

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"**

**Dipartimento di Neuroscienze Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE XIX CICLO**

**Ruolo della proteina tau nella sopravvivenza neuronale**

**Tesi di Dottorato della  
Dott.ssa Giuseppina Amadoro**

**Relatore:  
Prof. P. Calissano**

**Correlatore:  
Dott.ssa N. Canu**

**ANNO ACCADEMICO 2005/2006**

## SOMMARIO

<b>Abstract italiano</b>	<b>pag. 1</b>
<b>Abstract inglese</b>	<b>pag. 2</b>
<b>Lista delle abbreviazioni</b>	<b>pag. 3</b>
<b>Introduzione:</b>	<b>pag. 4-50</b>
<u>Le proteine tau:</u>	<b>pag. 4-11</b>
-localizzazione cellulare, struttura genica, trascritti e <i>splicing</i> alternativo	
-funzioni:ruolo del dominio di proiezione N-terminale e dell'estremità C-terminale di legame ai microtubuli	
<u>Isoforme di tau e malattie neurodegenerative: classe I, II, III, IV</u>	<b>pag. 11-18</b>
<u>Modificazioni post-traduzionali:conseguenze fisiologiche e patologiche</u>	<b>pag. 18-31</b>
-fosforilazione:siti di fosforilazione, chinasi e fosfatasi	
-proteolisi	
-N-O-Glicosilazione e Acilazione	
-Ubiquitinizzazione	
-Glicazione	
-Transglutaminazione	
-Deaminazione e ossidazione	
-Nitrazione	
-Sumoilazione	
-Aggregazione	
<u>Meccanismi di degenerazione neurofibrillare in AD e in altre tauopatie:</u>	<b>pag. 31-46</b>
-Modello di perdita di funzione: disfunzione di tau come MAP e quindi inabilità della proteina di regolare l'instabilità dinamica dei microtubuli.	
-Modello di acquisizione di nuove funzioni: diretta citotossicità della proteina alterata.	
-Potenziale ruolo dell'aggregazione di tau: saggi acellulari ( <i>cell-free</i> ), modelli in vitro di colture cellulari neuronali e non, modelli animali in vivo.	
<u>Conclusioni e prospettive</u>	<b>pag. 46-50</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>pag. 51-56</b>
<b>Risultati</b>	<b>pag. 57-65</b>
<b>Discussione</b>	<b>pag. 66-74</b>
<b>Legenda delle figure</b>	<b>pag. 75-82</b>
<b>Referenze bibliografiche</b>	<b>pag. 83-104</b>
<b>Figure e Tabelle</b>	

## **ABSTRACT**

E' stato ipotizzato che l'alterata funzione e/o struttura della proteina tau, una MAP (*microtubule-associated-protein*) particolarmente abbondante nei neuroni, causa la morte di specifiche popolazioni cellulari in numerosi disordini neurodegenerativi, quali ad esempio le tauopatie e il morbo di Alzheimer. In particolare, uno squilibrio del rapporto intracellulare delle differenti isoforme è sufficiente di per sé ad indurre una pronunciata neurodegenerazione, suggerendo che la precisa stechiometria di tutte le 6 varianti alternative è necessaria per garantire il corretto adempimento delle sue funzioni fisiologiche, che implicano non esclusivamente l'interazione e la stabilizzazione dei microtubuli citoscheletrici. Comunque, il meccanismo molecolare attraverso cui una disfunzione della proteina tau è causa della morte neuronale disordine-associata rimane ancora da chiarire. A tal fine, noi abbiamo analizzato l'effetto dell'espressione dose-dipendente della tau umana (htau/h40) e di alcuni dei suoi frammenti N-terminali -privi del dominio di legame ai microtubuli- in diverse colture primarie neuronali, trasdotte ad alta efficienza mediante infezione adenovirale.

In tale lavoro, noi riportiamo che bassi livelli d' espressione del dominio di proiezione in membrana di tau, o tau(1-230), come dell'isoforma più lunga, o tau(1-441), inibiscono moderatamente l'inizio dell'apoptosi nei granuli del cervelletto, deprivati del siero e del potassio extracellulare. L'effetto antiapoptotico implica una modulazione positiva della fosforilazione di Akt1/2, una serin-treonin chinasi che criticamente controlla la cascata delle caspasi effettrici.

Di converso, noi dimostriamo che l'espressione di più alti livelli intracellulari della isoforma più lunga di htau, e di alcuni dei suoi frammenti N-terminali, in colture neuronali di cervelletto, ippocampo e corteccia evoca un potente effetto neurotossico NMDAR (*N-methyl-D-aspartate receptor*)-mediato e caspasi-indipendente. Al fine di elucidare una possibile via biochimica di trasduzione del segnale, noi riportiamo che la morte tau-indotta è associata ad un' eccessiva stimolazione dei recettori extrasinaptici, in quanto (1) largamente inibita da ifenprodil, un antagonista altamente selettivo dei recettori NMDA NR2B-arricchiti ed (2) accompagnata dalla marcata defosforilazione del fattore trascrizionale CREB (*cAMP-response-element-binding-protein*), responsabile dell'espressione di importanti geni di sopravvivenza neuronale. L'attivazione patologica dell'NMDAR causa una sostenuta, protratta e tardiva fosforilazione di ERK1/2 (*extracellular-regulated-kinase 1/2*), una MAPK (*mitogen-activated-protein kinase*) la cui inibizione significativamente previene la morte tau-mediata. Infine, la stimolazione dell'NMDAR induce la deleteria attivazione della calpaina-I che, a sua volta, degrada la proteina tau non solo nel peptide di 17kDa, ma anche in altri peptidi N-terminali più fortemente dannosi. Sulla base dei nostri esperimenti in vitro, noi ipotizziamo pertanto che il taglio inappropriato della proteina tau all'N-terminale genera numerosi peptidi tossici i quali, innescando un loop a feedback negativo, ulteriormente amplificano e propagano il processo di morte. Infatti, l'inibizione della calpaina I blocca completamente la proteolisi di tau, e quindi la morte neuronale.

I nostri dati dunque rivelano un meccanismo patogenetico che accoppia la neurotossicità tau-mediata all'aberrante attivazione dell'NMDAR. Tali osservazioni pertanto non solo risultano rilevanti in numerosi disordini neurodegenerativi, quali le tauopatie e il morbo di Alzheimer's associati ad una marcata eccitotossicità da glutammato, ma provvedono anche un ulteriore supporto sperimentale all'effetto neuroprotettivo FDA (*Food and drug administration*)-approvato della memantina, un antagonista non competitivo del recettore NMDA utilizzato con successo nei trials clinici sull'uomo, al fine di migliorare le funzioni cognitive di pazienti affetti da tali malattie dementignene.

## **ABSTRACT**

The altered function and/or structure of MAP (microtubule-associated- protein) tau is postulated to cause cell death in tauopathies and Alzheimer's disease. Any disturbance in intracellular tau ratio are sufficient to induce neurodegeneration, suggesting that a precise stoichiometry of all 6 isoforms is necessary to correctly discharge more of their functions, which extend beyond interaction with microtubules. However, the mechanisms by which tau induces neuronal death remain unclear. Therefore, we have analyzed the effect of dose-dependent expression of human tau (htau) and of some of its N-terminal fragments -free of microtubule-binding domain- in primary neuronal cultures (cerebellum, hippocampus, cortex), by adenovirally-mediated infection.

Here we report that moderate expression levels of the tau (1-230) fragment, as well as of full length htau, inhibits the onset of apoptosis in serum and potassium-deprived cerebellar granule neurons, probably acting at the level of Akt1/2-mediated activation of the caspase cascade.

On the contrary, we show that overexpression of more high levels of the longest isoform htau and of some of its N-terminal fragments in primary neuronal cultures leads to an N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-mediated and caspase-independent cell death. Death signaling likely originates from stimulation of extrasynaptic NR2B-subunit-containing NMDARs because it is accompanied by dephosphorylation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) and it is inhibited by ifenprodil. Interestingly, activation of NMDAR leads to a crucial, sustained, and delayed phosphorylation of extracellular-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), whose inhibition largely prevents tau-induced neuronal death. Moreover, NMDAR involvement causes the fatal activation of calpain I, which, in turn, degrades tau protein into a 17-kDa peptide and possibly other highly toxic N-terminal peptides. Some of these peptides are hypothesized, on the basis of our in vitro experiments, to initiate a negative loop, ultimately leading to cell death. Thus, inhibition of calpain I largely prevents tau degradation and cell death.

Our findings unravel a cellular mechanism linking tau toxicity to NMDAR activation and might be relevant to Alzheimer's disease and tauopathies, where NMDAR-mediated toxicity is postulated to play a pivotal role. Finally, these studies provide strong experimental evidences about the therapeutical efficacy in humans of memantine, an well-tolerated uncompetitive antagonist of NMDAR, shown to be beneficial in the treatment of neurological disorders mediated by excitotoxicity.

## **ABBREVIAZIONI**

AD-Alzheimer's disease-  
CGCs-cerebellar granule cells-  
M.O.I.-multiplicity of infection-  
NMDAR- N-methyl-D-aspartate receptor-  
D.I.V.-days in vitro-  
PHF-paired helical filaments-  
NFT-neurofibrillary tangles-  
A $\beta$ - $\beta$ -amyloid-  
GSK3 $\beta$ -glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -  
MAP-microtubule-associated-protein-

## **INTRODUZIONE**

### **Le proteine tau**

#### **-Localizzazione cellulare, struttura genica, trascritti e *splicing* alternativo**

Una delle peculiarità di un neurone, esempio di alto differenziamento morfologico e biochimico, è la specializzazione funzionale realizzata grazie ad una fine compartimentalizzazione subcellulare, in distretto assonale e somato-dendritico. Il maggior determinante intracellulare della morfologia neuronale è il citoscheletro, la cui integrità è critica per le funzioni vitali e quindi per la sopravvivenza neuronale, cosicché molti disordini neurodegenerativi sono caratterizzati da profonde anomalie a carico di esso. I microtubuli ne sono i principali costituenti strutturali ed una classe di proteine, note come MAPs (*microtubule-associated-proteins*), ne controlla l'integrità e il dinamismo cellulare.

Le proteine tau sono fosfoproteine appartenenti appunto alla più grande famiglia delle proteine associate ai microtubuli che include anche MAP1(A/B) e MAP2: esse sono presenti in tutti gli eucarioti e sono inoltre altamente conservate nella scala evolutiva in quanto presenti in *Caenorabditis elegans*, in *Drosophila*, nei pesci e negli anfibi, ma anche nei roditori, nei bovini ed ovini ed infine nelle scimmie e nell'uomo (Bueè et al., 2000; Shahani and Brandt, 2002). In particolare nell'uomo, esse sono prevalentemente abbondanti nei neuroni, ma sono anche espresse a più bassi livelli nella glia e in alcuni tessuti non neuronali periferici quali cuore, rene, polmone, muscolo, pancreas, testicolo e fibroblasti (Binder et al., 1985; Bueè et al., 2000). Nelle cellule neuronali, le proteine tau esibiscono una localizzazione assonale e possono associarsi, tramite il dominio N-terminale, con la membrana plasmatica (Brandt et al., 1995) e, tramite l'estremità C-terminale, con i microtubuli (Avila et al., 2004). Nelle cellule proliferanti e in divisione, è stata riportata la presenza di antigeni nucleari reattivi con molti anticorpi di tau (Loomis et al., 1990; Greenwood and Johnson, 1995; Brady et al., 1995). Durante lo sviluppo neuronale inoltre, la fosforilazione di tau ne influenza la distribuzione subcellulare. In particolare, tau fosforilata nel subdominio amino-terminale, basico e ricco in proline, è presente principalmente nel compartimento somato-dendritico, mentre la defosforilazione di tale regione aminoacidica rilocalizza tale proteina al compartimento assonale distale (Mandell et al., 1996).

Le tre MAPs (MAP1A/B, MAP2 e tau) apparentemente svolgono funzioni simili, quali la promozione dell'assemblaggio e la stabilità dei microtubuli. L'eccessiva ridondanza cellulare, la presenza appunto nei neuroni di tre differenti proteine per mantenere i microtubuli citoscheletrici, è probabilmente dovuta all'essenziale richiesta di tali strutture subcellulari al fine di garantire il flusso assoplasmatico e quindi la sopravvivenza e l'attività delle cellule nervose. Pertanto, un neurone ha la capacità di compensare la perdita di funzione di una MAP complementando con le altre due: infatti, i topi transgenici knockout per tau o MAP2 sono vitali e fertili e mostrano un normale sviluppo fino all'adulto (Harada et al., 1994; Teng et al., 2001). Diversamente i topi transgenici doppi knockout per tau e MAP2, o per MAP1 e MAP2 muoiono dopo quattro settimane dalla nascita: colture primarie espianate da tali mutanti esibiscono marcati difetti nell'elongazione e nella migrazione neuronale, una profonda disorganizzazione degli strati neuronali ed infine un evidente disassemblaggio dei microtubuli del cono di crescita (Teng et al., 2001; Takei et al., 2000). In particolare, i topi tau-difettivi esibiscono un aumento di MAP1A (Harada et al., 1994) e, se incrociati con topi MAP1B-deficienti, il doppio knockout mostra durante lo sviluppo numerosi difetti che sono invece assenti nei singoli mutanti parentali (Takei et al., 2000).

Le proteine tau umane sono codificate da un singolo gene mappante sul cromosoma 17q21 che consiste di 16 esoni, e le diverse isoforme espresse nel sistema nervoso centrale (CNS) sono derivate dal processamento (*splicing*) alternativo nel trascritto primario di 11 di tali esoni (Neve et al., 1986; Goedert et al., 1988). L'analisi di restrizione e il sequenziamento del gene, che si estende

per circa 100Kb, mostra che esso contiene due tratti CpG, uno associato con il promotore, caratteristica tipica di quelli neurone-specifici, l'altro con l'esone 9. Sono presenti inoltre due regioni omologhe alle sequenze murine Alu. La sequenza del promotore è priva di consensus TATA, caratteristica tipica di geni evolutivamente conservati (*housekeeping*) che esibiscono multipli siti d' iniziazione. In prossimità del primo sito di inizio della trascrizione, sono presenti infine siti consensus per i fattori SP1 e AP2, responsabili dell'inizio della trascrizione in promotori privi di sequenza TATA (Bueè et al., 2000; Shahani and Brandt, 2002).

Nel cervello umano adulto, il processamento alternativo nel trascritto primario degli esoni 2, 3 e 10 genera sei differenti isoforme comprese in un intervallo da 352 a 441 residui aminoacidici di lunghezza (Fig.18). L'interazione fra tau e i microtubuli è mediata da tre o quattro imperfette ripetizioni (R1-R4, 31-32 aminoacidi ognuno) mappanti all'estremità COOH-terminale e codificate dagli esoni 9-12 (Goedert et al., 1988; Gustke et al., 1994; Trinczek et al., 1995). Il differente processamento dell'esone 10 produce isoforme di tau con sia tre (esone 10-) o quattro (esone 10+) domini ripetuti, note rispettivamente come 3R e 4R tau. Tali domini funzionali consistono di ripetizioni imperfette di circa 18 aminoacidi separate da brevi sequenze interposte di 13-14 aminoacidici di lunghezza (Lee et al., 1989). In aggiunta, il processamento differenziale degli esoni 2 e 3 genera isoforme di tau 3R e 4R senza inserto (0N), o con un inserto di 29 (1N) o di 58 aminoacidi (2N) di funzione non nota.

In particolare, l'esone -1 è parte del promotore, è trascritto ma non tradotto. Gli esoni 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 e 13 sono esoni costitutivi in quanto sono presenti nel trascritto maturo. L'esone 14 è invece trovato negli RNA messaggeri, ma non è tradotto in proteina. Infine, gli esoni 2, 3 e 10 sono processati alternativamente e sono adulto-specifici. L'esone 3 non appare mai indipendentemente dall'esone 2. Pertanto, il processamento differenziale di tali esoni genera sei diverse isoforme (rispettivamente note come 2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+) che correlano nel cervello umano con i sei diversi RNA messaggeri in cui è maturato il trascritto primario di tau. Nel cervello umano adulto, il rapporto stechiometrico tra le isoforme 3R e 4R di tau, che esibiscono un peso molecolare apparente fra 50 e i 70 KDa, è circa 1 e le isoforme 1N, 0N e 2N sono rappresentate intorno al 54%, 37% e 9% rispettivamente sul totale di proteine tau (Goedert et al., 1990). Tale processamento alternativo è regolato poi durante lo sviluppo, cosicché nel cervello fetale è espressa solo l'isoforma più breve (0N3R), mentre tutte le sei isoforme compaiono nel periodo post-natale, anche se possono essere non egualmente espresse e diversamente distribuite in sottopopolazioni neuronali (Goedert et al., 1989). E' interessante notare che la composizione delle isoforme di tau è specie-specifica. In particolare, nel cervello di un roditore adulto sono espresse solo le 3 isoforme 4R (o E10+), mentre durante lo sviluppo è espressa una 0N3R o isoforma fetale di tau. Sebbene le conseguenze funzionali di tali differenze tra le specie non siano note, è possibile speculare che la mancanza della struttura ad ansa ed uncino (*stem-loop*) nell'introne che segue l'esone 10 nel roditore verso l'umano può giustificare la mancata espressione di isoforme 3R di tau nel cervello adulto di roditori (Kosik et al., 1989; Janke et al., 1999). Poiché le isoforme 4R tau legano i microtubuli ed assemblano in essi più stabilmente e più efficientemente (circa tre volte) che le isoforme 3R tau, la diversa modulazione dell'espressione durante il neurosviluppo da fetale verso adulto suggerisce una differente necessità funzionale di interazioni tau-microtubuli, finalizzata a mantenere la stabilità dinamica del citoscheletro neuronale (Makrides et al., 2003, Panda et al., 2003; Bunker et al., 2004). Nel sistema nervoso periferico invece, l'inclusione di un aggiuntivo esone 4a nell'estremità amino-terminale di tau risulta nell'espressione di un ulteriore proteina di alto peso molecolare chiamate *big tau* (Georgieff et al., 1991; Couchie et al., 1992; Goedert et al., 1992).

Le varianti alternative delle isoforme di tau esibiscono moduli aminoacidici diversi che differentemente ne influenzano la funzione biologica: gli esoni 2 e 3 modulano l'interazione con la membrana (Brandt et al., 1995), l'esone 4a altera la spaziatura tra i microtubuli (Chen et al., 1992; Frappier et al., 1994), l'esone 6 codifica per un dominio ricco in proline ed influenza l'elongazione neuritica (Luo et al., 2004), l'esone 10 infine aumenta l'affinità di tau per i microtubuli (Mandelkow

et al., 1995) ed è importante nella transizione dal più instabile citoscheletro fetale a quello più rigido tipico dell'adulto. Tali domini esibiscono inoltre numerosi potenziali siti di fosforilazione, una modificazione post-traduzionale che, come descritto successivamente, diversamente controlla la funzione biologica delle proteine tau. Infine, l'inclusione o meno di essi ne influenza l'interazione sia con i microtubuli o con altri componenti del citoscheletro, sia con proteine di membrana, quali protein chinasi e/o fosfatasi.

### **-Funzioni : ruolo del dominio di proiezione N-terminale e dell'estremità C-terminale di legame ai microtubuli**

Le diverse isoforme di tau sono proteine modulari, in quanto esibiscono domini proteici strutturalmente e funzionalmente diversi.

-(a) In particolare, l'estremità amino-terminale è anche nota come dominio di proiezione, in quanto protrude dalla superficie dei microtubuli quando tau è ad essi ancorata. Essa include circa due terzi della intera proteina ed, a sua volta, può essere ulteriormente suddivisa in due subregioni: (1) la regione più prossimale, che esibisce un' alta proporzione di residui aminoacidici acidi, e (2) quella adiacente più distale, che invece è altamente basica in quanto ricca in motivi PPXXP o PXXP, sequenze note mediarne l'interazione con proteine contenenti domini SH3. L'estremità NH<sub>2</sub>-terminale di tau, interagendo appunto con la membrana plasmatica, lega anche proteine implicate in importanti vie di trasduzione del segnale quali (i) fyn, un membro della famiglia di tirosin-chinasi non recettoriali della famiglia src (Lee et al., 2004), (ii) PLC- $\gamma$  ( Hwang et al.,1996; Scott et al.,1998) e PLA2, fosfolipasi di membrana implicate nella produzione di importanti secondi messaggeri intracellulari. Infatti, analisi biochimiche di frazionamento cellulare e saggi immunocitochimici in colture di PC12 (*rat pheochromocytoma cell line*) di ratto transfettate con il dominio N-terminale di tau, hanno rivelato che tale regione è direttamente associata alla membrana e che tale interazione è indispensabile per la crescita neuritica (Brandt et al., 1995).

Per primi, Lee et al. (Lee et al., 1998) riportano che tau lega il dominio SH-3 di alcune tirosin-chinasi non-recettoriali appartenenti alla famiglia src, quali fyn, src e lck. Altri esperimenti di co-immunoprecipitazione nel neuroblastoma umano SY5Y indicavano che solo una piccola frazione di tau e fyn sono associate l'uno all'altra e che tale interazione è modulata dalla fosforilazione al residuo Thr 231 (Zamora-Leon et al., 2001). Successivamente gli autori (Lee et al., 2004) mappano il motivo-PXXP-SH3-legante nella regione aminoacidica 231-237 di tau (accordando alla numerazione della più lunga isoforma). Essi riportano inoltre la colocalizzazione di tau e fyn in prossimità del plasmalemma, ed un' associazione tra il complesso tau-fyn e il citoscheletro di actina. In esperimenti di co-transfezione di tau e fyn nelle cellule COS-7 (*African green monkey kidney cell line*), unitamente a saggi in vitro di fosforilazione di tau da parte di fyn e mutagenesi sito-diretta, essi dimostrano poi che tau è fosforilata da tale protein chinasi al residuo tyr18. L'utilizzo di anticorpi fosfo-specifici contro tale sito ha permesso di evidenziare poi che nel topo la tyr 18 è precocemente fosforilata durante lo sviluppo neurale, mentre non è fosforilata nell'adulto. La tirosin fosforilazione di tau è riportata anche nel cervello fetale umano da Williamson et al. (Williamson et al., 2002). E' noto inoltre che tale importante modificazione post-traduzionale regola il dinamismo del cono di crescita neuronale, particolarmente arricchito di src e fyn: i neuroni infatti espianati da topi deficienti per tali tirosin-chinasi esibiscono marcati difetti nell' elongazione neuritica (Ignelzi et al., 1994). Inoltre, tali chinasi interagiscono direttamente con la membrana (*lipidrafts*) attraverso miristoilazione e palmitoilazione dell'N-terminale: a tal proposito è stato riportato che negli oligodendrociti, il complesso tau-fyn è associato ai lipid rafts e che il trattamento con fumonisina B1, un inibitore della sintesi degli sfingolipidi, distrugge tali domini di membrana bloccando così la crescita neuritica (Klein et al., 2002).

La stessa regione di tau ricca in proline è coinvolta poi nell'interazione con l'isoenzima PLC- (*phospholipase*) $\gamma$ . Hwang et al. (Hwang et al., 1996) hanno dimostrato infatti che in vitro le proteine

tau complessano specificatamente con il dominio SH3 della PLC- $\gamma$  aumentandone l'attività idrolitica, soprattutto in presenza di acidi grassi poliinsaturi quali l'acido arachidonico. Infine Jenkins and Jhonson (Jenkins et al., 1998) dimostrano l'associazione in situ tra tau e la PLC- $\gamma$ , anche in assenza di acido arachidonico. Tau inoltre agisce come proteina che lega il fosfatidilinositolo bifosfato (PIP2), che serve come precursore della sintesi del diacilglicerolo e di inositolo trifosfato, supportandone un ruolo nei processi di trasduzione del segnale (Flanagan et al., 1997).

Tau lega anche l'actina (Correas et al., 1990; Griffith and Pollard, 1982; Fulga et al., 2006) e pertanto può modificare la geometria cellulare, agendo sul rimodellamento del citoscheletro corticale submembranoso. Numerose sono infatti le evidenze sperimentali a favore di un legame diretto o indiretto di tau con il citoscheletro di actina. (i) Cellule che mancano della principale proteina legante l'actina, ABP-280 (filamina) esibiscono un esteso "blebbing" di membrana (Cunningham et al., 1997). (ii) La soppressione di tau in colture neuronali con oligonucleotidi antisenso risulta in una significativa riduzione dell'area del cono di crescita e del numero di filopodia, in associazione con considerevoli cambi dei microfilamenti di actina evidenziati mediante colorazione con falloidina (DiTella et al., 1994). (iii) Infine, la compartimentalizzazione di tau nelle regioni distali dell'assone richiede l'integrità dei microfilamenti (Kempft et al., 1996). Di recente, è stato dimostrato inequivocabilmente che tau interagisce con l'actina filamentosa, sia in vitro che in vivo, e che l'accumulo e la fascicolazione in aggregati simili ai corpi di Hirano (*Hirano bodies*) presenti nell'AD e in altre tauopatie, sono direttamente associati all'entità della perdita neuronale, in modelli di neurodegenerazione tau-indotta, sia di topo che di *Drosophila* (Fulga et al., 2006).

Alcuni autori (Liao et al., 1998; Sontag et al., 1999) documentano poi la specifica interazione di tau con la serin-protein fosfatasi 2A (PP2A), o meglio con l' isoforma cerebrale dominante AB $\alpha$ C, e l'associazione tau-dipendente della serin-protein fosfatasi 1(PP1) ai microtubuli.

Tau inoltre lega anche altre proteine quali la spectrina (Carlier et al., 1984), la chinasi di modificazione post-traduzionale cdk5 (Sobue et al., 2000), la presenilina 1 (PS1) attraverso una regione dove PS1 lega anche la chinasi GSK-3 $\beta$  ( Takashima et al., 1998), l'  $\alpha$ - sinucleina (Jensen et al., 1999), la subunità regolativa p85 $\alpha$  della PI3-K (Reynolds et al., 2002), la proteina Eed murina (Lee et al., 1996), la proteina 14-3-3 (Hashiguchi et al., 2000), la tubulina (Serrano et al., 1985) ed infine una famiglia di proteine esprimenti le sequenze Alu (Hoenicka et al., 2002; Avila et al., 2004). Le proteine di risposta allo stress termico, HSP70 e HSP90, anche legano tau: tale interazione promuove l'associazione di tau con i microtubuli e contestualmente ne diminuisce la formazione degli aggregati insolubili (Dou et al., 2003).

A supporto dell'interazione di tau con il plasmalemma, è interessante osservare che topi tau omozigoti *-/-* esibiscono marcate alterazioni morfologiche a carico degli assoni di ridotto calibro (fibre parallele cerebellari), che mostrano la più alta proporzione di microtubuli associati alla membrana, che non altri processi neuritici (Harada et al., 1994). Infatti, il dominio di proiezione in membrana di tau determina la spaziatura fra i microtubuli, controllando così indirettamente il diametro assonale (Chen et al.,1992). E' interessante notare che i neuroni periferici, che spesso proiettano lunghi assoni di largo diametro, esibiscono un' addizionale sequenza NH2-terminale di tau, codificata dall'esone 4A e risultante in una specifica isoforma di tau indicata come "*big tau*"(Georgieff et al.,1993).

Per quanto riguarda un possibile ruolo di tau come proteina associata alla membrana o nucleare, si ritiene che essa, direttamente e/o indirettamente tramite l'associazione ad altre proteine cellulari, possa giocare un ruolo importante nei processi di trasduzione del segnale e/o di modulazione dell'espressione genica (Shahani et al., 2002; Johnson et al., 2004). Analisi, per microarray su RNA messaggero, del profilo d' espressione di cervelli di topi tau-deficienti, rivelano infatti un significativo aumento dell'espressione di c-fos, un fattore di trascrizione attivato durante la fase precoce della trasduzione del segnale sostenuta da fattori di crescita (Oyama et al., 2004).

-(b)E' stato riportato che la regione di tau interposta tra le estermità NH<sub>2</sub>-e COOH-terminale e contenente il motivo ricco in proline controlla l'estensione neuritica. Nelle NGF (*nerve growth factor*)-differenziate PC12, l'induzione dell'espressione di tau è correlata con l'incremento della massa e della stabilità dei microtubuli e parallelamente con la formazione dei processi assionali (Drubin et al., 1985; Esmaili-Azad et al., 1994). Il ruolo di tau nella stabilizzazione dei microtubuli è stato dimostrato mediante deplezione funzionale della proteina con specifici oligonucleotidi antisenso, esperimenti in cui l'inibizione della traduzione del messaggero ben si correla con la ritardata elongazione neuritica (Caceres et al., 1990; Caceres et al., 1991). Il silenziamento del gene tau è stato eseguito nei macroneuroni cerebellari (Caceres et al., 1990), un sistema neuronale in cui l'espressione e la distribuzione subcellulare di tau è temporalmente collegata allo sviluppo morfologico dell'assone: tale trattamento previene la formazione dei processi assone-simili, ma non dei neuriti minori indifferenziati (Ferreira et al., 1989). Di converso, nelle cellule non neuronali Sf9, l'espressione di tau induce la formazione di lunghi processi citoplasmatici (Knops et al., 1991). Infine, tau conferisce una pronunciata protezione per stabilizzazione dei microtubuli contro l'esposizione a droghe di disassemblaggio del citoscheletro (Baas et al., 1994).

Nonostante i topi knockout per tau non esibiscano un fenotipo eclatante (Harada et al., 1994; Dawson et al., 2001), culture primarie di neuroni ippocampali espianati da tali transgenici mostrano un significativo ritardo nell'estensione e nell'elongazione, sia dell'assone che dei dendriti: l'espressione di proteine tau umane recupera la normale crescita assonale (*sprouting*), dimostrando che il fenotipo mutante è causato dalla deficienza funzionale di tau (Dawson et al., 2001). D'altro canto i topi tau-difettivi esibiscono severi deficit motori e comportamentali, in accordo con l'indispensabilità di tau durante lo sviluppo (Ikegami et al., 2000). Da esperimenti in cui si aumentano i livelli intracellulari d'espressione di costrutti mutanti per tau dotati di tale dominio basico, ma privi delle ripetizioni di legame ai microtubuli, risulta che essi non esibiscono una distribuzione completamente citoplasmatica e colocalizzano solo in parte con i neuriti. Inoltre tali varianti mutazionali inibiscono l'elongazione neuritica, probabilmente in quanto agiscono come dominanti negativi del dinamismo del citoscheletro perturbando così, con la loro alta densità di cariche positive, l'interazione con le proteine di legame (Luo et al., 2004). L'inattivazione acuta di tau nei DRG (*dorsal root ganglia*) di pollo, eseguita mediante tecniche laser, mostra che vi è una locale diminuzione nelle dimensioni dei lamellipodia nella regione di trattamento, accanto ad una diminuzione dell'estensione neuritica (Liu et al., 1999). Tali dati concordano con l'alterazione della distribuzione dell'actina e la riduzione delle dimensioni del cono di crescita evidenziati nei neuroni, dopo trattamento con oligonucleotidi antisenso per tau (DiTella et al., 1994). Sulla base di tali osservazioni si è ipotizzato che tau nel cono di crescita potesse avere una funzione diversa dalla stabilizzazione dei microtubuli. La più labile associazione di tau ai microtubuli nel cono di crescita rispetto a quella di altre MAPs, la necessità del dinamismo dei microtubuli per il movimento in avanti (*forward*) del cono di crescita, la compromissione delle lamellae del cono se il dinamismo dei microtubuli è soppresso, sono tutte prove a favore di un ruolo di tau nell'avanzamento del cono di crescita (Lee et al., 2005).

-(c)L'estremità carbossi-terminale di tau include le ripetizioni di ancoraggio e di legame al citoscheletro e pertanto controlla l'instabilità dinamica dei microtubuli (Mandelkow et al., 1995; Goedert et al., 1991). Alcuni esperimenti di microiniezione di tau in culture di fibroblasti di ratto mostrano infatti che tau promuove l'assemblaggio netto della tubulina nei microtubuli, aumentandone la stabilità e causando "*bundling*": i domini ripetuti leganti i microtubuli sono le minime regioni necessarie per la polimerizzazione de novo, sebbene sia richiesto anche il contributo delle sequenze fiancheggiatrici ricche in prolina (Drubin et al., 1986; Kanai et al., 1989; Kanai et al., 1992; Lee et al., 1982). Tale regione è coinvolta anche in altre funzioni: nei topi è stata dimostrata l'interazione fra tau e le protein Eed, suggerendo che tau può giocare un ruolo importante durante lo sviluppo (Lee et al., 1996). Eed è l'omologo della proteina di *Drosophila* Esc che è un repressore, altamente espresso e tardivo, dei geni omeotici (Schumacher et al., 1998; Simon et al., 1995). E'

probabile che isoforme di Eed, risultanti dalla maturazione alternativa del messaggero, siano specificatamente trasportate nel nucleo. D'altro canto, le proteine tau sono state ritrovate anche nel nucleo (Brady et al., 1995; Thurston et al., 1996). Tali isoforme nucleari sono simili a quelle citoplasmatiche, ma mostrano una più bassa solubilità, suggerendo che esse possono subire modificazioni post-traduzionali, come ad esempio la fosforilazione, o legare altre proteine, quali ad esempio le proteine Eed. A tal proposito, è interessante notare che recenti dati hanno mostrato che le proteine tau legano l'RNA attraverso il dominio di legame ai microtubuli (Kampers et al., 1996). Le isoforme di tau sono fosforilate nel citoplasma prima di essere traslocate nel nucleo (Greenwood et al., 1995): ma il loro ruolo e come esse possano essere regolate da tale modificazione post-traduzionale non è ancora noto.

Le proteine tau dunque, attraverso la loro capacità intrinseca di legare e regolare la struttura e il dinamismo dei microtubuli, che soprattutto nei neuroni giocano un ruolo importante nel garantirne la corretta citoarchitettura, sono funzionalmente coinvolte in numerosi ed importanti aspetti del comportamento dei microtubuli stessi quali la morfogenesi neuronale, il mantenimento della forma dei processi neuritici, il trasporto assonale chinesina-mediato (Goedert et al., 1991; Hirokawa et al., 1994).

L'affinità di tau per i microtubuli, in particolare dipende da (1) il numero di ripetizioni di legame all'estremità carbossi-terminale (Goedert and Jakes, 1990), (2) dalla sequenza basica ricca in proline adiacente al sito di legame ai microtubuli (Gustke et al., 1994), (3) dal dominio di proiezione in membrana amino-terminale (Brandt et al., 1995), ed infine (4) dall'estensione e dai siti di fosforilazione (Biernat et al., 1993).

In particolare, la polimerizzazione dei microtubuli in vitro avviene attraverso un meccanismo di nucleazione-elongazione, in cui ad una lenta fase di formazione di un germe di microtubuli segue una più rapida fase di elongazione ad entrambe le estremità per aggiunta, reversibile e non covalente, di dimeri di  $\alpha$ - $\beta$  tubulina (Hyams et al., 1978).

Le estremità dei microtubuli differiscono sia strutturalmente che cineticamente. L'estremità detta "plus" cresce e si accorcia più rapidamente di quella opposta, o estremità "minus", ed esibisce rispetto a quest'ultima un più robusto dinamismo, sia in vitro che nella cellula.

Nel corpo cellulare neuronale, come in altri tipi cellulari, la nucleazione sembra essere facilitata da un terzo tipo di tubulina, la  $\gamma$ -tubulina, e avviene all'estremità minus dei microtubuli in un numero limitato di compartimenti subcellulari indicati come centri organizzatori dei microtubuli o centrosomi. I microtubuli non sono polimeri in semplice equilibrio. Il nucleotide GTP lega l' $\alpha$ -tubulina solubile non-polimerizzata, ad un sito di scambio con la subunità  $\beta$ , ed è successivamente idrolizzato a GDP e Pi, fornendo così l'energia chimica necessaria perchè la tubulina polimerizzi alle estremità crescenti dei microtubuli. L'idrolisi del GTP crea due unici comportamenti di equilibrio non-dinamico. Il primo, "*treadmilling*" è caratterizzato dalla crescita netta all'estremità plus del microtubulo e dal netto accorciamento all'estremità minus: ciò sembra dovuto alla differenza di concentrazione delle subunità di tubulina libera in equilibrio con le estremità dei microtubuli allo *steady state* (la concentrazione critica di subunità di tubulina). Per un microtubulo in *treadmilling*, entrambe le estremità devono essere capaci di scambiare subunità di tubulina con la tubulina libera presente nel pool solubile. Il secondo comportamento dei microtubuli, l'instabilità dinamica, è caratterizzato invece dall'alternanza di fasi di crescita sostenuta e di relativamente rapido accorciamento. L'instabilità dinamica è inoltre definita da un numero preciso e quantizzabile di parametri, quali il tasso di crescita, il tasso di accorciamento (*shrinking*), la frequenza di transizione fra crescita ed un attenuato o un intervallato stato di accorciamento (*catastrophe*) e la frequenza di transizione fra accorciamento e crescita o uno stato attenuato (*rescue*). Sia l'elongazione, che l'accorciamento dei microtubuli sono caratterizzati rispettivamente dalla presenza e dall'assenza alle estremità terminali di forme conformazionalmente stabilizzate di tubulina, leganti o GTP o GDP-Pi al sito di interscambio detto "GTP cap". La restante parte dei microtubuli consiste invece di migliaia di dimeri di tubulina, circa 1700 dimeri per

µm di lunghezza, in una conformazione contenente solo GDP al sito di interscambio, a causa dell'idrolisi del GTP.

E' interessante riportare che il *treadmilling* e l'instabilità dinamica non sono comportamenti cellulari mutuamente escludentesi cosicchè una specifica popolazione di microtubuli può esibire prima un comportamento e poi l'altro, od entrambi. I parametri che controllano il grado con cui una popolazione di microtubuli esiste sono (i) la composizione isotipica della tubulina, (ii) l'entità delle modificazioni post-traduzionali e (iii) la presenza di proteine regolatorie accessorie. Infine sia il *treadmilling* che l'instabilità dinamica sono entrambi comportamenti intrinseci dei microtubuli costituiti biochimicamente da sola tubulina: nessuna proteina accessoria è ulteriormente necessaria e la sola fonte di energia chimica richiesta deriva dall'idrolisi del GTP (Hyams et al., 1978).

E' interessante notare che il dinamismo di specifiche popolazioni di microtubuli può essere finemente controllato nei diversi compartimenti cellulari. Ad esempio, i microtubuli presenti negli assoni differenziati sono relativamente stabili in confronto ai microtubuli di cellule mitotiche, così da assicurare che i motori proteici responsabili del trasporto antero-retrogrado possano muoversi lungo essi. Sebbene i microtubuli assonali siano stabili, ma non statici in quanto esibiscono una emi-vita di circa 45-90 minuti, essi preservano un certo dinamismo che, in particolari condizioni, li rende capaci di spostare il terminale sinaptico. Infatti in cellule non-neuronali, i microtubuli nell'assone in crescita esibiscono diverse stabilità in funzione della localizzazione sub-cellulare, in quanto quelli associati al cono di crescita sono più labili di quelli vicini al corpo cellulare. A tal proposito, Tanaka et al. (Tanaka et al., 1995), riportano che nel cono di crescita assonale sono presenti sia microtubuli stabili che dinamici e che quest'ultimi, più labili, giocano un ruolo chiave nell'orientare quelli più rigidi, controllando le funzioni del cono stesso.

Il meccanismo di azione di alcune droghe sui microtubuli può essere utilizzato come paradigma per comprendere come tau e le altre MAPs ne regolino il dinamismo nei neuroni. Il tassano paclitaxel, che lega la tubulina in multipli siti lungo l'intera superficie dei microtubuli, ad alte concentrazioni aumenta la polimerizzazione della tubulina e pertanto è considerato un farmaco stabilizzatore dei microtubuli. La colchicina e gli alcaloidi estratti dalla Vinca, che legano sia la tubulina solubile che le estremità del microtubulo, ad alte dosi ne inibiscono la polimerizzazione e pertanto sono considerati farmaci destabilizzanti dei microtubuli. In particolare, l'inibizione può essere causata dal legame di un alto numero di molecole del farmaco (colchicina) alla tubulina solubile, riducendo così il pool citosolico disponibile per la polimerizzazione, o in alternativa dal legame alla tubulina già polimerizzata (alcaloidi della Vinca), destabilizzando direttamente il lattice dei microtubuli. D'altro canto, basse dosi di tali droghe, legandosi alla superficie o all'estremità dei microtubuli, possono modularne potentemente il dinamismo cellulare, in assenza di apprezzabile polimerizzazione o depolimerizzazione. Basse dosi di paclitaxel sono sufficienti a stabilizzare l'instabilità dinamica dei microtubuli e il *treadmilling*. Allo *steady state*, quando cioè la concentrazione di tubulina solubile ed assemblata nei microtubuli rimane costante, basse dosi di paclitaxel (0.01 mole per mole di dimeri di tubulina nei microtubuli) potentemente e selettivamente sopprimono il tasso e l'estensione di accorciamento all'estremità plus, in associazione con un minimo aumento della massa di polimeri assemblati, in confronto a microtubuli di controllo non trattati con tale farmaco. Il meccanismo d'azione di tau, che lega l'estremità C-terminale della tubulina sulla superficie dei microtubuli, è simile a quello di basse dosi di paclitaxel in vitro. Infatti, basse dosi della forma adulta 4R di tau inibiscono il *treadmilling* dei microtubuli e potentemente ne sopprimono sia il tasso che l'estensione dell'accorciamento (Feinstein et al., 2005).

Tau inoltre, data la presenza delle ripetizioni COOH-terminali di interazione ai microtubuli, in colture neuronali modula il trasporto dei neurofilamenti, delle vescicole e di altri organelli lungo i microtubuli stessi influenzandone il legame della chinesina e di altri motori proteici chinesina-simili. A tal proposito, Ebner et al. (Ebner et al., 1998) e Stamer et al. (Stamer et al., 2002) riportano che l'aumentata espressione dell' isoforma più lunga della tau umana causa, sia nelle cellule neuronali che non, l'aggregazione di tau ai centrosomi o centri di organizzazione dei microtubuli con conseguente sequestro di mitocondri e reticolo endoplasmatico, a causa dei difetti

del trasporto assonale plus-end-diretto e microtubuli-dipendente. Il meccanismo per cui tau inibisce il trasporto chinesina-dipendente è la riduzione della frequenza di attacco dei motori, in quanto essa non ha alcun effetto sulla velocità e sulla distanza percorsa dalla chinesina, una volta che essa si è attaccata ai microtubuli (Seitz et al., 2002). L'aumentata espressione della serin-treonin-chinasi di tau GSK-3 $\beta$  in topi transgenici per la tau umana ne aumenta significativamente lo stato di fosforilazione e, parallelamente riduce l'assonopatia, in confronto a topi che esprimono la sola forma selvatica di tau: la diminuzione dell'affinità di legame ai microtubuli della tau iperfosforilata la rende infatti meno efficace nel competere con la chinesina per i siti di legame al citoscheletro, recuperando così il trasporto assonale anterogrado. Tali dati evidenziano dunque che il trasporto assonale di tau è regolato dalla fosforilazione GSK-3 $\beta$ -mediata (Spittaels et al., 2000). Tau infine attraverso l'estremità C-terminale interagisce con i neurofilamenti, con l' $\alpha$ -sinucleina, con l'adattatore 14-3-3, con la presenilina PS1, e con il DNA a doppia elica (Shahani et al., 2002; Johnson et al., 2004).

### **-Isoforme di tau e malattie neurodegenerative**

Le proteine tau sono il principale componente biochimico delle inclusioni filamentose proteinacee, presenti nei neuroni di pazienti affetti dal morbo di Alzheimer (AD) o da altri disordini neurodegenerativi indicati come tauopatie (Iqbal et al., 2005). In tali patologie umane, la proteina tau perde la sua tipica localizzazione assonale e la stabile interazione con i microtubuli, e si aggrega in depositi filamentosi intracellulari la cui morfologia, distribuzione subcellulare e contenuto in isoforme sono tauopatia-specifici. Tali disordini neurodegenerativi sono caratterizzati da una progressiva destabilizzazione dei microtubuli, dalla riduzione del numero delle sinapsi, da degenerazione assonale e dendritica, ed infine da morte neuronale. Le lesioni neurofibrillari, come i grovigli neurofibrillari (NFT -*neurofibrillary tangles*-), i filamenti neuritici (NT -*neuropil thread*-) del corpo cellulare, o le placche neuritiche (NP -*neuritic plaques*-) dei dendriti ed assoni distrofici, sono tutte strutture argirofile, che sono visualizzate immunoistochimicamente per mezzo di anticorpi diretti contro le proteine tau fosforilate. In aggiunta, alcuni neuroni mostrano una diffusa immunoreattività per tau nel perikarion, e pertanto sono definiti allo stadio "*pre-tangle*," in quanto la patologia di tau non è marcata dai coloranti amiloidei come la thioflavina-S e il rosso Congo, diversamente dalle lesioni neurofibrillari. Comunque, i NFT nel cervello di casi AD sono spesso rilasciati nello spazio extracellulare, dopo la degenerazione dei neuroni portanti le lesioni, e pertanto sono definiti "*ghost tangles*". Infine, i neuriti distrofici sono spesso associati alle placche amiloidee, formando le placche neuritiche (Higuchi et al., 2002). Differenti tipi neuronali e aree cerebrali sono tipicamente affette nelle diverse tauopatie e, sia i neuroni che la glia, o entrambi, ne sono infatti interessati (Brandt et al., 2005). Le differenze nelle aree cerebrali affette, nelle dimensioni e nello stato di fosforilazione delle isoforme di tau tengono conto della diversa sintomatologia clinica manifestata da tali disordini e, delle diversità delle forme patologiche, distinguibili sulla base della differente mobilità elettroforetica. Ultrastrutturalmente tali aggregati neurofibrillari (NFT) fosfotau-positivi acquisiscono la forma di PHF (*paired helical filaments*), di filamenti dritti SF (*straight filaments*), ma anche di filamenti/nastri avvolti (*twisted ribbon/filaments*) presenti in alcune tauopatie familiari con demenza senile.

Alcuni tauopatie mostrano un'abbondante coesistenza con le placche amiloidee di A $\beta$ : ad esempio, le lesioni neurofibrillari coesistono con i depositi di A $\beta$  nel morbo di Alzheimer, nella sindrome di Down, nella demenza pugilistica e nella miosite con corpi di inclusione. Diversamente, in alcuni casi di disordine di Gertsman-Straussler-Scheinker (GSS), di disordine di Creutzfeldt-Jakob (CJD) e di angiopatia amiloidea con proteina prionica cerebrale, le lesioni neurofibrillari coesistono con i depositi amiloidei di proteina prionica. Dall'altro lato, la sclerosi amiotrofica laterale parkinsonismo-demenza complesso di Guam, trovata nella popolazione dei Chamorro di Guam mostra solo poche placche amiloidee di A $\beta$ . Comunque, le lesioni neurofibrillari in assenza di placche amiloidee sono osservate (i) nella demenza con grani argirofili, (ii) nel disordine di Pick,

(iii) nella degenerazione corticobasale, (iv) nella paralisi progressiva sopranucleare, (v) nell' atrofia multipla sistemica (MSA), (vi) nel disordine di Niemann-Pick di tipo C, nella patologia da grovigli neurofibrillari con calcificazione, nel disordine di Hallervorden-Spatz, (vii) nella panencefalite subacuta sclerosante, (viii) nella demenza fronto-temporale con parkinsonismo associata al cromosoma 17 (Higuchi et al., 2002). La patologia di tau nell'AD è limitata quasi esclusivamente ai neuroni mentre, come detto, altre tauopatie esibiscono sia inclusioni neuronali che gliali. I cervelli di casi affetti da atrofia multipla sistemica (MSA), da paralisi progressiva sopranucleare (PSP), da degenerazione corticobasale (CBD) e da demenza fronto-temporale con parkinsonismo associata al cromosoma 17 (FTDP-17) contengono infatti abbondanti depositi di tau, sia negli astrociti che negli oligodendrociti. Infine, nella tauopatia familiare multipla sistemica con demenza senile (MSTD), le cellule colpite invece sono prevalentemente gli oligodendrociti (Higuchi et al., 2002).

In conclusione, le tauopatie differiscono dall'AD in quanto esibiscono (a) difetti clinici sia cognitivi che motori, (b) sono inoltre caratterizzate da inclusioni patologiche sia gliali che neuronali (3) ed interessano non solo la corteccia entorinale e l'ippocampo, ma anche i gangli della base, i nuclei cerebellari più profondi e il sistema limbico. Infine, (4) gli aggregati di tau in suddetti disordini sono biochimicamente distinti da quelli riportati in casi AD (Lee et al., 2001).

-Sulla base del tipo di aggregati di tau sono state definite cinque diverse classi di tauopatie (Fig.19).

Classe I: una tripletta di tau a 55,64,68/69 KDa.

Tale classe è identificata da una tripletta patologica di tau a 55,64,68/69 KDa e da una minore banda a 72/74KDa, corrispondenti alle sei isoforme di tau. Il prototipo di tali disordini neurologici è il morbo di Alzheimer, ma tale gruppo include anche la sclerosi amiotrofica laterale parkinsonismo-demenza complesso di Guam, la demenza pugilistica, la sindrome di Down, il disordine di Niemann-Pick di tipo C, e la demenza fronto-temporale con parkinsonismo associata al cromosoma 17. Tali lesioni sono anche presenti nella corteccia entorinale di anziani di 75 anni di età e spesso anche nell'ippocampo, con o senza depositi di amiloide.

*Alzheimer's disease* (AD) è la malattia dementigena a più alta incidenza (5%) tra la popolazione mondiale dopo i 65 anni di età. Tale disordine è neuropatologicamente caratterizzato da due differenti lesioni neuronali: (1) presenza di numerose placche extracellulari, composte prevalentemente da A $\beta$ 42, ed (2) aggregati intracellulari neurofibrillari, composti invece da proteine tau iperfosforilate (Walsh and Selkoe, 2004). Le forme autosomiche dominanti sono causate da mutazioni nei geni codificanti per il precursore dell'amiloide  $\beta$  (APP-*amyloid precursor protein*) e della presenilina 1 e presenilina 2 (PS1/2). Le mutazioni a carico dell'APP alterano il processamento proteolitico dell'APP, promuovendo la formazione del più fibrillogenico peptide A $\beta$ 42 (Hardy and Selkoe, 2002). Le preseniline, unitamente ad altre proteasi recentemente identificate, sono componenti centrali della  $\gamma$ -secretasi, l'enzima responsabile per il taglio al C-terminale dell'APP, e mutazioni nei relativi geni anche alterano la maturazione dell'APP verso una maggiore produzione di A $\beta$ 42 (Wilquet and De Stopper, 2004). I topi transgenici mutanti per l'APP sviluppano una patologia a placche amiloidee, che aumenta se tali animali sono incrociati con topi transgenici mutanti per le preseniline. Comunque, è importante notare che, siffatti topi non esibiscono alcuna estesa perdita neuronale, né una evidente degenerazione neurofibrillare (La Ferla and Oddo, 2005), né sono mai stati riportati nell'uomo casi in cui entrambe le mutazioni (tau/APP) siano contestualmente presenti. Di converso, incrociando i topi con patologie a placche con topi mutanti per tau, si osserva un aumento della formazione dei NFT ma non delle placche amiloidee, il che suggerirebbe che la A $\beta$  è a monte di tau nella cascata patogenetica dell'AD (Hardy et al., 1998). Tale ipotesi è ulteriormente corroborata dall'osservazione che A $\beta$  è molto meno tossico nei neuroni in cui il gene tau è stato preventivamente deletato (Rapoport et al., 2002). Per quanto riguarda invece la natura delle specie tossiche di A $\beta$ , si ritiene che gli ADDL (*Alzheimer's Disease Diffusibile Ligand*) o oligomeri solubili e diffusibili, più che i polimeri fibrillari, siano gli effettivi mediatori della patogenesi (Klein et al., 2004).

La patologia di tau, negli estratti di cervello di pazienti AD dopo analisi di Western blotting, è visibile come una tripletta di bande di alto peso molecolare (tau55,64,68): dopo defosforilazione tali specie anomale di tau recuperano il loro normale peso molecolare, fra 55 e 64KDa. Le analisi di elettroforesi bidimensionale (2D) e di spettrometria di massa hanno confermato che tutte le sei isoforme di tau sono presenti nei PHF e che tali specie AD-associate sono iperfosforilate e così, più acide su gel 2D. Una quarta banda anomala di peso di circa 72-74KDa è stata poi scoperta successivamente ed è stato dimostrato essere corrispondente alla isoforma più lunga di tau (Delacourte et al., 2005).

In particolare: tau 55 risulta dalla fosforilazione della forma fetale (2-3-10-), tau 64 dalla fosforilazione delle varianti di tau con un solo esone (2+3-10- e/o 2-3-10+), tau 68 dalla fosforilazione delle varianti di tau con due esoni (2+3+10- e/o 2+3-10+). La fosforilazione della più lunga isoforma di tau (2+3+10+) induce la formazione della variante iperfosforilata tau 74.

Le analisi di Western blotting riportano inoltre che i livelli totali della proteina tau sono aumentati nei PHF del cervello dei pazienti AD (Goedert et al., 1989). Alcuni gruppi inoltre, utilizzando anticorpi che discriminano tra le isoforme 3R e 4R, riportano che tali aggregati neurofibrillari sono prevalentemente 3R-immunoreattivi (Liu et al., 2001, de Silva et al., 2003). In particolare, indagini immunoistochimiche, su fettine di casi AD, distinguono tre diverse classi di aggregati: (1) quella con sole isoforme 3R, (2) quella con combinazione di isoforme 3R e 4R, mentre poco rappresentata è (3) la classe che esibisce solo isoforme 4R. Utilizzando le tecniche di analisi del messaggero (Northern blotting e PCR quantitativa), alcuni studi indicano che i trascritti con l'esone 3R sono aumentati nel cervello dei pazienti AD (Liu et al., 1993), mentre altri suggeriscono che i trascritti 4R sono prevalenti in quelle aree cerebrali, quali ad esempio la corteccia entorinale, che sono più severamente affette in tale malattia dementigena (Yasojima et al., 1999).

A livello microscopico, mentre le placche senili sono variabilmente diffuse nella corteccia cerebrale e nelle strutture subcorticali, i NFT sono osservati preferenzialmente nelle cellule piramidali dell'ippocampo, nella corteccia entorinale, nello strato sopragranulare (I-III) e infragranulare (V-VI) delle aree associative corticali, e nella corteccia motoria. Anche le aree cerebrali corticali e subcorticali, come il nucleo basale di Meynert, l'amigdala, il locus coeruleus e il nucleo dorsale del rafe, sono anche interessati dalla formazione dei NFT. Comunque, alcune lesioni neurofibrillari a bassa densità sono anche presenti nella corteccia entorinale e nell'ippocampo di anziani sani non dementi (Bueè et al., 2000). Ultrastrutturalmente, tali aggregati neurofibrillari (NFTs) fosfo-tau-positivi acquisiscono la forma di PHFs (*paired helical filaments*), di filamenti dritti SFs (*straight filaments*). Tali lesioni neurofibrillari sono presenti nel corpo cellulare e nei dendriti apicali: in particolare, i filamenti neuritici (NTs o *neuropil threads*) sono presenti nei dendriti apicali, mentre le placche neuritiche (NPs o *neuritic plaques*) costituite dai neuriti distrofici argirofilati sono associate alle placche extracellulari amiloidee (Fig.20). Infine, le analisi di microscopia elettronica hanno evidenziato che i PHFs, che rappresentano circa il 95% dei NFTs, consistono di due nastri elicoidali avvolti con una periodicità di 75-80 nm e uno spessore di 10-22 nm, mentre i SFs rappresentano la frazione meno abbondante pari a circa il 5% e non esibiscono alcuna periodicità.

Accordando ai sei stadi descritti da Braak e Braak nello sviluppo dei NFTs e dei NFs, i primi neuroni affetti che esibiscono alterazioni neurofibrillari sono i neuroni di proiezione del pre-strato  $\alpha$ - della regione transentorinale (TE) (Stadio I). Le lesioni neurofibrillari si sviluppano in assenza dei depositi di amiloide, suggerendo che esse non sono la mera conseguenza dell'effetto neurotossico sostenuto dai depositi extracellulari di A $\beta$ . Nello stadio II, vi è un più severo coinvolgimento della regione TE, associata ad una minore alterazione del pre-strato  $\alpha$  della regione entorinale (E). I pazienti nello stadio I e II, detti stadi transentorinali, esibiscono solo scarse modificazioni a carico dell'ippocampo (CA1) e sono in uno stadio " clinicamente silente " di AD, in quanto non mostrano evidenti difetti cognitivi. Nello stadio III e IV, detti stadi limbici, compaiono invece le prime alterazioni cognitive. Nello stadio III, sia il pre-strato  $\alpha$  delle regioni E e TE sono severamente colpiti, diversamente dall'ippocampo (CA1). Alterazioni sono anche visibili nei neuroni magnocellulari del proencefalo, nel nucleo anterodorsale del talamo, e nell'amigdala. Nello

stadio IV, l'ippocampo CA1 esibisce numerosi NFTs, mentre alcune aree subcorticali ne sono interessate. Infine negli stadi V e VI, detti stadi neocorticali, sia l'ippocampo che le aree associative corticali sono severamente compromesse. In particolare nello stadio V, diversamente dalle aree primarie sensorie, i nuclei subcorticali sono severamente lesi. Nello stadio VI terminale, l'ippocampo è pieno di grovigli neurofibrillari e si rileva una pronunciata perdita di neuroni CA1: tutte le aree associative corticali, ma anche quelle sensorie primarie sono danneggiate (Lau et al., 2002).

Aggregati di tau simili a quelli precedentemente descritti, ma presenti sia nei neuroni che nelle cellule gliali e in assenza di depositi extracellulari, sono la caratteristica patognomonica di un altro disordine neurodegenerativo, la demenza fronto-temporale ereditaria e parkinsonismo legate al cromosoma 17 (FTDP-17) (Goedert et al., 2005). Sebbene per lungo tempo si riteneva che la disfunzione della proteina tau fosse eziogeneticamente nel disordine un evento secondario, la scoperta di circa 32 mutazioni, introniche ed esoniche, mappanti nel gene tau e causanti un disordine neurodegenerativo autosomico dominante, noto appunto come (FTDP-17), ha permesso di capire che alterazioni di tau sono diretta causa di malattia. La FTDP-17 è infatti un disordine ereditario che, come risulta dalle analisi di linkage, cosegrega con un locus genetico sul cromosoma 17q21-22 ed è caratterizzato da disturbi del comportamento, da demenza e perdita delle funzioni dei lobi frontali, da parkinsonismo, da alterazioni della memoria e del linguaggio e da amiotrofia. Neuropatologicamente i pazienti affetti esibiscono un'atrofia dei lobi temporali e frontali, una severa perdita neuronale con gliosi della sostanza bianca e grigia, e una patologia neurofibrillare interessante sia i neuroni (cervello, cervelletto e tronco encefalico, midollo spinale) che le cellule gliali, in completa assenza di placche di amiloide (Goedert et al., 2005; Reed et al., 2001; Spillantini et al., 1998). La patologia di tau in tale malattia consiste in una neurodegenerazione fibrillare con formazione di grovigli (NFT), globosi e a forma di fiamma, o con depositi diffusi e granulari, detti stadio "pre-tangle". Le strutture simili a fili (*neuropil threads*) e i grani, presenti sia nella sostanza bianca che in quella grigia, rappresentano invece processi gliali e segmenti assonali. La patologia astrocitaria mostra la presenza di una colorazione di tau di tipo granulare con alcune strutture reminiscenti degli astrociti "tufted" (evidenti anche nella paralisi progressiva sopranucleare) o delle placche astrocitarie (evidenti nella degenerazione corticobasale e presenti solo nelle mutazioni K317M e N279K associate alla malattia). I depositi di tau negli oligodendrociti ricordano i "coiled bodies," descritti in altri disordini neurodegenerativi. Sia le inclusioni neuronali che quelle gliali sono identificate tramite colorazione argentea, come Bodian, Gallyas e Bielschowsky, mentre per immunostochimica esse risultano positive con anticorpi diretti contro fosfo-epitopi di tau. Le mutazioni negli esoni 9, 11, 12 e 13 sono prevalentemente caratterizzate da depositi di tau neuronali, mentre le mutazioni negli esoni 1 e 10 e nell'introne che segue l'esone 10 sono caratterizzate da depositi di tau sia neuronali che gliali (Wszolek et al., 2005). L'analisi per microscopia elettronica della morfologia dei filamenti tau, ha evidenziato un'alta eterogeneità, in funzione del tipo di mutazione genica. In particolare, le proteine tau appaiono come "straight filaments" (mutazioni R5L, P301S, E10+3, G839R), come "twisted filaments" (S305S, E10+13, G839R), come "straight tubules" (R5H, N296H, S305N), "paired tubules" (N279K), come "twisted ribbons" (K257T, P301L, K369I) o come "paired helical filaments" (V337M, G342V, R406W). Due differenti tipi di filamenti ("straight" e "twisted") possono invece coesistere nelle mutazioni G839R e S320F (Wszolek et al., 2005) (Fig.21).

Le mutazioni di tau, associate a tale malattia dementigena, sono geneticamente classificate in mutazioni missense, per delezione, mutazioni silenti nelle regioni esoniche codificanti, o mutazioni introniche localizzate presso i siti donatori dell'introne che segue l'esone 10 (Fig.22). Sulla base del meccanismo patogenetico invece, sono classificate in (a) mutazioni mappanti all'interno dell'esone 10, o intorno al sito di *splice* 5' nell'introne che segue immediatamente l'esone 10, le quali alterano pertanto lo splicing alternativo dell'esone 10 aumentando così il rapporto tra le isoforme 4R/3R (b) mutazioni che direttamente alterano l'abilità di tau nel legare i microtubuli, e nel controllarne la polimerizzazione e la stabilità.

Le mutazioni introniche, identificate ponendo il primo nucleotide del sito donatore di *splicing* come +1, sono +3, 11, 12, 13, 14,16, 19, 29, ed alterano tutte la regolazione della maturazione dell'esone 10, influenzando così il rapporto tra le proteine 4R/3R. Le mutazioni introniche disturbano nel sito di *splicing* 5' una potenziale struttura ad ansa-uncino (*stem-loop*) che è probabilmente coinvolta nella regolazione dello *splicing* alternativo dell'esone 10 codificante per un dominio ripetuto di legame ai microtubuli: tale destabilizzazione causa dunque un più frequente uso del sito di *splice* 5', e quindi un'aumentata proporzione dei trascritti di tau che includono l'esone 10. Infatti, senza tale struttura a *stem-loop*, l'accesso dell'U1snRNP a questo sito è facilitato, promuovendo la formazione di mRNAs tau 10+, e aumentando così la quota di isoforme di proteina tau-4R. Tale incremento in mRNA contenenti l'esone 10 è correlato ad un aumento della quota di proteina tau con quattro domini di legame ai microtubuli (4R>3R). Mentre nel cervello adulto normale le isoforme 4R e 3R di tau sono espresse in pari quantità (1:1), le mutazioni introniche inducono un aumento di tale rapporto, cosicché le isoforme 4R rappresentano circa il 75% del totale, mentre le isoforme 3R solo il 25%. E' da sottolineare che tali mutazioni non alterano la sequenza aminoacidica della proteina tau codificata ma sono mutazioni regolatorie, in quanto sbilanciano l'assetto di espressione dei polipeptidi selvatici. Tali mutazioni introniche, come le tre mutazioni esoniche missense N279K, S305N e L284L che anche modificano lo *splicing* dell'esone 10 creando o distruggendo rispettivamente una sequenza *enhancer* esone-*splicing*, mostrano tutte lo stesso pattern di mobilità elettroforetica di tau, con un doppietto di tau a 64 e 69 KDa (Bueè et al., 2000).

