full-length intact- or caspase-3-truncated tau. Barely any association was found in the advanced stages of tau processing when tau has lost its N- and C-termini, although the repeat domains were still preserved in the final PHF core (Garcia-Sierra et al., 2012).

In the current investigation, we sought morphological evidence that ubiquitination is associated with an early and intermediate conformational change in the N-terminus of tau, in which susceptible residues of ubiquitin-conjugated enzymes may be available. However, once this conformation is lost due to a refolding of the N-terminus in the intermediate and advanced stages of the disease, ubiquitination is no longer detected. Overall, the timing of tau ubiquitination along its proteolytic processing and conformational changes is a reliable marker, which contributes to better describe the evolution and maturation of neurofibrillary pathology in AD.

2. Results

In a previous study, some colocalization patterns were determined between ubiquitin-targeted and truncated-tau composed NFTs in the hippocampus of AD and mixed dementia cases (Garcia-Sierra et al., 2012). In the present study, the same group of cases was used to further analyze the relationship between ubiquitination of NFTs and the presence of conformational changes in the molecule of tau involving N-terminus folding.

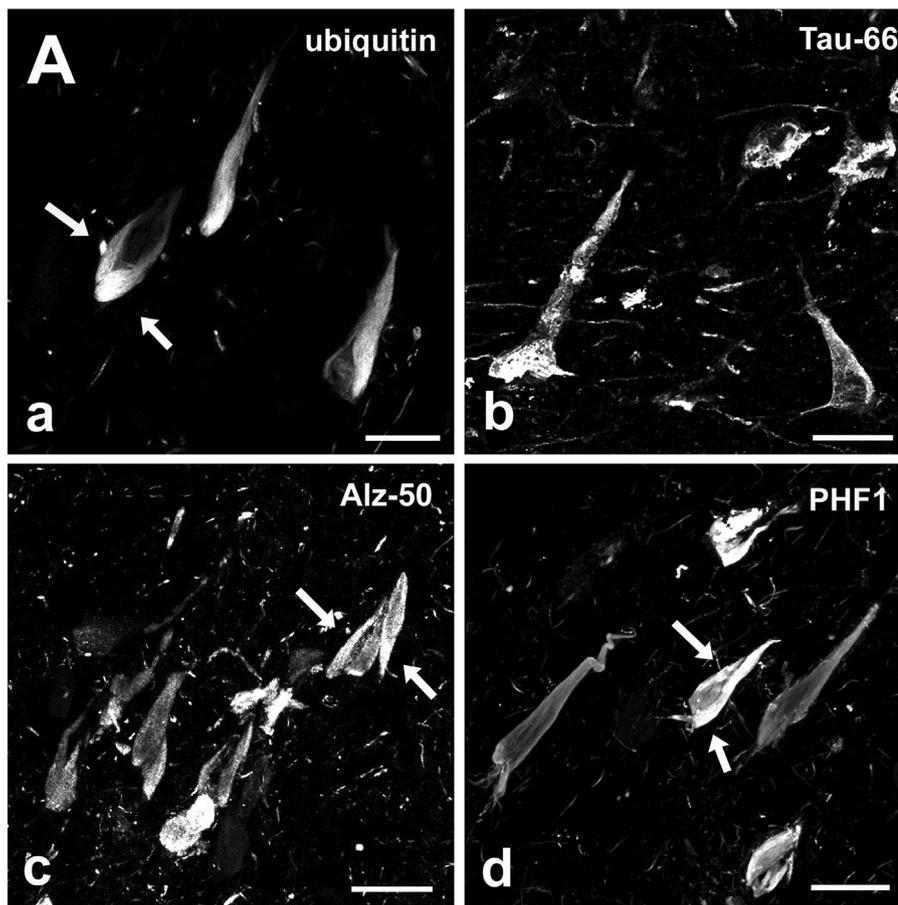
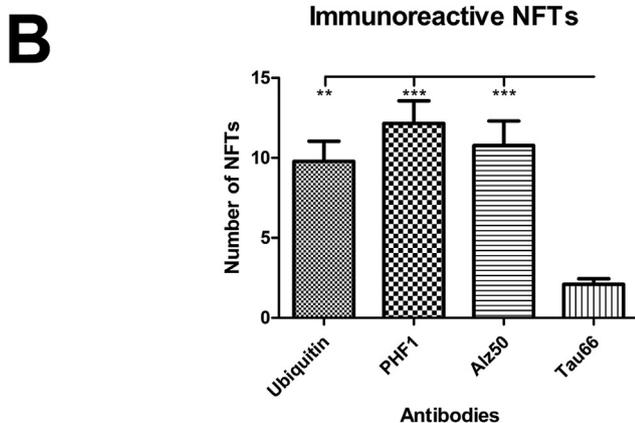


Fig. 2. Profile and counts of NFTs recognized in the hippocampus of AD cases. A. Single-labeling immunofluorescence and confocal microscopy using (a) anti-ubiquitin, (b) Tau-66, (c) Alz-50, and (d) PHF1 antibodies. Arrows in (a), (c)-(d) indicate intracellular double-leaf shaped NFTs. Bars: (a) 29 μm , (b) 30 μm , (c) 22 μm , and (d) 34 μm . B. Immunoreactive NFTs were counted in the CA1 region of the hippocampus and expressed as the number of structures in 0.086 mm^2 . Significant differences were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine specific differences between all antibodies. **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).



2.1. Ubiquitin and conformationally altered tau immunoreactivity in the hippocampus of AD and mixed dementia cases

Single immunofluorescence with antibodies that recognize the conformational changes of tau in the hippocampal CA1 region of AD and mixed dementia cases is shown in Fig. 2A. The intracellular profile of NFTs, as compacted double-leaf shaped structures, was observed in ubiquitin-targeted (panel a), Alz-50 immunoreactive (panel c), and PHF1 decorated (panel d) NFTs (arrows). Most of these NFTs display a fibrillary pattern of staining; however, the NFTs recognized by the conformation-dependent antibody Tau-66 (panel b) are decorated with a more amorphous and punctate staining of these structures.

When the total number of NFTs recognized by the previous set of antibodies was determined in the hippocampus (Fig. 2B), the conformation-dependent antibody Alz-50 and Phospho-Ser396,404-Tau

immunoreactive PHF1 antibody show the highest number of recognized structures, which were not significantly different from those counted for ubiquitin-targeted NFTs. Nevertheless, Tau-66 antibody detected a significant and reduced number of NFTs compared to the ubiquitin ($p < 0.01$), Alz-50 ($p < 0.001$) and PHF-1 ($p < 0.001$) immunoreactive structures.

