

T
516

908824

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO.
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LAS ETAPAS INICIALES DEL
PROCESAMIENTO AMILOIDOGÉNICO DE LA PROTEÍNA
TAU EN LA DEGENERACIÓN NEUROFIBRILAR EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.
“Estudio por microscopia confocal”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A:

BIOL. JOSÉ CARMEN LUNA MUÑOZ

MÉXICO, D.F

**XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO**

FEBRERO 2005

**XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO**

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Raúl Mena López, en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante la realización de la presente investigación el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Comité Tutorial

DIRECTOR

Dr. Raúl Mena López

Dpto. De Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN

Dr. Francisco García-Sierra

Dpto. De Biología Celular del CINVESTAV-IPN

CODIRECTOR

Dra. Claudia Soto Peredo

UAM-Xochimilco

Dr. Daniel Martínez Fong

Dpto. De Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN

El jurado designado por la divisiones de Ciencias Biológicas y de la salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que
presento:

José Carmen Luna Muñoz

El día 28 de Febrero del año 2005

Sinodales:

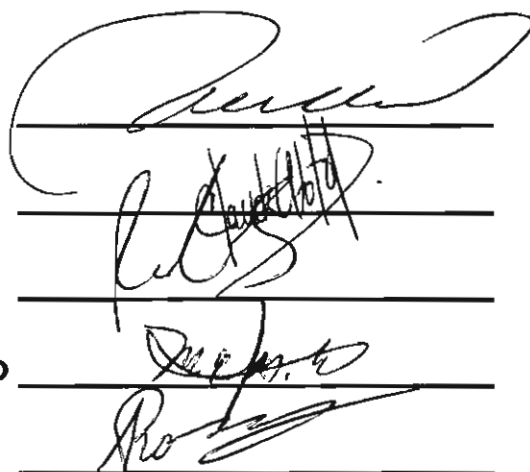
Dr. Raúl Mena López

Dra. Claudia Soto Peredo

Dr. Francisco García Sierra

Dra. María Eugenia Mendoza Garrido

Dr. Rubén Román Ramos



The image shows five horizontal lines, each with a handwritten signature written across it. The signatures are in black ink and appear to be cursive or semi-cursive. The first signature is the largest and most prominent. The second signature is smaller and more compact. The third signature is also smaller and more compact. The fourth signature is smaller and more compact. The fifth signature is smaller and more compact.

DEDICO ESTA TESIS

Especialmente a mi esposa Amparo Viramontes Pintos.

Que hemos pasado muchas dificultades pero que siempre ha tratado y ha comprendido lo absorbente de este tiempo tan maravillosos que es el laboratorio.

A mis hijos Nabil Itzi y José Emmanuel.

Que son la base de mi existencia y estímulo por seguir adelante.

Los amo y les entrego mi vida misma.

A mis padres Yolanda Muñoz Sánchez y Miguel Luna Tinajero que han sido siempre un ejemplo a seguir en la perseverancia, amor y dedicación a nuestros sueños forjados desde el inicio de mis estudios.

A mis hermanos Yolanda, Eva, Miguel, Ana y Elvia.

Que siempre nos hemos brindado un apoyo incondicional en todo momento.

A mis hermanos (primos) Alejandro, Guadalupe, Raúl Luna Z. que siempre han sido un ejemplo a seguir y en las metas propuestas a alcanzar.

A la memoria de mi abuelita Marcelina Tinajero Caballero que siempre la llevo en mi mente y mi corazón.

AGRADECIMIENTOS.

A las Familias Mexicanas que donaron el tejido cerebral de sus familiares que padecieron la enfermedad de Alzheimer, para el avance de la investigación en dicho padecimiento y la realización de este trabajo.

Al Dr. Raúl Mena López.

Raúl por tu valioso apoyo y dirección de este trabajo, por transmitirme gran parte de tus conocimientos que ahora se han culminado en este trabajo doctoral. Además por brindarme tu amistad y confianza en todo momento. Del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN.

Al Dr. Francisco García-Sierra.

Por tu apoyo total en la co-dirección desde los inicios de este trabajo, por tu amistad que me has brindado en todo momento. Del Depto de Biología Celular del CINVESTAV IPN.

A la Dra. Laura Chávez

Por su colaboración y donación del tejido cerebral, el cual fue de vital importancia para el desarrollo de este estudio. De la unidad de Patología del Hospital General de México.

A la Dra. Claudia Soto

Por su apoyo, consejos y amistad dentro y fuera de esta trabajo. Del Programa de doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco.

A la Dra. Maria Eugenia Mendoza Garrido

Por la revisión y apoyo en el desarrollo del presente trabajo así como por su amistad de toda la vida. Del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN.

A la Dra. Viviana Falcón Cama

Por su apoyo y enseñanza en la microscopia electrónica, por su amistad y cariño. Del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Habana, Cuba.

Al Dr. Daniel Martínez Fong

Por su apoyo y amistad en el desarrollo de este trabajo. Jefe del Del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN.

A José Luis Fernández López

Por su apoyo técnico y su gran amistad. Del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN.

A la futura Dra. Janneth Peralta Ramírez. Por la revisión del presente trabajo así como por su ayuda incondicional durante el desarrollo del mismo. Del Depto de Biología Celular del CINVESTAV IPN.

A mi gran amigo Biol. Miguel Ángel Rojas Sierra

Por su ayuda en las tinciones de plata en los tejidos donados para este estudio así como por su gran amistad que me ha brindado desde la licenciatura y que este trabajo sea un estímulo para que sigas adelante "Mike". Del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN.

A Mari Carmen de Lorenz

Por su amistad y asistencia secretarial siempre tan eficiente. Del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN.

A mi gran amigo Biol. Dagoberto Tapia Ramírez por su gran amistad y consejos en el desarrollo de este trabajo. Y que este sea un estímulo para que te animes a entrarle al doctorado.

A mis amigos del laboratorio Gustavo "el Gus", Emmanuel "Dr Simi", Siddhartha "Figurin", Mario "El diamante negro", Alberto "Rod", Norma, Celso, Isaura "Princesa" y Edgar "Woody" por la amistad así como el ambiente que hacíamos en el laboratorio.

....."Si no puedo dibujarlo es que no lo entiendo"

(Albert Einstein)

ABREVIATURAS.

ac	Anticuerpo.
acM	Anticuerpo monoclonal.
acP	Anticuerpo policlonal.
APOE	Apolipoproteína E.
DMR	Dominios repetidos de unión a microtubulos
EA	Enfermedad de Alzheimer.
FHAs	Filamentos helicoidales apareados.
G	Golgi
HE	Heterocromatina
IR	Inmunorreactividad.
M	Mitocondria
MAP	Proteína asociada a microtúbulos.
MNFs	Marañas neurofibrilares.
MNF_i	Marañas neurofibrilares intracelular.
MNF_e	Marañas neurofibrilares extracelular.
MT	Microtúbulo.
N	Núcleo
PBS-t	PBS tritón
PFA	Paraformaldehído.
PN	Placas neuríticas.
PPA-β	Proteína precursora del amiloide beta.
PSV	Partículas semejantes a virus
RE	Retículo Endoplásmico
RT	Rojo tiazina.

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	04
ÍNDICE	05
RESUMEN	06
1.0 INTRODUCCIÓN	07
2.0 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA EA	08
2.1 ETIOLOGÍA DE LA EA	09
3.0 NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	10
3.1 PATOLOGÍA MACROSCÓPICA	10
3.2 PATOLOGÍA MICROSCÓPICA	11
4.0 VÍA PERFORANTE	12
4.1 ALTERACIÓN DE LA VÍA PERFORANTE EN LA EA	13
5.0 LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LA EA	15
5.1 PLACAS NEURÍTICAS	16
5.2 PPA-β Y AMILOIDE-β	16
5.3 MARAÑAS NEUROFIBRILARES	18
6.0 FILAMENTOS HELICOIDALES APAREADOS Y LA PROTEÍNA TAU	19
6.1 LA PROTEÍNA TAU EN CONDICIONES NORMALES	20
6.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAU	21
6.3 MOLÉCULA DE TAU	22
6.4 FUNCIÓN BIOLÓGICA DE TAU	24
7.0 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA TAU EN LA EA.	25
7.1 HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU	25

7.2 TAU TRUNCADA	27
7.3 CAMBIO CONFORMACIONAL	30
8.0 PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA TAU EN LA EA	33
9.0 REQUERIMIENTOS PARA EL CAMBIO CONFORMACIONAL	35
10.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
11.0 JUSTIFICACIÓN	37
12.0 HIPÓTESIS	37
13.0 OBJETIVO GENERAL	37
13.1 OBJETIVOS PARTICULARES	37
14.0 MATERIAL Y MÉTODOS	38
15.0 RESULTADOS	44
16.0 DISCUSIÓN	67
17.0 CONCLUSIONES	87
18.0 BIBLIOGRAFÍA	88

RESUMEN

La mayoría de los estudios en el procesamiento de la proteína tau se han realizado en la MNFi. Sin embargo para poder detectar aquellos cambios más tempranos en la degeneración neuronal, este trabajo se enfocó al análisis de los depósitos granulares difusos y pre-maraña en el soma neuronal. Así mismo, comparamos el cambio conformacional regional dependiente de fosfatos (TG-3 y AT100) y el cambio conformacional estructural de la proteína tau (Alz-50), mediante el análisis de triples y dobles inmunotinciones en tejido cerebral con la EA. Se observó que la proteína tau sufre el cambio conformacional regional (TG-3 y AT100) previo al cambio conformacional estructural (Alz-50) y posiblemente una serie de cambios conformacionales regionales, favorezca el acercamiento de la porción N-terminal sobre el tercer dominio repetido realizándose los requerimientos necesarios, para que el anticuerpo Alz-50 reconozca la proteína tau conformacionalmente alterada. Así mismo, también utilizando anticuerpos contra la porción N- y C-terminal, se pudo evidenciar que la porción C-terminal es más sensible a la proteólisis y que la porción N-terminal podría ser protegido en primera instancia por este cambio conformacional que adquiere la molécula.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La demencia es un desorden cerebral, que afecta progresivamente las habilidades de una persona para efectuar sus actividades diarias. La enfermedad de Alzheimer (EA), es la forma más común de la demencia entre las personas mayores de 65 años (ADEAR, 2002). La EA se ha definido como un proceso neurodegenerativo progresivo de las funciones intelectuales del individuo, la cual clínicamente se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria y el deterioro de las funciones cognoscitivas incluyendo el lenguaje, el juicio y la conducta (Absher y Cummings 1994). La EA fue llamada así por el médico Alemán Alois Alzheimer, quien en 1906 describió los cambios en el tejido cerebral de una mujer que falleció demente. El estudio anatomopatológico del cerebro de esta paciente evidenció una atrofia cortical severa. A nivel histológico se encontró una gran cantidad de lesiones distribuidas principalmente la neocorteza y el hipocampo. Estas lesiones, que fueron teñidas con impregnaciones argénticas, fueron llamadas por el Dr. Alzheimer, como ovillos o marañas neurofibrilares (MNFs) y placas seniles (PS). Fue hasta el año de 1986, en que se reconoce a la enfermedad como un problema de salud pública mundial, ya que afecta aproximadamente 18 millones de personas con demencia, de los cuales, dos tercios es causada por la EA (ADI, 2000). Para 1988, la Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares, estimó que habían 350,000 casos de demencia tipo Alzheimer, de los cuales aproximadamente 40,000 eran menores de 65 años (AMAES, 1988).

2.0 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La EA se desarrolla principalmente después de los 65 años de edad, aunque se han descrito casos entre los 47-50 años. La EA se caracteriza por la aparición de trastornos mentales tales como: ideas de persecución, alteración de la memoria, desorientación espacio-temporal, problemas de comprensión del lenguaje y falta de memoria.

La evolución de la EA es muy variable la cual puede ser de 1-2 años y en otros casos el deterioro de las funciones cognitivas puede prolongarse hasta 15 años, definiéndose de esta manera tres estadios evolutivos de la enfermedad

- 1- *Estadio I* (leve). Tiene una duración aproximada de 2-4 años y se caracteriza por alteraciones de la memoria, dificultad para aprender cosas nuevas, discreta pérdida de memoria remota (dificultada de recordar cosas aprendidas hace tiempo), desorientación espacial (no recuerda bien el lugar en el que se encuentra), presenta cambios de humor y síntomas de depresión con apatía y pérdida de iniciativa. Sin embargo, el paciente es capaz de mantener una conversación, comprende bien y utiliza los aspectos sociales de la comunicación (gestos y entonación).
- 2- *Estadio II* (moderado). Se presenta con una duración de 2-10 años. Se observan alteraciones en el lenguaje (Ataxia. Al paciente le cuesta hablar), dificultades para llevar a cabo funciones aprendidas (Apraxia. Por ejemplo vestirse, planchar, utilizar los cubiertos), pérdida parcial de la capacidad de reconocimiento (Agnosia. No reconoce ambientes familiares), conserva su orientación personal (recordando su nombre, edad y lugar de nacimiento), reconoce a su cónyuge y allegados, es descuidado con su higiene personal, esto se debe a su falta de memoria, en ocasiones dice reconocer lo que realmente no

conoce (confabula). Se manifiestan alteraciones neurológicas en forma de debilidad muscular, alteraciones posturales y de la marcha. Aparecen signos sicóticos como alucinaciones e ilusiones, realiza actos perseverantes (como ordenar la ropa varias ocasiones al día y deambular continuamente). 3. *Estadio III* (severo) se acentúa la rigidez muscular, así como resistencia al cambio postural. Pueden aparecer temblores e incluso crisis epilépticas; los pacientes se muestran profundamente apáticos, presentan cierto grado de pérdida de respuesta al dolor, e incontinencia de esfínteres. Los pacientes terminan encamados, con alimentación asistida y suelen fallecer por neumonía, infección sistémica u otra enfermedad accidental. (<http://www.tuotromedico.com/temas/alzheimer.htm>)

En la actualidad no hay un tratamiento efectivo para la EA. En general los medicamentos suministrados a los pacientes van dirigidos a aliviar los síntomas del paciente, que van surgiendo durante la evolución de la enfermedad y por otro lado apoyar a los familiares que por lo general son los cuidadores de los pacientes ya que, la evolución de la enfermedad en la mayoría de los casos es muy larga y difícil de soportar en su entorno.

2.1 ETIOLOGÍA DE LA EA

Basados en estudios de prevalencia se ha sugerido que la etiología de la EA puede ser multifactorial. La principal y más importante es la edad (Evans y col., 1989). Cifras epidemiológicas de países europeos y EEUU indican que, aproximadamente 1 de cada 9 individuos mayores de 60 años y 1 de cada 5 mayores de 85 años padecen un síndrome demencial, el 65% de los cuales corresponden a la EA. Factores de riesgo ambiental como el traumatismo de cráneo con pérdida de conocimiento, o los micro-traumatismos repetidos como es

el caso de los boxeadores, presentan un riesgo relativo de 2 a 3 veces mayor para la EA en comparación con la población en general; se ha descrito que el traumatismo severo induce la formación de placas difusas de amilode- β (Mortimer y col., 1991). También la exposición a metales como el aluminio y el incremento plasmático de mercurio (Hock y col., 1998), aunque han sido considerados como factores de riesgo, no hay evidencias contundentes que lo apoyen.

Otro factor de riesgo es el genético, en donde la variante alélica ϵ -4 de la apolipoproteína-E, se ha relacionado con el establecimiento tardío de la EA. Sin embargo, el presentar la forma genotípica de E4/E4 no significa necesariamente que el individuo desarrollará la EA.

A pesar de su origen multifactorial la EA se caracteriza por la acumulación anormal de filamentos formados de amilode- β y proteína tau (Glennner y Wong 1984, Flament y Delacourte 1989).

3.0 NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La EA puede diagnosticarse hasta con un 90% de certeza, con la batería de análisis clínicos y pruebas de cognición. Pero la prueba definitiva de la EA se realiza en estudio anatomopatológico posmortem de los cerebros de personas que padecieron la enfermedad.

3.1 PATOLOGÍA MACROSCÓPICA.

La atrofia es normalmente simétrica y difusa en los giros cerebrales, que se evidenció con la disminución del espesor de las circunvoluciones, se observa un aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular, disminución del peso y volumen cerebral. La atrofia afecta principalmente al

hipocampo, la corteza entorrinal y a los lóbulos temporales (más frecuente) y frontales (Fig 1 A). El patrón de atrofia más común es una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas y en menor proporción puede haber un compromiso parieto-occipital (Fig 1 C).

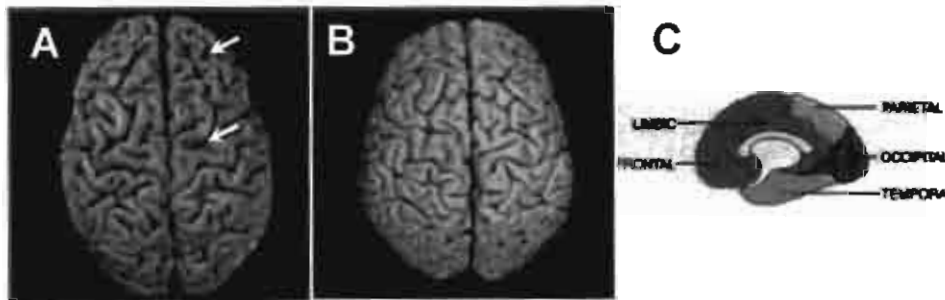


Fig 1. Vista superior del cerebro de un paciente con la EA (A), comparado con un caso control (B). A) se observa una marcada atrofia cerebral difusa, el ensanchamiento de las fisuras y el adelgazamiento de las circunvoluciones (flechas). Tomado de www.adaptogeno.com/noticiero18.htm, C) esquema de vista lateral en los cuales se observan los lóbulos temporal y frontal que son los mas afectados en la EA y principalmente el hipocampo.

Secciones a través de los hemisferios cerebrales, revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular.

3.2 PATOLOGÍA MICROSCÓPICA.

A nivel microscópico, la EA se caracteriza por la presencia de lesiones en el tejido de MNFs (Fig 2 A, B), NDs (Fig 2 C) y PNs(Fig 2 D).

La acumulación de las estructuras patológicas en la EA no ocurre en forma azarosa, sino más bien sigue un patrón estereotipado perfectamente bien definido. Antes de describir con detalle este punto, primero se describirá la organización del hipocampo. Se han descrito dos grandes regiones en la citoarquitectura cerebral de los mamíferos. La neocorteza (isocorteza), se caracteriza por una constitución celular extensa y homogénea, la otra región es la allocorteza es de menor tamaño

que la isocorteza, y su constitución celular es heterogénea (Fig 3). Dentro de la allocorteza se encuentra como parte de esta región el hipocampo, el cual, se encuentra ubicado en la parte interna del lóbulo temporal (región temporomesial) a dicha estructura se le ha dividido en dos partes. Una anterior llamada circunvolución del hipocampo (parahipocampo) y una posterior llamada lingual. Las regiones que se encuentran incluidas en el área hipocámpica son el giro dentado, el subíulum, presubíulum, para subíulum y la corteza entorrinal.

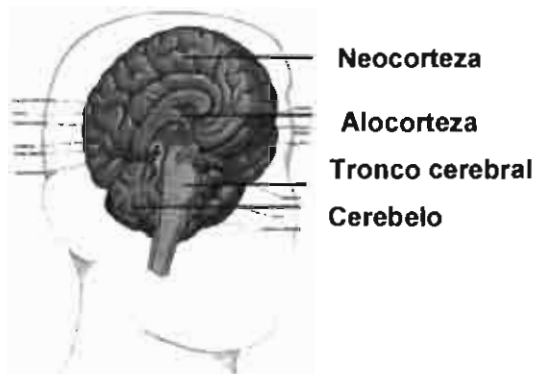


Fig 3. El hipocampo es un área relacionada con la corteza cerebral que se ubica en el interior del lóbulo temporal. Se le considera como perteneciente a la corteza primitiva o allocorteza. Se encuentra en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que podría considerarse un sistema, el sistema hipocámpico. En él se incluirían, la corteza perirrinal, la entorrinal y la parahipocámpica. La neocorteza ocupa la mayor parte del área cerebral.

4.0 VÍA PERFORANTE

El circuito de la formación hipocámpica (Fig 4), se inicia en las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal (CE-II), los axones de estas neuronas inician la vía perforante que pasa por el subíulum y termina en el giro dentado y en la región CA3 del hipocampo. Sin embargo, las neuronas ubicadas en la capa III de la corteza entorrinal proyectan directamente al CA1 y subíulum. Las neuronas del giro dentado, envían sus axones (fibras mossy) a las dendritas de las células piramidales de CA3. Estas células envían a otras células del CA3 y también a

células piramidales del CA1 (Col.,aterales de Schaffer). Las células de CA1 envían axones al subíulum y a las capas profundas de la corteza entorrinal capa IV (CE-IV). (Witter M.P. y col., 2000).

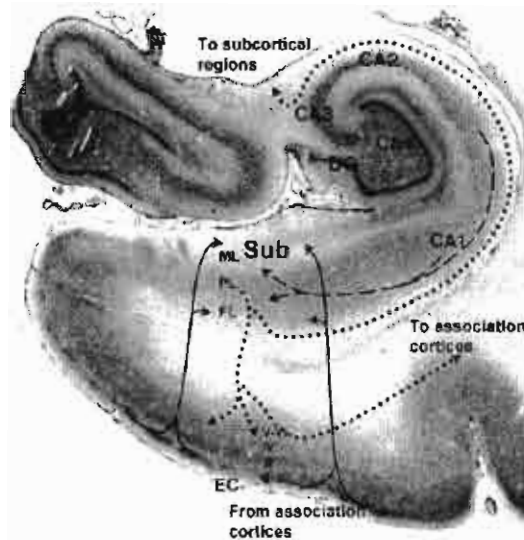


Fig 4. Micrografía del hipocampo contrateñido con Nissl, en el cual se muestra la localización y conexión del subíulum (sub). El subíulum recibe innervación directa de las capas II y III de la corteza entorrinal (EC), a la porción superficial de la capa molecular (ML) y la capa profunda de células fusiformes (FL).

4.1 ALTERACIÓN DE LA VÍA PERFORANTE EN LA EA

Esta vía de entrada y salida de información (vía perforante), se ve afectada por la acumulación de estructuras patológicas (MNFs) las cuales, son evidenciadas por un gran número de anticuerpos que van dirigidos contra la proteína tau (Thal D.R. y col., 2000). García-Sierra y col., (2001), describieron la vulnerabilidad celular de esta vía en donde se demostró la presencia de Marañas Neurofibrilares Extracelulares (MNFe), en áreas bien definidas (Fig 5), mostrando una relación inversa en la distribución de MNFi y MNFe. En la región de la transentorrinal y capa II de la corteza entorrinal en los casos con la EA, se presentó una mayor cantidad de MNFe evidenciadas por el anticuerpo 423 (reconoce una truncación

en el Glu-391), siendo éste un reflejo de la muerte neuronal. En estas mismas áreas, las MNFi se encuentran en una densidad muy baja y su presencia se restringe en gran parte a las zonas de la CA1 y subículum. En etapas avanzadas de deterioro cognoscitivo en la EA, se observó un incremento de MNFe en las áreas CA1 y subículum), coexistiendo con MNFi sugiriendo que en estas zonas, las neuronas piramidales presentan una mayor resistencia a la degeneración. Por otro lado, Thal D.R y col., (2000), observaron acumulaciones de tau hiperfosforilada en el soma y en las dendritas de las células de la zona transentorrinal y entorrinal, esta acumulación, posteriormente se encuentra en el neuropilo del CA1-subículum y después en el *stratum radiatum* y *stratum oriens* mostrando una patología de FHAs. Por lo que al involucrarse las dendritas (que son las vías de entrada) y axones (vías de salida), la patología del citoesqueleto en la EA, incluye alteraciones axonales que es el resultado de una progresiva expansión de los FHAs de las dendritas y el pericarion, sugiriendo de esta manera que el inicio de la degeneración en la neurona, es anterógrada iniciándose en las dendritas posteriormente en el soma neuronal.

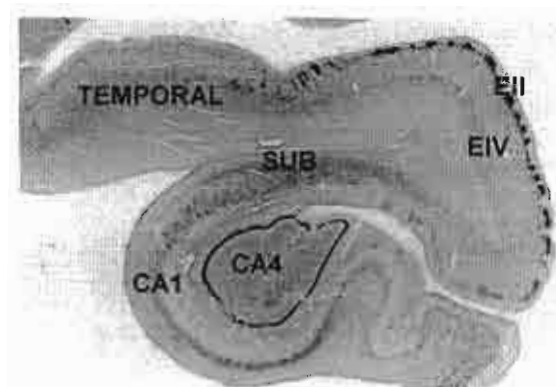


Fig 5. Fotomicrografía del hipocampo con la EA, en la cual se observa la acumulación de MNF en la capa entorrinal II, subículum y CA1 teñidas con un anticuerpo anti tau, revelado con peroxidasa. Se evidencio la alteración y daño de estas zonas en la EA.

Sea cual fuere su origen de la EA. La degeneración neuronal responsable del cuadro clínico demencial de la EA, se debe a la acumulación de filamentos insolubles de amiloide- β y de proteína tau.

5.0 LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LA EA

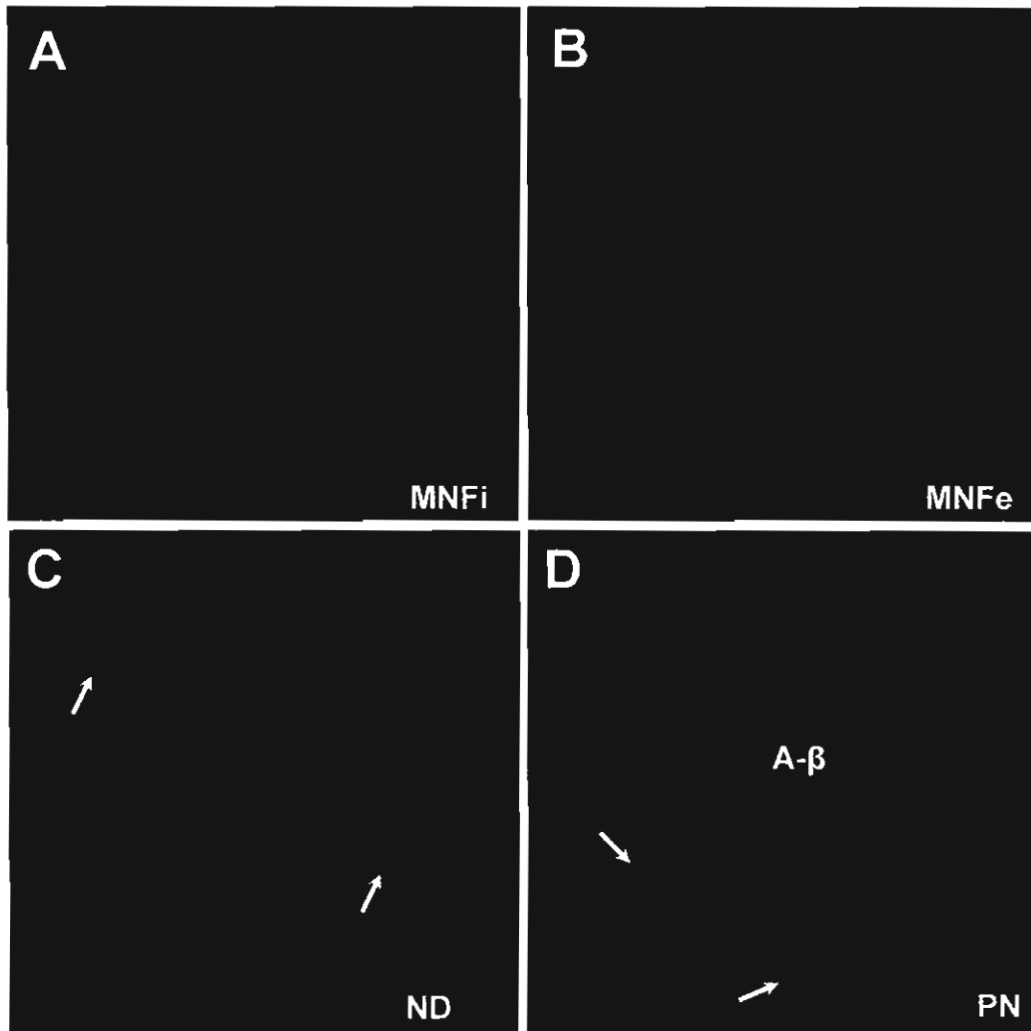


Fig 2. Lesiones características en el EA. A) Maraña Neurofibrilar intracelular (MNFi) reconocida con un ac contra tau fosforilada y el RT. B) Maraña Neurofibrilar extracelular (MNFe) teñida con el ac 423 y RT. C) Acumulación neurítica (ND), teñidas con un ac contra la proteína tau fosforilada y RT. D) Placa Neurítica (PN), teñida con el RT (rojo) y asociada a este depósito de amiloide- β se encuentran las Neurítas Distróficas (Flechas). Imágenes tomadas al microscopio confocal TCSC Leica.

5.1 PLACAS NEURÍTICAS.

Las PN que caracterizan a los cerebros con la EA, están formadas por depósitos extracelulares del péptido amiloide- β , a estos depósitos se asocian estructuras filiformes llamadas NDs de origen dendrítico y axonal (Fig 2D) así mismo, se asocian a estos depósitos de amiloide- β células gliales reactivas. En los cerebros con la EA la acumulación de las PN no tienen una distribución topográfica selectiva contrario, a la acumulación de las MNF que sigue un patrón típico con la evolución de la enfermedad (ver vía perforante en la EA), mientras que la cantidad de estos depósitos puede ser relativamente baja en regiones como el hipocampo, sin embargo, su acumulación es abundante en las cortezas motoras o sensitivas primarias (Arnold y col., 1991; Arraigada y col., 1992). En forma general, las PN no tienen una buena correlación con los síntomas clínicos, ni con el grado de pérdida neuronal (Arraigada y col., 1992, Gómez-Isla y col., 1997b).

5.2 PPA- β Y AMILOIDE- β

El péptido que forma las PNs, se origina de la proteína precursora del amiloide PPA con una expresión variable en los tejidos, cuya heterogeneidad procede tanto del procesamiento diferencial del ARN, como de las modificaciones postraduccionales. Existen tres isoformas de 695, 751, y 770 aa's. La isoforma que se expresa en forma abundante en las neuronas es la de 695 aa's. La PPA es una glicoproteína de membrana con un único dominio transmembranal, una porción intracitoplasmática y una porción larga extracelular. La PPA tiene una región de 23 aa's, la cual es hidrofóbica cerca de su porción C-terminal que le sirve para su anclaje a las membranas. El dominio extracelular está expuesto a la proteólisis parcial por la acción de tres secretasas (Fig 6). La proteólisis más

frecuente es realizada por la α -secretasa entre los aa's 16 y 17 de la región amiloide- β , liberándose una fracción soluble grande (PPA- α), quedándose anclada a la membrana un fragmento de 83 aa's. La liberación de este fragmento, le confiere a la PPA propiedades de crecimiento y adhesión celular e inhibición de las serina-proteasas.

Cuando el fragmento de 83 aa's es cortado por la γ -secretasa se genera un pequeño fragmento de amiloide- β de 3 kDa de forma alternativa a esta vía proteolítica no amiloidogénica, en la que la proteasa β -secretasa lleva acabo una proteólisis de la PPA- β liberando un fragmento de 99 aa's sobre el cual, la γ -secretasa genera el péptido de amiloide- β , siendo éste un péptido hidrofóbico de tamaño pequeño con dos especies, una de 40 y otra de 42 aa's (A β 40 y A β 42) respectivamente. En un principio se pensó, que este amilode- β se producía sólo en eventos patológicos, sin embargo, se demostró que la producción y secreción es un proceso fisiológico, y este amiloide- β se encuentra en el plasma y líquido cefalorraquídeo durante la vida normal de un individuo (Haass y col., 1992, Seubert y col., 1992, Shoji y col., 1992). En la EA se altera el metabolismo de la PPA con un aumento progresivo en la producción y depósito anormal del amiloide- β . Los depósitos iniciales corresponden al fragmento A β 42 (conforman la placa difusa no fibrilar). Posteriormente, conforme avanza la enfermedad, además de los depósitos A β 42, comienzan a depositarse el fragmento A β 40 presentándose las placas fibrilares a las que se asocian las NDs. En la mayoría de los cerebros con la EA, la cantidad de placas difusas es mucho mayor que las PNs, sugiriendo que estos depósitos difusos podrían preceder a las PNs. Así mismo, se observan estas

placas difusas en individuos de edad avanzada sin alteraciones cognitivas (Lemere y col., 1996). En general, se piensa que la acumulación anormal del amiloide- β podría depender de ciertas alteraciones en el proceso metabólico normal del procesamiento de la PPA- β . Estudios recientes han enfatizado un papel neurotóxico del amiloide- β en modelos *in vivo*, que han llevado a reconsiderar al péptido, como uno de los principales factores relacionados con la patogénesis molecular de la EA (Mattson, 1992, 1993; Shea, 1997).

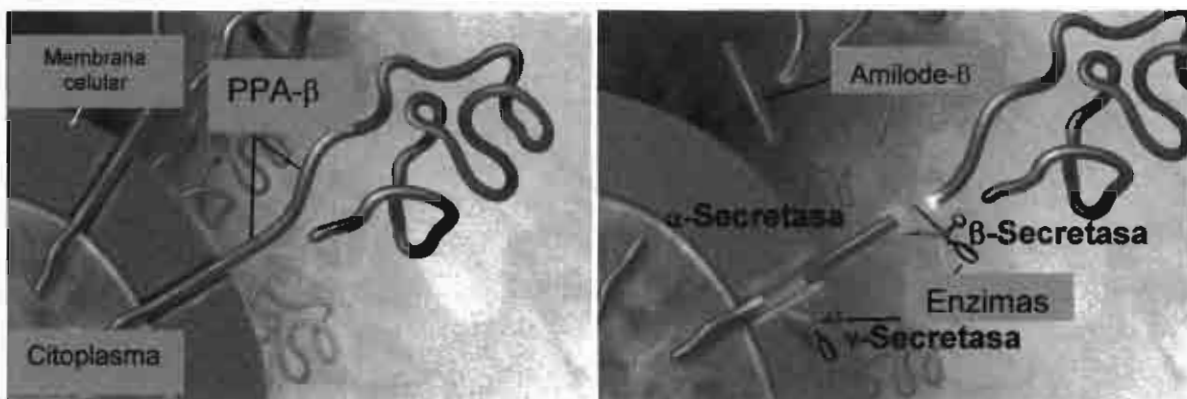


Fig 6 procesamiento patológico de la PPA.

5.3 MARAÑAS NEUROFIBRILARES.

A diferencia de lo encontrado con los depósitos de amiloide- β , se ha demostrado que la severidad de la demencia en la EA, correlaciona significativamente con la densidad de MNFs en la neocorteza y corteza entorrinal (Ball, 1988; Blessed, 1968; Van Hoesen, 1991). Las MNFs que se acumulan en las neuronas del cerebro de los casos de EA, pueden ser intracelulares (Fig 2. A) y extracelulares (Fig 2. B), dependiendo de su estado de degradación (Mena R y col., 1995).

La formación de las MNFs esta asociada con la muerte neuronal (Cras, 1995, Gómez-Isla, 1996, 1997) y se ha encontrado una fuerte correlación entre la degeneración neuronal y la transición entre las MNFi y MNFe (Bondareff, 1993). Las MNFi se caracterizan por tener una constitución compacta dentro de la célula, haciendo posible distinguir la membrana celular y el núcleo, aunque éste último puede ser desplazado de su posición original. Este tipo de MNF tiene una típica forma de flama (Fig 2. A). Las MNFe, son estructuras que presentan una forma más laxa y que carecen de núcleo (Fig 2. B). Estas MNFs, consideradas como el "esqueleto" o "fantasma" patológico de la neurona, son liberados al espacio extracelular, como consecuencia de la muerte celular donde permanecen como una huella.

6.0 FILAMENTOS HELICOIDALES APAREADOS Y LA PROTEÍNA TAU

Las MNFs, y las NDs, así como los HN, están formados por la acumulación de filamentos helicoidales apareados (FHAs) (Fig. 7A) (Kidd, 1963), los cuales, al microscopio electrónico tienen una apariencia de un doble filamento enrollado hacia la izquierda en su propio eje (Fig. 7A, B), con un diámetro aproximado de 8-20nm. La distancia de cada punto de entrecruzamiento de la banda, es de aproximadamente 80nm (Crowther, 1985; Wischik, 1985). Al analizar cortes transversales de los FHAs mediante imágenes computarizadas se pudo observar que éste estaba formado por dos subunidades estructurales unidas entre sí (Crowther y Wischik, 1985). Cada subunidad consiste de tres dominios en forma de una "C" (Fig. 7. BC). Las dos subunidades se asocian transversalmente a través de

su dominio central y el ensamble longitudinal de ambas subunidades con otras similares conforma el eje del FHA (Fig. 7. Bd,e). Cada subunidad tiene un peso molecular de aproximadamente 100 KD (Wischik, 1989; Wischik, 1988a). Los FHA también se caracterizan morfológicamente por poseer sitios de unión al colorante fluorescente RT, propiedad que ha sido usada para diferenciar entre los estados amorfo no fibrilar (pre-ensamble) y fibrilar (ensamble) de la proteína tau en la EA (Mena,1995; 1996). El constituyente principal del FHA es la proteína tau.

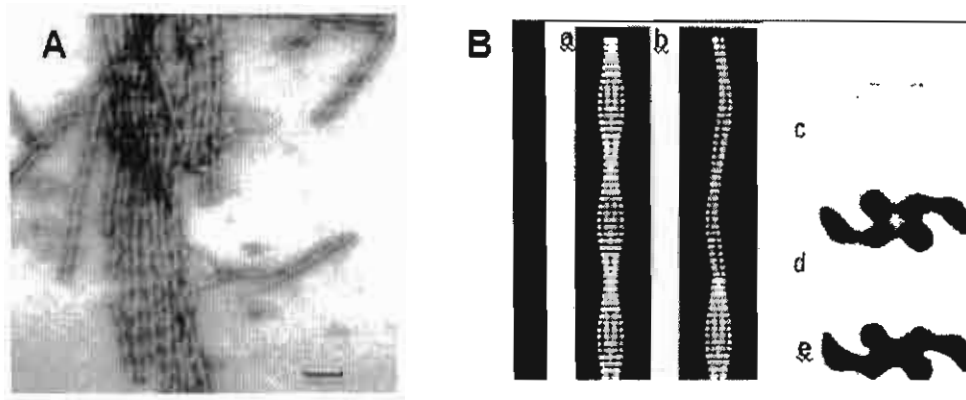


Fig.7 A) Microscopia electrónica de un purificado FHAs de un caso de EA, tienen una apariencia de un doble filamento enrollado hacia la izquierda en su propio eje B). Cortes transversales de los FHAs mediante imágenes computarizadas formado por dos subunidades estructurales unidas entre sí. (a-b). Diferentes proyecciones de doble polímero que se encuentran cortados transversalmente. (c-e) Cada subunidad consiste de tres dominios en forma de una "C" (c). El ensamble longitudinal de ambas subunidades con otras conforma el eje del FHA.

6.1 LA PROTEÍNA TAU EN CONDICIONES NORMALES.

Las neuronas son células que presentan una morfología muy compleja, las cuales, han desarrollado dos tipos de extensiones citoplasmáticas axones y dendritas. La transmisión neuronal ocurre a través de estos procesos, si llega a ocurrir algún cambio en la morfología de estas células, puede afectar el desarrollo y producir eventos patológicos. En la diferenciación neuronal está involucrada la

reorganización extensiva del citoesqueleto, el cual es responsable para el mantenimiento de la forma celular. El citoesqueleto está compuesto principalmente por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios; los microtúbulos son estructuras muy dinámicas, se ha sugerido que las proteínas que estabilizan al microtúbulo son las MAPs (proteínas asociadas al microtúbulo) MAP1A, MAP1B, MAP2 y tau (Fig 8).

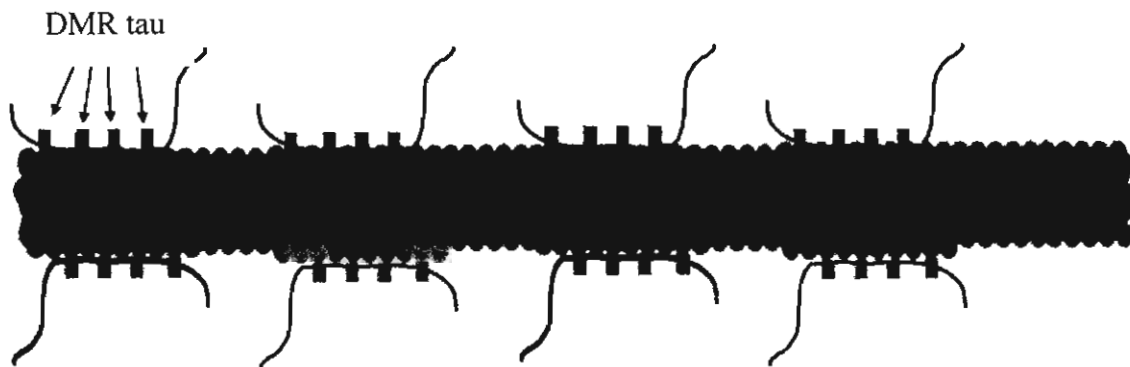


Fig 8. La proteína tau se asocia a los microtúbulos por sus dominios repetidos confiriéndole la estabilidad a los mismos DRM (dominios repetidos de tau)

6.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAU.

La proteína tau es el constituyente mayoritario de proteínas asociadas al microtúbulo en la neurona. El gen de la proteína tau, se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (en la posición 17q21) y contiene 16 exones (Neve y col., 1986). Tres de estos exones (exon 4 a, 6 y 8), se presenta únicamente en el RNA del tejido periférico y estos no se presentan en el RNAm del cerebro humano (Fig 9), los exones 1 y 14 se transcriben pero no se traducen (Goedert y col., 1989, Andreadis y col., 1992, Sawa y col., 1994), los exones 2, 3 y 10 tiene un procesamiento alternativo y el exon 3 nunca aparece en ausencia del exon 2 (Andreadis y col., 1992, 1995). El procesamiento alternativo de estos tres exones

(2, 3 y 10), produce seis isoformas de la proteína tau en el cerebro adulto (Goedert y col., 1989, Kosik y col., 1989). Las isoformas de tau difieren una de otra por la presencia o ausencia de uno o dos insertos (29 ó 58 aminoácidos), en la porción amino terminal y por la presencia de 3 o 4 dominios repetidos de la porción carboxilo terminal, y su longitud varía de 352 a 441 aa's (Fig 9).

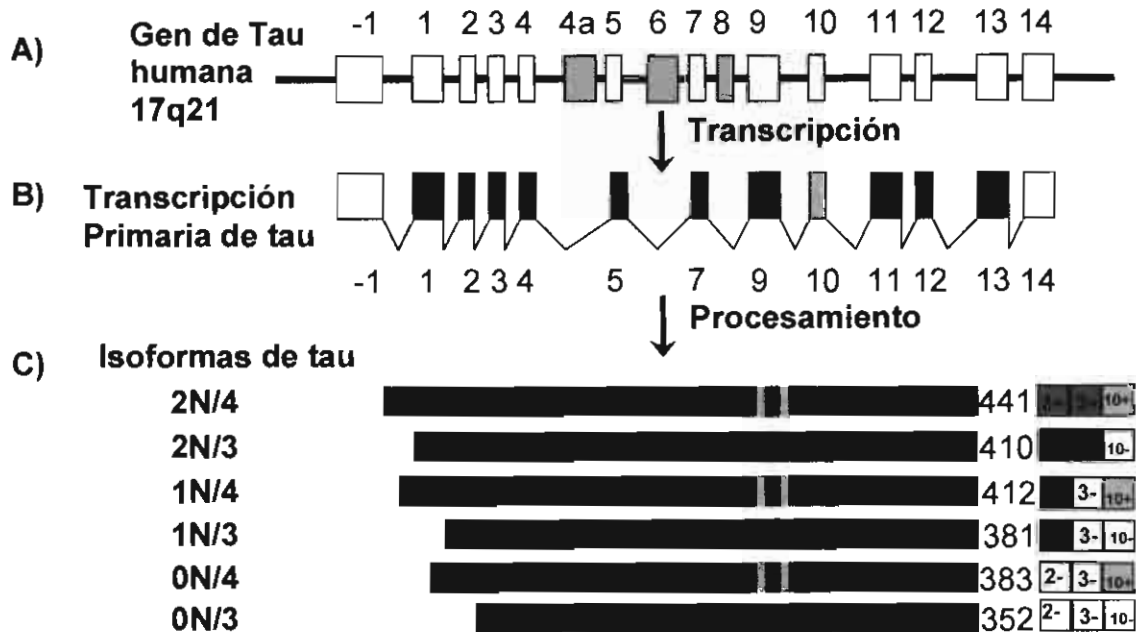


Fig 9. Gen, transcripción primaria e isoformas de tau del cerebro humano. **A)** El gen de tau humana tiene 16 exones, con un exon-1 que es parte de promotor. **B)** La transcripción primaria de tau, contiene 13 exones por que los exones 4 a, 6 y 8 no se transcriben en el cerebro humano, los exones 1, 4, 5, 7, 9, 12 y 13 son constitutivos, pero los exones 2, 3 y 10 generan el procesamiento alternativo. Este procesamiento alternativo, genera 6 diferentes RNAs mensajeros, **C)** los cuales son traducidos en 6 diferentes isoformas de tau. Estas isoformas difieren por la ausencia o presencia de 1 ó 2 insertos codificados por el exon 2 (cuadros naranjas) y 3 (cuadros verdes) de la porción amino terminal en combinación por la presencia de 3 ó 4 dominios repetidos (cuadros negros) de la porción carboxilo terminal.