Le mutazioni esoniche influenzano direttamente l'abilità di tau nel legare i microtubuli e la capacità di promuoverne la polimerizzazione e la stabilità, oltre che alterare la fosforilazione e l'associazione di tau con enzimi come la tau fosfatasi PP2A o la tirosin-chinasi non recettoriale fyn, (Goedert et al., 2000; Bhaskar et al., 2005; Hyman et al., 2005). In particolare, molte mutazioni nelle regioni codificanti sono localizzate negli esoni 9-12 o nell'esone 13 prossimi alla regione di legame ai microtubuli, mentre solo due mutazioni mappano nell'esone 1 di tau (R5H e R5L). Circa metà delle mutazioni conosciute altera il livello della proteina tau, riducendone l'abilità intrinseca ad interagire con i microtubuli, ed aumentandone la propensione ad aggregare intracellularmente in grovigli filamentosi neurofibrillari. Le restanti alterano il livello del relativo messaggero, perturbando così il normale rapporto tra le isoforme a tre o quattro ripetizioni terminali (Goedert and Jakes, 2005). Alcune mutazioni mappanti nell'esone 10 di tau, come deltaK280, deltaN296 e N296H influenzano invece sia il messaggero che i livelli di proteina. Le mutazioni nell'esone 1 (R5H e R5L), quelle dell'esone 9 (K257T, I260V, L266V e G272V), quelle dell'esone 11 (L315R, S320F), quelle dell'esone 12 (V337M, E342V, S352L e K3691I) ed infine quelle dell'esone 13 (G839R e R406W) influenzano tutte le sei isoforme di tau. Diversamente, le mutazioni nell'esone 10 (N279K, deltaK280, L284L, N296N, deltaN296, N296H, P301L, P301C, S305N e S305S) influenzano solo le isoforme 4R o il relativo livello d'espressione. In particolare, la mutazione N279K agisce su un altro elemento regolatorio ESE (*exon-splicing-enhancer*) all'interno dell'esone 10 causando conseguentemente un incremento del rapporto 4R/3R. La mutazione delta280, che produce la delezione di tre purine adiacenti (AAG), abolisce lo *splicing* dell'esone E10 nell'mRNA di tau, mentre la mutazione silente L284L probabilmente disturba un'altra sequenza regolatoria detta ESS (*exon-splicing-silencer*) sempre all'interno dell'esone 10. La caratterizzazione biochimica degli aggregati di tau, esclusivamente neuronali e relativi a mutazioni che cadono fuori all'esone 10 (V272G, V377M, R406W) in una regione di tau comune a tutte le isoforme, mostra un profilo elettroforetico simile a quello della tripletta AD-associata (tau55-64-69). Diversamente, per le mutazioni localizzate nell'esone 10 (P301L, P301S) che influenzano solo le isoforme 4R, la caratterizzazione biochimica di tali inclusioni, sia neuronali che gliali, evidenzia che esse esibiscono una mobilità elettroforetica con doppietto (tau 64-69) simile a quello riportato nella PSP e nella CBD. Sebbene l'eziologia, i sintomi clinici, le caratteristiche patologiche e di composizione biochimica dei filamenti aggregati di tau iperfosforilati (morfologia, composizione in isoforme e distribuzione) sono diverse, tali malattie neurodegenerative sono tutte indotte da una disfunzione primaria del gene tau (Brandt et al., 2005; Goedert et al., 2005).

Il disordine di Niemann-Pick di tipo C (NPC) è una malattia neurodegenerativa da accumulo di colesterolo, associata a difetti del trasporto intracellulare di tale sterolo esogeno da parte delle LDL (*low density lipoprotein*). L'esordio clinico è precoce, nell'infanzia o nell'adolescenza e solo raramente nell'adulto, mentre le manifestazioni neurologiche tipiche sono atassia, paresi e ritardo psicomotorio. Neuropatologicamente, i cervelli da pazienti affetti da NPC mostrano una marcata dilatazione assonale, nella corteccia e nel tronco encefalico, mentre i casi con decorso cronico progressivo esibiscono i NFT, che sono tau-positivi e risultano indistinguibili da quelli AD-associati, presenti in diverse aree cerebrali, quali ippocampo, neocortex e alcune strutture subcorticali. Recenti dati infine suggeriscono che tale accumulo di colesterolo può essere correlato a difetti genetici a carico del gene NPC1 localizzato sul cromosoma 18 (Bueè et al., 2000). Ultrastrutturalmente, la patologia filamentosa di tau è indistinguibile da quella rilevabile nell'AD.

La sindrome di Down (DS) è causata da una trisomia del cromosoma 21: i pazienti esibiscono numerose disfunzioni somatiche durante lo sviluppo, quali una ridotta maturazione di diverse aree cerebrali, marcati deficit cognitivi e demenza dopo i 50 anni di età. Neuropatologicamente è riportata una massiva perdita neuronale nell'ippocampo (corteccia entorinale, subiculum, neuroni CA1-CA3), nella neocortex e in diverse aree subcorticali, con formazione sia dei NFT che dei depositi amiloidei. Come per il disordine di Niemann-Pick di tipo C (NPC), tali lesioni sono analoghe a quelle tipiche dell'AD.

La sclerosi amiotrofica laterale parkinsonismo-demenza complesso di Guam (ALS/PDC) è un disordine neurodegenerativo cronico ad alta incidenza nella popolazione nativa dei Chamorro del Guam, nelle terre ad ovest del Pacifico. Clinicamente tale malattia dementigena si manifesta con declino mentale, disfunzioni extrapiramidali quali rigidità e tremore, mentre eziopatogeneticamente si ritiene che agenti tossici ambientali (metalli pesanti o neurotossine) ne siano principalmente coinvolti. Neuropatologicamente i pazienti affetti esibiscono una severa atrofia corticale, con perdita neuronale ed un'ampia distribuzione di NFT, specialmente nella corteccia temporale e frontale, nell'ippocampo e in diverse aree subcorticali. Sebbene i NFT siano presenti sia nell'AD che nella ALS/PDC, tali due patologie si distinguono per la differente distribuzione laminare e per la densità di tali grovigli neurofibrillari tau-positivi. In particolare, i NFT nella ALS/PDC sono distribuiti prevalentemente negli strati II-III delle aree neocorticali e solo raramente negli strati V-VI, mentre nei casi AD i NFT sono presenti ad alta densità solo negli strati V-VI. Sebbene esibiscano una diversa localizzazione anatomica, i NFT, estratti dai cervelli di pazienti affetti da AD e da ALS/PDC, hanno evidenziato analoghe proprietà biochimiche (una tripletta di tau55, 64, 69), mediante analisi di Western blotting utilizzando anticorpi diretti contro tau e fosforilazione-dipendente. Ultrastrutturalmente tali grovigli neurofibrillari consistono di filamenti dritti SF (*straight filaments*) e PHF (*paired helical filaments*), analoghi a quelli presenti nel cervello di casi AD.

Classe II: un doppietto a 64 e 69 KDa e il concetto di tauopatia 4R

Tale classe è caratterizzata essenzialmente dall'aggregazione delle isoforme di tau 4R. A tale gruppo appartengono la paralisi progressiva soprannucleare (PSP), la degenerazione corticobasale (CBD), la degenerazione a grani argirofili (AGD) e la FTDP-17 (isoforme 10+: P301L, P301S).

La paralisi progressiva soprannucleare (PSP) è un disordine ad esordio tardivo, caratterizzato neuropatologicamente da perdita neuronale, gliosi e formazione dei NFT nei gangli della base, nel tronco encefalico, nel cervelletto e nelle aree subcorticali e subfrontali. Il profilo elettroforetico delle proteine tau iperfosforilate in tale disordine differisce da quello riportato nell'AD, in quanto esibisce un tipico doppietto (tau64 e tau69) invece della tripletta (tau 55-tau 64-tau 69). Spesso è rivelata anche una banda minore di 74KDa, ed inoltre non sono immunoistochimicamente rivelate le isoforme prive di esone 10. Diversamente, molti dei siti iperfosforilati nei PHF-tau dell'AD lo sono anche nelle inclusioni patologiche di pazienti affetti da PSP (Bueè et al., 2000). Ultrastrutturalmente i grovigli neurofibrillari sono prevalentemente composti da filamenti dritti

o “*straight filaments*” e da un minor numero di filamenti a nastro elicoidale o “*twisted ribbon-like*”, simili a quelli dei PHF presenti nell’AD (Fig.20).

La degenerazione corticobasale (CBD) è un disordine neurodegenerativo raro e sporadico, caratterizzato clinicamente da disturbi cognitivi come afasia, apraxia, da demenza e disfunzioni motorie extrapiramidali, come rigidità, acinesia, tremore nell’azione. L’analisi neuropatologica rivela anomalie sia gliali che neuronali. Le patologia gliale è tipicamente rappresentata sia da placche astrocitarie che da numerose inclusioni tau-positive nella sostanza bianca, mentre i neuroni, con assoni dilatati e numerose varicosità, sono presenti sia nella corteccia che nelle aree subcorticali (Fig.20). Il profilo elettroforetico delle proteine tau patologiche nella CBD è simile a quello della PSP, con un doppietto di tau 64 e tau 69. Comunque le componenti possono differire tra le due malattie dementigene, in quanto tale doppietto non è rivelato nella CBD utilizzando anticorpi diretti contro la regione codificata dall’esone 3. Recenti lavori riportano inoltre che le isoforme di tau codificate dall’esone 10 sono presenti nella CBD, mentre non sono rilevabili le isoforme che ne sono prive (E10-), suggerendo che in tale disordine principalmente le isoforme 4R tau aggregano in filamenti. A tal proposito si ricorda che, la sola isoforma con le sequenze codificate sia dall’esone 3 che 10 è quella più lunga.

Il disordine a grani argirofili (AGD) è clinicamente caratterizzato da disturbi del comportamento, deficit cognitivi e di memoria. A livello neuropatologico, tale malattia dementigena è accompagnata dalla comparsa di numerosi grani argirofili nei tessuti cerebrali affetti, da cui appunto il nome, e da inclusioni neuronali tau-positive colorate con l’argento, presenti sia nell’ippocampo che nell’area limbica. Il rapporto 4R/3R è significativamente aumentato, accreditando la AGD come una patologia-4R (Bueè et al., 2000). Ultrastrutturalmente, sono poi evidenti numerosi filamenti dritti, o “*straight filaments*,” e filamenti a nastro elicoidale, differenti da quelli tipici dell’AD in quanto mostrano una periodicità irregolare di 90-130 nm (Fig.20).

Classe III: doppietto di tau a 55 e 64KDa e il concetto di tauopatie a 3R

Tale classe di tauopatie include un singolo disordine neurologico che è il disordine di Pick (PiD), una rara demenza progressiva ad esordio clinico precoce. Neuropatologicamente tale malattia è definita da una prominente atrofia dei lobi temporali, da gliosi, perdita neuronale e da presenza di inclusioni tau-positive, dette corpi di Pick, particolarmente abbondanti nell’ippocampo (granuli del giro dentato, CA1, subiculum e corteccia entorinale) e nella corteccia (strato II e VI dei lobi frontali e temporali). L’analisi biochimica, eseguita mediante approcci quantitativi di Western blotting, rivela un doppietto patologico di tau a 55 e 64KDa e spesso una debole banda a 69KDa: tale profilo è dato dalla specifica aggregazione delle isoforme di tau 3R. Inoltre, gli aggregati proteici del disordine di Pick non sono immunoreattivi all’anticorpo 12E8, diretto contro il residuo Ser262/Ser356 fosforilato, come riportato per altri disordini neurodegenerativi. Infine, i corpi di Pick e il doppietto di tau55-64 non sono immunologicamente marcati nella sequenza codificata dall’esone 10 (Bueè et al., 2000). Come per la paralisi progressiva sopranucleare, le lesioni neurofibrillari sono ultrastrutturalmente composte da filamenti sottili, o “*straight filaments*,” e da un ridotto numero di filamenti tau elicoidali, a periodicità simile a quelli presenti nell’AD.

Classe IV: doppietto di tau a 55KDa

La classe IV include anch’essa un singolo disordine neurologico: la distrofia miotonia di tipo I (DM1). Tale malattia, che esibisce un’ereditarietà autosomica dominante, è la più comune forma di distrofia muscolare ad inizio tardivo, è multisistemica, in quanto causa difetti cognitivi e neuropsichiatrici del sistema nervoso centrale, ed è associata a numerosi e diversi sintomi clinici. Essa è causata da mutazioni nel 3’ non tradotto (una tripletta CTG instabile) del gene, a copia singola e mappante sul cromosoma 19q, codificante per la Ser/Thr protein-chinasi della distrofia miotonia (dmpk). L’espansione della tripletta causa trascritti DMPK aberranti, che sono ritenuti nel nucleo e sono completamente assenti nel citoplasma. Neuropatologicamente, le lesioni neurofibrillari sono osservate già in individui di circa 50 anni di età: il tipico profilo patologico di

tau (a singola banda di 55KDa) nei pazienti affetti è correlato ad un ridotto numero di isoforme di tau, sia in termini di messaggero che di proteina, espresse in diverse aree del cervello (ippocampo, corteccia entorinale e aree temporali). Il profilo biochimico degli aggregati neurofibrillari differisce quindi dalla tipica tripletta AD-associata, in quanto non esibisce la banda a 69KDa mentre quella a 55KDa è particolarmente abbondante. L'analisi immunologica diretta contro la regione aminoacidica di tau codificata dall'esone 2 e 3, evidenzia che le lesioni di pazienti DM1 sono prive di isoforme di tau contenenti inserti N-terminali (N1 e N2). Un alterato splicing di tau, caratterizzato da una ridotta espressione di isoforme contenenti gli inserti N-terminali, è dunque associato alla DM1. Pertanto, tali evidenze sperimentali accreditano tale malattia come una effettiva tauopatia.

Recentemente, tre diversi lavori (Koolen et al., 2006; Sharp et al., 2006; Shaw-Smith et al., 2006) riportano il primo esempio di delezione del gene tau nell'uomo. Alcune microdelezioni a carico della regione cromosomica 17q21, su cui mappa anche il gene tau, causano un severo ritardo mentale, con tipiche anomalie facciali, ed anomalie di sviluppo. Sebbene tali studi non identifichino inequivocabilmente tau come la causa del fenotipo da delezione genica, essi dimostrano come la proteina tau giochi un ruolo importante nel normale sviluppo neuronale, evidenziando come le mutazioni a carico del relativo gene, che inducono perdita o acquisto di funzione, possono condurre a fenotipi ben diversi.

### **-Modificazioni post-traduzionali: conseguenze fisiologiche e patologiche**

In aggiunta al differenziale processamento dell'mRNA, le proteine tau esibiscono complesse modificazioni post-traduzionali, inclusa fisiologica fosforilazione e glicazione.

La fosforilazione sito-specifica delle proteine tau è la più importante di tali modificazioni, in quanto (i) controlla l'affinità di tau per i microtubuli, (ii) è regolata intracellularmente da un equilibrio di attività tra diverse protein-chinasi e fosfatasi ed (iii) è infine modulata durante il neurosviluppo, come lo splicing alternativo (Kosik and Shimura, 2005; Stoothoff and Johnson, 2005). In particolare, la fosforilazione di tau è alta nei neuroni allo stadio fetale e diminuisce progressivamente con l'avanzare dell'età. In condizioni patologiche, tau esibisce inoltre un' aberrante fosforilazione, sia in termini di estensione che di sito-specificità: le differenti isoforme di tau possono essere così modificate in diversi siti, probabilmente a causa della diversa compartimentazione subcellulare, o in quanto controllate da più protein-chinasi e fosfatasi. Inoltre, in condizioni patologiche tau esibisce anche glicosilazione, glicazione, ubiquitinizzazione, nitratura, ossidazione, legame covalente ad addotti chimici, proteolisi ed aggregazione. Tali modificazioni, ma come detto soprattutto l'iperfosforilazione, causano la disfunzione e quindi la morte neuronale, attraverso meccanismi cellulari differenti. Da una lato, infatti esse inducono la perdita della funzione di tau nel promuovere l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli citoscheletrici, causandone il distacco e la conseguente formazione di aggregati intraneuronali, insolubili e resistenti alla digestione da parte delle proteasi cellulari. Dall'altro lato, queste stesse modificazioni causano anche l'acquisizione di nuove funzioni tossiche da parte della proteina, quali ad esempio il sequestro della stessa tau e/o delle MAP1A/MAP1B e MAP2, inducendo il collasso del citoscheletro e l'inibizione del trasporto assonale (Iqbal et al., 2005).

#### **Fosforilazione: siti di fosforilazione, chinasi e fosfatasi**

L'isoforma più lunga della proteina tau umana contiene circa 80 residui di serina (Ser, S) e treonina (Thr, T) e 5 residui di tiroxina (Tyr, Y), molti dei quali strettamente mappanti nelle regioni fiancheggianti il dominio di legame al citoscheletro. La modificazione di tali residui aminoacidici controlla il legame di tau ai microtubuli, l'abilità a promuoverne l'assemblaggio e la relativa stabilità (Higuchi et al., 2002). Dunque circa il 20% della molecola può essere potenzialmente fosforilata, e l'utilizzo di specifici anticorpi diretti contro fosfoepitopi, l'analisi per spettrometria di

massa e il sequenziamento hanno evidenziato almeno 30 siti di fosforilazione, inclusi numerosi residui di tirosina (Chun and Johnson, 2007).

Le differenti isoforme di tau sono fosforilate in siti diversi, anche nelle stesse condizioni fisiologiche e a parità di protein-chinasi. Ciò può esser attribuito (1) ad una differente localizzazione o compartimentalizzazione cellulare, o in alternativa, (2) alla modulazione da parte di più protein-chinasi e fosfatasi, che possono preventivamente modificare siti adiacenti a quelli già fosforilati (*primed or unprimed sites*), delle diverse isoforme di tau. Comunque, in condizioni patologiche, una singola isoforma può essere modificata ad un' aumentato numeri di siti.

A supporto del probabile ruolo patogenetico dell' iperfosforilazione di tau, è stato dimostrato che i PHF-tau sono incapaci di associare ai microtubuli, e che l'abilità di legame è recuperata dopo defosforilazione enzimatica, in vitro, da parte di protein-fosfatasi. La proteina tau normale fetale è più iperfosforilata che le proteine tau estratte post-mortem da cervelli adulti normali, ma quasi tutti i siti fosforilati nella fetale tau normale sono identici a quelli nei PHF-tau. E' noto inoltre, che anche la tau fetale è meno capace di legare i microtubuli in confronto a quella normale. Tuttavia, una differenza tra i PHF-tau e la tau normale non è esclusivamente l'estensione, ma anche l'aberrante fosforilazione di alcuni siti che, è importante sottolineare, sono unici nei PHF-tau. Infatti la Ser212 e la Ser214, i due residui fosforilati contenuti nell'epitopo riconosciuto dall'anticorpo per fosfo-tau AT100/AT10, sono unici per i PHF-tau. Tale anticorpo infatti non riconosce nell'uomo la proteina tau isolata da biopsie da cervello fetale o da adulto normale, dimostrando così che la fosforilazione a tal sito appare essere specifica per i PHF-tau nell'AD, come per altre tauopatie (Higuchi et al., 2002). Così il termine "iperfosforilazione" indica sia "fosforilazione in maggiore estensione" che "fosforilazione aberrante in siti unici".

Dei numerosi residui di serina o treonina presenti nelle proteine tau, alcuni sono adiacenti a residui di prolina: tali siti sono potenziali candidati per la fosforilazione catalizzata in vitro dalla famiglia delle chinasi prolina-dirette. Quest'ultima include: cdk5 o *tau protein-kinase II*, ERK (*extracellular signal-regulated-kinase*), p38 MAPK (*mitogen-activated-protein-kinase* o *stress-activated- protein-kinase*), c-Jun-N-terminal- chinasi (JNK) e GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase 3* o *tau protein-kinase I*).

In particolare, la chinasi GSK-3 $\beta$  è espressa ad alto livello nel cervello (Woodgett et al., 1990), in particolare nei neuroni (Leroy et al., 1999) ed è associata ai microtubuli (Ishiguro et al., 1993). Tale chinasi fosforila tau in numerosi siti, sia in vitro che in vivo e più estensivamente che altre protein-chinasi: la fosforilazione al residuo bersaglio Thr 231 criticamente regola l'abilità di tau nel legare e stabilizzare il citoscheletro (Cho et al., 2004). E' interessante osservare che: (a) la fosforilazione di tau da parte di GSK-3 $\beta$  a siti specifici può richiedere preliminarmente la fosforilazione da parte di altre chinasi, in siti adiacenti a quelli da essa modificati (fosforilazione innescata) (b) nonostante GSK-3 $\beta$  fosforili numerosi siti su tau, non tutti hanno un impatto sulla sua funzione biologica (Avila et al., 2004; Stoothoff et al., 2005).

Numerose sono poi le evidenze sperimentali che accreditano la GSK3 $\beta$  come una delle principali chinasi di tau in vivo. In sistemi cellulari, la cotrasfezione di GSK-3 $\beta$  disturba significativamente il legame di tau esogeno ai microtubuli (Lovestone et al., 1996; Wagner et al., 1996). Di converso, l'inibizione di GSK-3 $\beta$  nei neuroni riduce la fosforilazione della tau endogena, causandone un aumento del legame ai microtubuli (Hong et al., 1997; Munoz-Montano et al., 1997; Lovestone et al., 1999; Leroy et al., 2000). L'aumentata espressione di GSK-3  $\beta$  nei topi transgenici risulta in una pronunciata iperfosforilazione di tau ad alcuni siti presenti nell' AD, modificazione reversibile dal trattamento con litio (Lim et al., 2001; Spittaels et al., 2000; Lucas et al., 2001; Perez et al., 2003). Perez et al., e Lim et al. studiano infatti l' iperfosforilazione di tau, in un topo transgenico esprime la tau umana mutante FTDP-17-associata: tali autori riportano che, tale modificazione patologica è GSK-3 $\beta$ -mediata ed è reversibile dal trattamento farmacologico con il litio, uno specifico inibitore di tale protein-chinasi, in assenza di aggregati insolubili. Analoghi esperimenti sono stati riportati da Noble et al. in un altro topo transgenico esprime la variante umana mutata FTDP-17 associata (Noble et al., 2005). L'aumentata espressione, nei moscerini transgenici, dell'

isoforma più lunga della tau umana e shaggy/zeste white-3, l'omologo del gene umano GSK-3 $\beta$ , induce una severa neurodegenerazione con accumulo di filamenti iperfosforilati (Jackson et al., 2002). In un modello murino transgenico che esprime costitutivamente la forma attiva di tale chinasi-GSK-3 $\beta$ (S9A)- sotto il controllo del promotore *thyl*, è stato riportato poi un aumento della fosforilazione di tau, ma solo negli animali anziani (6-7 mesi di età). Tali topi transgenici esibiscono infatti un normale comportamento nel test "water maze" di Morris ma, se incorciati con topi transgenici per l'isoforma più lunga di tau, sia i deficit motori che il numero delle dilatazioni assionali sono significativamente ridotti. Inoltre, tali animali mostrano un aumento della fosforilazione di tau, in completa assenza di formazione di aggregati insolubili (Spittaels et al., 2000). Gli autori suggeriscono che, l'assonopatia trovata nel topo che esprime esclusivamente l'isoforma umana più lunga di tau umana (h40) è attribuibile ad un eccesso di tau legata ai microtubuli, che interferisce così con il fisiologico trasporto assonale: la fosforilazione di tau da parte di GSK-3 $\beta$  ne diminuisce l'affinità per i microtubuli, recuperando i deficit motori e il trasporto assonale. Diversamente, altri studi riportano l'iperfosforilazione di tau a siti AD-correlati e l'accumulo nel compartimento somato-dendritico in un topo transgenico condizionale che esprime la GSK-3 $\beta$ , sotto il controllo tetraciclina-inducibile del promotore CaM chinasi II, esclusivamente nella corteccia e nei neuroni ippocampali del giro dentato e della regione CA2. L'aumento nella fosforilazione di tau è indipendente dall'incremento dei livelli totali d' espressione della proteina, ed è associato ad una marcata diminuzione della frazione legata ai microtubuli, in assenza di aggregati insolubili (Lucas et al., 2001). Le discrepanze fra le due linee transgeniche murine possono essere spiegate sulla base (i) delle differenze nell' espressione del transgene, costitutiva o condizionale, (ii) nel promotore utilizzato, (iii) nel costrutto, selvatico o costitutivamente attivo, e (iv) nei diversi background genetici: in entrambi i modelli è riportata comunque una forte iperfosforilazione di tau, a dimostrazione che essa è substrato in vivo per GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  gioca inoltre anche un ruolo importante nella catabolismo e quindi nella degradazione di tau da parte del proteosoma: la fosforilazione di tau da parte di tale chinasi ne causa infatti il legame di Hsc70 e il reclutamento da parte della E3 ubiquitin-ligasi CHIP, con conseguente ubiquitinizzazione e degradazione (Shimura et al., 2004). Engel et al., infine (Engel et al., 2006) generano un modello murino doppio transgenico overesprimente, sotto il controllo di un promotore inducibile, sia la GSK-3 $\beta$  che la tau umana con triple mutazioni FTDP-17. Tali linee transgeniche mostrano un' iperfosforilazione patologica di tau nei neuroni ippocampali, accompagnata dalla formazione di grovigli neurofibrillari (NFTs). La cronica somministrazione del litio, pur bloccando la GSK3 $\beta$ , può parzialmente prevenire la progressione della tauopatia ma solo a stadi precoci, allorchè si manifestano i primi segni di degenerazione, supportando la possibilità che la sola inibizione di tale chinasi non è sufficiente di per sé a revertire gli aggregati NFT-simili.

Cdk5 è l'unico membro della famiglia Cdk (*cyclin-dependent-kinase*): tale protein chinasi necessita, per la sua attivazione, dell'interazione molecolare con le subunità p39 o p35 o meglio, con i loro prodotti proteolitici p29 o p25, che sono appunto proteine regolatorie rispettivamente generate nei neuroni post-mitotici per taglio da parte della calpaina. Alcuni epitopi presenti nei PHF sono fosforilati da cdk5 in vitro (Thr181, Ser202, Thr205, Thr212, Ser235, Thr 217, Ser396, Ser404) e in vivo, come risulta dalle analisi di spettrometria di massa e da alcuni esperimenti di transfezione neuronale di cdk5 con il suo potenziale attivatore p35/25 (Lund et al., 2001; Patrick et al., 1999; Dhavan et al., 2001). L'aumentata espressione di p25 in topi transgenici, risulta in un significativo incremento dell'attività di tale enzima in correlazione con l'iperfosforilazione di tau (Cruz et al., 2003; Noble et al., 2003). In particolare, Cruz et al. dimostrano che l'aumentata espressione di p25, nel cervello postnatale di topo, incrementa la fosforilazione di tau e la ripartizione nelle frazioni insolubili. Le aree cerebrali affette mostrano una significativa disfunzione e perdita neuronale, accanto ad un' evidente patologia neurofibrillare. Noble et al. riportano che, nei topi transgenici doppi mutanti p25xP301L, l'estensione della fosforilazione di tau ad alcuni epitopi e il numero dei neuroni positivi alla colorazione argentea per Gallyas sono maggiori di quelli osservati nei topi transgenici per la sola variante mutata P301L tau. Inoltre, in tali ceppi mutanti vi è un aumento

dell'attività di GSK-3 $\beta$  ed un' evidente colocalizzazione delle chinasi, cdk5 e GSK-3 $\beta$  attive, con gli aggregati di tau.

p25 è il frammento proteolitico C-terminale derivato dal taglio della calpaina, in accordo con la presenza di alti livelli di calpaina attiva nel cervello di casi AD. p25 differisce poi da p35 in due aspetti. Mentre p35 è N-miristoilato e pertanto membrana-associato, p25 è largamente citosolico e colocalizza con la tau iperfosforilata nei NFTs. Sulla base della diversa localizzazione cellulare è stato ipotizzato che cdk5/p25 fosforila tau meglio che cdk5/p35, dato che tau è una proteina che sorge largamente nel citosol. In accordo con tale ipotesi, i topi transgenici che esprimono alti livelli di p25 esibiscono aumenti significativi della fosforilazione di tau, diversamente dai topi tripli transgenici cdk5/p35/tau (Ahlijanian et al., 2000; van den Haute et al., 2001). Infine, entrambe le protein- chinasi, GSK-3 $\beta$  e cdk5, sono espresse ad alto livello nel cervello, ne è stata poi dimostrata l'interazione funzionale con tau in vivo ed infine entrambe sono associate a tutti gli stadi di patologia neurofibrillare in casi accertati di AD (Woodgett et al. 1990; Tsai et al., 1993; Lew et al., 1994; Pei et al., 1998).

La famiglia delle MAPK chinasi (*mitogen-activated-protein kinase*), che include ERK1, ERK2, p70S6 chinasi e le protein chinasi attivate da stress, JNK e p38 chinasi, sono note fosforilare tau ad alcuni siti presenti nell'AD ed inoltre l'attivazione di tali enzimi associa con la progressione della neurodegenerazione fibrillare (An et al., 2003; Pei et al., 2003; Drewes et al., 1992; Ledesma et al., 1993; Pei et al., 2001; Kins et al., 2003; Hensley et al., 1999; Zhu et al., 2000; Zhu et al., 2001). L'esposizione dei neuroni ippocampali al peptide A $\beta$ 1-42 fibrillare induce una sostenuta attivazione di ERK2 ed un aumento della fosforilazione di tau che è parzialmente inibita da PD98059, un selettivo inibitore di MEK1 (Perry et al., 1999). Analisi di FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) indicano poi una stretta associazione di MAPK con i fosfoepitopi di tau presenti nei PHF, Ser199/202 e Ser 396/404 (Knowles et al., 1999).

Oltre alle serin-treonin chinasi proline-dirette, tau è fosforilata in vitro da altre chinasi non prolina-dirette. Questa famiglia include la protein chinasi calcio-calmodulina-dipendente, la protein chinasi C (PKC), la casein chinasi I e II, la PKA (*AMPC-dependent-protein kinase*), CDC2-cyclin-A-chinasi, la tau tubulin-chinasi, la protein-chinasi DNA a doppia elica-dipendente, MARK (*microtubule-affinity regulating kinase*), PKB (*protein kinase B* o Akt) e Rho-chinasi (Kosik and Shimura, 2005).

La protein chinasi MARK (*microtubule-affinity -regulated- kinase*) fosforila motivi KXGS presenti in ciascuno dei domini ripetuti di legame ai microtubuli, è ubiquitariamente espressa ed, in particolare, fosforila tau ai residui di serina 262/356 (epitopo 12E8 non fosforilato da GSK-3 $\beta$ ): tale modificazione post-traduzionale di per sè è capace di causare il distacco di tau dai microtubuli, destabilizzandone il legame e aumentando così il dinamismo stesso dei microtubuli, necessario per la crescita dei neuriti e lo sviluppo della polarità neuronale (Drewes et al., 1997; Biernat et al., 2002). Recentemente è stato poi riportato che la serina-treonina chinasi PAR-1, l'omologo di *Drosophila* di MARK, fosforila tau in vivo nei moscerini, supportandone così il ruolo in vivo anche nei mammiferi (Nishimura et al., 2004).

Sia la PKA che la chinasi MARK fosforilano il residuo di tau Ser262, ma la PKA fosforila anche i siti Ser214, Ser217, Ser396/404 e Ser417. La fosforilazione in corrispondenza di tali siti da parte delle chinasi non prolina-dirette, sembra funzionare da innesco, aumentando marcatamente la fosforilazione successiva di tau da parte delle chinasi prolina-dirette, GSK 3- $\beta$  e cdk5 (Iqbal et al., 2005). Le subunità regolatorie e catalitiche della PKA e la proteina di ancoraggio AKAP97, sono associate con i PHF (Jicha et al., 1999). Il trattamento di fettine di cervello (Fleming et al., 1995) o di cellule in coltura (Litersky et al., 1996) con forskolin, noto attivatore delle adenilato ciclasi, e rolipram, un inibitore delle cAMP fosfodiesterasi, causa un pronunciato aumento della fosforilazione di tau in vivo. I residui Ser 214 e Ser 409 sono fosforilati in vitro esclusivamente dalla PKA e sono presenti nel cervello di casi avanzati di AD (Jicha et al., 1999). La fosfo-Ser 214 è parte dell'epitopo AT100, che è formato dalla sequenziale fosforilazione al sito AT8 (Ser199, Ser202, Thr205), Ser212 e in ultimo Ser214 (Zheng- Fishhofer et al., 1998). Comunque, se la

Ser214 è fosforilata per prima dalla PKA, la fosforilazione della Ser212 e dei sei siti AT8 è bloccata e l'epitopo AT100 non può essere generato (Zheng-Fishhofer et al., 1998).

La casein chinasi I è strettamente associata ai PHF purificati da cervelli di casi AD, e i relativi mRNAs per le tre diverse isoforme ( $-\alpha$ ,  $\delta$  ed  $\epsilon$ -) sono significativamente aumentati nella regione CA1 ippocampale. In particolare, l'isoforma  $\delta$  esibisce un aumento di circa 30 volte in tale area cerebrale, seguita poi dall'amigdala, dalla corteccia entorinale, dal cervelletto e dal nucleo caudato (Singh et al., 1996; Kuret et al., 1997).

In conclusione, risulta dunque evidente dai numerosi dati sperimentali qui riportati che, sia GSK3 $\beta$  che Cdk5, PKA e MARK, probabilmente modulano la fosforilazione di tau in vivo, direttamente o indirettamente.

Oltre all'essere fosforilata estensivamente su numerosi residui di Ser (S) e Thr (T), tau è fosforilata su residui di tirosina (Y). Che tale modificazione post-traduzionale sia importante nella patologia di tau, è evidenziato da numerosi dati sperimentali presenti in letteratura. L'aumentata tirosin-fosforilazione di tau è stata infatti riportata nelle cellule trattate con i peptidi neurotossici A $\beta$ 25-35 e A $\beta$ 1-42 (Williamson et al., 2002). Tale evento appare coincidere con l'aumentata attivazione della chinasi non-recettoriale FAK (*focal adhesion kinase*), attraverso la fosforilazione mediata dalla tirosin-chinasi Ick. Utilizzando alcuni anticorpi diretti contro i peptidi di tau tirosin-fosforilati al fine di marcare i lisati cellulari e gli estratti tissutali, è stato poi dimostrato che sia le cellule esposte al peptide A $\beta$  che le preparazioni detergenti-insolubili da cervelli AD contengono la tau patologicamente fosforilata al residuo Y29. Come detto, la tirosin-chinasi fyn lega tau (Lee et al., 2004) e probabilmente la fosforila al residuo Tyr18. Per determinare infatti se tau è substrato di fyn, Lee et al., cotrasfettano le cellule COS-7 con vettori codificanti per entrambe le proteine e saggiano successivamente in vitro per la fosforilazione di tau: saggi di tirosin-fosforilazione, seguiti poi dalla mutagenesi sito-diretta di tyr 18, identificano inequivocabilmente tale residuo aminoacidico come la sola tirosina della proteina tau umana fosforilata da fyn nelle cellule transfettate. Fyn inoltre, può fosforilare anche la GSK3 $\beta$ , aumentandone la sua attività chinasi e quindi può, indirettamente, promuovere anche la fosforilazione di tau: il legame di fyn a tau può dunque non soltanto indurre tirosin-fosforilazione diretta della stessa tau, ma anche facilitare la fosforilazione di tau da parte di GSK3 $\beta$  aumentando l'attività di tale chinasi (Lesort et al., 1999). Negli oligodendrociti la compartimentalizzazione di tau e la tubulina con fyn nei *lipid rafts*, noti microdomini della membrana plasmatica ricchi in colesterolo e sfingolipidi, è un passaggio importante nel processo di mielinizzazione (Klein et al., 2002). Dati sperimentali dimostrano infatti che, disorganizzando tali domini del plasmalemma attraverso l'inibizione della sintesi dei sfingolipidi per trattamento con fumonisina B1, la crescita dei processi è drammaticamente abolita. I trattamenti farmacologici che disturbano i lipid rafts, o l'inattivazione laser cromoforo-assistita dei gangliosidi, tutti agenti sui principali componenti biochimici, alterano la motilità del cono di crescita in colture neuronali (Nakai et al., 2002). Diversamente dalla fosforilazione su residui di serina e treonina, la tirosin-fosforilazione al residuo Y18 non impatta però sulla capacità di tau di legare i microtubuli e la quota di tau presente nei lipid rafts è fosforilata a tal sito (Lee et al., 2005). È stato proposto infatti che tale modificazione post-traduzionale giochi un ruolo importante nei processi di trasduzione del segnale, nella localizzazione di tau al plasmalemma, nell'assogeneri ma anche nella motilità e nelle funzioni del cono di crescita, tutti eventi dipendenti dalla sua localizzazione nei lipid rafts (Lee et al., 2005). Infine, la tirosin-fosforilazione di tau può anche rivestire un ruolo nei processi patogenetici, in quanto le preparazioni di PHF o NFT da casi di AD sono immunoreattive all'anticorpo diretto contro fosfo-Tyr18: in particolare i neuriti distrofici non sono immunocolorati con tale anticorpo, suggerendo dunque un differente ruolo per tale evento di fosforilazione, rispetto alla fosforilazione in Ser/Thr, nell'eziopatogenesi di tale malattia dementigena (Lee et al., 2004). Manipolando i livelli di APP/A $\beta$  e di fyn, è stato dimostrato che l'aumentata espressione di fyn esaspera i difetti sinaptici mostrati dai topi APP, mentre la deplezione di fyn li riduce. In aggiunta, l'aumentata espressione di fyn accelera la morte prematura dei topi APP, mentre la deplezione di fyn diminuisce la mortalità di tali topi transgenici (Chin et al.,

2004). L'osservazione che tau nei PFH è fosforilata al residuo tyr18 (Lee et al., 2004), e l'accumulo età-dipendente di tau nei lipid raft di topi transgenici Tg2576, un noto modello animale di AD (Kawarabayashi et al., 2004), supportano ulteriormente un ruolo dell'interazione fyn-tau nella sinaptotossicità mediata da APP/A $\beta$ .

In vitro, tau è rapidamente defosforilata da numerose protein-fosfatasi, quali PP1, PP2A, PP2B (calcineurina) e PP5.

Le serin/treonin protein-fosfatasi PP2A e PP1A sono le più abbondanti fosfatasi presenti nelle cellule di mammifero, entrambe defosforilano tau e la loro attività è significativamente diminuita di circa il 20-30% nel cervello di pazienti affetti da AD. In particolare, la PP1 è veicolata ai microtubuli da tau (Liao et al., 1998) e la PP5 defosforila tau, sia in vitro che in situ, dopo overespressione in PC12 (Gong et al., 2004). La PP2A è particolarmente abbondante nel cervello ed è associata in vivo con i microtubuli. A favore del ruolo di tali due protein-fosfatasi in vivo, Sun et al. (Sun et al., 2003) mostrano che l'inibizione sia di PP2A che di PP1A con caliculina A induce una marcata iperfosforilazione di tau ed una significativa alterazione della memoria spaziale nel ratto. Gong et al. (Gong et al., 2001), mostrano invece che, negli assoni di fettine organotipiche di ratto metabolicamente attive, l'inibizione della PP2A con acido okadaico causa un significativo aumento della fosforilazione di tau, ad alcuni dei siti che sono iperfosforilati nell'AD. L'attività intracellulare di questi enzimi è fisiologicamente regolata dagli inibitori endogeni. La PP-1 è controllata prevalentemente da (i) un inibitore di 18.7KDa termostabile detto inibitore-1 (I-1) e (ii) da una proteina, strutturalmente ad esso correlata, detta DARPP-32 (fosfoproteina regolata da dopamina e cAMP), di peso molecolare apparente di 32,000 dalton ed altamente espressa nel cervello. I-1 e DARPP-32 sono attivate dalla fosforilazione da parte della protein-chinasi A ed inattivate a livelli basali di calcio dalla PP-2A. Pertanto, l'inibizione dell'attività della PP-2A tiene in forma inattiva I-1 e DARPP-32, con risultante diminuzione dell'attività di PP-1. Nel cervello di pazienti AD, una diminuzione dell'attività della PP-2A potrebbe causare così un decremento dell'attività della PP-1, attraverso la modulazione positiva dei suoi inibitori I-1/DARPP-32. La PP-2A è invece inibita nei tessuti di mammifero da due proteine termostabili (i) I-1PP2A, una proteina citosolica di 30KDa e (ii) I-2PP2A una proteina nucleare di 39KDa, entrambe clonate da rene e cervello umano. Nel cervello di pazienti AD, è stata osservata poi un' alterata localizzazione cellulare, per traslocazione dal nucleo al citosol, della I-2PP2A. Il livello di I1-PP2A, che interagisce con il sito catalitico della PP-2A, è diminuito di circa il 20% nei cervelli di casi AD, rispetto a quelli di controllo di anziani di pari età non-dementi, un decremento che probabilmente è causa della riduzione dell'attività enzimatica della PP-2A, già riportata in tale malattia dementigena (Iqbal et al., 2005).

E' importante sottolineare che non tutti i circa 30 siti che sono iperfosforilati nell'AD convertono la proteina tau in una molecola tossica. La fosforilazione di tau ai residui Ser-262, Thr-231 e Ser-235 inibisce la sua capacità di legare i microtubuli di circa 35%, 25% e 10% rispettivamente. L'iperfosforilazione di tau al livello di 4-6 moli di fosfato/mole di proteina induce le proprietà tossiche di tau, che così acquisisce la capacità di sequestrare la normale tau. L'aggiuntiva fosforilazione a livelli di 10 moli di fosfato /mole di proteina è richiesta poi per indurne la reciproca aggregazione in filamenti. Le proteine tau con mutazioni FTDP-17 associate, G272V, P301L, V337M, R406W sono più rapidamente fosforilate, ed aggregano in filamenti a livelli di fosforilazione più bassi che la tau selvatica. Le cinetiche di fosforilazione a diversi siti di tali proteine, sia mutanti che selvatica, e l'abilità acquisita di legare la normale tau, suggeriscono che Ser199/202/205, Thr-212, Thr-231/Ser235, Ser-262/356 e Ser404 sono i siti che più criticamente sono coinvolti nella conversione di tau in una proteina dannosa. Infine, la fosforilazione ai siti Thr-231, Ser-396 e Ser-422 promuove l'aggregazione reciproca di tau in filamenti. Tali residui aminoacidici sono tutti substrati noti di PKA, CamKII, GSK-3 $\beta$  e cdk5. L'osservazione inoltre che le proteine tau con mutazioni sono iperfosforilate, in maggiore entità e più rapidamente, e polimerizzano in filamenti a più bassa stechiometria che la proteina selvatica parimenti trattata suggerisce che, in aggiunta ai livelli di attività di protein-chinasi e fosfatasi, la fosforilazione di tau

è regolata anche a livello del substrato (tau) (Iqbal et al., 2005). Diversamente dalla fosforilazione tardiva al residuo Ser422, i neuroni nello stadio “*pre-tangle*” nel cervello di casi AD sono fortemente colorati con anticorpi che riconoscono la fosfo-Ser262 e la fosfo-Thr 231 (Augustinack et al., 2002), indicando che l’iperfosforilazione a tali siti è un evento precoce nella patologia di tau in vivo. E’ stato ipotizzato infatti che un evento iniziale di fosforilazione, diminuendo l’affinità di tau per i microtubuli, aumenta il pool di tau libera o non legata, rendendola così disponibile a successive fosforilazioni che la fanno più fibrillogena. Comunque è da notare che, sebbene la fosforilazione ai residui Ser262 e Ser214 di tau ne diminuisce il legame al citoscheletro, tali modificazioni post-traduzionali inibiscono anche la polimerizzazione di tau in filamenti (Schneider et al., 1999). Così, non tutti gli eventi di fosforilazione che causano distacco di tau dai microtubuli contribuiscono allo sviluppo della patologia. Inoltre, il taglio di tau da parte delle caspasi (Gamblin et al., 2003; Rohn et al., 2002) può sinergizzare con l’anormale iperfosforilazione, in quanto i frammenti caspasi-derivati sono più fibrillogeni che la tau intera (Gamblin et al., 2003).

La prolyl-isomerasi-fosforilazione-dipendente Pin1 (PPIase) è una cis/trans isomerasi ubiquitaria che regola la conformazione dei siti di fosforilazione Pro-diretti in specifiche proteine cellulari, rappresentando un nuovo meccanismo di regolazione post-traduzionale. Recenti lavori riportano che tau è il principale substrato di Pin1 nei neuroni (Lu et al., 1999) e che tale isomerasi svolge un ruolo essenziale nel mantenimento delle normali funzioni cellulari, provvedendo inoltre una relativa protezione contro la neurodegenerazione età-dipendente (Liou et al., 2003). Tale enzima riconosce su tau specifici residui di serina e treonina fosforilati seguiti da prolina (Thr231-Pro), e ne catalizza una profonda modificazione conformazionale (cis/trans isomerizzazione), con conseguente recupero della funzione biologica della forma fosforilata, in termini di ripristino nell’abilità di legame ai microtubuli (Kosik and Shimura, 2005), e/o ne facilita la defosforilazione da parte della proteinfosfatasi PP2A, ad attività conformazione-dipendente (Zhou et al., 2000). L’espressione di Pin1 correla inversamente con la predetta vulnerabilità delle diverse popolazioni neuronali presenti nel cervello umano durante il fisiologico invecchiamento, ma anche con la neurodegenerazione neurofibrillare nei casi di pazienti AD. Comunque, la delezione del gene codificante per Pin1 nel topo causa una progressiva neuropatia età-dipendente associata a severi deficit motori e comportamentali, una significativa iperfosforilazione di tau con formazione di filamenti tau-positivi, ed un’ evidente degenerazione neuronale. E’ interessante notare che, diversamente dagli altri modelli di topi transgenici in cui l’aumentata espressione di specifiche proteine causa una patologia tau-associata, Pin1 è la prima proteina la cui deplezione funzionale causa la patologia di tau e una neurodegenerazione età-dipendente (Lim et al., 2005).

L’ anormale iperfosforilazione di tau nel cervello di pazienti affetti da morbo di Alzheimer, o da altre tauopatie, è, come detto, la conseguenza di un alterato bilancio intracellulare tra fosforilazione/defosforilazione (fig.23). Le proteine tau, estratte da biopsie ottenute dal focus epilettico di giovani adulti e da cervello fetale, sono iperfosforilate ad alcuni degli stessi siti di quelli modificati nei PHF-tau. Comunque, soltanto alcuni siti riportati modificati nei PHF-tau sono fosforilati nel cervello fetale o adulto, e il livello è meno del 5% che per la tau nell’ AD (Goedert et al., 1996). Numerose inoltre sono le prove sperimentali dimostranti che l’ iperfosforilazione patologica di tau è un evento precoce, poichè nei neuroni dei pazienti affetti da AD ne precede il suo accumulo. Innanzitutto l’osservazione che, nei neuroni da pazienti AD non solo quella presente negli aggregati insolubili o NFT, ma anche la forma solubile citosolica di tau è iperfosforilata (Grundke-Iqbal et al., 1986; Iqbal et al., 1986). Le analisi immunocitochimiche poi, mediante l’utilizzo dell’anticorpo fosforilazione-dipendente mAb Tau-1, hanno rivelato esclusivamente depositi della tau iperfosforilata, ma non della tau normale, nei neuroni ippocampali di anziani non dementi e di pazienti AD, in completa assenza di aggregati (Baner et al., 1989; Baner et al., 1991). La proteina tau presente negli aggregati insolubili intracellulari, o extracellulari (*ghosts*), a stadi di patologia più avanzata, è ubiquitinata, mentre la forma solubile iperfosforilata estratta dalla frazione citosolica dei cervelli AD non è reattiva per l’ubiquitina (Mori et al., 1987; Perry et al., 1987; Grundke-Iqbal et al., 1988). Infine Vincent et al. (Vincent et al., 1994), utilizzando anticorpi

monoclonali diretti contro fosfoepitopi, dimostrano inequivocabilmente che la fosforilazione di tau precede la presenza dei PHF nel cervello affetto di pazienti AD. E' probabile pertanto che, l'iperfosforilazione di tau sia attribuibile a profondi cambi conformazionali disordine-correlati, che la rendono così un miglior/peggior substrato per la fosforilazione/defosforilazione. Hernandez et al. (Hernandez et al., 2003), ipotizzano che se la fosforilazione è un evento precoce ed interessa regioni che sono successivamente mascherate nei PHF, tali siti non saranno accessibili alle fosfatasi dopo l'assemblaggio. Negli estratti AD, l'immunoreattività dell'anticorpo 12E8, che riconosce la fosfo-Ser262 localizzata nel primo dominio di ripetizione dei microtubuli, è significativamente aumentata: comunque tale anticorpo non reagisce con i PHF assemblati, il che suggerisce che la fosforilazione precede l'assemblaggio. D'altro canto, esistono forti evidenze che la fosforilazione promuove l'aggregazione (Alonso et al., 2001).

La degenerazione neurofibrillare del tipo Alzheimer è solo riportata raramente nell'invecchiamento animale e in condizioni sperimentali indotte. Nessuna delle mutazioni a carico del precursore della  $\beta$ -amiloide (APP), della presenilina (PS)-1 o 2 associate geneticamente a casi familiari di AD, mostrano una significativa patologia di tau, allorchè tali varianti umane mutate sono espresse ad alto livello nei topi transgenici (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996). D'altro canto, l'aumentata espressione di varianti umane mutate di tau associate alla FTDP-17 nei topi transgenici evoca una patologia neurofibrillare, con PHF anormalmente fosforilati (Gotz et al., 2001; Lewis et al., 2000; Tanemura et al., 2001). Un recente studio (Crohan et al., 2006) ha mostrato poi che, dopo iperfosforilazione, la tau murina aggrega in filamenti tanto rapidamente quanto la corrispondente di cervello umano, suggerendo che il sistema fosforilazione/defosforilazione è probabilmente più stabile e resistente ad alterazioni nelle specie evolutive di ordine più basso che non in quelle superiori, come nell'uomo. L' anormale iperfosforilazione rende poi tau più resistente alla proteolisi da parte delle proteasi calcio-attivate (Wang et al., 1995; Wang et al., 1996) e probabilmente ciò giustifica perché i livelli di tau sono significativamente aumentati nel cervello dei pazienti AD (Khatoon et al., 1992). Significativi aumenti dei livelli di tau nel cervello AD possono anche però risultare da un' attivazione della p70S6 chinasi, che promuove a sua volta la traduzione del messaggero di tau (An et al., 2003).

### Proteolisi

Sebbene, in vitro, tau è substrato di numerose proteasi come tripsina, chimotripsina, catepsina D, calpaine, caspasi, proteasi proteosomali, proteasi stimulate da DNA doppia elica e trombina (Chen and Johnson, 2007), quelle che effettivamente ne sono responsabili della proteolisi in vivo non sono ancora note.

Tau nel cervello di pazienti affetti da AD e da altre tauopatie è prevalentemente intatta, anche se, numerose analisi immunoistochimiche, hanno rivelato che negli grovigli neurofibrillari disordine-associati sono presenti forme tronche caspasi 3-derivate ai siti Glu391 e Asp421 (Novak et al., 1991; Gamblin et al., 2003). Ciò provvede una diretta evidenza sperimentale che tali cistein-proteasi aspartato-dirette sono attivate nei neuroni degeneranti dei pazienti affetti da tali malattie neurologiche. E' stato inoltre suggerito che il taglio di tau può giocare un ruolo patogenetico importante nella morte neuronale, e nel processo di aggregazione. Numerose evidenze sperimentali riportano infatti che la proteolisi caspasi-mediata al sito Asp421 è strettamente associata alla morte cellulare, in quanto l'espressione di tali varianti di delezione di tau nelle colture neuronali causa una marcata apoptosi (Fasulo et al., 1998; Fasulo et al., 2000; Rissman et al., 2004), mentre il taglio al residuo Glu391 è presente nel cervello dei pazienti AD, ma non in quello di anziani non dementi, costituendo in prevalenza il nucleo dei PHF (Ugolini et al., 1997; Novak et al., 1993). Di recente Ding et al. (Ding et al., 2006), riportano che la fosforilazione sito-specifica e il taglio caspasi-mediato di tau differentemente ne influenzano la capacità di legare i microtubuli, e di aggregare reciprocamente in filamenti. In particolare la fosforilazione, più che la troncazione, riduce l'affinità di tau per i microtubuli, ma non necessariamente innesca l'aggregazione nei PHF. Poichè, la mutazione di residui di serina e treonina ad acido glutammico o acido aspartico mima gli effetti

biochimici dell'aggiunta di un gruppo fosfato (Eidenmuller et al., 2000), gli autori osservano che tale modificazione, nota come pseudofosforilazione, ai siti Thr231/Ser235 distacca l'isoforma di tau 2N4R dai microtubuli, ma non ha alcun effetto nel promuoverne l'aggregazione. In contrasto, la pseudofosforilazione dei residui Ser396/Ser404 non altera l'abilità di legame di tau 2N4R, ma ne aumenta significativamente la formazione degli aggregati. Gli autori propongono pertanto un meccanismo alternativo di aggregazione di tau, dipendente dalla preventiva associazione della proteina ai microtubuli, che pertanto possono servire come centro di enucleazione, iniziandone l'aggregazione polimerica.

Comunque, i PHF SDS-solubili purificati da cervelli AD appaiono contenere solo molecole intere di tau, suggerendo che la troncatura avviene dopo la formazione dei polimeri. A tal proposito Gamblin et al. (Gamblin et al., 2003), riportano che una delezione interna all'estremità amino-terminale di tau (5-18 aa) impatta negativamente sulla formazione dei filamenti in vitro: tale mutazione previene l'acquisizione precoce dell'epitopo conformazionale Alz50, risultante dalla sovrapposizione tra l'estremità amino-terminale di tau e il primo dominio di legame ai microtubuli (R1), e quindi impatta negativamente sulla formazione e la maturazione degli aggregati. Poiché la degenerazione neurofibrillare sopraggiunge nell'AD dopo un lungo periodo di mesi o anni, non è sorprendente che certe forme tronche di tau siano presenti nelle lesioni, probabilmente in quanto esposte al taglio da parte delle diverse idrolasi cellulari, sia nei neuroni affetti che nei *ghost* extracellulari. Inoltre, sia le regioni amino- che quelle carbossi-terminali adiacenti ai domini ripetuti di legame ai microtubuli controllano fortemente il self-assemblaggio di tau nei filamenti polimerici: infatti, mentre il ripiegamento dell'estremità NH<sub>2</sub> promuove la formazione dei filamenti, l'estremità COOH esercita un potente effetto inibitorio. In particolare, la tau troncata al residuo Asp421 da parte della caspasi-3 assembla in vitro più rapidamente che la corrispondente forma intera selvatica (Gamblin et al., 2003; Binder et al., 2005). È stato proposto pertanto che, il taglio da parte della caspasi-3, a tale estremità terminale di tau, modula positivamente la nucleazione e l'elongazione delle protofibrille, o in alternativa stabilizza i filamenti dopo che essi si sono già formati (Binder et al., 2005). Infatti, un modello di ratto transgenico, esprime ad alto livello la variante umana di tau troncata, esibisce un elevato numero di aggregati insolubili neurofibrillari, tau-positivi ed iperfosforilati (Hrnkova et al., 2004). Poiché determinati eventi di troncatura dei NFT generano frammenti di tau che sono ancor più tossici della forma intera, qualora espressi in modelli cellulari, è lecito speculare che gli aggregati di per sé non sono tossici, fino a quando non sono modificati dal taglio da parte di specifiche proteasi. È probabile infatti che i NFTs si siano evoluti per sequestrare le forme solubili e tossiche di tau, al fine di prolungare la sopravvivenza neuronale (Binder et al., 2005).

Un'altra possibile famiglia di proteasi di tau in vivo è quella delle calpaine. Tali proteasi calcio-attivate sono anormalmente attivate nel cervello dei pazienti AD, rispetto ad individui sani di controllo di pari età (Saito et al., 1993). In aggiunta, la calpaina-2 attivata colocalizza con i filamenti di tau, sia nei cervelli dei pazienti AD che in quelli affetti da demenze fronto-temporali (Adamec et al., 2002). Recentemente, è stato riportato che il peptide A $\beta$  pre-aggregato induce la formazione del frammento di 17KDa di tau, sia in vitro, che in vivo nei neuroni ippocampali in cultura: l'inibizione del taglio della calpaina completamente ne previene la formazione, e parallelamente riduce la morte neuronale indotta dal peptide amiloide stesso (Park and Ferreira, 2005). In aggiunta, gli ormoni steroidei, testosterone ed estrogeni, prevengono rispettivamente il taglio di tau calpaina-mediato (frammento 17KDa) e caspasi-3-mediato (frammento 50KDa), proteggendo così i neuroni ippocampali dalla neurotossicità A $\beta$ -indotta. Tali dati supportano così l'utilizzo di terapie farmacologiche mirate a contrastare il declino degli ormoni sessuali, associato al normale invecchiamento, per il trattamento preventivo dell'AD (Park et al., 2007). Infine, è stato riportato che anche la trombina può tagliare la tau umana ricombinante a multipli siti di lisina ed arginina, ma il ruolo di tale proteasi in vivo rimane ancora da stabilire (Arai et al., 2005).

Per quanto riguarda l'evoluzione delle *tangles*, è importante sottolineare che il processo di fibrillogenesi di tau, e la relativa aggregazione, implicano una serie ordinata di modificazioni

conformazionali accompagnate da eventi di fosforilazione e tagli, sia all'estremità amino- che a quella carbossi-terminale. La conformazione Alz50, che implica uno stato di ripegamento dell'estremità N-terminale con il terzo dominio di legame ai microtubuli, è la prima ad apparire nei neuroni allo stadio "*pretangle*", e persiste anche più tardivamente nei neuroni contenenti i NFT. Successivamente, si verificano gli eventi di taglio ad entrambe le estremità della molecola. Molti NFT Alz50-positivi sono anche reattivi per Tau C3, un anticorpo che riconosce selettivamente la tau troncata al residuo Asp421. L'immunoreattività per TauC3 colocalizza anche con strutture Tau-66 positive, che riconoscono una conformazione di tau che richiede il taglio all' NH2 terminale. Dopo la transizione allo stato Tau66, tau è poi tagliata ancora più estensivamente nei NFT divenendo positiva per MN423, un anticorpo che reagisce con la proteina tau tagliata al residuo Glu391. Infine, l' alta incidenza di colocalizzazione di MN423 e Tau-66, solo a stadi avanzati di patologia, suggerisce che il taglio più estensivo al C-terminale è comunque un evento tardivo. Tuttavia, la presenza della proteina tau tagliata al C-terminale, in corrispondenza del residuo Asp421 nei neuroni "*pretangle*", suggerisce un ruolo patogenetico importante per il taglio delle caspasi nell'inizio della formazione dei polimeri (Binder et al., 2005).

La fosforilazione stessa di tau ne influenza poi la proteolisi, in quanto è stato riportato che i PHF-tau sono più resistenti alla degradazione da parte della calpaina che non la tau normale e fetale, indicando che tale modificazione post-traduzionale ne diminuisce la suscettibilità al relativo clivaggio (Yang et al., 1995; Mercken et al., 1995). D'altro canto, l'isoforma fetale di tau è più vulnerabile alla proteolisi da parte della catepsina D che la tau ricombinante non modificata, suggerendo che diversamente la fosforilazione ne aumenta la sensibilità alla catepsina D (Kenessey et al., 1997). La fosforilazione di tau da parte della PKA ne attenua la proteolisi calpaina-mediata, sia in vitro che in vivo (Litersky et al., 1992; Litersky et al., 1996). Infine, la fosforilazione di tau ricombinante da parte di protein-chinasi dipendenti da DNA a doppia elica ne accelera le degradazione trombina-mediata (Wang et al., 1996).

#### N-O-Glicosilazione e Acilazione

La N-glicosilazione di tau si ha nella forma iperfosforilata, mentre la forma non modificata può essere O-glicosilata. Lefebvre et al. (Lefebvre et al., 2003) hanno dimostrato un' importante relazione tra fosforilazione e O-glicosilazione delle proteine tau nel controllo della localizzazione nucleare: l'iperfosforilazione di tau, per inibizione delle fosfatasi cellulari, ne diminuisce l'incorporazione di O-GlcNAc e così il trasporto nel nucleo.

Come per altre fosfoproteine neuronali, tau è anche O-GlcNAcilata. La O-glcNAcilazione, che diversamente dalla N- e O-glicosilazione implica l'aggiunta di un singolo zucchero a residui aminoacidici di serin/treonina, modifica post-traduzionalmente sia proteine nucleari che citoplasmatiche, con una modalità dinamica analoga alla fosforilazione. La O-glcNAcilazione e la fosforilazione si regolano reciprocamente l'un con l'altra. Nell'AD, probabilmente a causa di un alterato trasporto intracellulare e/o metabolismo del glucosio, la O-glcNAcilazione di tau è significativamente ridotta e la diminuzione del metabolismo del glucosio nelle cellule in colture e nel topo, produce un'anormale iperfosforilazione di tale proteina (Liu et al., 2004).

#### Ubiquitinizzazione

In vitro, tau può essere ubiquitinata (Mori et al., 1987) o direttamente degradata dal proteosoma senza essere ubiquitinata (Layfield et al., 2003) e tale processamento è bidirezionale, in quanto procede sia dall'estremità N- che C-terminale (David et al., 2002). Comunque, è stato anche riportato che tau non è normalmente degradata dal proteosoma (Feuillette et al., 2005). Pertanto, non vi è alcun lavoro in letteratura che chiaramente dimostra che tau, in condizione fisiologiche di normalità, sia ubiquitinata.

L'inibizione del proteosoma ed un parallelo aumento dello stato di fosforilazione di tau, nelle colture di oligodendrociti di ratto, ne causa l'aggregazione (Goldbaum et al., 2003). Aggregati patologici di tau coniugati all'ubiquitina sono stati trovati sia nei corpi di inclusione caratteristici del morbo di Pick's, che nei PHF del morbo di Alzheimer, patologie tutte che implicano appunto anomalie a carico del citoscheletro (Morishima et al., 1993). E' stato inoltre riportato un aumento di diverse volte dei livelli di ubiquitina nella corteccia di pazienti AD, un incremento che correla fortemente con l'estensione della patologia neurofibrillare in tale area cerebrale. In contrasto, il cervelletto dei malati AD, che non esibisce una significativa patologia neurofibrillare, contiene dei livelli normali di ubiquitina (Wang et al., 1991). Tale modificazione post-traduzionale è comunque un evento tardivo nella progressione della patologia neurofibrillare AD, in quanto l'ubiquitinizzazione dei PHF avviene dopo la formazione dei NFTs (Baner et al., 1991; Morishima-Kawashima et al., 1993). Inoltre, molti dei PHF sono solo mono-ubiquitinati (Morishima-Kawashima et al., 1993), segnale non sufficiente di per sé ad iniziare la degradazione proteosoma-mediata (Gregori et al., 1990). E' da tempo noto che il processo energia-dipendente di eliminazione di proteine mal-aggregate, mediato da Hsc/Hsp70 e Hsp90 attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma (*USP unfolded protein response*), è severamente affetto nel cervello dei pazienti AD. L'attività del proteosoma è diminuita nei casi AD (Keller et al., 2000) e i PHF-tau estratti da pazienti colpiti da tale demenza, sono capaci di inibire in vitro direttamente l'attività del proteosoma stesso (Kech et al., 2003). Inoltre, numerose inclusioni ubiquitina-positivo sono presenti nelle cellule gliali e/o neuronali dei topi transgenici, esprimenti alti livelli dell' isoforma umana di tau con mutazione P301L associata alla FTDP-17 (Lin et al., 2003). Le specie aggregate di tau, isolate dai tessuti cerebrali dei pazienti AD mediante immunoprecipitazione con anticorpi conformazione-specifici, hanno rivelato che i residui di lisina, prossimi o mappanti all'interno della regione di legame ai microtubuli, sono poliubiquitinati (Cripps et al., 2006). Inoltre, le mutazioni in molti geni multiubiquitinanti sono geneticamente associate con i casi di AD ( De Vrij et al., 2001). Recentemente, è stato riportato che la proteina tau estratta dal cervello di pazienti AD è poliubiquitinata in vitro da UbcH5B, un enzima E2 ubiquitin-coniugante (Shimura et al., 2004): in particolare il complesso E3-ubiquitin- ligasi CHIP/Chaperone HSP70 selettivamente ubiquitina tau fosforilata ai siti substrato per le chinasi Cdk5 e GSK3- $\beta$ , in collaborazione con l'enzima E2 ubiquitin-coniugante UbcH5B. La proteina CHIP (*C terminus of the Hsc-70-interacting protein*) lega le chaperonine Hsc70, Hsp70 e Hsp90 inibendone l'attività, e poiché possiede un motivo U-box, coopera con gli enzimi E2 ubiquitin-coniugante e E3 ubiquitin-ligasi nella formazione di catene di multiubiquitine: tale proteina infatti ubiquitina altre proteine substrato delle chaperonine, come tau, le veicola al proteosoma e ne promuove la degradazione via USP (*unfolded protein response*). A tal proposito, Dickey et al. (Dickey et al., 2006) riportano che la delezione di CHIP in topi transgenici promuove l'accumulo di forme di tau iperfosforilate, ubiquitina-negative, solubili e non aggregate: ciò dimostra inequivocabilmente che la proteina CHIP è essenziale per la degradazione in vivo di specie di tau fosforilate, e che l'ubiquitinizzazione è coinvolta nell'aggregazione di tau. Tale ubiquitin-ligasi supporterebbe i neuroni nel rimuovere gli intermedi solubili ed iperfosforilati di tau, promuovendone la degradazione e/o l'aggregazione. Infine, in modelli di colture cellulari esprimenti GSK-3 $\beta$  e tau, l'entità della morte cellulare è significativamente ridotta dopo la co-espressione di CHIP, e tau ubiquitinata è più abbondante nelle cellule CHIP-coesprimenti, mentre tau fosforilata non-ubiquitinata è più abbondante in quelle CHIP-deficienti. Tali risultati suggeriscono dunque che l'accumulo di tau solubile fosforilata è di per sé tossico, mentre la tau insolubile ubiquitinata è molto meno tossica. La proteina CHIP così provvede ad ubiquitinare la tau fosforilata, non solo per promuoverne la degradazione proteosomale, ma anche per segregarla nella frazione insolubile, prevenendo così la morte cellulare (Petrucci et al., 2004).