2.2. Ubiquitin-targeted NFTs being preferentially associated with early conformational changes of tau

To evaluate whether ubiquitination in NFTs is related to tau-specific conformational changes involving folding of the N-terminus, double immunolabeling was performed by combining an ubiquitin polyclonal antibody with either Alz-50 or Tau-66 monoclonal antibodies. As shown in Fig. 3, ubiquitination is closely associated with

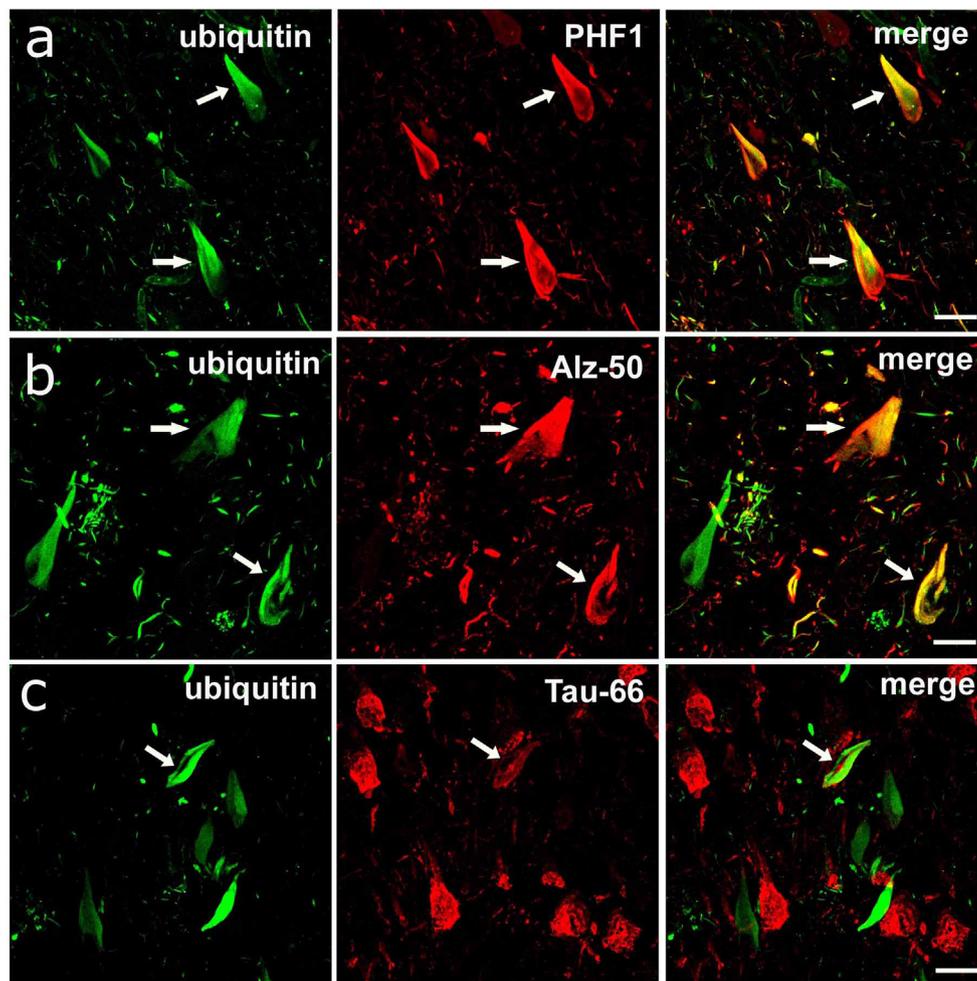


Fig. 3. Ubiquitination of tau is preferentially observed in the Alz-50-recognized conformation adopted by Tau in NFTs. Ubiquitin-targeted NFTs were analyzed by double-labeling immunofluorescence in pairwise combination of antibodies: (a) Ubiquitin-PHF1, (b) Ubiquitin-Alz-50, and (c) Ubiquitin-Tau-66. Arrows indicate the most obvious double-labeled NFTs. Colocalization per NFT is more evident between Ubiquitin and PHF1. Tau-66 immunoreactive NFTs display a more amorphous shape. Bars: (a) 25 μm , (b) 16 μm , and (c) 25 μm .

phosphorylation of NFTs composed of tau, and colocalization between these structures was commonly observed (arrows in panel a). When ubiquitin-targeted NFTs were visualized to expose the conformational change recognized by Alz-50, colocalization was also observed in these structures (arrows in panel b, Fig. 3). However, this was not the case for ubiquitin-targeted NFTs, which displayed the conformation recognized by Tau-66 with reduced colocalization (arrows in panel c, Fig. 3).

To further confirm the close association between ubiquitin-targeted NFTs and Alz-50 immunoreactivity, triple labeling experiments were performed, including the Tau-13 antibody, which recognizes the first amino acids of the N-terminus of tau (Table 2). As shown in Fig. 4, examples of triple labeled NFTs were clearly seen in the merge channel (arrows). On the other hand, the tau conformation recognized by the Tau-66 antibody is also associated with the N-terminus of tau, but in a different array in which the proline region makes contact with the third repeat domain, and the N-terminal amino acids are lost (Garcia-Sierra et al., 2003). When Tau-13 was also assessed in combination with Tau-66 and the anti-ubiquitin antibodies, no triple labeling was detected in the merge channels, indicating a lack of ubiquitination in the Tau-66-recognized conformation adopted by tau in NFTs (Fig. 5, arrows indicate no colocalization of Tau-66-positive NFTs).

The quantitative determination of double-labeled NFTs in each pairwise combination is shown in Fig. 6A. The ubiquitin-targeted and phosphorylated tau colocalizing NFTs (Ub-PHF1) as well as the ubiquitin-targeted colocalization with the Alz-50-dependent conformation

Table 1

Demographic information of Psychiatric Hospital Bohnice cases.

Case number	Gender/age	Pathological diagnosis*	CDR [‡]	Cause of death
12	F/64	AD	III	BCI
82	M/88	AD	III	BCI
99	F/99	AD	III	BCI
140	F/77	AD	III	BCI
179	F/82	AD	II	BCI
192	F/82	AD	III	BN
229	F/75	AD	II	ICB
50	M/83	AD + MID	III	ICB
60	M/78	AD + MID	III	ICB
102	M/77	AD + MID	III	BN
109	F/85	AD + MID	III	ICB
117	F/81	AD + MID	III	BN
136	F/94	AD + MID	II	ICB
205	M/87	AD + MID	II	ICB
212	M/95	AD + MID	III	ICB

* According to Mirra et al. 1991; [‡]Clinical Dementia Rating; AD: Alzheimer's disease; AD + MID: AD plus Multi-Infarct Dementia; BHF: Bilateral Heart Failure; BN: Bronchopneumonia; F: Female; M: Male.

of tau in NFTs (Ub-Alz-50) were significantly higher than those for ubiquitin-positive NFTs carrying the Tau-66-adopted tau conformation (Ub-Tau-66) ($p < 0.001$).

To further dissect and attest this pattern of colocalization, the total

Table 2
Summary of antibodies employed.

Antibody	Epitope	Host-class	Dilution	Reference
Alz-50	Tau conformational change (5–15; 312–322*)	mouse-IgM	1:5000	(Carmel et al., 1996)
Tau-66	Tau conformational change (155–244; 305–314*)	mouse-IgM	1:10,000	(Ghoshal et al., 2001)
PHF1	Phospho-Tau (Ser396, 404*)	mouse-IgG	1:10,000	(Otvos et al., 1994)
Tau-13	N-terminus (9–18*)	mouse-IgG	1:5000	(Garcia-Sierra et al., 2003)
Anti-ubiquitin	Ubiquitin-protein conjugates	rabbit-polyclonal IgG	1:200	Millipore Corp.

*Residues based on the longest human Tau isoform (2N4R).