6.3 MOLÉCULA DE TAU.

Las isoformas de la proteína tau del cerebro humano se caracteriza por presentar dos grandes regiones, la primera región incluye las 2 terceras partes de la molécula y es la porción amino terminal, por otro lado, se tiene la porción C-terminal en la que se incluyen los 3 ó 4 dominios repetidos de unión al

microtúbulo (Fig 10). A su vez, la porción N-terminal se subdivide en otras dos regiones, una ácida, implicada en la unión a cationes, y se ha propuesto como un posible sitio de unión a los metales (Pérez M y col., 1998), se ha propuesto que en esta misma región N- terminal tiene un sitio de unión a la heparina (Arrasate M. 1997), la región rica en prolina contiene una gran cantidad de aa's potencialmente susceptibles a la fosforilación; algunos de ellos seguidos por residuos de prolina y otros dentro de los sitios PPXXP o PXXP, secuencias relacionadas con las interacciones de tau y proteínas con dominios SH3. Esta región rica en prolina parece ser importante en la actividad de tau, para unir microtúbulos (Goode B.L. y col., 1997, Kanai Y. y col., 1992). La región de unión a microtúbulos contiene 3 ó 4 dominios repetidos con 31 o 32 aa's. Estos dominios, presentan una secuencia de 18 aa's altamente conservados y de una secuencia menos conservada de 13-14 aa's, la cual, es conocida como una región interna de dominios repetidos. Finalmente, en la región C-terminal se presenta también una zona rica en residuos de prolina con aa's que pueden ser fosforilados y una región ácida hacia la zona C-terminal (Fig 10).



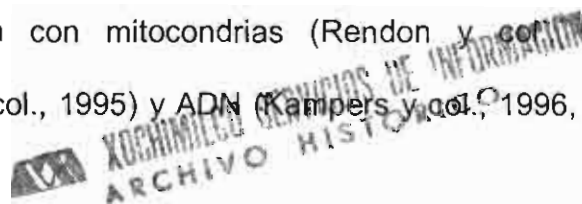
Fig 10. Representación esquemática de las regiones constitutivas de la molécula de tau larga (441aa's). La región dominante en la cual se incluye la porción ácida y la región rica en prolina, interactúa con elementos del citoesqueleto para determinar los espacios entre los microtúbulo en el axon. La porción N-terminal se ha involucrado también, en las vías de traducción por interactuar con las proteínas PLC- γ y Src-cinasa. La porción C-terminal se refiere a los dominios repetidos de asociación a los microtúbulos, estos regulan la polimerización de los

microtúbulos, y también se han involucrado funcionalmente con otras proteínas como son, la protein fosfatasa 2A o la presinilina-1.

La proteína tau es un componente estructural integral del FHA y posiblemente su subunidad misma (Kondo, 1988; Wischik, 1988a). El fragmento predominante de la proteína tau es el núcleo mínimo resiste a pronasa del FHAs que pesa 12-kDa y corresponde a la región de repetidos del extremo C-terminal que funciona como dominio de unión a los microtúbulos (Wischik, 1988b). La proteína tau es una proteína termoestable que forma parte del grupo de las denominadas MAPs (del inglés Microtubule Associated Protein), las cuales son capaces de asociarse a la tubulina.

6.4 FUNCIÓN BIOLÓGICA DE TAU.

La función biológica de la proteína tau, es la de estabilizar la estructura del microtúbulo mediante los dominios repetidos de la porción C-terminal (Lee y col., 1989). La porción N-terminal se proyecta sobre la superficie del microtúbulo, puede interactuar con otros elementos del citoesqueleto, como la actina (Correas y col., 1990) y la membrana plasmática (Hirokawa y col., 1988., Brandt y col., 1995). Sin embargo, recientes estudios han podido dilucidar otras funciones diferentes al ensamble de los microtúbulos. La proteína tau parece que interfiere con la afinidad de la cinesina y cinisina-like, que es motor para los microtúbulos inhibiendo el transporte axonal. La sobreexpresión de tau inhibe el tráfico de vesículas, mitocondrias y retículo endoplásmico (Ebneth y col., 1998). También se ha observado, que interactúa con mitocondrias (Rendon y col., 1990), membrana plasmática (Brandt y col., 1995) y ADN (Kampers y col., 1996, Hua y



col., 2002), estas observaciones sugieren que puede la proteína tau actuar como un mediador entre los microtúbulos y estos organelos. La proteína tau mediante la región rica en prolinas de la porción N-terminal interacciona con la fosfolipasa C- γ (Jaspert y col., 1995, Jenkins y Johnson 1998) que presenta un dominio SH3, por lo que podría unirse a la región PPXXP de la proteína tau (Jenkins y Johnson 1998), la proteína fyn (es una tirosina cinasa) también tiene un dominio SH3 (Lee G y col., 1998). Este dato sugiere que la proteína tau, podría participar en la vía de señalización de la transducción.

7.0 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEINA TAU EN LA EA.

En la EA no se han encontrado cambios en los niveles de RNAs, mensajeros de ninguna de las seis isoformas existentes de la proteína tau, lo que sugiere, que las formas anormales de la proteína se originan de modificaciones postraduccionales más que de síntesis de *novo* (Goedert, 1989b). Se han encontrado dos modificaciones postraduccionales en la proteína tau, como los principales mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la EA: la hiperfosforilación y la proteólisis endógena en la posición Glu³⁹¹ (Grundke-Iqbal, 1986; Novak, 1993, respectivamente).

7.1 HIPERFOSFORILACION DE TAU

Una de las modificaciones postraduccionales mas estudiadas de la proteína tau es la fosforilación (Kosik, 1993). La asociación de la proteína tau a los microtúbulos es regulada por ciclos de fosforilación y defosforilación. Se han caracterizado por lo menos 30 sitios anormales de hiperfosforilación, los cuales se encuentran principalmente fuera de los dominios repetidos, que se asocian a los microtúbulos

(Ueda, 1990; Hasegawa, 1992) con la excepción de Ser²⁶² (en R1), Ser²⁸⁵ (entre R1 y R2), Ser³⁰⁵ (entre R2 y R3), Ser³²⁴ (en R3), Ser³⁵² (en R4) y Ser³⁵⁶ (en R4) (Buée y Delacourte, 1999). La Proteína tau es una fosfoproteína que puede modificarse por muchas cinasas, como aquellas cinasas dirigidas a prolinas (PDPK), entre ellas GSK3 y cdk5 también conocidas como cinasas I y II (Ishiguro K y col., 1993) o como las cinasas no dirigidas a prolinas como por ejemplo la PKA (Jonson G. y col., 1992 a, b), MARK cinasa (Trinczek B. y col., 1995) o PKC (Correas L. y col., 1995). La fosforilación por PDPK tiene lugar principalmente en la región rica de prolinas y en la región C-terminal, mientras que la fosforilación por las no PDPK ocurre en la región de unión a los microtúbulos. La fosforilación por las cinasas GSK3, PKA o MARK disminuye la afinidad de tau por los microtúbulos (Trinczek B. y col., 1995, Eidenmuller J. y col., 2000, Muñoz-Montaña JR y col., 1999, Utton M y col., 1997), además, la fosforilación por PDPK puede favorecer la dimerización de tau (García de Ancos J. y col., 1993, Pauldel H. 1997), en general la fosforilación de la proteína tau en diferentes regiones, puede afectar no sólo su interacción con los microtúbulos, si no también su capacidad para agregarse o interaccionar con otras proteínas.

El grado de fosforilación de tau le confiere propiedades particulares, que han permitido la caracterización bioquímica e inmunocitoquímica, de las distintas especies de las proteínas tau tanto normal como patológica. Un factor importante relacionado como inductor de la hiperfosforilación de tau es el amiloide- β , cuyo efecto sobre la proteína tau, ha sido evidenciado por diversos investigadores al inducir su hiperfosforilación en diferentes modelos celulares y facilitar directa o

indirectamente, vía incremento de la concentración de calcio intracelular y la formación de estructuras similares a FHAs (Giaccone, 1996; Busciglio, 1995). A partir de homogenados de cerebros de sujetos con la EA se puede obtener una fracción insoluble de filamentos (en Sarkosil al 1%) que se denomina "FHAs dispersos". Cuando esta preparación se analizó por electroforesis en gel y se identificó por inmunoblots con sueros anti-tau fosforilada, se encontró un grupo de bandas de 60, 64 y 68 kD (Rubenstein, 1986; Greenberg y Davies, 1990) que se denominó fracción A68, compuesta de tau hiperfosforilada.

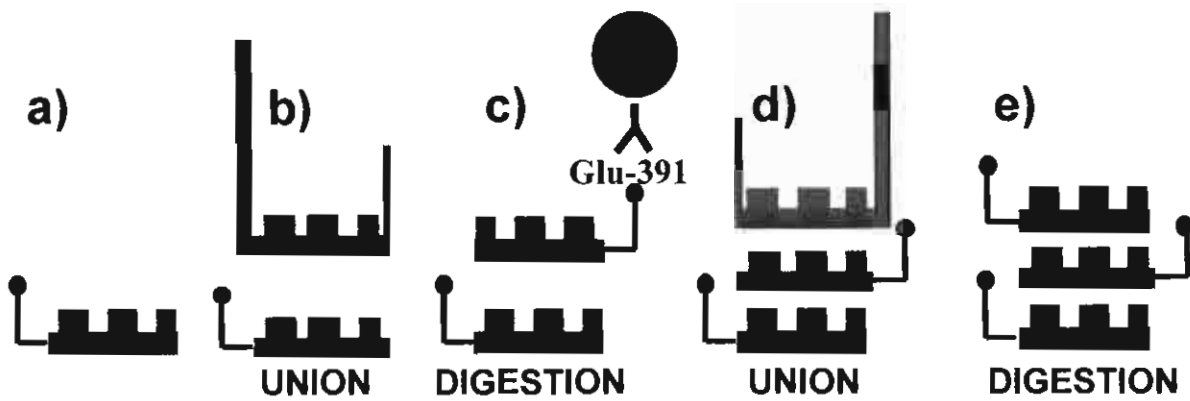
Las proteínas A68 se encontraron en el cerebro de sujetos con la EA, manifestando una gran cantidad de FHAs y otras estructuras anormales hiperfosforiladas (Binder, 1985). Esta población de proteínas se identificó por mucho tiempo como la fracción de tau asociada a FHAs (tau-FHAs), tau-hiperfosforilada o "A68-FHAs". Estas proteínas también se han encontrado en cerebros de sujetos adultos con síndrome de Down, quienes en gran proporción desarrollan la EA (Hanger, 1991; Goedert, 1992). Las proteínas A68 poseen un peso molecular aparente de 57-68 kD, en comparación con los 45-65 kD de la tau normal.

Debido a su presencia conspicua en la EA, en forma de diversas acumulaciones que van desde una forma granular citoplásmica hasta la de MNFi (Fig. 2A) (Braak, 1994; Bancher, 1989), la hiperfosforilación se ha considerado como el evento indispensable que genera todo el proceso patológico propio de la enfermedad.

7.2 TAU TRUNCADA

Se ha sugerido que la proteólisis de la proteína tau favorece la agregación de la molécula y como consecuencia el ensamble de los FHAs en la EA. Esta hipótesis se basó en el hallazgo, de que los FHAs están constituidos por un núcleo mínimo resistente a pronasa, el cual está rodeado por una cubierta exterior que es sensible a proteasas (Wischnik, 1988b). El núcleo mínimo del FHA tiene un peso molecular de 12 kDa, con una longitud de 93/95 aminoácidos que corresponde a la región de los dominios repetidos de la molécula. Estos FHAs muestran una proteólisis en el aa Glu-391 de su extremo carboxilo, que es reconocido específicamente por el acM 423 (Novak, 1993).

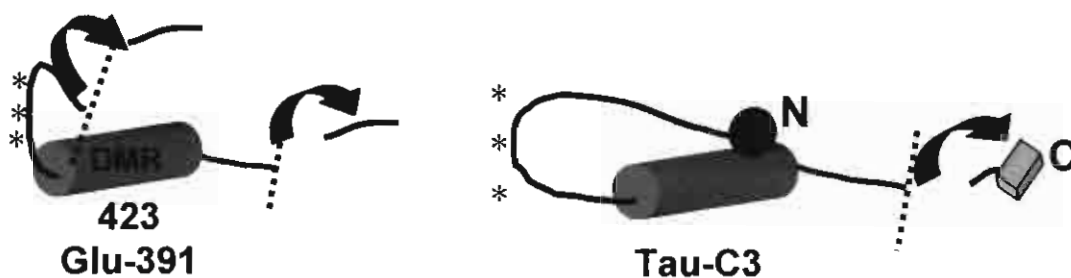
La hipótesis de que la proteína tau truncada patológicamente propone que la polimerización de los FHAs es debida a una alteración postraduccional de la proteína por la que se genera una especie truncada (Glu³⁹¹), con una elevada capacidad de auto asociar moléculas intactas de tau. Al formarse este complejo, la tau normal completa capturada es inducida (por un mecanismo desconocido), a truncarse en la misma posición que la subunidad iniciadora y manifestar una mayor afinidad por más tau completa (Esquema 1). Este proceso de secuestro-ruptura-secuestro, se propaga exponencialmente hasta "agotar" la poza soluble de tau y la célula se llena de FHAs. Este mecanismo de auto captura y alteración de proteínas normales ha sido comparado con el proceso de propagación de la proteína prion (Novak, 1994; Wischnik, 1997). Esta propuesta llevaría a reubicar a la EA, en la categoría de enfermedades producidas por cambios conformacionales de las moléculas, entre las que se incluyen las enfermedades producidas por priones (Prusiner, 1982).



Esquema 1. Modelo de agregación catalítica de la proteína tau truncada. En el origen de la formación del FHA, a) Aparece en un inicio una molécula de tau truncada (Glu-391), b) la cual tiene capacidad de asociar moléculas de tau completa, c) y ésta facilita la proteólisis en la misma posición formando un dímero d) que puede volver a asociar tau completa y e) continuar el efecto catalítico, hasta formar el núcleo mínimo del filamento (tomado de Wischik y col., 1995).

En estudios hechos con dobles marcas y el uso del microscopio confocal, se ha evidenciado que la inmunorreactividad del ac 423 (tau truncada en el Glu-391), tiene una forma amorfa y granular citoplásmica, la cual se ha asociado a los eventos iniciales en la degeneración neurofibrilar. Esta acumulación está caracterizada también, por una oclusión del epítipo del ac 7.51 (marcador genérico de las isoformas de tau), que es reversible por ácidos (Mena, 1991, 1995, 1996). Con el uso del RT que tiene alta afinidad por proteínas con la conformación β -plegada, ha sido posible diferenciar entre el estado amorfo y fibrilar tanto de tau como de amiloide- β , facilitando el monitoreo del estado de agregación de estas acumulaciones (Mena, 1995, 1996). Con la muerte de la célula, los FHAs sufren un proceso gradual de degradación en el espacio extracelular, que se asocia con la pérdida de su cubierta exterior (Bondareff, 1990) y pérdida de los sitios de unión al RT y preservación del núcleo mínimo que corresponde a la tau truncada (Esquema 1, Mena, 1995). Debido a este procesamiento, las MNFe son detectadas únicamente por el ac 423. En estudios recientes de correlación clínico patológica se

observo una mayor densidad de MNFe y en menor grado las MNFi, ambas inmunorreactivas al ac. 423, las cuales correlacionan significativamente tanto con los estadios de Braak, como con el grado de demencia en la EA (García-Sierra, 2001). Recientemente se ha detectado otra truncación realizada por la caspasa-3 en el aa Asp421, este evento es evidenciado por el ac Tau-C3 (Esquema 2), en estudios inmunohistoquímicos en tejido cerebral con la EA, esta truncación ocurre posterior a la formación del epítipo del ac Alz-50 y previo al evidenciado por el ac. Tau-66 y de la truncación (ac. 423). Sugiriendo que esta truncación (Asp 421), es un evento temprano en el procesamiento de la molécula de tau (Guillozet-Bongaarts A y col., 2004).

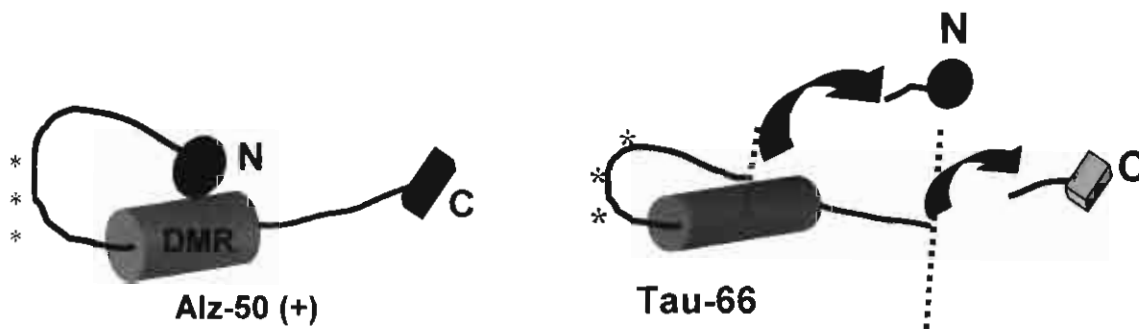


Esquema 2. Molécula tau truncada en el Glu 391 reconocida por el ac 423 este evento se ha sugerido que ocurre en las etapas finales de la neurodegeneración fibrilar. Tau-C3 evidenció una truncación temprana en el aa Asp 421, en donde la porción N-terminal se mantiene intacta. (ver García-Sierra F y col., 2003, Guillozet-Bongaarts A y col., 2004). DMR- dominios repetidos de tau, N- porción aminoterminal. C- porción carboxilo terminal.

7.3 CAMBIO CONFORMACIONAL

Recientemente se ha descrito otro procesamiento postraduccional en el que se involucra un **cambio conformacional estructural** de la proteína tau. Este cambio conformacional, involucra epítipes discontinuos que se encuentran alejados unos de otros. Carmel y col., en 1996, describieron el primer ac que evidenció este cambio conformacional (Alz-50), en el cual se encuentra involucrando el

plegamiento de la porción N-terminal, acercando los aa's 7-9 al tercer dominio repetido (aa's 312-342. Esquema 3) (Jicha G. A y col., 1999). Otro ac que reconoce este plegamiento de la molécula con el epítopo semejante al Alz-50, es el ac. MC-1. Estos ac's (Alz-50 y MC-1) se han asociado a las etapas iniciales del procesamiento de la molécula de tau en la EA (Jicha G. A y col., 1997, García-Sierra F. y col., 2003, Guillozet-Bongaarts A. y col., 2004). Ghoshal y col., 2001, desarrollaron y caracterizaron un nuevo ac que reconoce también un cambio conformacional estructural en el que su epítopo depende de las porciones N- y C-terminal intactas a partir de los aa's 155-244, el plegamiento y acercamiento de estos a los aa's 305-314 del tercer dominio repetido (Esquema 3)



Esquema 3. Cambios conformacionales estructurales de la molécula tau. El cambio conformacional evidenciado por el ac Alz-50 depende de sus porciones amino y carboxilo intactos, este procesamiento se ubica en los estadios iniciales de la neurodegeneración fibrilar, mientras que el ac tau-66 requiere a partir del aa 155 intacto, este cambio conformacional estructural se ubica en el procesamiento de la proteína tau como un evento intermedio ya que colocaliza con tau-C3 pero no con Alz-50. (DMR- dominios repetidos de tau, N- porción aminoterminal. C- porción carboxilo terminal).

Sin embargo, dentro de estos cambios conformacionales se desarrollaron otros ac's que reconocen un **cambio conformacional regional**, dependiente de fosforilación como son los ac's TG-3 (epítopo fosforilado en Thr-231) y AT100 (Ser-199, Ser-202, Thr-205, Thr-214 y Ser-216), estos cambios conformacionales

se han asociado a las primeras alteraciones que sufre la molécula de la proteína tau en la EA (Vincent I. y col., 1998, Zheng-Fischhöfer Q y col., 1998).

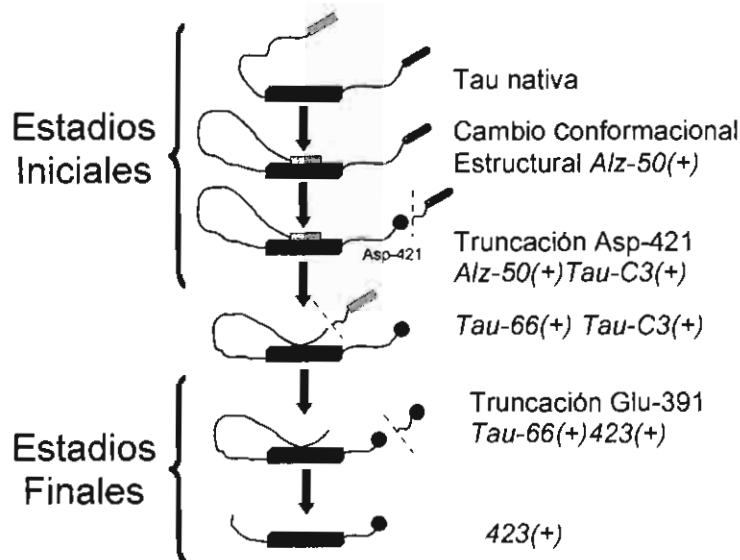
Sin embargo se ha determinado que la fosforilación es un evento crítico en la agregación de tau en los FHAs. Por otro lado, se han desarrollado y caracterizado perfectamente una gran cantidad de ac's contra epítopes fosforilados en la proteína tau, los cuales tiñen neuronas con patología neurofibrilar en la EA, aunque muchos de estos epítopes también se han observado en biopsias de tejido cerebral de pacientes no dementes (Matzuo y col., 1994, Hasegawa y col., 1996, Khatoon S y col., 1994). Con el desarrollo de nuevos ac's que reconocen un cambio conformacional regional dependiente de fosforilación, parecen ser más específicos y pueden discernir la proteína tau normal de la tau patológica de los FHAs en la EA. Dentro de estos ac's que reconocen el cambio conformacional regional se encuentra el ac TG-3 el cual se desarrollo de homogenizados del cerebro con la EA, los cuales se pasaron por una columna de afinidad con el ac Alz-50. Este ac tipificado como TG-3 no presenta inmunorreactividad en tejido cerebral normal. En cerebros con la EA, tiene una elevada afinidad por las estructuras patológicas características de la EA (Vincent I y col., 1996). En la caracterización del epítope de este anticuerpo por recombinates de tau, determinaron que el epítope del ac TG-3 se encuentra en la Thr231 y éste es dependiente de fosforilación, mientras que sí el aa Ser235 se encuentra fosforilado, la inmunorreactividad del ac TG-3 se abate, a menos que esta región de la molécula se encuentre en una conformación adecuada, lo cual sugiere, que esta conformación de tau es exclusiva de la EA (Jicha G. y col., 1997). Matsuo y col., (1994), demostraron que ambos epítopes se encuentran fosforilados en

biopsias de cerebros normales, esto sugiere, que esta fosforilación no es específica para la EA, pero sí el cambio conformacional evidenciado por el anticuerpo TG-3 (Jicha G. y col., 1997).

8.0 PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA TAU EN LA EA

Un estudio realizado por García-Sierra y col., 2003 utilizaron una batería de ac's que reconocen diferentes regiones de la molécula de tau (de la porción N- y C-terminal) así como con el ac 423 (evidenció la truncación en el aa Glu-391), los cuales se combinaron con los ac's dependientes del cambio conformacional estructural (Alz-50 y Tau-66), así pudo sugerir una secuencia de eventos que sufre la proteína tau en la evolución de la formación de la MNF. En este estudio ellos sugieren que la molécula de tau al encontrarse disociada de la tubulina, adquiere un plegamiento en su porción amino terminal (Alz-50), manteniendo intactas sus porciones amino y carboxilo terminal, posteriormente en este proceso de maduración, la proteína tau sufre la pérdida de la porción carboxilo terminal hasta los aa's 396 y 404 (epítoto del anticuerpo AD2), sin embargo recientes estudios realizados por el grupo de Binder L., desarrollaron un nuevo ac (Tau-C3) que reconoce una truncación en el aa's 421, esta truncación es realizada por la acción de la caspasa-3 (Gamblin T.C. y col., 2003), este anticuerpo colocaliza con el anticuerpo Alz-50 en el procesamiento de la proteína tau (Guillozet-Bongaarts A. 2004). Se observa posteriormente la inmunorreactividad del ac Tau-66 que no colocaliza con el ac Alz-50, lo cual sugiere que se ha perdido la porción amino terminal, razón por la cual no se observa colocalización entre ambos ac's. El evento posterior y final en la evolución y formación de la MNF, es la truncación en el Glu-391 (ac 423), la cual ya no colocaliza con el ac Alz-50, pero sí colocaliza

con el ac Tau-66. En otras estructuras se observó inmunorreactividad del ac 423 siendo éste el último procesamiento de tau en la evolución de MNF (Fig 4). Estudios realizados por Skrabana y col., 2004, ha sugerido que el ac 423 el cual termina en el Glu-391 evidenciando además de la truncación, un cambio conformacional de la proteína tau. Utilizando análogos recombinantes del núcleo mínimo del FHA correspondientes a los residuos del 297-391, ellos determinaron, que el epítipo del anticuerpo 423 corresponde a un pentapéptido ³⁸⁷DHGAE³⁹¹ de la porción carboxilo terminal, siendo únicamente una de las porciones de la estructura que realmente reconoce este anticuerpo. Sin embargo, cuando realizaron mutantes truncadas del núcleo mínimo del FHA pudieron determinar dos regiones estrechamente asociadas que son aa's 306-311 y del aa's 321-325, las cuales contribuyen a la formación de la estructura reconocida por el ac 423, esta proximidad espacial de estas tres subunidades (ac's 306-311, 321-325 y 387-391), requieren del empaquetamiento de un plegamiento intramolecular del núcleo mínimo del filamento confiriéndole al núcleo mínimo del filamento la estructura β -plegada, lo cual concuerda con estudios realizados en nuestro laboratorio, al colocalizar este anticuerpo con el colorante RT en MNFs en casos con la EA (Mena R y col., 1996).



Esquema 4. Esquema simplificado del procesamiento de la molécula de tau propuesto por García-Sierra y col., 2003, y Guillozet-Bongaarts y col., 2004. En los estadios iniciales la proteína tau nativa sufre un cambio conformacional estructural, posteriormente la molécula de tau sufre una truncación en la porción carboxilo-terminal por acción de la caspasa-3 dando lugar a un nuevo cambio estructural reconocido por el anticuerpo tau-66 el cual no depende de sus porciones amino y carboxilo terminal intactos. Posteriormente, la molécula de tau sufre una nueva truncación en el Glu 391 evidenciado por el anticuerpo 423, éste colocaliza con al tau-66 el procesamiento de la molécula de la proteína tau que culmina con la acumulación del núcleo mínimo del filamento reconocido únicamente por el anticuerpo 423.

9.0 REQUERIMIENTOS PARA EL CAMBIO CONFORMACIONAL.

Los requerimientos para un cambio conformacional son muy variados y específicos. Por ejemplo, para el cambio conformacional regional evidenciado por el anticuerpo AT100 (Zheng-Fischhöfer y col., 1998), es muy complejo ya que requiere de más de una cinasa y de un plegamiento conformacional. Zheng-Fischhöfer y col., mostraron que el epítipo del ac AT100, se puede generar por dos cinasas GSK-3 β y PKA de una manera secuencial afectando los residuos Thr212 y Ser214, esto también depende de una fosforilación previa de Ser o Thr de la región de las prolinas alrededor del residuo 200 (incluyendo el epítipo del AT8: Ser199, Ser 202 y Thr205). Y por último se requiere de la presencia de

polianiones como la heparina, RNA y poly (Glu). Kampers T y col., (1996) *in vitro*, evidenciaron que el RNA induce e incrementa la formación de filamentos y esto posiblemente se deba a que el RNA incrementa la formación de puentes disulfuros en donde esta involucrada la Cys 322 del tercer dominio repetido. Para el cambio conformacional estructural evidenciado por el ac Alz-50, se ha descrito que requiere de sus porciones N- y C- terminal intactas. Otros ac's se han descrito como el ac tau-66, que reconoce un evento intermedio en el procesamiento de tau y este se caracteriza por no depender de sus porciones N- o C-terminal intactas si no por el contrario este anticuerpo únicamente requiere a partir de los aa's 155-244 el cual se pliega presentando una asociación en los aa's 305-314 del tercer dominio repetido (Esquema 3 y 4).

10.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los datos acumulados en los últimos años, apoyan que la densidad de las MNF presentes en los cerebros de los afectados, correlaciona con el grado de la demencia en la EA y, entonces, puede estar asociada a su fisiopatología. La formación de las MNF, refleja un complejo y poco entendido sistema de procesos directa e indirectamente asociados con el mecanismo que produce la amiloidosis de la proteína tau con el consiguiente ensamble de los FHAs. Debido a que la EA afecta exclusivamente a los seres humanos, se ha dificultado de manera muy importante el estudio de los pasos involucrados en la cascada de eventos moleculares que llevan a la degeneración neurofibrilar. Con esta consideración, los logros que en el campo se han debido al estudio sistemático de cerebros afectados de la enfermedad mediante técnicas sofisticadas de microscopía y del

aislamiento de diferentes fracciones de preparaciones frescas obtenidas de tejido almacenado en un banco de cerebros. A este respecto, el tejido almacenado en el banco de cerebros humanos, nos permite contar con un grado óptimo de preservación, lo que nos permite analizar los eventos más iniciales del procesamiento patológico de la proteína tau, que parecen estar representados por cambios conformacionales regionales y estructurales, previos al ensamble mismo de los FHAs.

11.0 JUSTIFICACIÓN

El contar con un modelo, que explique la secuencia de eventos moleculares iniciales en una neurona hacia la formación de la maraña intracelular y su subsecuente muerte y formación de la maraña extracelular, podrá permitir el diseño de estrategias de intervención farmacológica, para el tratamiento de los pacientes afectados de este devastador mal.

12.0 HIPÓTESIS.

Los cambios conformacionales regionales presentes en la proteína tau asociados a fosforilaciones anormales preceden a las modificaciones estructurales en la EA.

13.0 OBJETIVO GENERAL

Analizar comparativamente los patrones de inmunorreactividad de anticuerpos que identifican cambios conformacionales regionales y estructurales en la proteína tau

13.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar por doble tinciones con el anticuerpo TG-3 y el colorante rojo tiazina el estado fibrilar y no fibrilar de la proteína tau.

2. Comparar la presencia de los antígenos detectados por los anticuerpos Alz-50 y TG-3 en neuronas en estados iniciales de degeneración fibrilar y en MNFs
3. Determinar por microscopia electrónica la ubicación subcelular de los antígenos identificados por ambos anticuerpos
4. Mediante triples inmunotinciones evaluar el procesamiento patológico de la proteína tau modificada regional y estructuralmente

14.0 MATERIAL Y METODOS

Para este proyecto se analizaron 6 casos de pacientes que padecieron la EA provenientes del banco de cerebros del CINVESTAV (edades de 47-90 años de edad, promedio: ver Tabla), con un tiempo post-mortem de 2-6 hrs. El diagnóstico de la EA se hizo usando el criterio del NIA-NINCDS (McKhann G y col., 1984). La Dra. Laura Chávez, neuropatóloga del Hospital General de México, fue la responsable del estudio post-mortem y diagnóstico definitivo. Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 y mantenidos a 4°C por 7 días. Posteriormente, se obtuvieron fragmentos de hipocampo y corteza entorrinal los cuales se pusieron en contacto con sacarosa al 10% en PBS por 24 hrs. Se realizaron cortes de 50 μm y se colectaron en PBS. Estos tejidos se procesaron con la técnica de flotación para las dobles y triples inmunotinciones, con ac's que van dirigidos contra diferentes regiones de la molécula de tau (ver tabla de ac's) y se analizaron en el microscopio confocal (TCS-SP2, Leica, Heidelberg. Alemania).

Tabla 1. Tejido cerebral utilizado en este estudio.

CASOS EN CUSTODIA DEL BANCO DE CEREBROS DEL IPN

#	CLAVE	S/EDAD	Dx clinico	Dx neuropatológico
1	A96-178	F/70	EA	Enf. Alzh.
2	A96-677	F/76	EA	Atrofia Sist. Neuronal Múltiple
3	A98-023	M/47	EA	Enf. Alzh.
4	A98-089	M/49	Demencia	Enf. Alzh.
5	A98-098	F/80	EA	Enf. Alzh.
6	A98-787	M/80	Demencia	Enf. Alzh.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en este estudio.

ANTICUERPOS 1ºs	EPÍTOPE	LESIÓN
acM 423, IgG	TAU truncada. Glu-391.	MNFintracelular MNFextrecelular Neurítas, Hilillos
acM TG-3, IgM	TAU hiperfosforilada Conformacional regional. Ser-231, Thr-235	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
acM AT100, IgG	TAU hiperfosforilada Conformacional regional Ser212, Thr 214	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
acM Alz-50, IgM	TAU, amino (2-10 aAc), carboxilo terminal Conformacional estructural	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
acM T46, IgG	TAU del 404-441 aAc de la porción C-terminal	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
acP M-19, IgG	TAU primeros 19 aAc de la porción N-terminal	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
acM AT8, IgG	TAU hiperfosforilada Ser199, Ser202, Thr205	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
acM AD2	TAU hiperfosforilada aAc 396, 404	MNFintracelular, MNF transicional Neurítas, Hilillos
acP S-199, IgM	TAU, hiperfosforilada Ser- 199	MNFintracelular Neurítas, Hilillos
ANTICUERPOS 2ºs	CADENA	ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y DE

		EMISIÓN (nm)
Anti-ratón IgG-CY5	γ -específico (azul)	550-670
Anti-ratón IgM-FITC	μ (verde)	494-520
Anti-conejo IgG-FITC	H+L (verde)	494-520

AcM= Anticuerpo monoclonal (ratón)

AcP= Anticuerpo policlonal (conejo)

REACTIVOS.

COLORANTE ROJO TIAZINA (RT). Colorante fluorescente rojo (554-576 nm). Tienen afinidad por las estructuras proteicas con la conformación β -plegada (amiloide- β fibrilar y Tau cuando se encuentra ensamblada en un filamento). (Mena R. y col., 1995, 1996, Uchihara T y col., 2000)

Doble inmunotinción con el ac TG-3 y rojo tiazina.

Previo a la inmunotinción, el tejido se bloqueó en solución de albúmina al 0.2% libre de IgG (Sigma Chemical Co) en PBS por 20 min a temperatura ambiente. Al término de este bloqueo, el tejido se puso en contacto con el anticuerpo TG-3 (a una dilución de 1:40) en PBS tritón X-100 (PBS-t, 0.2%. Sigma chemical Co.), toda la noche a 4°C. El ac TG-3 se reveló con un ac secundario Goat-anti mouse IgM, acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Jackson ImmunoRes Lab inc West Grove P.A.) en PBS-t. Los tejidos se contratiñeron con RT (0.001% en agua). Mediante el uso del RT, se pudo determinar entre los agregados fibrilares y no fibrilares de la proteína tau en el microscopio confocal.

Doble inmunotinción con los ac's TG-3 y Alz-50.

Para evitar la reacción cruzada entre los ac's TG-3 y Alz-50 (debido a que ambos ac son IgM) la inmunotinción se hizo en dos pasos. Esta técnica fue descrita previamente (García-Sierra F y col., 2003). En el primer paso se incubó el tejido con el ac Alz-50 (1:1000) por toda la noche a 4°C seguido por su correspondiente

ac secundario acoplado a TxR (rojo texas) (1:100) (Jackson ImmunoRes Lab Inc. West Grove P.A.), el cual se incubó a una concentración saturada por 2 hrs. en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a bloquear sitios que pudiesen encontrarse libres que haya dejado el ac secundario TxR, con un ac secundario IgM acoplado a peroxidasa (no fluorescente 1:100) por tres horas. Posteriormente, se incubó con el ac TG-3 a temperatura ambiente en oscuridad por 2 horas y se reveló con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a FITC (1:100) por 1 hr.

Triple inmunotinción con TG-3 y marcadores de la porción N- y C-terminal.

La triple tinción con los ac's TG-3 (dilución 1:40), T-46 (ZYMED, California) (Dilución 1:100) y M19G (1:100) (ver tabla). Las muestras fueron incubadas en una mezcla de ac's primarios durante toda la noche a 4°C, después se lavaron con PBS-t, posteriormente se incubaron con la mezcla de ac's secundarios (ac secundario anti IgM fracción μ específico, Jackson ImmunoRes Lab Inc. West Grove P.A.) para el TG-3; ac secundario anti IgG γ -específico acoplado TxR, para T-46, y un ac secundario policlonal anti IgG para el M19G en PBS-t por 2hrs.

La triple inmunofluorescencia de TG-3, M19G y AD2. TG-3 o S199, colorante RT y 423 fue semejante a la descrita previamente los cuales se revelaron con los ac's. secundarios acoplados a FITC (ratón IgM μ o conejo IgG), TxR (conejo IgG o ratón IgG γ) y CY5 (ratón IgG γ) (Jackson ImmunoRes Lab inc West Grove P.A.)

Doble inmunotinción con los anticuerpos de los cambios conformacionales regionales (TG-3 y AT100) o con epítoto fosforilado (AT8).

Para doble inmunotinción se realizó un coctel de ac´s primarios en la siguiente combinación: 1- TG3 (1:40) con AT100 (1:100) ó AT8 (1:100), 2- AT100 con Alz-50 (1:1000) los cuales se pusieron en contacto con el tejido toda la noche a 4°C y se revelaron con una mezcla de ac´s secundarios específicos acoplados con FITC, para los ac´s TG-3, AT-8 o Alz-50 y TxR para el AT100.

Microscopia confocal

Las dobles y triples inmunotinciones, fueron montadas en vectashield (anti apagamiento de fluorescencia) (Vector Labs Burlingane C.A) y se observaron al microscopio confocal (TCS-SP2, Leica, Heidelberg. Alemania), se analizaron con un objetivo plan Apocromático 100X de inmersión en aceite (AN 1.4), se obtuvieron de 10-15 cortes ópticos, con una distancia entre ellos de 0.8-1.0 µm. Para evitar la contaminación de un canal a otro, las dobles y triples inmunotinciones se capturaron de una manera secuencial, a través de la muestra en el eje de las z. La colecta de imágenes se proyectó y se analizó en un plano bidimensional (proyección), usando pseudocolores verde (Fluoresceína), rojo (Rojo Texas) y azul (CY5). Los fluorocromos en las múltiples tinciones se excitaron a 488nm (para FITC), 560nm (TxR) y 650 (CY5). Las imágenes se almacenaron en discos compactos.

Los colores de colocalización son los siguientes:

Verde con azul= Turquesa

Verde con rojo= Amarillo

Azul con rojo= Fiusha

Verde, azul y rojo= Blanco

Inmunoelectromicroscopia.

Las bloques de los hipocampos de cerebros con la EA se post-fijaron en una mezcla de paraformaldehído (4%) / glutaraldehído (0.2%) en PBS pH 7.3 a 4°C por 2.5 hrs. Posteriormente, se transfirieron en solución de tetraóxido de osmio al 1% por 1 hr en oscuridad. El tejido se incluyó en resina Lowicryl y se polimerizó bajo luz UV por 72 hrs. Los cortes ultra finos, se colectaron en rejillas de níquel y se procesaron para la inmunotinción de oro. Se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina libre de IgG (0.2% en PBS) por 20 min. Las muestras se pusieron en contacto con los ac's TG-3 y Alz-50, a una dilución de (1:20) en PBS por 45 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se pusieron en contacto con el ac secundario acoplado a partículas de oro, de aproximadamente 20 nm de diámetro (Amersham U.K), a una dilución de 1:100. Como control específico del ac, se utilizó como ac primario CB-Hep1, el cual se procesó de una manera similar. Los cortes inmunomarcados con oro se contratiñeron con sales de uranilo y se observaron al microscopio electrónico (JEOL JEEM 2000EX).

15.0 RESULTADOS

Bajo el esquema de evolución de formación de la MNF, con el uso de dobles y triples tinciones se caracterizó el patrón de inmunorreactividad del anticuerpo TG-3, el cual reconoce un cambio conformacional regional dependiente de un epítipo fosforilado localizado en el ac Thr-231 (Jicha G.A. y col., 1997b). De la misma manera se ha comparado, con el ac AT100 (reconoce otro cambio conformacional regional dependiente de fosfatos, aa's 202, 205 y 212, 214) y ambos con el ac Alz-50 (cambio conformacional estructural), combinándolos con ac's que reconocen la porción N- (M19G) y C- terminal (T-46) de la molécula de tau.

PATRÓN DE INMUNORREACTIVIDAD DEL AC. TG-3 EN CEREBROS CON LA EA.

El patrón de inmunodetección del ac TG-3 en casos con la EA previamente fue reportado (Vincent I. y col., 1998, Augustinack J.C. y col., 2002), de acuerdo con estos reportes, el ac TG-3 tiñe MNFs, PNs y NDs, así como también evidenció una tinción granular citoplásmica asociado con los estadios iniciales de una pre-maraña. El análisis de las muestras de casos con la EA bajo la microscopia confocal. En la Figura 11 A-E se ilustra el patrón de inmunorreactividad del ac. TG-3, así mismo se monitoreó el grado de ensamble de la proteína tau con el RT. En el proceso de maduración de la MNF, se sugiere una secuencia de eventos que inicia con una acumulación de apariencia granular difusa (Fig 11. A), en donde la acumulación de la proteína tau se incrementa y forma la MNFi (Fig 11. B, C, D) y culmina con la exposición de la maraña al espacio extracelular (MNFe, Fig 11. E). El primer estadio de agregación de la proteína tau, se observó como una

acumulación granular citoplásmica (Fig 11. A, flecha) y perinuclear (Fig 11 A, cabeza de flecha), este tipo de agregación de la proteína tau no colocaliza con RT (Fig 11 A, cabeza de flecha y flecha, canal rojo, Merge). Lo cual sugiere que esta primera agregación de la proteína tau conformacionalmente alterada, se encuentra en una forma no fibrilar. En este tipo de neuronas en las que se observó la acumulación granular, fue común observar su árbol dendrítico inmunorreactivo al anticuerpo TG-3 (Fig 11. A. flechas chicas, canal verde) y este colocalizó con el RT (Fig 11. A, flechas chicas, canal rojo y Merge), siendo esta zona la primera con indicios de acumulación de la proteína tau conformacionalmente alterada y ensamblada en filamentos. En la vecindad de esta célula se observan ND en color amarillo, en su mayoría colocalizan ambos marcadores (Fig 11 A, Merge). En la figura 11. B se observa la inmunorreactividad del ac TG-3 en las "primeras acumulaciones de MNFs", en esta neurona se observa la acumulación de estructuras en forma de frijol en el citoplasma (Fig 11. B, flechas chicas), las cuales fueron detectadas por el RT (Fig. 11. B, flechas chicas, canal rojo). La inmunorreactividad del ac TG-3, sigue el grado de maduración de la MNF evidenciado por el RT. Así, en este proceso de maduración se han diferenciado 3 estadios de degeneración de la MNFi (Fig 11 B, C E, flechas), las cuales sugieren ser estructuras de transición en la formación de la MNFe. En la Fig 11. C (flechas) la inmunorreactividad del ac TG-3 se observó en casi todo el soma neuronal y éste colocalizó prácticamente toda esta estructura con el RT (Fig 11. C, Merge). Por otro lado, también se observó que la inmunorreactividad del ac TG-3 disminuye en una MNFi fuertemente teñida por el RT (Fig 11. C, cabeza de flecha, D, flecha llena). En nuestro material pudimos observar MNFi que no fueron

inmunorreactivas al ac TG-3, pero fueron fuertemente reconocidas por el colorante RT (Fig 11. E, flechas), en la vecindad se observa que las MNFe no fueron reconocidas por el ac TG-3 (Fig 11 E, flechas, canal verde) reconocidas únicamente por el RT en el canal rojo (Fig 11 E cabezas de flecha), Las MNFe se caracterizan por presentar una estructura laxa y han perdido el núcleo. Asociadas a estas MNFe se observa una gran cantidad de neuritas las cuales colocalizan con el RT (Fig 11. E, flechas chicas, Merge), por otro lado también se observaron NDs que fueron detectadas únicamente por el ac TG-3 (Fig 11. D Merge).