### Glicazione

Le proteine tau isolate dai PHFs sono inoltre fortemente glicate, fino a formare prodotti terminali di glicazione avanzata: esse cioè sono modificate ai residui di lisina, mediante una reazione non enzimatica che implica la condensazione di un gruppo aldeidico o chetonico di uno zucchero con il gruppo  $\epsilon$ -aminico delle lisine. A supporto del ruolo patogenetico di tale modificazione post-traduzionale, è stato riportato che l'espressione di tau glicata in colture cellulari induce un' aumentata produzione di specie ossigeniche reattive (ROS *reactive oxygen species*), e quindi un marcato danno neuronale. Inoltre, tale modificazione post-traduzionale promuove anche l'aggregazione dei PHF in complessi di ordine superiore o NFT (*neurofibrillary tangles*) (Avila et al., 2004).

### Transglutaminazione

La transglutaminasi tissutale (TGase) è un enzima calcio-attivato che catalizza la formazione di legami tra i residui di glutammina e le amine primarie presenti nei residui di lisina peptide-legati, o in poliamine. Tale enzima modifica specifiche proteine-substrato in complessi ad alto peso molecolare, insolubili e proteasi-resistenti. La tau umana ricombinante trattata con transglutaminasi aggrega in strutture filamentose in vitro, e i PHF isolati dai NFT dei cervelli di casi AD sono sia tau- che TGase-positivi (Dudek et al., 1993; Miller et al., 1995; Norlund et al., 1999).

### Deaminazione e ossidazione

Sia la deaminazione di tau, in corrispondenza di residui di asparagina o glutammico, che la riduzione di uno o due cisteine, con formazione di dimeri attraverso ponti intermolecolari di legame S-S, sono descritti in letteratura e sembra che tali modificazioni giochino un ruolo nel processo di aggregazione in fibrille (Avila et al., 2004).

### Nitrazione

La nitrazione è una modificazione post-traduzionale caratteristica saliente di diverse tauopatie (Horiguchi et al., 2003 ). La nitrazione di tau sito-specifica ai siti Tyr18 e Tyr29, Tyr197 e Tyr394 (Reynolds et al., 2005) ha un effetto cumulativo nell'inibirne la polimerizzazione in vitro. Recentemente, Reynolds et al. (Reynolds et al., 2006) suggeriscono che la nitrazione al residuo N-terminale Tyr 29 è un importante evento biochimico disordine-correlato. Gli autori infatti generano un anticorpo monoclonale, che riconosce selettivamente la nitrazione di tau alla posizione Tyr29, e riportano che tale anticorpo rivela chiaramente i monomeri di tau e i PHF su cervello di pazienti severamente affetti da AD, mentre non marca le proteine tau nel cervello di individui sani, anziani ma non dementi.

### Sumoilazione

Recentemente è stato riportato (Dorval and Fraser, 2006) che tau, o meglio il pool solubile, in corrispondenza del residuo di Lys340 mappante nel quarto dominio ripetuto di legame ai microtubuli, è substrato all'attacco covalente da parte delle proteine SUMO (*small ubiquitin-like modifier*). Tau pertanto è degradata non solo dal proteosoma, attraverso un processo ubiquitina-dipendente (Shimura et al., 2004; Petrucelli et al., 2004; Babu et al., 2005) e non (David et al., 2002), ma anche attraverso il legame delle isoforme 1,2,3 delle proteine SUMO. In particolare, il trattamento con l'inibitore del proteosoma MG132 eleva i livelli endogeni di tau ubiquitinata, ma contestualmente ne diminuisce quelli della forma sumoilata, supportando l'ipotesi di una diretta

competizione fra le due diverse proteine, SUMO e l' ubiquitina, per il legame agli stessi residui bersaglio di lisina mappanti al C-terminale di tau (Dorval and Fraser, 2006). Pertanto, è possibile che la sumoilazione prevenga il turnover di tau, o attraverso l'inibizione del processo di ubiquitinizzazione o, in alternativa, alterandone la compartimentalizzazione cellulare e prevenendone così la traslocazione al proteosoma. L'inibizione della sumoilazione causata da alterazione del proteosoma, una caratteristica comune nell'invecchiamento e in numerosi disordini neurodegenerativi (Ciechanover and Brundin, 2003), spiegherebbe perché i NFT, presenti nel cervello dei pazienti AD, non cross-reagiscono con gli anticorpi diretti contro SUMO (Poutney et al., 2003).

### Aggregazione

La normale proteina tau, dopo condizioni standard di fissazione dei tessuti, è immunoistochimicamente negativa, mentre è vero il contrario per la forma aggregata. Come detto, nel cervello dei pazienti affetti da AD o da altre tauopatie, la proteina tau aggrega in filamenti di calibro variabile, tra 2.1 nm (protofilamenti) fino a 15nm. In tutti questi disordini neurodegenerativi umani, come anche nei modelli animali in condizioni sperimentali indotte, gli aggregati di tau sono sempre anormalmente iperfosforilati, indicando dunque che alcuni eventi specifici di fosforilazione ne possono significativamente aumentare la tendenza a fibrillare. Le proteine tau anormalmente iperfosforilate isolate dai cervelli AD, nei sistemi acellulari e in appropriate condizioni sperimentali, polimerizzano infatti in aggregati analoghi a quelli rinvenuti nelle lesioni neurodegenerative, in assenza di alcun cofattore. Tale aggregazione richiede l'iperfosforilazione, in quanto la defosforilazione la inibisce. Inoltre, diversamente dalla defosforilazione, la de-glicosilazione di AD-tau non ne inibisce la capacità ad aggregare nei PHF. Pertanto, tali dati dimostrano inequivocabilmente che l' iperfosforilazione anormale è sufficiente di per sé a causare il reciproco assemblaggio e l' aggregazione di tau nei filamenti, e che tale modificazione post-traduzionale può essere il meccanismo molecolare principalmente responsabile della formazione di tali lesioni patologiche, nell' AD e in altre tauopatie (Iqbal et al., 2005).

Tau inoltre è noto essere una proteina inusuale, in quanto mostra dei lunghi tratti aminoacidici, carichi sia positivamente che negativamente, e tale compresenza appunto di due regioni a differente polarità non è compatibile con l'associazione idrofobica intermolecolare. In particolare, i domini ripetuti R2 e R3 di tau esibiscono delle strutture  $\beta$  e possono aggregare reciprocamente in filamenti, in vitro e in presenza di eparina. D'altro canto, le regioni cariche positivamente localizzate all'estremità restanti della molecola (estremità amino-terminale e carbossi-terminale) esercitano un potente effetto inibitorio sulla polimerizzazione, per aggregazione reciproca. Pertanto, per quanto riguarda l'aggregazione fosforilazione-indotta della tau selvatica e della variante mutata associata alla FTDP-17, è stato proposto che le proteine tau 3R si assemblano reciprocamente attraverso il dominio ripetuto di legame ai microtubuli R3, mentre le proteine tau 4R invece si aggregano attraverso i domini R2 e R3, formanti strutture  $\beta$  a foglietto ripiegato: tale interazione intermolecolare idrofobica necessita della neutralizzazione preventiva di carica da parte delle regioni inibitorie, basiche e fiancheggianti tali domini ripetuti. Nel cervello AD e in altre tauopatie, tali estremità inibitorie sono neutralizzate dall'iperfosforilazione, promuovendo così delle profonde modificazioni conformazionali che favoriscono l'interazione tau-tau. Infine, quattro delle mutazioni missense, G272V, P301L, V337M e R406W, che co-segregano con la FTDP-17 rendono tau un più favorevole substrato per la fosforilazione in vitro da parte delle protein-chinasi neuronali, che non la forma selvatica 4R, che a sua volta è più rapidamente fosforilata che non la 3R. Pertanto, ciò suggerisce che le proteine tau mutate sono fosforilate ad un tasso più elevato, acquisendo più rapidamente una conformazione prona ad aggregare, a più bassi livelli di fosfato incorporato. Tale cinetica di una più rapida iperfosforilazione delle varianti di tau mutate può spiegare il precoce esordio, la severità e la dominanza autosomica di tale disordine in casi ereditari di FTDP-17 (Iqbal et al., 2005; Alonso et al., 2004).

Per quanto riguarda il processo di fibrillazione di tau, è convenzione suddividere tale evento patologico in più stadi sequenziali. Nel primo stadio, la fisiologica funzione di legame ai microtubuli è abrogata, cosicché la proteina tau si accumula intracellularmente in una forma assemblaggio-competente, suggerendo che l'aggregazione può essere un evento concentrazione-dipendente. Successivamente, le molecole tau devono reciprocamente associarsi, attraverso le rispettive regioni di legame ai microtubuli, formando dei filamenti arricchiti in strutture  $\beta$  a foglietto ripiegato. Allorché infatti è raggiunta la concentrazione critica, i monomeri di tau non ripiegati, privi cioè di alcuna struttura secondaria, oligomerizzano transitando, attraverso profondi e lenti cambi conformazionali, in strutture a foglietto- $\beta$ . La struttura secondaria più precocemente rivelabile con i coloranti fluorescenti corrisponde agli aggregati di tau associati a strutture di membrana, evidenziando che il ripiegamento patologico di tau può essere facilitato dall'interazione con i componenti delle membrane intracellulari. Il terzo stadio coinvolge la nucleazione dei filamenti tau, e la formazione di strutture NFT più mature: i filamenti gradualmente rimpiazzano i depositi amorfi, e dominano l'intera immunomarcatura per tau nelle cellule. Infine, lo stadio ultimo prevede la completa perdita della vitalità cellulare e la formazione dei "ghost tangles", che appaiono così come aggregati fibrillari, extra-cellulari e capaci ancora di legare molecole di fluoroforo, come la thioflavina S e il rosso Congo. Tali dati pertanto sono tutti a favore di un processo ordinato di aggregazione che implica la sequenziale transizione da uno stadio precoce di aggregazione amorfa, evento modulato sia dalla fosforilazione che da mutazioni geniche, seguito poi da uno più tardivo di fibrillazione (Chun and Johnson, 2007).

#### **-Meccanismi di degenerazione neurofibrillare nell' AD e in altre tauopatie:**

-Modello di perdita di funzione: disfunzione di tau come MAP, e quindi inabilità nel regolare l'instabilità dinamica dei microtubuli.

-Modello di acquisizione di nuove funzioni: diretta citotossicità della proteina alterata.

-Potenziale ruolo dell'aggregazione di tau: saggi *cell-free*, modelli in vitro di colture cellulari neuronali e non, modelli animali in vivo.

L'analisi genetica ha dimostrato inequivocabilmente una diretta relazione causale tra disfunzione/misregolazione della proteina tau e morte neuronale: come detto, le mutazioni a carico del gene tau inducono numerosi disordini neurodegenerativi dementigeni, detti tauopatie, mostrandoci caratteristiche cliniche e patologiche simili, quali una massiva perdita neuronale ed un largo accumulo di aggregati insolubili neurofibrillari. Nonostante tali dati evidenzino una chiara relazione causa-effetto tra errori nel gene tau e morte neuronale e quindi demenza, le basi molecolari che sottendono al processo patologico non sono ancora note. Per elucidare il meccanismo della neurodegenerazione tau-indotta, sono stati effettuati numerosi studi su diversi sistemi modello (acellulari, cellulari o in vitro, e animali o in vivo), ognuno dei quali offre sia vantaggi che svantaggi. I sistemi più semplici sono generalmente quelli che permettono una più larga accessibilità, sia per la facilità di manipolazione che per l'estrema flessibilità, ed inoltre rappresentano il primo strumento per identificare, in vivo, le caratteristiche della funzione di tau rilevanti per l'eziologia delle tauopatie umane, al fine poi di testarle sull'animale intero, generalmente un modello transgenico murino. I sistemi animali (lampreda, moscerino, nematode, pesce rosso, topo) consentono invece un approccio sperimentale più complesso, ma anche più completo e di maggior rilevanza.

Un modello interpretativo della patologia di tau recentemente proposto suggerisce che cause genetiche e/o ambientali inducono, direttamente od indirettamente, un'alterazione dell'abilità intrinseca della proteina tau nel legare e stabilizzare i microtubuli citoscheletrici, causandone di conseguenza l'accumulo intracellulare e la formazione di aggregati di per sé neurotossici.

Un modello alternativo, indicato "effetto-dosaggio", propone invece che l'attività della proteina tau non sia regolata da un meccanismo del tipo "tutto-nulla", ma oscilli in un intervallo graduato che

deve essere strettamente controllato nei neuroni da meccanismi omeostatici, al fine così di garantirne la sopravvivenza. Mutazioni genetiche e/o cause esogene di tipo ambientale, che spostano tutte l'attività di tau al di sopra o al di sotto di tale intervallo biologico, causano pertanto la disfunzione della proteina tau, e quindi l'inabilità nel regolare l'instabilità dinamica dei microtubuli citoscheletrici e, in ultimo, la morte neuronale. E' da notare che tale interpretazione sull'eziopatogenesi delle tauopatie, implica che gli aggregati neurofibrillari siano una mera conseguenza, e non una causa di morte neuronale.

Infine un terzo modello, che unifica i precedenti, prevede che alterazioni endogene di tipo genetico e /o sollecitazioni esterne di tipo ambientale inducono tutte un' interazione anomala tra la proteina tau e i microtubuli, provocando la successiva formazione degli aggregati insolubili intracellulari. L'effetto patologico netto è la deplezione funzionale di tau: tale grovigli neurofibrillari esercitano dunque un effetto neurotossico non di tipo diretto, ma indiretto, sequestrando la proteina tau fisiologica, e così riducendone significativamente i livelli intracellulari indispensabili per la vitalità neuronale. In termini genetici il primo modello (citotossicità diretta degli aggregati) è detto di acquisto di una nuova funzione o *gain-of-function*, mentre il secondo e il terzo (incapacità di mantenere l'attività biologica di tau entro l' intervallo fisiologico) sono detti modelli di perdita di funzione/aplo-insufficienza o *loss-of-function/haplo-insufficiency* (Fig.24). Nelle pagine successive sono pertanto riportati, a convalida o meno dell'uno o dell'altro modello interpretativo della neurotossicità tau-medata, i dati sperimentali ottenuti in sistemi acellulari, in vitro e in vivo.

#### -Modello di perdita di funzione: disfunzione di tau come MAP e quindi inabilità della proteina di regolare l'instabilità dinamica dei microtubuli.

(i) Nei sistemi acellulari, sia la proteina tau purificata da lisati cerebrali che quella ricombinante, legano i microtubuli e promuovono, de novo, la nucleazione e l'elongazione (Lee et al., 1989; Murphy et al., 1977; Butner et al., 1991; Brandt et al., 1993 a). La concentrazione di tubulina, e il rapporto tau/tubulina necessarie, variano nell'intervallo delle rispettive concentrazioni fisiologiche richieste in vivo durante il neurosviluppo: ciò conferma pertanto che tau è un potente agente di polimerizzazione della tubulina, contribuendo all'assemblaggio e alla stabilizzazione dei microtubuli durante il processo di crescita assonale (Brandt et al., 1993 b). Sia le isoforme 3R che quelle 4R, promuovono entrambe l'assemblaggio dei microtubuli, ma l'isoforma più lunga 4R stabilizza i microtubuli più efficientemente che quella 3R (Panda et al., 2003). Ciò suggerisce che (a) la modulazione dell'espressione genica delle diverse isoforme durante lo sviluppo favorisce la formazione di microtubuli più rigidi, cioè meno dinamici ma più stabili, di quelli presenti nei neuroni adulti (b) le mutazioni introniche associate a casi di FTDP-17, che incrementano il rapporto delle isoforme 4R/3R, causano tutte un'aumentata stabilità dei microtubuli. Le mutazioni missense (G272V, P301L, P301S, V337M, R406W) e la mutazione per delezione delta K280, associate a casi di FTDP-17, analizzate nei sistemi acellulari esibiscono una diminuita capacità di legame ai microtubuli, ed inducono un ridotto assemblaggio della tubulina (Hong et al., 1998; Hasegawa et al., 1998). In particolare, tali mutazioni influenzano sia l'affinità di tau per i microtubuli (Kd), che la capacità di legame ( $\beta_{max}$ ) (Hong et al., 1998).

L'attività di tau nel promuovere l'assemblaggio dei microtubuli è, come detto, fortemente sensibile al suo stato di fosforilazione. In vitro, tau può essere fosforilata da numerose protein-chinasi e tale modificazione post-traduzionale riduce l'interazione di tau con i microtubuli. E' interessante osservare che, la fosforilazione dei siti all'interno della regione aminoacidica ricca in proline riduce drasticamente la capacità di tau di promuovere, de novo, la nucleazione dei microtubuli, ma non ha un significativo effetto invece sulla sua capacità di legame ai microtubuli e di promuoverne l'allungamento (Brandt et al., 1994; Leger et al., 1997). Ciò suggerisce che il ruolo di tau nell'assemblaggio è modulato dallo stato di fosforilazione di specifici residui, mappanti in definite regioni della proteina, le quali provvedono nei neuroni, sia spazialmente che temporalmente, a regolarne l'assemblaggio dei microtubuli. In particolare, un elevato numero di tali siti, che è

iperfosforilato nelle preparazioni della proteina tau isolate dai pazienti affetti da AD, mappa all'interno della regione ricca in proline (Morishima- Kawashima et al., 1995).

La proteina tau solubile, isolata dai cervelli di pazienti AD, induce la polimerizzazione della tubulina, ma ad un tasso inferiore, e promuove l'assemblaggio dei microtubuli ad un più basso "steady state", se comparata a quella isolata da cervelli di controllo (Lu et al., 1993). Diversamente, la PHF-tau è pressoché inabile all'assemblaggio (Yoshida et al., 1993): la competenza può essere recuperata solo dopo trattamento con fosfatasi, ad indicare che la capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli è reversibilmente soppressa dalla fosforilazione, durante il decorso clinico dell'AD (Alonso et al., 1994; Iqbal et al., 1994; Garver et al., 1996; Wang et al., 1996). L'effetto della fosforilazione su tau, in termini di riduzione della sua capacità microtubuli-polimerizzante, può essere ulteriormente potenziato dalla capacità della AD-tau patologica di sottrarre la proteina tau normale dalle reazioni biochimiche di assemblaggio, poiché l'aggiunta ad AD-tau di una miscela di tubulina e tau normale inibisce significativamente l'assemblaggio dei microtubuli (Alonso et al., 1994; Alonso et al., 1996). Inoltre, la proteina tau anormalmente fosforilata lega e depleta in soluzione anche MAP1 e MAP2, inibendo così ulteriormente l'assemblaggio dei microtubuli, che è mediato anche da tali MAPs a più alto peso molecolare. Ciò indica dunque che la proteina tau, anormalmente fosforilata, può prevenire anche la potenziale capacità compensatoria di altre MAPs, che sono contestualmente presenti nei neuroni (Alonso et al., 1997).

La mutagenesi sito-diretta, che mima eventi di fosforilazione disordine-associati ed incorpora cariche negative in posizioni selezionate della proteina, causa la completa perdita dell'attività di nucleazione dei microtubuli da parte della tau mutata, mentre ne preserva la capacità di legame ai microtubuli e di promuovere l'allungamento di quelli già preesistenti (Eidenmuller et al., 2000). In particolare, la proteina tau patologicamente modificata è pressoché completamente spiazzata dai microtubuli dalla proteina selvatica, se addizionata in concentrazioni equimolari. Ciò indica che, le modificazioni a carico di tau possono indurre cambi nei parametri cinetici di interazione di tau con i microtubuli, anche nei casi in cui la totale affinità di tau per la superficie dei microtubuli rimane non alterata (Eidenmuller et al., 2000).

(ii) Gli esperimenti eseguiti su modelli di colture cellulari, e finalizzati a comprendere il ruolo di tau durante lo sviluppo, hanno invece dato risultati molto contrastanti.

La soppressione dell'espressione della proteina tau, in colture primarie di granuli del cervelletto mediante trattamento con oligonucleotidi antisense, inibisce drasticamente lo sviluppo della polarità neuronale (Caceres et al., 1990). In contrasto, l'inattivazione funzionale acuta di tau, nelle colture di neuroni simpatici per microiniezione di specifici anticorpi bloccanti (immunodeplezione), non sortisce alcun effetto sull'assogènesi (Tint et al., 1998). Anche le colture di neuroni primari, espianati da topi knockout per tau, mostrano dati non univoci. Mentre in nessuna linea cellulare è riportato un cambio evidente nello sviluppo dei processi assonali (Harada et al., 1994), un significativo ritardo nell'estensione neuronale è invece osservata in altre linee (Dawson et al., 2001). Infine, incrociando topi knockout tau-deficienti con topi transgenici per tau, vi è un recupero funzionale della normale crescita assonale, indicando un ruolo diretto di tau nella regolazione dell'estensione neuritica (Dawson et al., 2001).

In accordo con i dati sui sistemi acellulari (*cell-free*), la transfezione di tau in varie linee neuronali e non, risulta in un' aumentata polimerizzazione della tubulina e in una relativa stabilizzazione dei microtubuli (Kanai et al., 1989; Lee et al., 1982; Takemura et al., 1992; Esmali-Azad et al., 1994). L'espressione della tau esogena induce inoltre la tipica formazione di "bundles" di microtubuli: ciò è noto essere una conseguenza dell'aumentata rigidità del citoscheletro stesso, in quanto essi ben correlano con l'estensione della tubulina acetilata, un modificazione post-traduzionale di tau utilizzata come marcatore di una popolazione di microtubuli stabili. In presenza dell'isoforma lunga 4R di tau, vi è un più evidente aumento della stabilizzazione dei microtubuli e della formazione dei

“*bundles*” (Lee et al., 1982), e l’isoforma 4R spiazza l’isoforma 3R dal citoscheletro (Lu et al., 2001).

Per quanto riguarda l’espressione delle varianti di tau recanti le mutazioni associate alla FTDP-17, la mutazione V337M disturba l’organizzazione dei microtubuli, nelle cellule non-neuronali di mammifero (Arawaka et al., 1999) e nelle cellule di insetto (Frappier et al., 1999), ma non sortisce analogo effetto, come riportato da altri studi successivi (De Ture et al., 2000). La variante mutata di tau R406W è fosforilata ad una più bassa estensione rispetto alla controparte selvatica, solo in alcuni tipi cellulari (Volgelsberg et al., 2000; De Ture et al., 2002) ma non in altri (Krishnamurthy et al., 2004). Alcune proteine mutanti poi intracellularmente si aggregano (De Ture et al., 2002; Krishnamurthy et al., 2004).

Allorché transfettata in cellule neuronali, la proteina tau induce una più rapida estensione neuritica (Esmaeli-Azad et al., 1994), mentre direttamente guida il processo di crescita neuritica, sia nelle cellule non-neuronali che nelle cellule neuronali non-differenziate, se il cortex di actina è stato precedentemente rilassato per esposizione al farmaco citocalasina (Edson et al., 1993; Leger et al., 1994). La transfezione dei costrutti codificanti per l’ isoforma più lunga della tau umana, tramite baculovirus, nella linea cellulare insetto-derivata SF9 induce la formazione di sottili processi con un calibro uniforme (Knops et al., 1991). Dopo la transfezione della linea cellulare SF9, che essendo priva della tau endogena e di filamenti intermedi è quindi ideale per esaminare le proprietà della forma umana esogena, la maggior parte dei microtubuli esibisce un orientamento uniforme plus-end-distale analogo a quello assonale, suggerendo che la proteina tau ha anche la capacità intrinseca di organizzare i microtubuli assonali (Frappier et al., 1999). Nella linea SF9 tau-transfettata i microtubuli sono stabili contro trattamento con droghe disassemblanti il citoscheletro. Nei neuroni infatti, la crescita neuritica è una forma specializzata di motilità cellulare: gli assoni in estensione sono strutture dinamiche, e i relativi microtubuli esibiscono una stabilità differente lungo tali processi. In particolare, l’estremità distale dell’assone è più sensibile alle droghe depolimerizzanti i microtubuli, e il turnover della tubulina è qui più alto che nella regione prossimale. Assumendo un ruolo funzionale di tau come proteina stabilizzatrice dei microtubuli, ne è stato pertanto ipotizzato un più forte legame a tali strutture citoscheletriche nella regione stabile, seguita poi da quella prossimale, e meno nell’estremità distale, che è la più dinamica. Nelle colture di neuroni simpatici di ratto, Black et al. (Black et al., 1996) riportano invece l’esatto contrario: la proteina tau è più fortemente associata ai microtubuli dell’estremità distale dell’assone, in prossimità del cono di crescita. Anche nelle colture primarie neuronali di ippocampo, tau è distribuita secondo un gradiente di concentrazione prossimo-distale, con la più alta percentuale al punto di transizione tra il processo neuronale e il cono di crescita (Kempf et al., 1996). Tuttavia, in tale sistema il legame di tau ai microtubuli distali non li stabilizza contro il disassemblaggio indotto da farmaci, in quanto il citoscheletro è più labile e dinamico, nonostante la concentrazione di tau più alta ai siti assonali più distali (Kempf et al., 1996; Black et al., 1996). Ciò indica pertanto che tau nell’assogènesi svolge funzioni aggiuntive al controllo del dinamismo dei microtubuli, in accordo con l’assenza di differenze nella stabilità dei microtubuli assonali, quanto osservato appunto da Tint et al. mediante esperimenti di immunodeplezione funzionale di tau nei neuroni simpatici in coltura. Nei neuroni ippocampali in coltura e in una linea neuronale umana a morfologia polarizzata (NT2N), le fosfoisoforme di tau sono differentemente distribuite lungo l’assone nascente, e lo stato di fosforilazione di tau ne influenza alcuni importanti parametri funzionali, quali ad esempio l’abilità di legame ai microtubuli (Mandell et al., 1996; Maas et al., 2000). In particolare, nei neuroni fetali di ippocampo, la proteina tau è localizzata in prossimità del cono di crescita ed è prevalentemente defosforilata ad un particolare sito, sensibile all’anticorpo Tau-1 (Ser 199/202), diversamente da quella presente nel compartimento somato-dendritico. E’ riportato infatti un evidente gradiente di fosforilazione, con un progressivo cambio dalla forma fosforilata a quella defosforilata procedendo dal soma, lungo l’assone, fino poi al cono di crescita terminale. Tali studi suggeriscono ancora che, il ruolo della proteina tau nella crescita assonale è indipendente dalla sua capacità di legare i microtubuli, in quanto richiede forme fosforilate con scarsa affinità di legame per tali strutture

citoscheletriche. In particolare, nella linea SF9 sono stati riportati come effetti biologici diversi, struttura primaria-specifici, siano indotti dalla fosforilazione a carico di tau: se tale modificazione cade infatti all'interno del dominio di legame ai microtubuli, essa inibisce drasticamente la formazione dei processi, mentre se interessa altre regioni della proteina evoca appunto effetti completamente opposti (Biernat et al., 1999). La cotrasfezione di tau con la protein-chinasi GSK-3 $\beta$ , nelle cellule non-neuronali, aumenta lo stato di fosforilazione di tau, ne riduce parallelamente l'affinità per i microtubuli, e contestualmente diminuisce la stabilità del citoscheletro, rispetto a cellule di controllo transfettate con il solo costrutto codificante per tau (Wagner et al., 1996). Analogamente, l'inibizione delle serin/treonin fosfatasi nella linea neuronale umana NT2N induce un' evidente iperfosforilazione di tau, una marcata diminuzione del legame ai microtubuli e una selettiva depolimerizzazione di quelli rigidi, più stabili (Merrick et al., 1997). In particolare, come detto, la protein-fosfatasi 2A (PP2A) gioca un ruolo importante nel controllare lo stato di fosforilazione di tau, e quindi la sua attività biologica, poiché essa lega sia i microtubuli che tau in vitro (Sontag et al., 1999), associa con essi nella linea neuronale NT2N, ed influenza profondamente l'abilità di tau nell'indurre la stabilizzazione del citoscheletro (Sontag et al., 1996). Infine, l'espressione di un costrutto di tau che mima l' iperfosforilazione patologica AD-associata, ed esibisce una completa perdita dell'attività di nucleazione ed elongazione dei microtubuli nei sistemi acellulari, è di per sé difettivo nel promuovere in vitro la stabilizzazione del citoscheletro nelle cellule neuronali, sebbene colocalizzi per l'intera lunghezza con i microtubuli (Fath et al., 2002). Ciò dunque suggerisce che la perdita di funzione biologica della tau iperfosforilata può contribuire alla progressione del disordine.

Gli oociti di *Xenopus* sono stati utilizzati a lungo come saggio in vivo, per saggiare gli effetti della proteina tau umana, selvatica o con mutazioni FTDP-17-associate. A tal proposito, gli autori Delobel et al. (Delobel et al., 2002) riportano che sia l'isoforma più lunga della tau umana, che le mutazioni R406W e S305N inibiscono tutte la maturazione degli oociti con una modalità dosaggio genico-dipendente, probabilmente in quanto causano l' instabilità dei microtubuli. In contrasto, le mutazioni P301L, deltaK280, G272V, P301S, V337M, le isoforme selvatiche a tre ripetizioni, e l'isoforma a tre ripetizioni con mutazione R406W non mostrano alcun effetto sulla maturazione degli oociti, apparentemente perché non legano i microtubuli così efficientemente come l'isoforma con quattro ripetizioni, selvatica o mutante .

Tau inoltre svolge un ruolo importante nel trasporto assonale, che garantisce costantemente la spedizione e l'approvvigionamento dei componenti cellulari indispensabili per la sopravvivenza neuronale, quali mitocondri e vescicole sinaptiche, alle porzioni più distali dell'assone. Pertanto, l'aumentata espressione di tau in alcuni modelli cellulari, altera la distribuzione subcellulare degli organelli perturbando preferenzialmente il trasporto assonale anterogrado, cioè diretto verso l'estremità plus (Ebner et al., 1998; Trinczek et al., 1999; Stamer et al., 2002). Come ciò sia correlato ai processi patologici causati da una ridotta affinità di tau per i microtubuli, resta ancora da chiarire.

(iii) Per quanto riguarda invece i modelli animali, l'espressione sito-diretta della proteina tau umana nei neuroni sensoriali di *Drosophila* causa un anormale *bundling* e un marcato rigonfiamento assonale, accompagnato ad un' evidente perdita neuronale (Williams et al., 2000). L'espressione dell'isoforma selvatica umana di tau e della variante mutata associata alla FTDP-17, sotto il controllo di un promotore pan-neuronale, induce una progressiva neurodegenerazione, che è più severa per la variante alterata (Wittmann et al., 2001). E' interessante notare poi che non vi è alcuna formazione di aggregati insolubili, indicando un effetto neurotossico diretto sostenuta dagli alti livelli di tau. La neurodegenerazione è inoltre esacerbata nelle mosche coesprimenti, sia la tau selvatica, che l'omologo di dittero della protein-chinasi GSK-3 $\beta$ : ciò suggerisce pertanto che le protein chinasi e fosfatasi influenzano la neurodegenerazione tau-indotta, controllandone intracellularmente lo stato funzionale (Jackson et al., 2002). L'osservazione che alcune chinasi esasperano la neurodegenerazione nel dittero è contraria a ciò che ci si sarebbe aspettato per un

effetto microtubuli-correlato, in quanto, in molte colture cellulari, l'aumento della fosforilazione di tau ne riduce drasticamente il legame al citoscheletro. Comunque non è chiaro, se e come, la fosforilazione in *Drosophila* influenzi alcuni importanti parametri del dinamismo dei microtubuli, e se tale modificazione post-traduzionale sia rilevante nella biologia di tau.

In un modello alternativo di semplice invertebrato, il nematode *C.elegans*, l'espressione pan-neuronale della tau umana causa una progressiva scoordinazione motoria, tipica dei difetti del sistema nervoso, in particolare dell'anello nervoso circumfaringeo. Con l'avanzare del ciclo vitale del verme, sono poi evidenti un accumulo della forma insolubile di tau, ed una conseguente neurodegenerazione. I vermi transgenici per le varianti mutate umane, associate alla FTDP-17, mostrano dei difetti più severi, rispetto a quelli transgenici per la forma selvatica. La disfunzione motoria, o fenotipo Unc (*uncoordinated locomotion*), è causata da difetti pre-sinaptici, più che post-sinaptici, e chiaramente precede l'accumulo degli aggregati insolubili di tau (Kraemer et al., 2003). La microiniezione intracellulare dei plasmidi codificanti per l'isoforma umana più lunga di tau marcata all'estremità amino-terminale con GFP (*Green Fluorescent Protein*), nei neuroni giganti ABC (*Anterior Bulbar Cells*) della lampreda di mare, o *Petromyzon marinus*, induce tardivamente una pronunciata iperfosforilazione di tau, seguita dalla formazione di filamenti aggregati, dalla degenerazione dei microtubuli dendritici e, in ultimo, dalla perdita sinaptica, in una sequenza citodegenerativa che ricapitola per intero quella delle tauopatie umane (Hall et al., 1997; Hall et al., 2000).

Nel primo topo transgenico che esprimeva la proteina tau umana è riportata un' alterata localizzazione di tau nel compartimento somato-dendritico, ed inoltre un' aumentata fosforilazione agli epitopi disordine-correlati, ma nessuna modificazione a carico del citoscheletro o formazione di aggregati intracellulari (Gotz et al., 1995). L'assenza di marcati cambi fenotipici, attribuibili probabilmente al basso livello d' espressione della tau esogena in tale modello sperimentale, ha indotto allo studio di topi transgenici in cui la proteina tau è posta sotto il controllo di un più forte promotore. Infatti, gli alti livelli d' espressione dell' isoforma 3R, ottenuti utilizzando il promotore prionico murino (PrP), causano non solo la formazione degli aggregati iperfosforilati di tau, soprattutto nel midollo spinale, ma anche una massiva degenerazione assonale, seguita da una forte riduzione del trasporto assonale provocando, in siffatti animali transgenici, una marcata debolezza muscolare, un sintomo clinico tipicamente riscontrabile nei pazienti affetti da sclerosi multipla, che è una malattia neurologica umana caratterizzata da un abnorme accumulo intracellulare di proteine del neurofilamento. La riduzione osservata, sia del numero totale dei microtubuli che del livello intracellulare di tubulina, indica una perdita della funzione di stabilizzazione dei microtubuli stessi, o un' alterazione del trasporto assonale (Ishihara et al., 1999).

I topi transgenici esprimenti l'isoforma della tau umana più lunga 4R (h40), sotto il controllo del promotore Thy, sviluppano anch'essi una degenerazione assonale nel cervello e nel midollo spinale e il livello di tau 4R, necessario per evocare tale effetto patologico, è più basso di quello richiesto per le forme 3R, in quanto evidente già dopo moderati incrementi. La neurodegenerazione è accompagnata poi da una marcata formazione di dilatazioni nei processi neuritici, con accumulo di neurofilamenti, mitocondri e vescicole, ad indicare marcati difetti nei meccanismi di trasporto assonale (Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000).

Diversamente da quanto riportato nel moscerino *Drosophila*, l'assonopatia centrale e periferica è significativamente ridotta dall' espressione della forma costitutivamente attiva della protein-chinasi GSK-3 $\beta$ , che causa una diminuzione del legame di tau ai microtubuli (Spittaels et al., 2000).Ciò suggerisce che la degenerazione assonale nel topo transgenico 4R, è dovuta all'eccessiva stabilizzazione dei microtubuli, a causa dunque dell'alta proporzione di tau ad essi legata, un effetto che può essere revertito dai trattamenti che indeboliscono l'interazione tau /citoscheletro. In accordo con tale ipotesi, i neuroni espianati dalle radici delle corna dorsali del midollo spinale dei topi transgenici per tau 4R mostrano un' aumentata densità e stabilità dei microtubuli, ed una forte riduzione del trasporto assonale rapido: la coespressione di GSK-3 $\beta$ , in tali colture neuronali,

aumenta significativamente la fosforilazione di tau, diminuendone il relativo legame al citoscheletro e revertendo così l'effetto neurotossico 4R tau-indotto (Nuydens et al., 2002).

I topi transgenici esprimenti alti livelli di una forma di mutante dominante negativo di PP2A, sotto il controllo di un promotore neurone-specifico, mostrano un' evidente correlazione fra la diminuzione dell'attività della suddetta proteina-fosfatasi e l'aumentata fosforilazione di tau ad alcuni epitopi, con conseguente formazione degli aggregati cellulari (Kins et al., 2001). Comunque in tali topi, diversamente da quanto riportato in vitro, nelle linee neuronali umane, e in vivo, nel moscerino *Drosophila*, non sono evidenti marcati cambi fenotipici, indicando che l'aumento dello stato di fosforilazione di tau non è sufficiente da solo a causare una marcata disfunzione neuronale, e quindi la morte.

Infine, nei topi ingegnerizzati per esprimere differenti varianti mutate di tau associate alla FTDP-17, è riportata la formazione degli aggregati di tau iperfosforilata, sia nella corteccia che nel midollo spinale e, in contrasto con quanto osservato per l'aumentata espressione dell' isoforma selvatica, sono visibili anche aggregati insolubili, simili a quelli tipicamente presenti in numerose tauopatie umane. Tali varianti mutate di tau inducono apoptosi in alcuni topi modello, ma non in altri (Gotz et al., 2001; Tanemura et al., 2001; Tatebayashi et al., 2002; Allen et al., 2002). I dati sperimentali qui riportati sono riassunti nella tabella 2.

#### -Modello di acquisizione di nuove funzioni: diretta citotossicità della proteina alterata.

(i) Sebbene le colture cellulari non neuronali rappresentino un sistema flessibile e controllato, quelle neuronali sono estremamente adatte a studiare i meccanismi patogenetici della tossicità tau-mediata, consentendo l'osservazione di modificazioni a carico di elementi cellulari neurone-specifici (sinapsi, dendriti, assoni, microtubuli dendritico /assonali). L'aumentata espressione della proteina tau pseudo-iperfosforilata (PHP-tau), che ne mima l'alto grado di stabile fosforilazione associato ai disordini dementigeni, esercita in vitro un potente effetto neurotossico, sia nelle cellule neuronali di ratto, quali le PC12, che in quelle umane, inducendo una marcata morte per apoptosi. In tali esperimenti però non vi è alcuna chiara evidenza a favore della formazione degli aggregati insolubili di tau, suggerendo piuttosto l'acquisto di una nuova funzione citotossica, da parte di altre specie della proteina stessa, quali monomeri od oligomeri solubili, in conseguenza delle modificazioni a carico del relativo stato di fosforilazione (Fath et al., 2002). In un lavoro più recente, alcuni autori (Shahani et al., 2006) esaminano gli effetti di tale forma di tau mutante iperfosforilata, o PHP-tau, introducendola in forma coniugata al marcatore fluorescente GFP (*green fluorescent-protein*) mediante Sindbis virus in fettine ippocampali di ratto: le colture organotipiche rappresentano infatti uno strumento elettivo per studiare gli effetti tossici della tau mutata su strutture sinaptiche integre, in quanto preservano intatta la completa citoarchitettura neuronale. Essi riportano appunto che, l'espressione virale di PHP-tau causa, nel sistema modello di fettine ippocampali, una morte più pronunciata di quella indotta dalla rispettiva forma selvatica, con un'attivazione di caspasi-3, una frammentazione del DNA, ma anche un rigonfiamento neuronale e il rilascio dell'enzima lattico deidrogenasi. Inoltre, diversamente da quanto riportato per il peptide A $\beta$ , la PHP-tau non sembra alterare in alcun modo né il numero, né la morfologia delle sinapsi dendritiche.

Le cellule non neuronali, che coesprimono la proteina tau, la E3-ubiquitin- ligasi CHIP, la GSK-3 $\beta$  e l'ubiquitina esogene sviluppano numerosi aggregati intracellulari di tau ubiquitinati. Se tali cellule sono invece private della proteina CHIP esogena, non sviluppano più aggregati di tau ubiquitinati e mostrano un'aumentata morte cellulare. Ciò suggerisce pertanto che la forma solubile, iperfosforilata di tau è tossica, ma non la forma insolubile, ubiquitinata ed indicano inoltre che la proteina CHIP coniuga l'ubiquitina sulla tau fosforilata, non solo per indirizzarla verso la

degradazione, ma anche per promuoverne la formazione in aggregati insolubili, che proteggono le cellule dalla tossicità indotta dalla stessa tau solubile fosforilata (Shimura et al., 2004).

Nelle linee cellulari corticali umane e nei tessuti cerebrali post-mortem da pazienti AD, la proteina chaperonina Hsp27 (*heat shock protein 27*) lega preferenzialmente la tau patologica iperfosforilata, ma non quella non fosforilata. La forma iperfosforilata di tau causa una pronunciata morte neuronale di tipo apoptotico, recuperabile da Hsp27, che probabilmente ne facilita la degradazione e/o la defosforilazione, per diretta alterazione della conformazione patologica acquisita (Shimura et al., 2004). Shimura et al., riportano pertanto che la tau iperfosforilata induce un' evidente morte apoptotica, di tipo caspasi 3-dipendente e recuperabile da Hsp27, e suggeriscono inoltre che l'effetto antiapoptotico di tale chaperone può essere indotto, non soltanto dall'interazione con la tau iperfosforilata tossica, ma anche dall'inibizione diretta della pro-caspasi 9 e della caspasi-3 effettrice.

(ii) Numerosi modelli di tauopatie sono stati sviluppati nei più semplici animali invertebrati non-murini, quali *D.melanogaster* e *C.elegans*. Entrambi offrono alcuni vantaggi rispetto ai topi transgenici quali, (a) la possibilità di identificare con estrema specificità i singoli neuroni sulla base della loro origine e sviluppo, (b) la semplice morfologia e fisiologia cellulare (c) la rapidità di manipolazione genetica (breve ciclo vitale, ridotto genoma, semplice sistema nervoso centrale, facilità nell'analisi e nella selezione dei mutanti). Le mosche transgeniche, esprimenti sia la tau selvatica che quelle mutanti associate alla FTDP-17 (V337M o R406W), mostrano una progressiva neurodegenerazione, con un inizio tardivo correlato all' avanzare dell'età adulta, un' aumentata tossicità della tau mutata, accompagnata da un' anormale accumulo e da una relativa selettività anatomica. In tale modello in vivo, la neurodegenerazione però non è accompagnata dalla formazione dei tipici grovigli neurofibrillari, presenti invece nei disordini umani e in alcuni modelli di tauopatie di roditori (Wittmann et al., 2001). Ciò suggerisce pertanto che l'alterazione precoce dei livelli della proteina precede la formazione dei più larghi aggregati intracellulari, causando una marcata neurotossicità. La neurodegenerazione infatti ben correla con l'anormale fosforilazione, e con le modificazioni conformazionali a carico di tau, eventi entrambi che precedono la formazione patologica degli aggregati (Jicha et al., 1997; Jicha et al., 1999). L' aumentata espressione in *Drosophila* della sola isoforma umana 4R di tau ne è a conferma, suggerendo che alti livelli della proteina tau sono di per sé neurotossici, e che la causa della morte neuronale è l'iperfosforilazione e non l'aggregazione (Jackson et al., 2002). Tali risultati dimostrano poi inequivocabilmente che la neurodegenerazione tau-indotta può precedere, o avvenire indipendentemente dalla deposizione degli aggregati filamentosi di tau. Infine tali studi, in cui non è riportata alcuna formazione di inclusioni proteinacee, ma esclusivamente l'iperfosforilazione di tau ai residui tipicamente modificati nell'AD e in altre tauopatie, disaccoppiano dunque l'iperfosforilazione patologica dalla formazione degli aggregati. Nel nematode *C.elegans*, l'espressione della tau umana selvatica o recante mutazioni associate alla FTDP-17 causa una significativa riduzione del ciclo vitale, associata ad alterazioni comportamentali, a marcati difetti della neurotrasmissione colinergica, con un forte accumulo della tau insolubile fosforilata, un evidente danno assonale e una perdita massiva di cellule nervose. L'espressione della variante mutata causa un più severo fenotipo neurodegenerativo, in confronto a quello delle rispettive forme selvatiche. La tau solubile mutante è fosforilata molto precocemente, allorché il sistema nervoso non è ancora alterato, ma la mancanza di coordinazione motoria è già evidente: ciò indica che, in tale modello animale, l'espressione della variante umana di tau mutata è sufficiente da sola a causare una pronunciata disfunzione neuronale (Kraemer et al., 2003). Tali dati sperimentali sono riportati nella tabella 3.

-Potenziale ruolo dell'aggregazione di tau: saggi acellulari (*cell-free*), modelli in vitro di colture cellulari neuronali e non, modelli animali in vivo.

La proteina tau, in condizioni fisiologiche di normalità, è una molecola altamente solubile ed intrinsecamente priva di strutture secondarie e/o terziarie (*random coil*). Nel morbo di Alzheimer (AD) e in altri disordini neurodegenerativi, tale proteina, come già detto, si accumula in strutture filamentose altamente ordinate. I PHFs (*paired helical filaments*) sono il principale tipo di filamenti presenti nel cervello dei pazienti affetti da AD, e consistono di fibrille di tau con uno spessore tra gli 8 e i 20 nm e una periodicità di 80 nm. I STs (*straight filaments*) sono invece il più abbondante costituente fibrillare presente nel morbo di Pick, e sono presenti solo in misura minore nell' AD: essi hanno un calibro di 10-15 nm e non mostrano alcuna periodicità. Le analisi di diffrazione a raggi X hanno evidenziato che, diversamente dalla forma solubile, gli aggregati di tau mostrano significative strutture secondarie ad  $\alpha$ -elica e foglietto  $\beta$ -ripiegato. Nell' AD e nella sindrome di Down, sia le isoforme 3R che quelle 4R sono presenti negli aggregati insolubili, mentre le altre tauopatie sono caratterizzate da diverse e specifiche combinazioni delle 6 isoforme di tau (Spillantini et al., 1998; Crowther and Goedert, 2000; Lee et al., 2001).

Numerose sono le difficoltà riscontrate nel definire il preciso ruolo dell'aggregazione di tau nella progressione dei disordini dementigeni, in conseguenza (a) della diversità delle forme aggregate di tau, che rende difficile analizzarne il contributo in ciascuna patologia, (b) delle numerose modificazioni post-traduzionali, in particolare della fosforilazione, che accompagnano l'aggregazione (Brandt et al., 2005; Gamblin et al., 2005).

(i) Gli studi di aggregazione in saggi acellulari, utilizzando un peptide tau sintetico, hanno dimostrato che, mentre la glicazione facilita la dimerizzazione e contribuisce solo precocemente alla formazione degli aggregati, l'ubiquitinizzazione è invece un evento tardivo, che pertanto non contribuisce all'assemblaggio dei filamenti (Ledesma et al., 1998; Goedert et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1993). L'iperfosforilazione è invece la modificazione post-traduzionale più importante in quanto (a) è precoce, (b) è diretta verso siti multipli, ed infine (c) è organizzata in maniera ordinata e stereotipata (Billingsley et al., 1997). Infatti la defosforilazione, ma non la glicazione, della tau iperfosforilata, estratta di cervelli post-mortem dei pazienti AD, ne riduce significativamente l'aggregazione (Alonso et al., 2001).

In termini cinetici, l'aggregazione di tau è un processo a più passaggi che prevede (a) una fase di formazione di oligomeri (dimeri) sequenza-dipendente, (b) una fase di nucleazione, in cui tre oligomeri formano il nucleo primitivo, (c) una fase infine di elongazione del nucleo, per aggiunta sequenziale di addizionali oligomeri. La polimerizzazione di tau in vitro necessita di grandi quantità di proteina (Wille et al., 1992; Crowther et al., 1992). Tuttavia, la minima concentrazione richiesta può essere ulteriormente ridotta in presenza di induttori carichi negativamente come sulfoglicosaminoglicani, tipo eparina, acidi grassi, come l'acido arachidonico, o chinoni, tipo CoQ (Goedert et al., 1996; Perez et al., 1996; Wilson et al., 1997; Perez et al., 2000; Santa-Maria et al., 2004). La minima regione richiesta per il reciproco assemblaggio tau-tau è stata mappata nel terzo motivo di legame ai microtubuli (von Bergen et al., 2000; Perez et al., 1996). In particolare, all'interno di tale dominio sono stati identificati due peptidi principalmente implicati: il peptide 1 (P1), che contiene i residui 301-306, che è capace di autoassemblare in assenza di qualsiasi cofattore, e il peptide 2 (P2) contenente invece i residui 317-335. E' stato proposto un modello per spiegare come entrambi i peptidi potessero promuovere la formazione dei filamenti: si ritiene infatti che tau assembla nelle fibrille solo dopo che i suddetti peptidi subiscono profonde modificazioni conformazionali, tali che P1 forma strutture  $\beta$  a foglietto ripiegato ( $\beta$ -sheets) e P2 invece acquisisce struttura ad  $\alpha$  elica ( $\alpha$ -helix) (von Bergen et al., 2000). Risultati poco conclusivi sono emersi invece dagli studi di aggregazione in vitro, di diversi costrutti di tau e in diverse condizioni sperimentali. Ciò che risulta è che il passaggio iniziale è la formazione di un dimero, covalente o non-, sotto condizioni riducenti o ossidanti. L'elongazione è il passaggio più lento, e quindi limitante nel processo, ma spesso è accelerato da cofattori, quali i polianioni carichi negativamente (Barghon et al., 2002).

(ii) Nel cervello dei pazienti affetti da AD, la distribuzione dei grovigli neurofibrillari di tau (NFT) meglio correla con i siti di degenerazione neuronale e con la severità del disordine, che non le placche senili amiloidee (Braak et al., 1991). Comunque in tale disordine, i neuroni sono perduti ad un tasso più alto di quanto ci si aspetterebbe dal calcolo dei neuroni NFT-positivi, e la perdita neuronale avviene anche in aree prive di aggregati insolubili di tau (Gomez-Isla et al., 1997; Lasn et al., 2001). E' pertanto probabile che altre forme di aggregazione, gli oligomeri o la stessa tau solubile iperfosforilata, esercitino un effetto neurotossico.

In particolare, l'aumentata espressione della tau pseudo-iperfosforilata nelle colture neuronali esercita un potente effetto tossico in completa assenza di strutture aggregate, indicando che le modificazioni strutturali di tau di per sé sono capaci di indurre neurodegenerazione (Fath et al., 2002). Nei modelli di colture non neuronali in vitro, la transfezione con costrutti di tau recanti mutazioni associate alla FTDP-17, causa la formazione di numerosi aggregati insolubili che non sono filamentosi. Diversamente, è possibile indurre la formazione dei PHF nelle cellule di neuroblastoma umane tau-transfettate esposte al peptide  $\beta$ -amiloide pre-aggregato (Ferrari et al., 2003).

(iii) In alcuni organismi animali, quali gli orsi, le capre, le pecore e i babbuini, è stata riportata la spontanea formazione degli aggregati insolubili di tau con l'avanzare dell'invecchiamento, in una sequenza temporale di eventi analoga a quella riportata nel cervello umano dei pazienti AD. Diversamente, gli animali standard di laboratorio, quali ratti e topi, non sviluppano spontaneamente filamenti o aggregati, ma possono essere sperimentalmente manipolati per studiare la patologia di tau.

In particolare, il topo ha un gene omologo di tau che codifica per una proteina legante i microtubuli che conferisce stabilità al citoscheletro. L'omologo murino della proteina tau è però maturato, per processamento alternativo del messaggero, solo nell'isoforma 4R nel cervello adulto, mentre la tau umana è maturata nell'adulto in sei diverse isoforme, distribuite tra quelle con 3 o con 4 ripetizioni di legame ai microtubuli. Alcune procedure sperimentali, di manipolazione animale, pertanto ablano il gene tau endogeno, cosicché i topi esprimono solo l'isoforma umana, mentre altre inseriscono il gene umano, ma lasciano intatto quello murino. Pertanto, tali sistemi modello differiscono rispetto alla presenza di diversi rapporti tra le isoforme di tau umana e di topo, il che ne complica ulteriormente l'interpretazione. Molti altri modelli di transgenici di tau esprimono poi solo un' isoforma, e pertanto diventa difficile la comparazione tra essi. Infine, oltre alle differenze del rapporto di maturazione delle varie isoforme, l'estremità N-terminale della tau murina include ben 14 aminoacidi diversi, se comparata a quella umana.

Uno studio dettagliato della formazione tempo-dipendente dei PHF è stata eseguita da Andorfer et al. (Andorfer et al., 2003), in topi transgenici opportunamente ingegnerizzati. Gli autori generano infatti un topo transgenico che non esprime la tau murina, ma tutte le sei isoforme della tau umana, così da studiare gli effetti indotti dal solo gene umano, e non anche da quello murino di tau. Essi chiamano questo sistema modello "*htau mice*" e lo studiano per ben 13 mesi. Le isoforme 3R e 4R sono approssimativamente prodotte in ammontari equivalenti nel topo htau. Negli animali giovani (sei settimane di età), l'immunoreattività per la tau fosforilata è alta negli assoni, ma non nei corpi cellulari dei neuroni ippocampali. A circa tre mesi, le isoforme si ridistribuiscono, in forma iperfosforilata, dall'assone al corpo cellulare e cominciano ad accumularsi nel soma neuronale. Tale delocalizzazione aumenta con l'avanzare dell'età e, dopo 9 mesi, terminalmente culmina con la formazione degli aggregati proteici tau-positivi, o NFT. In particolare, tali inclusioni sono visibili nei corpi cellulari dei neuroni corticali ed ippocampali, in maniera analoga a quanto riportato nei casi di AD. E' interessante riportare che, in tale studio, la maggior parte della patologia di tau nel topo "umanizzato" htau è localizzata nella neocorteccia e nell'ippocampo, mentre è minima nel tronco encefalico e nel midollo spinale, anche in presenza di significativi deficit motori e comportamentali. La sequenza di eventi supporta pertanto l'ipotesi che l'iperfosforilazione

precede la formazione dei filamenti, accreditando dunque tali animali come modello di estrema utilità, al fine di studiare i possibili effetti della perdita di funzione di tau (alterata compartimentazione cellulare dall'assone al soma), la tossicità di tau (solubile) iperfosforilata (tra 6 e 9 mesi) ed infine gli effetti della formazione intracellulare degli aggregati.

In aggiunta a tale elegante approccio sperimentale, sono stati prodotti poi numerosi topi transgenici, che esprimono la tau umana selvatica, o recante mutazioni associate alla FTDP-17, in un contesto genetico di tau endogena murina. Tali modelli animali ci insegnano circa la tossicità di tau aggregata che:

(a) topi transgenici che esprimono alti livelli della isoforma più breve di tau (3R) esibiscono numerosi filamenti intraneuronali della proteina tau iperfosforilata, privi di strutture a foglietto  $\beta$ -ripiegato o thioflavina-negative, solo nel midollo spinale e a 6 mesi di età. Con l'avanzare dell'invecchiamento, cioè dopo 18 mesi circa di età, essi sviluppano anche i NFT iperfosforilati nell'ippocampo, nella corteccia entorinale e nell'amigdala (ma non nel midollo spinale) (Ishihara et al., 1999; Ishihara et al., 2001). Tali dati dimostrano che, i NFT thioflavina S-positivi possono formarsi con la tau selvatica e in assenza di fattori esogeni aggiuntivi. Tale modello murino, che Ishihara et al. studiano da 3 fino a 24 mesi di età, acquisisce una patologia del sistema nervoso centrale età-dipendente, in maniera analoga alla FTDP-17 e alla ALS (sclerosi amiotrofica laterale di Guam), o alla ALS/PDC (complesso Guam ALS/parkinsonism dementia), malattie caratterizzate tutte dalla presenza di inclusioni iperfosforilate di tau nella corteccia, nel tronco encefalico e nel midollo spinale. Tali aggregati insolubili sono thioflavina S-negativi, e quindi non identificabili come NFT, essendo privi di strutture  $\beta$ , ma sono positivi al metodo di colorazione argentea di Bodian, utilizzato per rivelare molti aggregati proteici di tau nelle tauopatie umane. Infine, tale modello murino esibisce una pronunciata debolezza muscolare associata a marcati difetti nella locomozione, tipico indizio clinico di Guam ALS e ALS/PDC. Nei topi anziani poi, le suddette lesioni fibrillari maturano in strutture che esibiscono tutte le caratteristiche morfologiche, immunoistochimiche e di profilo istologico proprie degli aggregati AD-associati, presenti nei neuroni corticali. Infatti, esse sono sia positive sia al Congo red, che al metodo di colorazione di Gallyas, come per le inclusioni tipiche del morbo di Alzheimer. Pertanto, tale modello murino è particolarmente interessante in quanto ricapitola la progressione temporale delle inclusioni fino ad aggregati insolubili tipo NFT, filamentosi e Gallyas-positivi.

In un altro studio dello stesso anno, Brion et al., (Brion et al., 1999) generano un topo che esprime l'isoforma 3R della tau umana (h44) sotto il controllo del promotore dell'HMG-CoA reduttasi, e riportano la completa assenza dei NFT in tali animali, fino a 19 mesi di età. Essi riportano che la proteina tau umana è particolarmente abbondante nel corpo cellulare e nei dendriti di una specifica popolazione neuronale, mentre l'espressione della controparte murina gradualmente diminuisce con lo sviluppo. Inoltre, gli autori evidenziano come la tau umana sia presente anche negli astrociti, in particolare sui microtubuli degli assoni e dei dendriti, ma non nel corpo cellulare.

(b) topi transgenici che esprimono moderati livelli della l'isoforma umana 4R esibiscono una marcata iperfosforilazione ed un accumulo somato-dendritico di tau, una pronunciata dilatazione dei processi assonali nel midollo spinale e nella corteccia cerebrale, con deficit motori e comportamentali, ma non esibiscono alcuna formazione degli aggregati insolubili thioflavina-positivi. La neurodegenerazione in tale sistema modello è probabilmente causata da un eccessivo legame di tau ai microtubuli, più che da una diretta tossicità di tau aggregata, in quanto il fenotipo mutante è revertito dalla co-espressione della protein-chinasi GSK-3 $\beta$  che, fosforilando tau, ne riduce l'interazione con il citoscheletro. Sebbene nel topo (GSK3 $\beta$  x htau40) sia presente una maggior quantità di tau iperfosforilata, non vi è alcun evidente incremento degli aggregati insolubili della proteina, né presenza dei PHF o dei NFT, lasciando così irrisolta la domanda di come l'iperfosforilazione di tau possa contribuirne alla formazione (Spittaels et al., 1999).

Gotz et al., (Gotz et al., 2001) clonano l'isoforma umana più lunga (4R) sotto il controllo del forte promotore umano Thy-1, in un contesto genetico di tau endogena di topo. In tale modello, la proteina tau umana è presente nel corpo cellulare neuronale, negli assoni, e nei dendriti ed è

fosforilata a numerosi siti, che sono modificati nei PHF AD-associati. Anche in tale studio, non vi sono aggregati insolubili o NFT, e gli autori concludono che la fosforilazione e i bassi livelli di accumulo sono cambi neuropatologici che precedono la degenerazione neurofibrillare, tipica dei casi AD.

(c) topi transgenici che esprimono le varianti mutate di tau associate alla FTDP-17 sviluppano invece i NFT thioflavina S-positivi, distribuiti in diverse aree cerebrali, con una significativa perdita neuronale (Allen et al., 2002; Lewis et al., 2000; Tanemura et al., 2002).

Tanemura et al., sviluppano infatti un modello di topo transgenico esprimente la variante umana mutata V337M tau (mutazione missense), e riportano in essi una marcata presenza dei NFT thioflavina-positivi, con una forte congofilia nell'ippocampo, associata a pronunciati difetti comportamentali.

Lewis et al., studiano la mutazione esonica P301L, la quale non influenza il rapporto delle isoforme 3R/4R ma promuove l'autoassemblaggio della proteina tau mutante negli aggregati fibrillari. Essi creano una linea di topi transgenici (JNPL3), che esprime la variante umana 4R con la mutazione P301L, e riportano in tali animali un significativo sviluppo dei NFT, associato a progressivi deficit motori. Tale fenotipo compare a 6.5 mesi di età negli emizigoti, e a 4.5 mesi negli omozigoti. La formazione degli aggregati proteici tau-positivi è età- e tempo-dipendente, ed interessa sia le aree cerebrali che il midollo spinale. Sono inoltre osservate marcate modificazioni della solubilità di tau ed una forte iperfosforilazione. È interessante osservare che, il fenotipo così severo osservato in tali topi JNPL3 è sorprendente, in quanto essi esprimono la variante di tau umana mutata P301L a livelli comparabili di quella endogena murina, indicando che la sua alta penetranza è dovuta esclusivamente all'effetto della mutazione P301L (Lewis et al., 2000).

Sahara et al., (Sahara et al., 2002) esaminano biochimicamente la progressione del disordine nei topi JNPL3. Gli omogenati cerebrali di tali topi sono così frazionati per determinare se lo sviluppo delle forme aggregate di tau, dalla tau solubile, passa per stadi intermedi. Gli estratti totali del cervello di topi a differente età sono separati in una frazione solubile (S1), una Sarkosyl- e sale-estraibile (S2), e in un pellet Sarkosyl-insolubile (P3), e sono analizzati per la distribuzione della tau umana, per lo stato di fosforilazione e per la presenza dei filamenti. Gli autori riportano che le frazioni solubili S1 e S2 contengono specie di tau a basso peso molecolare, sebbene la frazione S2 includa anche la tau a più alto peso molecolare di 64KDa. I livelli di tau insolubile nella frazione P3 aumentano con l'età e correlano con la concentrazione della tau solubile. La proteina tau transgenica umana, più che quella endogena murina, è prevalente ed è fosforilata a molti siti, alcuni dei quali sono modificati nella frazione S2 in minor misura che in quella P3. Gli aggregati polimerici di tau sono presenti nella frazione insolubile P3, a partire dai 3 mesi di età nei topi JNPL3, ma non nei topi non-transgenici di controllo. Tali risultati dimostrano che la proteina tau della frazione S2 rappresenta una forma intermedia, dalla quale poi si forma la tau insolubile, ed inoltre evidenziano che la fosforilazione è strettamente associata con la formazione e/o la stabilizzazione dei filamenti.

Tatebayashi et al. (Tatebayashi et al., 2002) riportano che l'espressione di moderati livelli della isoforma umana di tau più lunga recante la mutazione R406W, in un topo transgenico, causa una marcata congofilia, con progressiva formazione di inclusioni di tau iperfosforilate, a partire dai 18 mesi di età e nei neuroni del proencefalo. Tali aggregati proteici, che includono sia la tau umana mutante che quella selvatica murina, in quanto il gene endogeno non è stato preventivamente rimosso, sono associati ad una massiva distruzione dei microtubuli, mentre la frazione sarkosyl-insolubile dei filamenti tau è estratta solo dai topi transgenici anziani. Comportamentalmente, tali topi R406W anziani esibiscono pronunciate alterazioni della memoria, senza mostrare difetti sensorio-motori.

Per quanto riguarda la patologia di tau, non come primaria causa eziogenetica di malattia dementigena, ma associata alla deposizione di A $\beta$  nell'AD, sono stati sviluppati numerosi modelli di transgenici, di doppi e tripli transgenici.