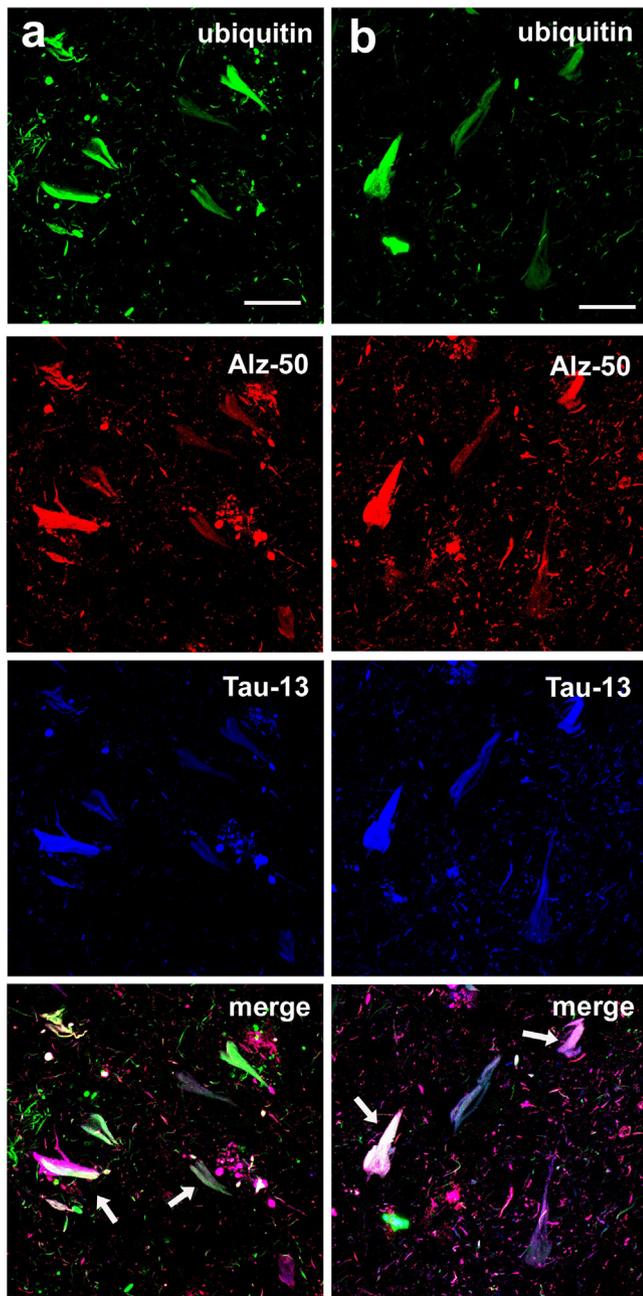


Fig. 4. Triple-labeling immunofluorescence corroborates ubiquitination in early intact and folded N-terminus of Tau. In (a) and (b), very similar NFT-staining patterns were observed using Alz-50 and Tau-13 antibodies. These NFTs were also colocalized with ubiquitin to various degrees (arrows in the merge channels). Bars: (a) 42 μ m and (b) 33 μ m.

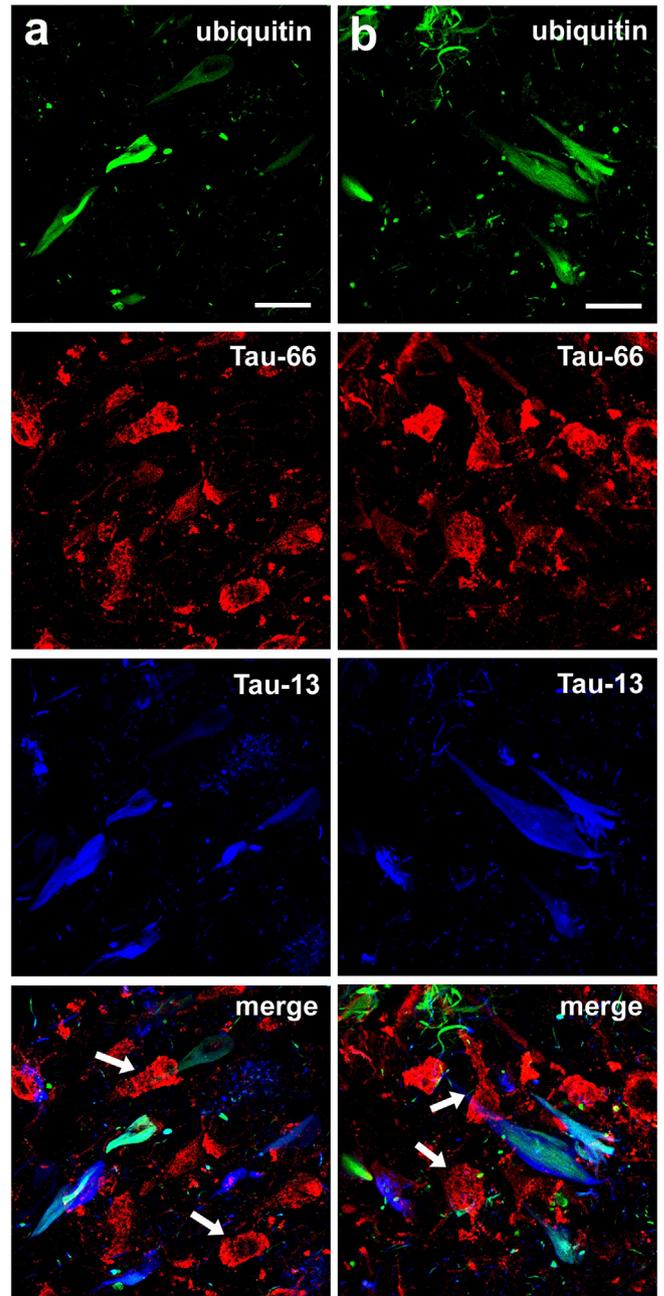


Fig. 5. Tau-66-recognized conformation adopted by tau in mature NFTs is not associated with ubiquitination. Besides the lack of colocalization of the late Tau-66-recognized conformation of tau with either anti-ubiquitin or Tau-13 antibodies, these NFTs display punctate labeling and irregular shape (arrows in a and b). Bars: (a) 39 μ m and (b) 26 μ m.