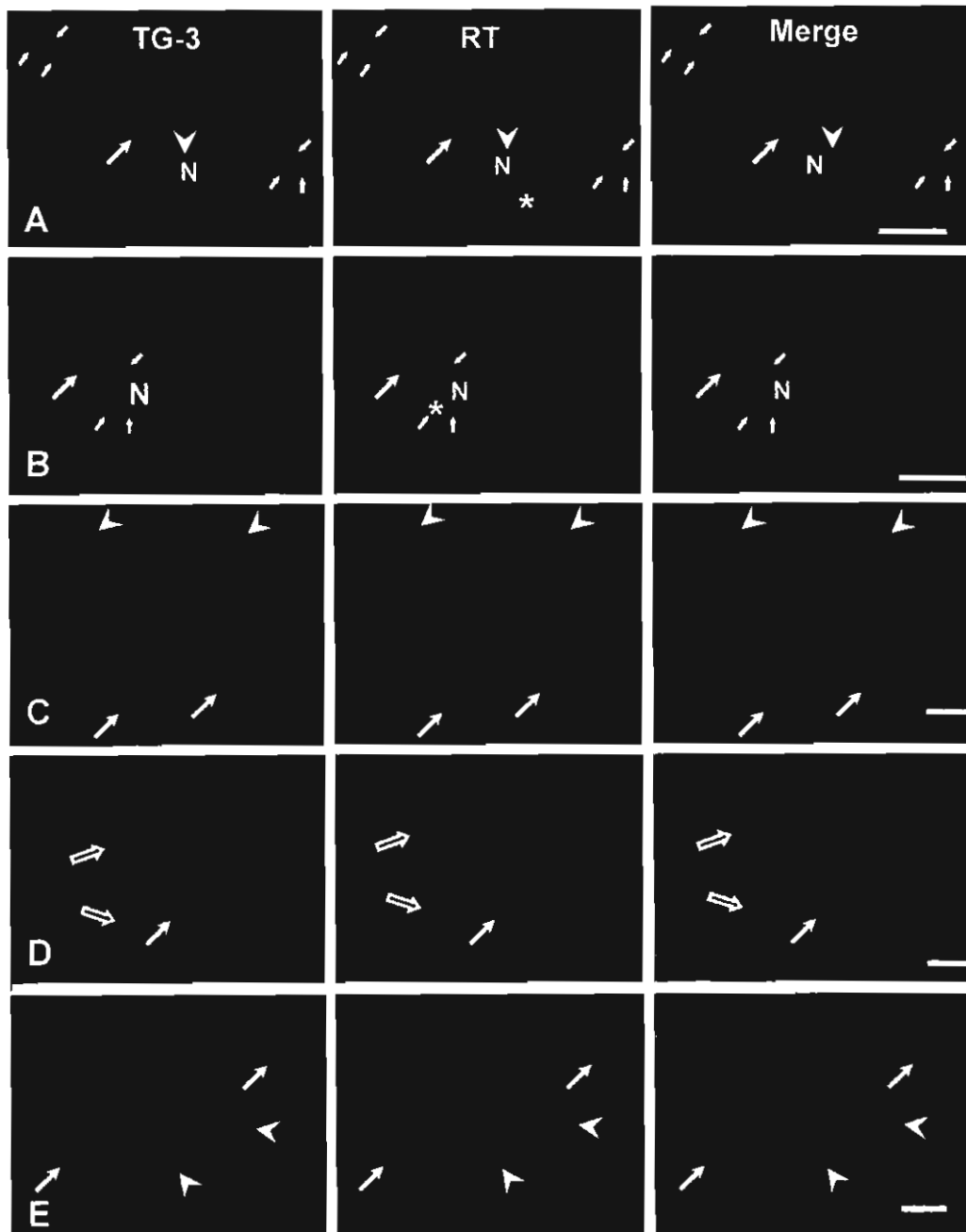


Fig 11. Inmunodetección del ac TG-3, monitoreado por el colorante rojo tiazina en estado fibrilar en el proceso de evolución de la formación de la MNF. A) Tinción granular citoplásmica (flecha) y perinuclear (cabeza de flecha), no colocalizan con el RT. B) Primeros indicios de formación de FHAs en el soma neuronal (flechas chicas), los cuales colocalizan intensamente con el RT. C) La inmunorreactividad del ac TG-3 evidenció la MNFi que tiene la forma de flama clásica la cual completamente colocaliza con el RT (flechas). D) La inmunorreactividad del ac TG-3 disminuye su intensidad en una MNFi completamente evidenciada por el RT, siendo este una etapa transicional a la MNFe (flechas). E) MNFe, de apariencia laxa, reconocida únicamente por el RT (cabezas de flecha) asociados a ellas se encuentran NDs reconocidas por ambos marcadores. Barra 20 μ .

INMUNOLocalIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL TG-3 EN CEREBROS CON LA EA.

La inmunolocalización ultra estructural del ac TG-3 en casos con la EA, se evidencio con partículas de oro de aproximadamente 20 nm. En la inmunolocalización de este ac en una neurona a bajo aumento se observó una gran cantidad de partículas de oro en el núcleo, en donde se asocia principalmente a la heterocromatina (Fig 12. A, D,G. HC), así mismo se observaron depósitos de oro en el retículo endoplásmico (Fig 12. A, C, D, E. RE). Otra estructura subcelular en la que se pudo observar este inmunomarcaje-oro, comúnmente se asoció a las mitocondrias (Fig 12. B y E), estas partículas en ocasiones se asociaron a las crestas mitocondriales. En el retículo endoplásmico se asoció a pequeños depósitos de material difuso (Fig 12. C, flechas). Algunas partículas de oro se localizaron en el Golgi pero en mucho menor grado (Fig 12. E, flechas chicas), también se asoció a la membrana nuclear como previamente se ha descrito en la inmunofluorescencia (Fig 12. D, flecha recuadro). Como control se observaron paquetes de filamentos, los cuales fueron evidenciados por el ac TG-3 (Fig 12. I flechas) y para Alz-50 (Fig 12. H, flechas). La localización subcelular para el ac. Alz-50 es semejante a la descrita para el TG-3 (no se muestra).

En un hallazgo esporádico, se observaron partículas similares a virus de 60-66nm de diámetro en el núcleo (Fig 12. G, (PSV) doble flecha, adicionalmente se observaron mitocondrias con la membrana interna y externa dañada (Fig 12. F, cabezas de flecha), mientras otras presentaban daño únicamente en su membrana externa (Fig 12. F, flechas).

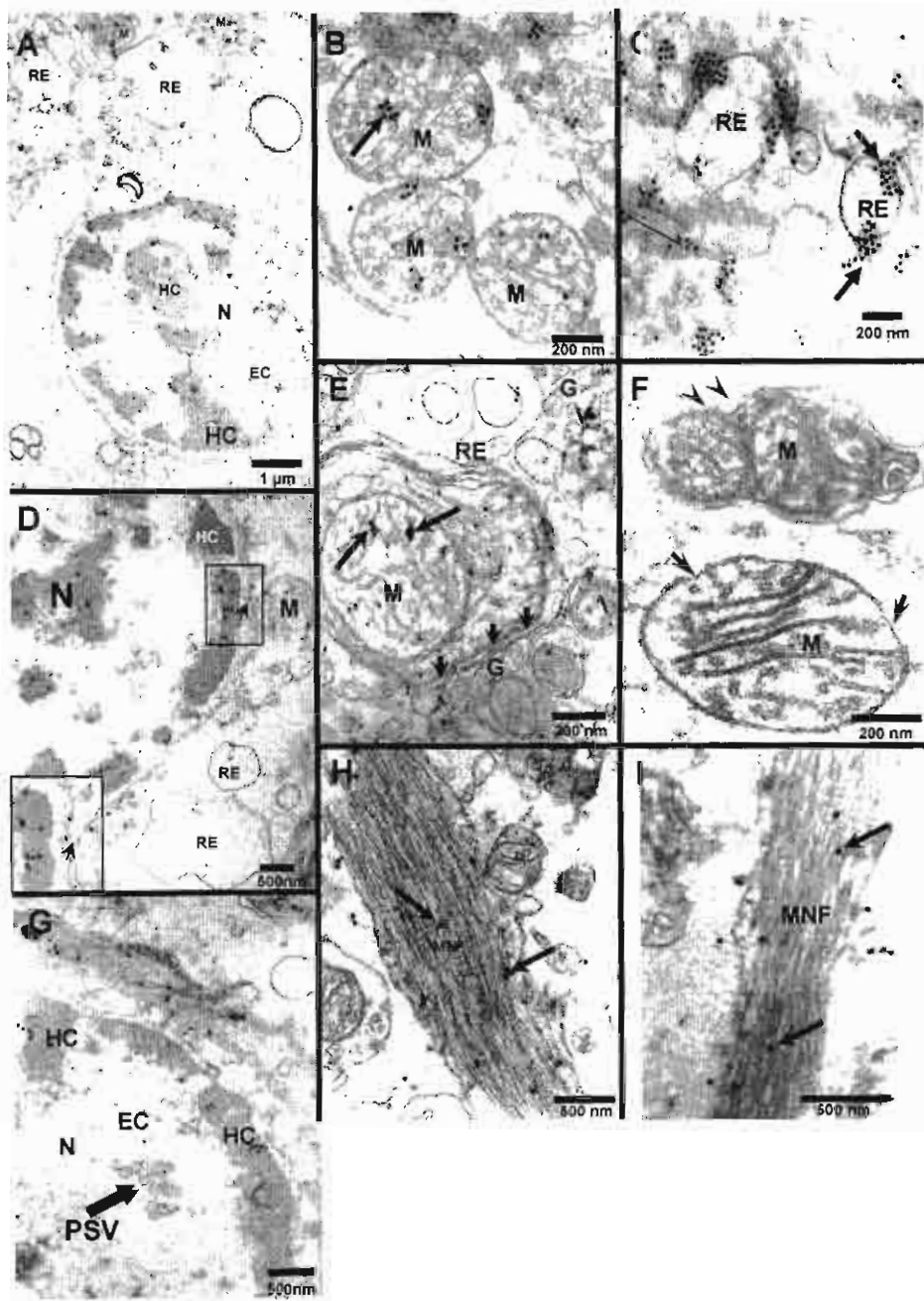


Fig 12 Localización ultra estructural de la inmunorreactividad del ac TG-3 en cerebros con la EA. A) Micrográfica a bajo aumento en donde se muestra una gran acumulación de partículas de oro en el núcleo particularmente en la heterocromatina (HC), en la vecindad del núcleo se observan pequeños depósitos de material difuso decorado con partículas de oro. Así mismo se observan estas partículas de oro retículo endoplásmico (RE). B) Amplificación de mitocondrias decoradas con partículas de oro (flechas). C) Material difuso asociado al retículo endoplásmico, reconocido por el ac TG-3 decorado con partículas de oro, en la vecindad se observa un material con las mismas características, también decorado con estas partículas de oro. D) Membrana nuclear decorada por partículas de oro (recuadro se observa una amplificación de esta zona) E) Organelo membranoso en el cual se asocian en muy poca proporción las partículas de oro (G) flechas, en la vecindad se observan partículas de oro asociadas a mitocondrias, y retículo endoplásmico. F) La morfología de la membrana mitocondrial se ve afectada debido a que se

pierden la membrana externa (flechas) y la membrana interna y externa (cabezas de flecha). G) Partículas virales similares a virus (PSV) doble flecha.

DOBLE INMUNOTINCIÓN CON LOS ANTICUERPOS TG-3 Y ALZ-50

La proteína tau en los FHAs en la EA, se encuentra altamente ordenada, siendo que ésta, en condiciones normales, presenta una escasa o pobre estructura secundaria sugiriendo que la proteína puede adoptar cambios conformacionales estables. Recientes estudios usando ac's específicos, han demostrado la presencia de cambios locales que pueden inducir o influenciar, el cambio conformacional patológico en la EA (Carmel y col., 1996, Hoffman y col., 1997, Jicha G. y col., 1997). El ac Alz-50 es uno de los más utilizados. Este ac reconoce un cambio conformacional estructural. El epítipo de este ac, requiere de dos porciones discontinuas en la molécula de tau (7-9 aAc de la porción N- terminal, y una secuencia de 30 ac's del 312-324 del tercer dominio repetido [Jicha y col., 1997]), el cual se encuentra en la EA (Carmel y col., 1996, Jicha y col., 1997a). Los análisis inmunohistoquímicos de los estadios iniciales de neurodegeneración en cerebros con la EA, usando el ac Alz-50, han demostrado neuronas de apariencia normal en ausencia de FHA (Wolozin and Davies 1987; Hyman y col., 1988), de la misma manera, el análisis al microscopio electrónico se pudo determinar que en estos primeros estadios en neuronas reactivas al Alz-50, no se observaron agregados filamentosos, lo cual sugiere que el cambio conformacional estructural evidenciado por el anticuerpo Alz-50, precede a la agregación patológica de la proteína tau en FHA (Jicha A. y col., 1997a), Así mismo García-Sierra F. y col., 2003, describieron el cambio conformacional estructural (Alz-50) como el primer cambio que sufre la molécula de tau en la EA. En el presente

estudio, se analizó la asociación de estos dos cambios conformacionales: estructural (Fig 13, canal rojo) y regional (Fig 13, canal verde) y su participación en el proceso de evolución y maduración de la MNF. Ambos ac's (Alz-50 y TG-3) se han asociado a los eventos iniciales en la neurodegeneración fibrilar, y presentan patrones de inmunorreactividad semejante. La tinción granular neuronal reconocida por el ac TG-3 (Fig 13. A), tanto en el soma (Fig 13. A, flecha), como en la región perinuclear (Fig 13. A, cabeza de flecha), no colocalizó con el ac Alz-50. Lo cual nos sugiere que el primer evento es un el cambio conformacional regional dependiente de fosfatos en la Thr231. Sin embargo, en estas células con tinción granular se observó en el árbol dendrítico una colocalización de ambos ac's. En la Fig 13. B se observó una fuerte inmunorreactividad con el ac TG-3, en unas estructuras en forma de frijol (MNF tempranas), localizadas en la región perinuclear, las cuales colocalizaron con el ac Alz-50 (Fig 13. B, cabezas de flecha). Estas observaciones sugieren que estas estructuras en forma de frijol, podrían corresponder a los primeros sitios de agregación de la proteína tau conformacionalmente alterada. Por otro lado, aún se mantiene una tinción granular citoplásmica reconocida únicamente por el ac TG-3 (Fig 13. B, flecha).

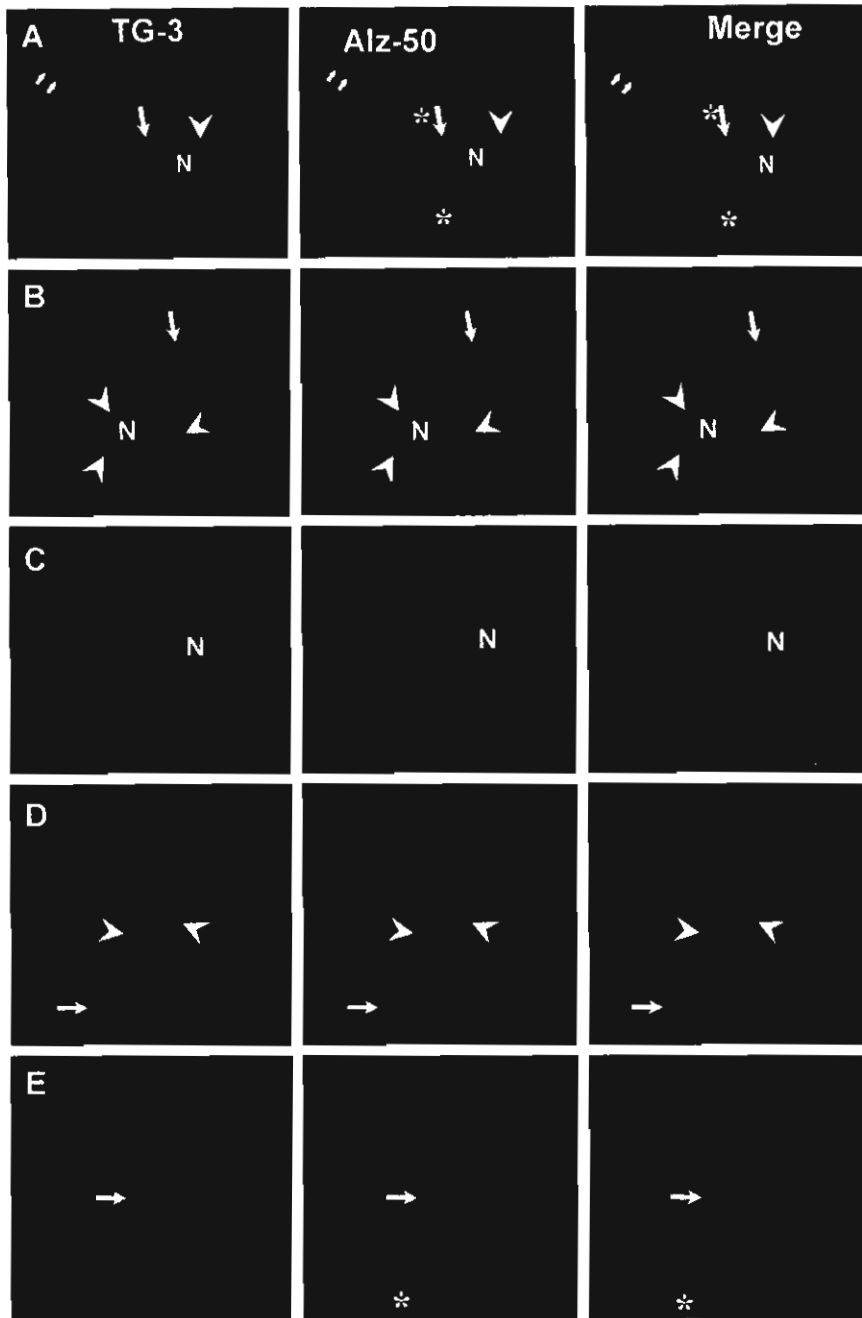


Fig 13. Colocalización del cambio conformacional regional TG-3 (canal verde) y cambio conformacional estructural Alz-50 (canal rojo). A) Tinción granular citoplásmica (flecha) y perinuclear (cabeza de flecha), reconocida únicamente por el ac TG-3 y colocalización de ambos ac en el árbol dendrítico (flechas chicas). B) Estadios iniciales de agregación de la proteína tau, localizado en la región perinuclear ambos ac's colocalizan, mientras que otra tinción granular citoplásmica TG-3 positiva, no colocaliza con el ac Alz-50. C) MNF1 colocalizan ambos ac's. D) MNF1 comienza a perderse la colocalización de ambos ac's prevaleciendo el TG-3. E) MNF1 reactiva al ac TG-3, en la cual no se observa inmunorreactividad del ac Alz-50.

En la mayoría de las MNFi, se observó una fuerte colocalización con ambos ac's (TG-3 y Alz-50). Sin embargo, este doble inmunomarcaje definió diferentes poblaciones de MNFi, las cuales dependieron principalmente del patrón de tinción: una población se caracterizó por una colocalización uniforme entre ambos ac's (Fig 13. C); otra población se observó en una fuerte tinción por el TG-3, sin embargo, la tinción con el anticuerpo Alz-50 disminuyó en varias zonas de la MNF (Fig 13. D, cabezas de flecha), mientras que en sus porciones más distales se observó una fuerte colocalización de ambos ac's. Otra población de MNFs, fue reconocida únicamente por el anticuerpo TG-3 (Fig 13. E, canal verde, flecha) y esta no colocalizó con el anticuerpo Alz-50 (Fig 13. E, canal rojo), estos resultados sugieren que el cambio conformacional regional, se conserva en el proceso de maduración de la maraña neurofibrilar, mientras que el anticuerpo Alz-50 dependiente de las porciones amino y carboxilo terminal intactas es más sensible que el cambio conformacional regional Thr231, siendo éste más interno y posiblemente más protegido que el cambio conformacional estructural (Alz-50).

TRIPLE INMUNOTINCIÓN CON EL ANTICUERPO TG-3 Y MARCADORES DE LA PORCIÓN N- Y C- TERMINAL DE LA PROTEÍNA TAU.

Para determinar el estado de la molécula de tau y la relación con el cambio conformacional regional detectado por el ac TG-3, se realizaron triples tinciones con ac's que reconocen la porción N- y C- terminal de la molécula de tau. Esto se muestra en la figura 14 A-D. En la MNFi se observó una fuerte colocalización entre los tres ac's (Fig 14. B). Sin embargo, en otra población de MNFs reactivas al ac TG-3, colocalizó con el ac que reconoce la porción N- (M-19), pero no así con el ac que reconoce la porción C- terminal (T46) (Fig 14. C). Por otro lado, se

observó otra población inmunorreactiva al ac TG-3 y los anticuerpos que reconocen la porción amino y carboxilo terminal, no se observaron en esta estructura (Fig 14. D, flecha).

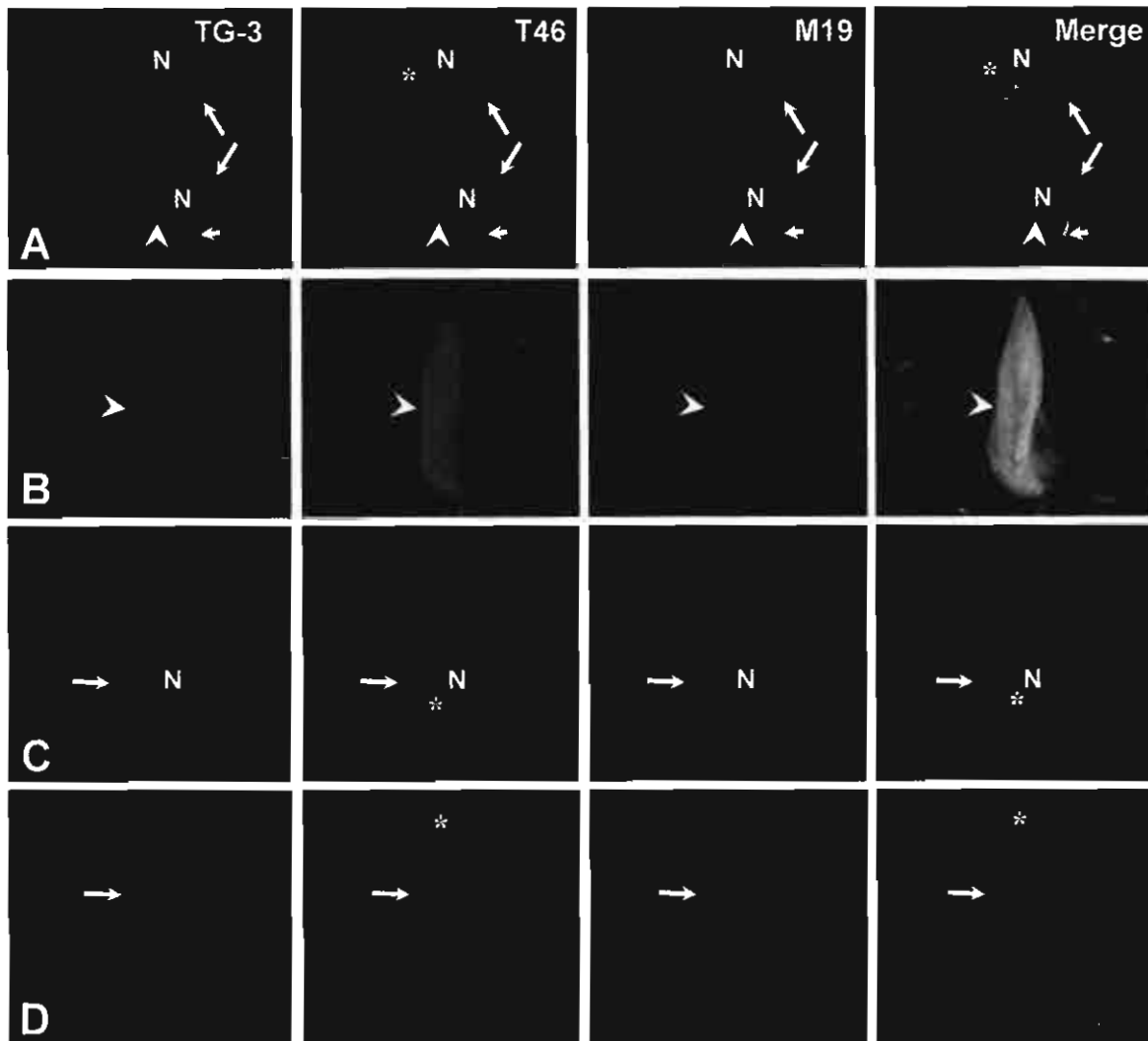


Fig 14. Monitoreo de la porción N- (M19G) y C- (T46) en el cambio conformacional regional (TG-3). A) Tinción granular difusa citoplásmica y perinuclear evidenciada por el M19G (flechas), el ac TG-3 evidencio unas estructuras semejantes a vacuolas las cuales presentan poca colocalización con el M19G, pero no con el T46. B) MNFi, colocalizan en su mayor parte los tres ac's (cabeza de flecha). C) MNFi reactivo al TG-3 colocaliza con el M-19G pero no con el T46. D) MNFi reactiva únicamente al ac TG-3, en la vecindad se observan NDs que son reactivos al TG-3 y M19G, mientras que otras sólo son positivas al TG-3.

En la vecindad de esta MNFi, se observan NDs que colocalizan con los marcadores TG-3 y M19G (Fig 14. D). Ocasionalmente, se observaron algunas

neuronas que presentan una tinción granular difusa, reconocida por el ac M19G (N-terminal), en donde los ac's TG-3 y T46 (C-terminal), colocalizaron con éste (Fig 14. A, flechas), adyacente a éste se encuentra una neurona en la que la inmunorreactividad del anticuerpo TG-3, se confinó a gránulos grandes semejantes a vacuolas, los cuales no colocalizan con el ac que reconoce la porción N- o C-terminal. (Fig 14 A, flechas). En la vecindad se encuentran algunas NDs, que son reconocidas por los tres marcadores (Fig 14 A, flecha chica). Estos hallazgos sugieren que el epítipo reconocido por el ac TG-3 es estable y, como se esperó, el procesamiento de la molécula de tau, continúa con la proteólisis de sus porciones N- y C-terminal, siendo más sensible la porción C-terminal.

DOBLE INMUNOTINCIÓN CON LOS ANTICUERPOS TG-3 / AT100.

El ac AT100 previamente se ha descrito que reconoce los FHAs de EA y no reconoce la proteína tau normalmente fosforilada en muestras de biopsias (Matsuo y col., 1994, Hoffmann 1997). El epítipo de este ac, es generado por una compleja secuencia de fosforilaciones. Primero se fosforilan los aa's Ser199, Ser202, y Thr205 (que es el epítipo del ac AT8), posteriormente la Thr212 y finalmente Ser 214, formándose el epítipo de AT100 debe de formarse un cambio conformacional regional, generado por poli-aniones por ejemplo (RNA, heparina y poli-Glu, (Zheng-Fischhöfer y col., 1998).

Estos dos ac's, se han asociado a los cambios conformacionales regionales dependientes de fosforilación, previamente hemos descrito el cambio conformacional regional, evidenciado por el anticuerpo TG-3 es previo al cambio conformacional estructural (Alz-50). Por lo tanto era importante asociar estos dos

cambios conformacionales regionales, en el proceso patológico que sigue la proteína tau, en la maduración de la MNF en la EA (Fig 15 A-C).

El ac AT100, se ha asociado también a los primeros cambios iniciales en el proceso de neurodegeneración, el patrón de inmunorreactividad de este ac es semejante al previamente descrito para el ac TG-3.

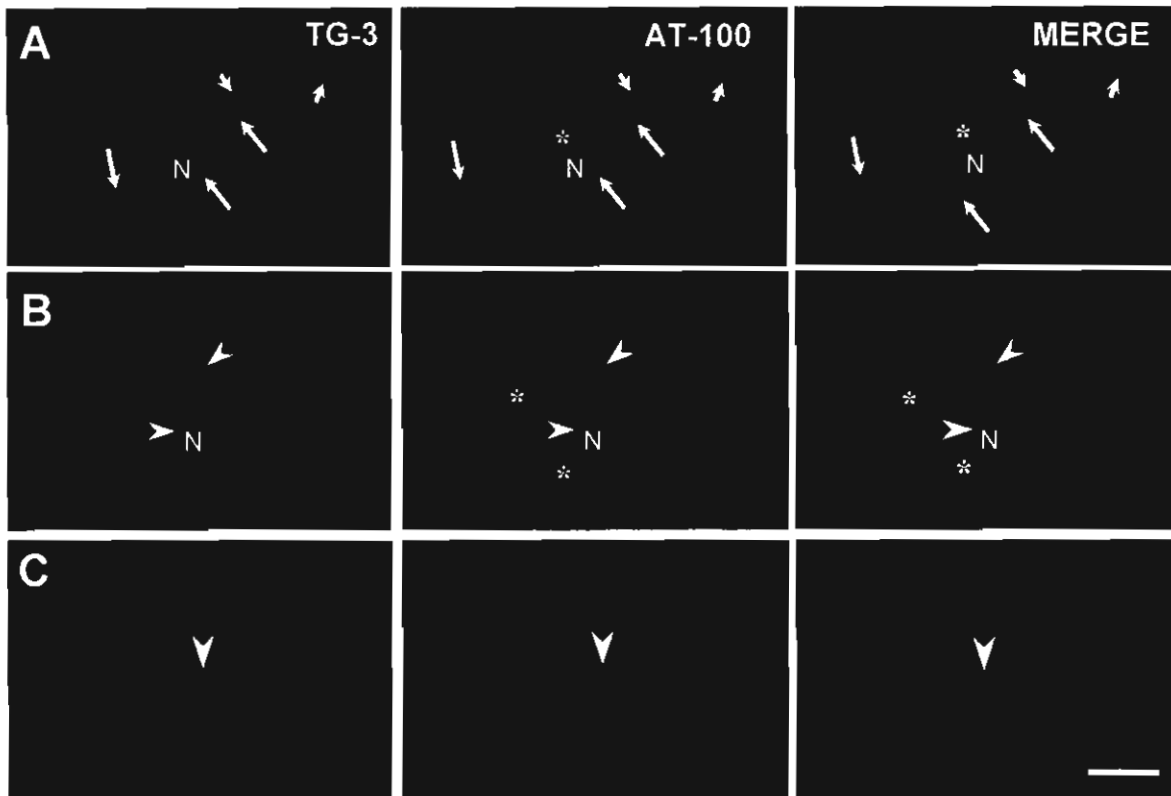


Fig 15. Cambios conformacionales regionales (TG-3 canal verde, AT100 canal rojo) en el proceso de maduración de la MNF. A) Tinción granular citoplásmica y perinuclear (flechas) evidenciada por el ac TG-3 la cual no colocaliza con la inmunorreactividad del anticuerpo AT100, en la vecindad de esta célula neuronal se observan ND, en las cuales colocalizan ambos ac's (flecha). B) La inmunorreactividad del ac TG-3 colocalizó con el ac AT100 en la tinción granular citoplásmica y perinuclear (cabezas de flecha). C) La inmunorreactividad de ambos ac's, colocalizan en toda la estructura de la MNFi (cabeza de flecha), NDs en la vecindad se observan que colocalizan ambos marcadores. Barra 20 μ m.

La inmunorreactividad del ac TG-3 generalmente colocalizó con el anticuerpo AT100, en la mayoría de las MNFs intracelulares (Fig 15. C, cabezas de flecha). Ambos ac's no evidenciaron MNFe. En las MNFi era complicado evidenciar cual

de estos dos epítopes dependientes de fosforilación, podrían presentarse primero en el proceso de la acumulación de la proteína tau, en el proceso de la degeneración neurofibrilar, ya que posiblemente estos cambios conformacionales regionales, son eventos que pueden suceder en un espacio de tiempo muy corto y en la MNFi, estos cambios tan sutiles no podrían apreciarse claramente. Por lo tanto, las diferencias se pudieron observar claramente en los primeros estadios de degeneración (Tinción granular difusa previamente descrita). En la Figura 15 A, se observa una tinción granular difusa reconocida únicamente por el ac TG-3, mientras que la inmunorreactividad del ac AT100 no se observó. Sin embargo, en otra célula con tinción granular difusa semejante a la anterior, se observó una intensa colocalización con ambos marcadores, en esta tinción granular citoplásmica y perinuclear (Fig 15. B). NDs se encuentran en la vecindad de esta y presentan las mismas características previamente descritas para el soma neuronal. Estos resultados nos sugieren que los cambios conformacionales regionales que sufre la molécula de tau y evidenciados por los ac's TG-3 y AT100, son eventos espacialmente cercanos. Esto explicaría por qué no pudieron observarse diferencias en la MNFi.

DOBLE INMUNOTINCIÓN CON LOS ANTICUERPOS TG-3 Y AT8

El cambio conformacional regional evidenciado por el anticuerpo AT100, requiere de una fosforilación secuencial, en el cual se encuentra involucrado el epítope del anticuerpo AT8 (Ser199, Ser202 y Thr205) y posteriormente se fosforilan los residuos Thr212 y Ser214, generándose así el epítope del anticuerpo AT100 (Zheng-Fichhofer y col., 1998). Dadas las evidencias que encontramos que la inmunorreactividad del TG-3 precede a la del AT8, consideramos importante

relacionar espacial y temporalmente la presencia de ambos epítopes. El ac AT8, también se ha relacionado con los eventos iniciales de la neurodegeneración fibrilar en la EA. García-Sierra F. y col., (2000), describieron los depósitos granulares reconocidos por el ac AT8, como un estado inicial no fibrilar dentro de la patología neurofibrilar aunque estos no correlacionaron con el grado de deterioro cognoscitivo y que estos cambios morfológicos granulares podrían estar involucrados en el proceso normal del envejecimiento.

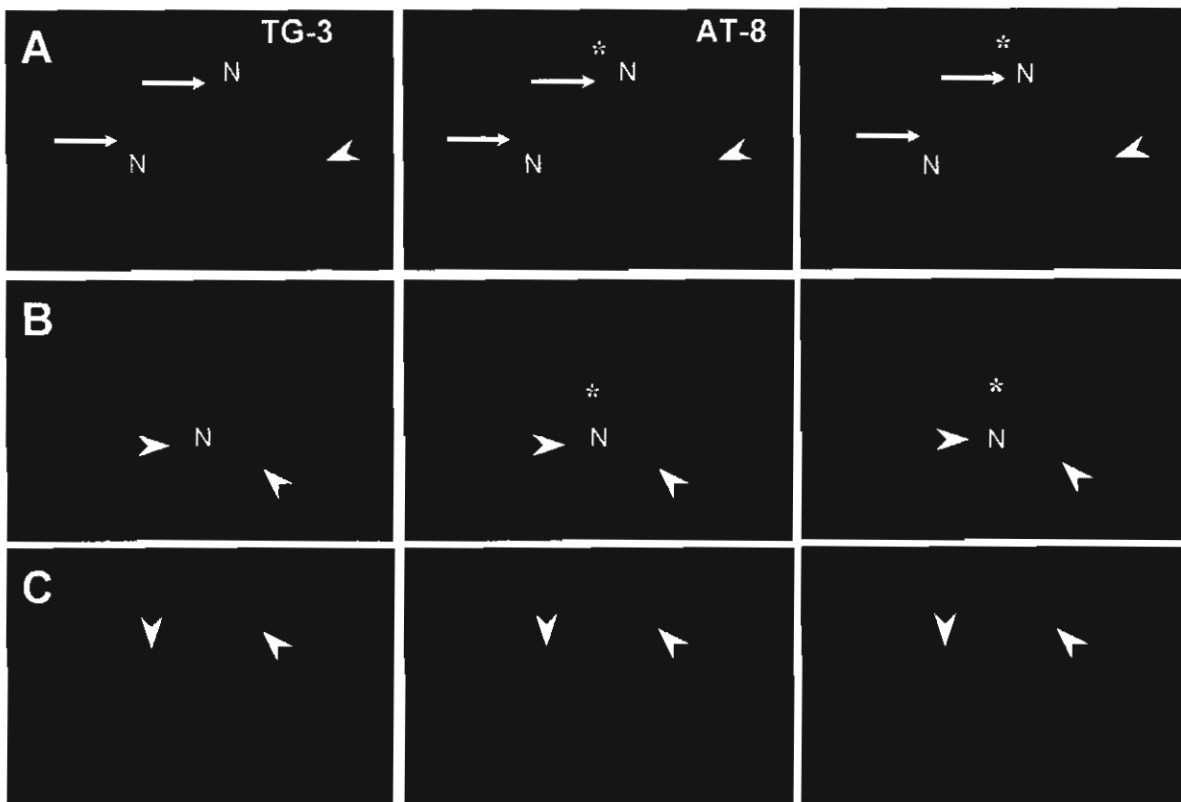


Fig 16. Inmunorreactividad de los ac's TG-3 (canal verde) y AT8 (canal rojo). A) Tinción granular citoplásmica positiva únicamente para el ac TG-3 (flechas), en la vecindad se observaron NDs reactivas para ambos ac's. B) Tinción granular citoplásmica y perinuclear evidenciada por ambos ac's en una colocalización intensa, las NDs en su vecindad colocalizan también ambos ac's C) MNFi inmunorreactiva al ac TG-3 colocaliza con el ac AT8 (flechas).

Se realizaron dobles inmunotinciones con los ac's AT8 y TG-3. La mayoría de MNFi fueron inmunorreactivas para ambos ac's (Fig 16 C, cabeza de flecha).

Sin embargo, en el análisis de la inmunorreactividad granular difusa citoplásmica, se pudieron observar diferencias claras. En la figura 16 A, se observa una neurona que presenta una tinción granular difusa positiva únicamente para el ac TG-3, mientras que la inmunorreactividad del ac AT8 no se observó (Fig 16 A. canal rojo, flechas). Por otro lado, se observó una tinción de las mismas características morfológicas que la anterior pero a diferencia de ésta, la inmunorreactividad de ambos anticuerpos colocalizaron (Fig 16. C, cabezas de flecha). Estos resultados sugieren que la fosforilación en los aa's 199, 202 y 205 es posterior a la fosforilación en el residuo 231 (TG-3) y estos posiblemente faciliten la formación del epítipo del ac AT100 (cambio conformacional regional, Zheng-Fischhöfer y col., 1997) y la combinación de varios cambios conformacionales regionales, faciliten el acercamiento de la porción amino al tercer dominio, repetido formándose el cambio conformacional estructural evidenciado por el anticuerpo Alz-50.

DOBLE INMUNOTINCIÓN CON LOS ANTICUERPOS AT100 (CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL) Y ALZ-50 (CAMBIO CONFORMACIONAL ESTRUCTURAL).

Mediante dobles inmunotinciones, se analizaron bajo microscopia confocal el cambio conformacional regional evidenciado por el anticuerpo AT100 y el cambio conformacional estructural (Alz-50. Fig 17). Estos dos eventos se encontraron en la mayoría de las MNFi. El grado de colocalización en esta estructura, varía dependiendo del grado de maduración de la MNF (Fig 17. C), adyacente a esta MNFi (flecha), se observó una PN en la cual las ND predominantemente son

inmunorreactivas al ac Alz-50, aunque en algunas ND el grado de colocalización varía, esto posiblemente, se deba al grado de maduración de la MNF. Sin embargo, al analizar las etapas iniciales de degeneración neuronal, se observó la tinción granular difusa en la cual predominaba la inmunorreactividad del ac AT100 (Fig 17. A, canal rojo, flecha) y en menor grado se expresó el cambio conformacional estructural (Alz-50). La tinción perinuclear también se caracterizó, por predominar el cambio conformacional regional (AT100). En la vecindad de esta neurona se observó una fuerte colocalización en las ND (Fig 17. A, cabeza de flecha). Por otro lado, también se observó una buena cantidad de células neuronales con tinción granular difusa, en la cual ambos anticuerpos se encontraban colocalizando, tanto en el soma neuronal como en la tinción perinuclear (Fig 17. B)

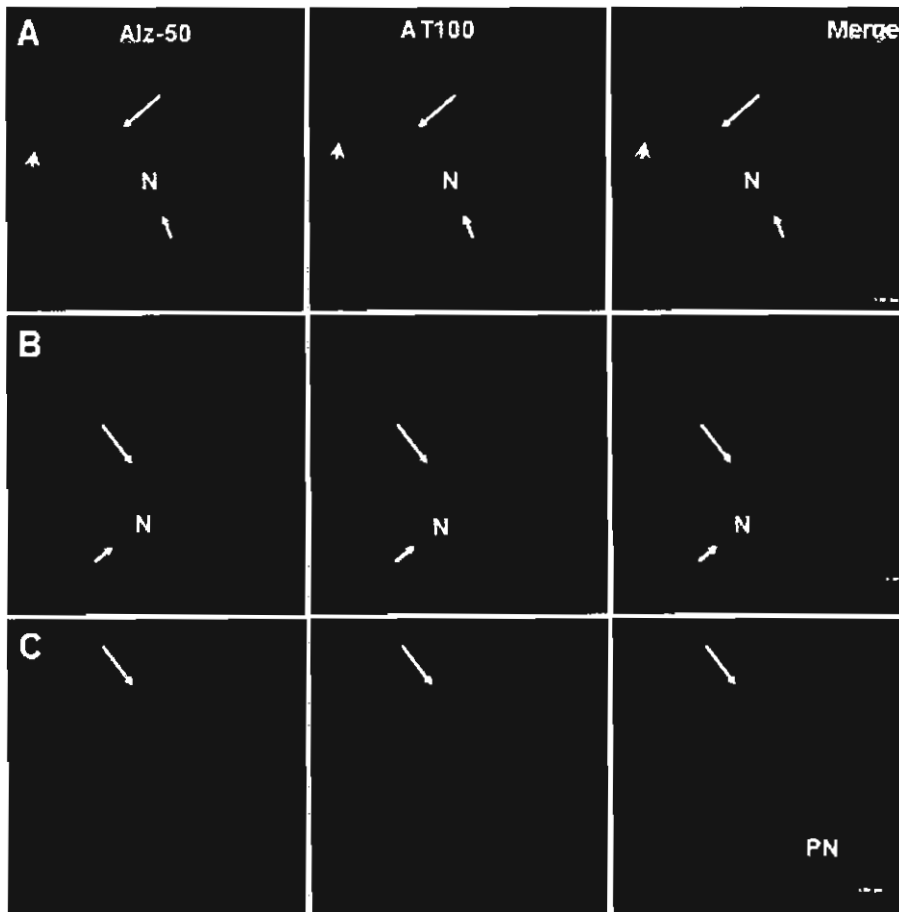


Fig 17. Inmunorreactividad de los ac's Alz-50 (canal verde) y AT100 (canal rojo) en un caso con EA. A) Tinción granular difusa. La inmunorreactividad de ambos ac's colocalizan mínimamente. El ac AT100 predomina en esta neurona (Flecha). En la vecindad se observan NDs en las cuales, ambos ac's colocalizan (cabezas de flecha). B) Tinción granular difusa, en la cual ambos ac's colocalizan casi en su totalidad tanto en el citoplasma (flecha) y tinción perinuclear (flecha chica). En la vecindad se observan NDs reactivas, sólo para el ac AT100. C) MNFi ambos anticuerpos reconocen la misma estructura colocalizando ambos anticuerpos (flecha). En la vecindad se observa una PN en la cual las NDs asociadas presentan diversos grados de colocalización.

FOSFORILACIÓN DE LA PORCIÓN CARBOXILO TERMINAL SER396, SER404 (AD2) Y SU ASOCIACIÓN CON EL CAMBIO CONFORMACIONAL TG-3.

En el procesamiento de la proteína tau en las MNF en la EA, García-Sierra F. y col., 2003, ubicaron la inmunorreactividad del ac AD2, en un estado transicional intermedio, que se caracteriza por la transición de la MNFi a MNFe. Por otro lado Galván V. y col., 2001, describieron un patrón de evolución en la formación de la

MNF mediante la inmunorreactividad del ac AD2, en los cuales pudieron observar una tinción granular difusa, semejante al analizado en este estudio.

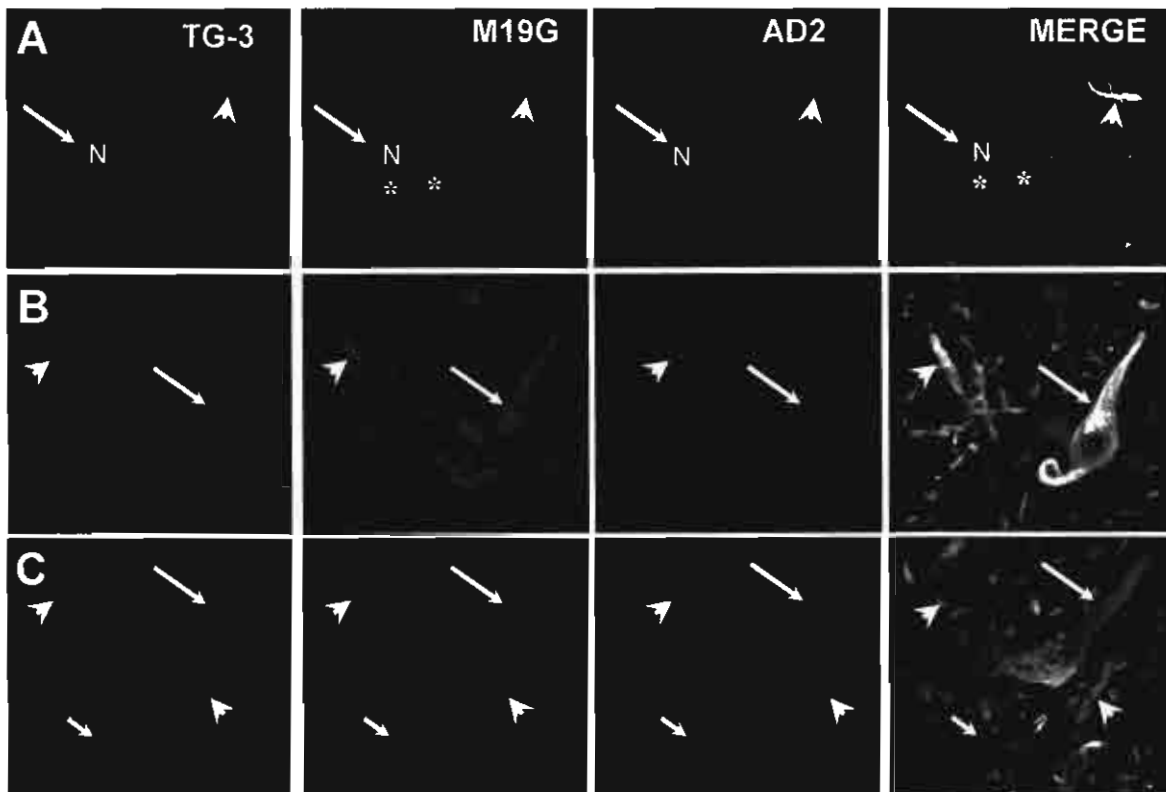


Fig 18. Triple tinción del ac TG-3 (canal verde), M19G (canal rojo) y AD2 (canal azul). A) Tinción granular difusa inmunorreactiva al TG3, la cual colocaliza con el M19G y no con el AD2 (canal azul flecha). Las NDs colocalizan los tres marcadores (cabezas de flecha). B) MNFi la inmunorreactividad del ac TG-3 colocaliza con los ac's M19G y AD2(flecha), una porción de esta maraña es reconocida únicamente por el AD2. Las NDs en la vecindad son reconocidas y colocalizan los tres ac's (cabezas de flecha), mientras que otras únicamente por el AD2 en color azul (merge). C) MNFi reconocida por el ac TG3 y parcialmente colocaliza con el ac AD2 (flecha), mientras que la MNFi vecina, es reconocida únicamente por el AD2 (flecha chica).