Gotz et al. (Gotz et al., 2001) iniettano, nella corteccia sensoriale e nell'ippocampo del topo transgenico per tau P301L, le fibrille del peptide sintetico A $\beta$ 42 : gli autori riportano una sinergica risposta, fra le lesioni di tau e quelle di A $\beta$ , tale da indurre un aumento, pari a ben quattro-cinque volte, del numero dei NFT nei corpi cellulari dell'amigdala, da dove i neuroni proiettano ai siti di iniezione. L'incremento degli aggregati proteici di tau è visibile nei topi così trattati a partire dai 6 mesi di età, già dopo 18 giorni di iniezione con A $\beta$ 42. Considerato che i NFT sono già stati riportati nel topo transgenico P301L, le evidenze sperimentali di un effetto patogenetico sinergico fra tau e la  $\beta$ -amiloide indicano appunto come le due proteine agiscano di concerto nella progressione dell'AD, e non isolatamente.

Per studiare l'interazione funzionale tra tau, GSK-3 $\beta$  e PS1, un gene comunemente mutato nelle forme ad esordio precoce e familiari di AD, Boutajangout et al. (Boutajangout et al., 2002) incrociano i topi transgenici che esprimono la più breve isoforma di tau umana (0N3R), descritta da Brion et al., con un mutante di topo che porta il transgene per la mutazione di PS1 M146L, geneticamente associata a casi familiari di AD. In tale doppio transgenico, è osservato un incremento significativo della fosforilazione di tau, ma non la formazione dei NFT.

Per esplorare l'interazione tra tau e A $\beta$  nella neurodegenerazione, Lewis et al. (Lewis et al., 2001) creano invece un topo che produce, sia la variante umana mutata P301L del topo JNPL3, che la proteina APP mutante. La progenie risultante da tale incrocio doppio-mutante (tau/APP) e il ceppo parentale APP-mutato sviluppano estesi depositi di  $\beta$ -amiloide alla stessa età, così che gli autori concludono che non vi è alcun effetto di tau sulla patologia di A $\beta$ . Comunque, rispetto al ceppo parentale del topo JNPL3 con P301L tau, i doppi mutanti esibiscono un' aumentata deposizione dei NFT nel sistema limbico e nella corteccia olfattiva. Tali risultati supportano pertanto l'ipotesi che tau e A $\beta$  possono interagire patologicamente durante la progressione del morbo di Alzheimer's.

Boutajangout et al. (Boutajangout et al., 2004), tramite incroci selettivi tra tre diverse linee transgeniche, creano un topo che esprime la tau umana selvatica, la presenilina-1 mutante (M146L) e l'APP mutante S751L: essi riportano che la deposizione di A $\beta$  precede l'accumulo tempo-dipendente della tau iperfosforilata.

Più di recente (Oddo et al., 2003), è stato creato un triplo modello transgenico (3xTgAD), esprime APP (APP K670N/M671L Swedish mutation), la presenilina 1 (PS1-M146V) e tau mutate (P301L), mediante iniezione dei geni codificanti per tau e APP in embrioni da topi knock-in per la presenilina-1 mutante. Tali animali sviluppano progressivamente un marcato accumulo di A $\beta$  intraneuronale, e successivamente mostrano un' evidente formazione sia delle placche di amiloide, che degli aggregati NFT di tau, nelle regioni cerebrali tipicamente interessate dalla perdita neuronale nel morbo di Alzheimer's, e con una modalità età-dipendente. E' inoltre osservata una significativa disfunzione sinaptica, associata a marcati difetti nell'LTP e severi deficit motori che correlano con l'accumulo intraneuronale di A $\beta$  (*Long Term Potentiation*). In tali animali, comunque, la riduzione del numero delle sinapsi, che si manifesta prima della comparsa istologica di tali lesioni patologiche, appare essere il più precoce indicatore di degenerazione assonale (Oddo et al., 2003). Tale studio è il primo che evidenzia un importante ruolo patogenetico di A $\beta$  intraneuronale, nell' alterazione della plasticità sinaptica associata a casi accertati di AD.

In successivi lavori Oddo et al. (Oddo et al., 2004; Oddo et al., 2006 a-b-c) riportano che l'iniezione nel cervello di topi 3XTg-AD di anticorpi diretti contro il peptide A $\beta$ , o di anticorpi specifici per le forme oligomeriche, o di inibitori della proteasi di processamento  $\gamma$ -secretasi, risultano in una marcata riduzione dell'accumulo di tau somatodendritico negli animali giovani, ma non in quelli anziani. Infatti, le lesioni di tau a stadi tardivi di iperfosforilazione sono fortemente resistenti all'immunoterapia con A $\beta$ . Gli autori propongono dunque che la A $\beta$  fibrillare extracellulare, o quella solubile oligomerica, presente nel lume degli endosomi maturi, che veicolano proteine di

membrana ai lisosomi (detti corpi multivescicolari) (Takahashi et al., 2002) e nel citosol, promuovono la patologia neurofibrillare di tau (1) attivando una risposta infiammatoria con induzione di citochine, che a loro volta attivano la tau chinasi Cdk5 (Kitazawa et al., 2005), (2) interferendo con l'abilità del proteosoma di degradare tau (Oddo et al., 2004), (3) o stimolando l'altra tau chinasi GSK3 $\beta$  (Oddo et al., 2006b-c). Infine gli autori dimostrano che, in tali topi transgenici che esibiscono sia le placche che gli aggregati neurofibrillari, la sola riduzione della A $\beta$  solubile, senza contestuale diminuzione della forma solubile di tau, non migliora il fenotipo cognitivo, supportando ulteriormente il ruolo cruciale di tau negli stadi precoci della progressione della patologia (Oddo et al., 2006c).

Sebbene tali lavori dimostrino dunque che i depositi extra ed intracellulari di A $\beta$  possono esasperare la patologia intraneuronale indotta dalla proteina tau mutata, bisogna sottolineare che le mutazioni a carico di APP e di tau non sono mai state riportate insieme, nei disordini umani. Inoltre, la deposizione di A $\beta$  non è stata mai riportata indurre una patologia di tau selvatica, nei modelli murini transgenici (Goedert et al., 2005). I topi esprimenti alti livelli di APP, con mutazioni AD-associate, mostrano evidenti placche senili di A $\beta$ , diffuse e neuritiche, ma mancano di NFT-tau positivi, o non esibiscono alcuna perdita neuronale (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Irizarry et al., 1997). Comunque, i topi transgenici con mutazioni nel transgene PS-1 geneticamente associate all'AD, con o senza mutazioni nel transgene APP, non sviluppano alcuna patologia a carico di tau (Price et al., 1998). Inoltre, negli studi di Oddo et al. (Oddo et al., 2003 a-b), di Lewis et al. (Lewis et al., 2001) e di Gotz et al. (Gotz et al., 2001), la patologia di tau appare inizialmente nell'ippocampo e solo successivamente si diffonde alla corteccia, mentre diversamente la deposizione di A $\beta$  è riportata per prima nella corteccia e poi nell'ippocampo, implicando una diversa distribuzione spaziale tra le due lesioni neurologiche, non supportando quindi l'ipotesi di un possibile ruolo causativo delle placche amiloidee nella degenerazione fibrillare. Infine, la deposizione di A $\beta$  precede la presenza degli aggregati di tau, il cui accumulo è dose-dipendente ed è accompagnato da un critico aumento della fosforilazione a carico di numerosi epitopi, come indicato dalle analisi di immunoistochimica (Boutajangout et al., 2004). Tuttavia, nessuno di tali studi dimostra inequivocabilmente, mediante Western blotting, che l'iperfosforilazione di tau nei tripli transgenici è maggiore di quella riportata dagli animali transgenici per la sola forma selvatica, cosicché la sequenza patologica degli eventi -A $\beta$ /tau- è corroborata solo da deboli evidenze sperimentali, sia spaziali che temporali (Stoothoff and Johnson, 2005). Presi insieme tali studi suggeriscono infine che la produzione delle placche amiloidee nel topo non è sufficiente a mimare la patologia AD, e ad elucidare le complesse interazioni tra tau e A $\beta$  nella patogenesi di tale disordine dementigeno.

Nella una linea di topo esprimente la mutazione tau umana P301L negli oligodendrociti, la co-espressione dell'  $\alpha$ -sinucleina umana selvatica, risulta nella comparsa di fibrille aggregate thioflavina S-positive, assenti invece nella singola linea transgenica (Giasson et al., 2003). L'interazione fra tau e l' $\alpha$ -sinucleina è riportata poi dagli stessi autori anche nella linea transgenica che esprime l' $\alpha$ -sinucleina umana mutata A53T nei neuroni. Preliminari esperimenti, in vitro, riportavano infatti che l' $\alpha$ -sinucleina può indurre sinergicamente la formazione dei filamenti di tau, dando così una possibile spiegazione alla co-presenza della patologia di tau e dell'  $\alpha$ -sinucleina in vivo in alcuni disordini neurodegenerativi

Infine, dati contrastanti sono riportati circa il tipo di morte neuronale indotto da tau. Nei topi transgenici esprimenti la variante umana mutata di tau P301L, legata geneticamente alla FTDP-17, vi è co-presenza delle placche e degli aggregati di tau, e la morte indotta è di tipo apoptotico (Gotz et al., 2001; Ho et al., 2001). Diversamente, nei topi esprimenti un'altra variante umana mutata V337M, la degenerazione neuronale, con aggregati fibrillari di tau, non è di tipo apoptotico (Tanemura et al., 2002).

(d) topi transgenici che mimano la patologia di tau con inclusioni esclusivamente nelle cellule gliali, ma non nei neuroni, esibiscono aggregati thioflavina e gallyas-positivi, in maniera analoga a quanto

riportato per le placche astrocitarie presenti nel modello umano di tauopatia noto come degenerazione corticobasale (CBD). Higuchi e et al., (Higuchi et al., 2002) riportano la presenza e l'accumulo età-dipendente di corpi d'inclusione tau-immunoreattivi, insolubili e iperfosforilati, negli oligodendrociti, con un'evidente degenerazione associata a severi difetti locomotori.

Tali studi sono stati eseguiti per investigare l'effetto, sia della tau selvatica transgenica, che della tau con una singola mutazione patologica. Comunque, alcune differenti mutazioni sono associate a casi familiari di FTPD-17 o, ad altre tauopatie, e pertanto Lim et al. (Lim et al., 2001) clonano alcune mutazioni del gene tau in un singolo, super-patogenico transgene al fine di studiare un modello murino con conseguenze patologiche tau-associate multiple. L'analisi ultrastrutturale dei neuroni tau mutanti-positivi rivela strutture pre-NFT associate al citoscheletro, con filamenti di tau ed un aumentato numero ed attività acida dei lisosomi. Così, l'espressione di una proteina tau multimutante provoca una significativa aberrazione lisosomale, anche se non è ancora chiaro se ciò contribuisca alla progressione del disordine nelle tauopatie.

Emergenti evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che un'alterazione del trasporto assonale sia causativa non soltanto di alcuni disordini motori, ma possibilmente anche del morbo di Alzheimer e di altri disordini neurodegenerativi associati. Come già riportato, l'aumentata espressione di tau in vitro in diverse linee cellulari altera il trasporto intracellulare delle vescicole sinaptiche, di mitocondri, ed altri organelli, ed influenza il tasso di attacco e distacco dei motori proteici dai microtubuli, inducendo una marcata diminuzione, sia del trasporto anterogrado, che retrogrado (Ebner et al., 1998; Trinczek et al., 1999; Stamer et al., 2002). In vivo, i topi che esprimono alti livelli della isoforma umana di tau fetale più breve (0N3R), sotto il controllo del promotore PrP (Ishihara et al., 1999), o di quella più lunga adulta (2N4R), sotto il controllo del promotore Thy (Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000), sia nel tronco encefalico che nel midollo spinale, mostrano numerose dilatazioni assonali con accumulo di neurofilamenti, mitocondri e vescicole. Sono presenti inoltre diversi marcatori di degenerazione assonale Walleriana, quali rottura assonale e segmentazione della mielina in ellipsoidi (detti camere di digestione), ma anche atrofia neurogenica muscolare e presenza di microglia con debris di mielina fagocitata, diminuzione delle abilità motorie e severi difetti neurologici. Analogamente, l'aumentata espressione della isoforma più breve della tau umana nei neuroni motori larvali del moscerino *Drosophila* causa una distruzione del trasporto assonale ed una significativa alterazione morfologica e funzionale delle giunzioni neuromuscolari (Chee et al., 2005). Stokin et al., (Stokin et al., 2005) riportano che in un modello di topo transgenico per l'APP sono evidenti varicosità assonali nelle fibre del nucleo basale di Meynert, nella corteccia e nell'ippocampo contenenti mitocondri, neurofilamenti e chinesina-I, una precoce assonopatia indotta dal fallimento del trasporto retrogrado analogamente a quanto osservato per i topi transgenici per tau. E' stato proposto che in conseguenza del distacco di tau dai microtubuli (sia a causa di un'alterazione dello stato di fosforilazione che di un alterato equilibrio tra la quota legata e non) essa comincia ad aggregarsi e (a causa di un alterato rapporto substrato/enzima) ad essere iperfosforilata. Tau subisce modificazioni conformazionali che ne prevengono l'accessibilità alle proteasi e/o al proteosoma. Tali aggregati sequestrano la tau normale dai microtubuli, depletandone la quota biologicamente funzionale nella cellula. Ciò suggerisce due probabili cause per l'alterazione del trasporto assonale: (1) la presenza degli aggregati fibrillari di tau che occludono l'assone impedendo il trasporto assonale, o che disturbano compartimenti intracellulari essenziali per il metabolismo cellulare, e/o (2) il collasso dei microtubuli per sequestro delle proteine ad essi associate. Tale disfunzione, che diviene macroscopicamente visibile con rigonfiamento assonale, promuove l'aberrante produzione del peptide A $\beta$ , dato che gli assoni ne sono il principale sito di generazione. E' noto infatti che l'APP interagisce indirettamente attraverso la sua coda citoplasmatica (AICD) con la catena leggera della chinesina (KCL), mediante la proteina di ancoraggio JIP1b/2 (*c-Jun N-terminal JNK signaling-interacting-protein*) (Inomata et al., 2003; Matsuda et al., 2003). La  $\beta$  e la  $\gamma$ -secretasi, BACE e PS1, sono trasportate lungo gli assoni (Sheng et al., 2003; Chen et al., 2004) e i terminali assonali sono sufficienti a produrre A $\beta$  (Chen et al., 2004). Se i topi transgenici per l'APP, con visibile e precoce assonopatia, sono

incrociati con topi knockout eterozigoti per KLC1, si osserva un significativo aumento della dilatazione assonale, un' aumentata produzione di A $\beta$  e un alterato rapporto A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 verso il pi $\dot{u}$  fibrillogeno A $\beta$ 42, un marcato incremento del numero delle placche amiloidee ed un accumulo intraneuronale di A $\beta$ , ad uno stadio precedente o coincidente con l'inizio della deposizione (Stokin et al., 2005). In alternativa, dopo il blocco del trasporto assonale, le vescicole contenenti APP o A $\beta$  possono venire trasportate in direzione retrograda dalla dineina verso il compartimento somato-dendritico, con aberrante produzione e/o deposizione del peptide A $\beta$ . Tale sequenza di eventi genererebbe un circolo vizioso, in cui processi come l'aggregazione di tau, l'aumentata produzione di A $\beta$ , e l'alterato trasporto assonale diventano mutuamente stimolatori. Infine, il mancato trasporto dei mitocondri ai terminali sinaptici indurrebbe la perdita di sinapsi e la successiva degenerazione neuritica (Gotz et al., 2006). A supporto di tale ipotesi, Zhang et al. (Zhang et al., 2005) dimostrano che il trattamento con paclitaxel, un farmaco stabilizzante i microtubuli citoscheletrici, recupera i deficit di trasporto assonale rapido e reverte la disfunzione motoria, in un modello di topo transgenico esprime l'isoforma umana di tau pi $\dot{u}$  breve. Infine, recenti dati ottenuti sui neuroni corticali espianati dal topo htau, che esprime cio $\grave{e}$  il transgene codificante per l'intero gene tau ma manca di quello endogeno murino, suggeriscono che la neurodegenerazione tau-indotta sia correlabile ad un incompleto ed aberrante rientro nel ciclo-cellulare (Andorfer et al., 2005). La presenza inoltre di fosfo-epitopi di tau NFT-associati nelle cellule mitotiche in divisione, e l'alto stato di fosforilazione di tau nei neuroni fetali, sono osservazioni che supportano ulteriormente l'ipotesi che i neuroni adulti e degeneranti ricapitolino lo sviluppo fetale, e che la morte sia attribuibile ad un' espressione abortiva di proteine ciclo-associate (Nagy et al., 1997; Vincent et al., 1997; Busser et al., 1998). Nei cervelli dei casi AD, sono stati poi rilevati numerosi marcatori di replicazione del DNA, mentre alcuni esperimenti d' ibridizzazione in situ riportano la presenza di neuroni con un corredo cromosomico tetraploide (Yang et al., 2001). E' stato suggerito, che l'esordio clinico delle distinte tauopatie, in diverse localizzazioni anatomiche del cervello, possa essere dovuto a diverse condizioni ambientali, o a differenti mutazioni a carico del gene tau. Goedert (Goedert et al., 2005) suggerisce infatti che i cambi nel primo dominio di legame ai microtubuli possono essere correlati al disordine di Pick, mentre i cambi nel dominio COOH-terminale della molecola tau possono essere associati al morbo di Alzheimer's. Analogamente, i cambi nel rapporto 4R/3R possono promuovere la comparsa di demenza corticobasale, o la paralisi progressiva sopranucleare. I dati sperimentali riportati sono riassunti nella tabella 4.

### **-Considerazioni e prospettive**

In conclusione, un'alterazione dei livelli intracellulari delle diverse isoforme della proteina tau, o uno sbilanciamento del reciproco equilibrio dinamico tra fosforilazione/defosforilazione, inducono tutti un' evidente neurodegenerazione fibrillare. La proteina tau pertanto acquisisce effetti inibitori e/o tossici: infatti, non solo  $\grave{e}$  incapace di legare e stimolare l'assemblaggio dei microtubuli, ma intracellularmente sequestra anche le proteine tau, MAP1A/MAP1B e MAP2 normali, causando cos $\grave{i}$  nei neuroni affetti una marcata destabilizzazione, con conseguente collasso del citoscheletro, una progressiva compromissione del trasporto assonale retrogrado, seguita da perdita di sinapsi, morte e, in ultimo, demenza clinica.

Purtroppo per $\acute{o}$ , nessuna evidenza sperimentale inequivocabilmente accredita uno di tali modelli come elettivo nel comprendere il meccanismo molecolare della neurodegenerazione tau-indotta: ciascuna interpretazione esibisce sia prove a favore, che a sfavore.

Per quanto riguarda il primo modello o “*gain of function*,” che prevede appunto che alterazioni ambientali e/o fattori genetici intrinseci causino il distacco di tau dai microtubuli e l’aggregazione in filamenti neurotossici, i suoi sostenitori ne indicano a supporto: (a) la natura ubiquitaria degli aggregati insolubili, sia nel morbo di Alzheimer che in altre tauopatie; (b) il fatto che proteine recanti alcune mutazioni puntiformi geneticamente associate alla FTDP-17, assemblano in fibrille tau più rapidamente e più efficientemente che le corrispettive isoforme selvatiche (Nacharaju et al., 1999; Barghom et al., 2002; Gamblin et al., 2000; Goedert et al., 1999; Hogg et al., 2003; Gamblin et al., 2003); (c) la trasmissione ereditaria di tipo mendeliano autosomico dominante, causata dalle mutazioni nella sequenza codificante di tau, che suggerisce dunque che le tauopatie sono caratterizzate dall’acquisizione di una funzione tossica da parte di tau, più che dalla perdita di funzione; (d) la presenza di sole modeste anomalie fenotipiche in topi knockout per tau, indicante che la perdita di funzione biologica di tau nei neuroni non evoca significative conseguenze in termini di vitalità, e/o può essere compensata dalle altre MAPs vicarianti durante il neurosviluppo. Dall’altro canto, numerosi modelli cellulari e animali di morte neuronale tau-mediata, sia in vitro che in vivo, non mostrano alcuna formazione degli aggregati neurofibrillari (Wittmann et al., 2001; Jackson et al., 2002; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000). Infine, mentre tale modello ben accomoda la neurodegenerazione tau-indotta con le sostituzioni aminoacidiche geneticamente legate alla FTDP-17, difficilmente esso spiega come le mutazioni che ne alterano il processamento del messaggero, disequilibrando il rapporto molare tra le isoforme selvatiche, possano causare la morte neuronale.

Infatti, come già riportato, le mutazioni associate alla FTDP-17 sono suddivise in due classi. Un gruppo consiste di sostituzioni aminoacidiche che mappano nella regione di legame ai microtubuli, o nelle immediate vicinanze delle sequenze note controllare l’affinità e l’interazione al citoscheletro (Spillantini et al., 1998; Hutton et al., 1998; Clark et al., 1998; Butner et al., 1991; Goode et al., 1997; Lee et al., 1998, Goedert et al., 2005; Brandt et al., 1993). L’altro gruppo invece altera il processamento alternativo del messaggero, e quindi l’assetto d’ espressione delle proteine tau selvatiche (Hutton et al., 1998; D’Souza et al., 1999). Mentre, in condizioni fisiologiche di normalità, nel cervello adulto sono espressi pari ammontari di isoforme di tau a quattro ripetizioni e isoforme a tre ripetizioni, tali mutazioni patologiche causano un significativo aumento di tale rapporto a favore delle isoforme più lunghe, che rappresentano circa il 75% del totale, contro le isoforme più leggere, che sono soltanto il 25% (D’Souza et al., 1999; Hong et al., 1998). E’ importante sottolineare che tali mutazioni non alterano la sequenza aminoacidica delle proteine tau codificate, poiché cadono tutte in sequenze spaziatriche introniche, di regolazione del processamento del messaggero, o in sequenze silenti.

Il secondo modello o “*effetto-dosaggio/loss of function*”, che ritiene che sia l’incapacità funzionale di tau nel regolare il dinamismo dei microtubuli a causare la disfunzione e quindi la morte neuronale, è supportato dalle seguenti evidenze sperimentali: (a) numerosi lavori riportati in letteratura indicano, come una corretta regolazione del dinamismo dei microtubuli sia essenziale per mantenere le funzioni cellulari indispensabili per la sopravvivenza e tau, appunto, è un potente modulatore della flessibilità del citoscheletro (Drechsel et al., 1992; Trinczek et al., 1995; Goode et al., 1997; Panda et al., 1999; Panda et al., 2003; Bunker et al., 2004; Panda et al., 1995); (b) accurate analisi meccanicistiche dimostrano che, sia le sostituzioni aminoacidiche, che direttamente alterano la struttura primaria di tau, che le mutazioni nelle sequenze regolative del processamento del messaggero, tutte influenzano il dinamismo dei microtubuli cellulari, in misura sufficiente a causare una marcata morte neuronale (Panda et al., 2003; Bunker et al., 2004); (c) sia le mutazioni di sostituzione aminoacidica che quelle di alterazione del processamento del messaggero, causanti lo sbilanciamento del fisiologico rapporto 4R/3R delle isoforme di tau e tutte associate geneticamente alla FTDP-17, conducono ad una progressiva neurodegenerazione, diminuendo l’abilità di tau nel regolare appropriatamente il dinamismo dei microtubuli cellulari (Bunker et al., 2006). Diversamente, i detrattori di tale modello riportano che l’espressione di molecole tau mutanti, recanti le sostituzioni aminoacidiche associate geneticamente alla FTDP-17 in diversi

modelli animali di topi transgenici, causano spesso un fenotipo più severo che l'espressione, a livelli comparabili, delle molecole tau selvatiche (Lewis et al., 2000; Gotz et al., 2001). Ciò non è compatibile con la totale perdita della funzione biologica di tau indotta dalle mutazioni genetiche di sostituzione aminoacidica, anche se i dati sui modelli animali transgenici sono spesso complicati dai differenti contesti genetici, dalle difficoltà relative al controllo dei livelli d'espressione del costrutto genico inserito e, soprattutto, dalle numerose osservazioni contrastanti riportate.

Il terzo modello, che prevede che gli aggregati neurofibrillari non sono né causa esclusiva né effetto, ma contribuiscono alla morte neuronale sequestrando la tau endogena e così causando una inappropriata regolazione del dinamismo dei microtubuli, può forse essere considerato il migliore: tale modello infatti non richiede che gli aggregati esercitino un diretto effetto neurotossico, ma soltanto che si formino. Inoltre, esso facilmente concorda con l'osservazione che le proteine tau mutate, associate alla FTDP-17, possano essere più citotossiche che le rispettive proteine tau selvatiche, poiché le forme di tau mutate spesso formano in vitro fibre più rapidamente che non quelle selvatiche (Gamblin et al., 2003). Comunque, come per quello 1, anche tale modello concorda meglio con le mutazioni di sostituzione di tau che non con quelle che ne alterano il processamento del messaggero, perché entrambi non spiegano se sbilanciati rapporti delle proteine tau selvatiche sono più proni a formare o meno gli aggregati neurofibrillari. Inoltre, tale modello non spiega la citopatogenicità di una mutazione nel gene umano causante una tauopatia familiare, con caratteristiche di significativa perdita neuronale, in completa assenza di aggregati proteinacei. E' però probabile che, il ridotto ammontare della proteina tau funzionale (causato sia dalla perdita di un allele nella FTDP-17, che dal sequestro di una quota aggiuntiva di tau funzionale negli aggregati) contribuisca esclusivamente alla progressione del disordine. E' probabile infine che, un singolo modello sia insufficiente per spiegare il meccanismo della morte neuronale tau-indotta attribuibile, sia alle mutazioni per sostituzione aminoacidica, che a quelle di alterazione della maturazione del trascritto.

E' probabile poi che l'effetto neurotossico sia esercitato non dagli aggregati inerti, ma bensì dalla forma solubile di tau iperfosforilata (Slow et al., 2006). Diversamente dalla tau solubile iperfosforilata ma non polimerizzata, gli aggregati insolubili sono inerti: con la progressione del disordine, tali lesioni possono accrescersi in dimensioni ed eventualmente possono fisicamente ostruire il fisiologico metabolismo cellulare, fino a causarne la morte. Per neutralizzare la capacità della tau patologicamente iperfosforilata di sequestrare le normali proteine MAPs e causare così il disassemblaggio dei microtubuli, i neuroni affetti attivano un meccanismo cellulare di compensazione che ne promuove l'aggregazione reciproca nei grovigli neurofibrillari insolubili. Tale ipotesi dunque, di un possibile ruolo di auto-difesa nella formazione degli aggregati cellulari (Lee et al., 2005), concorda con l'osservazione che i neuroni positivi per essi sembrano sopravvivere per molti anni (Morsch et al., 1999). E' stato infatti dimostrato che, i deficit cognitivi (memoria ed apprendimento) osservati in un modello di topo transgenico con evidente formazione di filamenti non sono associati alla presenza di tali aggregati polimerici di tau (Santacruz et al., 2005), in accordo con precedenti dati sul moscerino *Drosophila* (Wittmann et al., 2001). In particolare, Santa-Cruz et al. (Santacruz et al., 2005) costruiscono topi transgenici per tau, con un'espressione ristretta nel proencefalo ed inducibile, in quanto sotto il controllo del promotore doxociclina-sopprimibile: tali mutanti appunto sviluppano numerosi evidenti NFT, una progressiva disfunzione motoria, ed esibiscono una significativa perdita ponderale e di massa nervosa. Se però il transgene tau è spento al quarto mese di età, gli aggregati insolubili continuano ad accumularsi, ma la perdita neuronale è arrestata e le capacità di apprendimento negli animali migliorano significativamente. A supporto di tale ipotesi, vi sono inoltre recenti esperimenti in cui si dimostra che la transfezione della E3-ubiquitin-ligasi CHIP causa la marcata formazione degli aggregati intracellulari di tau iperfosforilata, e parallelamente ne riduce la tossicità in vitro: pertanto, ciò suggerisce che la tau solubile iperfosforilata rappresenta la specie tossica responsabile della progressione dei disordini neurodegenerativi, senza alcuna necessità di formazione di più larghi aggregati proteinacei, che rappresenterebbero invece un pool biologicamente inerte, capace di

inattivare le più dannose specie solubili di tau. Infine, l'osservazione che i pazienti affetti da FTDP-17 esibiscono un'estesa neurodegenerazione con alti livelli di tau iperfosforilata, ma mostrano solo pochi aggregati insolubili (Bird et al., 1999), ulteriormente disaccoppia la formazione degli aggregati dalla neurotossicità tau-indotta e supporta l'ipotesi che, più che i PHF, altre forme della proteina siano tossiche, quali ad esempio gli intermedi d'aggregazione o piccoli oligomeri solubili. In un lavoro del 1997, Alonso et al. (Alonso et al., 1997) riportano che la tau iperfosforilata sequestra la normale tau e le altre proteine microtubuli-associate MAP1 e MAP2 causando così il disassemblaggio dei microtubuli. Recentemente poi, tali autori (Alonso et al., 2006) identificano la specie solubile di fosfo-tau, ma non i singoli filamenti o i PHF aggregati, isolati tutti dai cervelli post-mortem di pazienti AD, come capaci di legare la proteina tau e di inibire parallelamente l'assemblaggio dei microtubuli in vitro. L'aggiunta delle specie solubili di tau fosforilate, ma non delle forme fibrillari aggregate, inibisce l'assemblaggio dei microtubuli negli estratti acellulari. Infine, essi dimostrano che la tau umana ricombinante, dopo fosforilazione e polimerizzazione in vitro, perde l'abilità a legare la tau normale, ma tale capacità è significativamente recuperata dopo la rottura delle strutture fibrillari per sonicazione. Analoghi risultati sono ottenuti utilizzando fosfo-tau solubile, isolata dai cervelli AD ed aggregata in vitro. Tali risultati ulteriormente supportano l'ipotesi che le mutazioni geniche associate alle tauopatie, quali FTDP-17, o i processi patogenetici implicanti anche il peptide A $\beta$ , tipici dell'AD ed associati ad una diminuzione dell'attività delle fosfatasi, rendono la proteina tau un migliore substrato per le chinasi, causando così un accumulo intracellulare delle forme citosoliche iperfosforilate. Tali varianti patologiche, sequestrando la tau neuronale fisiologica, causano la distruzione dei microtubuli, per progressivo disassemblaggio del citoscheletro. Con l'avanzare poi della malattia e parallelamente all'aumento dei livelli di fosfo-tau, la proteina comincia ad aggregarsi nei PHF, perdendo conseguentemente la sua attività inibitoria. I PHF che si accumulano nel corpo cellulare, sebbene inizialmente neuroprotettivi, sono potenzialmente deleteri allorché tali lesioni diventano così estese da compromettere la normale fisiologia cellulare. Ciò dimostra dunque che le specie tossiche di tau sono le forme citosoliche iperfosforilate e non quelle fibrillari, con una marcata attività d'inibizione dell'assemblaggio dei microtubuli. Infine, tali dati suggeriscono che gli approcci terapeutici devono essere finalizzati, più che a revertire l'aggregazione, a bloccare o a prevenire l'interazione delle forme solubili ed iperfosforilate di tau con le normali proteine associate ai microtubuli. E' stato infatti recentemente riportato che un inibitore di protein chinasi K252a, oralmente biodisponibile e capace di penetrare la barriera emato-encefalica, se somministrato ai topi transgenici P301L tau (JNPL3) significativamente riduce gli aggregati solubili iperfosforilati di tau, ma non le inclusioni neurofibrillari a più alto peso molecolare, e parallelamente previene la comparsa dei severi deficit motori associati al fenotipo mutante (Le Corre et al., 2006).

Le sei isoforme della tau umana sono differenzialmente sequestrate da AD P-tau in vitro. L'associazione, in termini di efficienza in vitro, di AD P-tau alla normale tau umana ricombinante è 4R2N>4R1N>4R e 3R2N>3R1N>3R ed infine 4R2N>3R2N. Ciascuna isoforma fosforilata inibisce l'assemblaggio e distrugge i microtubuli pre-assemblati con ciascuna isoforma di tau, con un'efficienza che corrisponde direttamente al grado d'interazione con quelle isoforme. L'iperfosforilazione in vitro della tau umana ricombinante la converte in uno stato AD-P-simil, che mostra una forte capacità di sequestrare la normale tau ed inibire l'assemblaggio dei microtubuli (Alonso et al., 1997). Il preferenziale sequestro delle isoforme 4R e delle isoforme con inserti amino-terminali spiega (a) perché il cervello fetale (la tau fetale è 3R 0N) è protetto dalla patologia neurofibrillare di Alzheimer, (b) perché le mutazioni introniche, che cosegregano con casi familiari di FTDP-17 e risultano in un'alterata maturazione del messaggero di tau e quindi in un aumento del rapporto molare 4R/3R, conducono ad una degenerazione neurofibrillare associata ad una marcata perdita neuronale.

In vitro, ad un rapporto stechiometrico di circa 4 la tau iperfosforilata sequestra quella normale, ma è richiesto un rapporto stechiometrico ben superiore, pari circa a 10, perché essa possa aggregare reciprocamente nei filamenti. Inoltre, in conseguenza della formazione degli aggregati insolubili, la

proteina tau perde l'abilità di sequestrare la forma normale, indicando che la formazione dei filamenti può rappresentare una risposta cellulare di auto-difesa da parte dei neuroni affetti (Iqbal et al., 2005).

Mentre i dati nei sistemi acellulari, di saggi di legame ed assemblaggio dei microtubuli, concordano con l'ipotesi che gli eventi d'iperfosforilazione patologica riducono l'abilità di tau nel controllare il dinamismo dei microtubuli, causando la conseguente destabilizzazione e rottura del citoscheletro, tale evidenza sperimentale non è poi così chiara per le mutazioni in tau associate alla FTDP-17. Gli esperimenti, eseguiti in diversi modelli cellulari ed animali, di un'aumentata espressione di tau e/o una modulazione del suo stato di fosforilazione, confermano che tau promuove la polimerizzazione della tubulina e la stabilizzazione dei microtubuli con una modalità fosforilazione-dipendente. Gli esperimenti invece disegnati per studiare la funzione endogena di tau danno risultati spesso contrastanti, così che l'ipotesi che i microtubuli siano destabilizzati in conseguenza della deplezione funzionale di tau non è completamente provata. Inoltre, i dati ottenuti nei sistemi acellulari, nei quali gli aggregati di tau sequestrano le MAPs promuovendo il collasso dei microtubuli, non sono stati completamente validati in vivo. L'analisi poi dell'effetto della fosforilazione sulla funzione biologica di tau, nei modelli animali, evoca effetti contrastanti specie-specifici. Nel topo, l'aumentata fosforilazione riduce l'interazione di tau ai microtubuli e recupera dall'assonopatia tau-indotta. Invece, nel dittero *Drosophila*, l'effetto neurotossico è esacerbato dopo l'aumentata espressione di protein-chinasi modificanti tau. In tutti gli invertebrati e nei modelli animali di roditori, l'aumentata espressione delle varianti umane mutate di tau, geneticamente associate a casi familiari di FTDP-17, evoca effetti marcatamente più tossici che la forma selvatica non mutata. Le prove a favore di un effetto neurotossico esercitato dalle forme solubili di tau iperfosforilate sono fornite invece da recenti esperimenti in cui l'espressione di CHIP o E3-ubiquitin-ligasi causa l'evidente formazione degli aggregati insolubili di tau iperfosforilati, e contestualmente ne riduce la tossicità cellulare. Ciò suggerisce che gli aggregati di tau provvedono al sequestro e alla detossificazione della tau solubile ed iperfosforilata, che è invece la forma più altamente neurotossica.

In conclusione, nonostante l'analisi dei numerosi modelli cellulari e animali, non vi è ancora una teoria conclusiva sull'effettivo ruolo della proteina tau nell'induzione di neurodegenerazione. Sono pertanto ancora necessari, sia ulteriori modelli cellulari disegnati specificatamente per saggiare tau in un più autentico contesto, che modelli animali che ricapitolino tutta la patologia di tau .

## **MATERIALI E METODI**

### **-Materiali**

(+)-MK-801 [dizocilpine hydrogen maleate, (5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate], GYKI52466 [1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7-8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepinehydrochloride], e memantine hydrochloride (3,5-dimethylamantadine hydrochloride) sono forniti da Sigma-Aldrich. Ifenprodil hemitartrate [2-(4-benzylpiperidino)-1-(4-hydrophenyl)-1-propanol hemitartrate], calpeptin (N-benzyloxycarbonyl-L-leucylnorleucinal) e CNQX sono forniti da Tocris Bioscience (Bristol, U.K.). UO126 [1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthiobutadiene)] e PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone) sono forniti da Calbiochem. Ac-DEVD-MCA e Ac-VEID-MCA sono forniti da Biomol (Plymouth Meeting P.A., U.S.A.), gli enzimi superossido dismutasi (EC 1.15.1.1), catalasi (EC 1.11.1.6) sono provvisti da Sigma. Anticorpi utilizzati in tale lavoro: gli anticorpi policlonali (coniglio) diretti contro la  $\beta$ -galattosidasi batterica e contro la subunità NMDAR1 sono forniti da Chemicon International Inc.; C17, un anticorpo policlonale (capra) fosforilazione-indipendente che riconosce l'estremità COOH-terminale della proteina tau, l'anticorpo monoclonale mAb 9E10, l'anticorpo policlonale (coniglio) contro l'epitopo myc (A14), l'antisiero (coniglio) contro Akt1/2 sono forniti da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA U.S.A.); l'anticorpo monoclonale defosforilazione-dipendente mAb TAU-1 è fornito da Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany); gli anticorpi monoclonali fosforilazione-dipendenti mAb PHF-1 (Greenberg and Davies, 1990), PHF-6 (Hoffman et al., 1997) e mAb AT8 (Goedert et al., 1993) sono stati gentilmente forniti da Dr. V. Lee (Dipartimento di Patologia e Laboratorio di Medicina, Università di Pennsylvania Scuola di Medicina, Philadelphia, PA U.S.A.); l'anticorpo monoclonale mAb  $\beta$ -actina, l'anticorpo policlonale fosforilazione-dipendente contro P(262)-tau ed infine l'anticorpo policlonale (coniglio) diretto contro il frammento attivo della calpaina-1 (cleaved-calpain-I) sono forniti da Sigma; gli anticorpi policlonali (coniglio) diretti contro P-CREB, ERK, ERK-P1/2, P-AKT1/2 (Ser 473) e contro il frammento attivo della caspasi-3 (Asp 175) (cleaved-Caspase-3) sono forniti da Cell Signaling (New England, Biolabs Ltd.)

### **-Costruzione e purificazione di vettori adenovirali ricombinanti**

I plasmidi cDNA, codificanti per l'isoforma più lunga della tau umana (htau40) e per i frammenti aminoterminali sono generati per amplificazioni a catena della DNA polimerasi (PCR), usando come template il vettore tau40pSG5 (Canu et al., 1998). La numerazione dei frammenti tau-derivati è relativa alla più lunga isoforma umana di tau (tau 40). L'oligonucleotide innesco 5' per tau (1-441), tau (1-230), e tau (1-44) è

5'-AGCTGAATTCAATGGCTGAGCCCCGCCAG-3',

mentre gli oligonucleotidi innesco 3' sono rispettivamente:

5'-GACCGCTCGAGTCACAAACCCTGCTTGGC-3',

5'-GACCGCTCGAGTCAACGGACCACTGCCAC-3',

5'-GACCGCTCGAGTCACAGGCCAGCGTCCGTGTC-3'.

Gli oligonucleotidi innesco contengono siti di restrizione per EcoRI(5') e XhoI(3') per il clonaggio inserzionale nel vettore plasmidico pCS2+MT digerito con EcoRI-XhoI, a valle e in fase traduzionale con 6 ripetizioni codificanti per myc-epitopi (Roth et al., 1991). I vettori adenovirali del sierotipo Ad5 replicazione-difettivi, codificanti per l'isoforma più lunga della tau umana e per frammenti derivanti dal dominio amino-terminale, sono preparati utilizzando il sistema d'espressione adenovirale (Adeno- X expression system) fornito da Clontech (Palo Alto, CA, USA).

In breve, l'assemblaggio e la produzione di vettori adenovirali ricombinanti è raggiunta in tre fasi. Le cassette di cDNA codificanti per la tau umana sono sottoclonate nel vettore pShuttle (XbaI ad estremità tronche- KpnI) dopo digestione (BamHI ad estremità tronche- KpnI) da pCS2+MT, necessario per l'amplificazione e la propagazione in E.coli. Successivamente la cassetta d' espressione viene rimossa per escissione enzimatica e trasferita nel DNA del vettore adenovirale, mediante reazione catalizzata dalla T4 DNA ligasi in vitro. Infine, il plasmide adenovirale ricombinante con l'epitopo myc aminotermine, è impacchettato in particelle virioniche infettive, mediante transfezione lipofectamina-mediata di cellule 293 di rene embrionale umano (HEK 293-*human embryonic kidney epithelial cell line*-) E1-immortalizzate. Il mezzo di coltura è sostituito con mezzo di crescita contenente 0,6% di agar nobile 4 h dopo la transfezione. Le placche di lisi isolate sono raccolte e i vettori adenovirali sono amplificati per successivi cicli amplificatori di infezione su monostrato di HEK 293 piastrate di fresco. I vettori adenovirali ad alto titolo ( $2 \times 10^8$ ) sono purificati per centrifugazione su gradiente di CsCl e congelati (Graham et al., 1973; Rosenfeld et al., 1992). La determinazione del titolo adenovirale è eseguita mediante saggio funzionale di infezione e per conta delle placche di lisi su monostrato di HEK 293. Aliquote di vettori adenovirali, purificati ed ad alto titolo infettivo, sono crioconservati a  $-70^\circ\text{C}$  fino all'uso.

I vettori adenovirali esprimenti l'enzima batterico  $\beta$ -galattosidasi (AdLacZ) e la proteina antiapoptotica Bcl2(AdBcl2) sono gentilmente provvisti dal Dr. Marco Crescenzi (Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma), mentre il vettore adenovirale codificante per l'inibitore peptidico di ratto (isoforma di 593-aa) della calpaina- calpastatina (AdCALP)- è provvisto dal Centro di Servizio di Ricerche Biomediche, Stato di New York a Buffalo.

### **-Allestimento di colture primarie di neuronali**

Colture arricchite in granuli sono state ottenute da cervelletti di ratti Wistar (Charles River, Calco Italia) di 8 giorni o da topi ERK-/- di 6 giorni, come descritto da Levi et al., (1984). Brevemente, i cervelletti vengono triturati meccanicamente in frammenti di 0.4mm e sospesi nella soluzione di Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), addizionata con Albumina Bovina (BSA, Sigma) 3mg/ml e  $\text{MgSO}_4$  1.2mM; dopo una rapida centrifugazione a 1500xg, il tessuto è risospeso nella stessa soluzione, contenente ora tripsina 0,25mg/ml, e successivamente incubato a  $37^\circ\text{C}$  per 15 min. Infine, la sospensione cellulare è addizionata con la soluzione KRB contenente DNAasi (Sigma)  $80\mu\text{g/ml}$ , l'inibitore della tripsina (Sigma) 0.5mg/ml e  $\text{MgSO}_4$  2.7mM ed è dissociata meccanicamente con pipetta pasteur. Dopo 10 min di sedimentazione, si raccoglie il supernatante e si procede ad una seconda dissociazione meccanica del sedimento. I due supernatanti così ottenuti sono aggiunti alla soluzione KRB, addizionata con BSA 3mg/ml,  $\text{MgSO}_4$  2.4mM e  $\text{CaCl}_2$  0.1mM, e si lasciano sedimentare per altri 10 min. Dopo una centrifugazione di 10 min a 1500xg, le cellule sono risospese nel terreno di coltura.

Le cellule sono state piastrate in BME (Basal Medium Eagle, Life Technologies) aggiunto di 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Life Technologies inattivato per 30 min a  $56^\circ\text{C}$ ), 25mM KCl, gentamicina (Life Technologies)  $100\mu\text{g/ml}$  e glutammina (Sigma) 2mM, su piastre da 24 pozzetti (Costar) pretrattate per 20 min con una soluzione poli-L-lisina (Sigma) 5-10 $\mu\text{g/ml}$ , ad una densità di  $0.5 \times 10^6$  cellule per pozzetto. Per prevenire la proliferazione di cellule gliali non-neuronali, 18-22 ore dopo il piastramento è stato aggiunto al mezzo di coltura  $1\beta$ -Arabinofuranosilcitosina  $10\mu\text{M}$ . Le piastre di coltura sono state incubate a  $37^\circ\text{C}$  in un'atmosfera 95%aria/5% $\text{CO}_2$ .

Colture primarie arricchite al 95% di neuroni cerebrali corticali sono preparate da embrioni a 17 giorni da ratte Wistar gravide (Charles Wistar, Calco Italia) come precedentemente riportato (Pillot et al., 1999). Brevemente, le cellule dissociate sono piastrate a densità di  $10^5$  cellule/cm<sup>2</sup> su piastre di plastica o vetrini portaoggetti di vetro precedentemente trattati con poli-DL-ornitina (1.5 o 15 µgrammi/ml, rispettivamente). I neuroni corticali sono coltivati in mezzo di coltura Eagle modificato da Dulbecco, addizionato di mezzo privo di siero/F12 nutriente-mix in rapporto 1:1 supplementato con 500nM insulina, 60µmolare putrescina, 100µM transferrina, 100nM progesterone e 0,1%(w/v) ovoalbumina. Le colture sono mantenute a 37°C in un'atmosfera 95%aria/5%CO<sub>2</sub>.

### **-Allestimento colture CGC per induzione di apoptosi da rimozione di KCl**

Colture arricchite in granuli sono state ottenute da cervelletti dissociati da ratti Wistar di 8 giorni, come descritto da Levi et al.,(1984).

Le cellule sono seminate in BME (Life Technologies) addizionato con 10%FBS (Life Technologies), 25mM KCl, 100µg/ml gentamicina (Life Technologies) e 2mM glutamina (Sigma). Per impedire la proliferazione di cellule non-neuronali, tutte le colture sono state addizionate con AraC 10µM (Sigma), 18-22 ore dopo il piastramento. A 6 giorni (DIV) le cellule sono mantenute in SK25, o spostate in SK5. Dopo 24 ore è saggiata la percentuale di sopravvivenza, per conta dei nuclei intatti e per saggio colorimetrico MTT.

### **-Infezione di colture primarie neuronali**

Per l'infezione dei granuli del cervelletto, sono utilizzate colture primarie da ratti a 8 giorni post-natali tenute in piastra per ulteriori 4 giorni, come precedentemente riportato (Amadoro et al., 2004). Il volume del mezzo di coltura è ridotto di un terzo e il virus ricombinante è aggiunto direttamente alla molteplicità d' infezione indicata. Dopo l'adsorbimento del virus al recettore di membrana per 1h, il mezzo è riportato al proprio volume originale. I neuroni sono ulteriormente coltivati per ulteriori 2 giorni in vitro, allorché sono effettuati gli esperimenti (6 giorni in vitro).

Per l'infezione dei neuroni di corteccia cerebrale, sono utilizzate invece colture primarie ottenute da espianti di embrioni di 16-17 giorni da ratte gravide, e tenute in piastra per ulteriori 6-7 giorni

### **-Immunofluorescenza**

Per l'immunofluorescenza di epitopi myc-tau, 2 giorni dopo l'infezione le colture neuronali sono fissate utilizzando un protocollo combinato di fissazione ed estrazione (0,3% glutaraldeide, 0,5% NP40, 80mM PIPES/KOH pH 6,8, 5mM EGTA e 1mM MgCl<sub>2</sub>) a 37 °C per 10 min (Lee G.J. et al., 1997).Dopo trattamento con NaBH<sub>4</sub> e blocco dei siti aspecifici di legame con 5% siero di capra, le cellule sono incubate con l'anticorpo primario mAb 9E10 (1:200, Santa Cruz) a temperatura ambiente 1h. Per l'estrazione della frazione di tau non legata al citoscheletro, i neuroni sono lavati con PBS, trattati con 0,1% Triton X-100 nel buffer di estrazione (80mM PIPES/KOH pH6,8, 1mM EGTA, 30% glicerolo, 1mMGTP) per 30 sec e successivamente fissati con glutaraldeide (0,3% glutaraldeide, 80mM PIPES/KOH pH 6,8, 5mM EGTA e 1mMMgCl<sub>2</sub>) dopo lavaggio con il buffer di estrazione e poi con PBS. Tutti i trattamenti sono effettuati a 37°C. La linea cellulare canina MDCK è doppiamente immunocolorata con l' anticorpo monoclonale anti-tubulina (1:2000 Sigma, St.Louis MO, USA) e con un anticorpo policlonale (coniglio) anti-

myc (1:200 Santa Cruz) per 1h a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi in PBS, la linea è controcolorata con anticorpo secondario fluorocromo-coniugato (FITC e TRITC, Sigma St. Louis, MO USA) per 30 min. Le doppie immunocolorazioni sono visualizzate ed analizzate per microscopia confocale a fluorescenza.

Per l'immunocolorazione del frammento attivo della caspasi 3 nei neuroni tau-infettati, le colture neuronali sono fissate con 4% (w/v in PBS 1X) paraformaldeide per 15 min a temperatura ambiente (Amadoro et al., 2004). Le cellule sono lavate in PBS 1X pH 7.5, e successivamente permeabilizzate con 0,2% TritonX-100 - 0.1M Tris-HCl pH 7,4 per 5 min. I vetrini partaoggetto su cui giace il monostrato cellulare, sono saturati con 3% siero di capra in PBS 1X per 3h e successivamente sono incubati per l'intera notte con l'anticorpo policlonale diretto contro il frammento attivo della cistein- proteasi caspasi-3 (1:50, Cell-Signaling). Infine i vetrini sono esposti all'anticorpo monoclonale 9E10 (1:100, Santa Cruz) per ulteriori 30 min, mentre i nuclei sono colorati con Hoechst 33258(Sigma, St.Louis, MO USA) 0,5mg/ml in PBS per 5 min.

### **-Analisi di estratti proteici per Western Blotting**

Gli estratti proteici totali sono ottenuti lavando il monostrato cellulare con PBS , raccogliendo in un buffer di lisi SDS-riducente e successivamente denaturando i campioni mediante bollitura per 5 min. La concentrazione delle proteine è determinata spettrofotometricamente mediante saggio colorimetrico, utilizzando il sistema DC Protein Assay (BioRad). Pari ammontari di proteina (30µgrammi) sono caricati su gel continui SDS-PAGE alla concentrazione di acrilamide opportuna, o su gradienti lineari 7.5%-/15%, e risolti elettroforeticamente sulla base del peso molecolare (Laemmli et al.,1970). Dopo elettro-trasferimento su membrana di nitrocellulosa (Hybond-C Amersham, Pharmacia), le proteine sono visualizzate utilizzando l'anticorpo primario appropriato. Tutti gli anticorpi primari sono diluiti in 0,5% (w/v) polvere di latte privo di grassi ed incubati con la nitrocellulosa per l'intera notte a 4 °C. Dopo incubazione con l'anticorpo secondario, diretto contro l'isotipo specifico e coniugato all'enzima perossidasi (diluizione a concentrazione opportuna in PBS) , le bande sono visualizzate mediante reazione di chemiluminescenza utilizzando il sistema ECL (Amersham, Alington, Heights, IL U.S.A.).

Le membrane sono preparate raccogliendo le cellule in un buffer di lisi contenente 10mM Tris-HCl, 2mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,5) addizionato di un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma), e successivamente centrifugati per 60 min a 100,000rpm in Airfuge per separare le membrane cellulari dalla frazione citosolica. Le membrane sono infine risospese in un buffer contenente 0,2% Triton X-100 e 0,2%Tween-20 e sonicate per 5 sec in ghiaccio con un sonicatore ad ultrasuoni. Equivalenti ammontari di proteine sono analizzati su SDS/7,5% poliacrilamide gel ed elettrotrasferiti su membrana di nitrocellulosa per 2h a 4°C (200mA). Le proteine sono visualizzate incubando le membrane a 4°C per tutta la notte con l'anticorpo primario appropriato, diluiti in 0,5% (w/v) polvere di latte privo di grassi e successivamente evidenziate per chemiluminescenza con l'anticorpo secondario perossidasi-coniugato.

### **-Colorazione dei nuclei cellulari per HOECHST 33258**

Colture di granuli cerebellari di ratto o di neuroni corticali cerebrali sono state fissate con paraformaldeide 4% (w/v in PBS 1X) per 15 min a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state poi lavate per 2 volte in PBS 1X pH 7.5, e permeabilizzate con Triton X-100 0.2%/ Tris HCl 0.1M pH 7.5 per 5 min. I nuclei sono stati infine marcati con l'agente intercalante HOECHST 33258 (Sigma), 1mg/ml in PBS 1X per 5min.

### **-Misura della sopravvivenza neuronale**

La percentuale di neuroni vitali è stata valutata contando il numero dei nuclei intatti dopo lisi cellulare in una soluzione contenente detergente (Bromuro di etylexadecildimethylammonio 0.5%, Acido Acetico 0.28%, Triton X-100 0.5%, NaCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, in PBS 1X pH 7.4) in base al metodo di Soto e Sonnenschein (1985) modificato da Volontè et al. (1994), o per saggio colorimetrico che si basa sulla capacità delle cellule vitali, sostenuta dall'attività enzimatica delle ossido-reduttasi mitocondriali, di ridurre il sale di tetrazolio MTT in un precipitato insolubile, come descritto da Manthorpe et al. (1986). In breve, il sale di tetrazolio (0.25 mg/ml) è stato aggiunto alla coltura neuronale ed incubato per 60-90 min a 37°C. Il mezzo di reazione è stato poi delicatamente aspirato ed i cristalli del precipitato di formazano prodotti sono stati solubilizzati in Isopropanolo/HCl 0.08M. La soluzione colorata così ottenuta è stata trasferita in piastre da 96pozzetti e l'assorbanza è stata stimata usando un Multiscan Plate Reader a 570 nm (LabSystem Multiskan MCC/340). L'intensità colorimetrica è direttamente proporzionale all'attività deidrogenasica mitocondriale delle cellule vitali.

### **-Immunoprecipitazione di mvc-tau (1-44)**

I neuroni tau (1-44) infettati sono lavati per tre volte in PBS freddo e lisati su piastra a 0°C per 20 min in 500µl IP buffer (50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 10% glicerolo, 0.5mM EDTA, 0.5mMEGTA, 50mM NaF, 1mM NaOV<sub>4</sub>, 1% NP40) addizionato di un cocktail di inibitore di proteasi e fosfatasi (Sigma). I lisati sono successivamente centrifugati a 4 °C per 10 min a 3000 rpm, e i relativi supernatanti sono incubati usando 20 µl di resina proteina A/proteina G-coniugata (Boehringer) per 1h a 4 °C. Gli estratti proteici sono poi immunoprecipitati secondo le procedure standard, utilizzando l'anticorpo monoclonale mAb 9E10.

### **-Saggi di attività di caspasi su substrati peptidici fluorogenici**

L'attività della caspasi-3 è misurata come descritto da Armstrong et al.,1997; in breve 500.000 granuli cerebellari sono lavati una volta in PBS 1X e lisati in 100µl di buffer A (10mM HEPES pH 7.4, 42mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT e 1mMPMSF, 0.5%3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid (CHAPS) e 1 mg/ml leupeptin). I lisati (25µl) sono uniti a 75 µl di buffer B (25mM HEPES, 1mMEDTA, 0.1% CHAPS, 10% saccarosio e 3mM DTT pH 7.5) contenente DEVD-MCA ed incubati per 20 min a temperatura ambiente.

L'attività della caspasi-6 è misurata come descritto da Allsopp et al., 2000; in breve, 40 µl di lisato di buffer A sono uniti con 200 µl di buffer B (25mM HEPES-KOH pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 5 mM MEGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% CHAPS, 10% saccarosio e 10mM DTT) contenente 20 µM di substrato specifico per la caspasi-6 Ac-VEID-MCA ed ulteriormente incubati a 37 °C per 30 min. La fluorescenza è misurata ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 380nm ed ad una lunghezza d'onda di emissione di 460nm, mediante un lettore a piastra Packard Fluorocount (Packard Bioscience Company).

### **-Esperimenti di silenziamento genico mediante oligonucleotidi antisenso**

L'oligonucleotide antisenso per la subunità NR1 del recettore NMDA è un ODN fosfodiesterico 18-mer (5'-CAG CAG GTG CAT GGT GCT-3') diretto contro il codone di inizio della sequenza del gene di ratto. Come riportato da precedenti lavori, tale oligonucleotide ODN è provato essere efficace e specifico (Wahlestedt et al.,1993). L'oligonucleotide non correlato, quale controllo negativo (5'- GAG CAG CTG CGT GAT GCT-3') ha lo stesso contenuto in G+C dell'oligonucleotide antisenso, ma differente sequenza. Nessuna identità con altre sequenze di roditori risulta da una ricerca in banca dati utilizzando il programma BLAST (Centro Nazionale per l'Informazione Biotecnologica, Bethesda MD). Entrambi gli oligonucleotidi contengono tre legami fosforotiodato all'estremità 3' e 5', mentre le estremità 5' sono coniugate alla fluoresceina per monitorare l'efficienza di transfezione. Gli oligonucleotidi sono aggiunti ai granuli del cervelletto a 3 giorni in vitro, utilizzando i liposomi cationici Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e, dopo 24h, le colture sono state infettate. I lisati cellulari per l'analisi proteica per Western blotting e i saggi di sopravvivenza neuronale sono stati effettuati dopo 48 di infezione.

### **-Analisi statistica dei dati**

I dati relativi a tre esperimenti indipendenti, con quattro determinazioni per condizione, sono normalizzati rispetto ai valori del solo veicolo (posto pari a 100%)

I valori sono espressi come la media +/-S.E. , mentre le differenze tra il controllo e i gruppi trattati sono analizzate utilizzando il test t-Student (Statview 4.01, SAS Institute, Cary NC). La significatività statistica è indicata dal valore di p:\* p<0,05; \*\* p<0,01.

## **RISULTATI**

### **-L'inserzione dell'epitopo myc in posizione amino-terminale dei costrutti codificanti per le proteine tau esogene non ne altera il legame ai microtubuli citoscheletrici**

Per validare l'utilizzo delle proteine esogene trasdotte dai costrutti Ad-myc-tau (fig.1) come specifiche proteine di fusione mimanti le funzioni biologiche della tau endogena nativa, noi preliminarmente verificammo se le sei ripetizioni dell'oncoproteina myc, inserite all'estremità aminoterminale dei costrutti genici, alterano o influenzano l'abilità intrinseca di tau di legare e/o codistribuire con i microtubuli citoscheletrici. Pertanto, considerato che la fine struttura dei microtubuli è difficilmente visibile ed apprezzabile in cellule neuronali a causa della ridotta superficie citoplasmatica e del largo nucleo (fig. 2), allestiamo esperimenti di infezione ed immunofluorescenza sulla linea cellulare canina MDCK (*Madin-Darby canine kidney cell line*) che meglio si presta a tal fine. In particolare, tali cellule sono infettate con i vettori Ad-myc-tau e , a 48h post-infezione, sono doppiamente immunocolorate con un anticorpo monoclonale diretto contro l' $\alpha$ -tubulina e con un anticorpo policlonale diretto contro l'epitopo myc marcante le proteine tau esogene. Come evidenziato dalla immunocolorazione per la tubulina (fig. 2a,b) solo il segnale relativo alla tau umana intera, o tau (1-441), codistribuisce con i microtubuli per tutta l'intera lunghezza. Diversamente, il segnale di immunoreattività relativo a tau (1-230) colocalizza solo in parte con la totale lunghezza dei microtubuli (fig. 2c,d), in accordo con la presenza in tale frammento di un unico sito di interazione e legame ai microtubuli di debole affinità (Brandt and Lee, 1993; Leger et al., 1994).Comunque, nelle MDCK-tau infettate la codistribuzione di tau (1-441) con i microtubuli non è prevenuta dopo rimozione della relativa frazione solubile (fig. 2 a',b'), mentre il segnale di immunoreattività relativo all'espressione di tau (1-230) è completamente eliminato da tale trattamento (fig.2 b',c'), indicando che tale dominio non è, o lo è solo debolmente, legato ai microtubuli citoscheletrici.

Tali osservazioni sperimentali indicano chiaramente che la proteina di fusione tau (1-441) lega i microtubuli, colocalizzando con essi con modalità indistinguibile dalla proteina nativa endogena, come già riportato per altre proteine marcate con tale epitopo (Leger et al., 1994; Kaech et al., 1996).

### **-Espressione delle proteine myc-tau in colture neuronali e relativa caratterizzazione**

Per studiare come il dominio amino-terminale della proteina tau influenza la sopravvivenza neuronale, sono stati clonati, in un vettore adenovirale per l'espressione in cellule neuronali, differenti cDNAs basati sulla sequenza genica dell' isoforma più lunga della tau umana. Per monitorare l'efficienza d' infezione nel nostro modello cellulare, ed inoltre come controllo sperimentale negativo, abbiamo utilizzato un costrutto adenovirale Ad-LacZ, codificante per la proteina batterica non correlata  $\beta$ -galattosidasi. Le colture neuronali di granuli del cervelletto sono state infettate a 4 giorni in vitro (D.I.V.) a molteplicità di infezione (M.O.I.) 30 con AdLacZ, e l'attività della  $\beta$ -galattosidasi è misurata dopo 48 h di transduzione. Mentre nelle colture di controllo non è rilevabile alcuna attività  $\beta$ -galattosidasica, nelle colture AdLacZ-infettate sono visibili circa il 60% di neuroni positivi per tale colorazione.

Successivamente testiamo l'espressione delle proteine tau esogene, mediante analisi di Western blotting ed immunocitochimica. Poiché i costrutti sono marcati con myc, l' espressione delle proteine tau trasdotte è valutata utilizzando l' anticorpo mAb 9E10, diretto contro tale epitopo, ed è successivamente comparata rispetto a quella della tau endogena, utilizzando l'anticorpo TAU-1. Come mostrato in figura 3a, i neuroni infettati a 30 M.O.I. con i vettori adenovirali codificanti per tau (1-230) e tau (1-441) esprimono le proteine esogene a livelli comparabili. Soltanto la proteina

tau umana intera tau (1-441) esibisce il peso molecolare atteso di 70KDa, mentre tau (1-230) corre a 50-52 KDa, un peso molecolare più alto di quello predetto in accordo con quanto già precedentemente riportato (Brandt et al., 1995). Successivamente per quantizzare l'ammontare della proteina tau esogena espressa, gli omogenati cellulari, sono preventivamente trattati con l'enzima fosfatasi alcalina prima della corsa elettroforetica su gel. Sia nelle cellule infettate con tau (1-441), che in quelle infettate con tau (1-230) a M.O.I. 30, i livelli d' espressione, monitorati con l'anticorpo de-fosforilazione dipendente TAU-1, sono di circa due volte più alti del relativo livello d'espressione della tau endogena, utilizzato come controllo interno per la normalizzazione. E' interessante osservare che, mentre la stima dell'ammontare di tau (1-441) e tau (1-230) è effettuata su lisati di  $2,5 \times 10^5$  neuroni, per avere un quantitativamente comparabile ammontare di tau (1-44), è necessario caricare su gel il lisato di  $2,5 \times 10^6$  neuroni. Ciò è probabilmente attribuibile, come sarà successivamente discusso, alla marcata azione neurotossica di tale frammento, con conseguente morte della gran parte dei neuroni transdotti.

L'analisi per microscopia confocale ad un fotone (fig. 3b), mostra che i neuroni esprimenti tau (1-441) esibiscono la tipica distribuzione di tau, che localizza nell'assone e in un sottile anello di citoplasma. Tale immunomarcatura è resistente al trattamento di rimozione della frazione solubile indicando, come precedentemente osservato nella linea cellulare MDCK, che tau (1-441) conserva la capacità di legare stabilmente i microtubuli citoscheletrici. L'overespressione di tau (1-230) risulta in una relativamente intensa immunocolorazione del corpo cellulare e del cono di emergenza assonale; tale marcatura non è resistente, ma è bensì rimossa dai trattamenti di estrazione della frazione proteica solubile non-legata ai microtubuli, come indicato nella figura 2. Diversamente, tau (1-44) esibisce una immunomarcatura uniforme lungo tutto il corpo cellulare, ad esclusione dei processi dendritici ed assonali, immunocolorazione che, come già riportato per tau (1-230), è sensibile al trattamento di estrazione della frazione non-citoscheletrica. Infine, l'espressione di tau (1-44) è rilevabile come un' intensa immunocolorazione solo durante una breve finestra temporale post-infezione, mentre tale marcatura a tempi più lunghi di transduzione decade fino progressivamente a scomparire. A 48 h dopo l'infezione, nessun o solo pochi neuroni sono positivi, probabilmente a causa della potente e rapida morte cellulare indotta da alti livelli d' espressione di tale subdominio amino-terminale di tau. Come risulta dalle analisi di immunofluorescenza, stimiamo infatti che circa il 50-60% dei neuroni è viralmente transdotto ed esprime i costrutti genici myc-tau, sebbene il livello d' espressione non è omogeneamente distribuito in tutte le cellule.