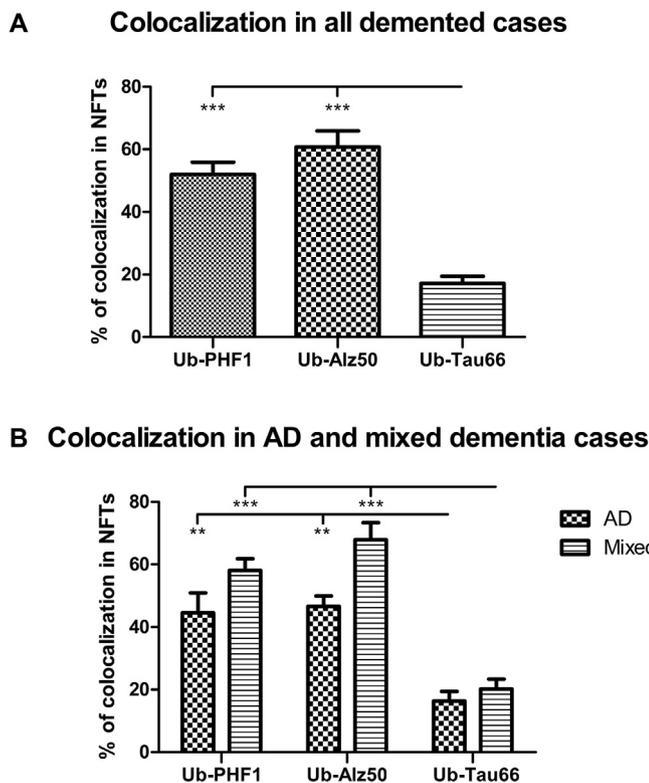


Fig. 6. Quantitative analysis of colocalization between ubiquitin and tau immunoreactive NFTs. (A) In all demented cases, significantly reduced numbers of double-labeled Ubiquitin (Ub)-Tau-66 immunoreactive NFTs were determined relative to the amount of NFTs double-labeled with Ub and either PHF1 or Alz-50 antibodies ($p < 0.001$); (B) The case population was separated into AD and mixed dementia cases, and the same number of double-labeled NFTs with anti-Ub and Tau-66 was significantly reduced relative to the rest of double-labeled NFTs in either AD (** $p < 0.01$) or mixed dementia cases (** $p < 0.001$). Significant differences were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

population of cases was then separated into cases of AD and mixed dementia, and quantitative colocalization was analyzed. As shown in Fig. 6B, the same colocalization patterns were observed in both groups, with a significantly reduced number of pairwise NFTs positive to ubiquitin and Tau-66 antibodies with respect to either ubiquitin-PHF1-positive NFTs or ubiquitin-Alz50-positive NFTs in cases of AD ($p < 0.01$) and Mixed dementia ($p < 0.001$).

2.3. Ubiquitin-targeted and conformationally altered tau in the neuritic component

Since the accumulation of abnormally processed tau and ubiquitin labeling in the neuritic pathology of AD brains has been described (Morishima-Kawashima et al., 1993; Perry et al., 1987), in the present study we investigated whether the relationship between ubiquitination and conformational changes of tau observed in NFTs was also preserved in another compartment, excluding the neuronal soma. To this end, areas with neuritic pathology were collected in the same multi-labeled slices and analyzed for epitope co-expression. As depicted in Fig. 7 in neuritic elements, a close colocalization was found between ubiquitin, the Alz-50-dependent conformation adopted by tau and phosphorylated tau (PHF1 immunoreactivity) (panel a). However, little decoration was found in these elements with the conformation-dependent antibody Tau-66 (red channel in panel b, Fig. 7). Colocalization in neuritic elements was more predominant for ubiquitinated and phosphorylated tau (asterisks in panel b, Fig. 7).

In order to quantitatively corroborate these observations, the

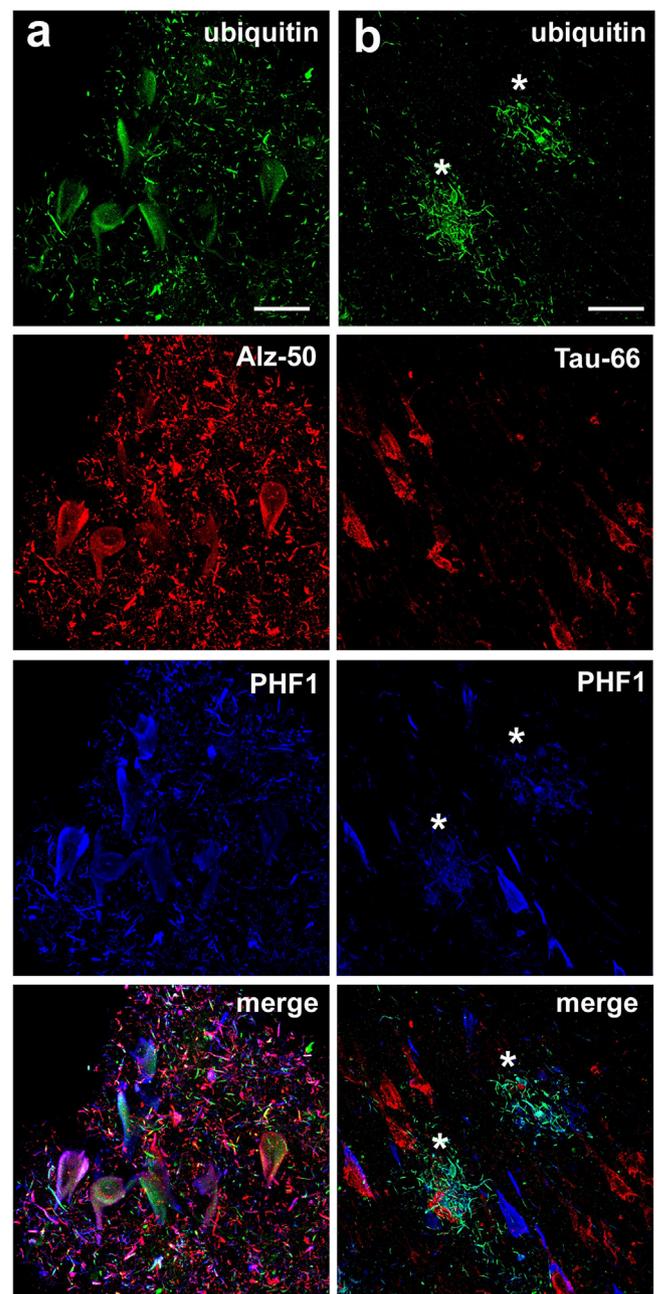


Fig. 7. Ubiquitin immunoreactive neuritic pathology in the hippocampus of AD cases. Extensive neuritic pathology was double- and triple-labeled with anti-ubiquitin, Alz-50, and PHF1 antibodies. Note the multiple combined patterns observed in these neuritic elements as a result of changes in individual contribution (merge channel in a). However, this is not the case for the Tau-66 antibody (b), which was unable to either recognize neuritic elements in significant amount or colocalize with other antibodies. Asterisks only denote colocalization between Ubiquitin and PHF1. Bars: (a) 35 μm and (b) 50 μm .

neuritic areas and colocalization patterns were determined between pairwise antibodies. As shown in Fig. 8, the values for ubiquitin and Tau-66-recognized conformation adopted by tau were significantly reduced compared to those shown by ubiquitin-Alz-50 ($p < 0.05$).

3. Discussion

Conformational changes and truncation of tau are considered to be molecular markers that sequentially define the progression and maturation of NFTs in AD (Basurto-Islas et al., 2008; Binder et al., 2005;

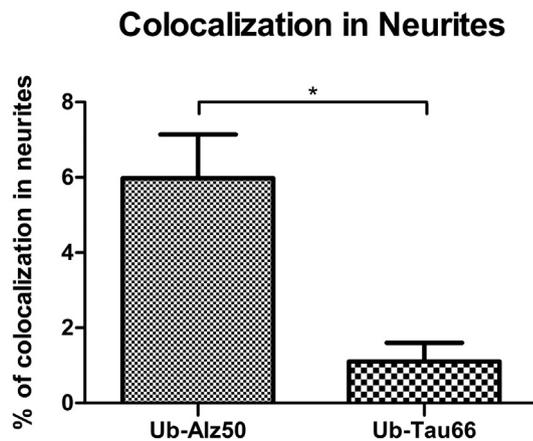


Fig. 8. Quantitative analysis of neuritic load immunoreactive to ubiquitin and tau antibodies. The double-labeled neuritic load is expressed as a normalized area showing colocalization relative to the total immunolabeled area (red + green occupied area). The colocalization between ubiquitin and Alz-50 (Ub-Alz50) was significantly higher than that observed for ubiquitin and Tau-66 (Ub-Tau66) double-labeled structures (* $p < 0.05$). p values were obtained using Student's t -test.