Mediante triples inmunotinciones con los ac's TG-3 (canal verde), M19G (canal rojo) y AD2 (canal azul), se observó una tinción granular difusa, en la cual colocalizó con los ac's TG-3 y M19G, en donde la inmunorreactividad del ac AD2 no se observó en esta neurona (Fig. 18. A, Flechas). En la vecindad se observan NDs, colocalizando los tres ac's (cabeza de flecha). Sin embargo, en otras neuronas con tinción granular difusa inmunorreactiva al AD2 colocalizó con el

anticuerpo TG-3 (no se muestra). En la población de MNFi se observó una intensa colocalización de los tres marcadores (Fig 18. B, flecha). Al centro de esta MNFi, se observa la tinción de AD2 independiente del TG-3 y AD2. En la vecindad se observan NDs las cuales colocalizan con tres marcadores (cabeza de flecha), mientras que otras son inmunorreactivas únicamente por el anticuerpo AD2. Por otro lado, se observaron MNF teñidas únicamente por el ac AD2 (Fig 18. C, flecha chica), otra población de neuronas positivas al anticuerpo TG-3, colocaliza parcialmente con el ac AD2 (Fig 18. C, flecha), en ausencia de la inmunorreactividad M19G (canal rojo).

TRIPLE INMUNOTINCIÓN CON LOS ANTICUERPOS TG-3 Ó S199, 423 Y EL COLORANTE ROJO TIAZINA.

La inmunorreactividad del ac 423, evidenció una truncación en el Glu-391 (Novak M y col., 1991). Esta truncación es un evento terminal, en el procesamiento de la proteína tau (García-Sierra F. y col., 2003). El ac 423, reconoció MNF intracelulares y extracelulares. Este anticuerpo no colocalizó con ac's que reconocen la proteína tau intacta (M19G, TG-3, Alz-50, S199 y S422). La inmunorreactividad del anticuerpo 423 reconoció las MNFi, las cuales presentan una morfología compacta. En la figura 19 B se observa un grupo de MNFi las cuales la inmunorreactividad del ac TG-3 colocalizó con el colorante RT (flechas) mientras que la tinción del 423, se observó completamente independiente del TG-3 (Fig 19. B, cabezas de flecha), lo cual nos sugiere, que ambos eventos están muy distantes en su aparición en el proceso de evolución y formación de la maraña.

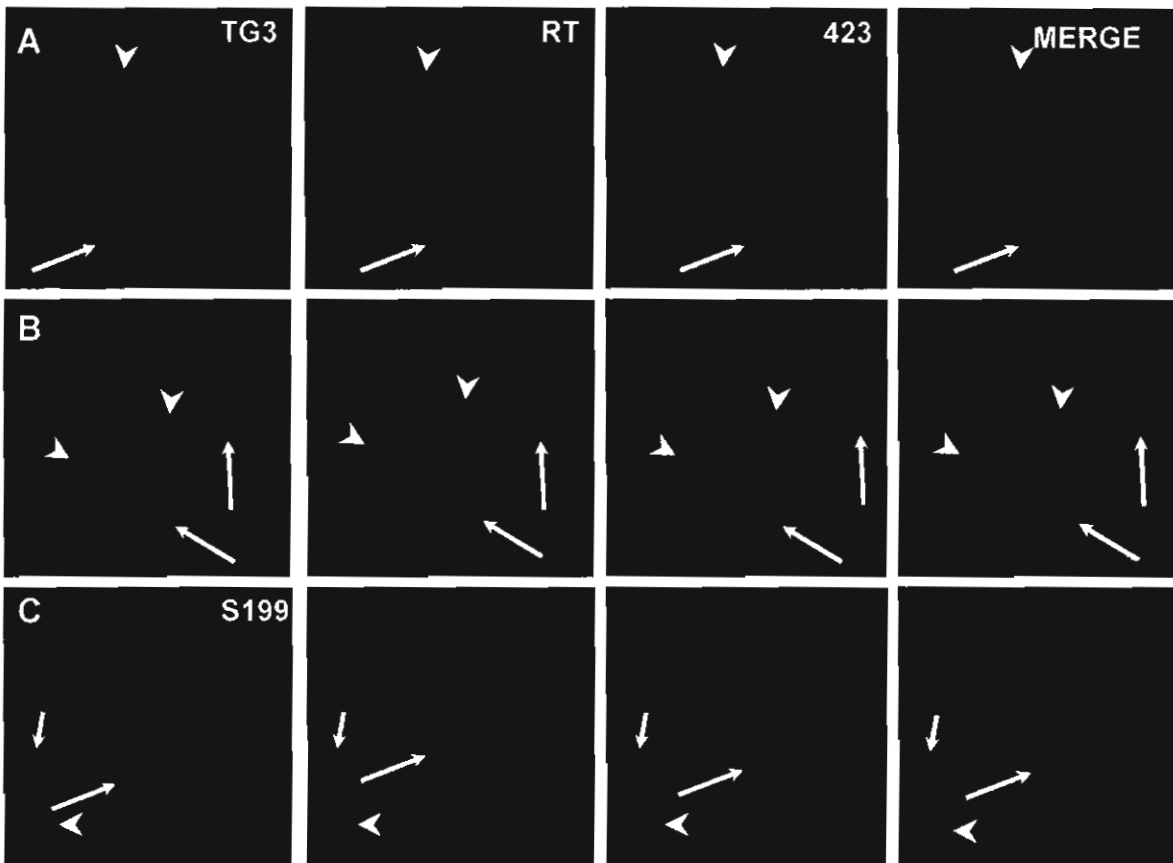


Fig 19. Asociación del cambio conformacional regional (TG-3, canal verde), RT (canal rojo), con el proceso de truncación en el Glu-391 ac 423 (canal azul). A) MNF extracelular evidenciada por el ac 423, colocaliza con el RT, sin embargo, la inmunorreactividad del ac TG3 tuvo afinidad por esta estructura (flecha). NDs en la vecindad fueron reconocidas únicamente por el TG-3 y en menor grado por el TR (canal rojo, cabeza de flecha). B). Las MNFi muestran una inmunorreactividad del TG-3 y 423 completamente excluyentes (flechas y cabezas de flecha respectivamente), en donde ambos eventos colocalizan con el RT. C) MNFi inmunorreactiva al 423 y este no colocaliza con el marcador de tau fosforilada en la Ser 199 (canal verde). Las NDs en la vecindad de esta MNFi, presentaron el mismo comportamiento siendo marcadores excluyentes (flecha y cabeza de flecha).

Estas observaciones fueron corroboradas por el anticuerpo S199, la cual presentó el mismo patrón previamente descrito. La inmunorreactividad del el ac S199, se presentó siempre independiente de la inmunorreactividad del ac 423 (Fig 19. C, flecha). En la vecindad se observaron NDs con semejantes cualidades de reconocimiento por ambos ac's. En la Fig 19 A, se muestra una MNFe

inmunorreactiva por el RT la cual también fue reconocida por el ac 423 y no así por el TG3.

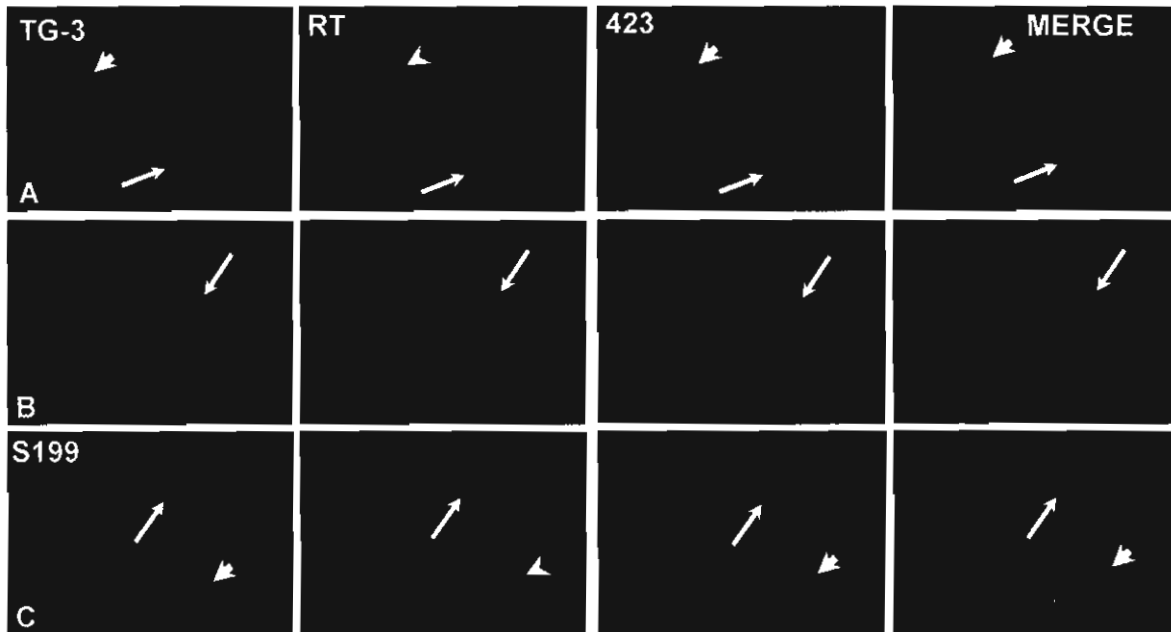


Fig 20. Asociación del cambio conformacional regional (TG-3, canal verde), RT (canal rojo), con el proceso de truncación en el Glu-391 ac 423 (canal azul), el tejido fue pretratado con ácido fórmico. A) MNFi inmunorreactiva al anticuerpo 423, la cual colocaliza con el RT, sin embargo la inmunorreactividad del ac TG3, no reconoció a esta (cabeza de flecha canal verde). El anticuerpo TG-3 tuvo afinidad por la MNFi (cabeza de flecha), colocaliza con el RT, pero no así con el 423. B). La MNFi muestra una inmunorreactividad al 423, asociada a ella se observan NDs positivas al ac TG-3 ambos ac's se muestran completamente excluyentes (flechas) en la vecindad se observan NDs reconocidas únicamente por el ac 423 y colocaliza con RT. C) MNFi inmunorreactiva al 423, no colocaliza con el marcador de tau fosforilada en la Ser199. Las NDs en la vecindad de esta MNFi, presentaron el mismo comportamiento siendo marcadores excluyentes (flecha y cabeza de flecha).

Para confirmar este resultado, se procedió a tratar el tejido con ácido fórmico puro (99% de pureza), ya que previos reportes (Mena et al., 1995; García-Sierra F y col., 2001) han demostrado que incrementa la inmunorreactividad al exponer epítopes ocultos de ac's como el 423, tal y como ha sido ya demostrado para ac's anti amiloide- β . Se expuso el tejido al ácido fórmico, para comprobar si en el empaquetamiento de la proteína tau truncada reconocida por el 423, ésta podría estar ocultando o enmascarando el epítope de los ac's TG-3 y S-199, sin

embargo, al realizar la triple inmunotinción con los ac's TG-3 ó S199 con el 423 y contrateñido con el RT, después del tratamiento del ácido fórmico los resultado fueron semejantes a los previamente descritos, en donde la inmunorreactividad del ac TG-3 (Fig 20. A, flecha) y 423 (Fig 20. A, cabeza de flecha) en una MNFi se mantienen independientes. Lo mismo ocurrió en la MNFe (Fig 20. B, flecha) asociado a esta MNFe en la cual, se observó una gran cantidad de NDs, asociadas a ella reconocidas únicamente por el TG-3 y éste colocaliza con la el RT. Resultados semejantes se observaron con el ac S-199 (Fig 20. C, flecha y cabeza de flecha), lo cual sugiere que en las MNF intracelulares y extracelulares positivas al 423, posiblemente los epítopes de los anticuerpo TG-3 y S199, no se encuentran ocultos. Sugiriendo que estos dos eventos son independientes y que tienen un curso temporal diferente.

16.0 DISCUSION.

La ausencia de un modelo animal o celular, es una de las principales limitantes para estudiar el procesamiento patológico de los mecanismos moleculares de la EA. Por lo tanto, todos los estudios hasta el momento, se realizan únicamente en el tejido cerebral de personas que fallecieron afectadas por este padecimiento.

El desarrollo del banco de cerebros del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Raúl Mena y en colaboración con la Dra. Laura Chávez del Hospital General, es el primero en América Latina, el cual es de vital importancia para el desarrollo de este estudio. Para propósitos de la presente investigación, el tejido cerebral humano que se obtiene por necropsia, debe ser manipulado y procesado en condiciones apropiadas como son, el tiempo post-mortem corto (máximo 24Hrs), y la fijación (paraformaldehído al 4% en solución amortiguada, pH7.4). Comúnmente en el departamento de patología de los hospitales, fijan los tejidos en formalina-agua. Este tipo de fijación, altera o abate la inmunorreactividad de una gran cantidad de anticuerpos contra las proteínas que estudiaremos en casos con la EA. Así que con la estrecha colaboración de ambas instituciones (CINVESTAV- Hospital General), el tiempo posmortem varió de 2-6 hrs y se fijó el tejido cerebral adecuadamente, para preservar los sitios antigénicos, siendo este material muy valioso. La confirmación histopatológica a cargo de la Dra. Laura Chávez, por métodos convencionales (tinción HyE) y por nuestra parte, por métodos inmunohistoquímicos con ac's altamente específicos, que reconocen la proteína tau y amiloide- β , así como también tinciones argénticas del hipocampo y

las cortezas entorrinal y trans-entorrinal, se confirmaron con la patología de Alzheimer.

Este trabajo, es uno de los primeros que se hace con cerebros de la población mexicana y con el desarrollo y apoyo de las autoridades de salud. Este banco seguirá apoyando al estudio de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, no sólo a México sino también a América Latina.

En el presente trabajo, se han analizado los cambios iniciales que sufre la neurona y el procesamiento de la molécula de la proteína tau, así como el proceso de evolución de la formación de la MNF en el cuerpo neuronal.

En los últimos años, han prevalecido dos hipótesis que han tratado de explicar la formación de la MNF en la EA: una de ellas es la hiperfosforilación y la proteólisis endógena (truncación), en la cual, la primera hipótesis es fuertemente apoyada por una gran cantidad de estudios y grupos de investigación en el mundo. Sin embargo la truncación ha sido apoyada solamente por algunos grupos (Wischnik C.M., y col., 1985, 1988b, 1995b, Novak M y col., 1991, 1993, 1994, 2004 y Mena R y col., 1991, 1995, 1996). Los modelos que han tratado de explicar la formación de la MNF en la EA, se basan prácticamente, en estudios usando métodos inmunológicos. Con esta ventaja se han desarrollado una gran cantidad de ac's para ambos eventos en el cual se incluyen ac's como el AT8 que reconoce una hiperfosforilación en los aminoácidos 202 y 205; S422 (fosforilación en Ser 422) entre otros. Y para la truncación se desarrolló en ac 423 (reconoce la truncación en el aa Glu-391 (Goedert M y col., 1995, Wischnik C.M y col., 1998, Novak M. y col., 1993). Recientemente, el papel de la truncación de la proteína tau por ejemplo la truncación del núcleo mínimo del filamento (Wischnik C.M y col.,

1998 a, b) ha recibido una particular atención, ya que se ha sugerido que algunas especies de tau truncada promueven la polimerización de tau in vitro (Abraha A. y col., 2000, Berry R.W., y col., 2003, Gamblin T.C. y col., 2003). Recientemente, una nueva generación de ac's, se han obtenido y clasificado como marcadores conformacionales, en los cuales sus epítopes son regiones discontinuas a lo largo de la molécula de tau (Carmel G y col., 1996, Jicha G y col., 1997, 1999, Ghoshal N. y col., 2001). Con esta evidencia, se ha podido observar que los cambios conformacionales de la proteína tau están involucrados en el procesamiento patológico y formación de los FHA en la EA. Con el uso de estos ac's que reconocen los cambios conformacionales, se ha podido observar que la molécula de tau puede adoptar dos tipos de cambios conformacionales, uno es el cambio conformacional regional evidenciado por los ac's AT100 y TG-3 (Zheng-Fischhöfer Q y col., 1998, Jicha G y col., 1997) y el otro es el cambio conformacional estructural evidenciado por los anticuerpos Alz-50, MC1 y Tau-66 (Carmel G. y col., 1996, Jicha G. 1997, 1999, Ghoshal N. y col., 2001). Recientes estudios utilizando estos marcadores (Alz-50, Tau 66 y 423), han demostrado que el ac Tau-66 (cambio conformacional estructural), se encuentra como un evento intermedio en el procesamiento de la molécula de tau (García-Sierra F y col., 2003, Guillozet-Bongaarts A y col., 2004), mientras que los ac's MC1 y Alz-50, se han asociado a las etapas iniciales en el proceso de la neurodegeneración (García-Sierra F. y col., 2003, Weaver C.L. y col., 2000). Jicha A. (1999), observó que estos marcadores se encontraban en una forma soluble en el citoplasma, previo, al ensamble de los FHAs.

ETAPAS DEL PROCESAMIENTO PATOLÓGICO DE LA PROTEÍNA TAU EN LA EA

I. PATRONES DE INMUNORREACTIVIDAD DEL AC TG-3

Mediante recombinantes de tau, se determinó que el epítoto del ac TG-3 se encuentra en la Thr 231 y éste es dependiente de fosforilación, mientras que si la Ser 235 se encuentra fosforilado, la inmunorreactividad del ac TG-3 se abate, a menos que esta región de la molécula se encuentre en una conformación adecuada. Lo cual sugiere que esta conformación de tau es exclusiva de la EA (Jicha G. y col., 1997; Matsuo y col. 1994). Se demostró que ambos epítotos se encuentran fosforilados en biopsias de cerebros normales, lo cual sugiere que esta fosforilación no es específica para la EA, pero si el cambio conformacional evidenciado por el anticuerpo TG-3 (Jicha G. y col., 1997). En el presente trabajo, se estudiaron sistemáticamente los cambios morfológicos que sufren las neuronas en la acumulación de las MNFs en los hipocampos humanos con la EA, mediante dobles y triples inmunotinciones con ac's, creados contra diferentes regiones normales y anormales de la proteína tau (Ver Tabla 2). Como contraindicación, cuando se pretendió analizar el ensamble de la proteína tau, se empleó el RT (Ver material y métodos). Al analizar los resultados con los diferentes patrones de inmunorreactividad, pudimos definir 4 diferentes patrones que parecen representar estadios o etapas en la formación de filamentos por el auto-ensamble de la tau. Estas etapas distinguen desde los patrones granulares difusos (Fig.11-18. A.) Tipo 1, estadios pre-ensamble o de pre-MNF (Fig 11, 13. B), hasta las MNF intracelulares (Fig 11. C,D, 13. C-E, 14. B-D Tipos 2 y 3) y la MNF extracelular (Fig

11. E, 19. A, 20. B. Tipo 4). A continuación, detallaremos estas estructuras con relación a las evidencias que apoyan su presencia en la EA.

Etapa de pre-maraña. Tipo I. Esta primera etapa de agregación patológica de la proteína tau, se caracterizó por una inmunorreactividad granular difusa, distribuida en la región perinuclear (Fig 11A, cabeza de flecha), así como en el citoplasma neuronal (Fig 11A, Flecha). Estos depósitos difusos fueron detectados por la mayoría de anticuerpos utilizados en este trabajo (ver Fig.11-18. A.) excepto por el ac 423 (no se muestra) Estos depósitos granulares difusos no fueron detectado por el colorante TR (Fig 11. A, RT), lo cual sugiere que la proteína tau en esta etapa, aunque está agregada, no se encuentra ensamblada. Los depósitos de los gránulos de lipofuscina autofluorescentes y detectadas en el canal rojo, que se acumulan en la región perinuclear de estas células (Fig. 1.A, *), favoreció la identificación de esta primera etapa de acumulación de tau en el soma neuronal. Previa publicaciones del tema, han demostrado que la máxima densidad de esta acumulación granular en los casos pre-clínicos de la EA, sin embargo, esta densidad tiende a disminuir conforme avanza el estado de severidad de la enfermedad (Uboga N y Price L 2000), por lo tanto esta acumulación granular difusa, no correlaciona con el grado de deterioro cognoscitivo (García-Sierra F. y col., 2000). Estas observaciones, concuerdan con nuestros resultados en donde la acumulación granular difusa en el citoplasma de las neuronas, es el primer evento que parece ocurrir durante el proceso inicial de acumulación anormal de la proteína tau, previo a su polimerización. Esto también es defendido por otros autores, quienes no han encontrado afinidad del TR con estos depósitos

granulares (Uchihara T y col., 2001; Galván M y col., 2000; García-Sierra F. y col., 2000), lo cual nos sugiere que esta acumulación de tau, se encuentra en forma soluble. Esta acumulación granular citoplásmica comúnmente se pudo observar en las áreas CA1 y CA1-CA4 del hipocampo que son regiones en donde la degeneración neurofibrilar, se encuentra con un mayor grado de desincronización y al parecer es más resistente a la neurodegeneración.

MNF Tipo II. Este tipo de MNF intracelular, se caracteriza por la presencia de varios sitios en forma de "frijol", que parecen ser áreas de nucleación de los agregados de la proteína tau y se caracterizan por una fuerte inmunorreactividad verde que evidenció la proteína tau hiperfosforilada (AT8), los cuales colocalizan fuertemente con el RT (Fig 11 B. flechas). Estos puntos de "pre-maduración" de las marañas se encontraron tanto asociadas a los gránulos de lipofuscina como a lo largo del citoplasma (Fig 11. B). Estos depósitos, fueron detectados por marcadores fosforilados (Fig 11, 13. B). Observaciones semejantes fueron descritas previamente (Galván M. y col., 2000 y García-Sierra F. y col., 2001), en donde ambos observaron estas acumulaciones, en pequeños paquetes con los ac's AD2 y AT8. Así mismo, se detectó una inmunorreactividad correspondiente a la etapa inicial, descrita arriba (Fig 13. B, flecha).

MNF Tipo III. Este tipo de MNF, parece corresponder a la maraña intracelular típica descrita previamente, por numerosos autores (Mena y col., 1991, Braak y Braak 1994, García-Sierra y col., 2000, Galván M. y col., 2001). Esta lesión se ilustra en la figura 11 C, D 14 B-D y se caracteriza por una estructura en forma de

flama que presenta una intensa fluorescencia. Esta MNF es compacta, los FHA han invadido por completo el soma neuronal, pero aún se observa el núcleo. Este Tipo de MNF fue detectada por los ac's TG-3, (Figs 11 C, D), Alz-50 (Fig 13. C-E), AT100 (Fig 15, 17. C), AT8 (Fig 16. C), ya que la gran mayoría de anticuerpos dirigidos contra la proteína, tau dependientes o no de fosforilación, son positivos (Jicha G y col., 1997, Vincent I y col., 1998, Mena R. y col., 1991,1995. 1996 Weaver C y col., 2000), en menor o mayor grado lo cual depende del evento de maduración de la MNF, en esta etapa se han podido determinar los cambios más drásticos en la proteína tau (García-Sierra F. y col., 2003).

MNF Tipo IV. La figura 11E ilustra este tipo de la MNFe, la cual se caracteriza por una apariencia laxa, por la extensa proteólisis extracelular. Esta maraña fue reconocida únicamente por el ac 423 (Fig 19. A, 20 B). Sin embargo, gran cantidad de estas MNFe fue reconocida también o únicamente por el colorante RT (Figs 11. E, 19. A). Como ha sido demostrado previamente (Mena y col., 1995; 1996), estas MNFe pierden progresivamente la afinidad RT conforme ocurre el procesamiento proteolítico de la lesión en el espacio extracelular. Este tipo de maraña, parece ser la etapa final del proceso de neurodegeneración asociado a la EA. Estos resultados, apoyan la propuesta de que el núcleo mínimo de los FHAs, que se caracteriza por un truncamiento en el Glu-391 del carboxilo terminal de la proteína tau y es reconocido específicamente por el ac 423, es insoluble, altamente estable y resistente a proteólisis (Mena y col., 1992, 1995) y García-Sierra y col., (2000).

En general, en la transición de MNFi a MNFe, se ha podido observar con la inmunorreactividad del ac AD2; la tinción con este anticuerpo en MNF transicional

es de patrón granular (Galván M y col., 2000) pero morfológicamente diferente a la tinción granular difusa citoplásmica, descrita en este estudio o correspondiente a una etapa pre-MNF.

II. EL CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL (TG-3), ES UN EVENTO INICIAL EN EL PROCESO DE MADURACIÓN DE LA MARAÑA NEUROFIBRILAR (TR).

El procesamiento patológico de la proteína tau y su asociación con el cambio conformacional que evidenció el ac TG-3, se monitoreó con el colorante RT. Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio, lo dió la observación de que la tinción granular citoplásmica detectada por el ac TG-3 no colocalizó con el RT (Fig 11A flechas), esto sugiere que el cambio conformacional regional, detectado por el marcador en estos gránulos citoplásmicos, se presenta previo a la conformación β -plegada, lo que sugiere que la proteína tau se encuentra aún en una forma soluble en dichas estructuras (Galván M. y col., 2001, García-Sierra F y col., 2000 Uchihara T y col., 2001). Por otro lado, se observaron células neuronales en las cuales el árbol dendrítico presentó una fuerte inmunorreactividad con el ac TG-3, y éste colocalizó con el colorante RT, en estas zonas la proteína tau se encuentra ensamblada en un filamento con una conformación β -plegada. Se ha observado que en las terminales neuronales y a lo largo del axón, los microtúbulos y la proteína tau, se incrementan progresivamente y hay una elevada concentración de proteína tau en el cono axonal y este es muy sensible a las drogas que despolimerizan los microtúbulos *in vitro* (Black M. M., y col., 1996). Si ocurriese una despolimerización de los microtúbulos en el árbol dendrítico y perdiendo la

afinidad de la proteína tau por la tubulina se facilitaría el acercamiento de las moléculas de tau, en un espacio muy reducido. Podría facilitar los cambios conformacionales de la molécula (evidenciados por los anticuerpos TG-3 y Alz-50), activando de esta manera los primeros depósitos de proteína tau ensamblada en filamentos reconocidos por el RT.

En la mayoría de las MNFi, la inmunorreactividad del anticuerpo TG-3 colocalizó en diversos grados con el colorante RT (Fig 11. C,D). Se observó una población de MNF que colocalizaban en su totalidad con el RT, sin embargo en otra población de MNFi la inmunorreactividad del anticuerpo TG-3, tendió a disminuir mientras que el RT reconocía fuertemente estas estructuras. Estos resultados indican que en el proceso de maduración de la MNFi, el cambio conformacional regional (ac TG-3) progresa con la maraña reconocida por el RT y este cambio conformacional regional tiende a perderse en la transición de MNFi a MNFe en proceso de maduración de la MNF. Estos resultados, concuerdan con observaciones previas con el ac AT8 y RT (García-Sierra F. 2000, Uchihara T. y col., 2001). Esta serie de hallazgos, indican que el cambio conformacional regional (TG-3), se presenta en los estadios iniciales de la acumulación de la proteína tau, en el soma neuronal Augustinack J., (2002) encontró que el anticuerpo TG-3 reconoce MNFe, resultados contrarios a los nuestros. Esta diferencia posiblemente se deba a que ellos realizaron su estudio en cortes de parafina de 5µm. La tinción y el análisis se basó, en una tinción de peroxidasa y morfológicamente sugieren que es MNFe por que no observan el núcleo, observación que pudo no ser correcta. Con relación a esto, el presente estudio se

realizó con más detalle bajo microscopia confocal, los cortes de 50 μm en el cual incluían toda la estructura y contrateñida el tejido con el RT mediante el cual podíamos diferenciar claramente la MNFi de la MNFe. La pérdida de inmunorreactividad del TG-3 en las MNFe sugieren que las porciones N-y C- han sufrido truncaciones, así como una serie de cambios estructurales en la molécula perdiéndose la afinidad de los anticuerpos que reconocen MNFi (García-Sierra y col., 2003, Gamblin C. y col., 2003).

III. EL CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL DETECTADO POR EL TG-3 PRECEDE AL CAMBIO CONFORMACIONAL ESTRUCTURAL (ALZ-50)

En el presente estudio, mediante dobles tinciones del TG-3 y Alz-50 y su análisis con la microscopia confocal, se encontraron evidencias en donde la fosforilación en el aa Thr-231 (sitio putativo del cambio conformacional regional TG-3) se presenta previo al cambio conformacional estructural, detectado por el anticuerpo Alz-50 (Fig 13. A). Tomando en cuenta las siguientes consideraciones: 1) Ambos anticuerpos se han asociado con la molécula intacta de la proteína tau (Jicha A. y col., 1997 y este estudio). 2) También se ha involucrado la truncación en estos procesos iniciales de la neurodegeneración (Mena R. y col., 1991, Ugolini G. y col., 1997), estos mecanismos se han asociado a la formación de los FHAs mediante la formación de heteropolímeros, en los cuales presentan monómeros de tau truncada y tau intacta (Guillozet-Bongaarts A. y col., 2004) en el procesamiento de la compleja cascada del procesamiento amiloidogénico de la proteína tau la cual culmina en los FHAs insolubles.

Recientemente Binder L y colaboradores han desarrollado un anticuerpo llamado tau-C3, el cual identifica una truncación en el Asp421 de la porción carboxilo terminal (Gamblin T.C. y col., 2003, Guillozet-Bongaarts A y col., 2004). Esta truncación es realizada por la caspasa 3, la cual está involucrada en la cascada de la vía apoptótica (Fasulo L y col., 2000). Esta truncación remueve la porción C- terminal. En este estudio se enfocó en el análisis de las consecuencias de la pérdida de esta porción y su procesamiento en la EA. Bajo este contexto se sabe que la molécula intacta de tau *in vitro* es capaz de polimerizarse en estructuras fibrilares. Sin embargo al remover la porción C-terminal la polimerización se potencializa (Kampers T y col., 1996). Por otro lado Abraha A y col., (2000), demostraron que la porción C- terminal puede inhibir en cierto grado el ensamblaje de tau. Estos autores sugieren que las modificaciones estructurales en esta porción de la molécula ya sea por fosforilación o truncación puede llevar un procesamiento progresivo de la molécula de tau en la cual se involucran plegamientos y truncaciones hasta mantener una conformación estable caracterizándose por la formación del FHA de tau.

IV. EL CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL (TG-3) RECONOCE LA PROTEÍNA TAU CON SU PORCIÓN AMINO Y CARBOXILO INTACTOS.

En nuestros resultados usando triples inmuno marcapjes combinando los anticuerpos TG-3, T46 y M19 marcadores del cambio conformacional regional, porción C- y N- terminal, respectivamente, se observaron ocasionalmente algunas neuronas con tinción granular difusa, reconocida únicamente por el anticuerpo M19G (Fig 14. A), y esta no colocalizó con el cambio conformacional

(TG-3) y C-terminal (T46). El ac TG-3 reconoció algunas estructuras vacuolares, mientras que el acT46 no fue inmunorreactivo en estos depósitos. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el remover la porción C-terminal, podría representar la primera modificación estructural de la molécula de tau, en la formación del FHA. De hecho el sitio antigénico del anticuerpo TG-3, requiere de la porción N-terminal de tau intacta, lo cual sugiere que el cambio conformacional regional relacionado con la fosforilación de la Thr 231, puede ocurrir previo a la truncación de la porción C-terminal.

Por otro lado, se ha demostrado por microscopia electrónica con la técnica de inmuno-oro que la inmunorreactividad del ac TG-3, así como el ac Alz-50, se observó asociado a un material amorfo, en el cual no había evidencia de FHAs como previamente lo describió Vincent I. y Jicha G. Estos resultados sugieren, que ambos cambios conformacionales (regional TG-3 y estructural Alz50), ocurren en la molécula de tau previo a la formación de los FHAs en el citoplasma. Por otro lado, la inmunorreactividad de ambos ac's, se relacionaron estrechamente a estructuras membranosas como son mitocondrias, lisosomas y núcleos (heterocromatina). En estudios previos Mena R y col., (1996) mostraron observaciones semejantes con la técnica de inmunomicroscopia electrónica, revelada con peroxidasa con el ac 423. Otros autores han encontrado a la proteína tau en el núcleo (Ellisman y col., 1987, Metzals y col., 1987, Loomis P.A., y col., 1990, Brady R y col., 1995, Jeffrey A. y col., 1987). Estas observaciones, sugieren que los elementos nucleares también se encuentran involucrados en el procesamiento anormal de la proteína tau en la EA.

En la EA comúnmente se observó, una serie de poblaciones neuronales las cuales se caracterizan por presentar una inmunorreactividad con marcadores de sus porciones C- (T46) y N- (M19G) terminal, en las cuales la molécula de tau se mantiene intacta, la cual se asocia estrechamente con el cambio conformacional regional (TG-3), colocalizando los tres marcadores (Fig 14. B). Sin embargo, se observó otra población de MNFi, las cuales carecían de su porción C- o N-terminal (Fig. 14 C) o ambos (Fig 14.D) en la MNFi, esto sugiere que en el FHA pueden coexistir varios procesamientos en el FHA de tau (heteropolímeros). Los eventos de pérdida de la porción C-terminal y N-terminal y el cambio conformacional se observaron fácilmente en las MNFs, debido a que estos dos eventos son drásticos en el procesamiento de la proteína tau. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por García-Sierra F y col., (2003), Guillozet-Bongaarts A y col., (2004), en donde describen que la porción C-terminal, es hidrolizada por la acción de la caspasa-3 en el aa Asp421. Por otro lado, Gou H y col., 2004 desarrollaron un anticuerpo que reconoce la forma activa de la caspasa-6. Al analizar la actividad de este anticuerpo en cerebros con la EA, ellos observaron una estrecha asociación de la inmunorreactividad de este anticuerpo con las MNFi, HN y en NDs de las PN. Estudios recientes *in vitro*, determinaron que la actividad proteolítica de la caspasa-6, se realiza en la posición del aa D(Asp)-13 de la porción N-terminal (Horowitz P. y col., 2004). En general en el escenario de la cascada del procesamiento amiloidogénico de tau, se involucran moléculas de tau con los tres tipos de conformaciones. 1- Proteína tau intacta, 2- Regionalmente modificada y fosforilada y 3- Especies de proteína tau, estructuralmente modificadas (tau truncada en su porción C- y N-terminal).

V. CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL TG-3 VS. AT100

En la EA ocurre una hiperfosforilación de la proteína tau, la cual puede llevar o facilitar la agregación a los FHAs (Grundke-Iqbal 1986). Ha sido muy interesante observar, como algunos ac's sensibles a los cambios conformacionales o al estado de fosforilación de la proteína tau. El ac AT100 es particularmente interesante, por que tiene una elevada especificidad por la proteína tau en la EA, en contraste con otros ac's que reconocen fosfoepítopes de la fracción normal de tau de adulto o tejido fetal (Matsuo y col., 1994). Watanabe y col., (1993) demostró que en la proteína tau normal de adulto o fetal presenta una serie de sitios putativos de fosforilación, sin embargo los FHAs en la EA mostraron específicamente, un incremento en la fosforilación de Thr212 y Ser214 (Morishima-Kawashima y col., 1995), lo cual es consistente con el epítope de AT100. Para la formación del epítope de AT-100, se requiere una fosforilación secuencial. Primero, se fosforila la región del epítope del anticuerpo AT8 (Ser199, Ser202 y Thr205) y posteriormente Thr212 generándose la mitad del epítope del AT100 y finalmente se fosforila la Ser214, induciendo el epítope de AT100. Las primeras dos condiciones son independientes unas de otras. La fosforilación de la Thr212, se realiza cuando previamente se ha formado el epítope de AT8 y la fosforilación de la Thr212, puede ser bloqueado si se fosforila primero la Ser214. Por lo tanto, el epítope de AT8 aparece primero que el epítope de AT100. Bajo este contexto, se pudieron determinar diferencias notables en la tinción granular difusa. En la cual, pudimos observar la inmunorreactividad del ac TG-3, independiente de la inmunorreactividad del ac AT100 (Fig 15. A), sin embargo en otras células neuronales, esta tinción granular difusa colocalizaron ambos

anticuerpos (Fig. 15 B). Estos resultados sugieren, que el primer cambio conformacional regional que se presenta en la molécula de tau, es el evidenciado por el TG-3 y posteriormente se forma el epítotope del AT100, previa fosforilación del epítotope de AT8 (Zheng-Fischhöfer Q y col., 1998). En la mayoría de las MNFi, colocalizaron ambos ac's (Fig 15. C).

VI. LA FOSFORILACIÓN DE SER202 Y THR205 (AT8), ES POSTERIOR AL CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL TG-3.

Como previamente se describió (Zheng-Fischhöfer y col., 1998) para generar el epítotope del ac AT100, se requiere primero el epítotope del ac AT8. La inmunorreactividad de ambos ac's (TG-3 y AT8), colocalizaron en la mayoría de las MNFi. Sin embargo, la diferencia pudo observarse en la tinción granular difusa, en la cual el cambio conformacional regional TG-3, se expresa primero que el epítotope del ac AT8 (Fig 16. A). En otra población de neuronas con tinción granular difusa, se pudo observar una colocalización de ambos marcadores (Fig 16. B). Contrario a lo que describe Augustinack J y col., (2002), en donde sus observaciones sugieren que predominantemente el AT8 tiñe MNFi y MNFe, en nuestro caso nunca observamos MNFe teñidas por este ac, por otro lado mencionan que este ac AT8 raramente tiñe de una manera granular difusa y ubican en el último paso en la progresión en la MNFe. Nuestros resultados indican, que la inmunorreactividad del ac AT8 se ubica en un evento inicial en el procesos de la neurodegeneración previa al cambio conformacional regional evidenciado por el ac AT100 y posterior al TG-3.

VII. EL CAMBIO CONFORMACIONAL REGIONAL AT100, ES PREVIO AL CAMBIO CONFORMACIONAL ESTRUCTURAL (ALZ-50)

Para confirmar y brindar más apoyo a la hipótesis de que los cambios conformacionales regionales preceden al cambio conformacional estructural (Alz-50) combinamos el ac AT100 con el ac Alz-50 (Fig 17). Los resultados obtenidos en este estudio previamente descritos, han demostrado que la inmunorreactividad del ac AT8 es posterior al TG-3 y éste es previo al AT100. Estudios realizados por Zheng-Fischhöfer y col., (1998), demostraron que el AT8 es previo al AT100. Ahora con el ac Alz-50, nuestros resultados sugieren que se expresa este epítipo previo al cambio conformacional estructural (Alz-50 Fig 17. A). Este cambio conformacional regional (AT100), se encuentra estrechamente asociado al cambio conformacional estructural, debido a que en la mayoría de las células granulares, se presentaron ambos ac's aunque predominaba la inmunorreactividad del ac AT100 y generalmente colocalizan en diversos grados ambos ac's, lo cual sugiere que al formarse el epítipo del ac AT100 este inmediatamente podría tener mayor efecto en el plegamiento de la porción N-terminal sobre el tercer dominio (Alz-50). En forma general, nuestros resultados sugieren que una serie de cambios conformacionales regionales (TG-3 y AT100), pueden facilitar el plegamiento de la porción N-terminal, acercándolo al tercer dominio repetido (Alz-50). Así mismo, Jicha G. y col (1997), han sugerido que la curvatura del plegamiento en el cambio conformacional estructural Alz-50, ocurre en la vecindad del residuo fosforilado Thr231.

VIII. PROTEÓLISIS DE LA MOLÉCULA DE TAU TG-3 O S199 / 423

Debido al hallazgo de dos sitios específicos de proteólisis endógena de la proteína tau en la EA (Glu-391, y Asp 421), como parte de una secuencia de eventos moleculares implicados en el procesamiento amiloidogénico, se discutirán

brevemente los hallazgos obtenidos con el TG-3, con otros marcadores de fosforilación anormal y con la truncación en el Glu-391 (423), Mena R. y col., (1991, 1996) y García-Sierra F. y col., (2001), caracterizaron al ac 423, el epítipo de éste ac, no se sabe qué lo genera en el tejido cerebral. Este evento se ha asociado a la etapa final en el procesamiento de la molécula de tau, el cual carece de sus porciones N- y C-terminal (Novak M. y col., 1993, 1994, García-Sierra F. y col., 2003 y Horowitz P. y col., 2004). En el análisis del cambio conformacional regional inicial (TG-3, residuo Thr231) y con el ac S199 (Ser199 dependiente de fosforilación), monitoreando simultáneamente el estado de ensamble de la proteína tau. La inmunorreactividad del anticuerpo TG-3 y S199, en ningún momento colocalizó en las MNFi o MNFe con el anticuerpo 423 (Fig 19, 20...A, B, C) manteniéndose independientes unos de otros. Estos resultados nos sugieren que son eventos distantes en el procesamiento de la molécula de tau, como previamente fue descrito (García-Sierra F. y col., 2003, Guillozet-Bongaarts A. y col., 2004, Horowitz P. y col., 2004). Previos estudios han descrito, que la proteína tau truncada *in vitro*, puede asociar tau intacta (Wischnik M.C. y col., 1987), por lo cual podría ocultarse el epítipo del ac TG-3 y S199 (ac's que en este trabajo, se han sugerido como eventos muy tempranos en el proceso de evolución de la proteína tau), en esta compleja acumulación de FHAs que forman la MNF. Se utilizó ácido fórmico para tratar de exponer epítopes (Mena R. y col., 1996, García-Sierra F. y col., 2001), ya sea tanto en las MNF, inmunorreactivas a los ac's TG-3 y S199 o tratar de observar estos eventos iniciales en la MNF reconocida por el ac 423. En el análisis de estas estructuras, se pudo observar que la inmunorreactividad de ambos ac's (TG-3 y S199), no colocalizaron con la

inmunorreactividad del anticuerpo 423 (Fig 20). Este resultado sugiere que la truncación en la MNF ya formada no se ocultan o enmascaran epítopes de tau completa, corroborando que la truncación es un evento terminal en el procesamiento de la molécula de tau en evolución de la formación de la MNF. Sin embargo, Mena R.y col., (1991) describieron una tinción granular difusa citoplásmica reconocida por el ac 423. Resultados tomados con ac's, que reconocen la porción N- y C-terminal evidenciaron una tinción granular difusa citoplásmica, la cual no colocaliza con el marcador de la porción C-terminal y el cambio conformacional regional (TG-3), futuros experimentos se requieren para discernir estas observaciones previas.

IX. MODELO DEL PROCESAMIENTO PATOLÓGICO INICIAL DE LA PROTEÍNA EN LA EA DEL ESTADO SOLUBLE AL FILAMENTOSO.

El dinamismo de la molécula de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con nuestros resultados indican una secuencia de eventos iniciales que comienzan con un cambio conformacional regional relacionado con el ac TG-3, en el camino del cambio de la proteína tau en un estado soluble a uno filamentoso. De acuerdo a esto, inicialmente la proteína tau se encuentra intacta en sus porciones amino y carboxilo terminal, posteriormente la molécula es fosforilada en la región Thr231 (epítopo del anticuerpo TG-3), posteriormente la molécula de tau sufre una fosforilación alrededor del epítopo de AT8 (aa's 200, 205) y posteriormente, se genera el siguiente cambio conformacional AT100. Ambos cambios conformacionales regionales, favorecen que la molécula de tau pliegue su porción amino, sobre el tercer dominio repetido (epítopos del anticuerpo Alz-50), en este momento ambos ac's colocalizan (TG-3/Alz50, AT100/Alz-50). De tal

manera que en un proceso posterior la molécula sufre una proteólisis inicial en la porción carboxilo terminal en este momento al perderse esta porción (T-46, epítipo 404-441), no afecta la inmunorreactividad del TG-3. Posteriormente, en una etapa más avanzada se pierde la porción amino terminal en la cual afecta la inmunodetección del ac Alz-50, preservándose aún el epítipo del ac TG-3, sin embargo cuando se incrementa la proteólisis en la molécula de tau, y como límite observamos la inmunorreactividad del ac 423 la cual abate completamente la inmunorreactividad del ac TG-3, Todo este complejo mecanismo se encuentra esquematizado en la Fig 21.

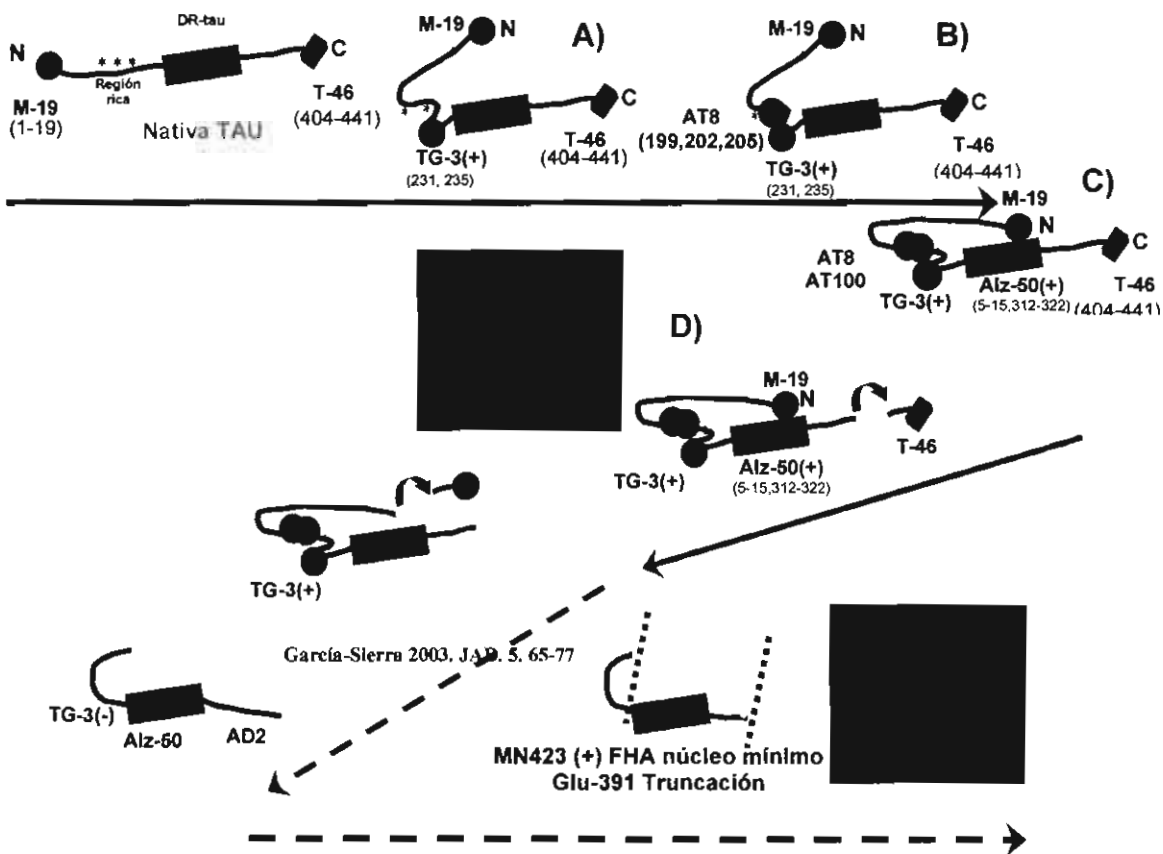


Fig 21. Modelo de los cambios conformacionales iniciales de la proteína tau, en el proceso de neurodegeneración en la EA. La proteína tau nativa se acumula en el soma neuronal, A) el primer

cambio que sufre la molécula de tau es el cambio conformacional regional TG-3. B) posteriormente se fosforila el epftope del ac AT8 (aa's 199, 202, 205) y los aa's 212 y 214 para generan el cambio conformacional regional AT100, C) Posiblemente una serie de cambios conformacionales regionales, faciliten el plegamiento de la molécula de tau generándose el cambio conformacional estructural Alz-50. D) Al perderse la porción C-terminal podría inducir la polimerización de la tau soluble en pequeños sitios de nucleación (forma de frijo). E) De manera secuencial se proteolisa la porción N-terminal, manteniéndose hasta este punto, los dos cambios conformacionales. F, G) Etapas posteriores que ocurren en el FHA, en la MNFi y MNFe (ver para detalles García-Sierra F y col., 2003)

CONCLUSIONES.