Successivamente studiamo se e come l'espressione di tau (1-230), tau (1-44), tau (1-441) altera la vitalità dei granuli del cervelletto. A tal fine, i neuroni sono infettati a 4 D.I.V. a differenti M.O.I. con i vettori adenovirali ricombinanti per tau. A 6 D.I.V., la sopravvivenza neuronale delle colture tau-transdotte è valutata sia biochimicamente, mediante saggio colorimetrico per MTT, sia morfologicamente, per conta dei nuclei intatti. Le colture di controllo sono sia, non infettate, che infettate con il vettore non correlato AdLac-Z. Come riportato in fig. 4a, moderati livelli di espressione di tau (1-230) e della tau umana intera, causano una modesta riduzione della vitalità neuronale compresa tra  $20 \pm 6,8$  e  $18 \pm 7,9$  ( $n=3$ ) rispettivamente, dopo 48h di infezione. Il vettore di controllo da solo causa una riduzione della sopravvivenza nell'intervallo di  $10 \pm 5,6$  ( $n=3$ ).

In contrasto, una significativa e marcata morte cellulare, che è proporzionale alla M.O.I. e quindi all'entità d' infezione, è osservata nei neuroni esprimenti tau (1-44). Infatti, la vitalità neuronale è drasticamente ridotta al 40%, già a basse molteplicità (M.O.I.10), e progressivamente declina fino al 10% a molteplicità d' infezione più alte (M.O.I.50), con livelli intermedi tra questi due estremi. E' interessante osservare che nessuno dei neuroni è 9E10-positivo.

E' stato recentemente dimostrato che l' espressione della più lunga isoforma della tau umana induce, in diversi modelli animali, neurodegenerazione e perdita neuronale, con una modalità tempo-dipendente (Hall et al., 1997; Hall et al., 2001; Jackson et al., 2002). Inoltre, è stato riportato che l'aumentata espressione di tau pseudofosforilata in cellule neuronali, causa morte apoptotica (Fath et al., 2002). Pertanto noi monitoriamo la vitalità neuronale (fig. 4b) e parallelamente valutiamo l'espressione delle proteine myc-tau (fig. 4c), a diversi tempi dopo l'infezione. I neuroni esprimenti

i costrutti tau (1-230), e tau (1-441), sono vitali nelle stesse condizioni di coltura, fino a 4 giorni dopo la trasduzione virale, non esibendo alcuna significativa alterazione della vitalità neuronale fino a 96h post-infezione rispetto alla sopravvivenza neuronale rilevata a 24h (fig.4b). Ciò indica che la vitalità neuronale rimane inalterata, nonostante l'ammontare della proteina tau esogena è costantemente elevato (fig.4c). Comunque, come rivelato da diversi e specifici anticorpi AT8, PHF1 e PHF6 (fig. 4d), l'espressione delle proteine tau esogene (tau1-441) e tau (1-230) nei granuli del cervelletto non è accompagnata ad un parallelo aumento degli epitopi AD-fosforilati, un evento che caratterizza significative alterazioni della sopravvivenza neuronale (Fath et al., 2002).

### **-Moderati livelli di espressione di tau (1-230) e tau (1-441) bloccano l'apoptosi nei granuli del cervelletto.**

In differenti modelli di apoptosi neuronale, la morte neuronale è accompagnata da deplezione funzionale di tau attiva, a causa delle modificazioni del suo stato di fosforilazione e/o dell' inattivazione proteolitica (Mills et al., 1998; Mookherjee and Johnson, 2001; Lorio et al., 2001; Stoothoff and Johnson, 2001). I granuli del cervelletto vanno incontro ad apoptosi, se il siero è rimosso (S-) e se la concentrazione extracellulare del potassio è ridotta a 5mM (K5), dopo un periodo iniziale di crescita in 23-40mM potassio (K25) e siero (S+) (Gallo et al., 1980; D'Mello et al., 1993; Galli et al., 1995). La vitalità dei granuli cerebellari è ridotta di circa il 50% a 24h, dopo l'esposizione allo stimolo apoptotico.

Come mostrato in fig.5a,b, aumentati livelli d' espressione di tau (1-441) e tau (1-230) inibiscono l'apoptosi, come saggiato attraverso due differenti parametri, quali saggio colorimetrico per MTT e conta dei nuclei Hoechst-positivi. Le misurazioni della vitalità neuronale a 24h nei neuroni Lac-Z-infettati mostrano che solo per il 43+/-7% i granuli spostati a S-K5 sono vitali, se comparati con colture neuronali di controllo spostate in parallelo a S-K25. Diversamente, i neuroni tau (1-441) e tau (1-230)-infettati sono recuperati dalla morte apoptotica, esibendo una sopravvivenza pari al 74+/-8% e 76+/-5% rispettivamente, allorché comparati a colture sorelle analogamente infettate e mantenute in terreno S-K25. E' interessante notare che, come preventivamente riportato, solo il 60% di tutti i neuroni trattati è infettato ed esprime la tau esogena. Così, è opportuno saggiare se i neuroni apoptosi-resistenti appartengono alla popolazione di cellule tau-infettate o non. Come riportato in fig. 5c, la quasi totalità dei neuroni myc-tau-esprimenti non è influenzata dalla deprivazione di potassio, ed è dunque apoptosi-resistente. Comunque, gli stessi neuroni myc-tau-esprimenti non sono Hoechst-positivi.

### **-Tau inibisce l'attivazione della pro-caspasi 3**

Per elucidare il meccanismo di neuroprotezione sostenuta da moderati livelli di espressione di tau (1-441) contro l'apoptosi neuronale, indotta nei granuli del cervelletto dopo rimozione di siero e concentrazioni depolarizzanti di potassio extracellulare, noi analizziamo inizialmente la cascata apoptotica. La fase di esecuzione dell'apoptosi è iniziata dall' azione coordinata e regolata di specifiche cistein-proteasi appartenenti alla famiglia delle caspasi (Steller, 1995), in particolare la caspasi-3 è principalmente coinvolta nel taglio proteolitico di selettivi substrati apoptotici (Cohen, 1997). L' attività di tale proteasi apoptotica effettrice è significativamente aumentata nell'apoptosi dei granuli del cervelletto in condizioni iperpolarizzanti (Eldadah et al., 1997; Canu et al., 2000).

Pertanto, noi analizziamo il probabile coinvolgimento di tau nella regolazione dell'attività della caspasi-3, saggiata spettrofluorimetricamente tramite misurazione del rilascio della componente fluorogena dal relativo peptide-substrato, dopo incubazione con lisati di granuli cerebellari indotti in apoptosi. Come indicato in fig. 6a, l'attività proteasica caspasi-3-simil, sia nelle colture

apoptotiche di controllo non infettate che in quelle esposte alle medesime condizioni sperimentali ma preventivamente infettate con AdLacZ, aumenta di circa 10 volte, come riportato (Armstrong et al., 1997). In contrasto, i granuli esprimenti moderati livelli di tau (1-230) e tau (1-441) esibiscono un più basso livello d'attivazione della caspasi-3 correlante con le crescenti M.O.I. utilizzate.

Successivamente, per determinare se tau inibiva l'attività della caspasi-3 o ne preveniva la sua attivazione, che necessita di un processamento proteolitico dello zimogeno inattivo nelle subunità attivate p17 e p12, esaminiamo l'iniziale attivazione della pro-caspasi-3 in risposta allo stimolo apoptotico. Marcando con un antisiero che specificatamente riconosce la forma tagliata, e quindi attiva, della caspasi-3, osserviamo che mentre le cellule esprimenti LacZ ed indotte in apoptosi sono fortemente immunoreattive, circa il 100% dei neuroni esprimenti tau (1-230) esposti contestualmente nelle stesse condizioni sperimentali non ne sono marcati, indicando appunto che il precursore procaspasi-3 rimane intracellularmente non tagliato (fig.6b). Analoghi risultati sono ottenuti nei neuroni esprimenti tau (1-441).

Di recente è stato riportato che l'inibizione farmacologica dell'attività della caspasi-6 da CP-VEID-cho previene l'attivazione della caspasi-3, nei granuli del cervelletto indotti in apoptosi (Allsopp et al., 2000): pertanto, noi investighiamo se, anche nei neuroni myc-tau-infettati, la modulazione della caspasi-6 altera l'attivazione della caspasi-3 effettrice. Mentre i neuroni di controllo esibiscono un aumento di circa due volte dell'attività della sopra menzionata proteasi, dopo circa 1h di esposizione allo stimolo apoptotico, a conferma di precedenti studi (Allsopp et al., 2000), l'attività della caspasi-6 è ridotta nei neuroni tau-infettati ed esposti nelle stesse condizioni apoptotiche (fig. 6c). Tali risultati sperimentali fortemente suggeriscono che, moderati livelli intracellulari di espressione di tau indirettamente sopprimono un evento comune a monte della cascata apoptotica che culmina con l'attivazione di proteasi caspasi-3-simil, più che direttamente inibirne l'attività.

### **-I neuroni esprimenti tau preservano alti livelli di P-Akt1/2 durante l'apoptosi**

Akt1/2 è una serin-treonin chinasi agente a monte della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), un enzima legante i lipidi di membrana coinvolto in importanti vie di trasduzione del segnale intracellulare, attivate da fattori di crescita e da depolarizzazione (Vaillant et al., 1999). L'attività della chinasi Akt1/2 è condizione necessaria e sufficiente per la sopravvivenza neuronale, ed è sostenuta da fosforilazione al residuo di Ser-473 da protein-chinasi a monte. Tale sito è rapidamente defosforilato, dopo induzione di apoptosi da deprivazione di potassio (Dudek et al., 1997; Miller et al., 1997). Successivamente, un set di substrati di Akt1/2 è libero di esercitare un'azione proapoptotica, con conseguente attivazione della cascata caspasi (Miller et al., 1997). Come riportato in figura 7a,b l'estensione di fosfo-Akt1/2, stimata sia mediante tecniche di immunocitochimica che mediante analisi di Western blotting, nei neuroni esprimenti tau (1-441) e tau (1-230) ed indotti in apoptosi, è mantenuta ad alti livelli. Diversamente nei neuroni apoptotici di controllo non infettati o infettati con AdLacZ, tale enzima è marcatamente defosforilato: ciò suggerisce che tau, probabilmente a livello della membrana plasmatica, esercita un modesto ruolo neuroprotettivo nell'apoptosi dei granuli cerebellari, supportando alti livelli di P-Akt1/2, e così indirettamente controllando la cascata delle caspasi.

**-La morte neuronale tau (1-44)-indotta è Bcl2 e caspasi-indipendente ed è parzialmente prevenuta da antagonisti del recettore NMDA e da antiossidanti**

Come mostrato in fig. 4, tau (1-44) esercita un effetto citotossico che è (1) potente, in quanto infezioni adenovirali a bassa M.O.I., e quindi ridotti livelli d' espressione intracellulare del transgene, evocano un massiva perdita neuronale, e (2) dose-dipendente, in quanto la percentuale di sopravvivenza diminuisce in misura inversa all'estensione e alla proporzione dei neuroni infettati. L'effetto neurotossico massimo, saggiato sia colorimetricamente, per MTT, che morfologicamente, per conta dei nuclei intatti, è raggiunto a M.O.I.50, allorchè solo il 10% di cellule rimane vitale dopo 48h di infezione. Poichè è riportato che Bcl2 è una proteina che gioca un ruolo chiave come regolatore della morte cellulare in differenti paradigmi neuronali, sia in vitro che in vivo, noi esaminiamo la risposta di neuroni co-esprimenti Bcl2 e tau (1-44). E' da sottolineare che Bcl2 è efficientemente espresso nei granuli del cervelletto infettati a M.O.I.30, ed è capace di proteggere i granuli del cervelletto dalla morte indotta da privazione di siero e potassio. Come riportato in fig.8a, i neuroni così co-transfettati vanno incontro a morte, a livelli comparabili ai neuroni transfettati con tau (1-44) da solo, suggerendo che la morte cellulare evocata dal sub-dominio N-terminale di tau è Bcl-2 indipendente e quindi di per sè non-apoptotica. Tale conclusione è ulteriormente supportata dall'osservazione che differenti inibitori dell'apoptosi dei granuli del cervelletto come IGF-1 (*insulin-like growth factor*) (25ng/ml), forskolin (10µM) (D'Mello et al., 1993; Galli et al., 1995), adenosina (10µM) (Vitolo et al., 1998) e il generale inibitore di caspasi z-VAD-fmk (100µM), aggiunti sia prima che dopo l'infezione, falliscono nel recuperare dalla morte i neuroni (tau1-44)-infettati (fig.8a). Comunque, non è possibile rivelare alcuna attività caspasi-3-simil a tempi differenti dopo l'infezione (fig.8b), e i neuroni tau (1-44)-infettati acquisiscono una morfologia di tipo necrotico, reminiscente della tossicità da glutammato. Poichè l'eccitotossicità, cioè la morte neuronale indotta da alte concentrazioni di glutammato extracellulare, è mediata prevalentemente dai recettori NMDA, noi successivamente investighiamo il possibile coinvolgimento di tali recettori nella morte tau (1-44)-indotta. A tal scopo, i neuroni tau (1-44)-infettati, come i neuroni di controllo non infettati o infettati con AdLacZ, sono trattati con antagonisti selettivi del recettore NMDA, come MK-801 e APV, a differenti concentrazioni, sia prima che dopo l'infezione. La sopravvivenza neuronale è saggiata colorimetricamente per MTT, sia a 24 che a 48h. Come riportato in fig. 9a, i due inibitori del recettore NMDA significativamente recuperano i neuroni transdotti dalla morte tau (1-44)-mediata. L'effetto neuroprotettivo è più massivo quando gli inibitori recettoriali sono aggiunti 1h prima dell'infezione, ed è più pronunciato con APV (200µM), un inibitore notoriamente più specifico per il recettore NMDA. Infatti, l'espressione di tau (1-44) evoca una morte neuronale pari al 65+/-5.7 % (n=3) saggiata a 24h. In presenza di MK-801 e APV, la morte è ridotta rispettivamente al 53+/-4.5% e al 30+/-3.5%. E' interessante infine notare che l'espressione di tau (1-44) in cellule non-neuronali come COS-7 (*African green monkey kidney cell line*) e MDCK, che sono prive di recettori NMDA, non sortisce alcun effetto neurotossico, ad evidenza che la morte tau-indotta è strettamente dipendente dall'attivazione del recettore NMDA. Dato che le specie ossigeniche reattive (ROS) giocano un ruolo importante nella tossicità glutammato-indotta (Lafon-Cazal et al., 1993; Dugan et al.,1995), sono stati poi allestiti esperimenti per saggiare l'efficacia di antiossidanti, sia enzimatici che farmacologici, nel proteggere i neuroni dalla morte neuronale tau (1-44)-mediata.

I neuroni sono pertanto incubati con differenti concentrazioni degli enzimi detossificanti, catalasi e superossido-dismutasi (SOD), dopo infezione adenovirale con Admyc-tau (1-44). Come riportato in fig.9b e c, i due enzimi, capaci di rimuovere i radicali liberi altamente neurotossici, sono parzialmente efficaci nel prevenire la morte cellulare indotta dall'espressione del peptide N-terminale di tau. Così, mentre l'espressione di tau (1-44) causa una morte neuronale pari al 63+/-7.2% (n=3) a 24h, in presenza di SOD e catalasi aggiunti separatamente, la perdita cellulare è ridotta al 37+/-6% (n=3).

### **-Alti livelli di espressione di tau sono neurotossici**

Da tali studi risulta che, moderati livelli d' espressione dell' isoforma più lunga della tau umana nei granuli del cervelletto, sebbene protettivi contro l'apoptosi indotta da concentrazioni iperpolarizzanti di potassio extracellulare (Amadoro et al., 2004), causano tuttavia un rapido aumento della morte neuronale, pari a circa il 20%, neurodegenerazione attribuibile probabilmente alla eterogenea distribuzione dei livelli d' espressione del transgene, e quindi ai più alti livelli della tau umana intera presente in una ristretta quota parte della popolazione neuronale. Per testare tale ipotesi, infettiamo i granuli del cervelletto a 4 D.I.V. a crescenti molteplicità d' infezione con Admyctau (1-441) e AdLac-Z, come vettore di controllo, e successivamente sagliamo la vitalità cellulare a 24 e a 48h dopo l'infezione. Verifichiamo, in accordo con quanto preventivamente ipotizzato, che l'espressione della tau umana intera induce una morte cellulare dose- e tempo-dipendente, e cioè che alti livelli d' espressione del transgene sono tossici (fig. 10 A). A 24h di infezione, circa l'83%, il 76%, il 63% e il 60% dei neuroni sono vitali, dopo transduzione del vettore adenovirale tau (1-441) rispettivamente a M.O.I.30, 60 120 e 200. A 48h, la vitalità è ulteriormente ridotta a valori del 75%, 70%, 55% e 53% rispettivamente. Diversamente, i neuroni infettati con il vettore di controllo sono vitali a tutte le M.O.I. utilizzate. Tali dati indicano chiaramente che la tossicità tau-indotta è dose-dipendente, e il più alto effetto è osservato quando il livello intracellulare della tau esogena transdotta è di circa 2.5 volte il livello di quella nativa endogena (fig.10 B). Analoghi risultati sono ottenuti in colture primarie di neuroni di corteccia cerebrale (fig. 10 C, D).

### **La tossicità tau -indotta è dipendente dall'attivazione del recettore NMDA**

Per caratterizzare biochimicamente la morte cellulare indotta dalla tau umana intera e per determinare un probabile coinvolgimento delle caspasi, abbiamo testato l'effetto neuroprotettivo di un pan-inibitore di caspasi Z-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk) nel modulare la vitalità, sia nei granuli del cervelletto che nei neuroni corticali infettati con tau (1-441) a M.O.I.120. Come riportato in tabella 1, z-VAD-fmk (100µM) è inefficace nel recuperare la perdita neuronale, suggerendo che tale modello di morte è caspasi-indipendente, come confermato inoltre anche dall'impossibilità di rilevare, sia per analisi di Western blotting (fig 11) che per immunocitochimica, il frammento tagliato, e quindi attivo della caspasi -3. Comunque, in esperimenti di co-infezione adenovirale l'espressione di Adbcl-2, un vettore codificante per una nota proteina antiapoptotica coinvolta in numerosi e differenti paradigmi di morte neuronale sia in vitro che in vivo, fallisce nel recuperare i neuroni tau (1-441)-infettati (tabella 1). Tali dati suggeriscono dunque che la modalità di morte neuronale tau-indotta, sia nei granuli cerebellari che nei neuroni corticali, non esibisce caratteristiche di classica apoptosi come preventivamente riportato da altri autori (Andorfer et al., 2005; Liazoghli et al; 2005; Yoshiyama et al., 2003). Analoghi risultati sono poi ottenuti in colture primarie di neuroni ippocampali, esperimenti alti livelli della tau intera umana. I granuli del cervelletto tau (1-441)-infettati acquisiscono una morfologia cellulare di tipo necrotico (aumento delle dimensioni cellulari, assenza di condensazione cromatinica nucleare) indicativa di una tossicità glutammato-mediata, che è sostenuta principalmente dal recettore NMDA (Sattler and Tymianski, 2001). In accordo con tale osservazione, tre diversi antagonisti del recettore ionotropo del glutammato di tipo NMDA, MK-801 (10µM), 2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) (100µM), e memantina (10µM), ma non 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2-3dione (CNQX) (40µM), un antagonista dei recettori ionotropici di tipo  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (*AMPA/kainite receptor*) e GYKY52466 (100 µM), un antagonista selettivo del recettore AMPA, sono capaci di proteggere i granuli del cervelletto dalla tossicità di tau (tabella1). Per ulteriormente confermare il ruolo del recettore NMDA nella morte tau-mediata, noi transfettiamo i granuli del cervelletto con un oligonucleotide

antisense (ODN-*oligodeoxynucleotide*) diretto contro la subunità recettoriale NR1 ed efficace e selettivo nel silenziamento del relativo gene bersaglio (Wahlestedt et al., 1993). Tale strategia consente di ridurre significativamente l'espressione di NR1 di circa il 50%, come verificato per analisi di immunoblotting (fig.10E). I neuroni trattati con l'ODN antisense per NR1 sono così protetti dalla tossicità-tau indotta (sopravvivenza 83+/-2.5% a 48h), mentre i neuroni trattati con l'ODN di controllo, non correlato, sono suscettibili alla tossicità di tau quanto i neuroni trattati con il solo veicolo ed infettati con alti livelli di tau(1-441) (sopravvivenza 51,8% e 55,5% +/- 3% a 48h, rispettivamente) (fig. 10F).

### **-Due diversi subdomini N-terminali della proteina tau mediano differenti tipi di tossicità neuronale**

Per mappare finemente ed identificare la minima regione di tau coinvolta nella tossicità NMDA-mediata, diversi frammenti del relativo dominio N-terminale sono stati clonati nei vettori adenovirali (fig.1) ed espressi nei granuli del cervelletto a differenti M.O.I. Tutti i frammenti influenzano, con modalità dose e tempo dipendente, la vitalità neuronale (fig. 12B). I più potenti sono tau (1-44), come già riportato, tau (26-44) e tau (26-230), che esibiscono il loro maggior effetto neurotossico a M.O.I. 50, con soltanto il 20% delle cellule vitali dopo 48h di infezione. In contrasto, per tau (1-156) e tau (45-230), la sopravvivenza è del 52+/-2,3% e del 72+/-1,8% (n=4) rispettivamente, a M.O.I. 120. Tutti i frammenti amino-terminali di tau, ad eccezione di tau (45-230), sono rapidamente tossici, anche alla più bassa molteplicità di infezione. Per il costrutto tau (45-230), la diminuzione della sopravvivenza diventa significativa ed apprezzabile soltanto a 48h, quando, a M.O.I. di 60 e 120 corrispondente ad un livello di espressione del transgene pari da 2 a 3 volte quello della proteina endogena, causa un 30% di morte, che rimane sostanzialmente invariato fino a 96h di infezione. E' interessante notare che il vettore codificante i primi 25 aminoacidi della tau umana risulta in una completa assenza di effetto neurotossico, anche alle più alte molteplicità di infezione (fig. 12). Ulteriormente caratterizziamo la neurotossicità indotta dall'espressione dei costrutti tau (1-44), come precedentemente già descritto, tau (26-230), tau (1-156) e tau (26-44) come direttamente mediata dal recettore NMDA: la reversibilità da parte di inibitori selettivi del recettore NMDA, l'assenza di tipici marcatori di apoptosi come per la forma lunga tau (1-441) (fig.11, 13), ne sono a supporto. Diversamente la tossicità neuronale esercitata da tau (45-230) non adeguatamente risponde né a criteri di classica apoptosi né a quelli di necrosi, suggerendo per la neurodegenerazione attivata dall'espressione di tale frammento di tau un meccanismo alternativo di morte. In conclusione, noi riportiamo che alti livelli d' espressione dell' isoforma più lunga della tau umana esercitano la loro azione tossica mediante attivazione del recettore NMDA, e che la minima regione responsabile è codificata dal vettore tau (26-44).

### **-La morte neuronale tau-indotta è mediata dal recettore NMDA extrasinaptico arricchito della subunità NR2B**

I recettori ionotropici del glutammato di tipo NMDAR mediano effetti cellulari diversi, sulla base della variabile composizione biochimica (tipo di subunità e relativo rapporto stechiometrico), e quindi della differente localizzazione neuronale. La stimolazione dei recettori sinaptici induce eventi che promuovono la sopravvivenza, mentre l'attivazione dei recettori extrasinaptici evoca morte eccitotossica (Riccio et al., 2002). E' riportato inoltre che, mentre i recettori NMDA arricchiti della subunità NR2A sono confinati principalmente alle sinapsi, i recettori contenenti la subunità NR2B sono invece prevalentemente distribuiti extrasinapticamente (Charton et al., 1999). Per stabilire se i recettori NMDA extrasinaptici sono coinvolti nella neurotossicità-tau indotta, noi trattiamo i neuroni infettati con AdLacZ e Admyctau con ifenprodil (10µM), un antagonista dei recettori NR2B-arricchiti (Williams et al., 1993). La fig 14A mostra che ifenprodil effettivamente provvede una robusta protezione, recuperando dalla neurotossicità indotta da tau (1-441) e tau (1-

44), mentre tale trattamento farmacologico non ha alcun significativo effetto sul decremento di vitalità causato da tau (45-230). Tale osservazione sperimentale ulteriormente supporta l'ipotesi che, due differenti modalità di morte neuronale sono evocate da diverse regioni del dominio aminoterminale della proteina tau umana. E' riportato che, l'attivazione dei recettori NMDA extrasinaptici induce un segnale intracellulare che termina con la defosforilazione di CREB, un fattore trascrizionale responsabile dell'induzione di importanti geni nucleari di sopravvivenza neuronale (Hardingham et al., 2002). Pertanto, noi verificammo che anche nel nostro paradigma di morte neuronale alti livelli d'espressione di tau evocano una significativa diminuzione della forma fosforilata, e quindi attiva, di tale fattore nucleare di sopravvivenza cellulare: l'infezione adenovirale dei granuli di cervelletto con tau (1-441) e tau (1-44) causa infatti un netto decremento della fosforilazione attivativa di CREB al residuo Ser-133, (rispettivamente pari al 36% e al 77% normalizzando rispetto ai livelli di fosfo-CREB dei neuroni di controllo AdLacZ-transdotti). Il pre-trattamento farmacologico con antagonisti del recettore NMDA, MK-801 e ifenprodil, significativamente sostiene una robusta attivazione di CREB nei neuroni tau-infettati, mentre CNQX è incapace di prevenire la defosforilazione e quindi di aumentare i livelli intracellulari di fosfo-CREB (fig. 14B).

### **-Tau induce attivazione NMDA-dipendente di ERK1/2**

E' stato proposto che, la via intracellulare di trasduzione del segnale mediata da ERK1/2 è coinvolta nella morte neuronale indotta da un'eccessiva stimolazione dei recettori di membrana NMDA (Krapivinsky et al., 2003). Pertanto, noi verificammo che anche nel nostro modello cellulare la neurodegenerazione tau-indotta è sostenuta dall'attivazione patologica di tali protein-chinasi: gli aumentati livelli intracellulari di tau (1-441) e tau (1-44), causati da relativa infezione adenovirale, evocano infatti una sostenuta e protratta fosforilazione attivativa di ERK1/2 (da 12h dopo transfezione fino a 48h), come risulta da esperimenti di Western blotting su estratti cellulari totali, marcando con anticorpi diretti contro fosfo-epitopi di tali chinasi (fig.14C). L'attivazione di ERK1/2 è più marcata per tau (1-44) comparata con tau (1-441), mentre un aumento della fosforilazione di tali chinasi intracellulari non è rilevabile nei neuroni esperimenti tau (45-230). Per determinare se l'attivazione di ERK1/2 è dipendente dal recettore NMDA, noi esponiamo i granuli del cervelletto a MK-801(10 $\mu$ M), per 24 e 48h dopo trasduzione adenovirale, e verificammo una significativa soppressione dell'attivazione di tali protein-chinasi indotta da tale trattamento farmacologico (fig. 14D). Per testare infine se l'attivazione di ERK1/2 contribuisce alla neurodegenerazione tau-indotta, valutiamo l'effetto sulla sopravvivenza neuronale di UO126 (5 $\mu$ M) e PD98059 (15 $\mu$ M), due selettivi inibitori delle protein-chinasi attivate da fattori mitogenici MEK1/2, modulanti a monte la fosforilazione delle chinasi di interesse. UO126 e PD98059, sebbene tossici per i neuroni AdLacZ-infettati, che esibiscono una massiva perdita cellulare pari al 35% dopo 48h di trasduzione, marcatamente prevengono la morte neuronale tau (1-441) e tau (1-44)-indotta. Infatti, mentre l'espressione di tau (1-44) induce una pronunciata morte pari al 65 $\pm$ 5,7% e al 74 $\pm$ 4,8% (n=3) rispettivamente a 24 e 48h dopo l'infezione, il preventivo trattamento farmacologico con UO126 (5 $\mu$ M) supportava la sopravvivenza neuronale, riducendo la morte fino ad un valore di 25 $\pm$ 4,5% a 24h, e di 50 $\pm$ 3,5% a 48h. Simili risultati sono ottenuti con PD98059 (15 $\mu$ M) (fig.14E). Per fornire un'evidenza alternativa per il proposto ruolo di tali protein-chinasi nella morte tau-indotta, noi infettiamo con i vettori adenovirali per tau i granuli del cervelletto espianati da topi ERK1 $^{-/-}$  (Mazzucchelli et al., 2002). Le colture primarie di granuli del cervelletto da topi ERK1 $^{-/-}$  esibivano una significativa neuroprotezione dalla morte neuronale tau (1-441), tau (1-44) e tau (25-230)-indotta, rispetto a colture di controllo da topi selvatici ERK1 $^{+/+}$ . Diversamente la morte indotta da tau (45-230) non è alterata dalla modulazione della via di trasduzione del segnale di ERK1 (fig. 14F). Così, l'inibizione del segnale intracellulare di ERK1/2, sia per trattamento farmacologico che per ablazione genetica di ERK1, può prevenire la morte cellulare tau-indotta.

### **-La tossicità tau-mediata è associata con attivazione della calpaina e con il taglio proteolitico di tau**

L'influsso di calcio attraverso il recettore NMDA può attivare la cistein-proteasi calpaina, una delle principali proteasi effettrici nella tossicità glutammato-indotta, degradante importanti substrati cellulari tra cui anche importanti proteine citoscheletriche (Yokota et al., 2003). Per testare se l'attivazione della calpaina NMDA-indotta è un evento coinvolto nella morte neuronale tau-mediata, noi effettuiamo esperimenti di Western blotting utilizzando un anticorpo diretto contro la calpaina-I, che riconosce sia la forma latente (80KDa), che quelle attivate (78-76KDa e 58KDa) di tale proteasi (Zimmerman et al., 1984; Imajoh et al., 1987). Dai dati sperimentali risulta che, nei neuroni tau (1-441) e tau (1-44), ma non in quelli tau (45-230) e LacZ-infettati, vi è un significativo aumento sia della forma latente che di quella attivata della calpaina-I, e che tale incremento è reversibile dopo trattamento farmacologico con MK-801 (10 $\mu$ M), un antagonista del recettore NMDA, e calpeptin (10 $\mu$ M), uno specifico inibitore cellula-permeabile di tale cistein-proteasi (fig. 15A).

Ad ulteriore conferma che l'inibizione della calpaina-I previene la tossicità tau-indotta, noi verificiamo che sia la calpeptina (10 $\mu$ M), che gli aumentati livelli intracellulari del relativo inibitore endogeno calpastatina, indotti da co-infezione adenovirale con Ad-calpastatin, provvedono una robusta protezione contro la tossicità tau (1-441) e (1-44)-indotta: in particolare, la sopravvivenza neuronale si attesta ai valori di 88 $\pm$ 4% e 82 $\pm$ 3,4% rispettivamente per tau (1-441) e 78 $\pm$ 4% e 79 $\pm$ 3% rispettivamente per tau (1-44). Di converso, la morte tau (45-230)-indotta non è modulata da tali trattamenti (fig.15B).

E' stato riportato che l'attivazione della calpaina evoca degradazione di tau con rilascio di un frammento di 17KDa corrispondente alla regione aminoacidica codificata dal vettore adenovirale tau (45-230) (Canu et al., 1998; Park and Ferriera, 2005). Pertanto, noi sagliamo se l'attivazione della calpaina tau-mediata risulta nella comparsa di tale frammento. A tal scopo colture primarie di granuli del cervelletto sono infettate con Admyctau (1-441) a M.O.I. comprese in un intervallo tra 30 e 120 e, dopo 24h di infezione, sono allestiti esperimenti di Western blotting su lisati proteici totali, marcando con l'anticorpo defosforilazione-dipendente TAU-1. La fig. 16 mostra la presenza del frammento di 17KDa, la cui formazione è dose-correlata con l'espressione di tau esogeno ed è prevenuta da MK-801 e calpeptina: tali dati indicano che la formazione del frammento di 17KDa è causata dall' attivazione della calpaina che, a sua volta, è dipendente dalla stimolazione patologica del recettore NMDA indotta da aumentati livelli d' espressione di tau.

## DISCUSSIONE

La scoperta che errori mutazionali nel gene tau co-segregano con casi familiari di FTDP-17 (*fronto-temporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*), una tauopatia umana con aggregati neurofibrillari insolubili, e l'osservazione che l'estensione della patologia di tau ben correla con la perdita neuronale durante la progressione di numerosi disordini dementigeni, quali ad esempio l'AD (*Alzheimer's disease*), indicano una diretta relazione causale tra le anomalie genetiche che direttamente influenzano i livelli intracellulari, o le funzioni biologiche delle proteine tau, e i processi neurodegenerativi. I meccanismi molecolari sottesi alla patologia tau-indotta non sono però ancora completamente noti: sono state avanzate numerose ipotesi, basate su evidenze sia genetiche che biochimico-cliniche, che contemplan come possibili cause l'alterazione del trasporto assonale microtubuli-dipendente, la diretta tossicità della proteina tau aggregata, e/o modificazioni a carico del suo stato di fosforilazione. Come ipotizzato dal modello di effetto-dosaggio (perdita di funzione-*loss of function/haplo-insufficiency*) e/o dal modello di citotossicità diretta (acquisizione di funzione-*gain of function*), la morte neuronale, e quindi la demenza clinica, sarebbero causati dalla deplezione funzionale, o dagli effetti inibitori e/o tossici della proteina tau alterata. In particolare, alterazioni ambientali e/o fattori genetici intrinseci causerebbero una disfunzione/misregolazione di tau (inabilità nel regolare il dinamismo dei microtubuli) in conseguenza del relativo distacco dal citoscheletro: pertanto il pool solubile della tau citosolica non solo diventerebbe incapace di legare e stimolare l'assemblaggio dei microtubuli ma anche, sequestrando le normali e fisiologicamente presenti proteine tau, MAP1A/MAP1B e MAP2, indirettamente causerebbe la destabilizzazione e il collasso della rete neuronale, con conseguente compromissione del trasporto assonale retrogrado e successiva perdita di sinapsi. Gli aggregati insolubili proteinacei, eserciterebbero pertanto un effetto neurotossico sia di tipo indiretto, sequestrando la proteina tau endogena e riducendone così i livelli fisiologicamente indispensabili per la sopravvivenza neuronale, che di tipo diretto, interferendo fisicamente con il normale metabolismo cellulare. Sebbene alcuna evidenza sperimentale inequivocabilmente accrediti uno di tali modelli come elettivo nel comprendere le basi molecolari della neurodegenerazione tau-indotta, si concorda tutti nel ritenere che, in particolare, l'alterazione dei fisiologici livelli intracellulari delle diverse isoforme varianti della proteina tau e/o uno sbilanciamento del reciproco equilibrio dinamico tra fosforilazione/defosforilazione causerebbero una disfunzione neuronale e quindi, in ultima analisi, contribuirebbero alla morte.

Le prove sperimentali che accreditano le tauopatie come disordini dose-genica dipendenti (Andreatis et al., 2005; Kosik et al., 2005) sono non solo il contrastante fenotipo dei topi mutanti nulli per tau, che sono vitali e fertili, sebbene esibiscano marcati difetti di maturazione neuronale e un' evidente debolezza muscolare, ma anche l'osservazione che gli sbilanciamenti nell'abbondanza relativa delle diverse isoforme di tau risultano in una pronunciata neuropatia e/o gliopatia, come riportato sia nell'uomo, che in numerosi modelli animali transgenici.

Una significativa alterazione del rapporto molare tra le isoforme 3R e quelle 4R, in assenza alcuna di variazioni a carico del livello totale delle proteine tau, è stata infatti riportata nell'uomo nei singoli neuroni colinergici del proencefalo (*basal forebrain*), in particolare nel nucleo basale di Meynert e nei neuroni CA1 ippocampali durante la progressione del morbo di Alzheimer's, ma non durante il normale invecchiamento (Ginsberg et al., 2006; Glatz et al., 2006). La proteina tau inoltre, in tale disordine dementigeno è iperfosforilata e si rilocalizza, accumulandosi nel compartimento somato-dendritico ed aggregandosi in inclusioni insolubili, detti grovigli neurofibrillari o NFT (*neurofibrillary tangles*) (Bueè et al., 2000; Shahani et al., 2002). Accanto poi alla ben documentata inclusione dell'esone 10 causante la FTDP-17 (Ingram et al., 2002), l'eccessiva inclusione dell'esone 2 e 3 causa una marcata gliopatia e una progressiva degenerazione del midollo spinale (Higuchi et al., 2002), mentre l'inclusione dell'esone 10 è elevata nei tumori (Vanier et al., 1998), e il dominio in membrana N-terminale di tau è tagliato durante l'apoptosi, rilasciando frammenti a loro volta effettori di tale processo (Canu et al., 1998; Fasulo et al., 2000;

Amadoro et al., 2004). Infine, la trascrizione del gene tau è significativamente diminuita nelle cellule vulnerabili all'apoptosi (Esclaire et al., 1998), mentre aumenta nella sindrome di Down (Metha et al., 1999) e in casi, ad esordio precoce, di morbo di Alzheimer (Ginsberg et al., 2006; Glatz et al., 2006).

Il nostro lavoro sperimentale è finalizzato ad investigare la possibilità di modulare differenzialmente la sopravvivenza neuronale di specifiche popolazioni neuronali (cervelletto, ippocampo, corteccia) e/o la suscettibilità a diversi insulti, alterando il normale rapporto intracellulare delle differenti isoforme della proteina tau: in particolare, noi ci proponiamo di studiare come l'espressione adenoviralmente-mediata e dose-dipendente dell'isoforma più lunga della tau umana e/o di frammenti derivanti dal dominio N-terminale, circa la cui funzione biologica poco è noto in letteratura, possono influenzare la vitalità neuronale.

Noi riportiamo (Amadoro et al., 2004; Amadoro et al., 2006) che i livelli moderati d'espressione della isoforma più lunga della tau umana (1-441aa), pari a circa 1.5-2 volte il livello della tau endogena, sono neuroprotettivi recuperando dalla morte le colture primarie di granuli del cervelletto di ratto indotte in apoptosi, dopo la rimozione del siero e di concentrazioni depolarizzanti del potassio extracellulare. In particolare, l'azione antiapoptotica sostenuta da tau è: (1) indipendente dall'interazione con i microtubuli citoscheletrici, in quanto esercitata anche dal dominio amino-terminale della proteina stessa (1-230 aa), noto interagire con la membrana plasmatica; (2) è tempo-dipendente, in quanto limitata ad un intervallo temporale ristretto, di 24 ore dall'esposizione allo stimolo; (3) è dose-dipendente, in quanto aumenta all'aumentare della proporzione dei neuroni infettati; (4) implica una sostenuta e protratta fosforilazione al residuo Ser-473 di Akt1/2, una serintreonin-chinasi la cui attivazione è condizione necessaria e sufficiente per la sopravvivenza neuronale ed infine; (5) è associata all'inibizione del processamento proteolitico della caspasi-3 effettrice, prevenendone il taglio nella forma attiva, probabilmente agendo a monte della caspasi-6 iniziatrice.

E' importante notare che il livello d'espressione del transgene non è omogeneo nell'intera popolazione tau-infettata, il che giustifica la riduzione di circa il 20% della sopravvivenza neuronale osservata in tali colture, rispetto a quelle infettate con il vettore di controllo non-correlato: come discusso successivamente, la quota dei neuroni transdotti che esprime più alti livelli della tau umana rapidamente muore, attraverso un meccanismo caspasi-indipendente.

L'osservazione che, l'espressione del dominio di proiezione in membrana di tau non sia tossico nel nostro paradigma cellulare è in apparente contraddizione con precedenti dati, riportanti l'effetto pro-apoptotico della regione ricca in prolina della proteina nelle cellule replicanti (Fasulo et al., 2000): tuttavia i diversi tipi cellulari (cellule post-mitotiche e cellule in attiva divisione), e l'osservazione che tau è fisiologicamente espressa solo nei neuroni e nella glia, possono tenere conto delle discrepanze sperimentali osservate. Infatti, l'effetto pro-apoptotico osservato da Fasulo et al., è causato dalla regione di tau contenente i moduli P1-P2 e R1 e priva di tutti i primi 151 aminoacidi (tau 151-274). Diversamente, nel nostro costrutto tau (1-230), R1 è assente e P2 è deletato degli ultimi 12 aminoacidi nei quali, per esempio, è presente il dominio funzionale SH3 di legame a proteine (Lee et al., 1998). D'altro canto, i nostri dati concordano con quelli di Brandt et al. (Brandt et al., 1995), dimostranti che l'espressione del dominio N-terminale della proteina di tau di ratto (1-203 e 1-233) nella linea neuronale di feocromocitoma di ratto terminalmente differenziata PC12 non è tossica.

La depolarizzazione, come le neurotrofine, promuovono la sopravvivenza neuronale, silenziando le caspasi e contestualmente attivando differenti vie di trasduzione del segnale, inclusa quella delle MAP chinasi (*mitogen-activated-protein-kinase*) e/o quella della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (*PI-3-kinase*). Come riportato da precedenti lavori, poichè l'attivazione delle MAP chinasi non è richiesta per la sopravvivenza potassio-indotta (Miller et al., 1997) mentre l'inibizione del segnale della via di trasduzione della PI3-K sostiene la morte, per esposizione a concentrazioni iperpolarizzanti di potassio extracellulare (D'Mello et al., 1997), noi riportiamo che l'effetto antiapoptotico di tau

passa per il mantenimento di alti livelli di fosfo-Akt1/2, la protein-chinasi a valle bersaglio di PI3-chinasi (Franke et al., 1997).

L'attivazione di Akt1/2 può avvenire attraverso: (1) la diretta stimolazione dell'attività della PI3-K; (2) l'attivazione di altre chinasi capaci a loro volta di fosforilare Akt1/2; (3) l'interferenza con il metabolismo dei fosfoinositidi, così regolando indirettamente l'attività della PI3-K; (4) l'inibizione di fosfatasi agenti su Akt1/2, sia direttamente che indirettamente. Mentre la prima ipotesi è invalidata da precedenti studi (Singh et al., 1996) riportanti l'inabilità di tau, diversamente da altre proteine del citoscheletro, quali la gelsolina, di modulare positivamente l'attività della PI3-K, la seconda e la terza ipotesi potrebbero essere legate dal coinvolgimento della PLC- $\gamma$  (*phospholipase C- $\gamma$* ), una enzima membrana-associato che direttamente, o indirettamente attraverso PIP<sub>2</sub>, è attivato da tau (Hwang et al., 1996; Scott et al., 1998).

L'attivazione di Akt1/2 è accompagnata dalla marcata diminuzione dell'attività della GSK3- $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3- $\beta$* ), una delle maggiori serin-treonin-chinasi prolina-dirette note fosforilare tau in vivo (Lee et al., 2003), come suggerito dall'osservazione che la fosforilazione al residuo Ser 202-205 (rivelata dall'immunoreattività per l'anticorpo AT8) nella sequenza aminoacidica di tau, sia di quella endogena che esogena, non aumenta dopo l'espressione di tau (1-230). Inoltre, è stato riportato che tau interagisce con la membrana plasmatica attraverso il dominio di proiezione amino-terminale (Brandt et al., 1995) e che tale interazione è alterata dalla fosforilazione ai siti che sono modificati nei PHF, come quelli riconosciuti dagli anticorpi AT8, PHF-1 e PHF-6 (Maas et al., 2000). E' da notare poi che nessuno degli epitopi su citati è iperfosforilato nei granuli del cervelletto esprimenti tau (1-230), o tau (1-441), suggerendo che tali peptidi agiscono interagendo con altri componenti cellulari membrana-associati. Se tale azione sia esercitata per competizione della tau esogena con il pool interno di tau a livello della membrana plasmatica, come suggerito da Brandt et al. (Brandt et al., 1995), o attraverso meccanismi alternativi, rimane da stabilire.

Sebbene i moderati livelli d'espressione della più lunga isoforma della tau umana siano protettivi contro l'apoptosi da deprivazione di siero e potassio nei granuli del cervelletto di ratto, il rapido decremento (20%) della sopravvivenza neuronale e l'eterogeneità dell'espressione del transgene nella popolazione neuronale tau-infettata, ci hanno indotto a testare l'ipotesi che più alti livelli d'espressione del transgene codificante per tau evocano diversamente un effetto neurotossico.

E' riportato che circa la metà delle mutazioni causanti FTDP-17 nell'uomo alterano la maturazione del messaggero di tau, aumentandone il rapporto tra le isoforme a 4 ripetizioni e quelle a 3 (4R/3R) (Iqbal et al., 2005). Di converso, l'inibizione nel topo mutante P301L dell'espressione del transgene inducibile, dopo l'inizio di una severa patologia di tau, riduce significativamente i livelli della proteina mutante e parallelamente reverte il processo neurodegenerativo e i deficit cognitivi ad esso associati (Santa Cruz et al., 2005). La perdita di funzione della aminopeptidasi-puromicina sensibile (PSA), una proteasi altamente conservata che proteolizza la tau in vitro, aumenta marcatamente la neurodegenerazione in un modello di *Drosophila* che ricapitola per intero la patologia di tau, indotta da alti livelli d'espressione dell'isoforma umana più lunga (Karsten et al., 2006). Inoltre, numerosi studi, sia in vitro che in vivo, hanno evidenziato che alti livelli d'espressione della più lunga isoforma della tau umana sono accompagnati da una severa perdita neuronale, in presenza o meno degli aggregati neurofibrillari (De Silva and Farrer, 2002). In particolare, la morte neuronale è correlata all'incremento tempo-dipendente del livello d'espressione della tau esogena (Hall et al., 1997; Jackson et al., 2002; Santa Cruz et al., 2005; Spittaels et al., 1999; Wittmann et al., 2001; Fath et al., 2002) suggerendo che la patologia di tau è dose genica-dipendente.

L'effetto di dosaggio genico non è esclusivo della proteina tau ma è stato dimostrato anche per altre importanti proteine neuronali, implicate in diversi disordini neurodegenerativi. In particolare, recenti lavori evidenziano come le duplicazioni del locus dell'APP (*amyloid-precursor protein*) o le triplicazioni del gene dell' $\alpha$ -sinucleina, anomalie genetiche tutte incrementanti il fisiologico livello d'espressione della proteina selvatica, siano la causa di esordio precoce del morbo di Alzheimer o del morbo di Parkinson ereditario (Rovelet-Lecrux et al., 2006; Singleton et al., 2003).

Parallelamente, alcuni studi in vitro invece hanno riportato un effetto neuroprotettivo, sia per l'APP che per l' $\alpha$ -sinucleina, mentre i relativi topi knockout non esibiscono alcun evidente segno di neurodegenerazione, suggerendo che uno sbilancio dose genica-dipendente, tra l'attività anti- e pro-apoptotica di tali proteine, di per sé non vitali, può essere associato a tali disordini dementigeni (Xhu et al., 1999; de Costa et al., 2000; Hashimoto et al., 2002). Parimenti, noi troviamo che l'entità della morte neuronale tau-indotta, sia in colture primarie di neuroni corticali che in quelle di granuli del cervelletto di ratto, è direttamente correlata al livello d'espressione del transgene. Il più potente effetto neurotossico è riportato quando la tau umana è circa tre volte più abbondante che quella endogena, espressa normalmente nel ratto.

La successiva caratterizzazione biochimica dell'effetto neurotossico tau-indotto evidenzia inoltre che la più lunga isoforma della tau umana ed alcuni, ma non tutti i frammenti derivati dal relativo dominio in membrana N-terminale, evocano in vitro una pronunciata e rapida morte NMDA-dipendente. L'utilizzo infatti di farmaci bloccanti la stimolazione del recettore NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*), o l'inibizione dell'espressione della subunità NR1 mediante specifici oligonucleotidi antisense, è fortemente neuroprotettiva, rendendo i neuroni immuni dalla tossicità tau-mediata.

Noi riportiamo poi diverse evidenze sperimentali a favore della modulazione della via di trasduzione del segnale NMDA-dipendente, da parte sia di alti livelli d'espressione della tau umana, che di alcuni dei suoi frammenti N-terminali: (1) un fenotipo di tipo necrotico, con assenza di tipici marcatori di apoptosi (mancanza di attivazione di caspasi-3, frammentazione oligonucleosomale del DNA, condensazione cromatinica, insensibilità al pan-inibitore di caspasi ZVAD-fmk, alla proteina antiapoptotica bcl-2, o a noti inibitori di apoptosi quali forskolin, IGF (*insulin-like growth factor*), adenosina; (2) un effetto neurotossico rapido (tempo-dipendenza) e potente (dose-dipendenza); (3) la robusta neuroprotezione offerta dagli enzimi detossificanti i radicali liberi (SOD e catalasi), e dalla memantina, un antagonista non-competitivo di moderata affinità dell'NMDAR approvato nei trials clinici negli U.S.A. per il trattamento di casi moderati o severi di AD, e da ifenprodil, un inibitore selettivo dei recettori extrasinaptici NR2B-arricchiti; (4) l'assenza di tossicità nei modelli non-neuronali privi di recettori NMDA, quali le linee cellulari COS-7 (*African green monkey kidney cell line*), MDCK (*Madin-Darby canine kidney cell line*) e CHO (*chinese hamster ovary cell line*); (5) la defosforilazione del fattore trascrizionale di sopravvivenza CREB (*cAMP-response-element-binding protein*).

In letteratura sono infatti riportate diverse evidenze sperimentali a favore del ruolo patogenetico del glutammato in numerosi malattie neurodegenerative, quali l'AD e altre tauopatie dementigene umane. Ad esempio, i campioni bioptici dei cervelli di pazienti affetti dal morbo di Alzheimer mostrano una significativa diminuzione del trasportatore astrogliale del glutammato EAA2 nella corteccia frontale (Li et al., 1997). Nei modelli di topi transgenici che esprimono, esclusivamente negli astrociti, sia l'isoforma più lunga della tau umana che quella mutante P301L geneticamente associata alla FTDP-17, riproducendo così la patologia gliale disordine-associata, vi è una progressiva alterazione dell'espressione del trasportatore gliale glutammato-aspartato (GLT-1), sia nel tronco encefalico che nel midollo spinale, precedente al progressivo accumulo intracellulare di tau e ai severi deficit motori (Dabir et al., 2006). Infine gli oligomeri solubili di A $\beta$ , ma non le fibrille, stimolano i recettori NMDA causando l'influsso di calcio, l'attivazione della calpaina-I e la degradazione della proteina sinaptica dinamina-I (Kelly and Ferreira, 2006).

Basse dosi di memantina efficientemente attenuano nei ratti le lesioni a carico dei neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert, dopo l'iniezione intracerebrale diretta di NMDA (Wenk et al., 1994). Anche ifenprodil provvede una robusta neuroprotezione in un modello di MCAO (*middle cerebral artery occlusion*) di ratto, senza produrre evidenti effetti collaterali, e migliorando sensibilmente la performance comportamentale dell'animale dopo seduta d'apprendimento al test del rotarod (Dogan et al., 1997). La memantina infine reverte l'iperfosforilazione patologica di tau, e la neurodegenerazione fibrillare ad esso associata, in fettine organotipiche ippocampali di ratto e

in colture cellulari di PC12, prevenendo l'inibizione dell'attività della protein-fosfatasi 2A (PP2A) (Li et al., 2004; Crohan et al., 2006).

La diminuzione della fosforilazione del fattore di sopravvivenza CREB, in corrispondenza del residuo Ser-133, è stata poi anche riportata nel cervello dei pazienti affetti da AD (Yamamoto-Sasaki et al., 1999) e, di recente, è stato dimostrato che anche il peptide A $\beta$  può influenzare la sopravvivenza neuronale attraverso tale fattore trascrizionale.

Snyder et al., (Snyder et al., 2005) riportano infatti che l'esposizione al peptide A $\beta$ 1-42 di colture primarie di neuroni corticali induce una rapida diminuzione del numero delle subunità del recettore NMDA, in conseguenza di un' aumentata endocitosi dalla superficie cellulare. Gli autori dimostrano che tale perdita di subunità recettoriali dalle sinapsi necessita dei recettori  $\alpha$ -7-nicotinici (noti legare il peptide A $\beta$ ), dell' attivazione della protein-fosfatasi 2B (PP2B), dell'attivazione successiva di STEP (*striatal-enriched phosphatase*), una fosfo-tirosin-fosfatasi localizzata nei terminali post-sinaptici e particolarmente espressa nello striato, nell'ippocampo e nella corteccia. La conseguente defosforilazione STEP-mediata, di uno specifico residuo di tirosin (Tyr1472) della subunità NR2B del recettore NMDA, ne induce la rapida internalizzazione dalla membrana per endocitosi. Funzionalmente, mediante accurate registrazioni elettrofisiologiche per patch-clamping di corrente NMDA-evocata, Snyder et al., riportano una significativa riduzione della corrente in entrata nei neuroni A $\beta$ -trattati, in associazione ad una pronunciata riduzione della fosforilazione di CREB, un fattore trascrizionale che, come detto, controlla importanti geni di sopravvivenza neuronale ed implicato in numerosi processi di plasticità sinaptica (apprendimento e memoria).

Il ruolo del peptide A $\beta$  nella disfunzione sinaptica NMDA-mediata è anche riportato da Kelly et al., (Kelly et al., 2006): essi propongono infatti un meccanismo alternativo che ipotizza che gli oligomeri (e non le fibrille) causano l'influsso intracellulare di calcio attraverso il recettore NMDA, con conseguente attivazione della cistein-proteasi calcio-attivata calpaina I, che a sua volta degrada una proteina indispensabile associata alle vescicole sinaptiche, quale la dinamina. Nell' AD dunque, la deplezione funzionale di tale proteina, necessaria per il riciclaggio delle vescicole di neurotrasmettitore, causerebbe una drastica diminuzione del rilascio del mediatore chimico nella fessura, e quindi una marcata disfunzione sinaptica. Gli autori suggeriscono inoltre che, la diminuzione del numero di recettori NMDA in risposta al trattamento con il peptide A $\beta$ , riportato da Snyder et al., rappresenterebbe un meccanismo di compensazione biologica attivato dai neuroni e finalizzato a contrastare la cronica ed eccessiva stimolazione del recettore di membrana. L'internalizzazione agonista-indotta del recettore, e la diminuzione della corrente ad esso associata, sono infatti riportati rappresentare un meccanismo biologico di auto-difesa, finalizzato a limitare il danno neuronale indotto dall'attivazione pronunciata e protratta dei recettori extrasinaptici (Li et al., 2002).

La composizione biochimica (numero, tipo e rapporto stechiometrico in subunità) dei recettori NMDA ne influenza la localizzazione subcellulare e le proprietà biologiche. In particolare, i recettori NMDA ai siti sinaptici (i) consistono prevalentemente di subunità NR2A, espresse più tardivamente durante l'ontogenesi del sistema nervoso, (ii) sono canali ionici selettivamente permeabili al calcio, al glutammato e voltaggio-dipendenti, (iii) inducono l'LTP (*long term potentiation*) e presiedono ai processi mnesici di plasticità sinaptica, modulando positivamente l'espressione genica CREB-mediata, e (iv) in ultimo promuovono la sopravvivenza neuronale. Di converso, i recettori extrasinaptici, attivati per diffusione laterale da alte concentrazioni del glutammato rilasciato sinapticamente in eccesso, (i) sono arricchiti in subunità NR2B espresse più precocemente durante il neurosviluppo, (ii) causano una diminuzione della fosforilazione del fattore trascrizionale CREB al sito Ser-133, evocando così una progressiva neurodegenerazione in numerosi modelli sperimentali, sia in vitro che in vivo (Colucci-D'Amato et al., 2003). Come i recettori extrasinaptici controllino tale evento non è ancora del tutto chiaro: è stato ipotizzato che essi stimolino l'istone deacetilasi nucleare di classe I-HDAC 1- (*hystone -deacetylase 1*), che a sua volta defosforila CREB, attraverso la stabile interazione con la protein-fosfatasi 1 (PP1). In alternativa, tali recettori extrasinaptici antagonizzerebbero il rimodellamento cromatinico, mediato

dalle HDAC di classe II (HDAC 4 e 5) ed indotto dall'attivazione dei recettori NMDA sinaptici, prevenendo l'esporto nucleare e l'attivazione dei fattori di sopravvivenza nucleare, quali MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) e CREB (Vanhoutte and Bading, 2003). È noto inoltre, che le serin-treonin chinasi ERK1/2 (*extracellular-regulated kinase*) appartenenti alla famiglia delle MAPK (*mitogen-activated-protein-kinase*) sono attivate dalla stimolazione del recettore NMDA e trasducono, attraverso secondi messaggeri intracellulari, i segnali di plasticità sinaptica e di sopravvivenza neuronale. In modelli di ischemia o trauma cerebrale e in numerosi disordini neurodegenerativi, tutti associati ad eccitotossicità da glutammato e ad un'alterazione del potenziale redox intracellulare, e quindi ad un'aumentata produzione dei deleteri radicali liberi, la morte neuronale correla con una sostenuta e protratta fosforilazione di ERK1/2, e/o con un'alterata compartimentalizzazione sub-cellulare. La natura, l'entità e la durata dell'insulto, il contesto e la localizzazione intracellulare, lo stato energetico/metabolico e l'interazione con proteine coinvolte in diverse vie di trasduzione del segnale, sono tutti fattori che giustificano le differenze in cinetica di stimolazione di ERK1/2, e quindi i diversi, e spesso contrastanti, effetti biologici evocati (Chu et al., 2004; Hetman et al., 2004). A tal proposito, noi riportiamo che la tossicità di tau (i) è accompagnata ad una robusta, cronica e temporalmente ritardata attivazione di ERK1/2, (ii) che tale pronunciata stimolazione è mediata dal recettore NMDA (reversibilità da MK-801), e (iii) che è criticamente coinvolta nella morte neuronale indotta. Infatti, due inibitori farmacologici altamente selettivi delle MEK1/2, le chinasi regolative a monte di ERK1/2, quali UO126 e PD98059, e l'ablazione genetica di ERK1 in topi knockout ERK1<sup>-/-</sup>, inibiscono marcatamente la tossicità tau-indotta: tali dati concordano con i precedenti risultati riportanti un potenziale ruolo dannoso di ERK1/2 nella eccitotossicità-ossidativa da glutammato, sia nei neuroni corticali che in altri paradigmi di morte neuronale, in vitro e in vivo (Satoh et al., 2000; Stanciu et al., 2000; Stanciu et al., 2002; Murray et al., 1998; Mori et al., 2002; Runden et al., 1998; Oh-hashii et al., 1999; Wang et al., 2003). Un'aumentata fosforilazione di ERK1/2 è stata riportata anche nel cervello di pazienti affetti da AD, spesso in associazione con marcatori di stress ossidativo (Zhu et al., 2002), o in numerosi altri disordini dementigeni, sia sporadici che familiari, con depositi insolubili di tau (Ferrer et al., 2003; Pei et al., 2002), ed infine anche nelle aree neuronali più vulnerabili della penombra, dopo un insulto ischemico acuto (Slevin et al., 2000).

L'attivazione delle protein-chinasi ERK1/2 correla con l'incremento della fosforilazione di tau ai siti TAU-1 e PHF-1 (Rapoport et al., 2000; Medina et al., 2005). Noi diversamente dimostriamo che l'espressione dell'isoforma più lunga della tau umana, nelle colture primarie neuronali, non è accompagnata ad un'anormale aumento dello stato di fosforilazione di tau a tali epitopi (Fig.17): l'aumentata immunoreattività per gli anticorpi fosforilazione-dipendente PHF-1, P-262, ma non AT8, con l'aumentare del tempo d'infezione è proporzionale all'incremento del livello totale di tau, come già riportato in altri paradigmi di tauopatie, cosicché la frazione di tau fosforilata rimane inalterata con l'avanzare dell'infezione (Yoshiyama et al., 2003). Tali dati suggeriscono pertanto che tale modificazione post-traduzionale di tau probabilmente non è coinvolta nel nostro modello di morte neuronale, in accordo con numerosi studi che riportano come la proteina tau può evocare morte indipendentemente dal suo stato di fosforilazione (Yoshiyama et al., 2003; Wittmann et al., 2001). Infine, noi dimostriamo che il potente effetto neurotossico è sostenuto dai frammenti aminoterminali di tau, quali tau 1-44, tau1-156, tau26-44, che non contengono i siti riconosciuti dagli anticorpi PHF-1 e TAU-1, suggerendo appunto che altre modificazioni post-traduzionali sono coinvolte nella tossicità tau-mediata.

Molti dei peptidi utilizzati in tale studio sono stati disegnati, sulla base della conservazione della sequenza aminoacidica, intorno ai presunti siti di taglio proteolitico da parte della calpaina (Canu et al., 1998; Park et al., 2005). Tale cistein-proteasi è attivata dall'influsso intracellulare di calcio attraverso il recettore NMDA (Yokota et al., 2003), ed aumentati livelli di calpaina sono presenti nel cervello di pazienti AD (Saito et al., 1993; Liu et al., 2005; Veeranna et al., 2004) e in alcune tauopatie degenerative (Adamec et al., 2002a-b). Noi riportiamo parimenti che, nelle colture neuronali tau-transdotte, l'attivazione della calpaina-I mediata dal recettore NMDA gioca un ruolo

chiave nella tossicità evocata: l'inibizione, da parte della calpeptina e/o dall' aumento dei livelli intracellulari dell'inibitore endogeno calpastatina, significativamente prevengono la neurotossicità. In un precedente lavoro, Canu et al. (Canu et al., 1998) riportano che durante l'apoptosi in vitro, indotta da deplezione del siero e del potassio extracellulare, nei granuli cerebellari vi è degradazione calpaina-I-mediata dell' N-terminale di tau, con conseguente rilascio di un frammento diagnostico di 17KDa. Successivamente, Park e Ferriera (Park and Ferriera, 2005) riportano che l'esposizione di colture di neuroni ippocampali al peptide A $\beta$  induce l'attivazione della calpaina-I e il conseguente taglio di tau in un frammento neurotossico di peso molecolare di 17 KDa, corrispondente alla regione aminoacidica codificata dal vettore adenovirale tau (45-230). E' lecito pertanto affermare che il taglio proteolitico, in corrispondenza di tale residui aminoacidici nella proteina tau, produce anche il più piccolo e più fortemente neurotossico frammento tau (1-44), nonostante le nostre difficoltà a rivelarlo, per analisi immunologia di Western blotting, probabilmente in quanto esso è rapidamente degradato dalle proteasi intracellulari. Tali osservazioni suggeriscono quindi che, l'aumentata espressione di tau causa una morte neuronale per degradazione proteolitica e successivo rilascio di più frammenti peptidici N-terminali, estremamente deleteri. Il nostro lavoro dimostra infatti che, oltre al 17KDa (residui 45-230), il taglio di tau da parte della calpaina rilascia un altro peptide, più piccolo e più potente, in termini di neurotossicità-evocata: ciò inizierebbe un loop a feedback negativo, in cui la calpaina non solo contribuisce alla formazione del peptide 1-44, ma sarebbe anche responsabile per la sua neurotossicità. Il taglio all'estremità amino-terminale di tau può pertanto essere rilevante nell'eziopatogenesi del morbo di AD, probabilmente in quanto coinvolto nella maturazione degli aggregati neurofibrillari e nell'evoluzione ad un fenotipo patologico più severo (Binder et al., 2005) Recentemente, è stato riportato che il taglio di tau da parte della caspasi-3 al sito Asp421 indotto da A $\beta$  1-42-preaggregato sia rilevante nell'AD, in quanto rilascia dei frammenti all'estremità C-terminale troncati di circa 20 aa che aggregano più rapidamente in filamenti insolubili che la tau intera (Gamblin et al., 2003; Garcia-Sierra et al., 2003). L'espressione dei frammenti derivati dal taglio C-terminale di tau inducono una marcata morte, nei sistemi cellulari in vitro (Fasulo et al., 1998; Fasulo et al., 2000; Chung et al., 2001). In aggiunta, è stato suggerito che l'estremità N-terminale di tau è persa quando gli aggregati neurofibrillari diventano extracellulari (Dickson et al., 1992; Endoh et al., 1993; Bondareff et al., 1994). La perdita dell'immunoreattività all'N-terminale di tau (Tau-12) correla con l'evoluzione ad una più severa patologia AD (Goshal et al., 2002; Horowitz et al., 2004). L'estremità amino-terminale di tau è poi necessaria per la formazione dell'epitopo conformazionale Alz 50, noto marcatore degli aggregati neurofibrillari (Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1997; Ghoshal et al., 2002; Garcia-Sierra et al., 2003). L'espressione delle forme tronche di tau, delete sia dell'estremità NH<sub>2</sub>- che COOH-terminale e presenti negli estratti bioptici di pazienti affetti da AD, è sufficiente di per sé a promuovere, in vivo nei ratti transgenici, una progressiva degenerazione neurofibrillare correlata con il ciclo di vita di tali animali: tale patologia fibrillare esibisce tutte le caratteristiche istopatologiche, biochimiche ed immunologiche tipiche dell'AD (Zilka et al., 2006), ed è accompagnata da un significativo aumento dello stress ossidativo, probabilmente per un'alterazione del trasporto assonale tau-mediato causante una diminuzione del numero e/o un'alterata distribuzione cellulare dei mitocondri (Cente et al., 2006). Inoltre tali mutanti transgenici esprimono le forme tronche non mutate di tau, se sottoposti, dopo seduta d'apprendimento, a diversi tests comportamentali di valutazione dell'efficienza (*performance*) cognitiva e/o sensomotoria, esibiscono severi difetti neurologici, particolarmente pronunciati all'età più avanzata di 9 mesi (Hrnkova et al., 2006). In aggiunta, numerosi sono i dati che supportano il ruolo patogenetico del dominio N-terminale di tau: (1) frammenti mappanti nella regione aminoacidica 18-42 di tau inibiscono in vitro la polimerizzazione dell' isoforma più lunga della tau umana (htau40), interagendo con specifiche sequenze (residui392-421) al C-terminale (Horowitz et al., 2007); (2) le regioni del dominio in membrana N-terminale, non direttamente coinvolte nel legame con i microtubuli e non implicate dunque nell'assemblaggio dei filamenti, conferiscono, sia nelle cellule non neuronali tau-transdotte che nelle colture neuronali che esprimono endogenamente

la proteina tau, una significativa ipersensibilità dei microtubuli alla depolimerizzazione iniziata dal peptide A $\beta$  prefibrillare, extracellulare (King et al., 2006). In ultimo, Rohn et al. (Rohn et al., 2002) utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro il sito di taglio della caspasi-3 -D25-(DRKD), mappante nell'estremità più prossimale dell'N-terminale di tau, evidenziano in vivo, su fettine ippocampali di pazienti AD, ma non di anziani sani non dementi, una forte e specifica immunoreattività (in quanto abolita per spiazzamento dal relativo peptide di controllo): tale studio ulteriormente supporta l'ipotesi che il taglio amino-terminale di tau al sito della caspasi-3 D25 sia rilevante in vivo, nell'eziopatogenesi di tale malattia dementigena.