Garcia-Sierra et al., 2003; Hyman et al., 2005; Kolarova et al., 2012). These modifications are associated with the dynamic changes experienced by tau even in apparently inert structures, such as NFTs. We have already proposed that during the aggregation of this molecule to form NFTs in AD brains, it displays an N-terminal folding, which may be the result of specific phosphorylations in several Ser/Thr residues related to truncation of the C-terminus (Binder et al., 2005; Garcia-Sierra et al., 2003; Jarero-Basulto et al., 2013; Mondragon-Rodriguez et al., 2008). Once this molecule changes its conformation, it may expose epitopes that were initially inaccessible and become a potential target for the action of distinct proteases, which in turn can continue the proteolytic process and induce another structural rearrangement of the molecule. Such is the case of the sequential conformations detected by the Alz-50 and Tau-66 antibodies during the formation and maturation of NFTs in AD (Binder et al., 2005; Garcia-Sierra et al., 2003; Ghoshal et al., 2001; Ghoshal et al., 2002).

Abnormal proteolytic processing of proteins has been widely reported to occur in the brains of AD patients, along with an increased level of proteases such as cathepsin, calpain and caspases (Chai et al., 2019; Ferreira and Bigio, 2011; Gamblin et al., 2003; Johnson et al., 1989; Sun et al., 2011; Wang et al., 2009), although not always in association with neurofibrillary pathology. Another group of processes involved in the degradation and recycling of misfolded proteins is in conformity with the UPS system, autophagy, and chaperon targeting (Blair et al., 2014; Kizilarlanoglu and Ulger, 2015; McKinnon and Tabrizi, 2014; Tai and Schuman, 2008; Zhang et al., 2017). Cells contain an efficient system of protein turnover and degradation involving proteasome, in which selective substrates are targeted by ubiquitination and processed through this pathway (Schwartz and Ciechanover, 2009).

Tau is a selective target to be processed by the UPS system, and disturbance or increased markers of this system have been found in the brains of patients with AD (Bancher et al., 1989; Lehman, 2009; Manetto et al., 1988; Manetto et al., 1989; Morishima-Kawashima et al., 1993; Perry et al., 1987; Perry et al., 1989). However, there is a lack of evidence to better explain when and how the structural signatures of tau promote its ubiquitination and degradation in AD, or conversely, whether the increased amount of this modification in tau is the result of unsuccessful degradation of tau-aggregates by the proteasomal complex (Keck et al., 2003; Keller et al., 2000).

Previously, the ubiquitination of tau has been demonstrated as a process that occurs in the early and intermediate stages of the disease during the formation of NFTs, and this ubiquitinated-molecule is

somehow prone to the truncation of its C-terminus, primarily by caspase-3 (Garcia-Sierra et al., 2012). As a result, tau continues to adopt more structural rearrangements, and ubiquitination does not seem to occur in more advanced stages of AD progression when the tau molecule has lost both the N- and C-termini (truncation in Glu-391). Remarkably, although tau still contains the repeat domain region with potential ubiquitination sites in the remaining PHF-core (Wischik et al., 1988), ubiquitination was no longer observed (Garcia-Sierra et al., 2012).

Since the conformational changes of tau, predominantly adopted by the N- terminus (Binder et al., 2005; Carmel et al., 1996; Cripps et al., 2006; Ghoshal et al., 2001), could represent an induced signal for the ubiquitination and activation of the UPS, in the present work, we seek to elucidate a possible morphological relationship between ubiquitination and conformational changes of tau during the maturation of NFTs and neuritic pathology in AD.

Interestingly, we found that when tau develops the early conformational change recognized by Alz-50, the molecule also undergoes an increased level of phosphorylation and ubiquitination, which is clearly demonstrated by a high colocalization observed between these modifications in the same NFTs (Fig. 3 and Fig. 6A). This could be reasonable in the sense that an intact tau molecule could expose all of its putative ubiquitination sites, and the folded conformation adopted by the N-terminus, probably promoted by abnormal phosphorylation, is an inducible signature for being ubiquitin-targeted and engaged for proteasome degradation (Abreha et al., 2018; Cripps et al., 2006). This Alz-50-dependent conformational change has no limitation on ubiquitin-targeting, and an opposite relationship was observed in the more advanced N-terminus conformational change in tau due to a very significant reduction in the colocalization signal between ubiquitination and Tau-66 immunoreactivity being noticed in the same population of NFTs (Fig. 3 and Fig. 6A).

As previously mentioned, the Tau-66-recognized conformation adopted by tau is closely associated with the loss of the N- and C-termini (Garcia-Sierra et al., 2003; Guillozet-Bongarts et al., 2005), which is further demonstrated in this work: when the lack of colocalization between an N- distal terminus marker (Tau-13 antibody) (Ghoshal et al., 2002) and Tau-66 was observed (Fig. 5). The absence of colocalization between Tau-66 and ubiquitin in NFTs was also corroborated when the entire population of cases was divided into pure AD and mixed dementia (Fig. 6B), which may imply that tau pathology develops common processing, regardless of additional insults in AD brains, as previously reported (Basurto-Islas et al., 2008; Basurto-Islas et al., 2009; Garcia-Sierra et al., 2012; Mondragon-Rodriguez et al., 2008).

Moreover, the characteristic profile of NFTs recognized by Tau-66 antibody is unique because it is morphologically different from others, including those undergoing ubiquitin-targeting. Although we found in this study that these NFTs coexist in the same CA1 subfield in the hippocampus, the Tau-66 positive NFTs are more irregular and less compact, showing a punctate staining pattern. Altogether, we can conclude that these Tau-66 immunoreactive NFTs probably correspond to a late stage structure in which the degradation and processing of tau have modified the molecular structure of PHFs.

If the tau molecule is analyzed, then traditional ubiquitination sites will be reported to occur in residues Lys²⁵⁴, Lys³¹¹, and Lys³⁵³ in association with a conformationally altered and phosphorylated tau molecule (Cripps et al., 2006). More recently, a quantitative analysis of brain ubiquitylome in AD cases has been performed, and updated characterization has mapped 28 ubiquitinated sites, including 15 new Lys residues (Abreha et al., 2018).

When tau developed the early Alz-50-detected conformation, the highest level of ubiquitination was found in NFTs (Fig. 6A), which is in line with the total availability of residues prone to ubiquitination in a full-length tau molecule. Nevertheless, this situation is not the same for the tau molecule that adopts the Tau-66-recognized conformation,

because 7 of the 15 new ubiquitin-targeted residues in this molecule are distributed along the proline-rich region (Lys¹⁶³, Lys¹⁸⁰, Lys¹⁹⁰, Lys²²⁴, Lys²²⁸, Lys²³⁴, Lys²⁴⁰) (Abreha et al., 2018).