1. El procesamiento patológico inicial de la proteína tau en el mecanismo de formación de los FHAs, se caracteriza por una fosforilación anormal en el aa thr231 que determina un cambio conformacional regional de la proteína tau en la EA
2. Los cambios conformacionales regionales de la proteína tau asociados con fosforilaciones anormales, preceden al cambio conformacional estructural de la molécula.
3. El cambio conformacional regional detectado por el ac TG-3, es más conservado en el proceso de la proteólisis de la proteína tau, al cambio conformacional estructural detectado por el ac Alz-50.
4. La pérdida del extremo C-terminal de la molécula de tau parece ser un evento molecular muy significativo, en las fases iniciales de su procesamiento patológico.
5. El procesamiento patológico de la proteína tau en la EA se caracteriza por eventos de fosforilación y truncación, los cuales parecen presentarse desde los estadios iniciales. Ambos eventos, sin embargo, no parecen coincidir espacialmente.

BIBLIOGRAFÍA.

Absher J.R. y Cummings J.L. (1994). Cognitive and no cognitive aspects of dementia syndromes: an overview, en dementia. Edit. A. Burns y R Levy. Chapman & Hall. London, England.

Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J, Binder LI. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 113:3737-3745.

<http://www.adaptogeno.com/noticiero18.htm>

ADEAR (Alzheimer's Disease Education & Referral center) (2002). <http://www.alzheimers.org/pubs/adfact-spanish.html>

Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* 23(17):3585-3593.

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry.* 1992 Nov 3;31(43):10626-33

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex.* 1991 Jan-Feb;1(1):103-16

Arrasate M, Perez M, Valpuesta JM, Avila J. (1997). Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol.* 151(4):1115-22.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease *Neurology.* 42:631-639.

Asociación Mexicana de Alzheimer y Enfermedades Similares (AMAES). 1998

Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 103:26-35.

Ball MJ, Griffin-Brooks S, MacGregor J-A, Nagy B, Ojalvo-Rose E, Fewster PH (1988). Neuropathological definition of Alzheimer's disease: multivariate analysis in the morphometric distinction between Alzheimer's dementia and normal aging. *Alzheimer Dis Assoc Disord* ; 2: 29-37.

Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM. (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 477:90-99.

Berry RW, Abraha A, Lagalwar S, LaPointe N, Gamblin TC, Cryns VL, Binder LI. (2003). Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry.* 42:8325-8331.

Billingsley M. L., and Kincaid R.L. (1997). Regulates phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interactions, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J.* 323, 577-591

Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry.* 114:797-811

Bondareff W, Wischik CM, Novak M, Amos WB, Klug A, Roth M. (1990). Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. An immunohistochemical study. *Am J Pathol.* 137:711-723.

Bondareff W, Mountjoy CQ, Wischik CM, Hauser DL, LaBree LD, Roth M. (1993). Evidence of subtypes of Alzheimer's disease and implications for etiology. *Arch Gen Psychiatry.* 50:350-356.

Black MM, Slaughter T, Moshia S, Obrocka M, Fischer I. (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci.* 16:3601-19

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

Braak E., Braak H. Y Mandelkew E.M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* 87, 554-567

Brandt R, Leger J, Lee G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain *J Cell Biol.* 131.1327-1340

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. 1985 The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 101:1371-1378.

Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI. (1995). Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging.* 16:479-486

Buee L, Delacourte A. (1999). Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* 1999 Oct;9(4):681-93

Buee-Scherrer V., Pau B., Condamines O., Mourton-Guilles C., Jakes R., Goedert M., Pau B. Y Delacourte A. (1996). AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39,79-88

Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA. (1995). beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron.* 14:879-888.

Carmel G., Mager E.M., Binder L.I., Kuret J. (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's Disease Pathology. *J Biol Chem.* 271(51): 32789-32795.

Correas I, Padilla R, Avila J. (1990). The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J.* 1;269. 61-64.

Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G. (1995). Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 89:291-295.

Crowther RA, Wischik CM. (1985).Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament. *EMBO J.* 4:3661-3665

Eidenmuller J, Fath T, Hellwig A, Reed J, Sontag E, Brandt R. (2000). Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry.* 39:13166-13175.

Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E. (1998).Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol.* Nov 2;143(3):777-94.

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. *JAMA.* 262:2551-2556

Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A. (2000). The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem.* 75(2):624-633.

Federación Internacional de Alzheimer (2000)

Flament S., Delacourte A., Verny M., Hauw J.J. y Javoy-Agid F. (1991). Abnormal tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol.* 81. 591-596

Gamblin TC, Berry RW, Binder LI. (2003). Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis. *Biochemistry.* 42(51):15009-15017.

Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abrahama A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL.(2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10032-10037.

Galván M, David JP, Delacourte A, Luna J, Mena R. (2001). Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2. *J Alzheimers Dis.* 3(4):417-425.

García de Ancos J, Correias I, Avila J. (1993). Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms. *J Biol Chem.* 268:7976-7982.

García-Sierra F., Hauw J.J., Duyckaerts C., Wischik C.M., Luna Muñoz J., Mena R. (2000). The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in very old. *Acta Neuropathol.*100:29-35.

García-Sierra F., Goshal N., Quinn B., Berry W., R., Binder I. L. (2003). Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Disease.* 5. 65-77

García-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Muñoz J, Mena R. (2001). Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat.* 22:65-77

Giaccone G, Pedrotti B, Migheli A, Verga L, Perez J, Racagni G, Smith MA, Perry G, De Gioia L, Selvaggini C, Salmona M, Ghiso J, Frangione B, Islam K, Bugiani O, Tagliavini F. (1996). beta PP and Tau interaction. A possible link between amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 148:79-87.

Glennner G.G. y Wong C.W. (1984). Alzheimer's disease:Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120. 885-890

Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.*8:159-168.

Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E. (1995). Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett.* 189:167-9.

Goedert M, Jakes R., Crowther R.A., Six j., Lubke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J.Q., Lee V.M-Y. (1993). The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:5066-5070

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3(4):519-526

Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 41(1):17-24.

Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 16:4491-44500

Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC. (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell.* 8(2):353-65.

Ghoshal N., García-Sierra F., Fu Y., Beckett L.A., Mufson E.J., Kuret J. Berry R.W., Binder L.I. 2001. Tau 66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 77. 1372-1385

Greenberg S.G. y Davis P. (1990). A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrilamide gel electrophoresis. *Proc Nat. Acad. Scie. USA.* 87,5827-5831

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4913-4917.

Guillozet-Bongaarts A. García-Sierra F., Reynolds M.R., Horowitz P., Fu Y., Wang T, Cahill M, Biogio H, Berry W., Binder L. (2004). Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow, Selkoe D J. (1992) Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism *Nature.* 24;359(6393):322-5

Hanger DP, Brion JP, Gallo JM, Cairns NJ, Luthert PJ, Anderton BH. (1991). Tau in Alzheimer's disease and Down's syndrome is insoluble and abnormally phosphorylated. *Biochem J.* 1991 Apr 1;275 (Pt 1):99-104.

Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. (1992). Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *Biol Chem.* 267.17047-17054.

Hyman BT, Kromer LJ, Van Hoesen GW. (1988). A direct demonstration of the perforant pathway terminal zone in Alzheimer's disease using the monoclonal antibody Alz-50. *Brain Res.* 450:392-397.

Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* 107.1449-1459.

Hock C, Drasch G, Golombowski S, Muller-Spahn F, Willershausen-Zonnchen B, Schwarz P, Hock U, Growdon JH, Nitsch RM. (1998). Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 105(1):59-68.

Hollenbeck PJ, Swanson JA. (1990). Radial extension of macrophage tubular lysosomes supported by kinesin. *Nature.* 346:864-866.

Horowitz P.M, Patterson K. R, Guillozet-Bongaarts A. L, Reynolds M. R, Carroll C. A, Weintraub S. T, Bennett D. A, Cryns V. L, Berry R. W, Binder L. I. (2004). Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 24(36):7895-78902

Hua Q, He RQ, Haque N, Qu MH, del Carmen Alonso A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci.* 60(2):413-21.

Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325:167-72.

Jaspert A, Fahsold R, Grehl H, Claus D. (1995). Myotonic dystrophy: correlation of clinical symptoms with the size of the CTG trinucleotide repeat. *J Neurol.* 242. 99-104.

Jenkins S.M, Johnson GV. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport.* 5:9(1).67-71.

Jicha A.G., Berenfeld B, Davies P. (1999). Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 15;55(6):713-23

- Jicha A.G.**, Bowser R., Kasam I.G., y Peter D., (1997a). Alz-50 and MC-1 a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosc. Res.* 48:128-132
- Jicha A. G.**, Lane E., Vincent I., Otvos L Jr., Hoffman R., Davies P. (1997b). A conformational- and phosphorylation- dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 69. 2087-2095
- Kampers T**, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 399. 344-9.
- Kanai Y**, Chen J, Hirokawa N. (1992). Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J.* 11:3953-3961
- Khatoon S**, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1994). Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.* 351. 80-4.
- Kidd M.** (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197:192-193.
- Kimura T, Ono T**, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Ihara Y, Miyamoto E, Miyakawa T. (1996). Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia.* 7(4):177-181.
- Kondo J**, Honda T, Mori H. (1988). The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-34.
- Kosik KS**, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* Apr;2(4):1389-1397
- Lee G**, Neve RL, Kosik KS. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron.* 2(6):1615-24.
- Lemere C.A**, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 3(1):16-32.
- Lee G**, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 111. 3167-77.
- Lindwall G.** y Col.,e R.D. (1984). Phosphorylation effects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J.Biol. chem.* 259, 5301-5305

Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov;87(21):8422-6.

Mandelkow E, Mandelkow EM. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 7:72-81.

Matsuo E.S, Shin R. W, Billingsley M. L, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski J. Q, Lee V. M. (1994). Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron*. 13(4):989-1002.

Mena R., Wischik C.M., Novak M.Milstein C., Cuello A.C. (1991). A progressive deposition of paired helical filament (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. An immunocytochemical study with a monoclonal antibody against the PHF core. *J. Neuropathol Exp Neurol*. 50(4):474-490

Mena R., Edwards P.C., Pérez-Olvera O., Wischik C.M. (1995) Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 89:50-56

Mena R., Edwards P.C., Harrington C.R., Mukaetova-Ladinska E.B. y Wischik C.M. (1996). Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 91, 633-641

Morris RL, Hollenbeck PJ. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol*. 131:1315-1326.

Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y. (1995). Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem*. 270:823-829

Mortimer J.A, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Rocca WA (1991). Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol*. 20 Suppl 2:S28-35.

Muñoz-Montaña JR, Lim F, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J. Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Neurite Outgrowth in Cultured Neurons: Possible Implications for Neurite Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 1999 Dec;1(6):361-378

Nangaku M, Sato-Yoshitake R, Okada Y, Noda Y, Takemura R, Yamazaki H, Hirokawa N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*. 79:1209-1220

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387(3):271-80.

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

Novak M., Edwards P.C., Milstein C., Wischik C.M. (1991). Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of mAbs 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:5837-5841

Novak M., Kabat J. y Wischik C.M. (1993). Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer disease paired helical filament. *EMBO J.* 12, 365-370

Paudel HK. (1997). Phosphorylation by neuronal cdc2-like protein kinase promotes dimerization of Tau protein in vitro. *J Biol Chem.* Nov 7;272(45):28328-34

Perez M, Valpuesta JM, de Garcini EM, Quintana C, Arrasate M, Lopez Carrascosa JL, Rabano A, Garcia de Yébenes J, Avila J. (1998). Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am J Pathol.* 152:1531-1539.

Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry.* Dec 21;21(26):6942-50.

Rickard JE, Kreis TE. (1996). CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* 1996.6:178-183

Rubenstein R, Kascsak RJ, Merz PA, Wisniewski HM, Carp RI, Iqbal K. (1986). Paired helical filaments associated with Alzheimer disease are readily soluble structures. *Brain Res.* 372(1):80-88.

Sawa A, Oyama F, Matsushita M, Ihara Y. (1994). Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Brain Res Mol Brain Res* Nov;27(1):111-117

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature.* 1992 359:325-327.

Shoji M., Golde TE., Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, Younkin SG. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 258:126-129.

Skrabana R, Kontsek P, Mederlyova A, Iqbal K, Novak M. (2004). Folding of Alzheimer's core PHF subunit revealed by monoclonal antibody 423. *FEBS Lett*. 18;568.178-182.

Rendon A, Jung D, Jancsik V. (1990). Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J*. 269(2):555-6.

Saunders AM, Schmader K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N. (1993). Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet*. 342(8873):710-711

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schiossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, McCormack R, Wolfert R, Selkoe D, L Ivan y Schenk D. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*. Sep 24;359(6393):325-7.

Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 258(5079):126-129.

Thal D.R., Holzer Max., Rüb U., Waldmann G., Günzel S., Zedlick D., Schober R. (2000). Alzheimer-related τ -pathology in the perforant path target zone and in the hippocampal stratum oriens and radiatum correlates with onset and degree of dementia. *Exp Neurol*. 163:98-110

Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules *Mol Biol Cell*. 6:1887-18902.

Tuotro medico. (2004). Enfermedad de alzheimer.
<http://www.tuotromedico.com/temas/alzheimer.htm>

Uboga NV, Price JL. (2000). Formation of diffuse and fibrillar tangles in aging and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21:1-10

Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O. (2000). Tau-positive neurons in corticobasal degeneration and Alzheimer's disease--distinction by thiazin red and silver impregnations. *Acta Neuropathol (Berl)*. 100(4):385-9.

Uchihara T, Nakamura A, Yamazaki M, Mori O. (2001). Evolution from pretangle neurons to neurofibrillary tangles monitored by thiazin red combined with Gallyas method and double immunofluorescence. *Acta Neuropathol (Berl)*.101(6):535-9

Ugolini G, Cattaneo A, Novak M. (1997). Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurones. *Neuroreport*.8:3709-3712

Utton M.A., Vandecandelaere A, Wagner U, Reynolds CH, Gibb GM, Miller CC, Bayley PM, Anderton BH. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta affects the ability of tau to promote microtubule self-assembly. *Biochem J*. 1997 May 1;323 (Pt 3):741-7.

Van Hoesen G.W., Hyman BT, Damasio AR. (1991). Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 1:1-8.

Vincent I, Rosado M, Davies P. (1996). Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease?. *J Cell Biol*.132. 413-425.

Vincent I., Zheng J.H., Dickson D.W., Kress Y., Davies P. (1998). Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol aging*. 19(4): 287-296

Watanabe A, Hasegawa M, Suzuki M, Takio K, Morishima-Kawashima M, Titani K, Arai T, Kosik KS, Ihara Y. (1993). In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J Biol Chem*. 268:25712-25717.

Weaver C. L., Espinoza M., Kress Y., Davies P. (2000). Conformational change as one of the earliest alteration of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 21: 719-727

Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, Subramani S. (1997). Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol*. 136:71-80.

Wischik CM. (1989). Cell biology of the Alzheimer tangle. *Curr Opin Cell Biol*. 1:115-122.

Wischik CM, Crowther RA, Stewart M, Roth M. (1985). Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 1985 Jun;100(6):1905-12.

Wischik C.M., Edwards P.C., Lai R.Y., Paykel E.S., Braine C., Huppert F.A., Mukaetova-Ladinska E.B., Mena R. (1995). Quantitative analysis of tau protein in paired helical filament preparation: Implication for the role of tau protein phosphorylation in PHF assembly in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 16: 409-417; discussion 418-431

Wischik C.M., Novak M., Edwards P.C., Klug A., Tichelaar W. Y Crowther R.A. (1988a) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. Proc Nat. Acad. Sci USA.85, 4884-4888

Wischik C.M., Novak M., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R., Walker J.E., Milstein C., Roth M., y Klug A. (1988b). Isolation of a fragment of fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc.Nat Acad. Sci. USA. 85, 4506-4510

Witter M.P., Woutwlood F.G., Naber P.A., Van Haeften T. (2000). Anatomical organization of parahippocampal-hipocampal network. In Parahippocampal region. Implication for neurological and psychiatric disease. Annals of the new york acad. Of Sci. 911. 1-24

Wolozin B, Davies P. (1987). Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. Ann Neurol. 1987 22:521-526

Zheng-Fichhofer., Biernat J., Mandelkow E-M., illenberger S., Godemann R., (1998). Sequential phosphorylation of tau by glycogen syntetase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser 214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. Eur J Biochem. 252:542-552

Apoptosis en la degeneración neurofibrilar de la enfermedad de Alzheimer

Luna-Muñoz J,^{1,3} Soto-Peredo C,¹ García-Sierra F,² Mena López R³

RESUMEN

La apoptosis es un proceso de muerte celular que comprende una secuencia de eventos debidos a la actividad de enzimas específicas llamadas caspasas. Las caspasas rompen en fragmentos a las proteínas y el ADN celular llevando finalmente a la desintegración celular. La apoptosis está fuertemente regulada por mecanismos fisiológicos que son cruciales durante el desarrollo en etapas adultas para el mantenimiento del balance entre células en división y muerte celular. A diferencia de la apoptosis, la muerte celular por necrosis es causada por daños a la célula que se caracterizan por una rápida disrupción del metabolismo celular y una desintegración no fisiológica de las células. Los eventos que comúnmente disparan o inducen la muerte celular por necrosis son procesos tóxicos o traumáticos. La apoptosis y necrosis pueden distinguirse fácilmente por un número de cambios morfológicos y bioquímicos característicos. En la presente revisión se hace una descripción general de los mecanismos específicos de la muerte celular por apoptosis y la asociación que se ha encontrado con el proceso neurodegenerativo que caracteriza a la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: apoptosis, caspasas, tau, maraña neurofibrillar tangle, Alzheimer.

Rev Mex Neuroci 2004; 5(5): 476-485

Apoptosis in neurofibrillar degeneration of Alzheimer's disease

ABSTRACT

The apoptosis is a cellular death processing which involves a sequence of events due to a number of enzymes referred as caspases. During apoptosis, caspases activity results into protein and DNA fragmentation leading to the cellular death. Apoptosis is firmly down regulated by physiologic mechanisms functioning for the maintenance of the balance among living and cell death. In contrast to apoptosis, cellular death due to necrosis is caused by cellular damages which are characterized by a quick disruption of the cellular metabolism and a non-physiologic disintegration of the cells. In general, it is accepted that necrosis is related to toxic and traumatic processes; the apoptosis process can be easily distinguished from necrosis by a number of morphological and biochemical characteristic changes. In the present paper, we reviewed the specific mechanisms involved in apoptosis. Some work is discussed in relation with the role of apoptosis in neurodegenerating process involved in Alzheimer's disease.

Key words: Apoptosis, caspase, tau, neurofibrillar, Alzheimer.

Rev Mex Neuroci 2004; 5(5): 476-485

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia que clínicamente se caracteriza por un daño progresivo en las funciones

cognoscitivas que llevan a la demencia. A nivel histopatológico esta enfermedad se caracteriza por presentar lesiones en áreas específicas del cerebro. Estas lesiones son conocidas como marañas neurofibrilares (MNF) (Figura 1A), neuritas distróficas (NDs) (Figura 1B) e hilillos del neuropilo (HN) (Figura 1b), las cuales están formadas por masivas acumulaciones de estructuras fibrilares llamadas filamentos helicoidales apareados (FHAs) cuyo principal componente estructural es la proteína tau.¹⁻³ Otra lesión característica en los cerebros de personas que fallecieron con la EA, es la placa neurítica (PNs) (Figura 1C) que están formadas por depósitos fibrilares extracelulares del péptido amiloide- β a los que se encuentran asociadas una gran cantidad de NDs.

1. Programa Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Xochimilco. Universidad Autónoma Metropolitana.
2. Biología Celular.
3. Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN, México.

Correspondencia: Biol. José C. Luna Muñoz
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN,
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.
Av. Instituto Politécnico Nacional Núm. 2508.
Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero.
CP 07300, Tel.: 5061-3800, Ext. 5130, 5061-3362.
Correo electrónico: jluna@fisio.cinvestav.mx

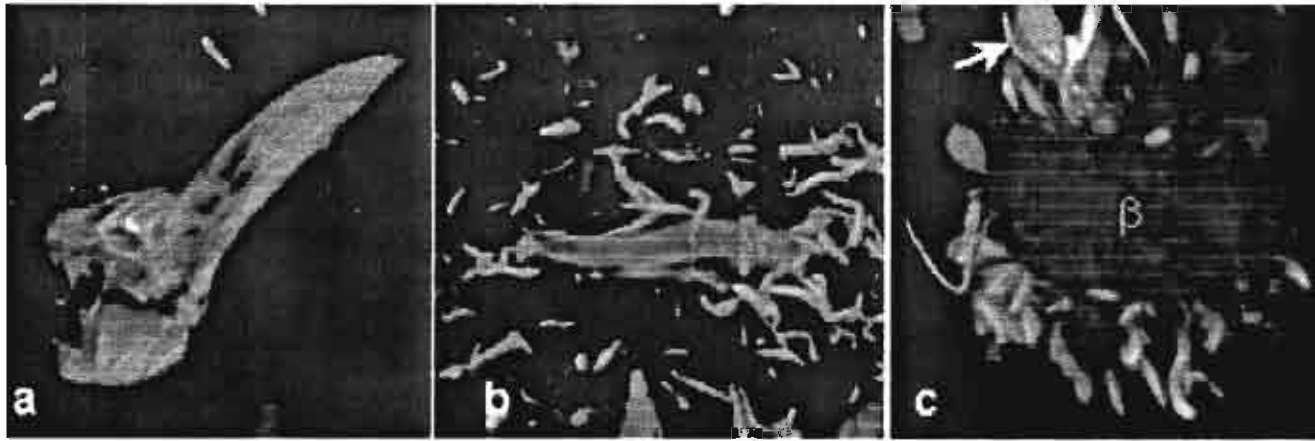


Figura 1. Lesiones características en la enfermedad de Alzheimer. **A.** Marañas neurofibrilares (teñido con un anticuerpo que reconoce la proteína tau patológica). **B.** Neuritas distróficas y **C.** Placas neuríticas de amiloide- β (β canal rojo), asociadas a estos depósitos se observan las neuritas distróficas (flechas).

Tabla 1
Características básicas de apoptosis y necrosis.

Apoptosis	Necrosis
Encogimiento celular	Hinchamiento celular
Ondulación membranal	Desintegración de membranas
Agregación de la cromatina	Degeneración del ADN al azar
ADN en escalera en gel de agarosa	Mancha de ADN en gel de agarosa
Formación de cuerpos apoptóticos	Lisis celular
Organelos y membranas se mantienen intactos	Desintegración de organelos
Procesos enzimático vía activación de caspasas	Perturbación de la homeostasis iónica
Dependiente de energía	Independiente de energía
Perfecto control de muerte celular, proceso activado por genes	El daño induce espontáneamente la muerte celular
No hay una respuesta inflamatoria <i>in situ</i>	Inflamación

Aunque el mecanismo exacto de la patogénesis de la EA no es muy claro, se han propuesto varias modificaciones postraduccionales de la proteína tau que parecen iniciar su agregación patológica en FHAs: 1) La hiperfosforilación,^{4,5} 2) truncación^{1-3,6-9} y recientemente se ha descrito una serie de 3) Cambios conformacionales.^{10,11} De la misma manera se han podido observar cambios morfológicos y bioquímicos que apoyan la idea de que las neuronas en la EA degeneran mediante vías de apoptosis. También se ha observado que las neuronas en etapas iniciales de la EA presentan una fragmentación intensa del ADN y este daño se presenta incluso en neuronas que no han desarrollado MNFs. En el curso de la EA se acumula una gran cantidad de condiciones en el cerebro capaces de inducir apoptosis y esto mantiene en riesgo a la neurona. Este mecanismo de autoprotección puede ser contraproducente porque retarda la degeneración celular al tratar de mantener la función celular.

En este artículo se actualiza la información que existe acerca de la posible implicación de la apoptosis en la fisiopatogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Al considerar el complejo sistema de mecanismos involucrados en este proceso se antepone una revisión general de la muerte celular por apoptosis.

En general, la muerte celular puede dividirse en dos procesos de acuerdo con sus características morfológicas y bioquímicas que le suceden en el momento de que la célula se dispone a morir. Estos dos procesos son la **apoptosis** (también llamada *muerte celular programada*) y la **necrosis** (Tabla 1).

La necrosis es una muerte por asesinato celular (por ejemplo, algunos factores que inducen a las células a necrosis son células afectadas por toxinas bacterianas, daño traumático-tóxico, isquemia o hiperactivación enzimática focal), cuando la célula es afectada por alguna de estas causas; la célula

y las mitocondrias se hinchan hasta que se rompe la membrana, se observa una picnosis nuclear. Al romperse la membrana celular se liberan enzimas nocivas, que a su vez matan a sus células vecinas, este evento origina un proceso inflamatorio y una cicatriz fibrosa, que deforman el tejido y el órgano afectado. La apoptosis en cambio es completamente diferente, ya que una gran cantidad de células mueren en un espacio de tiempo muy corto sin que se produzcan reacciones inflamatorias ni lesiones en los tejidos en los que ocurre. Este proceso se desencadena por una gran cantidad de mecanismos tales como la perturbación de las moléculas de membrana (Fas, TNF, entre otras), la carencia de factores de crecimiento (paracrinos y aun autocrinos) que les permiten comunicarse con otras células, al recibir radiaciones ionizantes, drogas y diversos agentes químicos. El "suicidio" celular es una muerte fisiológica que no produce procesos reactivos a su alrededor, la célula destinada a morir se separa de sus células vecinas al perder sus moléculas de adhesión. Primeramente, se condensa el núcleo y posteriormente se fragmenta a consecuencia de la desorganización de la membrana nuclear interna, se produce una perturbación de la función mitocondrial, los cromosomas y el genoma se parten en fragmentos regulares (degradación del ADN intranucleosomal en múltiplos de 180 pares de bases) y finalmente, por la acción de proteasas sobre proteínas citoesqueléticas, se forman vesículas con restos celulares denominadas cuerpos apoptóticos. Estas estructuras son rápidamente absorbidas por las células vecinas (en este proceso no hay rompimiento de la membrana, por lo cual no hay productos tóxicos que se viertan al exterior, de esta manera no afecta a sus células vecinas).

La muerte celular programada es esencial en los organismos desde la embriogénesis, el desarrollo fetal y en la maduración del sistema inmune, así como también en la homeostasis inmune. Así pues, la muerte celular programada es esencial en los mecanismos fisiológicos para controlar el número de células en varios tejidos durante el desarrollo y en el organismo adulto. Por consiguiente, durante el desarrollo y maduración de las células del sistema nervioso se generan en exceso de una manera ordenada para dirigir el establecimiento del tejido intacto. El exceso de células nerviosas puede removerse mediante la inducción de apoptosis. Se han conservado algunas evidencias en las cuales genéticamente se presenta una desregulación en el mecanismo apoptótico presentándose una inapropiada muerte celular, lo cual provoca la proliferación celular descontrolada y por consecuencia se desarrolla el cáncer.¹²

Ejecutores de la apoptosis

El mecanismo central de la maquinaria de la muerte celular está constituido por una familia de **cistein-proteasas** comúnmente llamadas **caspasas**,¹³ por ser **Cistein-proteASAS** que hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de ácido **ASPártico**. La actividad de estas enzimas es un prerrequisito para la activación de la apoptosis respondiendo a la activación de una cascada intracelular proteolítica que induce la activación o inhibición de diferentes sustratos celulares provocando la muerte celular. Las caspasas están formadas por una familia de enzimas (14 miembros),¹⁴ de ellas seis se relacionan preferentemente con procesos inflamatorios y no con procesos de muerte celular. Sin embargo, todas comparten semejanzas en cuanto a su secuencia proteínica, estructura y espe-

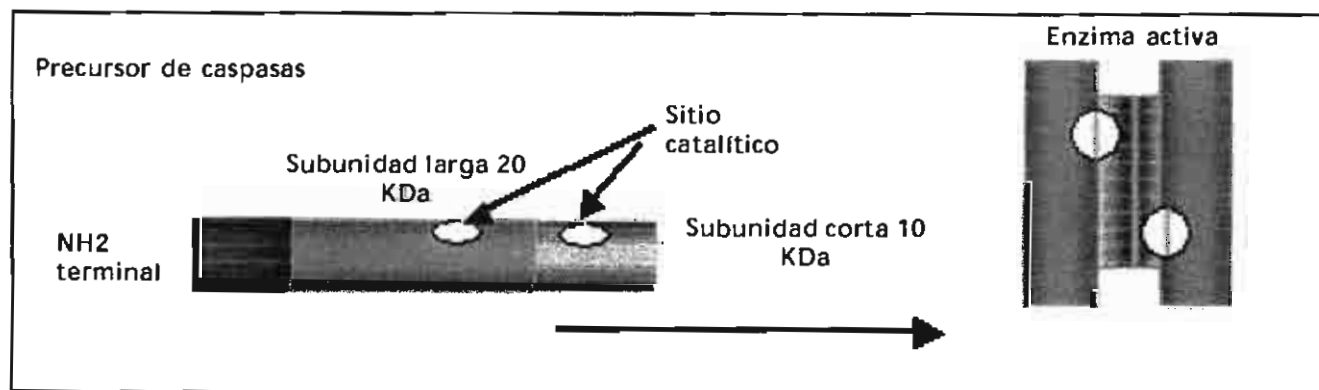


Figura 2. Las caspasas comparten semejanzas en las secuencias de sus aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. Todas ellas se expresan como proenzimas de 30-50 KDa, las cuales contienen tres dominios, uno es el amino terminal, una subunidad grande de 20 KDa y una pequeña de 10 KDa. La activación involucra el procesamiento proteolítico entre los dominios, seguido de una asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. La estructura cristalina de dos de las caspasas activas (caspasas 1 y 3) muestra que en ambos casos, dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero, con dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente. Dentro de cada dominio catalítico las unidades grandes y pequeñas están íntimamente asociadas, contribuyendo ambas con los residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis.

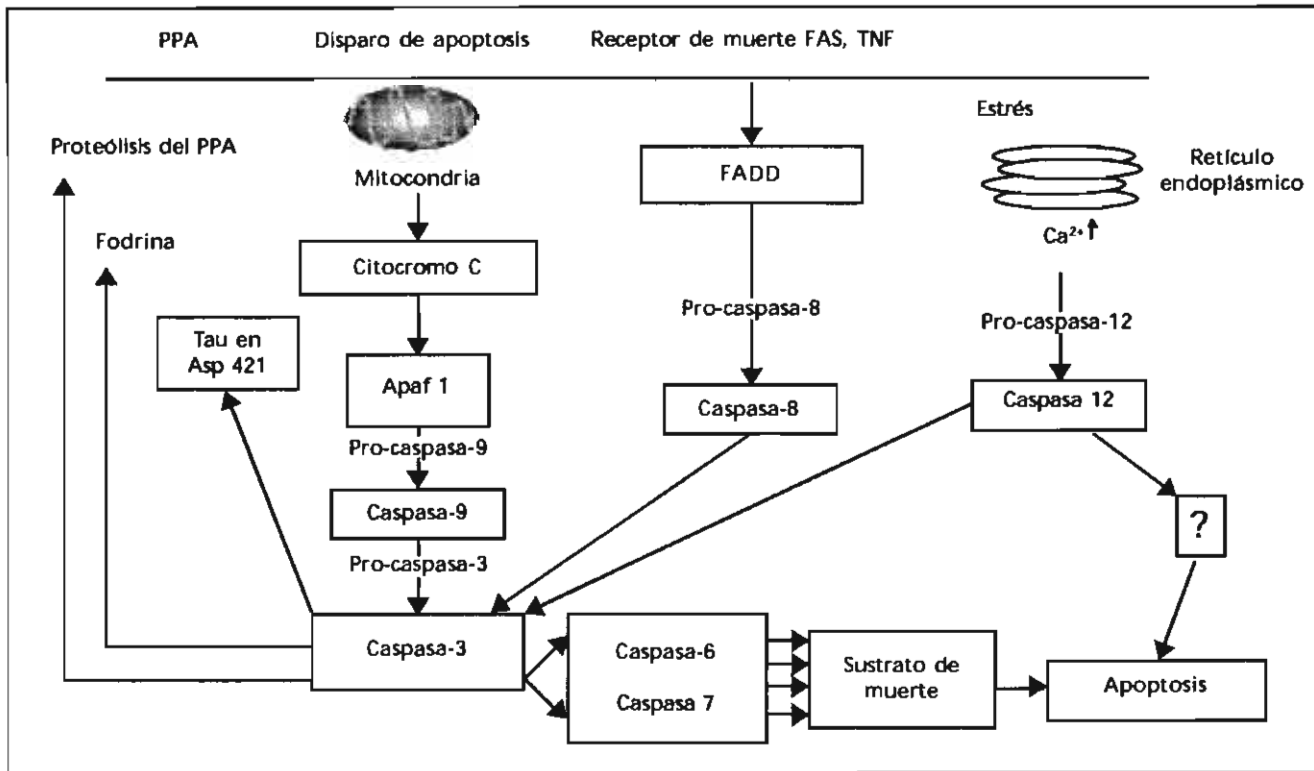


Figura 3. La activación de las caspasas puede implicar tres vías diferentes de señalización que disparen la apoptosis (ejemplo toxinas), receptores de muerte (ejemplo Fas-CD95) y condiciones de estrés intracelular. El daño mitocondrial libera el citocromo c, el cual es una molécula proapoptótica en el citoplasma. Ahí con ATP se forma un complejo con Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) y procaspasa-9 llevando a la activación de la caspasa-9. Una segunda vía de acción es a través de la vía de receptores de muerte celular, la cual requiere de unas moléculas adaptadas FADD, las cuales activan la caspasa-8 y el tercer mecanismo es mediante la activación de la caspasa-12 mediante la liberación del calcio seguido de un estrés sobre el retículo endoplásmico. Las tres diferentes vías tienen en común que activarán a la caspasa-3 y finalmente la activación de los sustratos de la muerte celular como la gelsolina, actina y otros, los cuales son modificados por la actividad de las caspasas y continúa con la fragmentación del ADN y culmina con la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, la caspasa-3 tiene una actividad de retroalimentación y proteólisis en la proteína precursora del amiloide. Así como también se ha detectado a la proteína tau como sustrato, la cual sufre una ruptura en el aminoácido Asp 421.

cificidad de sustrato.¹⁵ Son sintetizadas a partir de un precursor inactivo (procaspasas) y éstos son activados mediante una proteólisis limitada y su asociación de las subunidades¹⁶ con lo que las enzimas adquieren su actividad catalítica para proteolizar a su vez sus sustratos tras un residuo de aspártico. Reconocen, sin embargo, diferentes secuencias tetrapeptídicas, lo cual le confiere cierta especificidad de sustrato (Figura 2).

Las caspasas inactivas pueden ser a su vez sustrato de las activas y éstas pueden activar a su vez a otras caspasas siguiendo un orden jerárquico y una actuación en cascada (Figura 3).¹⁷ Las caspasas que participan en la apoptosis pueden dividirse en dos grandes grupos: **las caspasas iniciadoras** (8, 9, 2 y quizás 10), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a **las caspasas efectoras** (3, 6 y 7), las cuales proteolizan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos de las células.¹⁴ Además, hay cierta especificidad de tejido para la caspasa requerida en el

proceso apoptótico. Por ejemplo, los ratones mutantes que no producen caspasa-3 mueren al nacer presentando un número superior de células neuronales comparado con los normales, pero no presentan ninguna anomalía en el resto de sus órganos.¹⁸ Otra caspasa que también se encuentra implicada en la muerte neuronal es la caspasa-2, que se encuentra en elevados niveles en el cerebro de ratones embrionarios, pero no en los adultos.¹⁹ El ratón mutante que carece de caspasa-2 presenta una alteración en la muerte de las neuronas simpáticas en ausencia de NGF (factor de crecimiento neuronal).²⁰ La caspasa-1 se ha implicado en algunos procesos de muerte neuronal^{21,22} aunque en el ratón mutante que carece de esta caspasa no presenta ninguna alteración en el desarrollo del cerebro.²³

Se conocen una gran cantidad de sustratos para las caspasas,²⁴ entre éstos se encuentran proteínas que inhiben la muerte celular como Bcl-2,²⁵ proteínas que participan en la reparación del ADN o en la organización de la cromatina^{26,27} y proteínas impli-

cadadas en la regulación del citoesqueleto.²⁸ En la muerte celular del sistema nervioso puede participar otra proteasa, la calpaína, cistein proteasa dependiente de calcio.²⁹ En ocasiones la apoptosis neuronal requiere de participación conjunta de calpaína y caspasas.³⁰

Reguladores intracelulares de la apoptosis

Los principales reguladores de la apoptosis son los miembros de la familia Bcl-2 que en los mamíferos está constituida por 15 miembros^{31,32} y en una forma general todos ellos presentan cuatro dominios homólogos a Bcl-2 (BH1 a BH4). Algunos miembros de esta familia inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X_L) y otros la activan (Bax, Bad, Bid). Como ambos tipos pueden heterodimerizar su concentración determina si la célula se dirige a apoptosis o sobrevive.³³ Estas proteínas se anclan en la cara citoplásmica de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, de manera que pueden registrarse daños en dichos organelos.³⁴ El siguiente nivel de regulación en mamíferos está determinado por la Apaf-1 con algunas caspasas iniciadoras, Bcl-X_L y Bcl-2, que impiden la activación del complejo Apaf-1/procaspasa-9,³⁵ además de impedir directa, o indirectamente, la liberación del citocromo c mitocondrial; lo que a su vez parece ser un cambio conformacional en Apaf-1 que le permite procesar a la procaspasa-9 (Figura 3).^{36,37} Bcl-2, Bcl-X_L y Bax participan en la muerte celular del sistema nervioso.³⁸ Los ratones mutantes para este gen mueren durante el desarrollo embrionario, los cuales presentan una muerte masiva de neuronas posmitóticas inmaduras en cerebro y médula espinal,³⁹ mientras que los ratones mutantes que carecen de Bcl-2 nacen, pero mueren aproximadamente a los 30 días mostrando una pérdida progresiva de motoneuronas. Las mutantes que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X_L presentan un incremento en número de neuronas y tienen una mayor resistencia a morir frente a los estímulos de la apoptosis.⁴⁰

Reguladores extracelulares

Dentro de los reguladores extracelulares de la apoptosis se encuentran las neurotrofinas y los factores de crecimiento en el sistema nervioso, que regulan a las proteínas de la familia Bcl-2 y las procaspasa-2. Sus señales de supervivencia se pueden traducir por la vía intracelular que implica a la PI3K (fosfatidil-inositol-3 cinasa)⁴¹ y la consecuente activación de la protein-cinasa B o Akt o por la vía que implica a las MAPK (protein-cinasas activadoras de mitógeno). La activación de Akt supone la fosforilación directa de Bad que mantiene unido a

la proteína 14-3-3. Por el contrario, Bad no fosforilado se une a Bcl-X_L (o a Bcl-2) impidiendo que ejerza su acción de supervivencia.

Otra vía de inducción de muerte implica la señalización a través de los llamados receptores de muerte (Fas y TNF) que participan en el sistema inmune. En el sistema nervioso hay una activación del NGF, la cual es esencial para la muerte celular que afecta el desarrollo de neuronas simpáticas, la sobreexpresión de su dominio intracelular puede inducir la muerte de algunas neuronas *in vivo*,⁴² la unión del NGF a p75 puede inducir la liberación de ceramida y activación de JNK (c-jun-aminoterminal-cinasa) en células gliales.

En el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas se originan de células precursoras que una vez diferenciadas no se dividen más. Antes de emitir axones y dendritas, las células inmaduras migran hasta su localización definitiva, cuyo objetivo es el de establecer conexiones interneurales correctas, si ello no ocurre las neuronas no reciben la acción de factores de crecimiento secretados por la célula receptora a la que pertenece el axón conectado y la célula que hizo la conexión equivocada muere por apoptosis. En enfermedades neurodegenerativas se ha observado apoptosis en biopsias de pacientes con Alzheimer, Huntington y Parkinson, fallecidos por otras causas. La apoptosis en la enfermedad de Alzheimer no es sistematizada, sino más bien difusa, que coincide con el polimorfismo de la lesión. Cotman, en 1998,⁴³ detectó que en la enfermedad de Alzheimer muestra un mayor número de células apoptóticas principalmente en células del hipocampo.