Come l'aumentata espressione della proteina tau e di alcuni frammenti N-terminali causino la pronunciata attivazione del recettore di membrana NMDA rimane ancora da chiarire: le ipotesi avanzate contemplano un possibile incremento della concentrazione del glutammato extracellulare (in conseguenza di un aumentato rilasciato sinaptico e/o di un'inibizione del suo re-uptake da parte dei trasportatori di membrana), o un'aumentata suscettibilità cellulare alle basse concentrazioni fisiologiche del glutammato già presente nel mezzo di coltura, per azione diretta o indiretta di tau sulle subunità recettoriali (modificazione post-traduzionale, interazione con proteine accessorie, diffusione laterale dai siti extrasinaptici). E' riportato infatti che, nelle colture primarie di astrociti, l'aumentata espressione dell' isoforma selvatica più lunga della tau umana e della variante mutata P301L causano un'evidente alterazione del trasporto assonale plus-end diretto, inducendo una marcata redistribuzione dei mitocondri e dei perossisomi nel corpo cellulare: il danno ossidativo, e la conseguente deplezione di ATP, ai terminali nervosi potrebbero giustificare la disfunzione dei trasportatori di membrana, quali ad esempio quelli del glutammato (Yoshiyama et al., 2003). In alternativa, l'accumulo somatico delle inclusioni insolubili fibrillari di tau comprometterebbe la normale fisiologia neuronale, alterando il traffico da e verso la membrana, e/o il metabolismo intracellulare di importanti recettori.

E' interessante ricordare che anche per l' $\alpha$ -sinucleina, è stato evidenziato un effetto dosaggio-genico, con conseguenze biologiche diverse in funzione del relativo livello di espressione (Eriksen et al., 2005). In particolare, nell'uomo, le mutazioni puntiformi (A53T; A30P e E46K) o le duplicazioni e le triplicazioni nel relativo gene SNCA causano tutte forme autosomiche dominanti del morbo di Parkinson (PD), con accumulo ed aggregazione della proteina in inclusioni proteinacee dette corpi di Lewy (*Lewy bodies*). Alti livelli d'espressione dell' $\alpha$ -sinucleina selvatica, o la variante mutata PD-associata, causano una progressiva neurodegenerazione, sia in vitro che in vivo, mentre i più fisiologici livelli della proteina selvatica preservano l'integrità sinaptica (Bonin and Giasson, 2005; Sidhu et al., 2004; da Costa et al., 2000). Tale proteina è infatti coinvolta nei processi di plasticità sinaptica, controlla il riciclaggio delle vescicole sinaptiche e quindi il rilascio del neurotrasmettitore, ma è anche necessaria per mantenere nei neuroni nigro-striatali i livelli intracellulari della catecolamina dopamina, di per sé potenzialmente ossidabile, all'interno dell'intervallo fisiologico non tossico (Sidhu et al., 2004). Infine, l'esposizione di colture neuronali di PC12 di ratto a dosi nonomolari di  $\alpha$ -sinucleina conferisce una robusta protezione, rendendo le cellule meno vulnerabili agli insulti apoptotici o allo stress ossidativo, stimolando l'espressione di proteine appartenenti alla famiglia bcl-2 e modulando positivamente la via del segnale PI3K/Akt1/2. Di converso, concentrazioni micromolari, o alti livelli d'espressione intracellulare dell' $\alpha$ -sinucleina selvatica, sono fortemente citotossici (Seo et al., 2002)

In conclusione, in tale lavoro noi dimostriamo che moderati livelli d'espressione dell' isoforma selvatica più lunga della proteina tau umana e del dominio N-terminale di proiezione in membrana inibiscono l'apoptosi, recuperando dalla morte le colture di granuli cerebellari esposti a condizioni iperpolarizzanti. L'effetto neuroprotettivo è indipendente dalla stabilizzazione dei microtubuli citoscheletrici, ed agisce a livello dell'attivazione precoce Akt1/2-mediata della cascata delle caspasi effettrici.

Inoltre, noi tentiamo di descrivere la via di trasduzione del segnale attivata dall'espressione di più alti livelli dell'isoforma lunga della tau umana o di alcuni frammenti tronchi N-terminali rilevanti nella patologia AD, supportando il ruolo patogenetico primario dell' eccitotossicità da glutammato

nei disordini neurodegenerativi. In particolare, riportiamo che: (1) alti livelli d' espressione della proteina tau sono fortemente neurotossici e che la minima regione capace di evocare tale effetto mappa nella tratto aminoacidico N-terminale 25-44; (2) la morte indotta è di tipo necrotico caspasi-indipendente; (3) implica una sostenuta e protratta stimolazione dei recettori NMDA extrasinaptici arricchiti nella subunità NR2B, in quanto è recuperabile da ifenprodil ed è associata ad una marcata defosforilazione del fattore trascrizionale di sopravvivenza CREB (*cAMP-response-element-binding-protein*); (4) ed implica una cronica e ritardata attivazione delle ERK1/2 (*extracellular-regulated -kinase*) associata alla degradazione calpaina-I mediata di tau , con rilascio del frammento di 17KDa e probabilmente di altri peptidi altamente neurotossici. E' lecito speculare quindi, sulla base dei nostri esperimenti in vitro, che alcuni di tali peptidi iniziano un loop negativo auto-alimentantesi che culmina nella morte neuronale. Tale studio inoltre, provvede un ulteriore supporto sperimentale all'effetto neuroprotettivo FDA (*Food and drug administration*)-approvato della memantina, un antagonista non competitivo del recettore NMDA utilizzato con successo nei trials clinici sull'uomo (Chen and Lipton, 2006), al fine di migliorare le funzioni cognitive di pazienti affetti dal morbo di Alzheimer's, in casi accertati di moderata e/o severa malattia.

## LEGENDA FIGURE

### **-Figura 1**

#### **Rappresentazione schematica dei costrutti di tau utilizzati**

Tutti i costrutti di tau sono derivati dalla più lunga isoforma umana di tau (htau40) e sono stati espressi marcandoli con 6 epitopi myc fusi all'estremità amino-terminale in fase traduzionale. La più lunga isoforma della tau umana, di 441-residui aminoacidici di lunghezza, consiste di tre differenti moduli funzionali: un dominio di proiezione NH<sub>2</sub>-terminale legante la membrana plasmatica, un' estremità COOH- terminale recante quattro imperfette ripetizioni (R1-R4) di interazione ai microtubuli (MT) e una sequenza interposta fra esse, basica e ricca in proline con siti di posizionamento sul citoscheletro (P1 e P2). Gli inserti N1 e N2 possono essere diversamente presenti per processamento alternativo del trascritto primario. Il diagramma rappresenta anche la mappatura degli epitopi contro cui sono diretti gli anticorpi utilizzati in tale studio. C17 riconosce la struttura primaria della sequenza (COOH-17) di tau indipendente dallo stato di fosforilazione (indicato da Pi). Gli anticorpi AT8 (Ser 202/Thr205), PHF1 (Ser396-404), PHF6 (Thr231) e 12E8 (Ser262/Ser356) riconoscono invece epitopi fosforilati (P+), mentre l'anticorpo TAU-1 (Ser195/Ser198/Ser199/Ser202) lega epitopi defosforilati (P-).

### **-Figura 2**

#### **La proteina di fusione myc-tau (1-441) colocalizza con i microtubuli citoscheletrici**

La linea cellulare MDCK (*Madin-Darby canine kidney cell line*) è infettata con i vettori adenovirali esprimenti Ad (1-441) e Ad (1-230) a M.O.I. 30, e dopo 36 h di infezione, le cellule sono state fissate e doppiamente immunocolorate con un anticorpo diretto contro l' $\alpha$ - tubulina (rosso) e con un anticorpo contro la proteina di fusione myc-tau (verde). La marcatura per fluorescenza, evidenziante la distribuzione cellulare di myc-tau e tubulina, è ottenuta mediante un protocollo combinato di fissazione e permeabilizzazione (A-D), o dopo un protocollo di estrazione e fissazione (A'-D'), per stimare l'associazione ai microtubuli. Le immagini fluorescenti, ricostruite a tre dimensioni, sono prese mediante un microscopio confocale laser (Leica TCS 4D System, equipaggiato di obiettivo X100 1.3 X10<sup>6</sup> obiettivo ad olio per immersione, sezione ottica 1  $\mu$ m).

### **-Figura 3**

#### **Espressione dei vettori adenovirali Ad myc-tau nei granuli del cervelletto**

Culture primarie di granuli del cervelletto (CGN<sub>S</sub>) sono infettate a 4 D.I.V. sia con AdLac-Z che con i vettori adenovirali esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) a M.O.I. 30 e, dopo 48 h di infezione, sono processate per analisi di Western blotting ed immunofluorescenza. **(a)** Analisi per Western blotting di lisati proteici da neuroni esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) separati elettroforeticamente su SDS-PAGE 10% e rivelati sia con l'anticorpo 9E10 (sinistra), un anticorpo monoclonale (mAb) che riconosce gli epitopi myc relativi alla proteina tau esogena, che con l'anticorpo TAU-1 (destra), un mAb che riconosce un epitopo defosforilato nella sequenza di tau. Le frecce indicano la proteina tau esogena marcata con l'anticorpo TAU-1. **(b)** Analisi per Western blotting di lisati proteici da neuroni esprimenti myc-tau (1-44) a M.O.I. 30, immunoprecipitati con mAb 9E10 ed analizzati su un gel SDS-PAGE 15%. Il saggio di immunoprecipitazione è effettuato dopo 24 h di infezione su colture di 2.5x10<sup>5</sup> neuroni. **(c)** Analisi per fluorescenza al microscopio confocale di neuroni infettati a M.O.I. 30 con AdLacZ (a), Ad (1-441) (b), Ad (1-230) (c) e Ad (1-44) (d), rispettivamente processati mediante protocollo di combinata fissazione e permeabilizzazione (a-d), o di estrazione e fissazione (a'-d'), e successivamente immunomarcati

## LEGENDA FIGURE

### **-Figura 1**

#### **Rappresentazione schematica dei costrutti di tau utilizzati**

Tutti i costrutti di tau sono derivati dalla più lunga isoforma umana di tau (htau40) e sono stati espressi marcandoli con 6 epitopi myc fusi all'estremità amino-terminale in fase traduzionale. La più lunga isoforma della tau umana, di 441-residui aminoacidici di lunghezza, consiste di tre differenti moduli funzionali: un dominio di proiezione NH<sub>2</sub>-terminale legante la membrana plasmatica, un'estremità COOH-terminale recante quattro imperfette ripetizioni (R1-R4) di interazione ai microtubuli (MT) e una sequenza interposta fra esse, basica e ricca in proline con siti di posizionamento sul citoscheletro (P1 e P2). Gli inserti N1 e N2 possono essere diversamente presenti per processamento alternativo del trascritto primario. Il diagramma rappresenta anche la mappatura degli epitopi contro cui sono diretti gli anticorpi utilizzati in tale studio. C17 riconosce la struttura primaria della sequenza (COOH-17) di tau indipendente dallo stato di fosforilazione (indicato da Pi). Gli anticorpi AT8 (Ser 202/Thr205), PHF1 (Ser396-404), PHF6 (Thr231) e 12E8 (Ser262/Ser356) riconoscono invece epitopi fosforilati (P+), mentre l'anticorpo TAU-1 (Ser195/Ser198/Ser199/Ser202) lega epitopi defosforilati (P-).

### **-Figura 2**

#### **La proteina di fusione myc-tau (1-441) colocalizza con i microtubuli citoscheletrici**

La linea cellulare MDCK (*Madin-Darby canine kidney cell line*) è infettata con i vettori adenovirali esprimenti Ad (1-441) e Ad (1-230) a M.O.I. 30, e dopo 36 h di infezione, le cellule sono state fissate e doppiamente immunocolorate con un anticorpo diretto contro l' $\alpha$ -tubulina (rosso) e con un anticorpo contro la proteina di fusione myc-tau (verde). La marcatura per fluorescenza, evidenziante la distribuzione cellulare di myc-tau e tubulina, è ottenuta mediante un protocollo combinato di fissazione e permeabilizzazione (A-D), o dopo un protocollo di estrazione e fissazione (A'-D'), per stimare l'associazione ai microtubuli. Le immagini fluorescenti, ricostruite a tre dimensioni, sono prese mediante un microscopio confocale laser (Leica TCS 4D System, equipaggiato di obiettivo X100 1.3 X10<sup>6</sup> obiettivo ad olio per immersione, sezione ottica 1  $\mu$ m).

### **-Figura 3**

#### **Espressione dei vettori adenovirali Ad myc-tau nei granuli del cervelletto**

Culture primarie di granuli del cervelletto (CGN<sub>S</sub>) sono infettate a 4 D.I.V. sia con AdLac-Z che con i vettori adenovirali esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) a M.O.I. 30 e, dopo 48 h di infezione, sono processate per analisi di Western blotting ed immunofluorescenza. **(a)** Analisi per Western blotting di lisati proteici da neuroni esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) separati elettroforeticamente su SDS-PAGE 10% e rivelati sia con l'anticorpo 9E10 (sinistra), un anticorpo monoclonale (mAb) che riconosce gli epitopi myc relativi alla proteina tau esogena, che con l'anticorpo TAU-1 (destra), un mAb che riconosce un epitopo defosforilato nella sequenza di tau. Le frecce indicano la proteina tau esogena marcata con l'anticorpo TAU-1. **(b)** Analisi per Western blotting di lisati proteici da neuroni esprimenti myc-tau (1-44) a M.O.I. 30, immunoprecipitati con mAb 9E10 ed analizzati su un gel SDS-PAGE 15%. Il saggio di immunoprecipitazione è effettuato dopo 24 h di infezione su colture di 2.5x10<sup>5</sup> neuroni. **(c)** Analisi per fluorescenza al microscopio confocale di neuroni infettati a M.O.I. 30 con AdLacZ (a), Ad (1-441) (b), Ad (1-230) (c) e Ad (1-44) (d), rispettivamente processati mediante protocollo di combinata fissazione e permeabilizzazione (a-d), o di estrazione e fissazione (a'-d'), e successivamente immunomarcati

con mAb 9E10 dopo 48 h di infezione (a-c), o 12 h di infezione (d). Nota che mentre la myc-tau (1-441) rimane stabilmente legata ai MT anche dopo trattamento di estrazione con detergenti (b'), la colorazione relativa alle proteine myc-tau (1-230) e myc-tau (1-44) è completamente rimossa mediante tale protocollo (c'-d'). Le immagini a fluorescenza sono prese come descritto nella figura 2. Scala: 7µmetri.

#### **-Figura 4**

##### **Saggi di vitalità neuronale in colture neuronali infettate con costrutti myc-tau**

Colture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z che con i vettori adenovirali esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) a differenti M.O.I. rispettivamente di 10, 25, 50. **(a)** La sopravvivenza neuronale è determinata dopo 48 h di infezione, sia per saggio colorimetrico di MTT, che per conta dei nuclei intatti, come riportato in materiali e metodi. Ogni punto sperimentale è la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule non infettate (Ctrl), considerati pari a 100 (\*P<0.05 rispetto ai neuroni Ctrl). **(b)** Determinazioni della vitalità neuronale a tempi differenti di infezione adenovirale, di colture infettate sia con AdLac-Z che Admyc-tau (1-441) e Admyc-tau (1-230) a M.O.I. 30. I dati sono riportati come descritto in (a). **(c)** I lisati proteici da neuroni infettati con AdLac-Z, Admyc-tau (1-441) e Admyc-tau (1-230) sono analizzati per valutare l'espressione della proteina dopo 24, 48, 36, 96 h di infezione, rispettivamente mediante mAb9E10 e un anticorpo policlonale diretto contro la  $\beta$ -galattosidasi. Pari ammontari di proteina sono caricati su gel, come confermato marcando la membrana con un mAb diretto contro la  $\beta$ -actina. **(d)** Analisi proteica per Western blotting di estratti totali da neuroni infettati rispettivamente con Ad (1-441) (in alto), e Ad (1-230) (in basso), mediante gli anticorpi fosforilazione-dipendente AT8, TAU-1, PHF6, PHF1, e mediante l'anticorpo fosforilazione-indipendente C17. Nota che in alto in (d) solo l'espressione della proteina tau (1-441) è riportata, mentre nel riquadro in basso è mostrata sia l'espressione esogena di myc-tau (1-230) (freccia), che quella della tau endogena.

#### **-Figura 5**

##### **Effetti dell'espressione adenovirale di Ad (1-441) e Ad (1-230) nei granuli del cervelletto sull'apoptosi indotta da deprivazione di siero e potassio**

Colture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z che con i vettori adenovirali esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) a M.O.I. 30. Dopo 48 h di infezione (6 D.I.V.), i neuroni sono lavati e mantenuti in un mezzo (BME) contenente alto potassio ma privo di siero (S-K25), o indotti in apoptosi spostandoli in mezzo privo di siero ma con basso potassio (S-K5). Dopo 24 h, la vitalità cellulare è determinata **(a)** mediante saggio colorimetrico di MTT e **(b)** mediante conta dei nuclei Hoechst-positivi, come riportato in materiali e metodi. Ogni punto sperimentale è la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule non infettate (Ctrl), considerati pari a 100 (\*P<0.05 rispetto ai neuroni Ctrl). **(c)** Istogramma indicante rispettivamente il numero di cellule myc-positivo nei neuroni esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) e mantenuti in terreno S-K25 e S-K5, e la percentuale di nuclei Hoechst-positivi (apoptotici). Nota che, come riportato nei risultati, la totalità dei neuroni esprimenti myc-tau non mostra segni di condensazione cromatinica, come evidenziato mediante colorazione per Hoechst.

### **-Figura 6**

#### **L'espressione adenovirale di Ad (1-441) e Ad (1-230) nei granuli del cervelletto K5-deprivati inibisce significativamente l'attività della caspasi-3 e l'attivazione della pro-caspasi-3**

Culture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z, che con i vettori adenovirali esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) a M.O.I. 30. Dopo 48 h di infezione (6 D.I.V.), i neuroni sono lavati e mantenuti in un mezzo (BME) contenente alto potassio ma privo di siero (S-K25), o indotti in apoptosi spostandoli in mezzo privo di siero ma con basso potassio (S-K5). **(a)** Dopo 8 h, i neuroni sono lisati e saggiati per l'attività enzimatica caspasi-3-simil, mediante taglio proteolitico sullo specifico substrato DEVD-MCA, come riportato in materiali e metodi. **(b)** L'analisi di immunofluorescenza è effettuata dopo 6 h l'esposizione allo stimolo apoptotico. I neuroni sono doppiamente marcati mediante un anticorpo policlonale diretto contro il frammento attivo della caspasi-3-tagliata (Asp 175) (rosso) e mediante un mAb diretto contro l'epitopo myc (verde). E' riportata esclusivamente l'immagine relativa ad un esperimento rappresentativo di tre. Nota che nei neuroni esprimenti myc-tau, la procaspasi-3 non è processata. Scala: 7  $\mu$ m. **(c)** L'attività della caspasi-6 è misurata incubando gli estratti cellulari dei neuroni, diversamente infettati ed esposti per 8h allo stimolo apoptotico, con lo specifico substrato VEID-MCA. L'accumulo di MCA è saggiato spettrofluorometricamente dopo 30 min di incubazione della reazione a 37 °C, come riportato in materiali e metodi. Per l'attività della caspasi-3 e della caspasi-6, i dati sono riportati come volte di induzione e in percentuale, normalizzando rispetto a quelli relativi alle cellule non infettate (Ctrl) considerati pari a 100 (\*P<0.05 rispetto ai neuroni Ctrl).

### **-Figura 7**

#### **L'espressione adenovirale di Ad (1-441) e Ad (1-230) nei granuli del cervelletto preserva alti livelli di P-Akt durante l'apoptosi da privazione di siero e potassio**

Culture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z, che con i vettori adenovirali esprimenti myc-tau (1-441) e myc-tau (1-230) a M.O.I. 30. Dopo 48 h di infezione (6 D.I.V.), i neuroni sono lavati e mantenuti in un mezzo (BME) contenente alto potassio ma privo di siero (S-K25), o indotti in apoptosi spostandoli in mezzo privo di siero ma con basso potassio (S-K5). **(a)** I neuroni sono doppiamente immunocolorati con un anticorpo policlonale diretto contro fosfo-Akt (Ser 473) (verde) e con mAb 9E10 diretto contro myc-tau (rosso). E' riportata esclusivamente l'immagine relativa ad un esperimento rappresentativo di tre. Scala: 7  $\mu$ m. **(b)** I lisati cellulari sono risolti elettroforeticamente su gel SDS-PAGE 10% ed elettrotrasferiti su membrana PVDF; i filtri sono stati poi incubati con l'anticorpo che riconosce la serina 473 fosforilata dell'enzima Akt1/2 in forma attiva (P-Akt). Nota che, mentre nei neuroni infettati con il vettore di controllo AdLacZ l'estensione della fosforilazione di Akt1/2 al sito 473 è marcatamente ridotta dopo esposizione delle colture al mezzo S-K5, nei neuroni infettati in parallelo con Ad myc-tau (1-441) e Ad myc-tau (1-230) tale epitopo rimane fosforilato nelle stesse condizioni apoptotiche. L'ammontare di proteina caricato è confermato incubando la membrana con l'anticorpo policlonale che riconosce la proteina totale Akt1/2.

### **-Figura 8**

#### **La neurotossicità indotta da myc-tau (1-44) nei granuli del cervelletto non è recuperabile da classici inibitori di apoptosi neuronale**

Culture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z, che con il vettore adenovirale esprimente myc-tau (1-44) a M.O.I. 25, in assenza e in presenza di differenti inibitori di apoptosi: IGF (25ng/ml), z-VAD-fmk (100 $\mu$ M) e Ad-Bcl2 (M.O.I. 30). Dopo 24 h di infezione, la sopravvivenza neuronale è determinata mediante saggio colorimetrico per MTT, come descritto in materiali e metodi. I dati relativi ad ogni punto sperimentale sono la media

+/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale, e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule non infettate (Ctrl), considerati pari a 100 (\*P<0.05 rispetto ai neuroni Ctrl). **(b)** Il grafico riporta l'attività della caspasi-3 nei neuroni esperimenti myc-tau (1-44) a differenti tempi dopo l'infezione, come descritto in materiali e metodi: i dati sono espressi in termini di volte di induzione (\*P<0.05, rispetto al relativo S-K25).

### **-Figura 9**

#### **La morte indotta da myc-tau (1-44) nei granuli del cervelletto è parzialmente prevenuta da antiossidanti ed antagonisti selettivi del recettore NMDA**

Colture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z, che con il vettore adenovirale esprime myc-tau (1-44) a M.O.I. 25 in assenza e in presenza di differenti antagonisti del recettore del glutammato, come MK-801 e APV, e di enzimi detossificanti i radicali liberi, come SOD e catalasi, alle rispettive concentrazioni indicate. Dopo 12, 24 h di infezione, la sopravvivenza neuronale è determinata mediante saggio colorimetrico per MTT, come descritto in materiali e metodi. I dati relativi ad ogni punto sperimentale sono la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale, e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule non infettate (Ctrl), considerati pari a 100 (\*P<0.05 rispetto ai neuroni Ctrl).

### **-Figura 10**

#### **Alti livelli d' espressione di tau (1-441) sono neurotossici, inducendo una morte dose- e tempo-dipendente.**

**(A)** Colture primarie di granuli del cervelletto (CGNs) sono infettate a 4 D.I.V., sia con AdLac-Z, che con il vettore adenovirale esprime myc-tau (1-441) a differenti M.O.I., rispettivamente di 30, 60, 120, 200. **(a)** La sopravvivenza neuronale è determinata dopo 24, 48 h di infezione per saggio colorimetrico di MTT. Ogni punto sperimentale è la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale, e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule infettate con il vettore di controllo AdLacZ, considerati pari a 100 (\*P<0.05, \*\* P<0.01 rispetto ai neuroni AdLac-Z-infettati). **(B)** Analisi proteica per Western blotting di estratti totali da neuroni infettati con Ad(1-441) rivelati, sia mediante mAb 9E10 e normalizzando poi per  $\beta$ -actina (in alto), che mediante mAb TAU-1 e normalizzando invece rispetto ad una banda nonspecifica (N.S.) (in basso). **(C)** Analisi di immunofluorescenza di neuroni corticali infettati con Ad myc-tau (1-441) a MOI 30 (a) e 120 (b) e marcati con anticorpo mAb 9E10 (verde). Dopo 72 h di infezione, i nuclei sono colorati con Hoechst 33258 (blu). In (c) è riportato un singolo neurone corticale esprime myc-tau (1-441) con segni di degenerazione (varicosità lungo il neurite) Scala: 20  $\mu$ m. **(D)** Microfotografia di neuroni corticali colorati con Hoechst 33258 (blu) dopo 48 h di infezione. I valori relativi alla percentuale di nuclei condensati e al valore di MTT sono riportati in basso. **(E)** Analisi proteica per Western blotting di preparazione di membrane cellulari di colture di CGNs trattate con l'oligonucleotide (ODN) antisenso, e quello non correlato (scrambled), per la subunità NR1 del recettore NMDA. **(F)** Colture primarie di CGNs sono transfettate in parallelo, con l'oligonucleotide (ODN) antisenso per NR1, e con quello non correlato (scrambled) e, dopo 24 h, sono infettate con Ad myc-tau (1-441). Dopo 48 h, ne è determinata la sopravvivenza neuronale per saggio colorimetrico di MTT. I dati sono espressi come in A.

### **-Figura 11**

#### **Assenza di attivazione di caspasi-3 durante la morte neuronale indotta da myc-tau (1-441) e tau (45-230)**

Analisi proteica per Western blotting di estratti proteici di colture primarie di CGNs infettate con Ad myc-tau (1-441) e Ad myc-tau (45-230) a differenti M.O.I., rispettivamente di 30, 60, 120, e con AdLac-Z a M.O.I.120, e rivelati mediante un anticorpo policlonale diretto contro il frammento attivo della caspasi-3-tagliata (Asp 175). Nota che, mentre nei neuroni indotti in apoptosi per rimozione di siero e potassio (S-K5) è visibile una banda di 17 KDa, relativa al frammento attivo della caspasi-3 tagliata (freccia), nei lisati dei CGNs tau-infettati essa non è rivelabile, neppure alla molteplicità più alta.

### **-Figura 12**

#### **I frammenti myc- tau diversamente influenzano la sopravvivenza neuronale**

Colture primarie di CGNs sono infettate a 4 D.I.V con AdLac-Z e con i vettori adenovirali codificanti per diverse regioni dell'estremità amino-terminale di tau 1-441 a differenti M.O.I. come rispettivamente riportato. La vitalità è determinata dopo 24, 48h ed è espressa come riportato in fig. 10A ( $P^* < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  in rapporto ai valori relativi ai CGNs AdLac-Z-infettati a M.O.I.30).

### **-Figura 13**

#### **La neurotossicità indotta dai frammenti amino-terminali di myc-tau (1-441) è caspasi-indipendente, ma NMDA-dipendente**

Colture primarie di CGNs sono infettate a 4 D.I.V, con AdLac-Z, e con i vettori adenovirali codificanti per diverse regioni dell'estremità amino-terminale di tau 1-441 a differenti M.O.I e trattati con z-VAD-fmk (100 $\mu$ M), Ad-Bcl2 (MOI120) e MK-801 (10 $\mu$ M). La vitalità cellulare è determinata a 24 h di infezione. I dati sono espressi come in fig.10A ( $**P < 0.01$  in rapporto ai valori relativi a colture di controllo non infettate).

### **-Figura 14**

#### **La neurotossicità indotta da alte dosi di myc-tau (1-441) coinvolge i recettori NMDA extrasinaptici, defosforilazione di CREB ed attivazione di ERK1/2.**

(A) Colture primarie di CGNs sono infettate a 4 D.I.V, con AdLac-Z, e con i vettori adenovirali codificanti per diverse regioni dell'estremità amino-terminale di tau 1-441 a differenti M.O.I, e trattati con ifenprodil (10 $\mu$ M), CNQX (40 $\mu$ M), omega-conotossina MCV11 (1 $\mu$ M), un bloccante dei canali del calcio di tipo N- P- e Q riportati essere inibiti da ifenprodil. La sopravvivenza è determinata a 24h e 48 h di infezione. I dati sono riportati come in 10A. (B) Analisi proteica per Western blotting di estratti proteici di colture primarie di CGNs infettati con AdLac-Z, Ad myc-tau (1-441), e Ad myc-tau (1-44) trattati con MK-801 (10 $\mu$ M), ifenprodil (10 $\mu$ M), CNQX (40 $\mu$ M) e rivelati mediante anticorpi policlonali diretti contro P-CREB (Ser133) e contro CREB totale. E' riportato il risultato più rappresentativo di diversi esperimenti indipendenti mostrandoci analoghi risultati. (C e D) Analisi per Western blotting di lisati cellulari di colture primarie di CGNs infettate con AdLac-Z, Ad myc-tau (1-441) e Ad myc-tau (1-44), in assenza (C) e in presenza (D) di MK-801 (10 $\mu$ M), a tempi diversi d' infezione marcati mediante un anticorpo policlonale diretto contro fosfo-ERK1/2 (P-ERK1/2). E' riportato il risultato più rappresentativo di diversi esperimenti indipendenti, mostrandoci analoghi risultati. (E) Sopravvivenza neuronale saggiata a 24h, 48 h di infezione di colture primarie di CGNs esperimenti Lac-Z, myc-tau (1-441), myc-tau (1-44) trattati con UO126 (5 $\mu$ M) e PD98059 (15 $\mu$ M). I dati sono espressi come in fig.10A ( $*P < 0.05$  ;  $**P < 0.01$  in rapporto ai valori relativi a colture di controllo non infettate). (F) Colture primarie di granuli del

cervelletto da topi di 6 giorni ERK1+/+ e ERK1-/- sono infettate con i vettori indicati, e la sopravvivenza cellulare è determinata dopo 48h. I dati sono espressi come in fig.10A (\*P<0.05; \*\*P<0.01 in rapporto ai valori relativi a colture di controllo non infettate). Analisi per Western blotting di estratti proteici di GGNs espianati da topi di 6 giorni ERK1+/+ e ERK1-/-.

### **-Figura 15**

#### **La neurotossicità indotta da alti livelli di myc-tau (1-441) è accompagnata ad attivazione della calpaina NMDA-dipendente**

(A) Analisi per Western blotting di lisati cellulari di colture primarie di CGNs, preventivamente trattate in presenza o assenza di MK-801 (10 $\mu$ M) e calpeptina (10 $\mu$ M), e poi infettate per 24 h con AdLac-Z, Ad myc-tau (1-441), Ad myc-tau (45-230), e Ad myc-tau (1-44), marcati con un anticorpo policlonale diretto contro la calpaina. Le frecce indicano sia la forma matura di più alto peso molecolare, che quella processata, attiva e quindi di più basso peso della calpaina. (B) Sopravvivenza neuronale saggiata a 24 h di infezione, di colture primarie di CGNs esprimenti Lac-Z e le proteine myc-tau in presenza o in assenza di calpeptina (10 $\mu$ M) o AdCalpastatina. I dati sono espressi come in fig.10A (\*P<0.05 ;\*\*P<0.01 in rapporto ai valori relativi a colture di controllo non infettate).

### **-Figura 16**

#### **La morte cellulare tau-indotta correla con il taglio calpaina-mediato di tau (frammento di 17KDa) dipendente dall' attivazione del recettore NMDA**

Analisi per Western blotting di lisati cellulari di colture primarie di CGNs, preventivamente trattate in presenza o assenza di MK-801 (10 $\mu$ M) e calpeptina (10 $\mu$ M), e poi infettate per 24h con AdLac-Z, Admyc-tau (1-441), marcati con mAb TAU-1. La porzione del gel corrispondente al frammento di 17 KDa è stata sopraesposta. La  $\beta$ -actina è utilizzata come controllo interno per verificare che pari ammontari di proteina sono caricati su gel.

### **-Figura 17**

#### **La frazione di tau fosforilata in colture neuronali esprimenti myc-tau (1-441) non aumenta a tempi diversi di infezione**

Lisati cellulari di colture primarie di CGNs infettate a 4 D.I.V. con Admyc-tau (1-441), a M.O.I.120 per 24h e 48h, sono risolti elettroforeticamente su gel SDS-PAGE e marcati con anticorpi che riconoscono diversi epitopi fosforilazione-dipendente di tau , TAU-1, AT8, PHF1, P262.

### **-Figura 18**

**Rappresentazione schematica delle sei diverse isoforme della proteina tau espresse nel sistema nervoso centrale. Le tre o quattro ripetizioni C-terminali sono indicate come barre nere, mentre le barre 2,3 e 10 in grigio indicano gli esoni che sono alternativamente processati nel trascritto primario.**

### **-Figura 19**

**Rappresentazione schematica del pattern di risoluzione elettroforetica delle bande di tau estratte dagli aggregati filamentosi di diverse tauopatie**

## **-Figura 20**

### **La patologia di tau in differenti tauopatie**

(a-c) Aree CA1 ippocampali. (a) Alzheimer's disease: *neurofibrillary tangles* (NFTs), *neuropil threads* (NTs) e neuriti distrofiche associate con placche senili (le placche neuritiche sono evidenziate tra le frecce). (b) Disordine a grani argirofili: grani argirofili (piccoli punti neri) distribuiti lungo i neuriti. Nota la totale assenza di NFTs e NTs in tale area cerebrale. (c) Numerosi NFTs e "ghosts tangles" (frecce) extracellulari. (d) Paralisi progressiva sopranucleare: *tufted astrocytes* distribuiti nello striato. (e) Paralisi progressiva sopranucleare: NFTs globosi (punti neri) ed abbondanti NTs nel nucleo subtalamico. (f) Degenerazione corticobasale: placche astrocitarie (le frecce ne indicano i margini) presenti nel giro cingolato.

## **Figura 21**

### **La patologia di tau nelle demenze causate da diverse mutazioni FTDP-17-associate mappanti nel gene tau**

La parte alta di ciascun pannello mostra l'immunoreattività per tau nella corteccia cerebrale (a,b,d) o nel giro dentato dell'ippocampo (c), utilizzando l'anticorpo fosforilazione-dipendente AT8- Scala: 100µm. La parte in basso di ciascun pannello mostra invece le immagini di microscopia elettronica dei filamenti tau, estratti dai cervelli dei pazienti affetti da tale malattia dementigena- Scala: 95nm. (a) La mutazione V337M produce una patologia neuronale di tau consistente sia di *paired helical filaments* che di *straight filaments*. (b) La mutazione P301L causa una patologia di tau, sia nei neuroni che nella glia, rappresentata principalmente da *twisted ribbons* e *straight filaments*. (c) Una patologia completamente neuronale è riportata invece nei pazienti con la mutazione K257T, caratterizzata da *irregular twisted filaments*. (d) Una mutazione nell'introne che segue l'esone 10 produce una patologia di tau sia neuronale che gliale, consistente di *twisted ribbons*.

## **-Figura 22**

(a) rappresentazione schematica del gene tau e mappa delle relative mutazioni associate alla demenza frontotemporale e parkinsonismo legate al cromosoma 17 (FTDP-17)

(b) Rappresentazione schematica della distribuzione delle bande risolte tramite Western blotting delle forme insolubili di tau da diverse tauopatie (AD/FTDP-17), prima (-) e dopo (+) trattamento enzimatico con fosfatasi alcalina

## **-Figura 23**

Diagramma che illustra il ruolo della fosforilazione nel regolare la funzione di tau in condizioni fisiologiche (A), o in condizioni patologiche (B)

## **-Figura 24**

Le possibili vie attraverso cui tau media la morte neuronale: modello gain of function, modello effetto dosaggio/loss of function

**-Tabella 1**

**Percentuale di sopravvivenza di colture neuronali di granuli del cervelletto e di corteccia cerebrale infettate con Admyc-tau (1-441) per 48h dopo esposizione a vari trattamenti**

Z-VAD-fmk (100µM), MK-801 (10µM), memantina (10µM), APV (100µM), CNQX (40µM), GYKY52466 (100µM). I dati sono espressi come in fig.10A (\*\*P<0.01in rapporto ai valori relativi a colture di controllo non infettate).

**-Tabella 2**

**Sommario schematico delle evidenze sperimentali del ruolo del (mal)-funzionamento della proteina tau nelle tauopatie.**

**-Tabella 3**

**Sommario schematico delle evidenze sperimentali del ruolo di citotossicità-diretta della proteina tau alterata nelle tauopatie**

**-Tabella 4**

**Sommario schematico di selezionati modelli murini transgenici esprimenti la proteina tau**

## **REFERENZE BIBLIOGRAFICHE**

Adamec E. et al.(a)- P301L tauopathy: confocal immunofluorescence study of perinuclear aggregation of the mutated protein- **J. Neurol. Sci.** **200:85-93 (2002)**.

Adamec E. et al.(b)- Calpain activation in neurodegenerative diseases: confocal immunofluorescence study with antibodies specifically recognizing the active form of calpain 2- **Acta Neuropathol.** **104:92-104 (2002)**.

Ahlijanian M.K. et al.- Hyperphosphorylation tau and neurofilament and cytoskeleton disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **97:2910-2915 (2000)**.

Allen B. et al. -Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301L tau protein- **J. Neurosci.****22: 9340-9351 (2002)**.

Allsopp T.E.et al.-Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cells during apoptosis- **Cell Death Differ.** **7:984-993 (2000)**.

Alonso A. del C. et al. -Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **91: 5562-5566 (1994)**.

Alonso A. del C. et al. - Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules- **Nat. Med.****2:783-787 (1996)**.

Alonso A. del C. et al. - Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer's 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.** **94:298-303 (1997)**.

Alonso A. del C. et al. -Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein- **J. Biol. Chem.** **276:37967-37973 (2001)**.

Alonso A. del C. et al. - Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments - **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **98:6923-6928 (2001)**.

Alonso A. del C. et al. - Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations- **J. Biol. Chem.****279:34878-34881 (2004)**.

Alonso A. del C. et al.- Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity- **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** **103:8864-8869 (2006)**.

Amadoro G. et al. -Role of N-terminal tau domain integrity on the survival of cerebellar granule neurons- **Cell Death and Differentiation** **11: 217-230 (2004)**.

Amadoro G.et al.-NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.****103:2892-2897 (2006)**.

An W.L. et al. - Up-regulation of phosphorylated/activated p70S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease- **Am. J. Pathol.** **163: 591-607 (2003)**.

Andorfer C. et al.- Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms- **J. Neurochem.** **86:582-590 (2003)**.

Andorfer C. et al. -Cell-cycle re-entry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms- **J. Neurosci.** **25:5446-5454 (2005)**.

Andreatis A. et al.-Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative disease- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739:91-103 (2005)**.

Arai T.J. et al.- Proteolysis of non-phosphorylated and phosphorylated tau by thrombin- **J- Biol. Chem.** **280:5145-5153 (2005)**.

Arawaka S. et al. -The mutation (val337met) disrupts cytoskeletal networks of microtubules- **Neuroreport** **10: 993-997 (1999)**.

Armstrong R.C et al.-Activation of the CED3-ICE related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis- **J. Neurosci.****17:533-562 (1997).**

Augustinack J.C. et al.- Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease-**Acta Neuropathol.** **103:26-35 (2002).**

Avila J. et al. - Role of tau protein in both physiological and pathological conditions-**Physiol. Rev.** **84:361-384 (2004).**

Baas P.W. et al. – Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells-**J.Cell Sci.** **107:135-143 (1994).**

Babu J.R. et al.-Sequestosome1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation-**J. Neurochem.****94:192-203 (2005).**

Bancher C. et al.- Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease- **Brain Res.** **477:90-99 (1989).**

Bancher C. et al.- Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease- **Brain Res.** **539:11-18(1991).**

Barghom S. et al.-Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments-**Biochemistry** **41:14885-14896 (2002).**

Bhaskar K. et al.- Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and Tau- **J. Biol. Chem.** **280:35119-35125 (2005).**

Biernat J. et al.- Phosphorylation at Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules. Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding- **Neuron** **11:153-163 (1993).**

Biernat J. et al. – The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domain- **Mol. Cell Biol.** **10:727-740 (1999).**

Biernat J. et al.-Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity- **Mol. Biol. Cell** **13:4013-4028 (2002).**

Billingsley M.L. et al.-Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration- **Biochem. J.** **323:577-591 (1997).**

Binder L.I. et al. –The distribution of tau in the mammalian central nervous system- **J.Cell Bio.** **101:1371-1378 (1985).**

Binder L.I. et al.- Tau, tangles, and Alzheimer's disease- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739:216-223 (2005).**

Bird T.D. et al.- A clinical pathological comparison of three families with fronto-temporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L)- **Brain** **122 (Pt4):741-756 (1999).**

Black M.M. et al. – Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons- **J. Neurosci.** **16:5727-5740 (1996).**

Bondareff W. et al.- Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease- **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **53:158-164 (1994).**

Bonini N. and Giasson B.I.- Snaring the function of  $\alpha$ -synuclein- **Cell** **123:359-373 (2005).**

Boutajangout A. et al.-Increased tau phosphorylation but absence of formation of neurofibrillary tangles in mice double transgenic for human tau and Alzheimer mutant (M146L) presenilin-1-**Neurosci. Lett.****318:29-33 (2002).**

Boutajangout A. et al.- Characterization of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1-**J. Neurobiol. Dis.** **15:47-60 (2004).**

Braak H. et al.- Neuropathological staging of Alzheimer-related changes- **Acta Neuropathol. (Berl.)** **82:239-259 (1991).**

Brady R.M. et al. –Presence of tau in isolated nuclei from human brain- **Neurobiol Aging** **16: 479-486 (1995).**

Brandt R. and Lee G. (a) –Functional organization of microtubule associated protein tau. Identification of regions which affect microtubular growth, nucleation, and bundle formation in vitro- **J. Biol. Chem.** **268:3414-3419 (1993).**

Brandt R. and Lee G. (b)- The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activity: implications for the formation of axonal microtubules-**J. Neurochem.** **61:997-1005 (1993).**

Brandt R. et al. – Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation- **J.Biol. Chem.** **269:11776-11782 (1994).**

Brandt R. et al. –Orientation, assembly, and stability of microtubule bundles induced by a fragment of tau protein- **Cell Motil. Cytoskelet.** **28:143-154 (1994).**

Brandt R. et al. – Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain- **J. Cell. Biol.** **131:1327-1340 (1995).**

Brandt R. et al. – Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739:331-354 (2005).**

Brion J.P. et al.- Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease- **Am. J. Pathol.** **154:255-270 (1999).**

Bueè L. et al.- Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders- **Brain Res. Brain Res. Rev.****33:95-130 (2000).**

Bunker J.M. et al. – Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration- **Mol.Biol.Cell** **15: 2720-2728 (2004).**

Bunker J.M. et al.- FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells- **J. Biol. Chem.** (2006).

Busser J. et al.- Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain- **J. Neurosci.** **18:2801-2807 (1998).**

Butner K.A. et al.-Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites- **J.Cell Biol.** **115:717-730 (1991).**

Caceres A. and Kosik K.S. – Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons- **Nature** **343:461-463 (1990).**

Caceres A. et al.- The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cerebellar granule macroneurons- **J. Neurosci.** **11:1515-1523 (1991).**

Canu N. et al. – Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis – **J. Neurosci.** **18: 7061-7074 (1998).**

Canu N. et al.- Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis- **J. Neurosci.** **20:589-599 (2000).**

Carlier M.F. et al. – Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin- **Biochimie** **66:305-311 (1984).**

Carmel G. et al.-The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology- **J. Biol. Chem.** **271:32789-32795 (1996).**

Cente M. et al.- Expression of a truncated tau protein induces oxidative stress in a rodent model of tauopathy- **Eur. J. Neurosci.** **24:1085-1090 (2006).**

Charton J.P. et al. –Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon.- **Brain Research** **816:609-617 (1999).**

Chee F.C. et al.- Overexpression of tau results in defective synaptic transmission in Drosophila neuromuscular junctions- **Neurobiol. Dis.** **20:918-928 (2005).**

Chen H.S. and Lipton S.-The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists- **J. Neurochem.** **97:1611-1626 (2006).**

Chen J. et al.–Projection domains of MAP2 and tau determine spacing between microtubules in dendrites and axons- **Nature** **360:674-677 (1992).**

Chen X.H. et al.-Long-term accumulation of amyloid-beta, beta-secretase, presenilin-1, and caspase-3 in damaged axons following brain trauma- **Am. J. Pathol.** **165:357-371 (2004).**

Ching J. et al.- Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice- **J. Neurosci.** **24:4692-4697 (2004).**

Cho J. H. et al.-Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules- **J. Neurochem.** **88:349-358 (2004).**

Chu C.T. et al.- Oxidative neuronal injury- the dark side of ERK1/2- **Eur. J. Biochem.** **271:2060-2066 (2004).**

Chung W. et al. - Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3- **Neurobiol. Dis.** **8:162-172 (2001).**

Chun W. et al.-The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal death- **Front. Biosci.** **12:733-756 (2007).**

Chung W. and Johnson G.V.- The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death-**Front. Biosci.** **12:733-756 (2007).**

Ciechanover A. and Brundin P. - The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg- **Neuron** **40:427-446 (2003).**

Clark L.N. et al.- Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **95:13103-13107 (1998).**

Cohen G.M.-Caspases: the executioners of apoptosis- **J. Biochem.** **326:1-16 (1997).**

Colucci-D'amato L. et al.- Chronic activation of ERK and neurodegenerative disease-**Bioessays** **25:1085-1095 (2003).**

Correas I. et al. - The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding- **Biochem. J.** **269:61-64 (1990).**

Couchie D. et al.- Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system- **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** **89:4378-4381 (1992).**

Cripps D. et al. -Alzheimer's disease-specific conformation of hyperphosphorylated PHF-tau is polyubiquitinated through lys-48, lys-11, and lys-6 ubiquitin conjugation- **J. Biol. Chem.** **281:19825-10838 (2006).**

Crohan M.O. et al.- Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine-**FEBS** **580:3973-3979 (2006).**

Crowther R.A. and Goedert M. - Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative disease- **J. Struct. Biol.** **130: 271-279 (2000).**

Crowther R.A.- The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease- **FEBS Lett.** **309:199-202 (1992).**

Cruz J.C. et al.- Aberrant cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles- **Neuron** **40:471-483 (2003).**

Cunningham C.C. et al.- Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line-**J. Cell Biol.** **136.845-857 (1997).**

D'Mello S.R. et al. - Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like-growth factor I and cAMP- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **90:10989-10993 (1993).**

D'Mello S.R. et al.- Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling- **J. Neurosci.** **17:1548-1560 (1997).**

D'Souza I. et al.- Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **96: 5598-5603 (1999).**

da Costa C. et al.-Wild-type but not Parkinson's disease ala53-thr mutant  $\alpha$ -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli- **J. Biol. Chem.** **275:24065-24069 (2000).**

Dabir D.V. et al.- Impaired glutamate transport in a mouse model of tau pathology in astrocytes- **J. Neurosci.** **26:644-654 (2006).**

David D.C. et al.- Proteasomal degradation of tau protein- **J. Neurochem.** **83:176-185 (2002).**

Dawson H.N. et al.- Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice- **J. Cell Sci.** **114:1179-1187 (2001).**

De Silva R. et al.- Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies- **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** **29:288-302 (2003).**

De Silva R. and Farrer M.- Tau neurotoxicity without lesions: a fly challenges a tangled web- **Trends Neurosci.** **7:327-329 (2002).**

De Ture M. et al.- Missense tau mutations identified in FTDP-17 have a small effect on tau-microtubule interaction- **Brain Res.** **853:5-14 (2000).**

De Ture M. et al.- Tau assembly in inducible transfectants expressing wild-type or FTDP-17 tau- **Am. J. Pathol.** **161:1711-1722 (2002).**

de Vrij F.M. et al.- Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death- **FASEB J.** **15:2680-2688 (2001).**

Delacourte A. et al.- Tauopathies: recent insights into old diseases- **Folia Neuropathol.** **43:244-257 (2005).**

Delobel P. et al.- Functional characterization of FTDP-17 tau gene mutations through their effects on *Xenopus* oocyte maturation- **J. Biol. Chem.** **277:9199-9205 (2002).**

Dickey C.A. et al.- Deletion of Ubiquitin Ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of the endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species- **J. Neurosci.** **26:6985-6996 (2006).**

Dickson D.W. et al.- Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles with antibodies to sub-regions of tau protein: identification of hidden and cleaved tau epitopes and a new phosphorylation site- **Acta Neuropathol.** **84:596-605 (1992).**

Ding H. et al.- Site-specific phosphorylation and caspase-cleavage differentially impact tau-microtubule interactions and tau aggregation- **J. Biol. Chem.** **281:19107-19114 (2006).**

DiTella M.- Microfilament-associated growth cone component depends upon tau for its intracellular localization- **Cell Motil. Cytoskeleton.** **29:117-130 (1994).**

Dogan A. et al.- Effects of ifenprodil, a polyamine site NMDA receptor antagonist, on reperfusion injury after transient focal cerebral ischemia- **J. Neurosurg.** **11:2545-2551 (1997).**

Dorval V. and Fraser P.- Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and  $\alpha$ -synuclein- **J. Biol. Chem.** **281:9919-9924 (2006).**

Dotti C.G. et al.- The expression and distribution of microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture- **Neuroscience** **23:121-130 (1987).**

Dou F. et al.- Chaperones increase association of tau protein with microtubules- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **100:721-726 (2003).**

Drechsel D.N. et al.- Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau- **Mol. Cell Biol.** **3:1141-1154 (1992).**

Drewes G. et al.- Mitogen activated protein (MAP) kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease- **FEBS Lett.** **308:218-224 (1992).**

Drewes G. et al.- MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption- **Cell** **89:297-308 (1997).**

Drubin D.G. et al.- Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors- **J. Cell Biol.** **101:1799-1807 (1985).**

Drubin D.G. et al.- Tau protein function in living cells- **J. Cell Biol.** **103:2739-2746 (1986).**

Dudek H. et al. – Regulation of neuronal survival by serine-threonine kinase Akt- **Science** **275:661-665 (1997)**.

Dudek S.M. et al.-Transglutaminase catalyzes the formation of sodium dodecyl sulphate-insoluble, Alz50-reactive polymers of tau-**J. Neurochem.** **61:1159-1162 (1993)**.

Dugan L.L. et al.-Mitochondrial production of reactive oxigenes in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate-**J. Neurosci.** **15:6377-6388 (1995)**.

Ebneth A. et al. – Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implication for Alzheimer's disease- **J. Cell Biol.** **143:777-794 (1998)**.

Edson K. et al. – Actin depolymerization induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells- **Development** **117:689-700 (1993)**.

Eidenmuller J. et al.- Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins- **Biochemistry** **39:13166-13175 (2000)**.

Eldadah BA. et al. –The role of CED-3 related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells-**J. Neurosci.****17:6105-6113 (1997)**.

Endoh R. et al.- Lack of the carboxy terminal sequence of tau in ghost tangles of Alzheimer's disease- **Brain Res.** **601:164-172 (1993)**.

Engel T. et al.- Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert-**J. Neurochem.** **99:1445-1455 (2006)**.

Eriksen J.L. et al.- Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease- **Trends Mol. Med.** **11: 91-96 (2005)**.

Esclair F. et al.-Neuronal apoptosis is associated with a decrease in tau mRNA expression-**Neuroreport** **9: 1173-1177 (1998)**.

Esmali-Azad B. et al.- Sense and antisense transfection analysis of tau protein-tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability- **J. Cell Sci.**- **107: 869-879 (1994)**.

Fasulo L. et al.- Tau truncation in Alzheimer's disease: expression of a fragment encompassing PHF core tau induces apoptosis in COS cells- **Alzheimer's Rep.****1: 25-32 (1998)**.

Fasulo L. et al. -The microtubule-associated protein tau is substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis- **J.Neurochem.** **75: 624-633 (2000)**.

Fath T. et al. -Tau-mediated cytotoxicity in a pseudophosphorylation model of Alzheimer's disease- **J. Neurosci.****15: 9733-9741 (2002)**.

Feinstein S. C. et al.- Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739: 268-279 (2005)**.

Ferrari A. et al.-  $\beta$ -Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture-**J. Biol. Chem.** **278: 40162-40168 (2003)**.

Ferreira A. et al.-Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau- **Brain Res. Dev. Brain Res.** **49: 215-228 (1989)**.

Ferrer I. et al.- Phosphorylated protein kinases associated with neuronal and glial deposits in argyrophilic grain disease- **Brain Pathol.** **13: 62-78 (2003)**.

Feuillet S. et al.- Tau is not normally degraded by the proteasome- **J. Neurosci. Res.** **80: 400-405 (2005)**.

Flanagan L.A. et al.- The structure of divalent cation-induced aggregates of PIP2 and their alteration by gelsolin and tau-**Biophys J.** **73: 1440-1447 (1997)**.

Fleming L.M. et al.- Modulation of the phosphorylation state of tau in situ : the roles of calcium and cyclic AMP- **Biochem. J.** **309 (Pt1):41-47 (1995)**.

Franke T.F. et al. – Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3-4-bisphosphate- **Science** **275**: 665-668 (1997).

Frappier T.F. et al.- Tau regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling- **J. Neurochem.** **63**: 2288-2294 (1994).

Frappier T.F. et al. – Abnormal microtubule packing in processes of SF9 cells expressing the FTDP-17 V337M tau mutation- **FEBS Lett.** **455**: 262-266 (1999).

Fulga T. et al.- Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo- **Nature Cell Biology** **9**: 139-148 (2006).

Galli C. et al. – Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis- **J. Neurosci.** **15**: 1172-1179 (1995).

Gallo V. et al. –Modulation of non-N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cerebellar granule cells- **J. Neurochem.** **54**:1619-1625 (1980).

Gamblin T.C. et al.-In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering:method and application to the study of FTDP-17 mutants-**Biochemistry** **39**: 6136-6144 (2000).

Gamblin T.C. et al.- Tau polymerization: role of the amino terminus- **Biochemistry** **42**: 2252-2257 (2003).

Gamblin T.C. et al.-Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis- **Biochemistry** **42**: 15009-15017 (2003).

Gambling T.C. et al.- Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **100**:10032-10037 (2003).

Gambling T.C. et al.- Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of tau- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739**:140-149 (2005).

Games D. et al.- Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$  amyloid protein- **Nature** **373**: 523-527 (1995).

Garcia-Sierra F. et al.-Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease- **J.Alzheimer's Disease** **5**:65-77 (2003).

Garver T.D. et al.- Microtubule assembly competence analysis of freshly-biopsied human tau, dephosphorylated tau, and Alzheimer tau- **J. Neurosci. Res.** **44**:12-20 (1996).

Georgieff I.S. et al. – Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous system- **J.Cell Sci.** **105**:729-737 (1993).

Georgieff I.S. et al.- High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system –**J.Cell Sci.** **100** (Pt I):55-60 (1991).

Ghoshal N. et al.-Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease- **Exp. Neurol.** **177**:475-493 (2002).

Ghoshal N. et al.-Tau-66:evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease- **J. Neurochem.** **77**:1372-1385 (2001).

Giasson B.I. et al.- Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein- **Science** **300**:636-640 (2003).

Ginsberg S. et al.-Shift in the ratio of three-repeat tau and four-repeat tau mRNAs in individual cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease- **J. Neurochem.** **96**:1401-1408 (2006).

Glatz D. et al.-The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease-**J. Neurochem.** **96**:635-644 (2006).

Goedert M. et al.- 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(1988).

Goedert M. et al.- Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain- **EMBO J.** **8**:393-399 (1989).

Goedert M. et al. –Multiple isoforms of human microtubule- associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease-**Neuron** **3:519-526 (1989)**.

Goedert M. et al. – Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau MAP2-**Trends Neurosci.** **14:193-199 (1991)**.

Goedert M. et al. –Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms- **Neuron** **8:159-168 (1992)**.

Goedert M. et al. – Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.****89:1983-1987 (1992)**.

Goedert M. et al. – The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development - **Prot. Natl. Acad. Sci.** **90:5066-5070 (1993)**.

Goedert M. et al. –Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer’s disease-**Ann.N.Y. Acad. Sci.** **777:121-131 (1996)**.

Goedert M. et al.- Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like-filaments induced by sulphated glycosaminoglycans- **Nature** **383:550-553 (1996)**.

Goedert M. et al.-Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments- **FEBS Lett.** **450:306-311 (1999)**.

Goedert M. et al.- Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). Their relevance for understanding the neurodegenerative process-**Ann. N.Y. Acad. Sci.** **920:74-83 (2000)**.

Goedert M. et al.- Tau gene mutations and their effects- **Mov. Disor.** **20 (Suppl. 12) S45-S52 (2005)**.

Goedert M. and Jakes R. – Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization –**EMBO J.** **9:4225-4230 (1990)**.

Goedert M. and Jakes R. –Mutations causing neurodegenerative tauopathies- **Biochimica and Biophysica Acta** **1739:240-250 (2005)**.

Goldbaum O. et al.- Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid- **J. Neurosci.** **23:8872-8880 (2003)**.

Gomes- Isla T.- Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease – **Ann. Neurol.** **41:17-24 (1997)**.

Gong C.X. et al.- Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain- **Brain Res. Brain Res. Protoc.** **6:134-140 (2001)**.

Gong C.X. et al.- Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5- **J. Neurochem.** **88:298-310 (2004)**.

Goode B.L. et al.- Functional interaction between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly- **Mol. Biol. Cell** **8:353-365 (1997)**.

Gordon-Krajcer W. et al.-Conformation of paired helical filaments blocks dephosphorylation of epitopes shared with fetal tau except Ser199/202 and Ser202/Thr205- **Brain Res.** **856:163-175 (2000)**.

Gotz J. et al. – Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform-**EMBO J.** **14:1304-1313 (1995)**.

Gotz J. et al. –Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau - **J. Biol. Chem.** **276:529-534 (2001)**.

Gotz J. et al. – Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$  42 fibrils- **Science** **293:1491-1495 (2001)**

Gotz J. et al. –Do axonal defects in tau and amyloid precursor protein transgenic animals model axonopathy in Alzheimer’s disease?- **J. Neurochem.** **98:993-1006 (2006)**.

Graham F.L. et al.- A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA-**Virology** **52:456-476 (1973)**.

Greenberg S.G. and Davies P. –A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrilamide gel electrophoresis- **Prot. Natl. Acad. Sci. 87:5827-5831 (1990).**

Greenwood J.A. and Johnson G.V. – Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau- **Exp. Cell Res. 220:332-337 (1995).**

Gregori L. et al.-A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis- **J. Biol. Chem. 265:8354-8357 (1990).**

Griffith L.M. and Pollard T.D.- The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins- **J.Biol. Chem. 257:15134-15143 (1982).**

Grundke- Iqbal I. et al. - Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer paired helical filaments- **J. Biol. Chem.93:4913-4917 (1986).**

Grundke-Iqbal I. et al.- Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments- **Mol. Brain Res. 4. 43-52 (1988).**

Gustke N. et al.- Domains of tau protein and interaction with microtubules- **Biochemistry 33:9511-9522 (1994).**

Hall G.F. et al. –Tau overexpressed in identified lamprey neurons in situ is spatially segregated by phosphorylated state, forms hyperphosphorylated, dense aggregation and induce neurodegeneration - **Prot. Natl. Acad. Sci. 94:4733-4738 (1997).**

Hall G.F. et al.- Human tau induce microtubule and synapse loss in an in vitro model of neurofibrillary degenerative disease- **J. Cell Sci. 113:1373-1387 (2000).**

Hall G.F. et al.- Staging of neurofibrillary degeneration caused by human tau overexpression in a unique cellular model of human tauopathy- **Am. J. Pathol. 158:235-246 (2001).**

Harada A. et al.-Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein- **Nature 369:488-491 (1994).**

Hardingham G.E. et al. –Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways- **Nat. Neurosci. 5: 405-414 (2002).**

Hardy J. et al.- Genetic dissection of Alzheimer’s disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau- **Nat. Neurosci. 1:335-358 (1998).**

Hardy J. and Selkoe D.J.- The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics- **Science 297:353-356 (2002).**

Hasegawa M. et al.-Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly- **FEBS Lett. 437:207-210 (1998).**

Hashiguchi M. et al. – 14-3-3 zeta is an effector of tau protein phosphorylation- **J. Bio. Chem. 275: 25247-25254 (2000).**

Hashimoto M. et al.- $\alpha$ -synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun-N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells- **J. Biol. Chem. 227:11465-11472 (2002).**

Hensley K. et al.-p38 kinase is activated in the Alzheimer’s disease brain- **J. Neurochem. 72:2053-2058 (1999).**

Hernandez F. et al.-GSK-3 $\beta$  dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms –**Neurobiol. Aging 24:1087-1094 (2003).**

Hetman M. et al.- Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival- **Eur. J. Biochem.271:2050-2055 (2004).**

Higuchi M. et al.- Transgenic model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration- **Neuron 35:433-446 (2002).**

Higuchi M. et al.-Tau protein and tauopathy- **Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress 94:1339-1354 (2002).**

Hirokawa N. et al.– Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins- **Curr. Opin. Cell Biol. 9:1381-1388 (1994).**

Ho L. et al. – Gene expression profiling of the tau mutant (P301L) transgenic mouse brain- **Neurosci. Lett. 310:1-4 (2001).**

Hoenicke J. et al. – A two-hybrid screening of human tau protein: interaction with Alu-derived domain- **Neuroreport** **13:343-349** (2002).