Coincidentally, the discontinuous epitope of Tau-66 located in this proline region (a.a. 155–244) makes contact with its complementary epitope positioned in the third repeat domain to develop the N-folded conformation (Ghoshal et al., 2001). For this reason, we assumed that these ubiquitination sites are masked and barely accessible for ubiquitin targeting the conformation recognized by Tau-66.

As a consequence of this condition, the folded tau can escape this signaling pathway associated with proteasome degradation, but will eventually be proteolyzed by yet unknown proteases, resulting in truncation at Glu-391. This truncation is well known to be found in NFTs also composed of the Tau-66-immunoreactive tau, but later became the main molecular signature of the remaining PHF-core preserved in the later stages of the disease (Basurto-Islas et al., 2008).

Another interesting analytical aspect, which we cannot clarify with our current data, is the type of ubiquitination associated with the molecular signatures (e.g. conformational changes and truncation) of tau during its aggregation. Our ubiquitin antibodies are limited to recognizing ubiquitin-protein conjugates, but cannot distinguish between mono- or poly-ubiquitination. In fact, it would be very prolific to obtain information on what type of current polyubiquitin linkages (Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys³³, Lys⁴⁸, and Lys⁶³) and linear ubiquitination (Lys⁶³-linked ubiquitin) (Nakayama et al., 2019) would be associated with distinctly modified tau-composed NFTs, which not only predicts the fate of tau degradation via proteasomal activity or autophagy, respectively, but also achieves more accurate neuropathological stratification in the diagnosis of AD.

On the other hand, our study also analyzed the neuritic component and dystrophic elements in the same hippocampal area, in which tau also accumulates abnormally and undergoes the same posttranslational modifications already reported for NFTs (Hoover et al., 2010; Schmidt et al., 1991; Xia et al., 2015). However, so far there is no clear evidence on specific associations between conformational changes, ubiquitination, phosphorylation, and truncation of aggregated-tau in these neuritic elements, which have already been obtained.

Previously, the neuritic pathology in AD brains was also found to be immunoreactive to Tau-66 antibody (Ghoshal et al., 2001). In fact, besides NFTs, unique structures called diffuse reticulated plaques were described, comprising of Tau-66 immunoreactive neurites and degenerated neuronal processes (Ghoshal et al., 2001). In the current study, the hippocampal load of Tau-66 immunoreactive neuritic pathology was greatly reduced compared to that detected by the Alz-50 antibody, indicating that the prevailing conformational change of tau in these structures preserves the N- and C-termini intact. Moreover, not only did the amount of Tau-66 positive neurites decrease, but their ubiquitination was also significantly less than that of the Alz-50-immunoreactive structures (Fig. 8). The patterns of tau ubiquitination in the neuritic component may reflect those observed during the early stages of NFTs formation and maturation. Ubiquitination in the neuritic component is both limited in amount (Iwatsubo et al., 1992) and related to specific structural signatures of tau, probably because tau does not develop intricate structural changes (misfoldings) in a compartment that is far from the neuronal soma where the mechanisms of transformation and processing of molecules are more active (Lopez-Gonzalez et al., 2013). We must also consider that in the neuritic and dystrophic compartments, the accumulation of proteins other than tau, such as neurofilaments of varying densities, has been reported, and these molecules could also be subject to ubiquitin targeting (Perry et al., 1991; Schmidt et al., 1991). In fact, certain elements of the neuritic pathology are immunoreactive to ubiquitin, and less to tau (Fig. 7).

As shown in Fig. 9, the study can conclude that the tau molecule undergoes important conformational changes during its aggregation process, and these alterations may be influenced by multiple processes of intracellular proteolysis and degradation of misfolded proteins. In

this model, the timing of tau ubiquitination in a molecule was updated, displaying distinct modifications in its N- and C-termini, and showing how ubiquitination is limited or eliminated when advanced folding of the molecule and extensive proteolysis occur in the latter stages of the disease.

4. Experimental procedures

4.1. Brain tissue and basic histological analysis

The study used 30 μm thick sections of the hippocampus from the brains of demented subjects, which have been used in previous studies (Garcia-Sierra et al., 2012). Tissue was obtained from the Psychiatric Hospital Bohnice in the Czech Republic, and the population consisted of seven pure cases of AD and eight mixed cases (a combination of AD diagnosed with multi-infarct dementia). Case collection and experiments were conducted following the Declaration of Helsinki, and the research was formally approved by the local ethics committee of the Prague Psychiatric Center, Prague, Czech Republic, in accordance with Laws 129–2003 and 130–2003.

Cases of AD were clinically classified into advanced stages of dementia and were pathologically confirmed in accordance with criteria used in the work by Mirra et al., (1991). Patients with mixed dementia presented AD changes and also developed vascular alterations, lacunae or attenuated brain weight (Table 1).

Free-floating sections of the hippocampus were obtained by cryotomy, and then fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), and kept at 4 °C.

4.2. Immunofluorescence

The procedures performed in this study were described in detail in a previous study (Garcia-Sierra et al., 2012). Briefly, fixed 30 μm thick brain slices were washed in 0.01% Triton (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) in tris buffered saline (TBS-t) and then incubated with primary antibodies (Table 2).

In double-labeling experiments, an ubiquitin polyclonal antibody (Millipore Corp., Temecula, CA, USA) diluted at 1:500 was independently incubated with either PHF1, Alz-50 or Tau-66 antibodies (Table 2) diluted to (1:5000), (1:5000), and (1:10000), respectively. Incubations were carried out overnight at 4 °C and washed with TBS-t. Slices were then incubated with the corresponding secondary antibodies for each pairwise combination, which always contained a fluorescein-isothiocyanate (FITC)-tagged anti-rabbit polyclonal antibody (Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc. West Grove, PA, USA) to detect the aforementioned primary ubiquitin antibody. This secondary antibody was combined with either a tetramethylrhodamine-isothiocyanate (TRITC)-tagged anti-mouse “γ”-specific chain (Jackson Immuno-Research Laboratories) or a TRITC-tagged anti-mouse “μ”-specific chain (Jackson Immuno-Research Laboratories), and incubated in the dark for 2 h at room temperature.

Triple labeling was performed by combining the rabbit polyclonal ubiquitin antibody with either Alz-50 or Tau-66 mouse monoclonal IgM-type immunoglobulins. The third primary antibody used was either the IgG-type mouse monoclonal antibody Tau-13 (Table 2) (1:5000) or PHF1. After overnight incubation, these mixtures were in turn visualized by incubation for 2 h with the abovementioned FITC-tagged anti-rabbit antibody, the TRITC-tagged anti-mouse-IgM antibody, and a Cyanine-5 (Cy5)-tagged anti-mouse “γ”-specific chain antibody (Jackson Immuno-Research Laboratories).

Samples were washed in TBS-t and then mounted in anti-queching Vectashield medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA).

In some experiments, single-labeled structures composed of either ubiquitin or tau proteins were double-labeled with 0.001% thiazine red (Sigma) to corroborate the fibrillary nature of the aggregated proteins (Mena et al., 1995).