Apoptosis en el tejido cerebral humano con la EA

Se han realizado una gran cantidad de estudios en los cuales se ha detectado la fragmentación del ADN en el cerebro humano con la EA, indicándonos un daño en la neurona. Esta observación se ha determinado mediante la técnica de túnel (Figura 4)⁴⁴ en algunos de estos estudios las células positivas a la tinción con la técnica de túnel, morfológicamente presentaban un encogimiento celular y cuerpos apoptóticos^{44,45} (Figura 4). Otros estudios han revelado que a pesar de la tinción positiva que evidencia la fragmentación del ADN, las características morfológicas de apoptosis no se observan y que posiblemente una vía alternativa para el proceso de muerte celular es la necrosis.^{44,46} Algunos otros grupos han reportado que los cambios morfológicos que se encuentran en las células de los cerebros con la EA no son característicos de la apoptosis, sino de necrosis y estas células son positivas a la técnica del túnel evidenciando la fragmentación del ADN, sin



Figura 4. Maraña neurofibrilar de un caso de EA. Tinción del ADN fragmentado mediante la técnica de túnel (verde), la cual se asocia a las MNFs, (rojo). Imagen tomada al microscopio con focal (MRC600 Bio-Rad).

embargo, las únicas células que presentan características morfológicas de apoptosis se observan en el hipocampo (por ejemplo, reducción del tamaño celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos).^{47,48} En relación con la controversia de que si en las células neuronales en la EA se encuentran sus núcleos fragmentados, se han tratado de utilizar otros marcadores como, por ejemplo, la proteína c-jun, la cual colocaliza con el ADN fragmentado,^{49,50} el cual es un gene inicial necesario para la activación de la apoptosis en neuronas.⁵¹ Así también en la EA se ha observado un incremento en la expresión de proteínas proapoptóticas como son c-jun, c-Fax, Bax, p53 Apo1/Fas-DC95 y proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X).⁵²⁻⁵⁶ Estos estudios sugieren que la apoptosis podría ser un mecanismo inicial en el daño neuronal en la EA, así también se han observado una gran cantidad de núcleos neuronales que no se asocian a MNFs (Figura 4), lo cual podría indicar un mecanis-

mo alternativo para la formación de la maraña. También se ha encontrado elevada la enzima reparadora de ADN (Ref-1) en la EA sugiriendo que esos núcleos están tratando de ser reparados, pero esta reparación es deficiente.⁵⁶

Dentro del proceso de apoptosis se encuentra la actividad de las caspasas, las cuales se han relacionado con los procesos de formación de las MNFs. Dentro de esta familia de caspasas la que se ha asociado principalmente con los procesos neurodegenerativos es la caspasa-3. Recientemente tanto *in vitro* como *in vivo* se ha determinado que la caspasa-3 puede hidrolizar a la proteína tau⁵⁷ en el aminoácido aspártico 421 de la porción carboxilo terminal seguido de Gli, Ser o Ala⁵⁸ esta hidrólisis sobre la proteína tau mantiene los dominios repetidos de asociación al microtúbulo (región de los residuos 351-380) y son los que forman el núcleo mínimo de los FHAs (1, 2, 3) y subsecuentemente se observa una disrupción del citoesqueleto como resultado de la muerte celular. Han desarrollado un anticuerpo que reconoce esta hidrólisis de la serina 421 denominado tau-C3 (Figura 5).⁵⁸

Estudios realizados por el Dr. García-Sierra en cortes de cerebros con la EA, muestran que la inmunoreactividad de este anticuerpo tau-C3 no colocaliza con la inmunoreactividad de un anticuerpo que reconoce la porción carboxi-terminal, lo cual sugiere que la proteína tau presenta una truncación inicial (comunicación personal) y ésta posteriormente continuará hidrolizándose por otras enzimas hasta llegar a la truncación en la porción Glu-391 evidenciada por el anticuerpo 423, que es la porción límite del núcleo mínimo de los FHAs,^{2,9} la acumulación de este núcleo mínimo en el cuerpo neuronal y su exposición al espacio extracelular sería la etapa final de degeneración neuronal.^{9,58,60} De esta manera, la sobreexpresión del núcleo mínimo



Figura 5. Triple Inmunodetección de una maraña neurofibrilar de un caso de EA. Con anticuerpos que reconocen la proteína tau en diferentes regiones de la molécula. **A)** TG-3 (reconoce una conformación regional en la Ser232 y Thr 235); canal verde. **B)** Anticuerpo TAU C-3 (que reconoce una truncación en la porción Asp 421, proteólisis realizada por la caspasa-3); canal rojo **D)** anticuerpo S422 (reconoce la Ser 422) canal azul. **D)** proyección de los tres canales en la cual se muestra una clara colocalización entre los marcadores de tau patológica (**A** y **C**) y con la proteólisis realizada por caspasa-3.

de los FHA en células Cos induce a las células a apoptosis, sugiriendo que el núcleo mínimo del FHA es tóxico para la célula.⁶¹ Asimismo, se ha podido observar que el fragmento 1-44 aminoácido de la proteína tau de su porción amino tiene un efecto tóxico elevado en neuronas granulares cerebelosas, induciéndolas a apoptosis, este efecto pudo ser inhibido por receptores antagonistas NMDA. Sin embargo, cuando se utilizó el fragmento completo del 1-230 aminoácido (libre de los dominios repetidos) se observó un efecto antiapoptótico determinando la importancia fisiológica de la porción amino de la proteína tau, sin embargo, en el procesamiento de la proteína tau en la EA se ha sugerido que hay una proteólisis tanto de su porción carboxilo como amino terminal mediada por proteasas apoptóticas, las cuales podrían generar fragmentos altamente tóxicos y éstos podrían contribuir a la muerte neuronal.⁶² El proceso de hiperfosforilación de la proteína tau también se ha asociado a procesos apoptóticos mediante la combinación de la técnica del túnel y con panel de anticuerpos que reconocen tau hiperfosforilada en diferentes regiones de la molécula de tau. Kobayashik K. y col. pudieron determinar que posiblemente la fosforilación entre los aminoácidos 159-163 y del 202-205 tienen una mayor asociación con los procesos apoptóticos.⁶³

Dentro de las caspasas que más se han visto asociadas a la patología de la EA es la caspasa-3, la cual mediante técnicas de inmunodetección de la fracción activa de caspasa-3 en cerebros con la EA se confina a unos gránulos citoplásmicos, lo cual indi-

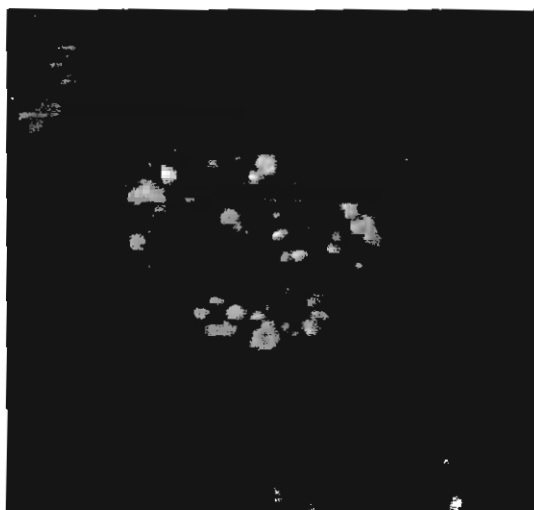


Figura 6. Tinción con el anticuerpo que reconoce la proteína tau con una conformación específica (verde) en la cual se pueden observar unas estructuras semejantes a vacuolas. El patrón es semejante a la inmunoreactividad observada por caspasa-3. En rojo se observa la autofluorescencia de la lipofucina. Micrografía tomada al microscopio con focal de un caso de EA.

ca que la célula que presenta el daño trata de neutralizar su efecto secuestrándola en vacuolas autofágicas.⁶⁴ De la misma manera se han observado algunas vacuolas inmunorreactivas a la proteína tau que se encuentra conformacionalmente alterada (anticuerpo TG-3) (Figura 6), la cual presenta una morfología semejante a las observadas con caspasa-3,⁶⁴ lo cual sugiere que en estas vacuolas podría iniciar la actividad de la caspasa-3 sobre tau. También se ha detectado un decaimiento en la función mitocondrial en las células piramidales del hipocampo en cerebros con EA.⁶⁵⁻⁶⁷

El daño oxidativo es una característica normal en el envejecimiento, sin embargo, en la EA es más extensiva⁶⁸ y éste puede selectivamente inducir la apoptosis.⁶⁹ La mitocondria es particularmente vulnerable al daño oxidativo y éste provoca la liberación del citocromo c de la mitocondria, la cual puede interaccionar con Apaf-1 y este complejo a su vez activa a la caspasa-9 (Figura 3).⁷⁰ Rhon y col. 2002⁷¹ observaron que la inmunoreactividad de la caspasa-9 colocó en un número considerable de neuronas que presentaban inmunoreactividad al anticuerpo 8oxodG (este anticuerpo reconoce un daño oxidativo en el ADN nuclear y mitocondrial y en el ARN), en estudios previos el anticuerpo anti8oxodG se ha asociado con una disfunción mitocondrial⁷² y a su vez la caspasa-9 activa a la caspasa-3 (Figura 3). Rohn y col.⁷¹ evidenciaron mediante técnicas de inmunodetección en cerebros con la EA que la inmunoreactividad de la caspasa-9 (fracción activa) se localiza en estructuras en forma de flama y en NDs que se asocian a los depósitos de amiloide (placas neuríticas).

Con base en la formación de la MNF y la activación de la caspasa-9 se ha observado una relación inversa, ya que en casos moderados de EA se observan una gran cantidad de células positivas a la caspasa-9 y esta inmunoreactividad disminuye conforme se incrementa la presencia de las MNFs positivas al anticuerpo PHF-1 (anticuerpo que reconoce la proteína tau fosforilada en los aminoácidos Ser 396 y Ser 404) en casos severos de EA, lo cual puede indicar que la caspasa-9 puede estar actuando previo a la formación de la MNF⁷¹ (Figura 3). Asimismo, la inmunoreactividad del anticuerpo anticaspasa-9 colocó con la caspasa-8, esto sugiere que podría realizarse una activación concurrente en ambas vías de apoptosis en las neuronas, mediante diferentes estímulos. Por un lado la caspasa-8 está implicada en Fas/CD95 o el factor de necrosis tumoral (TNF) que es un receptor de muerte programada, en este contexto la caspasa-8 es un miembro inicial de la familia de las caspasas que es reclutada por proteínas adaptadoras (por ejemplo, Fas asociada a un dominio de muerte, FADD) y la convierte a una forma

activa por autoproteólisis,⁷³ en la proteólisis de la caspasa-8 resultan dos fragmentos activos de 11 y 18 kDa ambos representan la forma activa de la enzima y éste activa particularmente la caspasa-3 (Figura 3).⁷⁴ Tanto la caspasa-8 y 9 colocalizan con fodrina (que es un producto de hidrólisis por la caspasa-3) y a su vez colocalizan con MNFs inmunorreactivas a AT8 (reconoce los aa 202 y 205 de la proteína tau hiperfosforilada) y PHF-1.^{75,76} Sin embargo, la modulación de sustratos hidrolizados por la caspasa-3 puede modificar la vía clásica de apoptosis y esto puede explicar la falta de evidencia de los estados terminales de la apoptosis en la que se incluye la condensación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos,⁷⁷ a este proceso de apoptosis no terminal se le ha denominado abortosis.⁷⁸

En conclusión, basándose en los resultados observados se puede decir que bajo tantos estudios *in vitro* como *in vivo* se favorece la apoptosis en la EA. Sin embargo, esta apoptosis en forma general no es una apoptosis clásica, que lleva a la neurona a la disgregación de los componentes celulares, sino más bien se echa a andar la maquinaria de apoptosis, pero que su punto esencial es la de activar a la vía de las caspasas cuyo fundamento es la de proteolizar a la proteína tau en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS

- Novak M, Kabat J, Wischik CM. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *Emboj* 1993; 12(1): 365-70.
- Mena R, Edwards P, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 633-41.
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. Structural characterization of the core of the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998b; 85: 4884.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lübke U, Vandermeern M, Crass P, Trojanowski JQ, Lee VM. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser202 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5066-70.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. 1993; 10: 1089-99.
- Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of mAbs 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5837-41.
- Wischik CM, Crowther RA, Stewart M, Roth M. Subunit of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 1985; 100: 1905-12.
- Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. Isolation of fragment of tau derived from the core of the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 4506-10.
- Mena R, Wischik CM, Novak M, Milstein C, Cuellar AC. A progressive deposition of paired helical filaments (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 474-90.
- Jicha GA, Bowser R, Kasam IG, Davies P. Alz-50 and MC-1 a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 1997a; 48: 128-32.
- Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L Jr., Hoffmann R, Davies P. A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997b; 69: 2087-95.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/ced-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-16.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299-306.
- Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of caspases. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1387: 17-31.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: Intracellular signalling by proteolysis. *Cell* 1997; 91: 443-6.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996; 384: 368-72.
- Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 β -converting enzyme. *Genes Dev* 1994; 8: 1613-26.
- Bergeron L, Perez GI, McDonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2 deficient mice. *Genes Dev* 1998; 12: 1304-14.
- Troy CM, Stefanis L, Prochiantz A, Greene LA, Shelanski ML. The contrasting roles of ICE family proteases and interleukin 1 β in apoptosis induced by trophic factor withdrawal and by copper/zinc superoxide dismutase down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1996; 93: 5635-40.
- Tanaka M, Sawada M, Miura MY, Marunouchi T. Insulin-like growth factor-I analogue prevent apoptosis mediated through an interleukin-1 β -like protease of cerebellar external granular layer neurons: developmental stage-specific mechanism of neural cell death. *Neuroscience* 1998; 84: 89-100.
- Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in

- mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 1995; 267: 2000-3.
24. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12: 1551-70.
 25. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-X ℓ . *Nature* 1997; 379: 554-6.
 26. Kaufmann SH, Desnoyer S, Ottavino Y, Davison NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 3976-85.
 27. Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A. Apoptain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996; 183: 1957-64.
 28. Rudel T, Bokoch GM (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cell regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* ; 276: 1571-4.
 29. Squier M, Miller A, Malkinson A, Cohen J. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994; 159: 229-37.
 30. Jordan J, Galindo MF, Miller RJ. Role calpain and interleukin 1 β converting enzyme-like proteases in the β -amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* 1997; 68: 1612-21.
 31. Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Ann Rev Immunol.* 1998; 16: 395-419.
 32. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cellular survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.
 33. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
 34. Green DR, Reed JC. Mitochondrial and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-12.
 35. Hu Y, Benedic MA, Wu D, Inohara N, Nuñez G. Bcl-X ℓ interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspases 9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4386-91.
 36. Zou H, Henzel WE, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1 a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-13.
 37. Li P, Nijhawan, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-89.
 38. Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Nuñez G. Bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(10): 4304-8.
 39. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, Loh DY. Massive cell death of immature hematopoietic cell and neurons in Bcl-X-deficient mice. *Science* 1995; 267:1507-10.
 40. Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holzman DM, Snider WD. Bcl-x ℓ is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 1009-19.
 41. Kulik G, Weber MJ. Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol cell Biol* 1998; 18: 6711-18.
 42. Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Belliveau D, Fawcett J, Miller FD, Barker PA. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J Neurosci* 1997; 17: 6988-98.
 43. Cotman CW. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19(S1): S29-S32.
 44. Su JH, Deng GM, Cotman CW. Bax protein expression is increased in Alzheimer brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression and brain pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 86-93.
 45. Lassman H, Baner C, Breitschopf H, Weigle J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* 1995; 89: 35-41.
 46. Cotman CW, Anderson AJ. Apoptosis: a potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 1995; 10: 19-45.
 47. Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1994; 5: 2529-33.
 48. Troncoso JC, Subo RR, Kawas CH, Kollatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1134-42.
 49. Lucassen PJ, Chung WC, Kamphorst W, Swaab DF. DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ and labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer's disease in absence of apoptotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 887-900.
 50. Stadelmann C, Bruck W, Baner C, Jellinger K, Lassman H. Alzheimer's disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 456-64.
 51. Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A β): association of c-Jun with A β -induced apoptosis. *J Neurochem* 1995; 65: 1487-98.
 52. Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Jonson EM Jr. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-Jun as necessary for neuronal apoptosis. *J cell Biol* 1994; 127: 1717-27.
 53. Anderson AJ, Su JH, Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 1996; 16: 1710-19.
 54. Tortosa A, López W, Ferrer J. Bcl-2 y Bax protein expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1998; 95: 407-12.
 55. Kitamura Y, Shimahama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry PJ, Whitehouse PJ, Taniguchi T. Alteration of protein regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32 in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1998; 780: 260-9.
 56. Cotman CW. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19(S1): S29-S32.

57. Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A. The neuronal microtubule associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem* 2000; 75: 624-33.
58. Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, Kwon YK, Kim HH, Gwag BJ, Mook-Jung IH, Jung YK. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 162-72.
59. Gambini CT, Chen F, Zambrana A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet A, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry R, Binder LJ. Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillar tangle in Alzheimer's disease. *PNAS* 2003; 100(17): 10032-7.
60. Garcia-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Muñoz J, Mena R. Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforate pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 2001; 22: 65-77.
61. Fasulo L, Visintin M, Novak M, Cattaneo A. Tau truncation in Alzheimer's disease: expression of a fragment encompassing PHF core tau induces apoptosis in COS cells. *Alzheimer's Rep* 1998; 1: 25-32.
62. Amadoro G, Serafino AL, Barbato C, Ciotti MT, Sacco A, Calissano P, Canu N. Role of N-terminal tau domain integrity on the survival of cerebellar granule neurons. 11: 217-230
63. Kobayashi K, Nakano H, Hayashi M, Shimazaki M, Fukutani Y, Sasaki K, Sugimori K, Koshino Y. Association of phosphorylation site of tau protein with neuronal apoptosis in Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 2003; 208: 17-24.
64. Standelmann C, Deckwerth T, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H. Activation of caspases-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999; 155(5): 1459-66.
65. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller W. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1627-34.
66. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Jonson AB, Crees Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; 21: 3017-23.
67. Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull. The role of cytochrome C oxidase deficient hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Neuropathol App Neurobiol* 2002; 28(5): 390-6.
68. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1502: 139-44.
69. Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredensen DE. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med* 2000; 6: 397-404.
70. Kuida K. Caspase-9. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(2): 121-4.
71. Rhon TT, Rissman RA, Davis MC, Cotman CW, Head E. Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 2002; 11(2): 341-54
72. Aliev G, Smith MA, Seyidov D, Neal ML, Lamb BT, Nunomura A, Gasimov EK, Vinters HV, Perry G, La-Manna JC, Friedland RP. The role of oxidative stress in the pathophysiology of cerebrovascular lesions in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2002; 12: 21-35.
73. Muzlo M, Chinnalyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3 like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-27.
74. Takahashi A. Caspase: Executioner and undertaker of apoptosis. *Int J Hematol* 1999; 70: 226-32.
75. Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 1995; 189: 167-9.
76. Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 1994; 39: 669-73.
77. Perry G, Nunomura A, Luchasen P, Lassmann H, Smith MA. Apoptosis and Alzheimer's disease (Letter). *Science* 1998; 282: 1268-9.
78. Raina A, Hochman A, Zhu X, Rottkamp C, Nunomura A, Siedlak S, Boux H, Castellani R, Perry G, Smith M. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2001; 101: 305-10.



Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr²³¹, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease.

José Luna-Muñoz^a, Francisco García-Sierra^b, Viviana Falcón^c, Ivón Menéndez^c, Laura Chávez-Macías^d and Raúl Mena^a.

Departments of ^aPhysiology, Biophysics and Neurociences, ^bCell Biology CINVESTAV-IPN, México, D.F. México.

^cBiomedicine Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, La Habana, Cuba

^dGeneral Hospital of Mexico

Corresponding author: R Mena Department of Physiology, Biophysics and Neurociences. CINVESTAV-IPN, México, D.F. México. C.P. 07360 Tel.: +52 55 50613800 ext 5130 e-mail: rmena@fisio.cinvestav.mx

Abstract

Neurofibrillary tangles (NFT) are the neuropathological hallmarks in Alzheimer's disease (AD). Densities of NFT correlate with the dementia status. NFT reflect the intracellular accumulation of abnormal paired helical filaments (PHFs) composed of the microtubule-associated protein tau. Hyperphosphorylation and truncation have been proposed as key events leading to the genesis of PHFs. A recent hypothesis involving conformational changes has been emerging. These structural modifications of the tau protein were detected by monoclonal antibodies (mAbs) recognizing discontinuous epitopes along the tau molecule such as Alz-50, Tau-66 and MC1. A new mAb, TG-3, detects an early pathology in AD. The epitope of mAb TG-3 maps to phosphorylated Thr²³¹ when the tau molecule is conformationally altered. In the present study, we used confocal

microscopy to analyze the state of tau molecule adopting the TG-3 conformation during tangle formation. We also compared mAb TG-3 immunoreactivity with that of mAb Alz-50. Immunoelectronmicroscopy was also performed. N- and C-termini markers evidenced that the tau molecule is intact when it adopts the TG-3 conformation. In addition to NFT, mAb TG-3 also recognized NFT-not bearing-neurons suggesting an early processing of tau prior to NFT formation. Ultrastructural analysis evidenced the presence of TG-3 and Alz-50 immunoreactive products on organelles including mitochondria and endoplasmic reticulum. Nuclear heterochromatin was densely immunolabelled. These results together with the fact that TG-3 immunoreactivity is related to intact tau suggest that the conformation recognized by TG-3 is early staged in the neuronal pathology of AD. In addition, we document that the earliest changes in tau occur closely associated with organelles and heterochromatin. This work was supported by CONACYT grant N° 39102-M (to RM).

Keywords: Alzheimer's disease, Tau protein, conformational changes, mAb TG-3, mAb Alz-50, neurofibrillary tangle, paired helical filaments, confocal micoroscopy.

I,. Introduction

Alzheimer disease (AD) is clinically characterized by the progressive loss of memory and deterioration of the cognitive functions which define a dementia syndrome. Neuritic plaques (NPs), neurofibrillary tangles (NFTs), dystrophic neurites (DNs) and neuropil threads (NTs) are the histological hallmarks of AD brains. Densities of these fibrilar structures correlate with dementia status

(Arriagada et al. 1992). NFTs, NPs, DNPs and NTs all represent massive accumulation of abnormal polymers referred to as paired helical filaments (PHFs). The microtubule-associated protein tau is the major constituent of the PHF.

In AD brains, PHF-associated tau presents two major posttranslational modifications namely hyperphosphorylation and truncation, It has been postulated that both abnormal modifications are involved in the formation of PHFs (Goedert 1993, Trojanowski et al. 1993, Novak et al. 1993). Although the precise mechanisms leading to the hyperphosphorylation of tau is not yet completely understood, evidence indicate that there is a relationship between the increment of the kinases activity and the decline of the activity of phosphatases (Patrick et al. 1999., Trojanowski and Lee 1995). The abnormally phosphorylated protein tau loses its affinity for the tubulin molecules (Lindwall et al 1984., Alonso et al 1997). It has been postulated that the tau hyperphosphorylation can constitute an early molecular change in the pathology of AD. In this regard with the use of immunologic markers raised against different hyperphosphorylated epitopes it has been observed abnormally phosphorylated tau protein in early and moderate cases of AD. (Buee-Scherrer et al. 1996, Greenberg et al. 1992, Mercken et al 1992). This accumulation of hyperphosphorylated tau precedes the formation of NFTs (Tabaton et al. 1991; Billingley and Kincaid 1997, Braak et al 1994, Buee-Scherrer et al 1996).

On the other hand, it has been found that in AD PHF-tau carries at least two specific sites of truncation located at the position Glu-391 and Asp-421 of its carboxyl terminus. (Novak et al. 1991, 1993, Rubén et al 1995, Wischik et al 1988a,b; Gamblin et al 2003).

Over the last years it has been postulated that, due to its scarce or almost null secondary structure (Schweers O et al. 1994), the tau molecule can be folded and thus, be susceptible to a variety of specific conformational changes, all of them leading to the PHF formation (Jicha and Davies G.A et al. 1997a, b, Weaver C.L. et al. 2000, García-Sierra et al.,2003). Based upon the use of

double and triple immunolabelling confocal microscopy and several antibodies raised against different segments of the molecule, a characteristic structural dynamism of the tau molecule along the pathological process involved in NFTs formation was proposed (García-Sierra et al 2003). According with the hypothetical model introduced by these authors, at early stages of NFTs formation, the conformation of tau is characterized by the presence of predominantly intact N- and C-termini. This early conformation which implies a self-folding of the N-terminus (sequence 5-15) over the repeated domain (sequence 312-322) is specifically identified by the well characterized Alz-50 antibody. At later stages of NFT evolution, the conformation detected by Alz-50 is eventually lost and the tau aggregates putatively adopt a different conformation which is detected by the antibody Tau-66. In this conformational state the tau molecule preserves two discontinuous segments (155-244 and 305-314) which are identified by Tau-66 when both N- and C-termini are lost (Ghosal et al. 2001). Eventually, the processing of the PHF-tau would imply a late truncation on the Glu-391 which would correspond to the stable PHF core which is specifically detected by mAb 423 (Wischik C.M., et al 1988b, Novak et al, 1991, 1993, Mena R. et al 1996).

Jicha et al. (1997b) raised and characterized a novel conformation-dependent antibody, TG-3. This antibody recognizes a phospho-epitope-dependent conformation located at Thr-231. mAb TG3 immunoreactivity is not detected in normal brains controls, but is in neurofibrillary lesions in AD brains. mAb TG3 immunoreactivity has been associated with early stages of neurofibrillary degeneration in AD (Vincent I. et al 1998, Weaver C.L., et al 2000, Augustinac J. C. et al. 2002).

In the present study we further analyzed the state of aggregation of the modified tau molecule which is detected by mAb TG-3 by using the fluorescent dye tiazin red that has been extensively used in our lab to monitor stages of aggregation of tau in AD (Mena et al, 95, Galvan-Valencia M. et al 2001). As well, based on double and triple labelling experiments we investigated the relationship among the patterns of immunoreactivity of TG-3 and Alz-50 with the presence or

absence of the carboxyl- and amino-termini of the tau molecule. Our results focused on TG-3 immunoreactivity preceding that of mAb Alz-50. In non-bearing NFT neuronal cells, the earliest accumulation of tau molecules appears to be related to the regional phospho-dependent epitope recognized by TG-3. As well, as it has been shown for Alz-50 antibody (García-Sierra 2003), in general, the conformational change recognized by TG-3 appears to be dependent of a well preserved N- and C-termini of the tau molecule. Immunoelectron microscopy observations confirmed the presence of TG-3 immunoreactive products in close association with organelles, perinuclear area and heterochromatin. Discussion is focused on the hypothetical initial stable fold of the N-terminus of tau as a consequence of abnormal phosphorylation on Thr-231.

Materials and Methods.

Brain tissue.

Brain tissue from 6 AD patients was examined in this study. (Ages 47-90 years, mean 67.5 years) were used in this study (2-6 h post-mortem delay). The diagnosis of AD was by the NIA-NINCDS group criteria (McKhann G et al. 1984). Blocks of the hippocampus and adjacent entorhinal cortex were fixed by immersion in a solution of 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 4°C for 7 days.

Antibodies

50 µm-thick free-floating sliding microtome sections were processed for immunofluorescence. Characteristics of the antibodies employed are referenced in Table 1.

Table 1. Antibodies and recognition sites

Antibodies	Epitope	Isotipe	Referente
------------	---------	---------	-----------

Alz-50	aac 5-15,312-322 Conformational	Mo IgM	Wolozin et al. 1986., Carmel y col 1996
TG-3	aac phosph Thr-231 Conformational	Mo IgM	Jicha G. A. et al 1997b
T-46	aac 404-441	Mo IgG	Merrick S. et al 1996
M-19G	aac firts 19	Rb IgG	Delobel P., et al 2002
AD2	aac fosfo 396, 404	Mo IgG	Buee Sherrer y col 1996
423	Glu-391, truncation	Mo IgG	Novak y col 1993

Immunofluorescence.

Double labelling with TG-3 and Thiazin red

Prior to incubation sections were blocked with a solution of 0.2% IgG-free albumin (Sigma Chemical Co.) in PBS for 20 min at room temperature. Sections were incubated with the primary antibody TG-3 (1:40 dilution), overnight at 4°C., and then with FITC-tagged goat-anti-mouse secondary antibody (Jackson immuno Res. Lab. Inc. West Grove, PA). PBS-0.2% Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) solution was used in all the immunolabelling steps. Prior to observation with the confocal microscope, sections were counterstained with Thiazin red (TR, aqueous 0.001% dilution). TR is a red-fluorescent dye with high affinity for β -pleated sheets structures, such as those found in PHF and amyloid fibrils (Mena R. et al 1995, 1996, Uchihara T. et al 2000). By using TR we can distinguish between fibrillar-and -non-fibrillar states of tau aggregates under confocal microscopy.

Double immunolabelling with TG-3 and Alz-50

To avoid cross-reactivity between TG-3 and Alz-50 (both are IgM class antibodies) a previously described double labelling protocol, was performed in two separate steps (García-Sierra et al, 2003). Briefly, in the first step Alz-50

(1:1000 dilution) was incubated overnight, at 4°C followed by its correspondent Texas red-conjugated secondary antibody (Jackson immuno Res. Lab. Inc. West Grove, PA), incubated at saturating concentrations for 2 hours at room temperature. It was also followed by an additional blocking step involving a 3 hour incubation with a non-labeled secondary antibody (1:100) to IgM molecules in the second step. TG-3 antibody was incubated for 2 hours and then with its correspondent FITC-conjugated secondary antibody for 1 hour. All the incubations were conducted in PBS-0.2 % Triton X-100. As a control for non-specific staining, sections were incubated either with Alz-50 or TG-3 alone and followed by Texas red or FITC -conjugated secondary antibody, respectively.

Triple immunolabelling with TG-3 and Carboxi- and amino termini markers

Triple immunolabelling with antibodies TG-3 (1:40 dilution), Tau-46 (ZYMED, California) (1:100 dilution) and M-19G (1:100 dilution) (see Table 1) were incubated overnight in the same PBS-Triton solution at 4°C after washing in PBS-Triton alone, section were incubated with a mixture of secondary antibodies that included an FITC-conjugated secondary antibody to IgM (μ -specific) molecules (Jackson immuno Res. Labs. Inc. West Grove, PA) (for TG-3), a Texas red-conjugated secondary antibody to IgG (γ -specific) molecules (Jackson immuno Res. Lab. Inc. West Grove, PA) (for Tau-46), and a CY5-conjugated secondary antibody to rabbit immunoglobulin (for M-19), all in PBS-0.1% Triton X-100 for 2 hours

Confocal microscopy

Double and triple labelled sections were mounted in anti-bleaching media (Vectashield, Vector Labs. Burlingame CA) and viewed throughout a confocal laser scanning microscope (TCP-SP2, Leica, Heidelberg Germany) using a 100x oil-immersion plan apochromat objective (NA 1.4) Ten-fifteen consecutive single sections were obtained at 0.8-1.0 μm intervals simultaneously for two or three

channels throughout the z-axis of the sample. The resulting stack of images were projected and analyzed onto the two-dimensional plane using a pseudocolor display green (FITC), red (Texas red), and blue (CY5). Fluorochromes in multiple labelled samples were excited at 488nm (for FITC), 560nm (for TxR) and 650nm (for CY5) wavelengths. The resulting images were saved in a system of compact disks.

Immunoelectronmicroscopy

Brain blocks from AD hippocampus were fixed by immersion in a mixture of 4% paraformaldehyde /0.2% glutaraldehyde in PBS, (pH 7.3), at 4°C for 2.5 hours. After a post-fixation with a 1% osmium tetroxide solution for one additional hour, tissue was embedded in Lowicryl and polymerization was performed under U.V, for 72 hr. Ultrathin sections were put on nickel grids and then processed for gold-immunolabelling as follows: 1) Incubation with either TG3 or Alz-50 primary antibodies (1:20 dilution in PBS) for 45 minutes at room temperature; 2) One hour incubation an anti-mouse gold-conjugated-IgM secondary antibodies (Amersham, U.K.) (20 nm particle diameter) diluted at 1:100. As a control for antibody specificity some sections were incubated with the non-related-AD primary antibody, CB-Hep1 and similarly processed. Immunolabelled ultrathin sections were counterstained with uranyl salts and viewed on an electron microscope (JEOL JEEM 2000EX, Habana, Cuba).

Results

By using double and triple labelling and confocal microscopy we further characterized the patterns of immunoreactivity of the novel mAb TG-3 which identifies a conformational phospho-epitope located at Thr-231 (Jicha G.A et al, 1997b). As well, we made special efforts to compare mAbs TG3 and Alz-50 immunoreactivities combined with N- and C- termini markers.

TG-3 immunolabelling in AD brains

TG-3 patterns of immunolabelling in AD brain have been previously reported (Vincent I. et al, 1998, Augustinack J.C. et al, 2002) to label fibrillary structures namely NFTs, NPs and NTs. Also, a granular diffuse pattern of staining associated with pre-tangle states was described. Our confocal microscopy analysis was performed in mAb TG-3 immunolabeled samples which were counterstained with thiazin red (TR) to distinguish between fibrillar and non-fibrillar states of tau aggregates.

Figures 1A,B illustrate the patterns of mAb TG-3 immunolabelling from diffuse granular cytoplasmic deposits to NFTs and neuritic components. The counterstaining with TR allowed us to define what may represent a sequence of changes in patterns immunolabelling from early TG-3 accumulation (neurons devoid of NFTs), to NFTs (Figs. 1B, 2C, 3 A-C). The first appearance of mAb TG-3 immunoreactivity takes the form of diffuse granular material distributed in the perikarya area and proximal processes (Fig. A, small arrows). TR counterstaining evidenced that these early aggregations of conformationally altered tau protein are not in a fibrillar state (Fig1A, red channel). Figure 2B shows what appears to be a mAb TG-3-immunoreactive "early NFT" state. This corresponds to a neuron whose cytoplasm contains large bead shaped structures also detected by TR (Fig 1B arrows). The immunoreactivity of the antibody TG-3 is lost according to the degree of maturation of the NFTs detected by the TR, as per intracellular tangles mAb TG-3 differentiated I-NFTs (Fig. 1C, arrows) from NFTs which appeared to represent "transitional" structures to the extracellular space to become ghosts. These tangles are mainly detected by TR in the red channel. In such structures mAb TG-3 immunoreactivity is faintly in the soma and proximal processes (Fig. 1C large arrow). In our material we were able to observe some I-NFTs which were undetected by mAb TG-3 (Fig. 1C, arrow head) present in the vicinity, the extracellular NFTs which were not labelled by mAb TG-3 and detected only by TR in the red channel. (Figs.1 C, small arrow). The latter structures are typically loose and lack a nucleus. Regarding neuritic structures,

most of these were detected only by mAb TG-3, (Figs.1C) again, suggesting non fibrillar aggregation. However some neurites mainly located in the vicinity were double labelled with mAb TG-3 and TR (Figs. 1A, B arrow head).

Double labelling with mAbs TG-3 and Alz-50

Early aggregation of conformationally altered tau protein

As described in the Material and Methods, some sections were double labelled with mAb TG-3 (green channel) and Alz-50 (red channel). This labelling demonstrated that mAb Alz-50 immunoreactivity does not colocalize with the early diffuse granular perinuclear material which is detected by mAb TG-3 (Fig. 2A merge). On the other hand, a strong colocalization was observed between both antibodies in the "early-NFTs" states, which were mainly located around the nuclear area (2B arrows). These findings suggest these structures may correspond to early aggregation sites of conformationally altered tau protein.

Intracellular NFT

TG-3 and Alz-50 antibodies showed strong colocalization in most of the intracellular NFTs. Furthermore, This double labelling defined different NFT subtypes depending on the particular pattern of staining: the first subtype was characterized by a uniform colocalization with both antibodies along the entire structure (Fig. 2C); another subtype was strongly stained by mAb TG-3 (not show) but a weakly detected with mAb Alz-50 (not show) the last staining was mainly distributed at the tangle edges. The third subtype appeared as a tangle displaying a weak mAb TG-3 immunoreactivity located at the outer part of the cell. This subtype of tangle was almost not labelled by mAb Alz-50 (Fig 1D arrow).

Triple immunolabelling with mAb TG3 and C- and N- terminal markers of tau protein

To determine the state of the tau molecule and their relationship with the regional conformational change detected by mAb TG-3 (phosphorylated at Thr231), we performed triple labelling with N- (M-19) and C- (T-46) terminal immunological markers and analyzed by confocal microscopy. As shown in Fig. 3, mAb TG-3 immunoreactive products were observed either colocalizing with both N- and C-termini of tau (Fig. 3-A) or only with N-terminus marker (Fig. 3-B) . However, some mAb TG-3 immunoreactive structures were undetected by both tau end termini markers (Fig. 3-C) . Occasionally, in non-NFT bearing neuronal cells which displayed a granular diffuse mAb M-19G (N-terminal marker) immunoreactivity, we were able to observe mAb TG-3 immunoreactive products in a sparse granular fashion (Fig. 3D). No evidences of colocalization were found between the two markers (Fig. 3C merge). The C-terminus appeared to be lost before that of the N-terminus suggesting that it is more sensitive to proteolysis (Fig. 3B). Figure 3C shows a NFT which is detected only by mAb TG-3 but no by antibodies to the C- and N-terminal. These findings suggest that mAb TG-3 epitope is stable and, as expected, its processing follows that of the terminals. Occasionally, we were able to find some cells which displayed a diffuse cytoplasmic immunoreactivity for the N-terminus antibody (Fig. 3D M-19G). In these cases mAb TG-3 immunoreactivity took the form of granular material randomly distributed throughout the cytoplasm. Immunoreactive products of the two antibodies did not colocalize. No trace of C-terminus immunoreactivity was found in this cell.

MAb TG-3 epitope is absent in mAb 423 immunoreactive extracellular NFT (Fig.3E) but colocalized with the mAb AD2 , which labels a subpopulation of transitional NFT (not shown). MAb AD2 recognizes two phosphorylated epitopes located at sites 396 and 404 toward the C-terminus of tau molecule (Bueé Sherrer V. et al. 1996).

Immunoelectronmicroscopy

The ultrastructure of the diffuse granular material detected by mAbs TG-3 and Alz-50 on non-NFT bearing cells was examined by immunoelectron microscopy using gold particles. Immunoreactive products for both mAbs were typically found distributed in the chromatin of neuronal cells (Fig4 C,D). Despite the postmortem changes we were able to see gold particles on the nucleus membranes (Fig 4C superior square). Lipofuscine granules located on the close vicinity of the nucleus were also immunolabelled with mAb Alz-50 (Fig 4D). When NFT were found, where were recognized by both mAbs Alz-50 and TG3 (Fig 4 A, B).

Discussion

Over the last years two major hypothesis have prevailed in the AD field to explain the formation of PHF from tau protein: abnormal phosphorylation and endogenous proteolysis or truncation. However, oxidative stress-related processes has been a prevailing factor also involved in the mechanisms associated with the abnormal modification of the tau protein leading to its assembly into PHF in AD (Gómez-Ramos; and Liu Quan). Specifically, compounds including 4-hydroxynonenal (HNE, Sayre et al 1997) and acroline (Uchida et al 1998) have been found in the brain of AD and colocalizing with NFT (Lovell et al 2001, Sayre et al 1997), evidences which provide further support to their possible participation in the PHF formation.

For a number of years hyperphosphorylation of tau protein, as an early mechanism involved in the abnormal assembly of PHF, was a hypothesis strongly supported and led to extensive studies, contrasting with the suggested truncation process, which, in fact, was practically rejected and supported for only few groups (Wischik C.M., et al 1985, 1988b, 1995b, Novak M., 1991, 1993, 1994, 2004 and Mena R. et al 1991, 1995, 1996). These models explaining PHF assembly from tau subunits were basically studied by using immunological methods. From these approaches a number of antibodies were raised to detect

both events, including mAbs AT8 for hyperphosphorylation at Ser-202, 205 and 423, for truncation at Glu-391 (Goedert M. et al 1995, Wischik C.M., et al. 1988b, Novak M., 1993). Currently, the role of a fragment of tau, *i.e.* the repeated domain of tau molecule or PHF core (Wischik C.M., et al 1988 a, b) has gained more attention since it has been proved that a truncated tau species that promotes polymerization *in vitro* (Abraha A. et al 2000, Berry R.W et al 2003, Gamblin T.C. et al 2003). Recently, a new generation of antibodies have been obtained and classified as conformational markers since their epitope are constituted by discontinuous sites along the tau molecule (Carmel G. et al 1996, Jicha G. et al 1997, 1999, Ghoshal N. et al 2001). These findings evidenced that conformational changes of tau were also involved in its pathological processing leading to PHF assembly. In AD, by the use of these type of markers was also found that tau molecules adopt different conformational shapes. Regional conformations have been observed with the antibodies AT100 and TG-3 (Zheng-Fishhöfer Q. et al 1998, Jicha G., et al 1997) and structural changes have been detected with MC-1, Alz-50 and Tau66 antibodies (Carmel G. et al 1996, Jicha G. et al 1997, 1999, Ghoshal N. et al 2001). Further analysis with these three markers showed that while mAb Tau-66 detected late structural changes, mAbs MC-1 and Alz-50 marked early conformational changes in abnormal tau processing (García-Sierra 2003). Jicha A. (1999) reported that the latter markers identified the earliest conformational changes of still soluble tau prior to its assembly into insoluble PHF. In the present study, by using double labelling confocal microscopy with mAbs Alz-50 and TG-3, we found evidence that the phosphorylation of tau molecule at the site Thr-231, (putatively favoring a regional change) and identified by mAb TG-3, was present before the conformational change (structural) which is specifically detected with Alz-50 (Fig. 2A). Taking into account that: 1) both antibodies have been shown to be associated with intact tau (Jicha A 1997a, this study), and 2) events involving truncation of tau have also been related to early tau processing in AD (Mena R. 1991, Ugolini G. et al 1997), those mechanisms involved in PHF assembly may imply the formation of heteropolymers, mainly constituted by both intact and

truncated tau monomers (García-Sierra F. 2003), along the complex cascade of the amyloidogenic processing of the tau protein resulting in insoluble PHF. In this regard, Binder and colleagues recently raised a novel antibody, referred to as TauC3 able to identify a truncation located at the Ser-421 in the C-terminus of tau molecule (Gamblin T.C et al. 2003). Contrasting to truncation of Glu-391 which is toxic (expected non-functional) *in vitro* (Fasulo L. et al., 1998, Wischik, personal communication) truncation of tau molecule at Ser-421 corresponded to a specific site of cut of caspase 3, a proteolytic enzyme involved in the apoptotic cascade (Fasulo L. et al., 2000), therefore a functional truncation. Since this truncation removes the C-terminus of tau, we will now focus on the expected consequences of the lack of this end in tau processing in AD. In this regard, it is well known that intact tau is capable of polymerise *in vitro* into filamentous structures by inducing molecules (Pérez M. et al 1996., Friedhoff P. et al 1998) like oxidation (Liu Q et al in press). However, the removal of its C-end potentiates the rate of polymerization (Kampers T. 1996). Likewise, Abraha A. et al (2000) demonstrated that the C-terminus inhibits tau assembly. These authors suggested that structural modifications of this portion of tau molecule, either by abnormal phosphorylation or truncation, may favor the adoption of a conformation which will carry the progressive processing of the molecule involving foldings and truncations towards the final stable conformation which characterizes the PHF-assembled tau. Our results using triple immunolabelling combining mAbs TG-3 and C- and N- termini markers, T-46 and M-19G, respectively, evidenced that some non-NFT-bearing neuronal cells (pre-NFT stage) displayed diffuse granular immunoreactivity for both TG-3 and M-19G antibodies. However, no traces of T-46 immunoreactive products were found (Fig. 3D). These findings provide further support that removal of the C-end of tau may represent the first structural modification of tau molecule in the PHF formation. However, the fact that the antigenic site identified by mAb TG-3 is already present in a N-terminus intact- tau molecule (Fig. 3A), strongly suggest that, actually, the regional change related with phosphorylation at Thr231 comes prior to C-terminus truncation. Regarding our findings with mAb Alz-50 as an

early but not the first conformational change putatively involved in the amyloidogenic processing of tau, it is still important to analyze the results which demonstrate that HNE, a strong oxidative compound is capable to induce mAb Alz-50 epitope (Takeda et al 2000).

On the other hand, as demonstrated by immunoelectron microscopy, diffuse granular mAb TG-3 aggregates took the form of amorphous material closely related with endogenous membranes including mitochondria, lysosomes and nucleus, as well as heterochromatin (Fig 4B,C). In this regard, we have previously shown that mAb 423 detects similar structures in AD (Mena R. et al 1996). These data indicate that Tg-3 (an early marker) and 423 (a putative late marker) epitopes may be spatially related, therefore, involved in the same molecular mechanism leading to PHF formation in AD. In addition, similarly to that observed for TG-3, Alz-50 (Fig 4 B, C) and 423 (Mena R. et al 1996) immunoreactive products have been found closely associated with chromatin. Likewise, tau proteins and PHFs have also been found within the nucleus (Ellisman et al., 1987, Metzals et al., 1987, Loomis P.A. et al 1990, Brady R. et al 1995, Jeffrey A. 1995). These findings suggest that nuclear elements are also involved in the abnormal processing of tau in AD.

On the other hand, triple labeling with mAb TG-3, and intact tau molecule was observed in I-NFT (Fig.3A, B). This may suggest that in the NFT, some heteropolymers (García-Sierra F. 2003) are associated with C-terminus containing tau, while others do not. In general, the scenario of the tau amyloidogenic processing cascade involves tau molecules in at least three types of conformations: 1) intact tau proteins, 2) regionally modified and phosphorylated, and 3) structurally modified tau species (truncated C-terminus).

Based upon the findings that mAb TG-3 presented in this study, we propose that phosphorylation at Ser-231, may produce a regional conformation shift of tau molecule (Fig.5) as an early event in the tau processing. Our proposal is summarized in the scheme introduced here where the different steps of NFT

formation (cellular level) is associated with the modelling of the early stages of tau processing (molecular level) as detected by the set of immunological markers used in this study .

In summary, the bulk of data obtained by combining the use of mAbs TG-3 and Alz-50 with C- and N- termini markers (for intact tau protein), and TR, suggest a sequence of conformational changes which appear to be involved in the earliest shifts of the tau molecule leading to the eventual stable amyloidogenic state as represented by the PHF core-assembled PHFs in AD. This sequence of progressive changes are illustrated in the scheme. According with this model, the abnormal processing of tau starts from normal intact tau molecules. The regional shift identified by mAb TG-3 and associated with phosphorylation at thr-231, appears to represent the initial evident change in the intact tau molecule. (Fig. 5A), would correspond to the immunoreactive pattern characterized by the diffuse-granular mAb TG-3 positive immunoreactivity but negative for both mAb Alz-50 and TR. In this regard, prior to this study, mAb Alz-50 was considered as the earliest tau conformational marker in AD (Jicha A.G. et al 1997a, Weeber C.L. et al 2000). In our model, the latter marker appears to follow the appearance of mAb TG-3 epitope in the form of granular diffuse pattern in which both the markers colocalized. TR dye is still negative in this step of tau processing. Actually, we interpret this pattern as evidence that the regional conformation-phosphorylation-dependent epitope associated with Thr-231, some what promotes a folding of the molecule that causes the N-terminus chain of tau towards the inner part of the molecule, i.e. the repeated domain that would favor the binding between the two discontinuous regions of the protein, therefore, giving origin to the structural changes which is detected by mAb Alz-50. This step would also correspond with Fig. 5A. A next step of tau early processing would imply the formation of small patches-like aggregates which are detected by the immunological markers and TR (Figs. 1A-B and 2B, arrows). These structures may represent nucleation sites for tau assembly into PHF-like β -pleated sheet structures. This step may correspond to Fig. 5B showing aggregates in the

vicinity of the nuclear area and with a strong diffuse-granular cytoplasmic immunoreactivity (pre-NFT stage). In this step the conformation of tau would be further modified by an early truncation of the C-terminus, but it may represent the formation and aggregation of granular structures. In this regard, it has been demonstrated that removal of the C-terminus enhances tau-tau binding in AD (Abraha A et al 2000 Gamblin T.C et al 2003). In addition to this, truncated tau at Glu-391 increases 10-fold the binding to intact full length tau. These steps, involving the loss of a fragment of tau protein may represent the critical conformation adopted by tau molecule, which determines an irreversible change which allows the further steps towards the formation of the PHFs. Further steps, involving binding and truncations (dotted arrowheads), involving both C- and N-termini truncations will form heteropolymers (García-Sierra F. 2003) which were previously described in I-NFTs (Fig. 5C) and to the eventual formation of E-NFTs which are characterized the sole presence of the truncation at Glu-391 but detected by TR dye. As described by García Sierra F. in press a second truncation at Asp-421 will also appear in this cascade of tau abnormal processing. In conclusion, we proposed that the amyloidogenic processing of tau is a specific molecular mechanism in AD, which is characterized by an early regional shift of intact molecules followed by structural foldings and truncations. As this occurs, more intact tau molecules are sequestered and processed as the initial proteins in an up regulation effect. We currently investigating this possibility in order to provide further support to our model explaining the pathological processing of tau proteins which results in the formation of insoluble filaments constituted by amyloid tau in AD.

References

Abraha A., Ghoshal N., Gamblin T. C., Cryns V., Berry W.R., Kuret J., Binder L. L. C-terminal Inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell Science*. 113 (2000). 3737-3745

Augustinak J.C., Schneider A., Eva-Maria Mandelkow . Hyman Bradley T.. *Acta Neuropathol*. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 103(2002), 26-35

Alonso A.D., Grundke Iqbal I., Barra H.S., Iqbal K., Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer's neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated protein 1 and 2 and disassembly of microtubule by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 94 (1997), 298-303

Arriagada P.V., Growdon J.H., Hedley-Whyte E.T. and Hyman B.T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 42(1992), 631-639

Berry R.W., Abraha A., Lagalwar L., LaPointe N., Gamblin T.C., Cry V.L Binder L.I. Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochem*. 42(2003), 8325-8331

Billingsley M. L., and Kincaid R.L. Regulates phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interactions, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J*. 323(1997), 577-591

Brady R.M., Zinkowski R.P., Binder L.I.. Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging*. 16(1995),479-486

Braak E., Braak H. Y Mandelkow E.M. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*. 87(1994), 554-567

Buee-Scherrer V., Pau B., Condamin O., Mourton-Guilles C., Jakes R., Goedert M., Pau B. Y Delacourte A. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 39(1996),79-88

Carmel G., Mager E.M., Binder L.I., Kuret J.. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's Disease Pathology. *J Biol Chem*. 271(1996): 32789-32795.