Hoffman R. et al. – Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites – **Biochemistry** **36:8114-8124** (1997).

Hogg M. et al.-The L266V tau mutation is associated with frontotemporal dementia and Pick-like 3R and 4R tauopathy- **Acta Neuropathol. (Berl.)****106:323-336** (2003).

Hong M. et al.- Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3- **J. Biol. Chem.****272:25326-25332** (1997).

Hong M. et al.-Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17- **Science** **282:1914-1917** (1998).

Horiguchi T. et al.- Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies- **Am. J. Pathol.** **163:1021-1031** (2003).

Horowitz P.M. et al.- Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease- **J. Neurosci.****24:7895-902** (2004).

Horowitz P.M. et al.- N-terminal fragments of tau inhibit full-length tau polymerization in vitro- **Biochemistry** **45:12859-12866** (2006).

Hrnkova M. et al. – Cognitive deficit and progressive motor impairment in AD rat model- **Neurobiol. Aging** **25:S233** (2004).

Hrnkova M. et al. – Neurodegeneration caused by expression of human truncated tau leads to progressive neurobehavioural impairment in transgenic rats- **Brain Res.****1130:206-213** (2007).

Hsiao K. et al. – Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice- **Science** **274:99-102** (1996).

Hutton M. et al.- Association of missense and 5' splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17- **Nature** **393:702-705** (1998).

Hwang S.C. et al. – Activation of phospholipase C- $\gamma$  by the concerted action of tau protein and arachidonic acid- **J.Biol. Chem.** **271:18342-18349** (1996).

Hyams J.S. et al.- Nucleation of microtubules in vitro by isolated spindle pole bodies of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*- **J. Cell Biol.** **78:401-414** (1978).

Hyman B.T. et al.-Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease-**Biochim. Biophys. Acta** **1739:150-157** (2005).

Ignelzi M.A. et al. – Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1-**Neuron** **12:873-884** (1994).

Ikegami S. et al.- Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice- **Neurosci. Lett.** **279:129-132** (2000).

Imajoh S. et al. –The COOH-terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity.-**J. Biochem.** **101:447-452** (1987).

Ingram E.M. et al.- Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17- **Trend Mol. Med.** **8:555-562** (2002).

Inomata H. et al. – A scaffold protein JIP-1b enhances amyloid precursor protein phosphorylation by JNK and its association with kinesin light chain- **J. Biol. Chem.** **278:22946-22955** (2003).

Iqbal K. et al.- Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease- **Lancet** **2:421-426** (1986).

Iqbal K. et al.-Alzheimer paired helical filaments: restoration of the biological activity by dephosphorylation- **FEBS Lett.** **349:104-108** (1994).

Iqbal K. et al. – Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739:198-210** (2005).

Irizarri M.C. et al.- A $\beta$  deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mice- **J. Neurosci.****17:7053-7059** (1997).

Ishiguro K.A. et al.-Glycogen synthase kinase  $3\beta$  is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments- **FEBS Lett.** **325:167-172 (1993).**

Ishihara T. et al.- Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform- **Neuron** **24:751-762 (1999).**

Ishihara T. et al.-Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice- **Am. J. Pathol.** **158:555-562 (2001).**

Jackson G.R. et al. – Human wild-type interact with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila – **Neuron** **34:509-519 (2002).**

Janke C. et al. – Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implication for the neurodegenerative disorders- **Molecular Brain Research** **68 (1-2):119-128 (1999).**

Jenkins S.M. et al.- Tau complexes with phospholipase C- $\gamma$  in situ- **Neuroreport** **9:67-71 (1998).**

Jensen P.H. et al.-  $\alpha$ -synuclein binds to tau and stimulated the protein-kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356- **J. Biol. Chem.** **274: 25481-25489 (1999).**

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.**- **48:128-132 (1997).**

Jicha G.A. et al.- Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease- **J. Neurosci. Res.** **55:713-723 (1999).**

Johnson G.V. et al.- Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction- **J. Cell Sci.****117:5721-5729 (2004).**

Julien J.P. – Neurofilaments and motor disease- **Trends Cell Biol.** **7:243-249 (1997).**

Kaeck S. et al. – Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins – **Neuron** **17:1189-1199 (1996).**

Kampers T. et al.- RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments- **FEBS Lett.** **399:344-349 (1996).**

Kanai Y. et al. -Expression of multiple isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA- **J. Cell Biol.** **109:1173-1184 (1989).**

Kanai Y. et al.-Microtubule bundling by tau proteins in vivo:analysis of functional domains- **EMBO J.** **11:3953-3961 (1992).**

Karawabayashi T. et al.- Dimeric amyloid  $\beta$  protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease- **J. Neurosci.** **24:3801-3809 (2004).**

Karsten S.L. et al. – A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration- **Neuron** **51:549-569 (2006).**

Kech S.R. et al.- Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease-**J. Neurochem.** **85:115-122 (2003).**

Keller J.N. et al.-Impaired proteasome function in Alzheimer's disease- **J. Neurochem.** **75:436-439 (2000).**

Kelly B. et al.- $\beta$ -amyloid- induced dynamin 1 degradation is mediated by NMDA receptors in hippocampal neurons- **J. Biol. Chem.** **281:28079-28089 (2006).**

Kempf M. et al. – Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament- dependent manner-**J. Neurosci.** **16:5583-5592 (1996).**

Kenessey A.P. et al.- Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration- **J. Neurochem.** **69:2026-2038 (1997).**

Khatoon S. et al. – Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein- **J. Neurochem.** **59:750-753 (1992).**

King M.E. et al.- Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar- $\beta$ -amyloid- **J. Cell Biol.** **20:175:541-546 (2006).**

Kins S. et al.- Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice- **J. Biol. Chem.** **276:38193-38200 (2001)**.

Kins S. et al.-Activation of the ERK and JNK signalling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP-2A in transgenic mice- - **Am. J. Pathol.** **163: 833-843 (2003)**.

Kitazawa M. et al.- Lipopolysaccharide induced inflammation exacerbates tau pathology by cyclin-dependent kinase 5 mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease- **J. Neurosci.** **25:8843-8853 (2005)**.

Klein C. et al.- Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau- **J. Neurosci.** **22:698-707 (2002)**.

Klein W.L. et al.- Small assemblies of unmodified amyloid  $\beta$ -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease- **Neurobiol. Aging** **25:569-580 (2004)**.

Knops J. et al.- Overexpression of tau in nonneuronal cell induces long cellular processes- **J. Cell Biol.** **114:725-733 (1991)**.

Knowles R.B. et al.- Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of a close association between activated MAP kinase and neurofibrillary tangles: implications for MAP kinase activation in Alzheimer's disease-**J. Neuropathol. Exp. Neurol.****58:1090-1098 (1999)**.

Koolen D.A. et al. – A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism- **Nature Genetics** **38:999-1001 (2006)**.

Kosik K.S. et al.- Developmentally regulated expression of specific tau sequence- **Neuron** **2: 1387-1397 (1989)**.

Kosik K.S. and Shimura H. – Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies- **Biochimica and Biophysica Acta** **1739:298-310 (2005)**.

Kraemer B.C. et al. –Neurodegeneration and defective neurotransmission in a Caenorhabditis elegans model of tauopathy- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.****100:9980-9985 (2003)**.

Krapivinski G. et al. – The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1 -**Neuron** **40:775-784 (2003)**.

Krishnamurthy G.V. et al.- Mutant (R406W) human tau is hyperphosphorylated and does not efficiently bind microtubules in a neuronal cortical cell model- **J.Biol. Chem.** **279:7893-7900 (2004)**.

Kuret J. et al.-Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain- **J. Neurochem.** **69:2506-2515 (1997)**.

La Ferla F.M. and Oddo S.-Alzheimer's disease: A $\beta$ , tau and synaptic dysfunction- **Trends Mol.Med.** **11:170-176 (2005)**.

Laemmli U.K. et al. – Cleavage of structural proteins during assembly or the head of bacteriophage T4 –**Nature** **227:682-685 (1970)**.

Lafon-Cazal M. et al. –NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity- **Nature** **364:535-537 (1993)**.

Lasn H. et al.-The number of neurons in the inferior olivary nucleus in Alzheimer's disease and normal aging: a stereological study using the optical fractionator. **J. Alzheimer's Dis.** **3:159-168 (2001)**.

Lau L.F. et al.- Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease- **Current Topics in Medicinal Chemistry** **2:395-415 (2002)**.

Layfield R.J. et al.- Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disease- **Ageing Res. Rev.** **2:343-356 (2003)**.

Le Corre S. et al.- An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **103:9673-9678 (2006)**.

Ledesma M.D. et al.- Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein- **J. Neurosci.****13.508-515 (1993)**.

Ledesma M.D. et al.-Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments- **Cell. Mol. Biol.** **44:1111-1116 (1998)**.

Lee C.W. et al.- Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -mediated tau phosphorylation in cultured cell lines- **Neuroreport** **14:257-260** (2003).

Lee G. et al. - Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization- **J.Cell Sci.** **102:227-237** (1982).

Lee G. et al.- The microtubule binding domain of tau protein- **Neuron** **2:1615-1624** (1989).

Lee G. et al. – A new molecular interactor for tau protein- **Soc.Neurosci.Abstr.** **22:975** (1996).

Lee G. et al. – Expression of MAP cDNAs in eukaryotic cells – **In Brain Microtubule Associated Proteins: Modifications in Disease, Amsterdam Netherlands-Harwood Academic Publisher** **293-311** (1997).

Lee G. et al. –Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases- **J. Cell Sci.** **111(Pt.21):3167-3177** (1998).

Lee G. et al. – Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease- **J.Neurosci.****24:2304-2312** (2004).

Lee G. et al.-Tau and src family tyrosine kinases- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739:323-330** (2005).

Lee H. et al.-Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? **Trends Mol. Med.** **11:164-169** (2005).

Lee M-Y.-V. et al.- Neurodegenerative tauopathies- **Annu. Rev. Neurosci.** **24:1121-1159** (2001).

Lefebvre T. et al. – Evidence of a balance between phosphorylation and O.GlcNAc glycosylation of tau proteins: a role in nuclear localization-**Biochim. Biophys. Acta** **1619:167-176** (2003).

Leger J. et al. –Identification of tau region required for process formation in PC12 cells. **J. Cell Sci.** **102:227-237** (1994).

Leger J. et al.-Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau- **J. Biol. Chem.** **270:823-829** (1995).

Leger J. et al.- Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of the microtubule-associated protein tau-**J. Biol. Chem.** **272:8441-8446** (1997).

Leroy K. et al.- Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in rat brain- **J. Chem. Neuroanat.** **16:279-293** (1999).

Leroy K. et al.- The function of the microtubule-associated protein tau is variably modulated by graded changes in glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity-**FEBS Lett.** **465:34-38** (2000).

Lesort M. et al.-Insulin transiently increases tau phosphorylation:involvement of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and Fyn tyrosin kinase - **J. Neurochem.****72:576-584** (1999).

Levi G. et al. – Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids differentiating cerebellar granule cells cultures – **Brain Res.** **290:77-86** (1984).

Lew J. et al.- A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase-5- **Nature** **371:423-426** (1994).

Lewis J. et al.- Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L). tau protein- **Nat. Genet.** **25:402-405** (2000).

Lewis J. et al. –Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP- **Science** **293:1487-1491** (2001).

Li B. et al.-Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors-**Nat. Neurosci.** **5:833-834** (2002).

Li L. et al. –Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration-**FEBS Lett.** **566:261-269** (2004).

Li S. et al.-Glutamate transporter alteration in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression- **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **56:901-911** (1997).

Liao H. et al.- Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein tau- **J. Biol.Chem.** **273:21901-21908** (1998).

Liazoghli D. et al. –Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons- **Am. J. Pathol.** **166:1499-1514 (2005).**

Lim F. et al. – FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and tau filaments in forebrain- **Mol. Cell. Neurosci.****18:702-714 (2001).**

Lim J. et al.- Pinning down phosphorylated tau and tauopathies- **Biochimica et Biophysica Acta** **1739:311-322 (2005).**

Lin W.L. et al. –Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau- **J. Neurocytol.** **32:1091-1105 (2003).**

Liou Y.C. et al.-Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration- **Nature** **424:556-561 (2003).**

Litersky J.M. et al.- Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain- **J. Biol. Chem.** **267:1563-1568 (1992).**

Litersky J.M. et al.- Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at ser-262 and ser-356- **Biochem. J.** **316 (Pt2):655-660 (1996).**

Liu C.W. et al.- Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons- **Cell Motil. Cytoskelet.** **43:232-242 (1999).**

Liu F. et al.- GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a novel mechanism involved in Alzheimer's disease- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **101:10804-10809 (2004).**

Liu F. et al.-Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer's disease brain- **J. Biol. Chem.** **280:37755-37762 (2005).**

Liu W.K. et al.- Heterogeneity of tau proteins in Alzheimer's disease- **Am. J. Pathol.** **142:387-394 (1993).**

Liu W.K. et al.- Relationship of the extended tau haplotype to tau biochemistry and neuropathology in progressive supranuclear palsy- **Ann. Neurol.** **50:730-739 (2002).**

Loomis P.A. et al. – Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **87:8422-8426 (1990).**

Lorio G. et al.- Modification of tau protein during neuronal cell death- **J. Alzheimer's disease** **3:563-575 (2001).**

Lovestone S. et al.- Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations- **Biol. Psychiatry** **54:995-1003 (1999).**

Lovestone S. et al.- Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules- **Neuroscience** **73:1145-1157 (1996).**

Lu Q. et al. –Functional studies of Alzheimer's disease tau protein- **J. Neurosci.** **13:508-515 (1993).**

Lu M. et al. – Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms- **Mol. Biol. Cell** **12:171-184 (2001).**

Lu P.J. et al. –The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein- **Nature** **399:784-788 (1999).**

Lucas J.J. et al.- Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice- **EMBO J.** **20:27-39 (2001).**

Luo M. et al. – Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain- **J. Neurochem.** **90:340-351 (2004).**

Luo M. et al. –Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. **J. Cell Biochem.** **91:880-895 (2004).**

Maas T. et al.- Interaction of tau with the neuronal membrane cortex is regulated by phosphorylation sites that are modified in paired helical filaments- **J. Biol. Chem.** **275:15733-15740 (2000).**

Makrides V. et al.- Microtubule-dependent oligomerization of tau- implications for physiological tau function and tauopathies- **J. Biol. Chem.** **278:33298-33304 (2003).**

Mandelkov E.M. et al. –Tau domains, phosphorylation and interaction with microtubules- **Neurobiol. Aging** **16:355-362 (1995)**.

Mandell J.W. et al. – A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons- **J. Neurosci.** **24:255-256 (1996)**.

Manthorpe M. et al. – An automated colorimetric microassay for neuronotrophic factors – **Brain Res.** **390:191-198 (1986)**.

Matsuda S. et al. – Amyloid  $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP), but not A $\beta$ PP-like protein 2, is bridged to the kinesin light chain by the scaffold protein JNK-interacting protein 1- **J. Biol. Chem.** **278:38601-38606 (2003)**.

Mazzucchelli C.-Knockout of ERK 1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory-**Neuron** **34:807-820 (2002)**.

Medina M.G. et al.-Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2activation-**EMBO J.****24:1706-16 (2005)**.

Merken M.F. et al.- Differential sensitivity to proteolysis by brain calpain of adult human tau, fetal human tau and PHF-tau- **FEBS Lett.** **368:10-14 (1995)**.

Merrick S.E. et al.- Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/threonine phosphatase in cultured human neurons (NT2N) cells –**J. Neurosci.** **17:5726-5737 (1997)**.

Metha P.D. et al.- Increased level of tau-like protein in patients with Down syndrome- **Neurosci. Lett.** **275:159-162 (1999)**.

Miller M.L. et al.-Transglutaminase cross-linking of the protein tau- **J.Neurochem.** **65:1760-1770 (1995)**.

Miller T.M. et al. – Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor-I-mediated survival of cerebellar granule cells- **Brain Res.** **809:297-301 (1997)**.

Mills J.C. et al. –Activation of a PP2A-like phosphatase and dephosphorylation of tau characterize onset of the execution phase of apoptosis- **J.Cell Sci.** **111:625-636 (1998)**.

Mookherjee P. and Johnson G.V.- Tau phosphorylation during apoptosis of human SH-SY5Y neuroblastoma cells-**Brain Res.** **921:31-43 (2001)**.

Mori H. et al. - Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease- **Science** **235:1641-1644 (1987)**.

Mori T. et al.-Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects-**J. Cereb. Blood Flow Metab.** **22:444-452 (2002)**.

Morishima K.M. et al. – Ubiquitin is conjugated with aminoterminally processed tau in paired helical filaments- **Neuron** **10: 1151-1160 (1993)**.

Morishima K.M. et al. –Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau- **J. Biol. Chem.** **270:823-829 (1995)**.

Morsch R. et al.- Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles- **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **58: 188-197 (1999)**.

Munoz-Montano J.R. et al.- Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons- **FEBS Lett:** **411:183-188 (1997)**.

Murphy D.B. et al.-Role of tubulin-associated proteins in microtubule nucleation and elongation- **J.Mol.Biol.****117:33-52 (1977)**.

Murray B. et al.-Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity-**Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **95:11975-11980 (1998)**.

Nacharaju P. et al.-Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations- **FEBS Lett.****447:195-199 (1999)**.

Nagy Z. et al.- Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease- **Acta Neuropathol. (Berlin)** **94:6-15 (1997)**.

Nakai Y. et al.- Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate- dependent manner- **J. Cell Biol.** **159:1097-1108 (2002)**.

Neve R.L. et al.- Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2- **Brain Res.****387:271-280 (1986).**

Nishimura I. et al.- PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*- **Cell** **116:671-682 (2004).**

Noble W. et al.- Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo- **Neuron** **38:555-563 (2003).**

Noble W. et al.-Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **102:6990-6995 (2005).**

Norlund M.A. et al.- Elevated transglutaminase-induced bonds in PHF tau in Alzheimer's disease- **Brain Res.** **851:154-163 (1999).**

Novak M. et al. – Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibody 423 and 7.51- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **88:5827-5841 (1991).**

Novak M. et al.- Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament- **EMBO J.** **12:365-370 (1993).**

Novak M. et al.-Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease- **Acta Virol.** **38:173-189 (1994).**

Nuydens R. et al.- Coexpression of GSK-3  $\beta$  corrects phenotypic aberrations of dorsal root ganglion cells, cultured from adult transgenic mice overexpressing human protein tau- **Neurobiol. Dis.** **9:38-48 (2002).**

Oddo S. et al.(a)-Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction- **Neuron** **39:409-421 (2003).**

Oddo S. et al.(b)- Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease- **Neurobiol. Aging** **24:1063-1070 (2003).**

Oddo S. et al.- A $\beta$  immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome- **Neuron** **43:321-332 (2004).**

Oddo S. et al.(a)- Temporal profile of A $\beta$  oligomerization in an in vivo model of Alzheimer's disease:a link between A $\beta$  and tau pathology- **J. Biol. Chem.** **281:1599-1604 (2006).**

Oddo S. et al.(b)-A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A $\beta$ - **Am. J. Pathol.** **168:184-194(2006).**

Oddo S. et al.(c)-Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles- **J. Biol. Chem.** **281:39413-39423 (2006).**

Oh-hashii K. et al.-Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells- **Biochem. Biophys. Res. Commun.****263:504-509 (1999).**

Oyama F. et al.- Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in CHO cells are antagonized by tau- **J. Biol. Chem.** **279:27272-27277 (2004).**

Panda D. et al. – Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four- repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease- **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.****100: 9548--9553 (2003).**

Panda D. et al.- Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau- **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.****96:12459-12464 (1999).**

Panda D. et al.-Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau-**Biochemistry** **34:11117-11127 (1995).**

Park S.Y. et al.-Caspase-3 and calpain-mediated tau cleavage are differentially prevented by estrogen and testosterone in  $\beta$ -amyloid-treated hippocampal neurons- **Neuroscience** **114:119-127 (2007).**

Park S.Y. and Ferreira A. –The generation of a 17kDa neurotoxic fragment:an alternative mechanism by which tau mediates  $\beta$ -amyloid-induced neurodegeneration-**J. Neurosci.** **25:5365-5375(2005).**

Pei J.J.et al.- Accumulation of of cyclin-dependent kinase 5(cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer’s disease neurofibrillary degeneration- **Brain Res.** **797:267-277 (1998).**

Pei J.J. et al.- Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer’s disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration- **J.Alzheimer’s Dis.** **3:41-48 (2001).**

Pei J.J.et al.- Up- regulation of mitogen- activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer’s disease- **Brain Res. Mol. Brain Res.****109:45-55 (2002).**

Pei J.J. et al.- Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinase ERK1/2, MEK1/2 and p70 S6, similar to that in Alzheimer’s disease- **Am. J. Pathol.** **163: 845-858 (2003).**

Perez M. et al.- Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation 4-hydroxy-2-nonenal- **FEBS Lett.** **486:270-274 (2000).**

Perez M. et al. – Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model- **J. Alzheimer’s Dis.** **5: 301-308 (2003).**

Perez M. et al.- Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin. The minimal sequence required for tau-tau interaction- **J. Neurochem.** **67:1183-1190 (1996).**

Perry G. et al.- Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaques neuritis of Alzheimer disease brain- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **84:3033-3036 (1987).**

Perry G. et al.- Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation-**Neuroreport** **10:2411-2415 (1999).**

Petrucelli L. et al. CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation-**Hum. Mol.Genet.** **13:703-714 (2004).**

Pillot T. et al.- The nonfibrillar amyloid  $\beta$ -peptide induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain-**J. of Neurochemistry** **73: 1626-1634 (1999).**

Pountney D.L.et al.- SUMO-1 marks the nuclear inclusions in familial neuronal intranuclear inclusion disease- **Exp. Neurol.** **184:436-446 (2003).**

Price D.L. et al.- Mutant genes in familial Alzheimer’s disease and transgenic models- **Annu. Rev. Neurosci.** **21:479-505 (1998).**

Probst A. et al.- Alzheimer’s disease. A description of the structural lesions- **Brain Pathol.** **1: 229-239 (1991).**

Probst A. et al.-Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein- **Acta Neuropathol. (Berl.)** **99:469-481 (2000).**

Rapoport M. et al.- Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **99:6364-6369 (2002).**

Rapoport M. and Ferreira A.- PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar  $\beta$ -amyloid in mature hippocampal neurons.-**J. Neurochem.** **74:125-133 (2000).**

Reed L.A. et al.- Phenotypic correlations in FTDP-17- **Neurobiol. Aging** **22:89-107 (2001).**

Reynolds H. et al.- Tau binds to phosphatidylinositol-3-kinase, GRB2, phospholipase C  $\gamma$ -1 and SRC-family kinases through SH3 domain-**Neurobiol. Aging (Abstract)** **23:S266 (2002).**

Reynolds M.R. et al.- Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer’s disease- **Biochemistry** **44:1690-1700 (2005).**

Reynolds M.R. et al.- Site-specific nitration differentially influences tau assembly in vitro- **Biochemistry** **44:13997-14009 (2005).**

ReynoldsM.R. et al.-Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer’s disease and other tauopathies- **J. Neurosci.** **26:10636-10645 (2006).**

Reynolds M.R. et al.- Peroxynitrite-mediated tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms-**Biochemistry** **45:4314-4326 (2006).**

Riccio A. and Ginty D.D. –What a privilege to reside at the synapse: NMDA receptor signalling to CREB- **Nat. Neurosci.** **5: 389-390 (2002).**

Rissman R.A. et al.- Caspase- cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology- **J. Clin. Invest.** **114:121-130 (2004).**

Rohn T.T. et al.-Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain- **Neurobiol.Dis.** **11:341-354 (2002).**

Rosenfeld M.A. et al. – In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium – **Cell** **68:143-155 (1992).**

Roth M.B. et al. -A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription.- **J. Cell Biol.** **115:587-596 (1991).**

Rovelet-Lecrux A. et al.-APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy- **Nat. Genetics** **38:24-26 (2006).**

Runden E. et al.- Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAP kinase-dependent mechanism- **J. Neurosci.** **18:7296-7305 (1998).**

Sahara N. et al.-Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility- **J. Neurochem.** **83:1498-14508 (2002).**

Saito K. et al.- Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **90:26-28 (1993).**

Santa- Cruz K. et al.- Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function-**Science** **309:476-481 (2005).**

Santa-Maria I. et al.- Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers- **Biochemistry** **43:2888-2897 (2004).**

Satoh T. et al.- Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with UO126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons- **Neurosci. Lett.** **288:163-166 (2000).**

Sattler R. and Tymianski M. –Molecular mechanism of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death- **Mol. Neurobiol.** **24:107-129 (2001).**

Schneider A. et al.- Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments- **Biochemistry** **38:3549-3558 (1999).**

Schumacher A. et al.- The murine polycomb-group gene *eed* and its human orthologue: functional implications of evolutionary conservation- **Genomics** **54:79-88 (1998).**

Scott M.J. et al. –Tau complexes with phospholipase C- $\gamma$  in situ- **Neuroreport** **9:67-71 (1998).**

Seitz A. et al.- Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c- **EMBO J.** **21:4896-4905 (2002).**

Seo I.H. et al.-  $\alpha$ -synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3K/Akt kinase pathway- **FASEB J.****16:1826-1828 (2002).**

Serrano L. et al., - Localization of the tubulin binding site for tau protein- **Eur. J. Biochem.** **153:595-600 (1985).**

Shahani N. et al. -Tau aggregation and progressive neuronal degeneration in the absence of changes in spine density and morphology after targeted expression of Alzheimer's disease-relevant tau constructs in organotypic hippocampal slices- **J. Neurosci.** **26:6103-6114 (2006).**

Shahani N. and Brandt R. – Function and malfunction of the tau proteins- **Cell Mol. Life Sci.** **59:1668-1680 (2002).**

Sharp A.J. et al.-Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome-**Nature Genetics** **38:1038-1042 (2006).**

Shaw-Smith C. et al.- Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability-**Nature Genetics** **38:1038-1042 (2006).**

Sheng J.G. et al.- The beta-amyloid proteins presenilin 1 and BACE 1 are axonally transported to nerve terminals in the brain- **Exp. Neurol.** **184:1053-1057 (2003).**

Shimura H. et al. – HSP27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival- **J. Biol. Chem.** **279:17957-17962 (2004).**

Shimura H. et al.- CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival- **J.Biol. Chem.** **279:4869-4876 (2004).**

Sidhu A. et al.- Does  $\alpha$ -synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse?- **FASEB J.** **18:637-647 (2004).**

Simon J. et al.-The extra sex combs product contains WD40 repeats and its of action implies a role distinct from other Polycomb group products- **Mech. Dev.** **53:197-208 (1995).**

Singh S.S. et al.- Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity- **Biochemistry** **35:16544-16549 (1996).**

Singleton A.B. et al.-  $\alpha$ -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease- **Science** **302:841-846 (2003).**

Slevin M. et al.- Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinases and VEGF in the human brain following acute ischaemic stroke- **Neuroreport** **11:2759-2764 (2000).**

Slow E. et al. – To be or not to be toxic: aggregations in Huntington and Alzheimer disease- **Trends in Genetics** **22:408-411 (2006).**

Snyder E.M. et al. –Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ - **Nature Neuroscience** (2005).

Sobue K. et al.- Interaction of neuronal cdc2-like protein kinase with microtubule-associated protein tau- **J. Biol.Chem.** **275:16673-16680 (2000).**

Sontag E. et al.- Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of tau by protein phosphatase 2A-**Neuron** **17:1201-1207 (1996).**

Sontag E. et al.- Molecular interaction among protein phosphatase 2A, tau, and microtubule: implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies- **J. Biol.Chem.** **274:25490-25498 (1999).**

Soto A.M. and Sonnenschein C. – The role of estrogen on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7) – **J. Steroid Biochem.** **23: 87-94 (1985).**

Spillantini M.G. and Goedert M.- Tau protein pathology in neurodegenerative disease- **Trends Neurosci.** **21:428-433 (1998).**

Spillantini M.G.- Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies- **Brain Pathol.** **8:387-402 (1998).**

Spittaels K. et al.- Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein –**Am. J. Pathol.** **155:2153-2165 (1999).**

Spittaels K. et al.- Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice- **J. Biol. Chem.** **275:41340-41349 (2000).**

Stamer K. et al.- Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhance oxidative stress- **J. Cell Biol.** **156:1051-1063 (2002).**

Stanciu M. et al.- Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures- **J. Biol. Chem.** **275:12200-12206 (2000).**

Stanciu M. et al.-Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated protein kinase promotes cell death generated by oxidative toxicity or proteasome inhibition in a neuronal cell line- **J. Biol. Chem.** **277:4010-4017 (2002).**

Steller H. –Mechanism and genes of cellular suicide- **Science** **267:1445-1449 (1995).**

Stokin G.B. et al.- Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease- **Science** **307 :1282-1288 (2005).**

Stoothoff W.H. and Johnson G.V. –Hyperosmotic stress-induced apoptosis and tau phosphorylation in human neuroblastoma cells-**J. Neurosci. Res.** **65:573-582 (2001).**

Stoothoff W.H. and Johnson G.V.-Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences- **Biochimica and Biophysica Acta** **1739:280-297 (2005)**.

Sun L. et al. – Inhibition of protein phosphatase 2A-and protein phosphatase 1- induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats- **Neuroscience** **118:1175-1182 (2003)**.

Takahashi R.et al.- Intraneuronal Alzheimer Ab42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology- **Am. J. Pathol.** **161:1869-1879 (2002)**.

Takashima A. et al.- Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3  $\beta$  and its substrate tau- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **95:9367-9341(1998)**.

Takei J. et al. – Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and MAP1B gene- **J.Cell Biol.** **150:989-1000 (2000)**.

Takemura R. et al. – Increased microtubule stability and  $\alpha$ -tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau- **J. Cell Sci.**- **103:953-964 (1992)**.

Tanaka T. et al.-Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells- **FEBS Lett.****360:5-9 (1995)**.

Tanemura K. et al.- Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau- **Neurobiol. Dis.** **8: 1036-1045 (2001)**.

Tanemura K. et al.- Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau- **J. Neurosci.** **22:133-141 (2002)**.

Tatebayashi Y. et al. - Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **99:13896-13901 (2002)**.

Tatebayashi Y. et al.- Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the regulation of organelle transport- **J. Cell Sci.** **117:1653-1663 (2004)**.

Teng J. et al.-Synergistic effects of MAP2 and MAP1a knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization- **J.Cell Biol.** **155:65-76 (2001)**.

Thurston V.C. et al.- Tau as a nucleolar protein in human nonneuronal cells in vitro and in vivo- **Chromosoma** **105:20-30 (1996)**.

Tint I. et al.- Acute inactivation of tau has no effect on dynamics of microtubules in growing axons of cultured sympathetic neurons- **J. Neurosci.** **18: 8660-8672 (1998)**.

Trinczek B.et al.- Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules- **Mol. Cell Biol.** **6:1887-1902 (1995)**.

Trinczek B. et al. –Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule- dependent transport of single vesicles and organelles- **J. Cell Sci.****112 (Pt 14):2355-2367 (1999)**.

Trojanowski J.Q. et al.- Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex: transgenic mice provide insights into mechanisms underlying a common tauopathy in an ethnic minority on Guam-**Exp. Neurol.****176:1-11 (2002)**.

Tsai L.H. et al.- Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system- **Development** **119: 1029-1040 (1993)**.

Ugolini G. et al.- Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's diseases neurons- **Neuroreport** **8:3709-3712 (1997)**.

Vaillant A.R. et al –Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergically regulate neuronal survival- **Cell Biol.** **146:955-966 (1999)**.

Van den Haute et al.- Coexpression of human cdk5 and its activator p35 with human protein tau in neurons in brain of triple transgenic mice-**Neurobiol. Dis.** **8:32-44 (2001)**.

Vanhoutte P. and Bading H.- Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation- **Curr. Opin.Neurobiol.****13:366-371 (2003)**.

Vanier M.T. et al.- Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells- **J. Cell Sci.** **54:920-924 (1998)**.

Veeranna et al.-Calpain mediates calcium-induced activation of the ERK1/2, MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease- **Am. J. Pathol.** **165:795-805 (2004).**

Vincent I. et al. -Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease- **Neurobiol. Aging** **19:715-723 (1994).**

Vincent I. et al. -Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain- **J. Neurosci.** **17:3588-3598 (1997).**

Vitolo O. et al. -Adenosine and ADP prevent apoptosis in cultured rat cerebellar granule cells- **Brain Res.** **809:297-301 (1998).**

Vogelsberg V. et al. - Distinct FTDP-17 missense mutations in tau produce tau aggregates or other pathological phenotypes in transfected CHO cells- **Mol. Biol. Cell** **11:4093-4104 (2000).**

Volontè C. et al. -Development of a method for measuring cell number: application to CNS primary neuronal culture - **Cytometry** **17:274-276 (1994).**

Von Bergen M. et al.-Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure- **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** **97:5129-5134 (2000).**

Wagner U. et al. - Cellular phosphorylation of tau by GSK-3  $\beta$  influences tau binding to microtubules and microtubule organization- **J. Cell. Sci.** **109:1537-1543 (1996).**

Wahlestedt C. et al.- Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions- **Nature****363:260-263 (1993).**

Walsh D.M. and Selkoe D.J.- Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease- **Neuron** **44:181-193 (2004).**

Wang G.P. et al.-Brain ubiquitin is markedly elevated in Alzheimer disease- **Brain Res.** **556:146-151 (1991).**

Wang J.Z. et al.- Dephosphorylation of Alzheimer paired helical by protein phosphatase- 2A-2B - **J. Biol. Chem.****270:4854-4860 (1995).**

Wang J.Z. et al.- Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase- 2A-2B and 1- **Mol. Brain Res.** **38:200-208 (1996).**

Wang X. et al.- Specific processing of native and phosphorylated tau protein by proteases- **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **219:591-597 (1996).**

Wang X. et al.- Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia- **J. Neurochem-** **86:351-362 (2003).**

Wenk G.L. et al.-Investigations of neurotoxicity and neuroprotection within the nucleus basalis of the rat- **Brain Res.** **655:7-11 (1994).**

Wille H. et al. - Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro- **J. Cell Biol.** **118:573-584 (1992).**

Williams D.W. et al.- Tau and tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in *Drosophila*- **J. Comp. Neurol.** **428:630-640 (2000).**

Williams K. - Ifenprodil discriminates subtypes of N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanism at recombinant heteromeric receptors- **Mol. Pharmacol.** **44:851-859 (1993).**

Williamson R. et al.- Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid- $\beta$  peptide exposure: involvement of src family protein kinases- **J. Neurosci.** **22:10-20 (2002).**

Wilquet V. and De Strooper B. - Amyloid- $\beta$  precursor protein processing in neurodegeneration- **Curr. Opin. Neurobiol.** **14:582-588 (2004).**

Wilson D.M. et al. - Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid  $\beta$  peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease- **Am. J. Pathol.** **150:2181-2195 (1997).**

Wittmann C.W. et al.- Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles- **Science** **293:711-714 (2001)**.

Woodgett J.R. et al. – Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3 factor A- **EMBO J.** **9:2431-2438 (1990)**.

Wszolek Z. et al.- Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17- **Folia Neuropathologica** **43:258-270 (2005)**.

Xhu X. et al.- Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **96:7547-7552 (1999)**.

Yamamoto-Sasaki M. et al.- Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type-**Brain Res.** **824:300-303 (1999)**.

Yang Y. et al.-Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments- **Eur. J. Biochem.** **233:9-17 (1995)**.

Yang Y. et al.-DNA replication precedes neuronal death in Alzheimer's disease- **J. Neurosci.** **21:2661-2668 (2001)**.

Yasojima K. et al.- Tangles areas of Alzheimer's brain have upregulated levels of exons 10 containing tau mRNA- **Brain Res.** **831:301-305 (1999)**.

Yokota M. et al. –Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain- **Brain Res.** **984:122-132 (2003)**.

Yoshida H. et al.- Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau- **J.Neurochem.** **61:1183-1186 (1993)**.

Yoshiyama Y. et al. –Reduction of deetyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes-**J. Neurosci.****22:10662-10671 (2003)**.

Zamora-Leon S.P. et al.- Binding of fyn to MAP-2c through an SH3 binding domain: regulation of interaction by ERK2- **J. Biol. Chem.** **276:39950-39958 (2001)**.

Zhang B. et al.-Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model- **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **102:227-231 (2005)**.

Zheng- Fischhofer Q. et al.- Sequential phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation-**Eur. J. Biochem.** **252:542-552 (1998)**.

Zhou X.Z. et al.-Pin-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins- **Mol. Cell** **6:873-883 (2000)**.

Zhu X. et al.-Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease- **J. Neuropathol. Exp. Neurol.****59:880-888 (2000)**.

Zhu X. et al.-Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease-**J. Neurochem.****76:435-441 (2001)**.

Zhu X. et al.- The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease-**Neurosignals** **11:270-281 (2002)**.

Zilka N. et al.- Truncated tau form sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo- **FEBS Lett.** **580:3582-3588 (2006)**.

Zimmerman U.P. et al. -Multiple forms of Ca<sup>++</sup>-activated protease from rat brain and muscle. **J. Biol.Chem.** **259:3210-3218 (1984)**.

Fig. 1

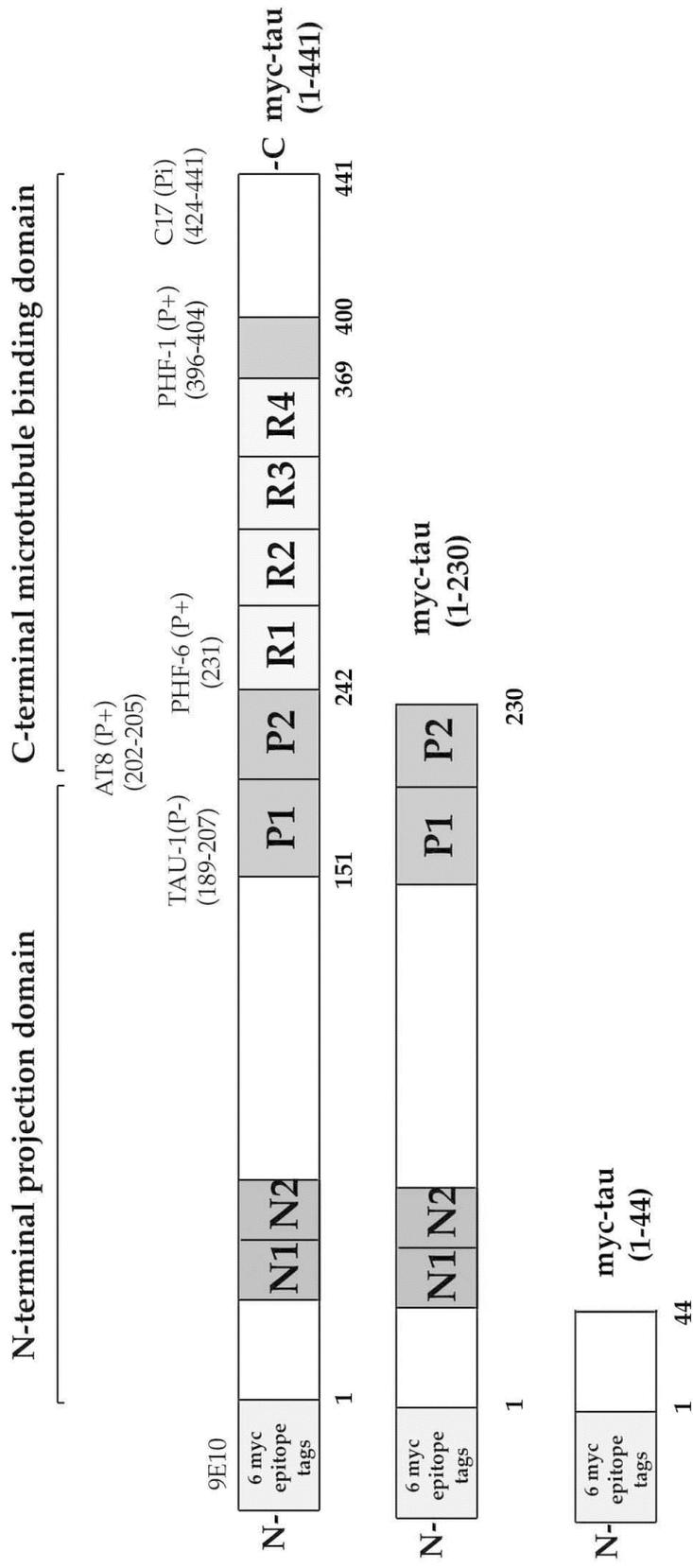


Fig. 2

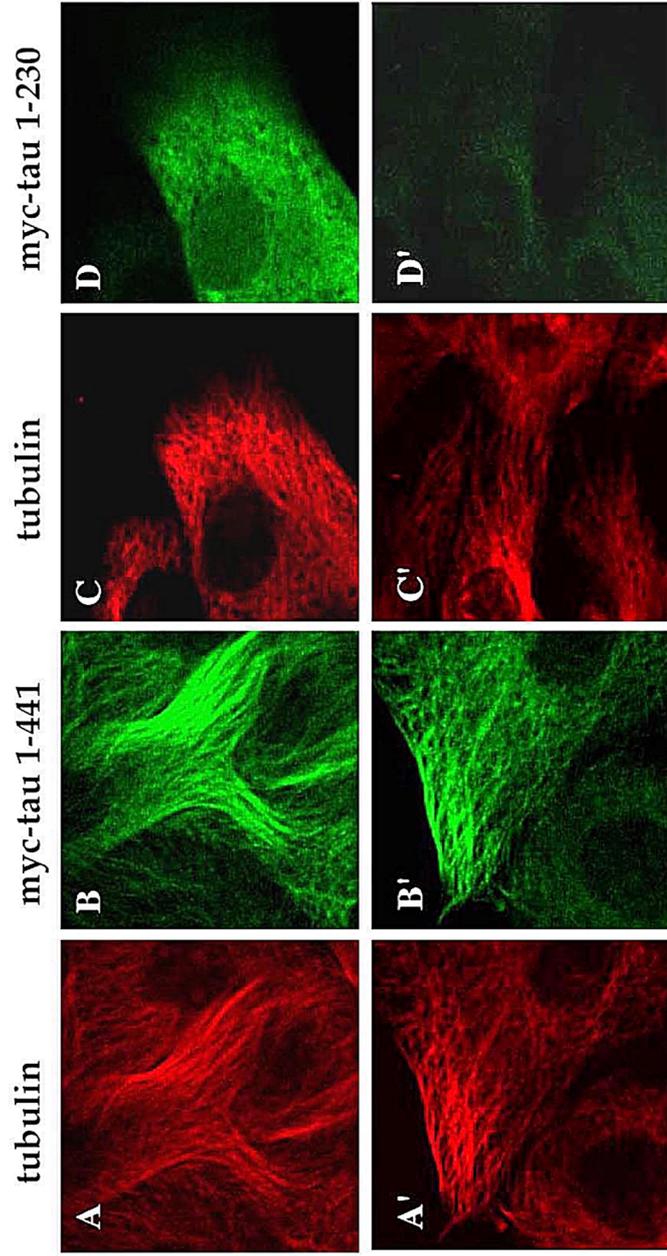
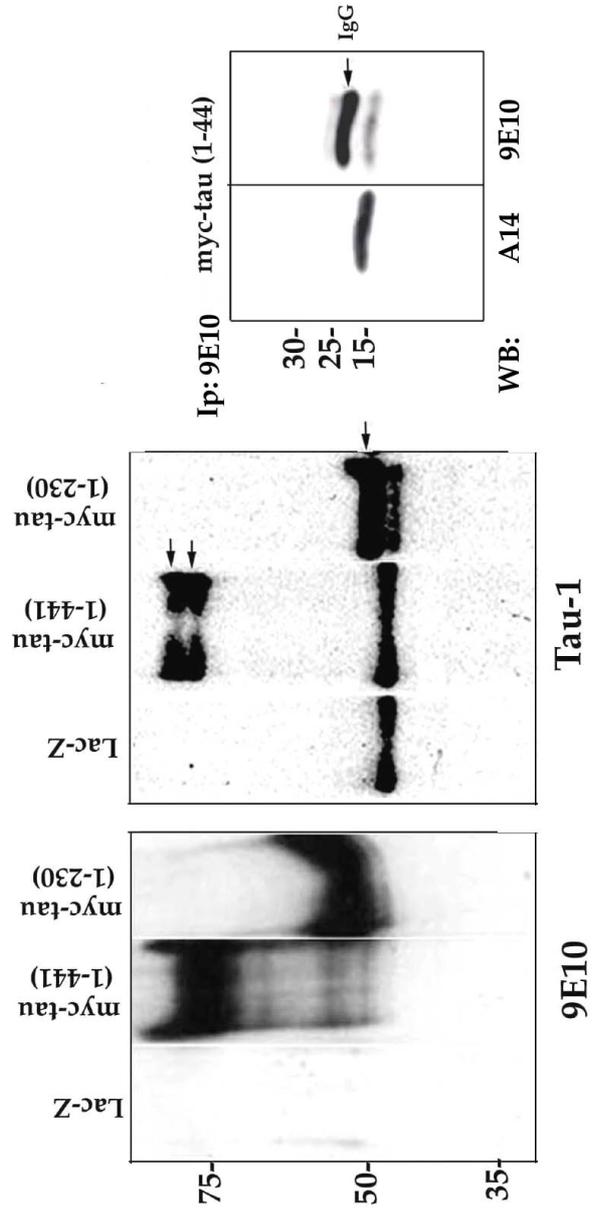


Fig. 3 A



B

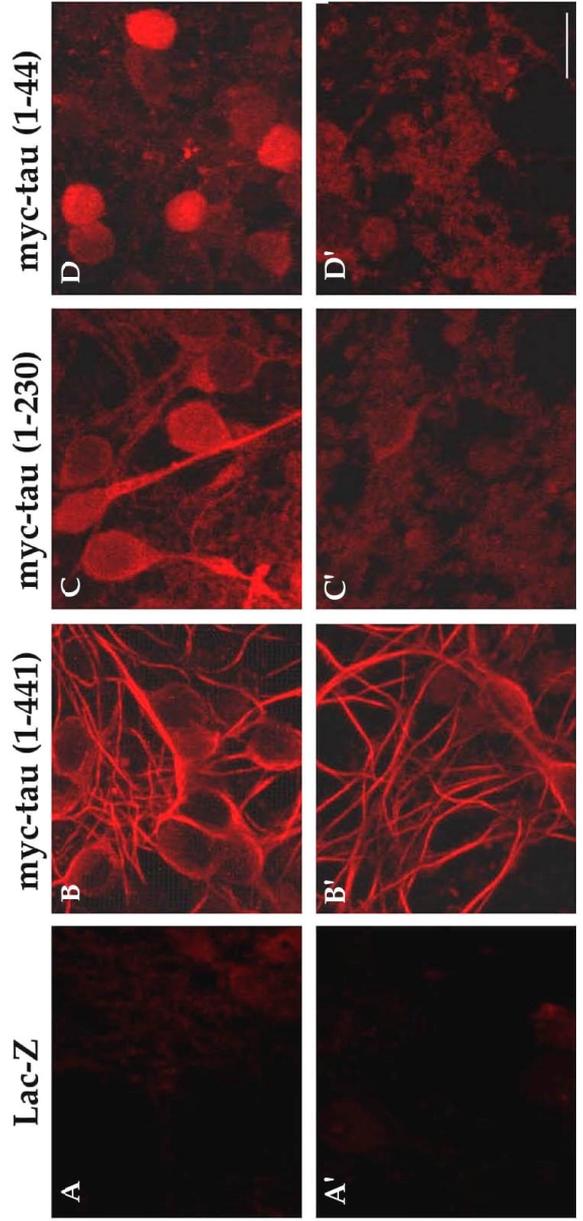
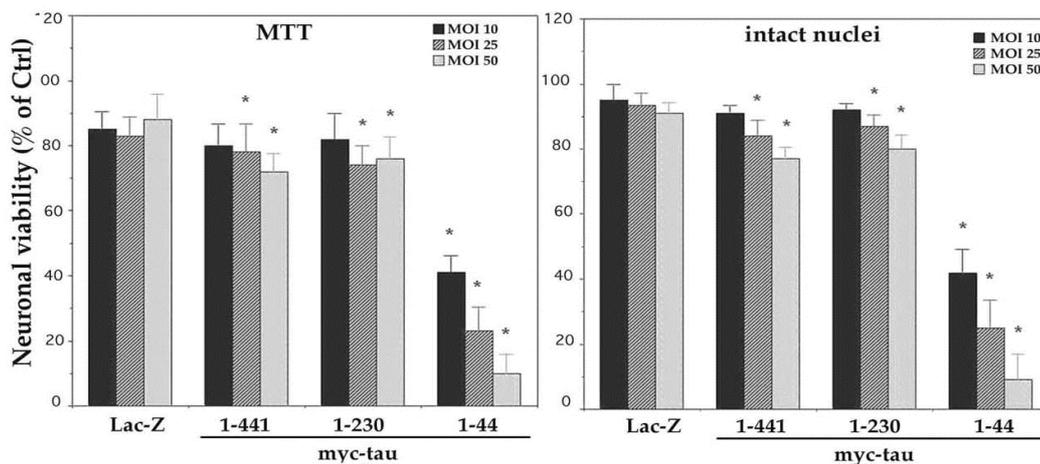
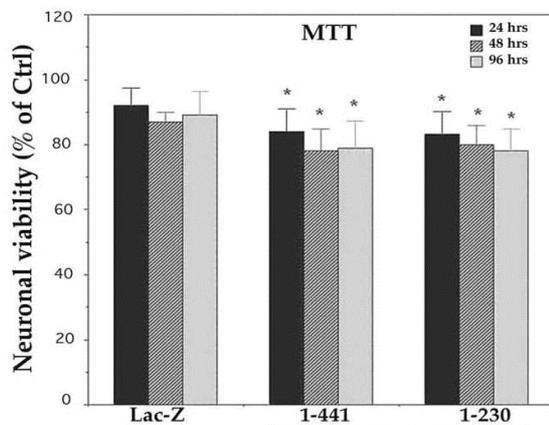


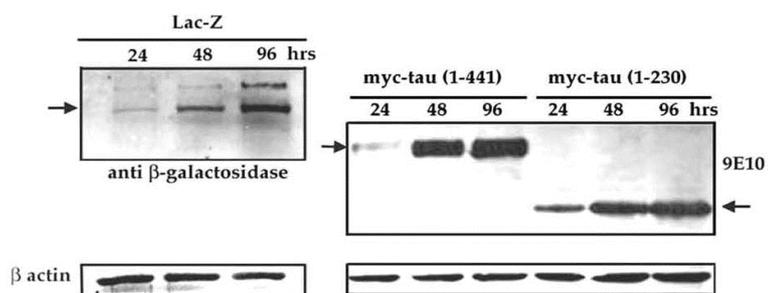
Fig. 4 A



**B**



**C**



**D**

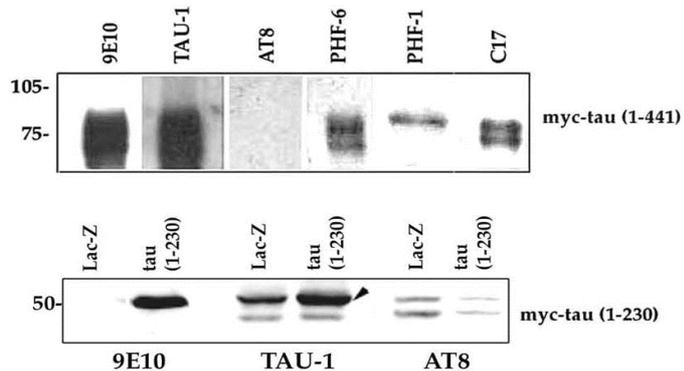


Fig. 5

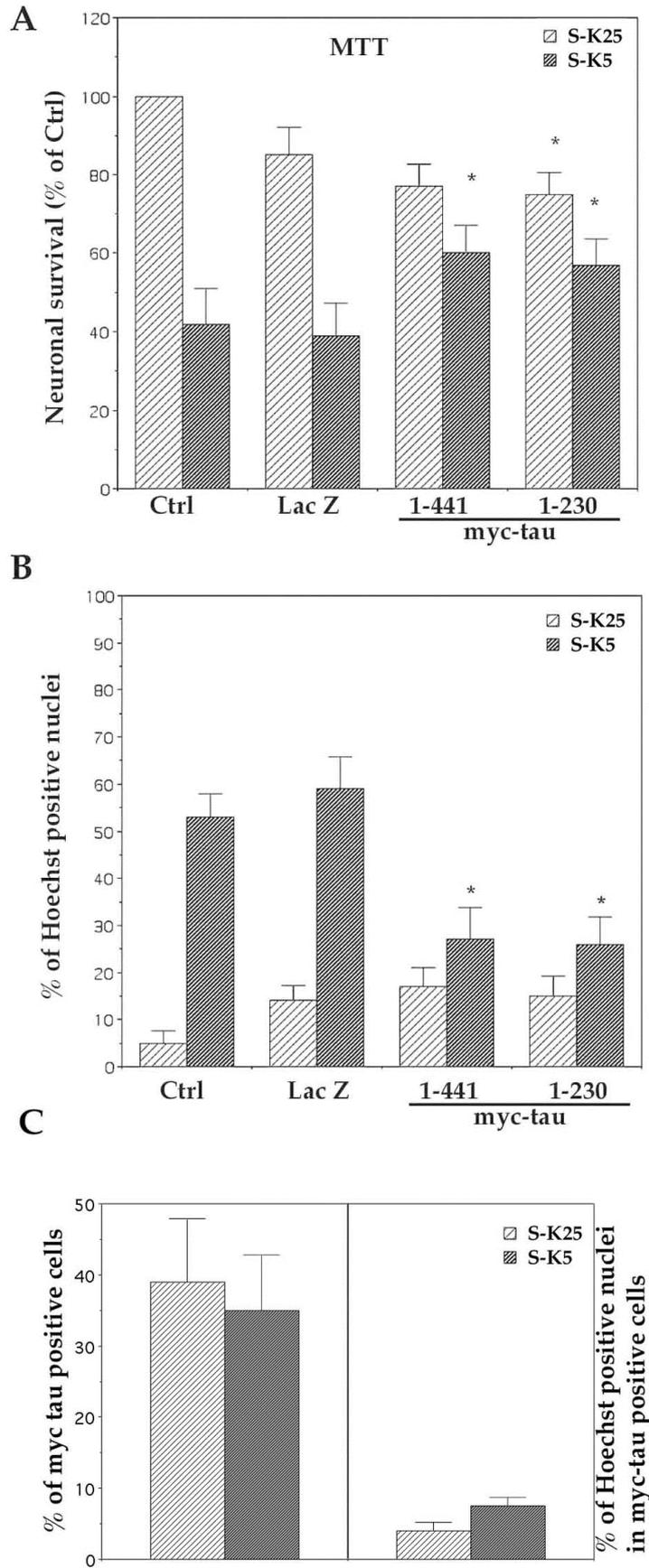


Fig. 6

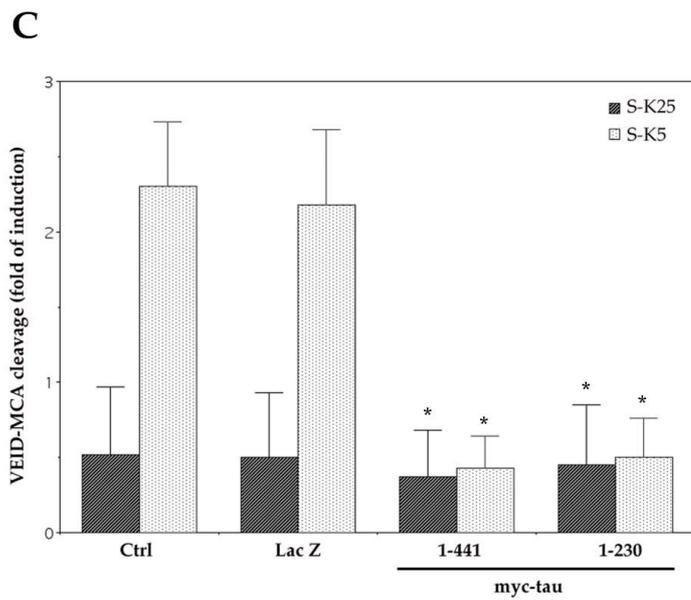
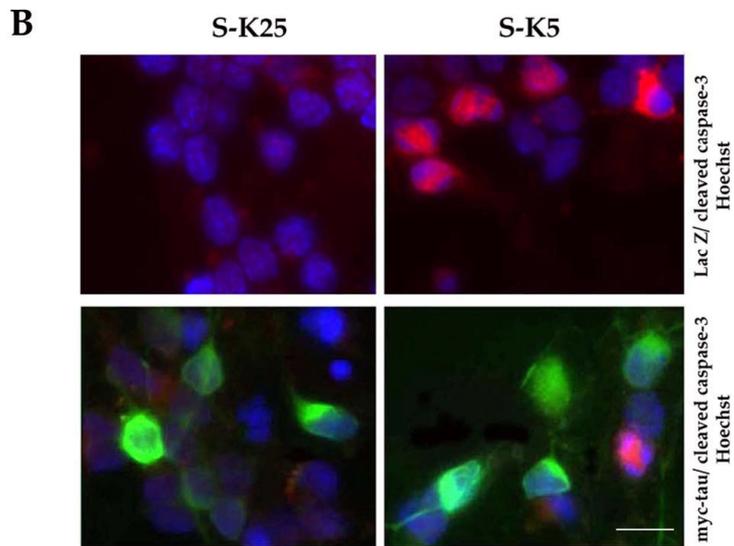
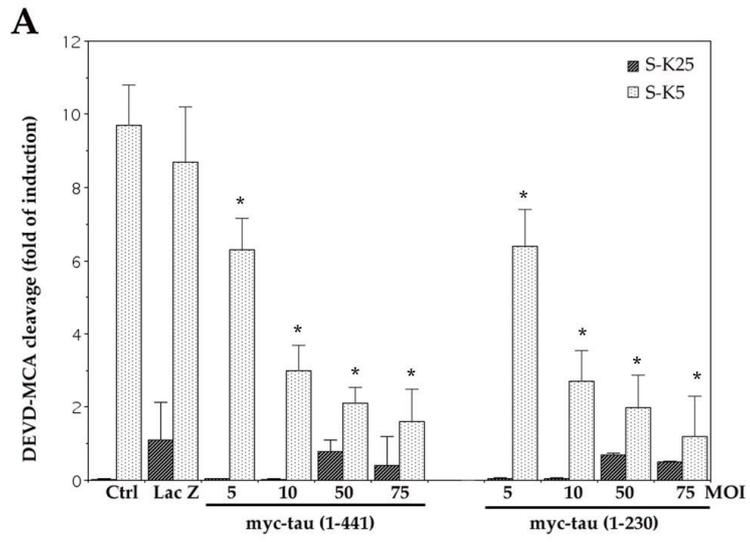
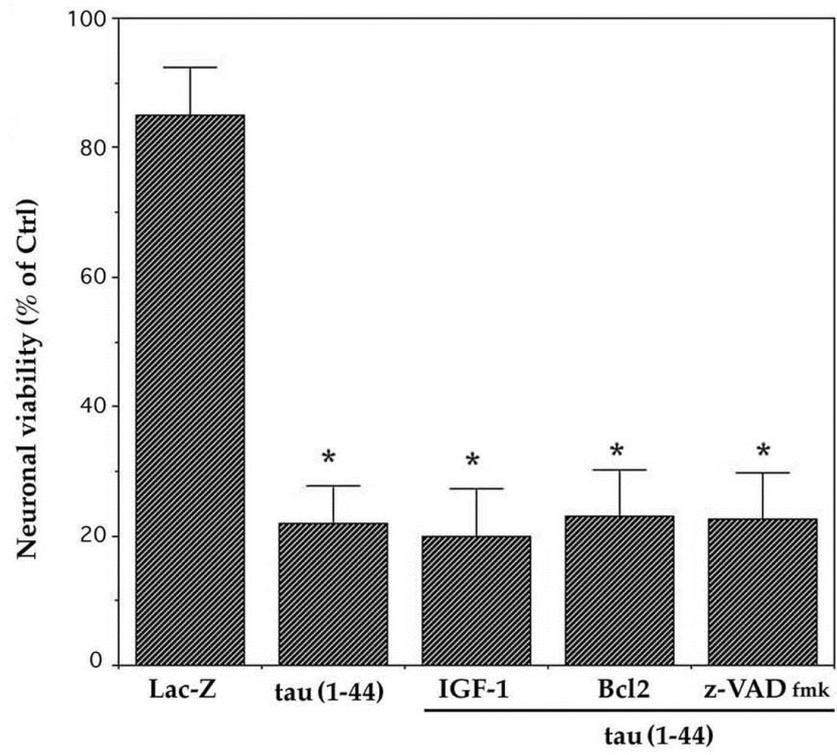




Fig. 8

**A**



**B**

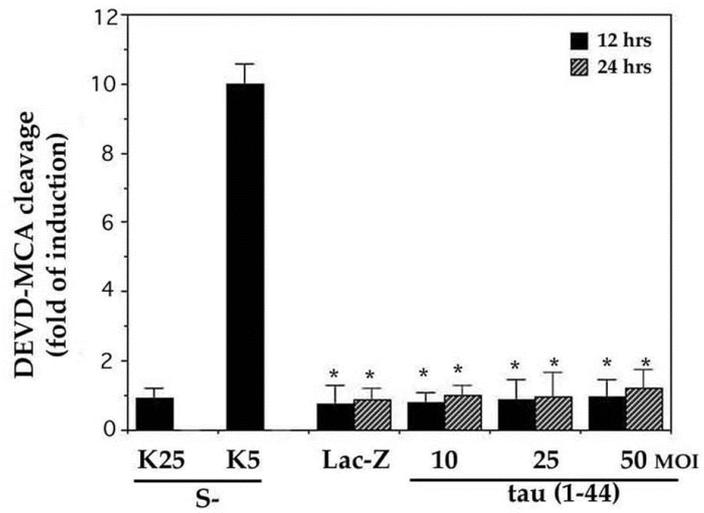
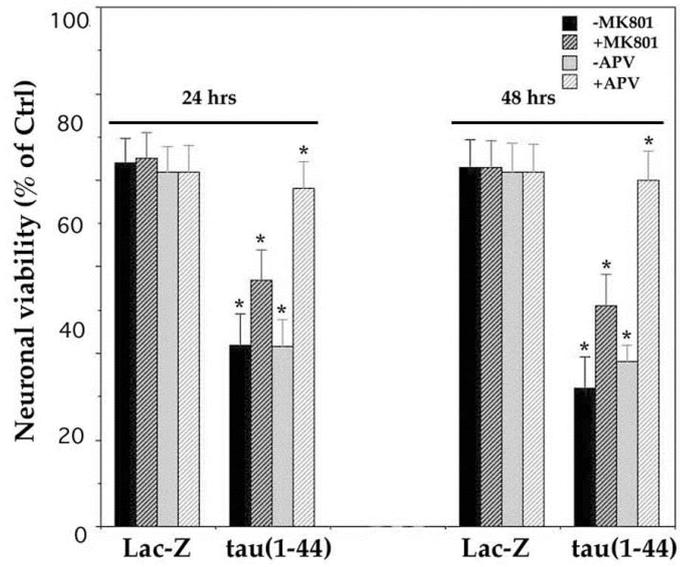
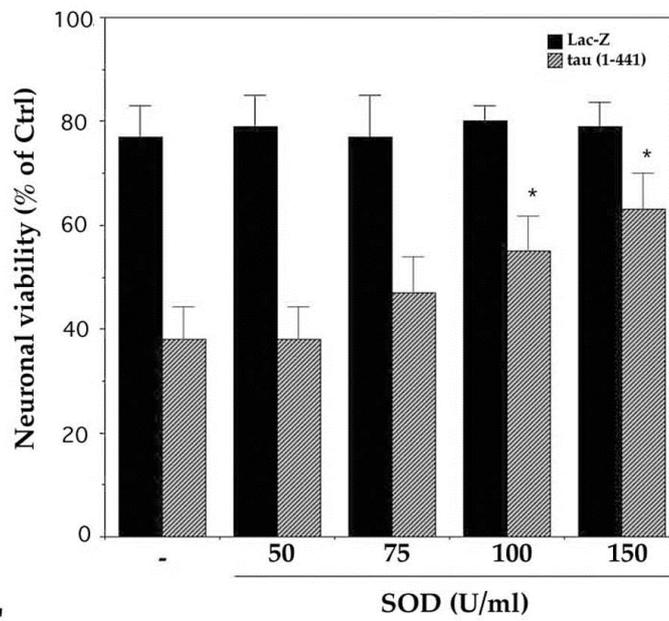