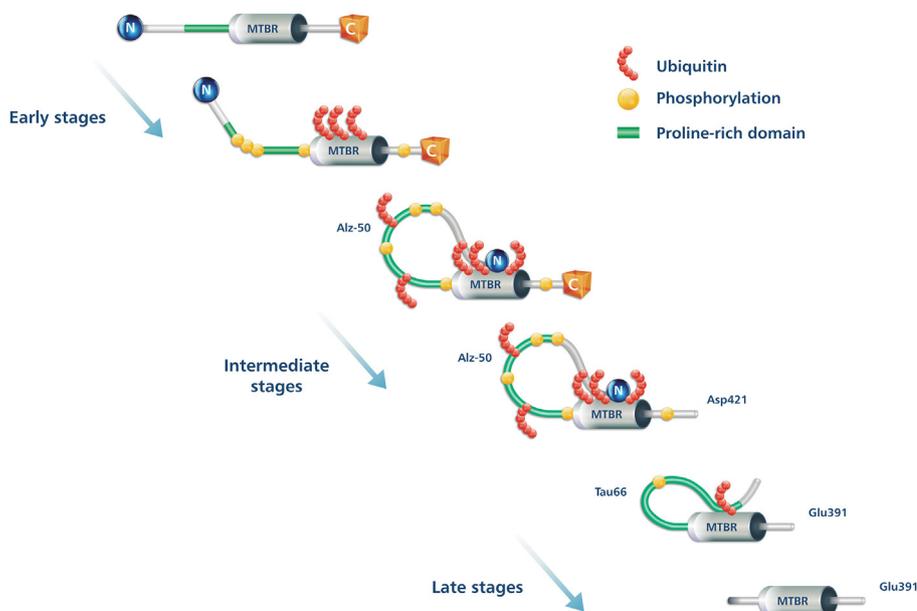


Fig. 9. Ubiquitin targeting is associated with early conformational changes of tau during NFTs maturation in AD. In the early stages of NFT formation, tau is phosphorylated and ubiquitinated in the available residues, which are not hidden when tau adopts the conformation recognized by Alz-50 and partial truncation of the C-terminus (Asp-421) in the intermediate stages of the disease. As NFTs become more mature, tau undergoes a complex N-terminal folding, in which the proline-rich region makes contact with the third repeat domain, thereby making this region more difficult for ubiquitin-targeting. Later events of proteolysis remove the extreme N- and C-termini of tau (truncation at Glu-391 occurs), but not the compressed fold of the proline-rich region on the repeats. The final PHF core is the remaining structure that only shows truncation in Glu-391, as a marker of advanced processing of tau in the latest stages of NFTs maturation.

4.3. Epifluorescence and confocal microscopy acquisition

Immunofluorescent slices were viewed and analyzed by epifluorescence through a 20X (Numerical Aperture [NA]:0.5) and a 40X (NA:0.75) Plan-Fluor Lens coupled with a Nikon Eclipse-80i Microscope (NikonCorp., Tokyo, Japan). Images were collected using a Nikon digital sight-DG-Ri1 camera, which was controlled by the Nikon NIS-Elements AR-3.0-SP7 software included in the system (Nikon). To perform multiple labeling, optical sectioning, colocalization and critical analysis of immunolabeled structures, a Leica-TCP-SP8 confocal laser scanning microscope was used in conjunction with a 40X (NA:0.75) OIL PH3 CS2 HC PL APO lens (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). The resulting images were obtained and analyzed using Leica Confocal-LAS-AF Lite version 2.x software.

4.4. Imaging analysis

After acquisition, images were analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) software. The quantitative determination of immunolabeled NFTs was obtained by using the Multi-Point tool to select the objects in a sampling area covering 0.086 mm². The number of structures was expressed as the mean and standard error of five randomly selected fields in the CA1 area of the hippocampus. Quantification of colocalization was expressed as the ratio of double-labeled NFTs (positive to ubiquitin and tau conformation-dependent antibodies) to the total number of single and double-labeled NFTs (Garcia-Sierra et al., 2012).

For the determination of neuritic pathology, images collected from the same area were digitally processed with the MCH mode of the Nikon NIS-Elements AR-3.0-SP7 software to calculate the proportion of immunolabeled neurites. NFTs and non-neuritic structures were removed from the analysis when threshold parameters were settled. Colocalization patterns were analyzed and expressed as the percentage of double-labeled neurites in the total area occupied by single and double-labeled structures.

4.5. Statistical analysis

For pairwise combinations, the differences between the two groups were calculated using the parametric Student's *t*-test. Multiple group differences were analyzed using one-way ANOVA and subsequent Tukey's test. Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism

v6.0 statistical software.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Virginia Lee for using the PHF1 antibody, Lester I. Binder for sharing Tau-13 and Tau-66 antibodies, and Peter Davis for using the Alz-50 antibody. Confocal microscopy facilities were provided by the Confocal Microscopy Unit at the Cell Biology Department of CINVESTAV-IPN. Thanks to L.D.G. Claudia Ibarra Bracamontes for her artwork design. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT-Mexico) (grant 255224 to Francisco Garcia-Sierra, grant 142293 to Benjamín Florán-Garduño, and scholarship 215216 to Vanessa J. Ibarra-Bracamontes), grant SEP-CINVESTAV. Support from the Ministry of Health of the Czech Republic for Zenda Kristofikova (grant nr. 16-27611A), is also acknowledged. Proofread by Modern Manuscript Editing Services.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146953>.

References

- Abreha, M.H., Dammer, E.B., Ping, L., Zhang, T., Duong, D.M., Gearing, M., Lah, J.J., Levey, A.I., Seyfried, N.T., 2018. Quantitative analysis of the brain ubiquitylome in Alzheimer's Disease. *Proteomics* 18, e1800108.
- Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1996. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2, 783–787.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wisniewski, H.M., 1989. Tau and ubiquitin immunoreactivity at different stages of formation of Alzheimer neurofibrillary tangles. *Prog. Clin. Biol. Res.* 317, 837–848.
- Basurto-Islas, G., Luna-Munoz, J., Guillozet-Bongaarts, A.L., Binder, L.I., Mena, R., Garcia-Sierra, F., 2008. Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 470–483.
- Basurto-Islas, G., Mondragón-Rodríguez, S., Binder, L.I., Garcia-Sierra, F., 2009.