Delobel P., Flament S, Hamdane M, Mailliot C, Sambo AV, Begard S, Sergeant N, Delacourte A, Vilain JP, Buee L. Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *J Neurochem.*83(2002):412-20

Ellisman M., Ranganathan R., Deerinck T., Young S., Terry R. and Mirra S. Neuronal fibrillar cytoskeleton and endomembrane system. In: *Advances in Behavioral Biology 34: Alterations in the Neuronal Cytoskeleton in Alzheimer Disease*, Perry G, Ed, Plenum Press, New York, pp 61-73,1987.

Fasulo L., Ugolini G., Visintin M., Bradbury A., Brancolini C., Verzillo V., Novak M. Y Cattaneo A. The neuronal Microtubule associated protein tau is a substrate for Caspase-3 and an effector of apoptosis. *J. of Neurochem.* 75(2000), 624-633

Fasulo L., Visintin M., Novak M. Y Cattaneo A.. Tau truncation in Alzheimer's disease: expression of a fragment encompassing PHF core tau induces apoptosis in COS cells. *Alzheimer's Rep.* 1(1998), 25-32

Friedhoff P., Von Bergen M., Mandelkow E-M., Davies P., Mandelkow E. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci.* 95(1998). 15712-15717

Galván M., David J.P., Delacourte A, Luna J., R. Mena. Sequence of neurofibrillary change in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho.tau antibody, AD2. *J. Alzheimer's disease.* 3(2001), 417-425

Gamblin T.C., Berry R.W., Binder L.I. Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochem.* 25. (2003a), 2252-2257

Gamblin T.C., Chen F., Zambrano A., Abraha A., Lagalwar S., Guillozet A.L., Lu M., Fu Y. García-Sierra F., Millar R., Berry W., R., Binder I. L. Cryns V.L. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangle in Alzheimer's disease. *Proc Natl. Acad Sci. USA* 100(17). (2003b), 10032-10037

García-Sierra F., Goshal N., Quinn B., Berry W., R., Binder I. L. (2003). Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Disease.* 5. 65-77

Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16(1993), 460-465

Goedert M. Jakes R., Crowther R.A., Six j., Lubke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J.Q., Lee V.M-Y. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(1993), 5066-5070

Goedert M., Jakes R. Vanmechelen E.. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett.*189(1995),167-169

Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandermeeren M., and Cras P.. Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: Identification of phosphorylation sites in the tau protein. *Biochem J.* 301(1994), 871-877

Ghoshal N., García-Sierra F., Fu Y., Beckett L.A., Mufson E.J., Kuret J. Berry R.W., Binder L.I. Tau 66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 77(2001). 1372-1385

Greenberg S.G. y Davis P.. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrilamide gel electrophoresis. *Proc Nat. Acad. Scie. USA.* 87(1990),5827-5831

Jicha A.G., Bowser R., Kasam I.G., y Peter D. Alz-50 and MC-1 a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosc. Res.* 48(1997a), 128-132

Jicha A. G., Lane E., Vincent I., Otvos L Jr., Hoffman R., Davies P. A conformational- and phosphorylation- dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 69(1997b), 2087-2095

Jicha A.G., Berenfeld B, Davies P.. Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 55(1999), 713-23

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

Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 1996 399(1996) 344-9.

Lindwall G. and Cole R.D. Phosphorylation effects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J.Biol. chem.*259(1984), 5301-5305

Liu Q., Smith M.A., Avila J., De Bernardis J., Kansal M, Takeda A., Zhu X., Nunomura A., Honda K., Moreira P.I., Oliveira R.C., Santos S.M., Shimohama S., Aliev G., De la Torre J., Ghanbari A.H., Siedlak S.L., Harris P.L., Sayre L.M., Perry G. Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformation. *Free radical Biol. Med.* In press

Loomis P.A., Haward T.H., Castleberry R.P. and Binder L.I. Identification of nuclear τ isoforms in human neuroblastoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(1990),8422-8426

Lovell M.A., Xie C., Markesbery W.R. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging*. 22(2001), 187-194

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D, Stadlan E.M.. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's disease and Related Disorders Association) Work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 34(1984), 939-944

Mena R., Wischik C.M., Novak M., Milstein C., Cuelllo A.C. A progressive deposition of paired helical filament (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. An immunocytochemical study with a monoclonal antibody against the PHF core. *J. Neuropathol Exp Neurol*. 50(1991), 474-490

Mena R., Edwards P.C., Pérez-Olvera O., Wischik C.M. Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 89(1995), 50-56

Mena R., Edwards P.C., Harrington C.R., Mukaetova-Ladinska E.B. y Wischik C.M. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 91(1996), 633-641

Merken M., Vandermeeren M., Lubke U., Six J., Boons J., Van de Voorde A., Martin J.J. y Gheuens J. Monoclonal antibodies phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol*. 84(1992), 265-272

Merrick S.E., Demoise D.C., Lee V.Y., Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser 202/Thr 205 in response to microtubule depolymerization in culture human neurons involves protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem*. 271(1996), 5589-5594

Metuzals J., Robitaille Y., Houghton S., Gauthier S. and Leblanc R. Transformation of the neurofilamentous network components into PHF-like strands and PHF paracrystals. In: *Advances in Behavioral Biology 34: Alterations in the Neuronal Cytoskeleton in Alzheimer Disease*, Perry G, Ed, Plenum Press, New York, pp 75-95. 1987

Novak M., Edwards P.C., Milstein C., Wischik C.M. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of mAbs 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(1991), 5837-5841

Novak M., Kabat J. y Wischik C.M. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer disease paired helical filament. *EMBO J.* 12(1993), 365-370

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

Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M. de la Monte S., Dikkes P. y Tsai L.H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration (ver comentarios). *Nature.* 402, 615-622

Pérez M., Valpuesta J.M., Medina M., Montejo de Garcini E., Avila J. (1996). Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem.* 67(3):1183-1190

Ruben G.C., Novak M., Edwards P.C. y Iqbal K. Alzheimer paired helical filaments, untreated and pronase digested, studied by vertical platinum-carbon replication and high resolution transmission electron microscopy. *Brain Res.* 675(1995),1-12

Sayre L.M., Zelasko D.A., Harris P.L.R., Perry G., Salomon R.G., Smith M.A. 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68(1997).2092-2097

Schweers O., Schonbrunn-Hanebeck E., Marx A., Mandelkow E. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J. Biol Chem* 269(1994), 24290-24297

Skrabana R., Kontsek P., Mederyova A., Iqbal K, Novak M. Folding of Alzheimer's core PHF subunit revealed by monoclonal antibody 423. *FEBS Lett* 568(2004), 178-182

Tabaton M., Cammarata S., Mancardi G., Manetto V., Autilio-Gambetti L., Perry G., and Gambetti P. Ultrastructural localization of β -amyloid, τ and ubiquitin epitopes in extracellular neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(1991), 2098-2102.

Takeda A., Smith M.A., Avila J., Nunomura A., Siedlak S.L., Zhu X., Perry G., Sayre L.M. In Alzheimer's disease, hemeoxygenase is coincident with Alz-50, an epitope of τ induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J. Neurochem.* 75(2000),1234-1241

Trojanowski J.Q., Schmidt M.L., Shin R.W., Bramblett G.T., Rao D. y Lee V.M. Altered tau and neurofilament proteins in neurodegenerative diseases: Diagnostic implications for Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain Pathol.* 3(1993a), 45-54

Trojanowski J.Q., and Lee V.M. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J.* 9(1995), 1570-1576

Ugolini G. Catteneo A., Novak M. Co-localization of tau truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurons. *Neuroreport.* 8(17):3709-3712

Uchida K., Kanematsu M., Morimitsu Y., Osawa T., Noguchi N., Niki E. (1998). Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J.Biol. Chem.* 273(1997), 16058-16066

Uchihara T., Nakamura A., Yamazaki M., Mori O. Tau-positive neurons in corticobasal degeneration and Alzheimer's disease-distinction by thiazin red and silver impregnation. *Acta Neuropathol.* 100(2000), 385-389

Vincent I., Zheng J.H., Dickson D.W., Kress Y., Davies P. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol aging.* 19(1998), 287-296

Weaver C. L., Espinoza M., Kress Y., Davies P. Conformational change as one of the earliest alteration of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21(2000), 719-727

Wischik C.M., Crowther R.A., Stewart M. y Roth M. Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Cell. Biol.* 100(1985), 1905-1912

Wischik C.M., Edwards P.C., Lai R.Y., Paykel E.S., Braine C., Huppert F.A., Mukaetova-Ladinska E.B., Mena R. Quantitative analysis of tau protein in paired helical filament preparation: Implication for the role of tau protein phosphorylation in PHF assembly in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 16(1995), 409-417; discussion 418-431

Wischik C.M., Novak M., Edwards P.C., Klug A., Tichelaar W. Y Crowther R.A. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proc Nat. Acad. Sci USA.* 85(1988a), 4884-4888

Wischik C.M., Novak M., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R., Walker J.E., Milstein C., Roth M., y Klug A. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Nat Acad. Sci. USA.* 85(1988b), 4506-4510

Wolozin B., Davies P. Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. *Ann Neurology.* 22. (1986) 521-526

Zheng-Fichhofer., Biernat J., Mandelkow E-M., Illenberger S., Godemann R., Sequential phosphorylation of tau by glycogen syntetase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser 214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem.* 252(1998). 542-552

Acknowledgments

We thanks Dr. P. Davies (Albert Einstein College of Medicine. Bronx, NY) for the generous gift of the mAb TG-3 and Alz-50: Dr. G. Perry for the critical readings of the manuscript and English edition. Mr. José Luis Fernandez and Ms. Maricarmen De Lorenz for their excellent technical and secretary assistances, respectively. Authors want to express their gratitude to the Mexican families for the donation of the brains of their beloved ones thanks to which this study was possible. Supported by CONACYT grant N° 39102-M (to R.M.)

Figures.

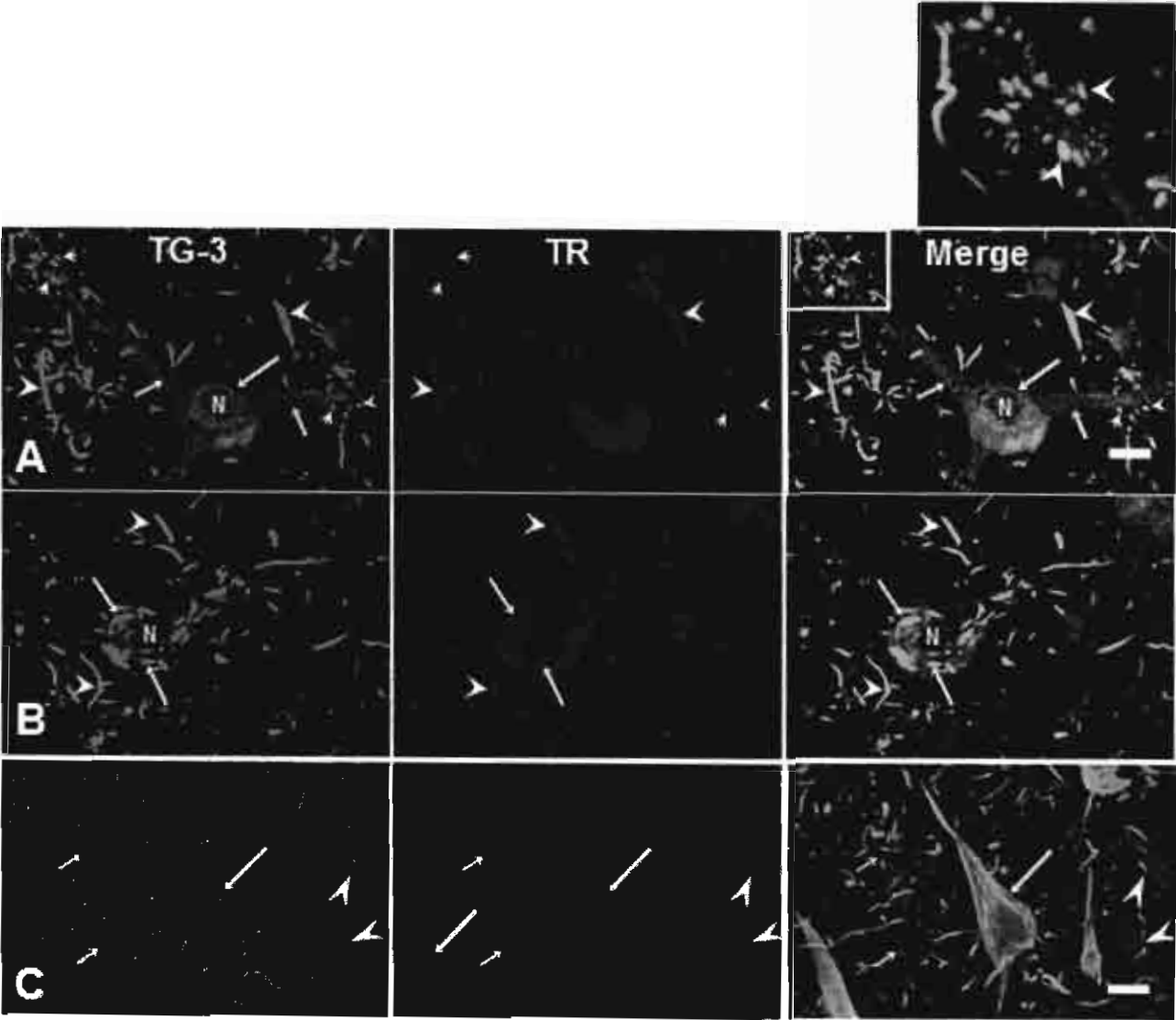


Fig1

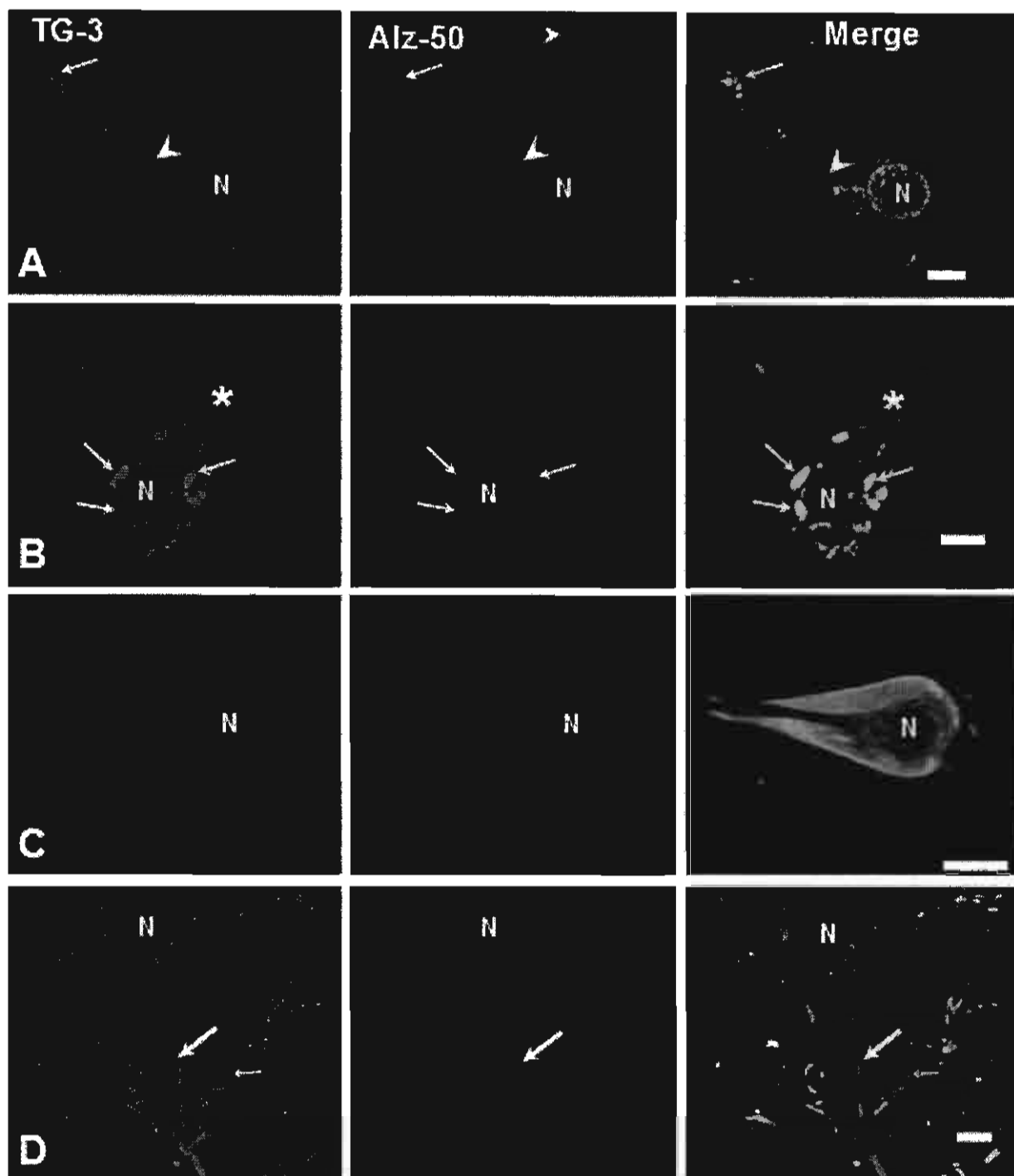


Fig 2

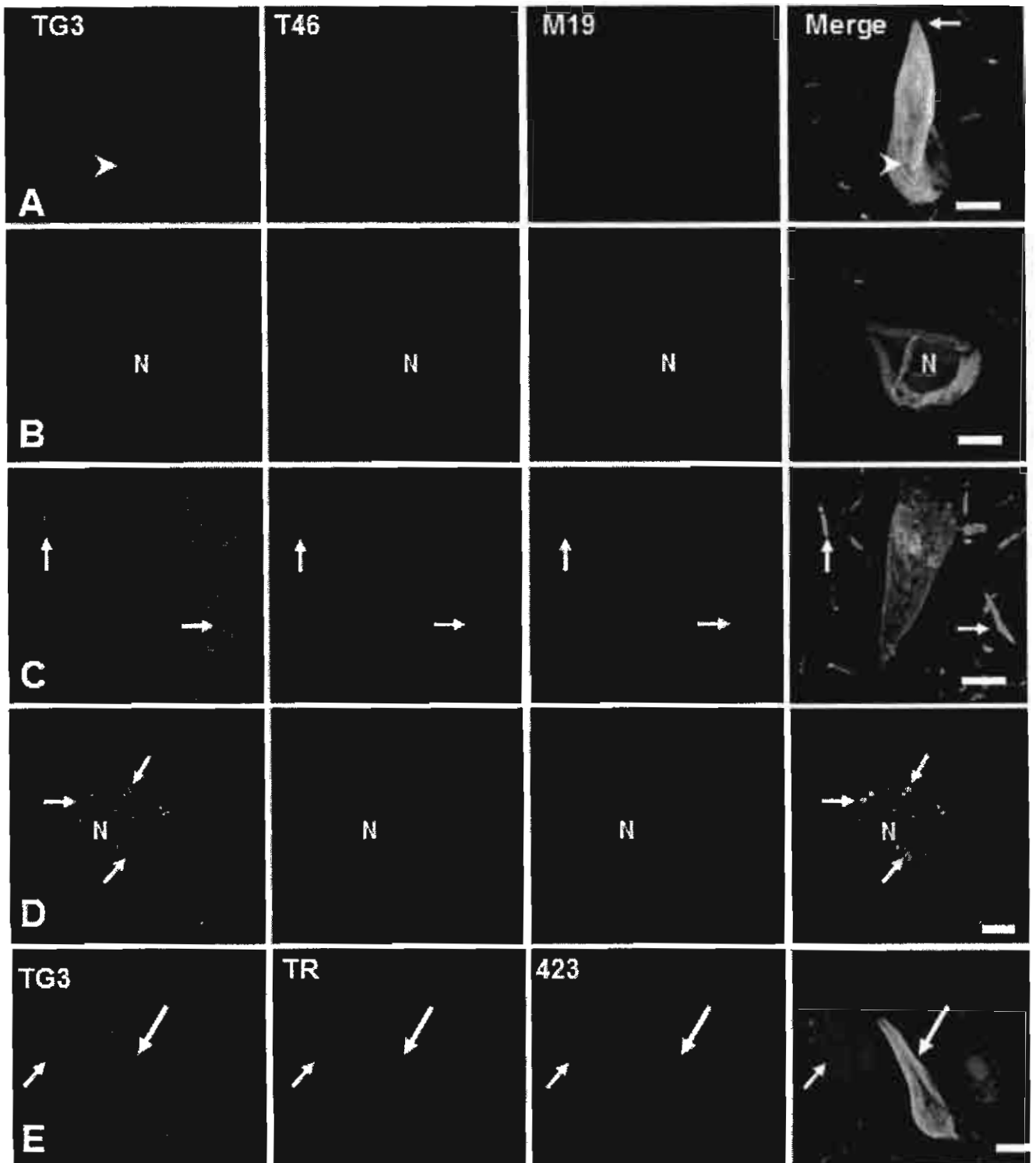


Fig 3

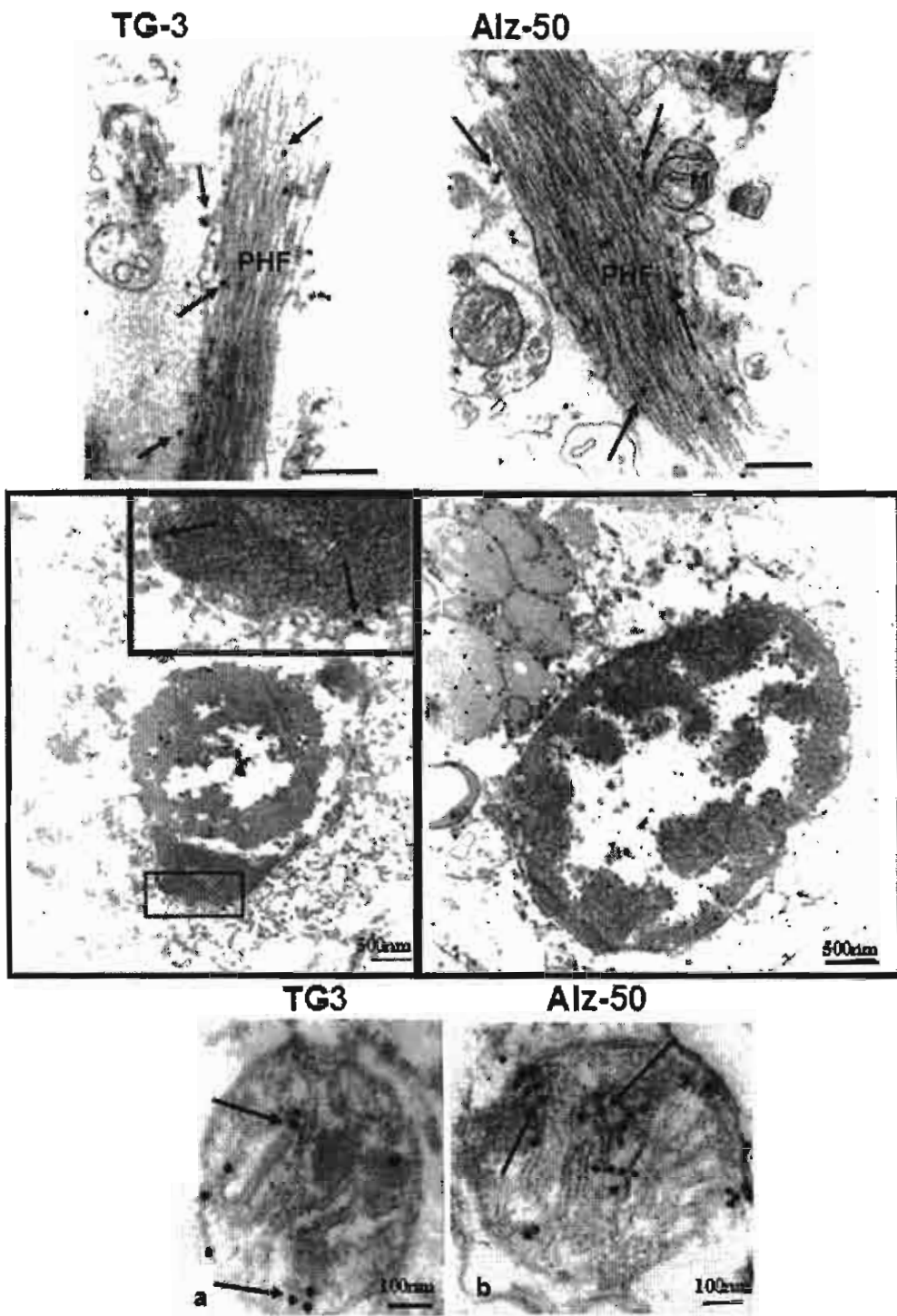


Fig 4

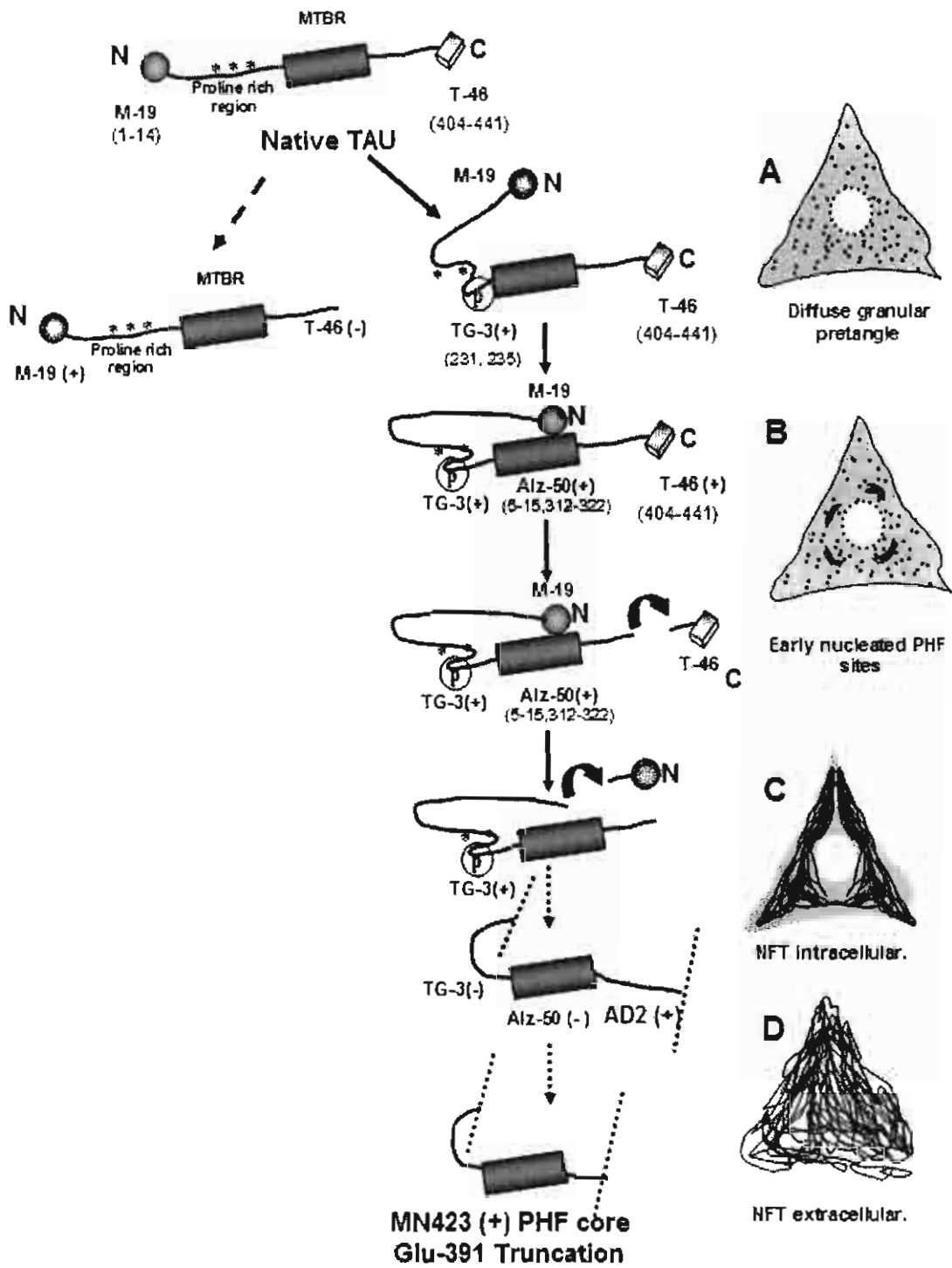


Fig 5

Figures Legends

Figure 1. mAb TG-3 immunoreactivity in AD brains. A. In non-NFT bearing neuronal cells, mAb TG-3 displays a diffuse-granular patterns distributed widespread in the cytoplasm and proximal processes (short arrows). The perinuclear area shows a strong green fluorescence (long arrow). Contrasting with this labeling, immunoreactive dystrophic neuritis located in the vicinity of the cell (large arrowheads) as well as ends of a basal dendrite and axonal processes are also detected by Thiazin red (small arrowheads), in the red channel. An enlargement of the outframed region allows to better see these double labeled structures. B. Pre-NFT stage. mAb TG-3 immunoreactive products located in the cytoplasm of the cells (arrows, Green channel) are also detected by TR in the red channel. Some neurites located in the vicinity displayed similar immunoreactive pattern (arrowheads). C. I-NFT. The two NFTs present in the field are strongly detected by TR in the red channel (long arrows) and show mAb immunoreactivity with fibrillar appearance restricted to the outer part of the structure. The majority of neurites present in the close vicinity of such tangles are detected only by mAb TG-3 in the green channel (short arrows). Autofluorescent lipofuscin granule are present in the red channel. Confocal microscopy. Bar= 20 μ m.

Figure 2.

Double immunolabelling with mAbs TG-3 (green channel) and Alz-50 (red channel). A. Cytoplasm (arrowhead) and perinuclear areas (N) A non-bearing NFT-cell (pre-tangle stage) is identified by mAb TG-3 (takes the form of diffuse granular deposits) . mAb Alz-50 is practically undetected in this cell, contrasting with some double immunolabelling observed in the end of the neuronal process (arrow). This is better observed in the merge figure. Autofluorescent lipofuscin is detected in red channel (small arrowheads. B. This pre-NFT stage cells shows putative nucleation centers of tau aggregation which are double immunolabeled with both antibodies. These structures take the form of "beads" (arrows). mAb TG-3 immunoreactive products but not Alz-50 are present in the cytoplasm (asterisk) as shown in Figure 1. C. A typical intracellular NFT is identified by the

two markers. D. mAb TG-3 immunoreactive I- NFT is observed in green channel (large arrow). Thin neurites located in the vicinity are also label with mAb TG-3 microscopy. Bar= 20 μ m.

Figure 3

Triple labeling with TG-3 (green channel) and C- and N- ends of tau protein (T46, red channel and M19, blue channel, respectively). A. The I-NFT is detected in the three channels. mAb TG-3 immunoreactivity is stronger towards the outer parts of the tangle where the triple labeling is more evident (arrow). mAbs T46 and M19, red and blue channels, respectively, but not mAb TG-3 are detected strongly in the center of such tangle (arrowhead) . B. The I-NFTs double labeled with TG-3 and M19 but not with T46. C. The I-NFT detected by TG-3 in green channel is not observed in either red and blue channels. Some neurites located in the vicinity which are identified by TG-3 are also identified by M19 (arrows). D. TG-3 immunoreactivity is present in granules (arrows) in this pre-I-NFT stage cell. These structures contrast with the dense diffuse immunoreactive cytoplasmic pattern displayed by M-19G in the blue channel. None of such structures appeared to colocalize with both M-19G and T46. This aspect is better observed in merged image. E. The E-NFT detected by mAb 423 in the blue channel is undetected by mAb TG-3 and TR (short arrow). In contrast, the I-NFT detected by the latter markers and detected in the green and red channels, respectively is not label with mAb 423 (long arrow). Autofluorescent lipofuscin is present in red channel (arrowheads). Bar= 20 μ m.

Figure 4

Immunoelectronmicroscopy with TG-3 and Alz-50 in AD hippocampus. Gold particles are observed closely associated with PHF bundles for both TG-3 (A) and Alz-50 (B). This marker also identifies heterochromatin areas, C insert and D, respectively. Also mitochondria crests (arrows) are detected by TG-3 (a) and Alz-50 (b).

Fig. 5. Scheme illustrating the progressive sequence of early tau protein processing in AD, based on previous data and this study. The processing starts from intact tau and the regional shift detected by mAb TG-3 in the proline-rich area (A. correspond to the granular-diffuse immunoreactive pattern displayed in non-bearing NFT cells) appears to determine the subsequent formation of the structural conformation change detected by mAb Alz-50. Some nucleation sites (illustrated in B) contain the conformational changes detected by mAbs TG-3 and Alz-50). The N-terminus folding is proceeded by a truncation of the C-terminus of of the molecule. This early processing of the tau proteins appears to involve intact, folded and truncated tau species (heteropolymers) which are sequentially associated by steps involving truncation and foldings. See results for details. A and C. represents I and E- NFTs (is constituted by the PHF core only), respectively.

Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2

M. Galván^a, J.P. David^b, A. Delacourte^b,
J. Luna^a and R. Mena^{a,*}

^a*Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, PO Box 14-740, 07000, México, D.F., México*

^b*Unité INSERM 422, Place de Verdun, 59045 Lille, Cedex, France*

In the present study, neurons of the entorhinal cortex, hippocampus and frontal lobe from non-demented and Alzheimer's disease (AD) cases, were stained in order to study neurofibrillary changes. We have used double immunolabeling with a phosphorylation dependent monoclonal antibody (mAb) to tau, AD2, and the histochemical dye thiazin red (TR). MAb AD2 specifically recognizes phosphorylated Ser396 and Ser404, while TR shows binding sites for amyloid- β and tau when they are in fibrillar states. We show a morphological sequence of changes in the development of neurofibrillary tangles (NFTs), starting from mAb AD2 diffuse labeling in non-NFT bearing cells recognized by mAb AD2, then going through two subtypes of intracellular NFTs, to a final stage as extracellular-NFTs. Morphometric analysis of the density of AD2 immunoreactive structures showed the NFT density in hippocampus and frontal lobe were the best parameters to differentiate normal aging from AD. Densities of AD2 immunoreactive structures in hippocampus and frontal lobe correlated with the Clinical Dementing Rating score. Based upon the variety of appearances of immunoreactivity displayed by mAb AD2, we were able to stage neurofibrillary changes at the level of individual neurons and brain areas. Our results demonstrate that the intensity of neurofibrillary changes in the hippocampus as well as the extent of the degeneration process in association areas differentiate normal aging from AD, and are well correlated with cognitive impairment.

Keywords: AD2, Alzheimer disease, confocal microscopy, hippocampus, hyperphosphorylated tau protein, neurofibrillary tangles

1. Introduction

The classic histopathological hallmarks of Alzheimer disease (AD) are neurofibrillary tangles (NFTs) and senile plaques. The neurofibrillary pathological structures are first seen in limbic cortical areas, then spread in a predictable, non-random way across the isocortical brain areas [6,26,34,38]. Their density in isocortical areas has been related to the cognitive impairment observed in AD [1,3,15,16]. In AD, NFT formation is associated with neuronal loss [12,23,24] and there is a strong correlation between neuronal degeneration and the transition between intracellular and extracellular NFTs [8]. In addition, it is generally assumed that extracellular NFTs presumably represent neuronal death [12,21,23,24].

Hyperphosphorylated tau proteins are the major antigenic components of paired helical filaments (PHF), which form NFTs, dystrophic neurites in neuritic plaques and neuropil threads [13,22,25,31]. Therefore, phosphorylation of tau protein has been considered an important event of PHF formation. Phosphorylation dependent antibodies were suited to study the gradual development of neurofibrillary structures [2,5,17] as well as to identify the phosphorylated sites that presumably are important in PHF assembly [4,32]. Based on immunocytochemical preparations, Kimura et al. [28] studied the changes in tau phosphorylation state with NFT development. These authors found that phosphorylation of sites Ser199, Ser202, Ser409 and Ser422 occurs early in NFT development and these sites remain phosphorylated throughout later stages of neurodegeneration. Tau protein sites Thr231 and Ser396 may also be phosphorylated in the more advanced stages of NFT formation [28].

*Corresponding author. Tel.: +52 574 73800 ext. 5130; Fax: +52 574 77105; E-mail: rmena@fisio.cinvestav.mx.

Monoclonal antibody AD2 (mAb AD2) recognizes phosphorylation on Ser396 and to a lesser extent on Ser404 [11]. This antibody detects a phosphorylation event that seems to be of great importance for microtubule assembly [19] and for all types of tau pathology [10]. Using confocal microscopy, we have analyzed the immunochemical characteristics of mAb AD2 at different stages of NFT formation that are detected by thiazin red [29,30]. Our confocal analysis provides further support that mAb AD2 is an useful immunocytochemical probe to define the pathological phosphorylation processing of PHF-tau protein.

In this report, we have examined the distribution of mAb AD2 immunoreactive NFTs in different brain areas of well-characterized AD and control patients. The NFT densities were correlated with the Clinical Dementia Rating (CDR) score, a clinical parameter of cognitive state [27]. Our findings support that the extent of neurofibrillary changes associated with abnormally phosphorylated tau protein in the hippocampus and neocortical areas correlate with cognitive impairment in AD.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Brains were obtained at autopsy (postmortem delay: 7–48 h). Tissue was fixed by immersion in buffered 10% formalin for at least three weeks. 10 demented cases age 69 to 92 (mean 85 ± 7 years) diagnosed as AD and 10 non-demented patients age 63 to 93 (mean 83 ± 10 years) were included. Clinical, neuropathological, and biochemical data for these cases have been previously reported [14]. Briefly, brains for AD patients diagnosed according to NINCDS-ADRDA criteria, were neuropathologically evaluated according to CERAD criteria. Cognitive status was retrospectively evaluated with the Clinical Dementia Rating (CDR) score [27]. The CDR values are as follows: 0 = no memory loss, 0.5 = questionable, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = severe dementia. Six of the non-demented group had a CDR of 0. The other four cases had a CDR of 0.5, however, did not conform to CERAD criteria for AD diagnosis. The number of AD cases, by increasing index of severity, were: 1 at 1; 3 at 2; and 6 at 3. The patient with CDR score at 1 was diagnosed as an early or preclinical AD.

2.2. Immunocytochemistry

Paraffin-embedded 8 μm -thick sections were obtained from entorhinal cortex, hippocampal formation and frontal cortex Brodman area 9 (BA9) regions of each case. Prior to immunolabeling, sections were incubated with 0.5% hydrogen peroxide in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, for 30 min. Sections were then incubated overnight, at 4°C, with the mAb AD2, diluted 1:500 in PBS containing 0.2% Triton X-100. An anti-mouse IgG coupled with horseradish peroxidase was used as secondary antibody. Visualization of immunoreactive products was achieved by the peroxidase catalyzed reaction of 0.06% diaminobenzidine with H_2O_2 . The reaction was stopped by immersion of the slide in PBS and sections were counterstained with cresyl violet, then dehydrated and coverslipped in DPX mounting medium (Electron Microscopy Sciences, Washington). Control sections were processed in which the primary antibody was omitted. In control preparations, no immunoreactive structures were detected.

2.3. Confocal microscopy

Selected sections from the hippocampus were double-labeled with mAb AD2 and the dye thiazin red (TR; Fluka, Busch). After incubation with mAb AD2, overnight at 4°C, sections were then incubated with FITC-tagged goat anti-mouse IgG, at room temperature for 1 h. Sections were counterstained with TR (0.001% in water) for 7 min, washed and mounted in anti-bleaching media (Vectashield, Vector Labs). TR is a red fluorescent dye that has staining properties similar to thioflavin S [36]. It has been extensively used in our laboratory to differentiate between fibrillar and non-fibrillar states of aggregation of PHF-associated tau protein [29,30]. The double-labelled slides were viewed with a $\times 60$ (NA 1.4) oil immersion objective on a Nikon microscope with attached confocal system (Bio-Rad MRC 600, Watford, UK). Sections were excited with green (blue exciter filter, 418 nm) and red (green exciter filter, 514 nm) for mAb AD2 and TR, respectively. From each area, 5–15 serial optical Z-sections (0.2–0.5 μm thick) were collected using the dual channel image system. Data were stored on rewritable optical disk cartridges. The criteria to identify TR-positive intracellular NFTs was based upon tightly-arranged tangles and the presence of a black rounded hole, corresponding to the nuclear space. Likewise, TR-positive extracellular NFTs were defined on the bases of a loosely-arranged tangles in the absence of nuclei and associated lipofuscin granules.

2.4. Morphometry and statistics

The density of intracellular NFTs was determined by counting three different fields randomly chosen in each region. The fields of the hippocampus formation were counted as the: CA3-CA2 and CA1-subiculum. Entorhinal cortical layers II and IV were considered together. Polymodal association cortex of BA9 in the frontal cortex was considered alone. Counting was made using a 20x objective lens. The density of AD2-immunoreactive intracellular NFTs was expressed as the number of structures per mm^2 . Data were compiled and processed using standard software. The comparisons between 10 AD and 10 non-demented cases were made using the t-student test. Demented and non-demented cases were considered in the analysis of the correlation between density of intracellular NFTs and CDR score using the Spearman's r coefficient.

3. Results

3.1. Double labelling with mAb AD2 and thiazin red in the hippocampus

A. Neurons devoid of NFTs

Both in control cases and AD, pyramidal neurons with morphological normal appearance which were present in the hippocampus, mainly in CA1 and subiculum, exhibited perinuclear (arrow in Fig. 1(a)) and cytoplasmic diffuse granular mAb AD2 immunoreactivity (arrows in Fig. 1(b)). These mAb AD2 immunoreactive deposits were, in general, not detected with TR, suggesting a non fibrillar state of the first neuropathological changes related to mAb AD2 antigen (Figs 1(b) and 3(B)). However, in some non NFT-bearing neuronal cells the mAb AD2 immunoreactivity that was found in association with endogenous membranes colocalized with TR, while no traces of AD2 immunoreactivity were observed within the karyoplasm (Figs 1(a) and 3(A), arrow). MAb AD2 immunoreactivity was frequently observed mingled with autofluorescent lipofuscin granules located in the cytoplasmic compartment (arrowhead in Figs 1(a) and 3(A); arrows in Figs 1(b) and 3(B)).