Fig. 9 **A**



**B**



**C**

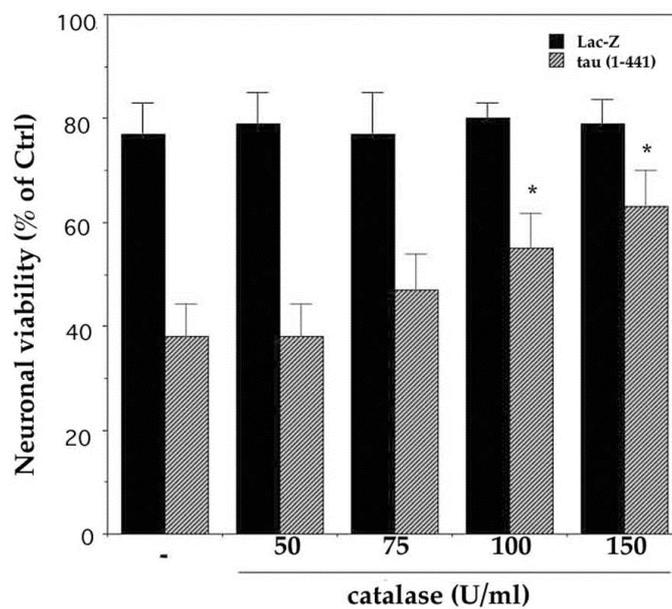


Fig. 10

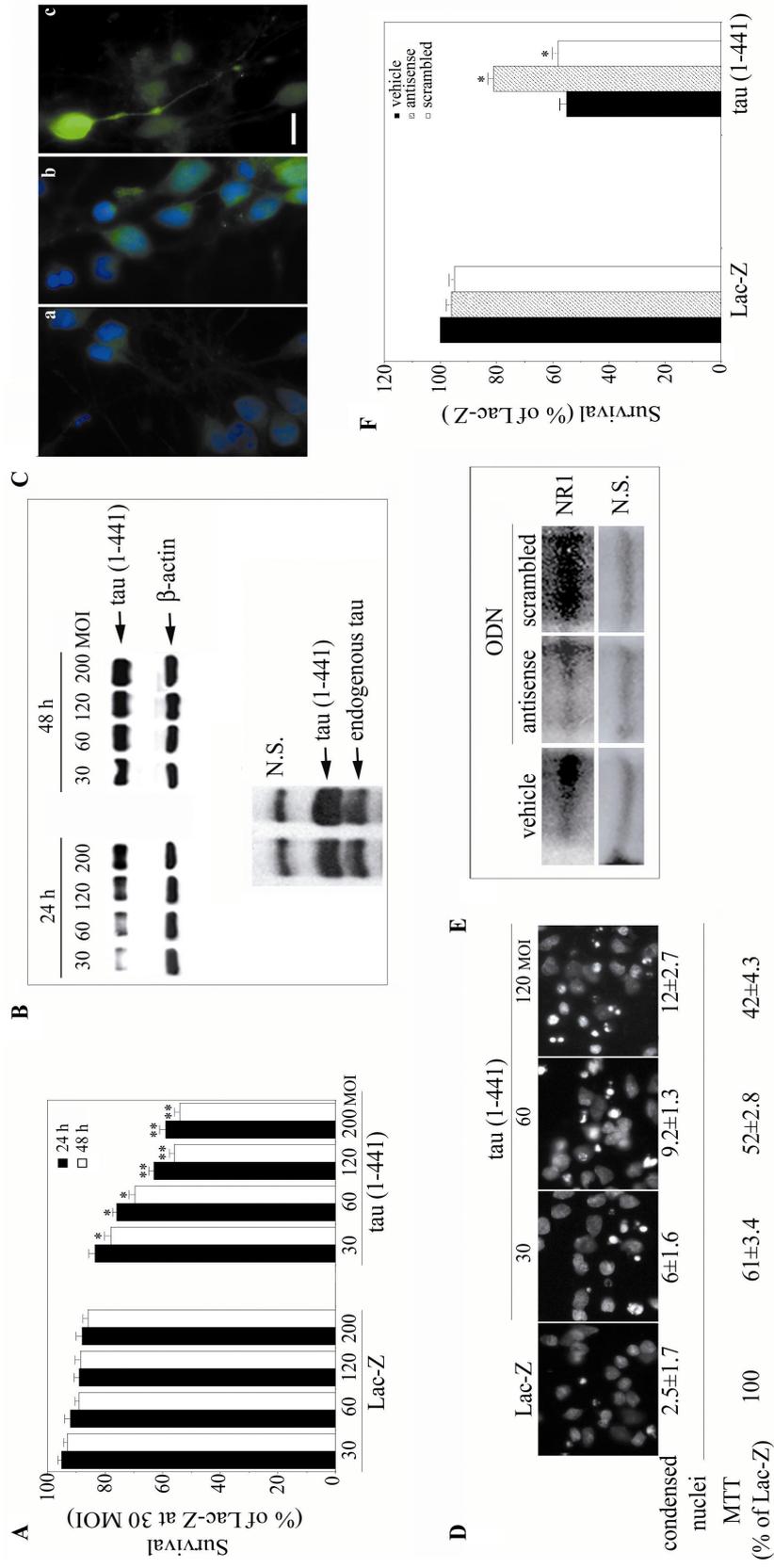


Fig. 11

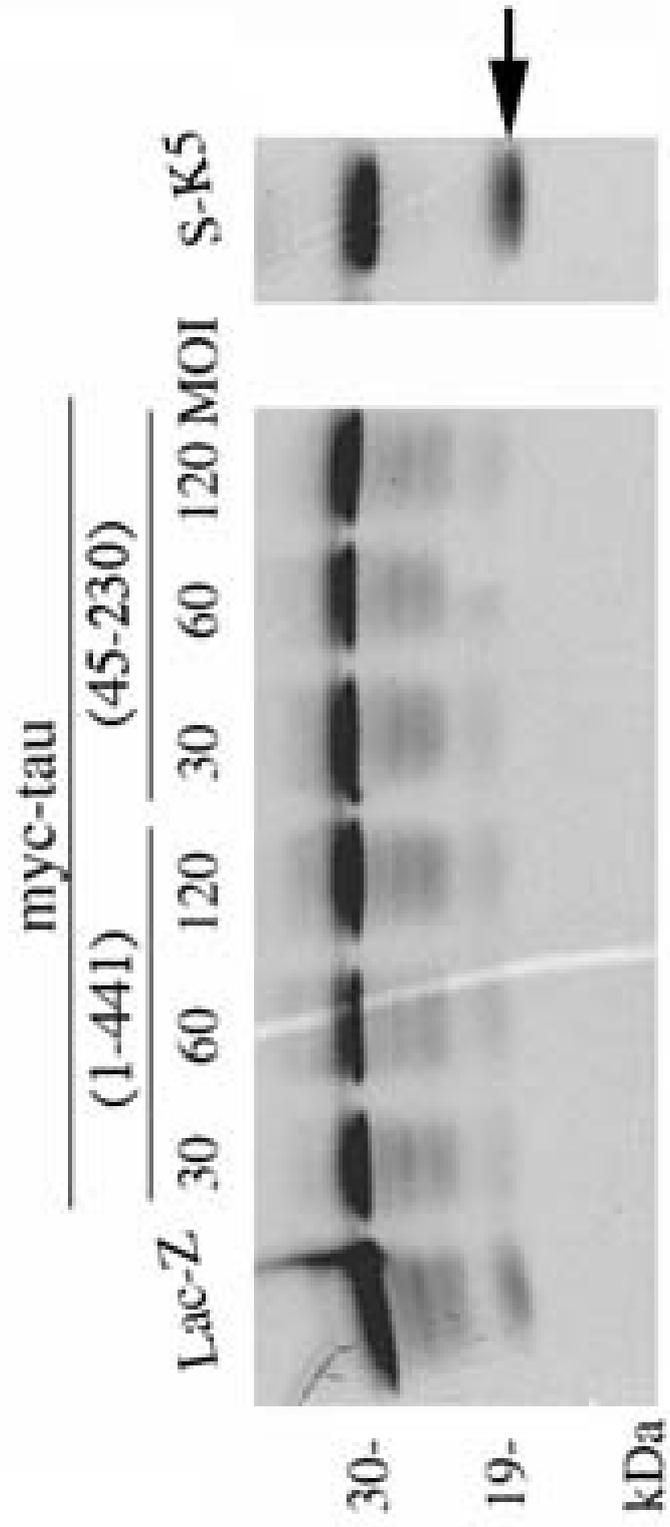


Fig. 12

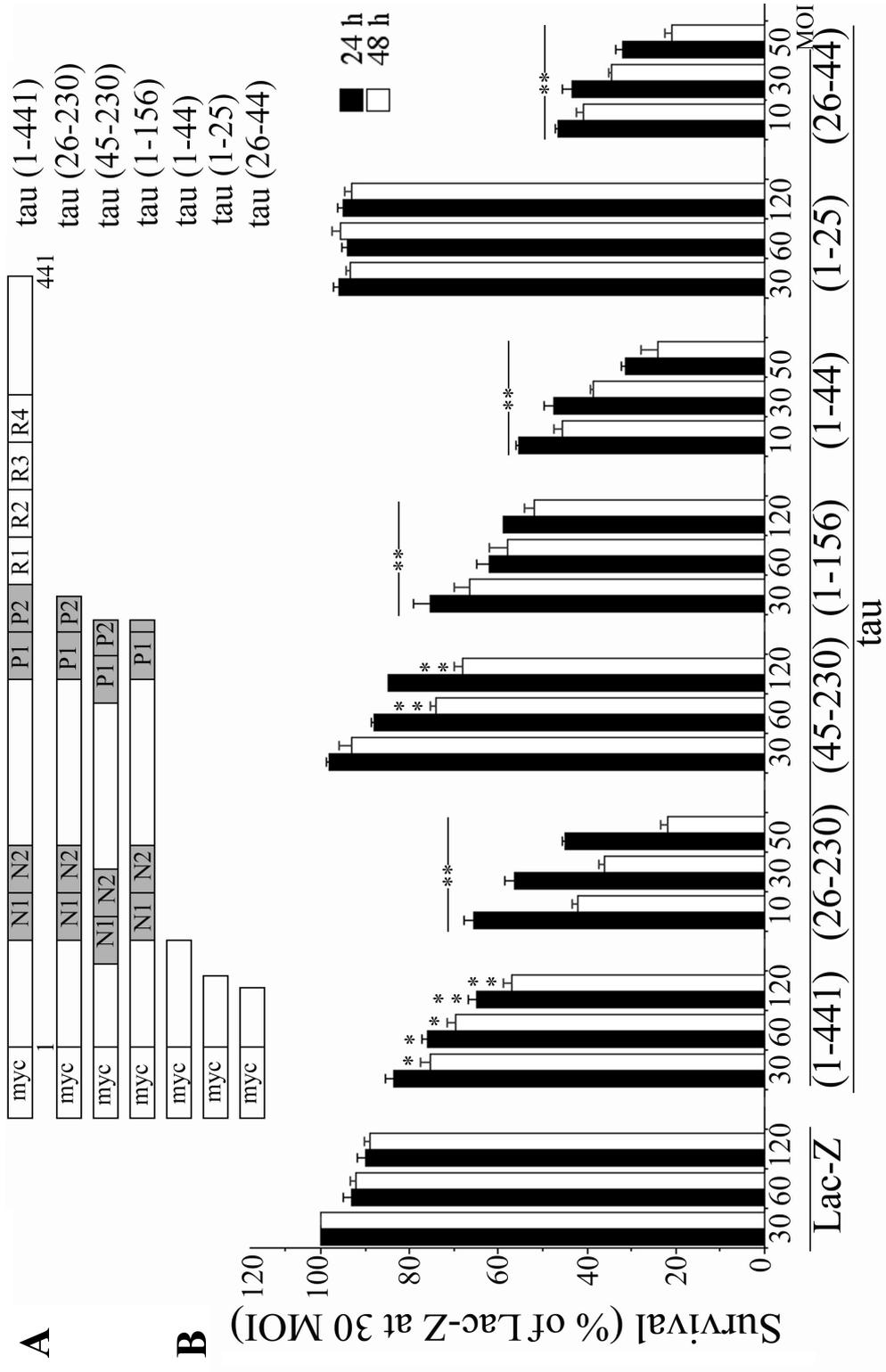


Fig. 13

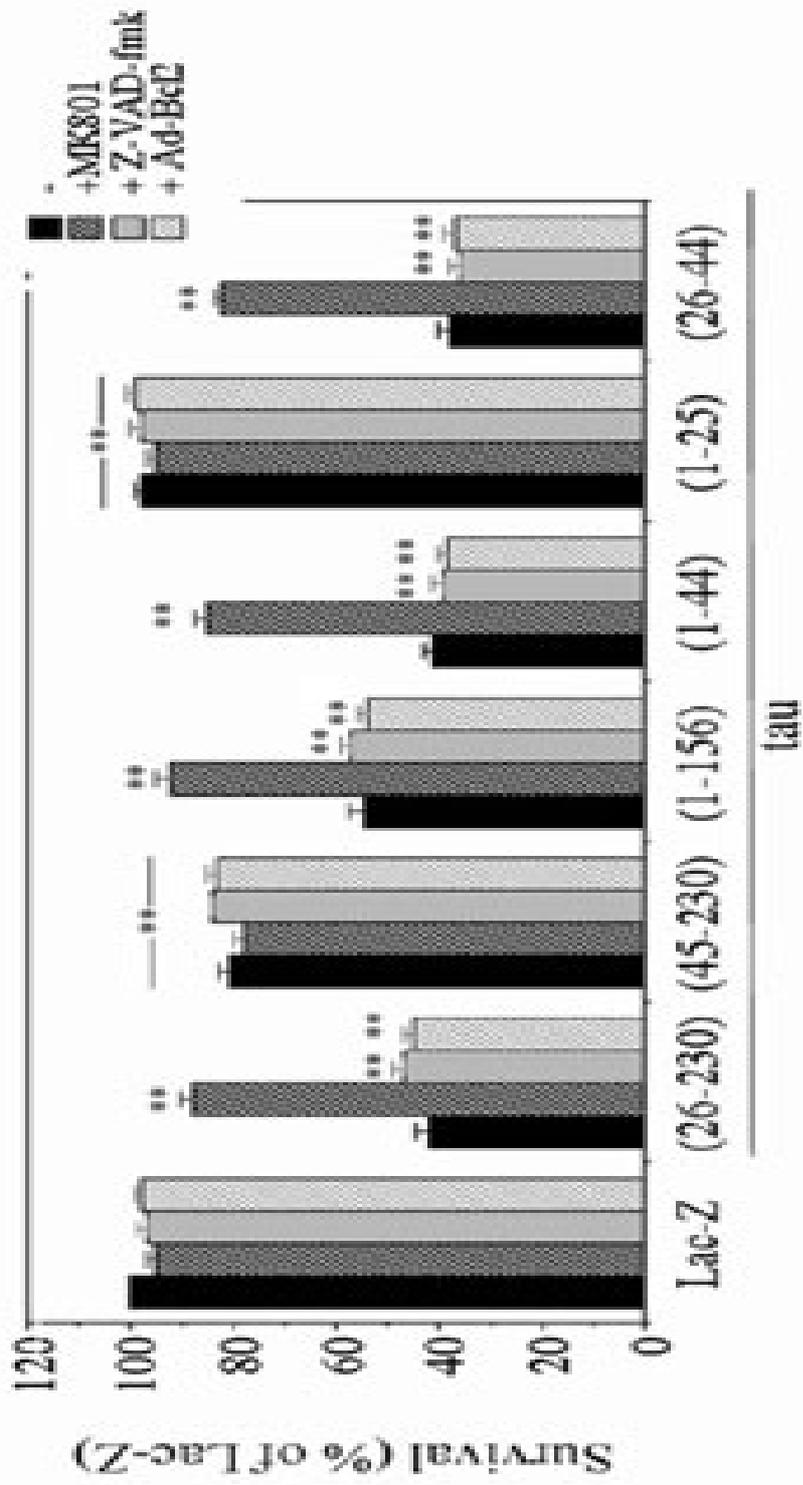


Fig. 14

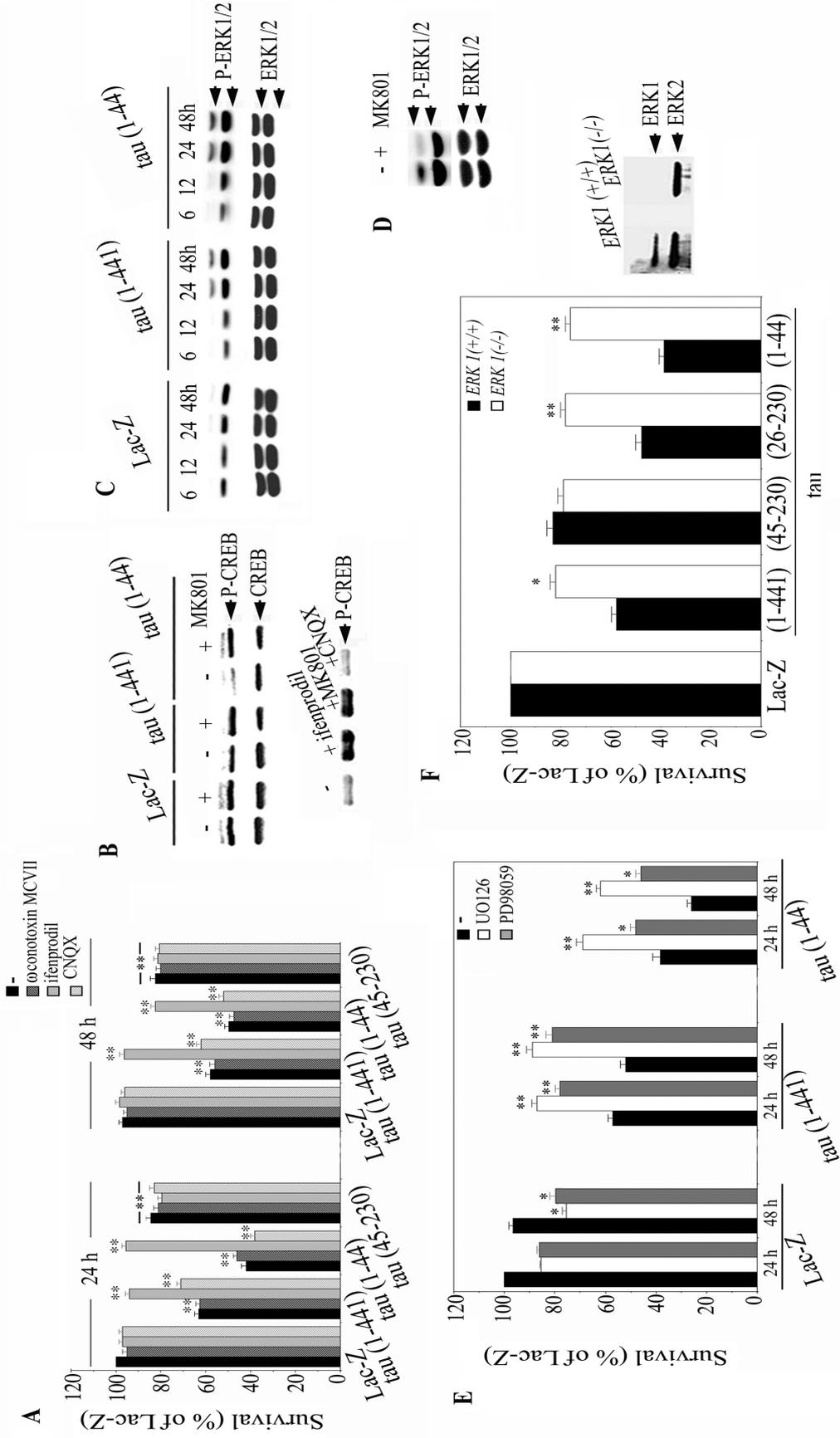


Fig. 15

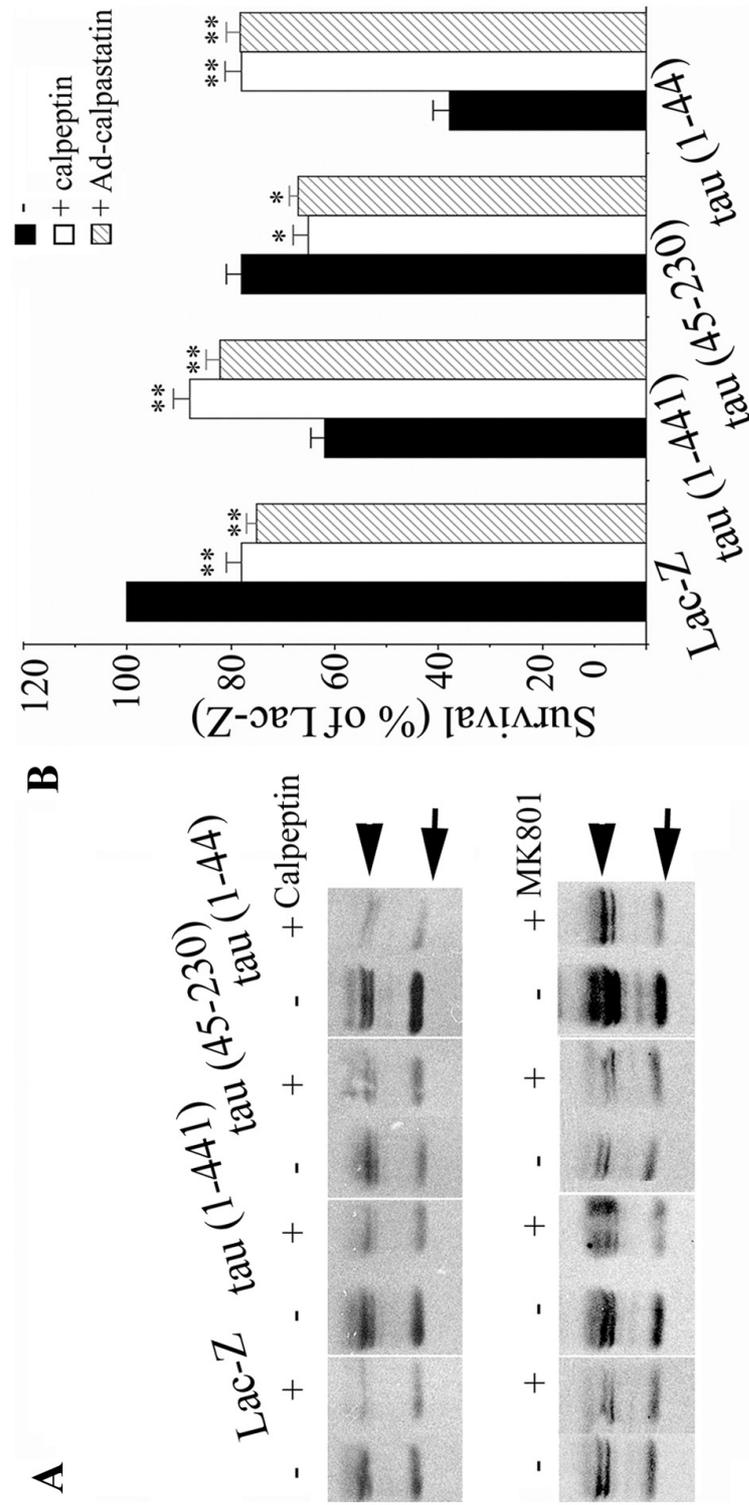


Fig. 16

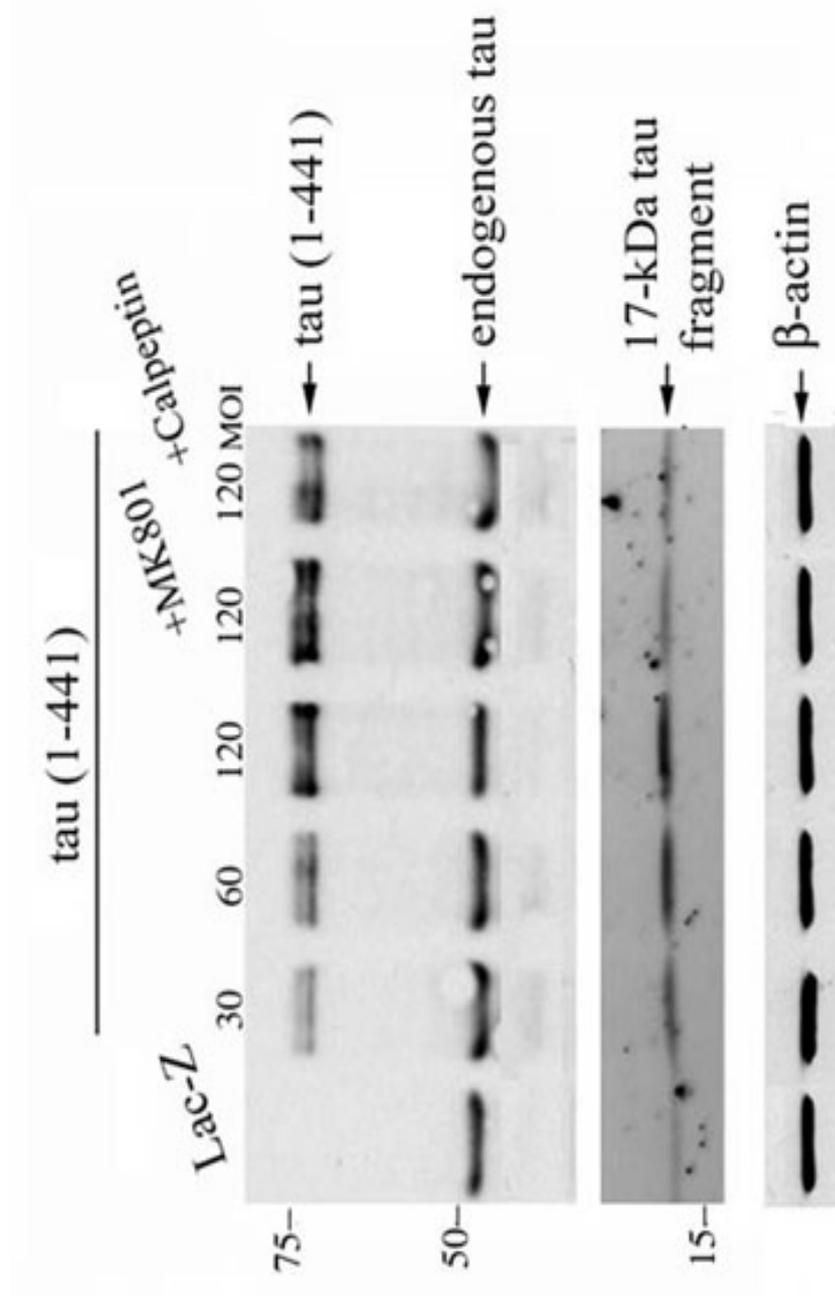


Fig. 17

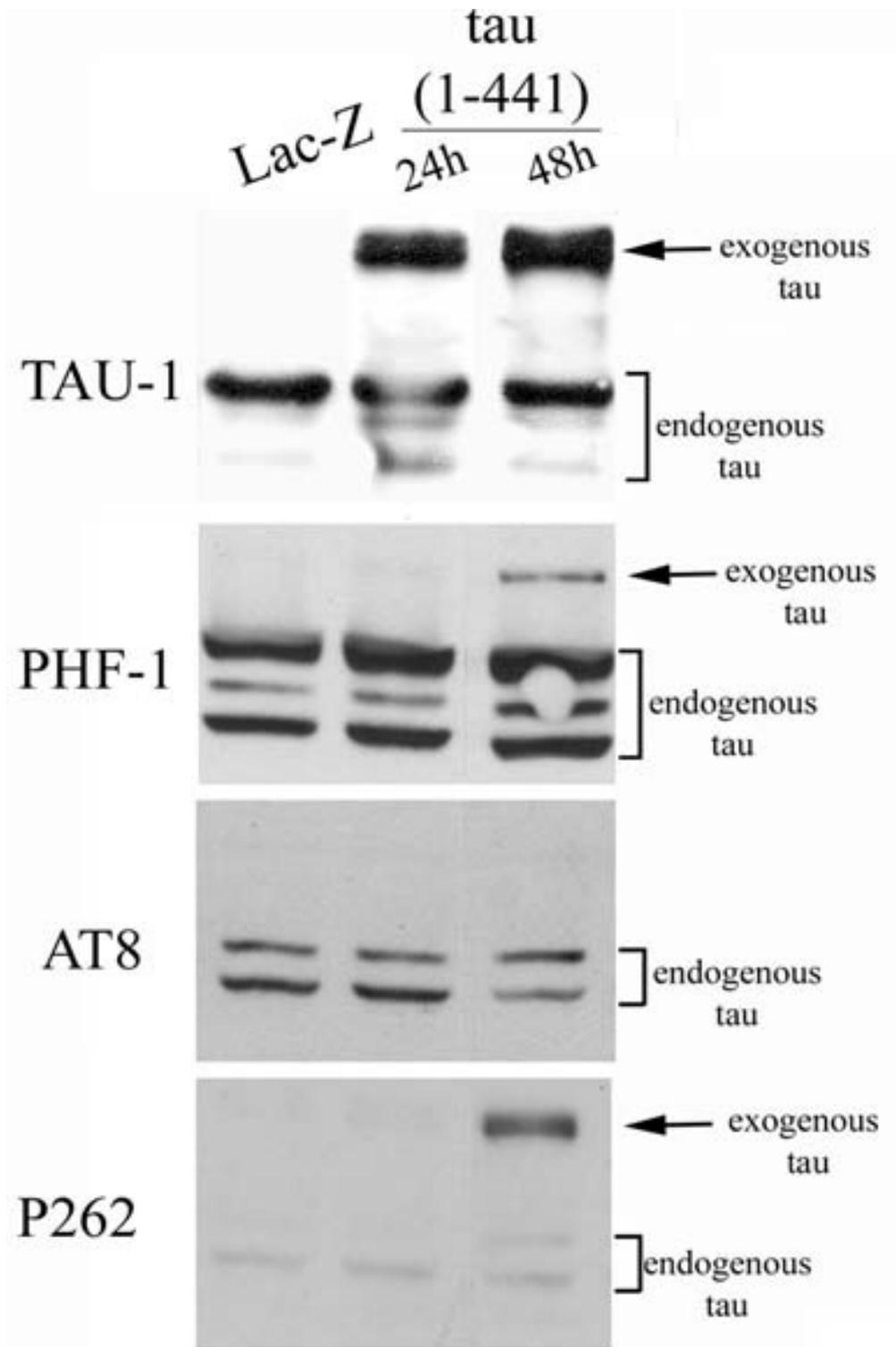


Fig. 18

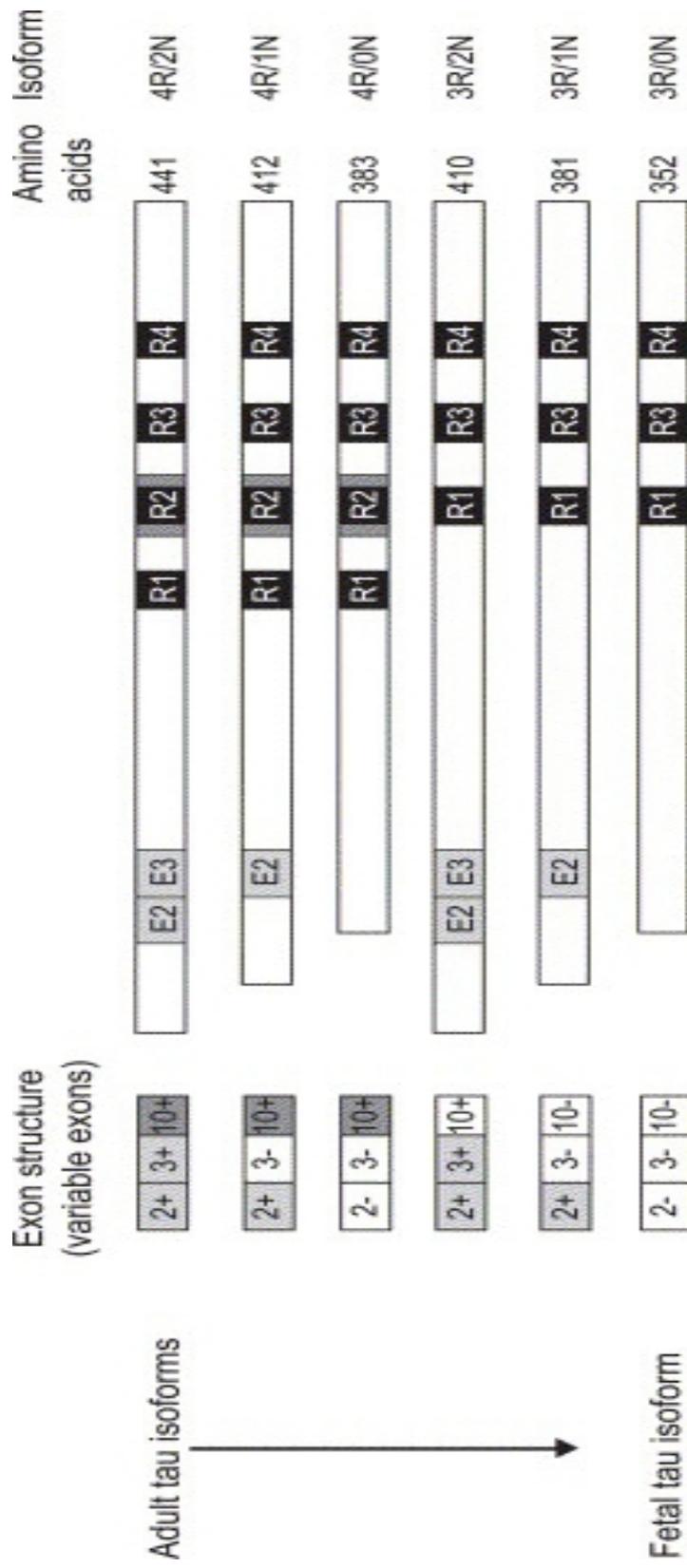




Fig. 20

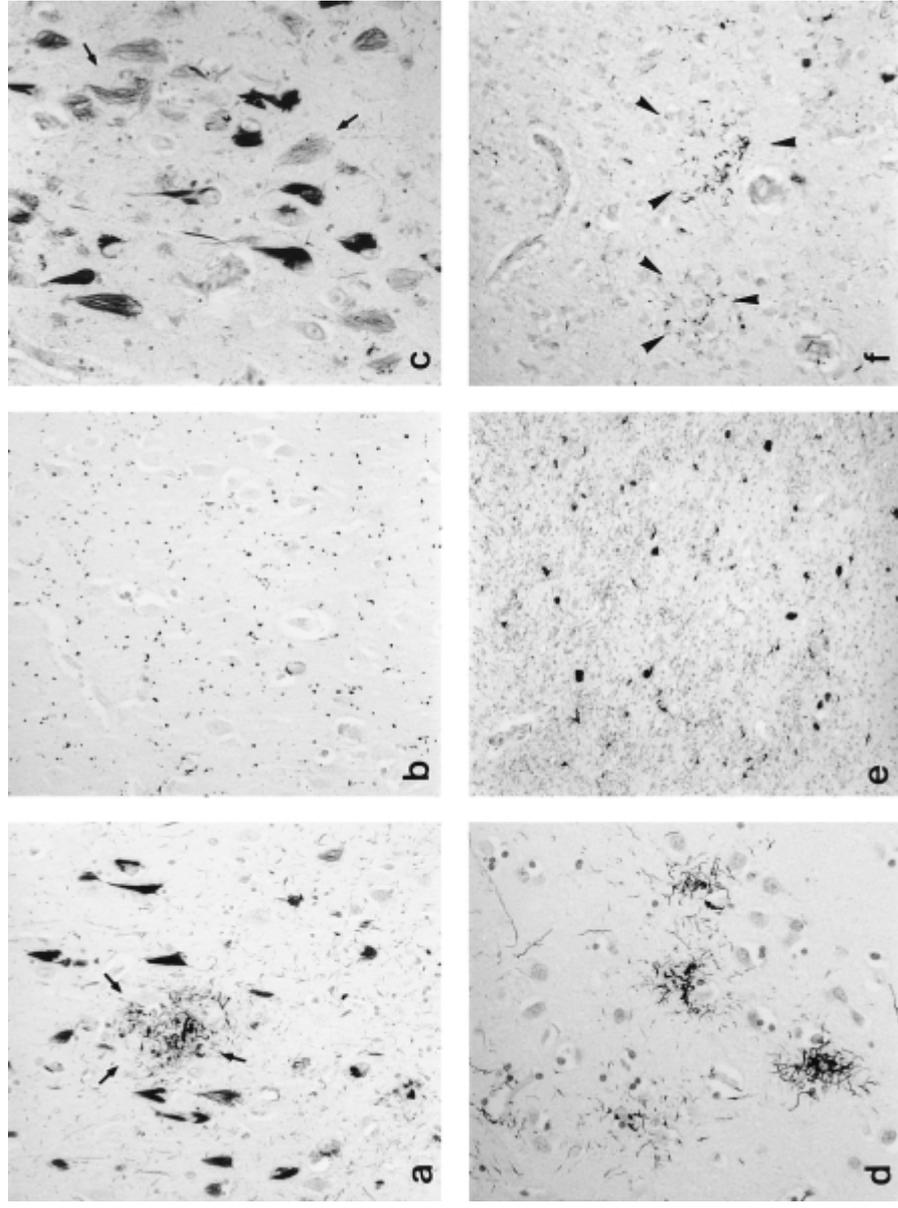


Fig. 21

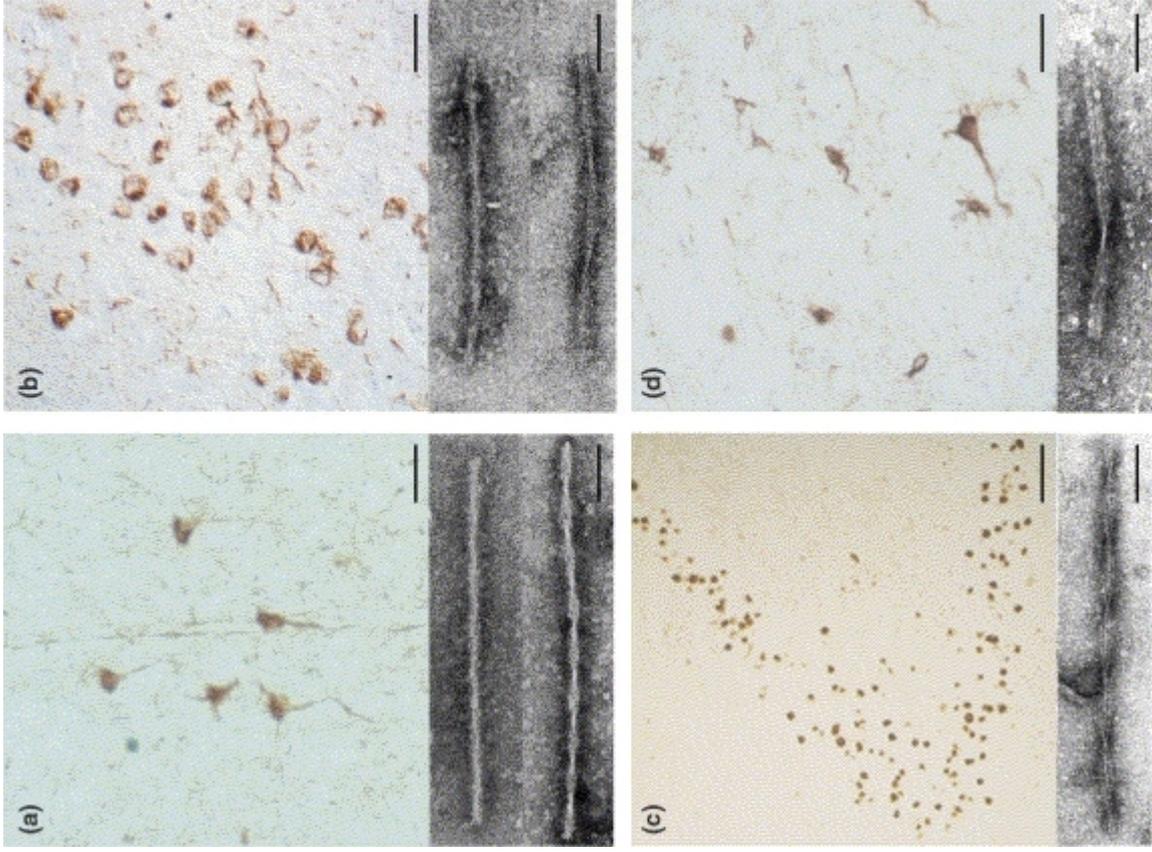


Fig. 22

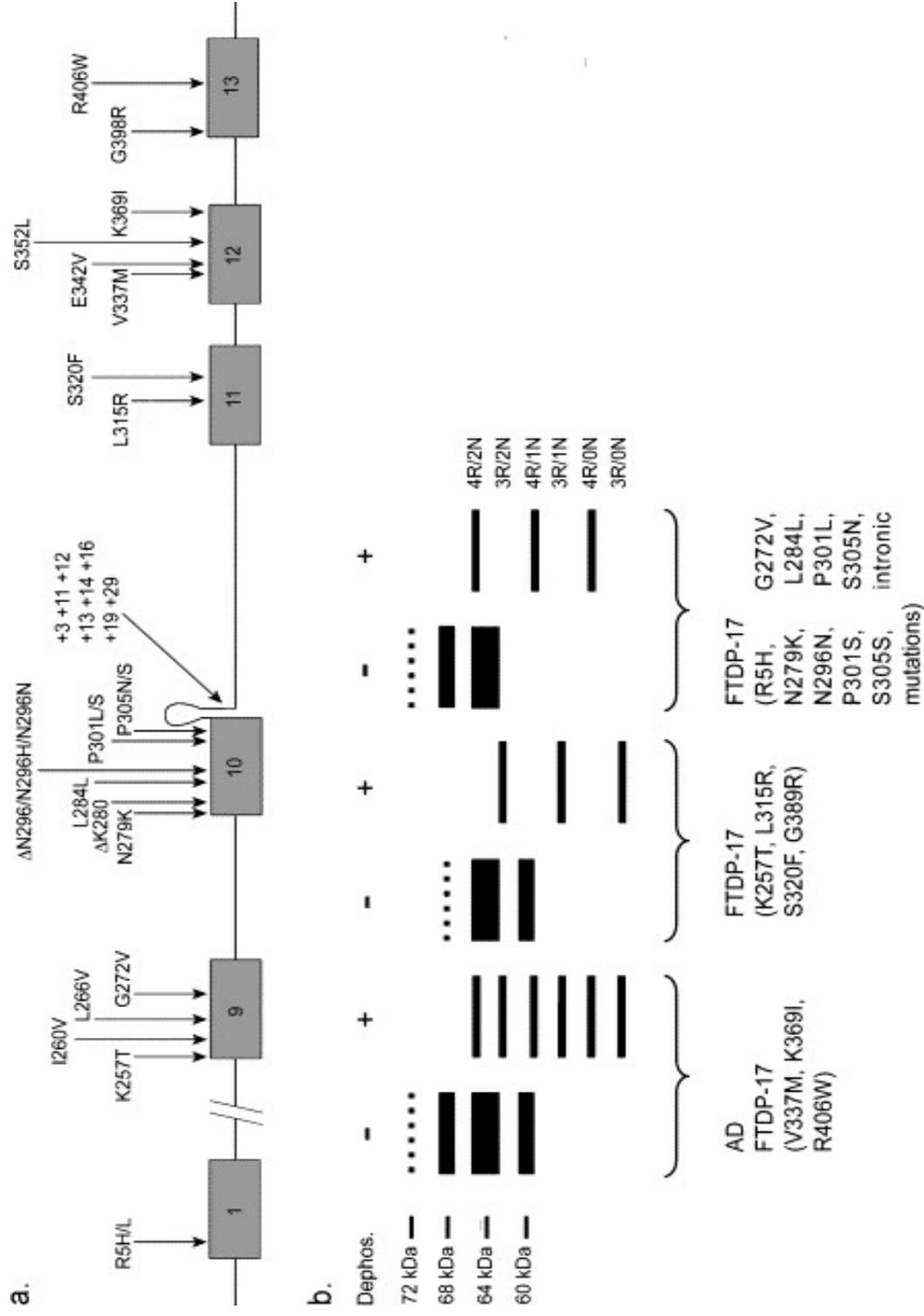


Fig. 23

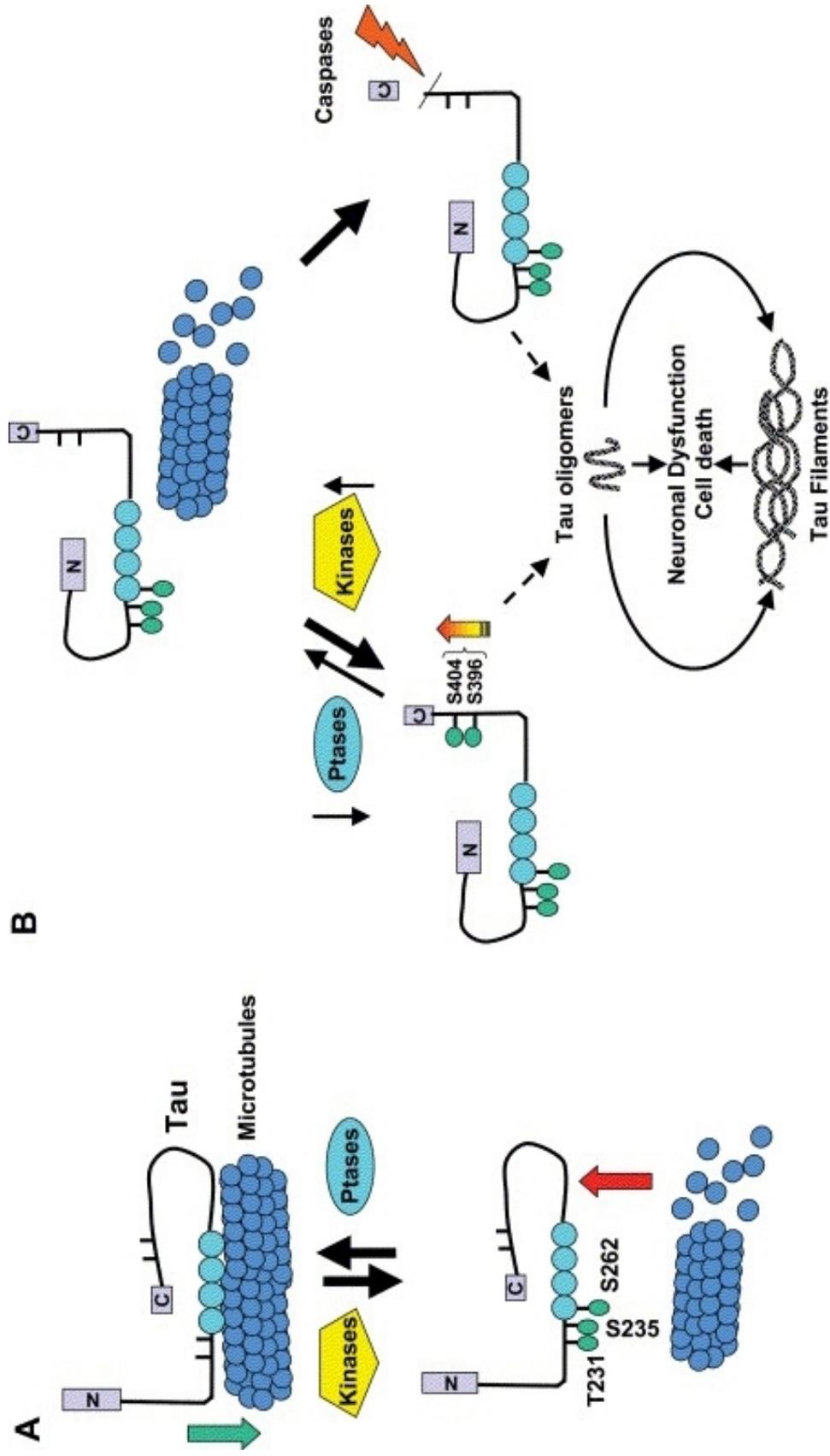
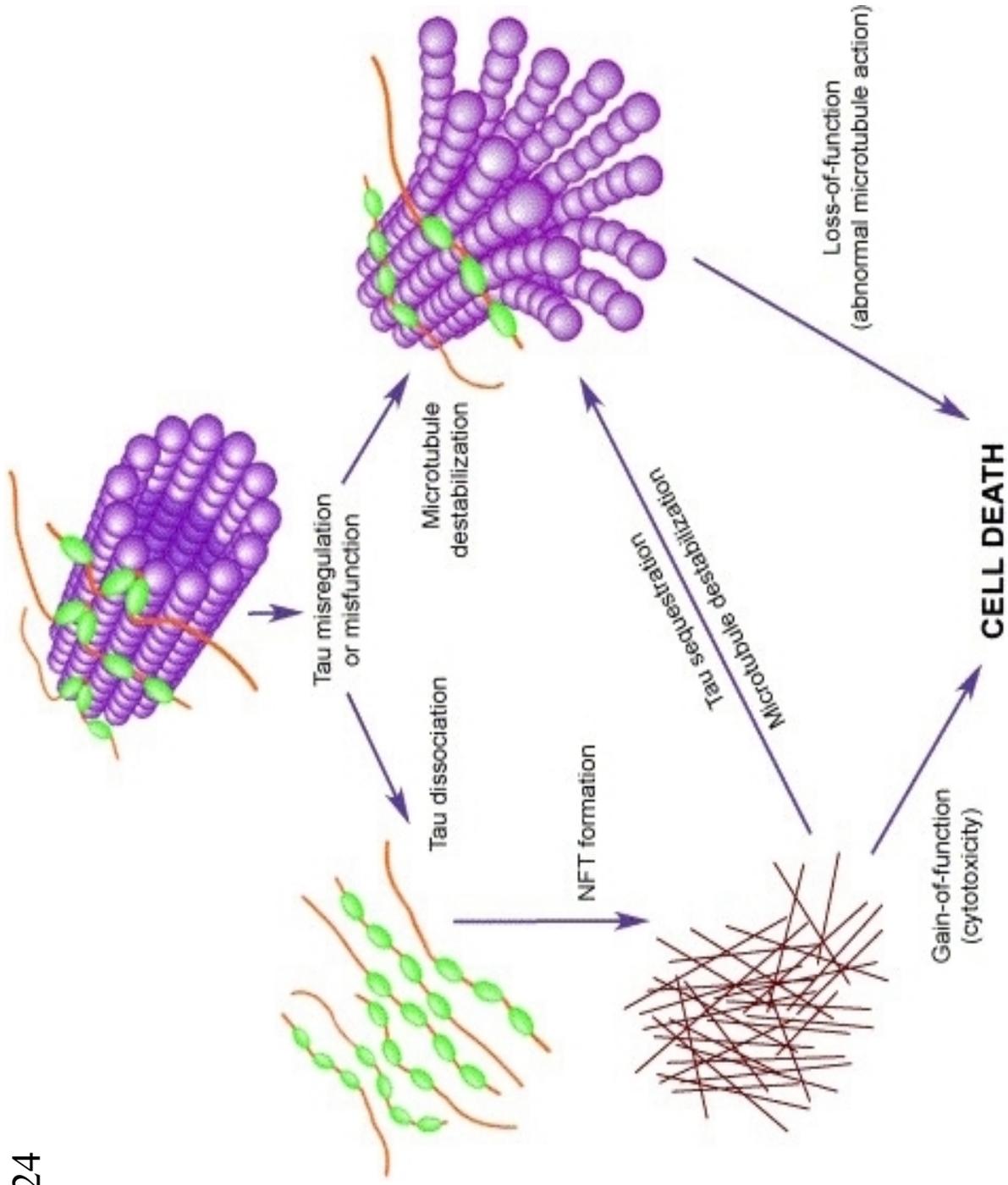


Fig. 24



**Table 1: Percent survival at 48 h of tau-(1–441)-infected CGCs and cortical neurons under various treatments**

Treatment	CGCs		Cortical neurons	
	Lac-Z	Tau-(1–441)	Lac-Z	Tau-1(1–441)
—	100	51 ± 2.8	100	40 ± 3
z-VAD-fmk	95 ± 3.2	52 ± 4 <sup>**</sup>	97 ± 2	44 ± 2 <sup>**</sup>
Ad-Bcl2	92 ± 2.8	48 ± 4.7 <sup>**</sup>	92 ± 3.2	47 ± 2 <sup>**</sup>
MK-801	98 ± 1.7	92 ± 3.4 <sup>**</sup>	97 ± 2	100 ± 2.2 <sup>**</sup>
APV	93 ± 3.7	87 ± 3.7 <sup>**</sup>	95 ± 2.8	98 ± 2 <sup>**</sup>
Memantine	100 ± 2	98 ± 2.4 <sup>**</sup>	97 ± 3	97 ± 1.8 <sup>**</sup>
CNQX	95 ± 4	50 ± 4.2 <sup>**</sup>	95 ± 2	35 ± 3 <sup>**</sup>
GYKY52466	97 ± 3.7	48 ± 3.2 <sup>**</sup>	93 ± 4	38 ± 4 <sup>**</sup>

z-VAD-fmk, Z-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone (100 μM); MK-801 (10 μM); APV, 2-amino-5-phosphonovaleric acid (100 μM); memantine (10 μM); CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, (40 μM); GYKY52466 (100 μM). \*\*, *P* < 0.01 compared with untreated tau-expressing neurons.

**Tabella 2: Summary representation of experimental evidence for a role of tau (mal-) function in tauopathies**

Model	Experimental set-up	Main conclusion
<i>I. Cell-free assembly reactions</i>		
Microtubule binding and assembly assay	microtubule binding and assembly with tau from brain lysates	• tau binds to microtubules
		• tau promotes microtubule polymerization
Microtubule binding and assembly assay	microtubule binding and assembly with recombinant tau	• tau promotes de novo microtubule nucleation and growth of existing microtubules
		• 4R tau stabilizes microtubules more than 3R tau
		• tau induces bundling of microtubules
Microtubule binding and assembly assay	microtubule binding and assembly with in vitro phosphorylated tau	• phosphorylation by many kinases reduces tau's binding to microtubules
		• differential effect of phosphorylation on de novo microtubule nucleation and growth of existing microtubules
Microtubule binding and assembly assay	microtubule binding and assembly with tau from AD brains	• AD-tau exhibits slower tubulin polymerization and lower steady state compared to “normal” tau, reversed by dephosphorylation
		• AD-tau sequesters “normal” tau and HMW MAPs
Microtubule binding and assembly assay	microtubule binding and assembly with “pseudohyperphosphorylated” (PHP)-tau	• loss of capacity to promote de novo microtubule nucleation, no change on promotion of growth of existing microtubules
		• PHP-tau is displaced from microtubules by “normal” tau
Microtubule binding and assembly assay	microtubule binding and assembly with FTDP-17 mutant tau	• diminished binding to microtubules compared to wt-tau
		• reduced microtubule assembly compared to wt-tau

## II. Cell culture models

Primary cerebellar neurons	tau antisense treatment	inhibition of axon development
Sympathetic neurons	microinjection of tau antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>• no effect on axon growth or microtubule stability</li> </ul>
Hippocampal neurons	prepared from tau KO mouse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• delay or no change in axonal development dependent on the mouse line</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• resistance to A<math>\beta</math>-induced neurodegeneration</li> </ul>
Non-neuronal cell lines	transfection of wt-tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• increased tubulin polymerization</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• increased microtubule stabilization</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• induction of bundling of microtubules</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4R tau stabilizes microtubules more than 3R tau</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• impairment of plus-end directed microtubule-based transport</li> </ul>
Non-neuronal cell line	transfection of tau with FTDP-17 mutation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• disruption of microtubule organization (but not in all studies)</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• decreased phosphorylation at some residues compared to wt-tau (but not in all studies)</li> </ul>
Non-neuronal cell line	co-transfection of different tau constructs or tau and kinases	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4R tau displaces 3R tau from microtubules</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• wt-tau displaces FTDP-17 tau from microtubules</li> </ul>
Non-neuronal cell line	co-transfection of tau and GSK-3 $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• co-transfection with GSK-3<math>\beta</math> increases tau phosphorylation, reduces its affinity to microtubules and reduces microtubule stability</li> </ul>
Sf9 cells	infection of wt-tau constructs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• formation of axon-like processes</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• induction of drug but not cold stability of microtubules</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• differential effect of phosphorylation on</li> </ul>

		process outgrowth
Sf9 cells	infection of tau with FTDP-17 mutations	<ul style="list-style-type: none"> <li>• disruption of microtubule organization</li> </ul>
Neural cell line	transfection of wt-tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• more rapid process extension</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• process formation in undifferentiated cells after cytochalasin treatment</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• impairment of plus-end directed microtubule-based transport</li> </ul>
Neural cell line	transfection of “pseudo-hyperphosphorylated” (PHP)-tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHP-tau colocalizes with microtubules in absence of microtubule stabilization</li> </ul>
Human model neurons	inhibition of serine/threonine phosphatases	<ul style="list-style-type: none"> <li>• increased tau phosphorylation, decreased tau binding to microtubules</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• selective depolymerization of stable microtubule polymer</li> </ul>
Immortalized mouse cortical neurons (CN1.4)	transfection of wt-tau and FTDP-17 mutated tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• increased phosphorylation and reduced microtubule binding of FTDP-17 mutant tau compared to wt-tau</li> </ul>
<i>III. Animal models</i>		
<i>D. melanogaster</i>	overexpression of human tau constructs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• abnormal axon bundling, axonal swellings and loss of axons in the absence of NFTs</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• neurodegeneration more severe for FTDP-17 mutant tau</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• co-expression with <i>Drosophila</i> GSK-3 homolog exacerbates neurodegeneration</li> </ul>
<i>D. melanogaster</i>	genetic modifier screen with tau expressing flies	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kinases and phosphatases are major classes</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• several kinases enhance neurodegeneration</li> </ul>
<i>C. elegans</i>	overexpression of human tau constructs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• progressive Unc phenotype</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unc phenotype is more severe with FTDP-17</li> </ul>

		mutant tau
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unc precedes tau accumulation and is due to presynaptic effect</li> </ul>
Mouse	low overexpression of human 4R tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• disease-related phosphorylation</li> <li>• no cytoskeletal changes or tau aggregates</li> </ul>
Mouse	high overexpression of human 3R tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aggregates with hyperphosphorylated tau mainly in spinal cord neurons</li> <li>• axon degeneration, diminished number of microtubules, reduced axonal transport</li> </ul>
Mouse	moderate overexpression of 4R tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• axonal degeneration in brain and spinal cord in the absence of NFTs</li> <li>• axonal dilations with neurofilament, mitochondria and vesicle accumulations</li> <li>• overexpression of constitutively active GSK-3<math>\beta</math> kinase rescues the phenotype</li> </ul>
Mouse	overexpression of dominant negative PP2A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hyperphosphorylation and aggregation of tau</li> <li>• no major phenotypic changes</li> </ul>
Mouse	overexpression of FTDP-17 mutant tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hyperphosphorylation and aggregation of tau</li> <li>• some NFTs</li> <li>• induction of apoptosis in some neurons in some studies</li> </ul>

**Tabella 3: Summary representation of experimental evidence for a role of direct cytotoxicity of altered tau protein in tauopathies**

<b>Model</b>	<b>Experimental set-up</b>	<b>Main conclusion</b>
Neural cell line (PC12)	transfection of “pseudo-hyperphosphorylated tau”	<ul style="list-style-type: none"> <li>• induces cytotoxicity associated with an induction of apoptotic mechanisms in the absence of detectable tau aggregates</li> </ul>
<i>I. Cell culture models</i>		
Human model neurons	infection of “pseudo-hyperphosphorylated tau”	<ul style="list-style-type: none"> <li>• induces cytotoxicity associated with an induction of apoptotic mechanisms</li> </ul>
Non-neuronal cell line (COS7)	co-transfection of tau, GSK-3 $\beta$ and ubiquitin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• co-expression of tau and GSK-3<math>\beta</math> resulted in accumulation of soluble phosphorylated tau, which is cytotoxic</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• co-expression along with CHIP rescues this type of cell death</li> </ul>
Human cortical neuronal cell line (HCN2A)	delivery of pathological hyperphosphorylated human tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pathological hyper-phosphorylated tau induced cell death associated with apoptosis</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hsp27 prevents tau induced cell death</li> </ul>
<i>D. melanogaster</i>	overexpression of human tau constructs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neurodegeneration due to abnormal tau phosphorylation in the absence of NFTs</li> </ul>
<i>II. Animal models</i>		
		FTDP-17 mutant tau
<i>C. elegans</i>	overexpression of human tau constructs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neuronal dysfunction as evident from Unc phenotype and more severe in FTDP-17 mutation</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• accumulation of soluble phosphorylated mutant tau correlates with the Unc phenotype before aggregation of tau</li> </ul>

**Tabella 4:overview about selected transgenic mouse models expressing tau**

<b>Model</b>	<b>Experimental set-up</b>	<b>Effect on tau aggregation</b>
Transgenic mouse for wild-type tau	high overexpression of human 3R tau	<p>young mice: filamentous tau inclusions (also containing NFs and <math>\beta</math>-tubulin) in spinal cord axons (thioflavin S-negative)</p> <p>older mice (&gt;18 months): NFT-like lesions (thioflavin S-positive) in neuronal perikarya of hippocampus, entorhinal cortex, and amygdala, SFs, no NF and no tubulin in NFTs</p>
Transgenic mouse for wild-type tau	overexpression of 4R tau	no filamentous tau aggregates
Transgenic mouse for wild-type tau on negative mouse tau background	expression of six human tau isoforms, no endogenous mouse tau	<p>insoluble tau consists mainly of 3R-isoform</p> <p>3 months: tau redistribution from axon to cell body</p> <p>6 months: accumulation of hyperphosphorylated tau</p> <p>9 months: aggregated tau and PHFs</p>
Transgenic mouse for mutant tau	overexpression of mutated 4R tau (P301L)	thioflavin S-positive NFTs in perikarya and dendrites of neurons of djensenhalon

<b>Model</b>	<b>Experimental set-up</b>	<b>Effect on tau aggregation</b>
		brainstem, cerebellar nuclei, spinal cord (SF and twisted ribbon filaments); tau-positive pre-tangles (sarkosyl-insoluble tau) in wider distribution
Transgenic mouse for mutant tau	overexpression of mutated 4R tau (P301S)	filaments in brain and spinal cord: mainly half-twisted ribbons; largest number of tau-positive nerve cells in brainstem and spinal cord; thioflavin S-positive filaments
Transgenic mouse for mutant tau	overexpression of mutated 4R tau (V337M)	thioflavin S-positive NFTs, straight fibrils >11 months of age (15 months)
Transgenic mouse for mutant tau	overexpression of mutated 4R tau (R406W)	congophilic hyperphosphorylated tau inclusions in somatodendritic compartment in forebrain neurons (>18 months); SFs
Transgenic mouse for mutant tau	overexpression of mutated 4R tau (triple mutant: G272V, P301L, R406W)	tau filaments in forebrain
Transgenic mouse for mutant tau	overexpression of 4R tau with mutation (P301L)	NFTs in neurons; filaments in glial cells
Double transgenic mouse for mutant tau and mutant APP	overexpression of mutated 4R tau (P301L) and APP <sup>swe</sup>	female mice develop NFTs earlier than males; NFTs in brainstem spinal cord

<b>Model</b>	<b>Experimental set-up</b>	<b>Effect on tau aggregation</b>
		hippocampus, amygdala; SFs; Gallyas-positive, some thioflavin S-positive
Triple-transgenic mouse for mutant tau, mutant APP and mutant PS1	overexpression of mutated 4R tau (P301L), APP <sup>swe</sup> and PS1 <sub>M146V</sub>	plaques and tangles in AD-relevant brain regions; some Gallyas-positive and thioflavin S-positive tau aggregates
Transgenic mouse for mutant tau with A $\beta$ injection	overexpression of mutated 4R tau (P301L) and injection of fibrillar A $\beta$	five times more NFTs than without injection, NFTs increase from 18 to 60 days after injection, in cell bodies of the amygdala, Gallyas-positive, thioflavin S-positive, twisted filaments