- Pathology of the cleaved tau protein in the context of toxicity and the formation of neurofibrillary tangles. *Eur. Neurol. Rev.* 4, 20–23.
- Binder, L.I., Guillozet-Bongaarts, A.L., Garcia-Sierra, F., Berry, R.W., 2005. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 216–223.
- Blair, L.J., Sabbagh, J.J., Dickey, C.A., 2014. Targeting Hsp90 and its co-chaperones to treat Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 18, 1219–1232.
- Carmel, G., Mager, E.M., Binder, L.I., Kuret, J., 1996. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 271, 32789–32795.
- Chai, Y.L., Chong, J.R., Weng, J., Howlett, D., Halsey, A., Lee, J.H., Attems, J., Aarsland, D., Francis, P.T., Chen, C.P., Lai, M.K.P., 2019. Lysosomal cathepsin D is upregulated in Alzheimer's disease neocortex and may be a marker for neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol.* 29, 63–74.
- Cripps, D., Thomas, S.N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P., Yang, A.J., 2006. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 281, 10825–10838.
- Delacourte, A., Dufosse, A., 1986. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76, 173–186.
- Ferreira, A., Bigio, E.H., 2011. Calpain-mediated tau cleavage: a mechanism leading to neurodegeneration shared by multiple tauopathies. *Mol. Med.* 17, 676–685.
- Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abrahá, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R.W., Binder, L.I., Cryns, V.L., 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10032–10037.
- Garcia-Sierra, F., Ghoshal, N., Quinn, B., Berry, R.W., Binder, L.I., 2003. Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 5, 65–77.
- Garcia-Sierra, F., Mondragon-Rodriguez, S., Basurto-Islas, G., 2008. Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 14, 401–409.
- Garcia-Sierra, F., Jarero-Basulto, J.J., Kristofikova, Z., Majer, E., Binder, L.I., Ripova, D., 2012. Ubiquitin is associated with early truncation of tau protein at aspartic acid (421) during the maturation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 22, 240–250.
- Ghoshal, N., Garcia-Sierra, F., Fu, Y., Beckett, L.A., Mufson, E.J., Kuret, J., Berry, R.W., Binder, L.I., 2001. Tau-66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 77, 1372–1385.
- Ghoshal, N., Garcia-Sierra, F., Wu, J., Leurgans, S., Bennett, D.A., Berry, R.W., Binder, L.I., 2002. Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 177, 475–493.
- Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., Klug, A., 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4051–4055.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4913–4917.
- Guillozet-Bongaarts, A.L., Garcia-Sierra, F., Reynolds, M.R., Horowitz, P.M., Fu, Y., Wang, T., Cahill, M.E., Bigio, E.H., Berry, R.W., Binder, L.I., 2005. Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26, 1015–1022.
- Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Meyer, H.E., Goedert, M., Mandelkow, E., 1992. The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* 307, 199–205.
- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.L., Ashe, K.H., Liao, D., 2010. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081.
- Hyman, B.T., Augustinack, J.C., Ingelsson, M., 2005. Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 150–157.
- Iwatsubo, T., Hasegawa, M., Esaki, Y., Ihara, Y., 1992. Lack of ubiquitin immunoreactivities at both ends of neuropil threads. Possible bidirectional growth of neuropil threads. *Am. J. Pathol.* 140, 277–282.
- Jarero-Basulto, J.J., Luna-Munoz, J., Mena, R., Kristofikova, Z., Ripova, D., Perry, G., Binder, L.I., Garcia-Sierra, F., 2013. Proteolytic cleavage of polymeric tau protein by caspase-3: implications for Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 1145–1161.
- Jicha, G.A., Bowser, R., Kazam, I.G., Davies, P., 1997. Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J. Neurosci. Res.* 48, 128–132.
- Johnson, G.V., Jope, R.S., Binder, L.I., 1989. Proteolysis of tau by calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1505–1511.
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., Ullrich, O., 2003. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 85, 115–122.
- Keller, J.N., Hanni, K.B., Markesbery, W.R., 2000. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 75, 436–439.
- Khatoun, S., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1994. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.* 351, 80–84.
- Kizilarslanoglu, M.C., Ulger, Z., 2015. Role of autophagy in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Turk. J. Med. Sci.* 45, 998–1003.
- Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Rincny, J., Ripova, D., 2012. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 731526.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4044–4048.
- Lehman, N.L., 2009. The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol.* 118, 329–347.
- Lopez-Gonzalez, I., Carmona, M., Blanco, R., Luna-Munoz, J., Martinez-Mandonado, A., Mena, R., Ferrer, I., 2013. Characterization of thorn-shaped astrocytes in white matter of temporal lobe in Alzheimer's disease brains. *Brain Pathol.* 23, 144–153.
- Luna-Munoz, J., Garcia-Sierra, F., Falcon, V., Menendez, I., Chavez-Macias, L., Mena, R., 2005. Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 8, 29–41.
- Manetto, V., Perry, G., Tabaton, M., Mulvihill, P., Fried, V.A., Smith, H.T., Gambetti, P., Autilio-Gambetti, L., 1988. Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4501–4505.
- Manetto, V., Abdul-Karim, F.W., Perry, G., Tabaton, M., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P., 1989. Selective presence of ubiquitin in intracellular inclusions. *Am. J. Pathol.* 134, 505–513.
- Martin, L., Latypova, X., Terro, F., 2011. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 58, 458–471.
- McKinnon, C., Tabrizi, S.J., 2014. The ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 2302–2321.
- Mena, R., Edwards, P., Perez-Olvera, O., Wischik, C.M., 1995. Monitoring pathological assembly of tau and beta-amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 89, 50–56.
- Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., Berg, L., 1991. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479–486.
- Mondragon-Rodriguez, S., Basurto-Islas, G., Santa-Maria, I., Mena, R., Binder, L.I., Avila, J., Smith, M.A., Perry, G., Garcia-Sierra, F., 2008. Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 89, 81–90.
- Mondragon-Rodriguez, S., Basurto-Islas, G., Garcia-Sierra, F., 2009. Conformational changes and cleavage; are these events responsible for the tau aggregation in Alzheimer's disease? *Future Neurol.* 4, 39–53.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., Ihara, Y., 1993. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10, 1151–1160.
- Nakayama, Y., Sakamoto, S., Tsuji, K., Ayaki, T., Tokunaga, F., Ito, H., 2019. Identification of linear polyubiquitin chain immunoreactivity in tau pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 703, 53–57.
- Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M., 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J.* 12, 365–370.
- Otvos Jr., L., Feiner, L., Lang, E., Szendrei, G.I., Goedert, M., Lee, V.M., 1994. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J. Neurosci. Res.* 39, 669–673.
- Perry, G., Friedman, R., Shaw, G., Chau, V., 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3033–3036.
- Perry, G., Mulvihill, P., Fried, V.A., Smith, H.T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1989. Immunohistochemical properties of ubiquitin conjugates in the paired helical filaments of Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 52, 1523–1528.
- Perry, G., Kawai, M., Tabaton, M., Onorato, M., Mulvihill, P., Richey, P., Morandi, A., Connelly, J.A., Gambetti, P., 1991. Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *J. Neurosci.* 11, 1748–1755.
- Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 1991. Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaque neurites and neuropil threads. *Lab Invest.* 64, 352–357.
- Schwartz, A.L., Ciechanover, A., 2009. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 73–96.
- Sun, X., Wu, Y., Chen, B., Zhang, Z., Zhou, W., Tong, Y., Yuan, J., Xia, K., Gronemeyer, H., Flavell, R.A., Song, W., 2011. Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 286, 9049–9062.
- Tai, H.C., Schuman, E.M., 2008. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 826–838.
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Kruger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.M., Cuervo, A.M., Mandelkow, E., 2009. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4153–4170.
- Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A., 1988. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4884–4888.
- Wood, J.G., Mirra, S.S., Pollock, N.J., Binder, L.I., 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4040–4043.
- Xia, D., Li, C., Gotz, J., 2015. Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 913–924.
- Zhang, Y., Chen, X., Zhao, Y., Ponnusamy, M., Liu, Y., 2017. The role of ubiquitin proteasomal system and autophagy-lysosome pathway in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 28, 861–868.