B. Intracellular-NFTs

Intracellular-NFTs were immunolabeled with mAb AD2. Using double labeling confocal microscopy with this antibody and TR, the fibrillar state of aggregation of AD2 immunoreactive products was analyzed in

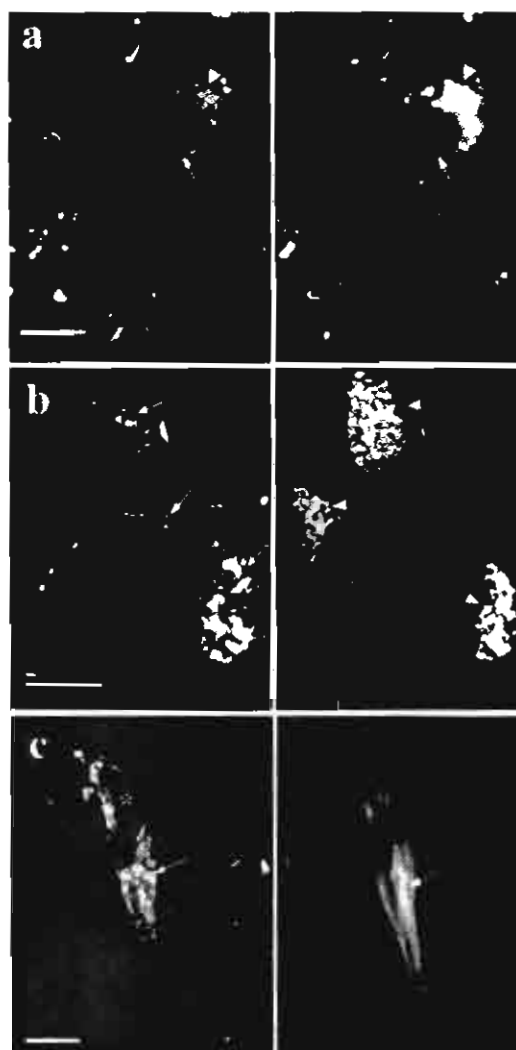


Fig. 1. a–c Double labeling with mAb AD2 and TR in AD brains. (a) a Patchy perinuclear mAb AD2 immunoreactivity is observed in the green channel (left side, arrow) that is faintly detected by TR in the red channel. A fraction of the autofluorescent lipofuscin granules located on the vicinity of the nucleus is also detected by mAb AD2 (arrowhead). (b) Granular mAb AD2 immunoreactivity (arrows) was observed mingled with lipofuscin granules deposits (arrowheads) which are detected in the red channel. Asterisks correspond to the nuclei of the cells. (c) An intracellular tangle that is detected by TR in the red channel displays a mAb AD2 immunoreactivity that takes the form of dense amorphous granular material distributed in patches along the structure (left side, thick arrow). The immunoreactive deposits observed toward the upper part of the cells is not TR associated (left side, thin arrow). The nucleus of the cell appears as a black hole (asterisk). Scale bars = 10 μm .

these tangles. This approach evidenced two consistent subtypes of intracellular-NFTs (Figs 3(C) and (D)). As Fig. 1(c) shows, the somatic compartment of neu-

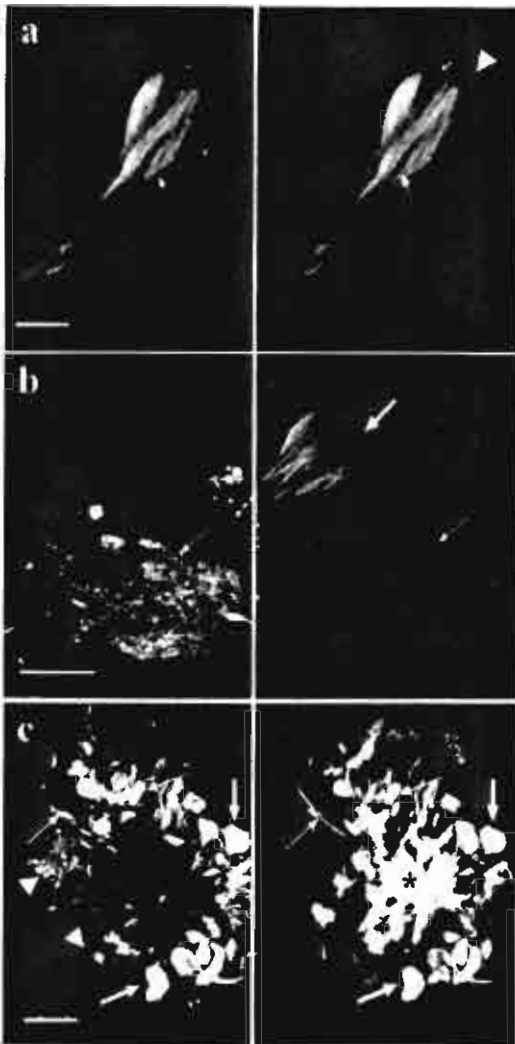


Fig. 2. a–c Double labeling with AD2 and TR. (a) A typical intracellular-NFT (arrow) is double labeled with mAb AD2 in the green channel (left side) and TR (right side) in the red channel. Autofluorescent lipofuscin granules are only observed in the red channel (arrowhead). (b) Extracellular NFT located in the upper part of the image is only detected by TR in the red channel (thick arrow). The extracellular-NFT located in the lower part of the image displayed a residual coarse granular mAb AD2 immunoreactivity (thin arrow). (c) Dystrophic neurites associated with a neuritic plaque whose core is constituted by amyloid- β deposits (asterisk) displayed a heterogeneity in both shapes and patterns of immunolabeling with mAb AD2. Large and round neurites were either double labeled with the two markers (thick arrows) or identified only by mAb AD2 (arrowheads). The long and slender neurites were double labeled with mAb AD2 and TR (thin arrows). Scale bars = 10 μ m.

ronal cell displayed the first subtype of intracellular-NFTs that was characterized by granular mAb AD2 immunoreactivity (Fig. 1(c) left) and positive labeling by

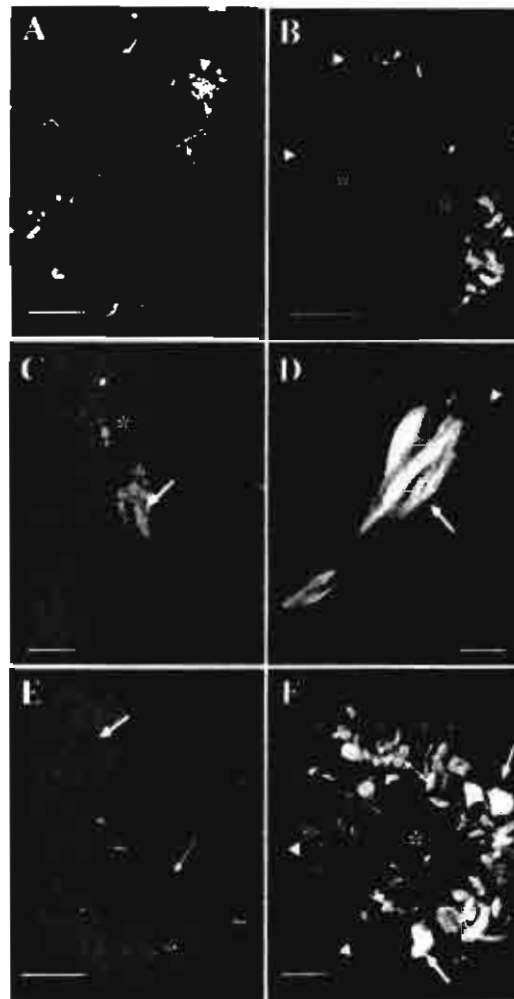


Fig. 3. A Merged color image corresponding to Fig. 1(a) for double labeling AD2 and TR. B Merged color image corresponding to Fig. 1(b). C Merged color image corresponding to Fig. 1(c). D Merged color image corresponding to Fig. 2(a). E Merged color image corresponding to Fig. 2(b). F Merged color image corresponding to Fig. 2(c). Scale bars = 10 μ m.

TR (Fig. 1(c), right). When both channels were merged the spatial relation between mAb AD2 granular immunoreactivity in green color and PHFs detected by TR in the red channel was observed unevenly distributed along the cytoplasmic surface of the cell (Fig. 3(C)).

The second subtype of intracellular-NFTs was the typical NFT. This lesion was characterized by double labeling of fibrillar appearance which was evident in both channels (Fig. 1(d), left and right arrows). The merged image showed the colocalization (in yellow color) between mAb AD2 fibrillar immunoreactivity and TR (Fig. 3(D)). This differential mAb AD2 labeling

found in these two subtypes of tangles may reflect the state of aggregation of hyperphosphorylated tau in the intracellular-NFTs. For all the cases studied, the second subtype of intracellular-NFTs was the prevalent form of tangles.

C. Extracellular-NFTs

It has been established that PHF-associated tau protein from intracellular-NFTs, during their transition to the extracellular space to become a "ghost", lose its whole amino terminus and portions of the carboxyl terminus [9,18]. In double labeling mAb AD2 and TR, we identified two subtypes of extracellular NFTs whose differences appeared to be related to the degree of proteolysis in the extracellular space. In subtype 1 extracellular-NFT, illustrated in Fig. 2(b) (thin arrow), mAb AD2 immunoreactivity took the form of granular material (green channel) distributed in "patches" along the surface of the loosely-arranged tangle detected by TR in the red channel (Figs 2(b) and 3(E), thin arrow).

We have called subtype 2 extracellular-NFTs those which appear to be highly degraded. These NFTs have lost all traces of antigenicity for mAb AD2 and are only detected by TR in the red channel (Figs 2(b) and 3(E), thick arrow).

D. Dystrophic neurites and neuropil threads

The large amounts of dystrophic neurites present in neuritic plaques allowed us to better analyze the different subtypes of such structures as detected by mAb AD2 (Fig. 3(F)). We were able to identify a heterogeneity of immunoreactive dystrophic neurites based upon their size, shape, degree of immunoreactivity and differential distribution. The majority of mAb AD2 immunoreactive neurites associated with the amyloid- β fibrillar deposits detected by TR in the red channel (Figs 2(c) and 3(F), asterisk) were large and round (Fig. 3(F)). Some of these enlarged neurites were double labeled by mAb AD2 and TR (Figs 2(c) and 3(F), thick arrows) while some other presented a granular pattern of mAb AD2 immunoreactivity rather than fibrillar and were undetected by TR (Figs 2(c) and 3(F), arrowheads). These patterns of labeling suggest differential states of phosphorylated tau aggregation. Large and round neurites associated to amyloid plaques were observed mainly in molecular layer of the dentate gyrus, CA1 and subiculum regions. Conversely to the latter neurites, long and slender neurites distributed in the neuropil could be associated or not to amyloid- β deposits. These neurites were mAb AD2 immunoreactive and double labeled by TR (Figs 2(c) and 3(F), thin arrows). This kind

of neurites when observed randomly distributed in the neuropil did not present any preferential location in the areas studied but were particularly abundant in the most severe cases of AD.

3.2. Densities of mAb AD2 immunoreactive structures in AD and non demented control cases

When we quantified the number of mAb AD2 immunoreactive cells displaying the perinuclear and cytoplasmic diffuse patterns both in AD and control cases by areas, non statistical difference was found.

The quantification of mAb AD2 immunoreactive intracellular-NFTs in CA3-CA2 ($P = 0.003$), CA1-subiculum ($P < 0.0001$), entorhinal cortex ($P = 0.0009$) and BA9 ($P = 0.008$), revealed that their density were significantly different between AD and non-demented groups (Fig. 4). In AD cases the highest density of intracellular-NFTs was found in the CA1-subiculum region, followed by entorhinal cortex, BA9 in the frontal cortex and in CA3-CA2 areas in the hippocampus. Control cases did not show this distribution pattern (Fig. 4).

3.3. Correlation between tangles and CDR

No correlation was found between the density of mAb AD2 immunoreactive cells displaying the perinuclear and cytoplasmic diffuse patterns and cognitive impairment among the cases studied.

On the other hand, the density of mAb AD2 immunoreactive intracellular-NFTs in the 20 cases correlated with the cognitive impairment which was previously established with the CDR score for each case. When all the regions in the hippocampus were considered together, the correlation between density and CDR was statistically significant ($r = 0.7964$, $P < 0.0001$). Additionally, when each region was analyzed separately the densities of mAb AD2 immunoreactive intracellular-NFTs correlated significantly with the CDR value in CA3-CA2 ($r = 0.7948$, $P < 0.0001$), CA1-subiculum ($r = 0.814$, $P < 0.0001$) and in entorhinal cortex ($r = 0.6979$, $P = 0.0006$). The highest correlation was found in the frontal cortex ($r = 0.8274$, $P < 0.0001$).

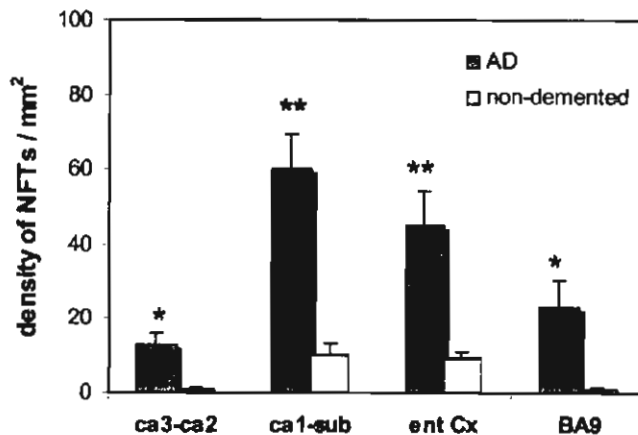


Fig. 4. Regional distribution of mAb AD2 immunoreactive NFTs in demented and non-demented groups. Three regions in the hippocampus (CA3-CA2, CA1-subiculum and entorhinal cortex) and one in the frontal lobe (BA9) were assessed. Density of NFTs corresponded to the average of 10 AD-cases and 10 non-demented cases. NFTs counts were performed using a 20x objective. Error bars represent standard error of the mean (SEM). For each region the statistical significance of the differences between density of NFTs for AD and non-demented groups was * $P < 0.01$ for CA3-CA2 and BA9, and ** $P < 0.001$ in CA1-subiculum and entorhinal cortex areas.

4. Discussion

The present study focused on the spatio-temporal formation of neurofibrillary changes that occur in normal aging and AD [2,5,17]. The study was performed using mAb AD2, an antibody that detects a phosphorylated epitope of the tau protein which is generated by phosphorylation of Ser396 and Ser404 residues [11]. Our quantitative study compared the changes in aging versus those observed in AD. Both in AD and non-demented cases, we found non-NFT bearing neurons which displayed a diffuse and granular AD2 immunoreactivity in the perinuclear area. Characteristically, these amorphous deposits were undetected by TR in the red channel (Figs 1(b) and 3(B)) suggesting a non-fibrillar state of such deposits. In addition, both in control and AD cases, these AD2 immunoreactive deposits were frequently associated with membranous structures like nuclear envelope (Figs 1(a) and 3(A)) and lipofuscin granules (Figs 1(b) and 3(B)). These findings agree with previous reports which demonstrate close association of tau immunoreactivity and endogenous membranes such as mitochondria, rough endoplasmic reticulum and lipofuscin granules [7,20,29]. In general, we interpret these results as representing early stages of tau accumulation probably occurring membrane bound. In this regard, membranous support may act as a template for the nucleation of the phosphorylated tau leading to PHFs formation as is showed in Figs 1a and 3A. The finding of mAb AD2 immunoreactive deposits in a non-fibrillar state as demonstrated

with TR (Figs 1(b) and 3(B)), supports previous publications suggesting that abnormally phosphorylation of tau protein precedes NFTs formation [2,5]. According with this, the non-fibrillar AD2 immunoreactive deposits may correspond to Braak's group 1 [5] or stage 0 of Bancher's classification [2]. Our findings appear to contrast with Kimura et al., in which they report that phosphorylation at Thr231 and Ser396 occurs after PHF assembly [28], a result that could be due to the additional recognition of mAb AD2 of a phosphorylated site on Ser404 in the tau molecule.

In this confocal microscopical analysis we were able to distinguish subtypes of NFTs based upon their patterns of AD2 immunoreactivity and TR counterstaining. In this regard, a subpopulation of TR positive intracellular-NFTs displayed an AD2 immunoreactivity which was diffuse granular rather than fibrillar, and distributed along the surface of the TR positive tangle (see Figs 1(c) and 3(C)). The second subpopulation of TR positive intracellular-NFTs was characterized by a clear colocalization between AD2 immunoreactivity and TR (Fig. 2(a)). This type of intracellular-NFT appeared green-yellow in the merged image (see Fig. 3(D)). Following Braak classification of NFT [5] the first population of structures characterized by diffuse granular mAb AD2 immunoreactivity (Figs 1(c) and 3(C)) would correspond to Group 2, while the second population (Figs 2(a) and 3(D)) to Group 3. As the AD cases used in our study were classified with moderate to severe dementia we expected to find mainly Group 3 mAb AD2 immunore-

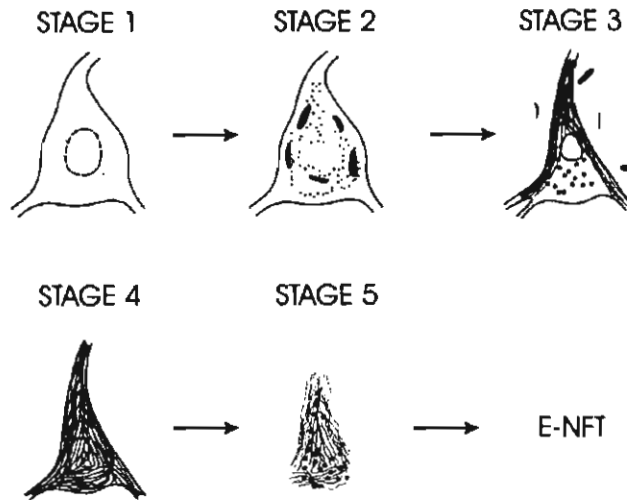


Fig. 5. Schematic drawing summarizing stages of mAb AD2 immunoreactivity in tangles. Stage 1 (pre-tangle stage I) corresponds to perinuclear and diffuse AD2 immunoreactivity which is generally undetected by TR. Stage 2 is characterized by amorphous granular mAb AD2 immunoreactivity located throughout the cytoplasm (pre-tangle stage II). TR fails to detect this stage. Stage 3 was characterized by granular AD2 immunoreactivity distributed along the intracellular tangle which is detected by TR. (tangle stage I). Stage 4. The typical intracellular tangle with fibrillar appearance is double labeled with AD2 and TR (tangle stage II). Stage 5 corresponds to a transitional stage in which the intracellular-NFT has become extracellular but still displays a coarse and sparse granular AD2 immunoreactivity (E-NFT stage I). Eventually the "ghost" tangle lacks antigenicity for mAb AD2 (E-NFT stage II).

active intracellular-NFTs. In general, the amount of the Group 2 intracellular-NFT was lower than Group 3 intracellular-NFTs. This observation is consistent with Group 2 intracellular-NFTs preceding Group 3.

A scheme of the staging of NFT formation based upon AD2 immunoreactivity and TR counterstaining is illustrated in Fig. 5. According with this, stage 1 corresponds to the structure illustrated in Fig. 3(A) and characterized by AD2 (+) immunoreactivity of perinuclear and diffuse appearance and TR (-). Stage 2 (illustrated in Fig. 3(B)) is characterized by dense AD2 (+) immunoreactivity TR (-) widespread in the perinuclear area and the cytoplasm. These states would correspond to "pre-tangle" stages. Stage 3 (illustrated in Fig. 3(C)) is characterized by either AD2 (+) of granular appearance and TR (+). Stage 4, intracellular-NFT is shown in Fig. 3(D) and characterized by full colocalization AD2 (+) and TR (+). The last stage 5 (illustrated in Fig. 3(E)) may correspond to Group 4 from Braak's classification [5]. This stage 5 tangle was characterized by an AD2 immunoreactivity similar to that present in stage 3 NFT formation, i.e. granular appearance rather than fibrillar. As the immunoreactivity to phospho-dependent antibody AD2 present on extracellular-NFTs is not possible to originate in the extracellular space, it may result from gradual proteolysis of the AD2 antigen in the transition of the intracellular-NFT to the extracel-

lular space to become an extracellular-NFT. Eventually, as shown in Fig. 3(E) (thick arrow) AD2 immunoreactivity would be lost in mature extracellular-NFTs. As it has been previously demonstrated, this structure will immunoreact with antibodies against ubiquitin [33] or truncated tau protein [29]. Furthermore, TR binding sites are also lost in the later stages of NFT degradation [30]. Similar stages of NFT formation as we illustrate in Fig. 5 have been recently described using a variety of immunological markers which identify PHF-associated tau protein [8,12,20,24]. All these reports provide evidences that intracellular-NFTs develop to extracellular-NFTs and that these lesions are in part related to neuronal death.

MAb AD2 labels PHFs at the electron microscopic level [35] and PHF-tau on immunoblots, allowing us to use it to define the biochemical pathway of neurofibrillary degeneration both in normal aging and AD [14]. Here, we analyzed the distribution and density of mAb AD2 immunoreactive intracellular-NFTs. The morphometric analysis evidenced differences between non demented aged cases and AD, related to the regional distribution and density of intracellular-NFTs found. As Fig. 4 shows, in AD cases intracellular-NFTs were found in high amount throughout the hippocampus, entorhinal cortex and frontal cortex, therefore we believe that measurements of mAb AD2 tangles densities could

be a suitable parameter to differentiate AD from non-demented cases.

On the other hand, it is generally accepted that the relationship between cognitive dysfunction and neurofibrillary degeneration is established only when they occur in the neocortex [1,3,15,16]. However, some studies have shown correlation between the density of neurofibrillary structures and the cognitive impairment in the hippocampus as it is shown in this paper [20,21,24]. We studied the relationship between the density of AD2 immunoreactive NFTs and cognitive status as defined by the CDR score. We found the highest correlation in the BA9 ($r = 0.8274$, $P < 0.0001$) and CA1-subiculum ($r = 0.814$, $P < 0.0001$) areas. Likewise, in CA3-CA2 and entorhinal cortical regions the density of intracellular-NFTs also correlated significantly with the CDR. These findings provides evidences that the increment in the density of mAb AD2 intracellular-NFTs in the hippocampus also influences cognitive impairment in AD. Taken all these data together, we can conclude that the extent of neurofibrillary changes both in the hippocampal and in the polymodal association neocortical areas, correlate well with cognitive impairment. However, these findings do not exclude the possibility that other mechanisms different to NFT formation may be involved in neuronal degeneration and death observed in vulnerable regions like hippocampus during AD.

In conclusion, our result provide evidence for the sequence of tangle formation as detected by mAb AD2. Our observations suggest that this process is characterized by a number of serial discrete stages. In addition, mAb AD2 immunoreactive intracellular-NFTs occurs in normal aged people, however, in significantly lower amounts than in AD cases and mainly distributed in entorhinal cortex and CA1-subicular regions. This study also indicates that the increase in the number of mAb AD2 immunoreactive intracellular-NFTs in susceptible regions, is related closely to the severity of dementia in AD. Finally, these findings demonstrate the value of the combination of accurate immunological markers with TR in confocal microscopy to understand the complex tau pathological processing leading to the PHFs assembly in AD and the disruption of neuronal networks.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from CONACyT-26319M (México) to R.M. We thank Dr. George Perry

for the critical reading and English editing of the manuscript and Ignacio Arauz for the drawing. MGV received financial support from CONACyT (México).

References

- [1] P. Arriagada, J. Growdon, Hedley-Whyte and B. Hyman, Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease, *Ann Neurol* 42 (1992), 631–639.
- [2] C. Bancher, C. Brunner, H. Lassman, H. Budka, K. Jellinger, G. Wich, F. Scitelberger, I. Grundke-Iqbal and H. Wisniewski, Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Brain Res* 477 (1989), 90–99.
- [3] L. Bierer, P. Hof, D. Purohit, L. Carlin, J. Schmeidler, K. Davis and D. Perl, Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease, *Arch Neurol* 52 (1995), 81–88.
- [4] M. Billingsley and R. Kincaid, Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration, *Biochem J* 323 (1997), 577–591.
- [5] E. Braak, H. Braak and E. Mandelkow, A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads, *Acta Neuropathol* 87 (1994), 554–567.
- [6] H. Braak and E. Braak, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol* 82 (1991), 239–259.
- [7] W. Bondareff, S. Matsuyama and P. Dell'Albani, Production of paired helical filament, Tau-like proteins by PC12 cells: A model of neurofibrillary degeneration, *J Neurosci Res* 52 (1998), 498–504.
- [8] W. Bondareff, C. Harrington, C.M. Wischik, D. Hauser and M. Roth, Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 53 (1994), 158–164.
- [9] W. Bondareff, C.M. Wischik, M. Novak, W. Amos, A. Klug and M. Roth, Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: An immunohistochemical study, *Am J Pathol* 137 (1990), 711–723.
- [10] L. Buée and A. Delacourte, Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease, *Brain Pathol* 9 (1999), 681–693.
- [11] V. Buée-Scherrer, O. Condamines, C. Mourton-Gilles, R. Jakes, M. Goedert, B. Pau and A. Delacourte, AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease, *Mol Brain Res* 39 (1996), 79–88.
- [12] P. Cras, M.A. Smith, P.L. Richey, S.L. Siedlak, P. Mulvihill and G. Perry, Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease, *Acta Neuropathol* 89 (1995), 291–295.
- [13] A. Delacourte and A. Défossez, Alzheimer's disease: tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments, *J Neurol Sci* 76 (1986), 173–186.
- [14] A. Delacourte, J.P. David, N. Sergeant, L. Buée, A. Wattez, P. Vermersch, F. Ghosali, C. Fallet-Biamco, F. Pasquier, F. Lebert, H. Petit and C. Di Menza, The biochemical pathway of

- neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease, *Neurology* **52** (1999), 1158–1165.
- [15] D. Dickson, H. Crystal, C. Benova, W. Honer, I. Vincent and P. Davies, Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly, *Neurobiol Aging* **16** (1995), 285–304.
- [16] C. Duyckaerts, M. Benneicib, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. Piette and J. Hauw, Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status, *Neurobiol Aging* **18** (1997), 267–273.
- [17] T. Duong, T. Doucette, N. Zidenberg, R. Jacobs and A. Scheibel, Microtubule-associated proteins tau and amyloid P component in Alzheimer's disease, *Brain Res* **603** (1993), 74–86.
- [18] R. Endoh, M. Ogawara, T. Iwatsubo, I. Nakano and H. Mori, Lack of the carboxyl terminal sequence of tau in ghost tangles of Alzheimer's disease, *Brain Res* **601** (1993), 164–172.
- [19] D. Evans, K. Rank, K. Bhattacharya, D. Thomsen, M. Gurney and S. Sharma, Tau phosphorylation at Ser-396 and Ser-404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly, *J Neurosci* **20** (2000), 3937–3946.
- [20] F. García-Sierra, J. Hauw, C. Duyckaerts, C.M. Wischick, J. Luna-Muñoz and R. Mena, The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old, *Acta Neuropathol* **100** (2000), 29–35.
- [21] F. García-Sierra, C.M. Wischick, C.R. Harrington, J. Luna-Muñoz and R. Mena, Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease, *J Chem Neuroanat* (in press).
- [22] M. Goedert, M. Spillantini, N. Cairns and R. Crowther, Tau-proteins of Alzheimer paired helical filaments—abnormal phosphorylation of all six brain isoforms, *Neuron* **8** (1992), 159–168.
- [23] T. Gómez-Isla, L.J. Price, W.D. McKeel, C.J. Jr. Morris, H.J. Growdon and T.B. Hyman, Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease, *J Neurosci* **16** (1996), 4491–4500.
- [24] T. Gómez-Isla, R. Hollister, H. West, S. Mui, J.H. Growdon, R.C. Petersen, J.E. Parisi and B.T. Hyman, Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Ann Neurol* **41** (1997), 17–24.
- [25] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. Tung, M. Zaidi, H. Wisniewski and L. Binder, Abnormal phosphorylation of the Map tau in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci USA* **83** (1986), 4913–4917.
- [26] P. Hof, L. Bierer, D. Perl, A. Delacourte, L. Buée, C. Bouras and J. Morrison, Evidence for early vulnerability of the medial and inferior aspects of the temporal lobe in an 82-year-old patient with preclinical signs of dementia—regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques, *Arch Neurol* **49** (1992), 946–953.
- [27] C. Hughes, L. Berg, W. Danzinger, L. Coben and R. Martin, A new clinical scale for the staging of dementia, *Br J Psychiatry* **140** (1982), 566–572.
- [28] T. Kimura, T. Ono, J. Takamatsu, H. Yamamoto, K. Ikegami, A. Kondo, M. Hasegawa, Y. Ihara, E. Miyamoto and T. Miyakawa, Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments, *Dementia* **7** (1996), 177–181.
- [29] R. Mena, P. Edwards, C. Harrington, E. Mukaetova-Ladinska and C.M. Wischick, Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol* **91** (1996), 633–641.
- [30] R. Mena, P. Edwards, O. Pérez-Olvera and C.M. Wischick, Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol* **89** (1995), 50–56.
- [31] M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, K. Titani and Y. Ihara, Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau, *J Biol Chem* **270** (1995), 823–829.
- [32] M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, A. Watanabe, K. Titani and Y. Ihara, Hyperphosphorylation of tau in PHF, *Neurobiol Aging* **16** (1995), 365–380.
- [33] M. Morishima-Kawashima and Y. Ihara, Posttranslational modifications of tau in paired helical filaments, *Dementia* **52** (1994), 282–288.
- [34] J. Price, J. Davis and D. Morrison, The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* **12** (1991), 195–312.
- [35] S. Reig, V. Buée-Scherrer, C. Mourton-Gilles, A. Défossez, A. Delacourte, J. Beauvillain and M. Mazzuca, Immunogold labeling of paired helical filaments and amyloid fibrils by specific monoclonal and polyclonal antibodies, *Acta Neuropathol* **90** (1995), 441–447.
- [36] J. Resch, G. Lehr and C. Wischick, Design and synthesis of a potential affinity/cleaving reagent for beta-pleated sheet protein structures, *Bioorganic and Med Chem Lett* **1** (1991), 519–522.
- [37] M. Tabaton, S. Cammarata, G. Mancardi, V. Manetto, L. Autilio-Gambetti, G. Perry and P. Gambetti, Ultrastructural localization of β -amyloid, τ , and ubiquitin epitopes in extracellular neurofibrillary tangles, *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (1991), 7787–7791.
- [38] D. Yilmazer-Hanke and J. Hanke, Progression of Alzheimer-related neuritic plaque pathology in the entorhinal region, perirhinal cortex and hippocampal formation, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **10** (1999), 70–76.

Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease

Francisco García-Sierra ^a, Claude M. Wischik ^b, Charles R. Harrington ^b,
José Luna-Muñoz ^a, Raúl Mena ^{a,*}

^a Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, P.O. Box 14-740, 07000, Mexico, D.F., Mexico

^b Department of Mental Health, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK

Received 5 June 2000; received in revised form 4 October 2000; accepted 7 November 2000

Abstract

Neurofibrillary pathology is a characteristic hallmark of Alzheimer's disease that is closely correlated with cognitive decline. We have analysed the density and distribution of neurofibrillary tangles (NFTs) that are immunoreactive with the monoclonal antibody (mAb) 423 in a prospectively analysed population of Alzheimer's disease (AD) cases and age-matched controls. NFTs were examined in allocortical and isocortical areas and correlated with Braak pathological stage and clinical severity of dementia. The mAb 423 was used as it recognises a C-terminally truncated tau fragment that is a major constituent of NFTs. Our results show that extracellular NFTs and, to a lesser extent, intracellular NFTs, correlated significantly with both Braak stages and the clinical index of severity. Furthermore, a differential distribution of the two types of tangles indicates that layer II of the entorhinal cortex and the transentorhinal area are particularly vulnerable to neurofibrillary degeneration. These areas serve as a point of connection between isocortex and hippocampus. Our findings, therefore, suggest that the perforant pathway may be substantially affected by the accumulation of truncated tau protein in AD and that this represents a neuropathological predictor for the clinical severity of dementia. When neurofibrillary pathology was examined by combined labelling with mAbs 423 and Alz-50 and the dye thiazin red, we were able to demonstrate various stages of tau aggregation. The different stages may represent a sequence of conformational changes that tau proteins undergo during tangle formation in the allocortex during the early development of dementia in AD. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Confocal microscopy; Entorhinal cortex; mAb 423; Neurofibrillary tangles; Thiazin red

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive degenerative disorder of insidious onset, initially characterised by memory loss and, in later stages, by severe dementia. Neurofibrillary tangles (NFTs) and dystrophic neurites, occurring in the neuropil and in neuritic plaques, are the major neuropathological features of AD. Their presence is correlated with clinical dementia (Blessed et al., 1968; Kowall and Kosik, 1987; Ball et al., 1988; Van Hoesen et al., 1991). In AD, NFT formation is

associated with neuronal loss (Cras et al., 1995; Gómez-Isla et al., 1996, 1997) and there is a strong correlation between neuronal degeneration and the transition between intracellular and extracellular NFTs (Bondareff et al., 1993). In the superior temporal sulcus, neuronal loss in AD both correlates with and exceeds NFTs in number (Gómez-Isla et al., 1997).

NFTs and dystrophic neurites are composed of pathological paired helical filaments (PHFs). The PHF consists of the microtubule-associated protein tau as an integral structural component (Kondo et al., 1988; Wischik et al., 1988a). The predominant fragment of tau in pronase-resistant core-PHF is a 12-kDa species, corresponding to the C-terminal repeat region that normally functions as a microtubule-binding domain. It is trun-

* Corresponding author. Tel.: + 52-5-7473800, ext. 5130; fax: + 52-5-7477105.

E-mail address: rmena@fisio.cinvestav.mx (R. Mena).

cated C-terminally at Glu-391 and can be recognised by the monoclonal antibody (mAb) 423 (Wischik et al., 1988b; Novak et al., 1993).

The presence of C-terminally truncated tau protein discriminates between elderly cases with and without clinical dementia, and its quantity is also correlated with neurofibrillary pathology (Harrington et al., 1991). In an earlier study, we reported that the progressive accumulation of mAb 423 immunoreactivity in brain tissue is associated with the evolution of neurofibrillary pathology (Mena et al., 1991). Although mAb 423 immunoreactivity becomes more prominent in NFTs as they become extracellular, following the death of NFT-bearing neurons (Bondareff et al., 1990), immunoreactivity is also observed at early stages of pathology (Mena et al., 1991).

Braak proposed that AD can be staged neuropathologically based upon the spread of NFTs within the hippocampus, entorhinal and transentorhinal cortices (Braak and Braak, 1991). Furthermore, the transentorhinal/entorhinal regions were the zones in which hyperphosphorylated tau protein first appeared (Braak et al., 1994). The latter took the form of granular material, which accumulated in the soma and preceded the development of neurofibrillary pathology.

In the present study, we have examined the distribution of mAb 423-immunoreactive NFTs in the allocortex and isocortex of well-characterised cases with AD and age-matched controls. We have examined the density and distribution of tangles in relation to Braak pathological stage and clinical severity of dementia, as measured by CAMDEX (Roth et al., 1986). We report that the presence of extracellular tangles in the transentorhinal and entorhinal cortices serves to predict both Braak stage and clinical severity of dementia in AD cases.

Using confocal microscopy, we have further analysed the immunochemical characteristics of the lesions that are detected by both mAb 423 and mAb Alz-50. The latter antibody recognises a particular conformational state of tau molecule adopted in PHFs (Carmel et al., 1996). Our findings demonstrate that tau protein aggregates exist in different forms within the various neurofibrillary structures that develop within the brain. We interpret these differences as resulting from conformational changes and post-translational modifications of the tau molecules.

2. Material and methods

2.1. Brain tissue

The present study was conducted using brain tissue obtained from a population-based sample of 42 elderly cases in the city of Cambridge (UK). The cases were

obtained from a prospective clinico-pathological study (Paykel et al., 1994). Clinical diagnosis of AD was made using CAMDEX, a tool in which clinical severity of dementia can be assessed (Roth et al., 1986). Details of these cases have been described elsewhere in earlier studies (Paykel et al., 1988, 1994; Huppert et al., 1995; Gertz et al., 1998). The number of cases, by increasing index of severity, were 16 at 0; nine at 1; seven at 2; seven at 3; and three at 4. The cases have been classified by Braak neuropathological stages according to Braak and Braak (1991). Cases were classified as follows: three at stage I; seven at stage II; 13 at stage III; nine at stage IV; nine at stage V; and one at stage VI. The brains were obtained post-mortem and cut in the sagittal plane. One cerebral hemisphere was dissected and frozen at -70°C . The other half of the brain was fixed by immersion in buffered 10% formalin for at least three weeks. For neuropathological diagnosis and immunochemical staining, the following samples of the brain were taken: hippocampus; entorhinal cortex; frontal lobe (Brodmann areas 9/10); inferior parietal lobe (Brodmann areas 39/40); and posterior temporal lobe, including superior and middle temporal gyrus (Brodmann areas 20/21). The paraffin-embedded blocks were cut into 10- μm thick sections and used for immunostaining and morphometry.

2.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was carried out using mAb 423 (Novak et al., 1993). Prior to immunolabeling, sections were incubated for 10 min with 0.5% hydrogen peroxide in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, to inactivate endogenous peroxidase. Sections were then pre-treated with formic acid (98%) for 5 min prior to incubation with the mAb 423, diluted 1:20 in PBS, for 1 h at room temperature. Goat anti-mouse IgG/horseradish peroxidase was used as secondary antibody, and the enzymatic reaction was developed by incubation with 0.01% hydrogen peroxide in PBS (pH 7.4) containing 0.06% diaminobenzidine. The reaction was stopped by immersion of the slide in PBS and sections were counterstained with hematoxylin and eosin, then dehydrated and mounted in DPX. Control sections were processed in which the primary antibody was omitted and in which the antibody had been preadsorbed overnight at 4°C with recombinant C-terminally truncated tau protein (Novak et al., 1993).

2.3. Confocal microscopy

Fifty μm thick sections from selected regions of the entorhinal cortex and hippocampus were double-labelled with mAb 423 and the dye thiazin red and viewed using a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC-600, Watford, UK) as described earlier

(Mena et al., 1995). Thiazin red can be used to differentiate between fibrillar and non-fibrillar states of aggregation of PHF-associated tau protein (Mena et al., 1995, 1996).

Sections were triple-labelled with mAb 423, mAb Alz-50 (kindly provided by Dr P. Davies) and thiazin red. Fluorescein isothiocyanate-tagged goat anti-mouse IgM and CY5-tagged goat anti-mouse IgG were used as secondary antibodies for mAbs Alz-50 and 423, respectively. Incubation with thiazin red (15 min) was conducted at the end of the procedure and the sections were mounted in anti-quenching media (Vectashield, Vector Labs.). Sections were excited with green (blue exciter filter, 418 nm), blue (red exciter filter, 650 nm) and red (green exciter filter, 514 nm) for 423, Alz-50, and thiazin red, respectively. Co-localisation of all three colours yields a white colour when images are merged.

2.4. Morphometry

NFTs were counted in the following areas: transentorhinal cortex; entorhinal cortical layers II and IV; CA1/subiculum area; frontal lobe (Brodmann area 39/40); inferior parietal lobe (Brodmann area 39/40); posterior temporal lobe, including superior and middle temporal gyrus (Brodmann area 20/21). Tangle counts were not available for the transentorhinal area from the sole case at Braak's stage VI, due to poor preservation of this region. Morphometric quantification in the hippocampal formation areas was assessed on three microscopical fields from three randomly chosen zones. In the neocortex, counting was based on three microscopical fields from six randomly chosen zones, which were distributed next to the sulcus: two at the crest, two at the side and two at the base. Observations were conducted by bright field microscopy using a Reichert light microscope. Identification and counting of tangles was conducted using 25× and 40× objective lenses and values expressed per mm², as described earlier (Mukaetova-Ladinska et al., 1993). The criteria used to identify intracellular NFTs was based upon the presence of well-preserved nuclear membranes, nucleoli, and the existence of residual Nissl substance in the NFT-bearing neuronal cell. Likewise, extracellular or 'ghost' tangles were defined on the basis of loosely-arranged tangles in the absence of nuclei and clear neuronal contours.

2.5. Statistical analysis

Student's *t*-test and non-parametric Mann–Whitney *U*-test were applied when tangle counts were compared between AD and control groups. Non-parametric Spearman correlation coefficients were calculated to correlate clinico-pathological parameters with tangle counts. Statistical analysis was conducted with a Sigma Plot for Windows software package.

3. Results

3.1. mAb 423-reactive tangles in AD

The pattern of mAb 423 immunoreactivity was examined in detail in the hippocampus and the parahippocampal gyrus, collectively referred to as the hippocampal complex (Fig. 1A). The limits of the transentorhinal region were defined according to anatomical criteria (Rose, 1927a,b; Braak and Braak, 1985). According to these, the allocortical layer II (or pre- α layer) gradually sinks into a deeper position, finally reaching neocortical layer IIIc. The main regions, in which systematic variation arose in AD, were the CA1/subiculum area of the hippocampus, and layers II and IV of both the entorhinal and transentorhinal cortices. In particular, the density and intensity of mAb 423-reactive tangles both increased and they started to appear in additional areas of the hippocampal complex as the severity of dementia increased.

The density of both intra- and extra-cellular tangles was significantly higher in AD than control cases when all regions were taken into consideration. The most significant difference, however, was observed for extracellular rather than intracellular tangles ($P < 0.001$ and $P = 0.037$, respectively). Extracellular tangles were rarely observed in control cases (Fig. 1B).

Since the individual areas affected in AD and controls appeared to differ, we proceeded to examine the density of tangles in these two groups (Fig. 2). The density of extracellular NFTs was significantly higher in the demented than in the non-demented cases in transentorhinal cortex ($P < 0.01$), layer II of the entorhinal cortex ($P = 0.015$), subiculum ($P = 0.001$) and CA1 area ($P < 0.001$). In contrast, the density of intracellular tangles was just significantly higher in demented than in the non-demented controls in the layer IV of the entorhinal cortex ($P = 0.050$) and CA1 area ($P = 0.040$). The greatest density of extracellular NFTs in the transentorhinal and layer II of the entorhinal cortex represents the most significant difference between AD and non-demented cases when compared with the density of intracellular NFTs.

3.2. Immunohistochemistry with mAb 423 in the hippocampal complex

There was a consistent pattern of mAb 423 immunoreactivity in specific laminae of the entorhinal cortex in AD patients. Tangles were present, principally in layer II, and appeared as an almost continuous band (Fig. 1A). They were also present, at lower densities, in the superficial region of layer III and IV (Fig. 1C). NFTs present in layer II and IV were primarily extracellular tangles. The immunoreactive pattern for the AD case illustrated in Fig. 1C appears to correspond to



Fig. 1. (A) Distribution of mAb 423-reactive NFTs in the hippocampal complex of an AD subject, using low-power bright-field microscopy. Layers II (curved arrow) and IV of the entorhinal cortex (EC) and the transentorhinal cortex (TC) contain numerous tangles. In the latter, tangles are found in a gradually deeper position through the cortical cellular layers. In addition, tangles are also found in columnar arrangements in transentorhinal cortex (thick arrows). TIC, temporal isocortex 7X. (B) mAb 423-reactive NFTs are not found in sections from corresponding areas from a control case 50X. (C) mAb 423 immunostained cross-sections through the entorhinal cortex in AD. NFTs are numerous in layer II. Layer IV contains tangles, although fewer than the number found in the upper layer II. The majority of NFTs in layer II are extracellular, whereas both intra- and extra-cellular NFTs are found in entorhinal cortical layer IV 50X. (D) mAb 423 immunoreactive tangles distributed in columnar arrangements in transentorhinal cortex from an AD case. Tangles are all of the extracellular type, and dystrophic neurites were not observed in this region 200X. Fifty μ m thick sections. Cresyl violet counterstain.

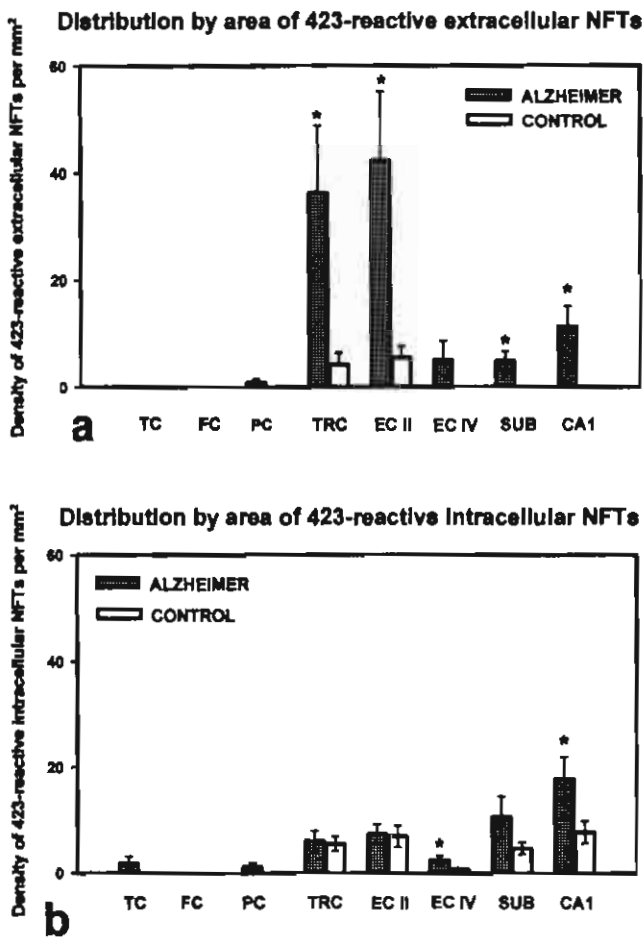


Fig. 2. Regional distribution of 423-reactive tangles in AD cases and control non-demented individuals. Eight brain regions were assessed in 17 AD patients and 25 age-matched controls: three isocortical regions (TC, temporal; FC, frontal; and PC, parietal) and five allocortical areas (transentorhinal cortex, TRC; layer II/IV of the entorhinal cortex, ECII/ECIV; subiculum, SUB; and CA1). The mean density of extracellular (a) and intracellular (b) NFTs is given. Significant differences between the density of NFTs in AD and control non-demented cases are indicated by asterisks (Student–Newman–Keuls test; $P < 0.05$).

the isocortical stage VI proposed by Braak (Braak and Braak, 1991). Tangles were found in layer II of the entorhinal cortex, in perpendicular columns in the

transentorhinal cortical layer IIIc and in layer IV in the adjacent temporal isocortex (Fig. 1A). The columns of densely labelled tangles in transentorhinal cortex were largely extracellular and found in severely demented AD cases (Fig. 1D). In cases with less severe dementia, the tangles were also predominantly extracellular. Dystrophic neurites were not associated with the extracellular NFTs seen in this location (Fig. 1D). In the hippocampus, large numbers of NFTs, labelled with mAb 423, were seen in CA1/subiculum areas.

3.3. Correlation between tangles and Braak stages

A significant correlation was found between the density of both extra- and intra-cellular tangles and Braak stage ($r = 0.61, P < 0.005$; $r = 0.63, P < 0.005$, respectively), when all brain regions were considered. No correlation was found between the density of either type of tangle and Braak stage in either frontal or temporal isocortex (Table 1). The only significant correlations in the isocortex were found in parietal cortex for both types of tangles. In isocortical areas, extra- and intra-cellular NFTs were only observed at Braak stages IV–VI (data not shown; also see Gertz et al., 1998).

The density of tangles correlated with Braak stage in more allocortical regions than in isocortex (Table 1). In general, this applied to both types of tangles, although only the extracellular forms correlated with Braak stage in transentorhinal and layer II of the entorhinal cortex. In the allocortex, intracellular tangles were present in all the areas, with the exception of layer IV of the entorhinal cortex, in which they were only observed at Braak stage V (Fig. 3). In contrast, the number of intracellular tangles did not increase at later Braak stages (V–VI) in the transentorhinal region or entorhinal cortical layer II (Fig. 3a and b). No significant correlations were found in these areas between the density of intracellular NFTs and Braak stage (Table 1).

Extracellular NFTs were first observed at Braak stage III in the transentorhinal region and entorhinal cortical layer II (Fig. 3a and b, arrows). Beyond this stage, their density increased and correlated with Braak

Table 1
Correlation between the density of mAb 423-reactive NFTs and the Braak’s staging (BST) (E-NFTs/I-NFTs = extracellular/intracellular neurofibrillary tangles, TC, temporal cortex; FC, frontal cortex; PC, parietal cortex; TR, transentorhinal; EcII/IV, layer II/IV from the entorhinal cortex; SUB, subiculum)^a

Structure	TC	FC	PC	TR	ECII	ECIV	SUB	CA1
E-NFTs	0.210	ns	0.36*	0.43*	0.48*	0.36*	0.55*	0.53*
	0.180	ns	0.018	0.005	0.001	0.018	<0.005	<0.005
I-NFTs	0.29	ns	0.36*	0.14	0.21	0.53*	0.57*	0.72*
	0.056	ns	0.018	0.367	0.175	0.005	<0.005	<0.005

^a For each pairwise comparison the correlation coefficient r (upper) and the significance value (below) are given. *Significant correlation values, ns not significant and no values obtained by the statistical analysis.

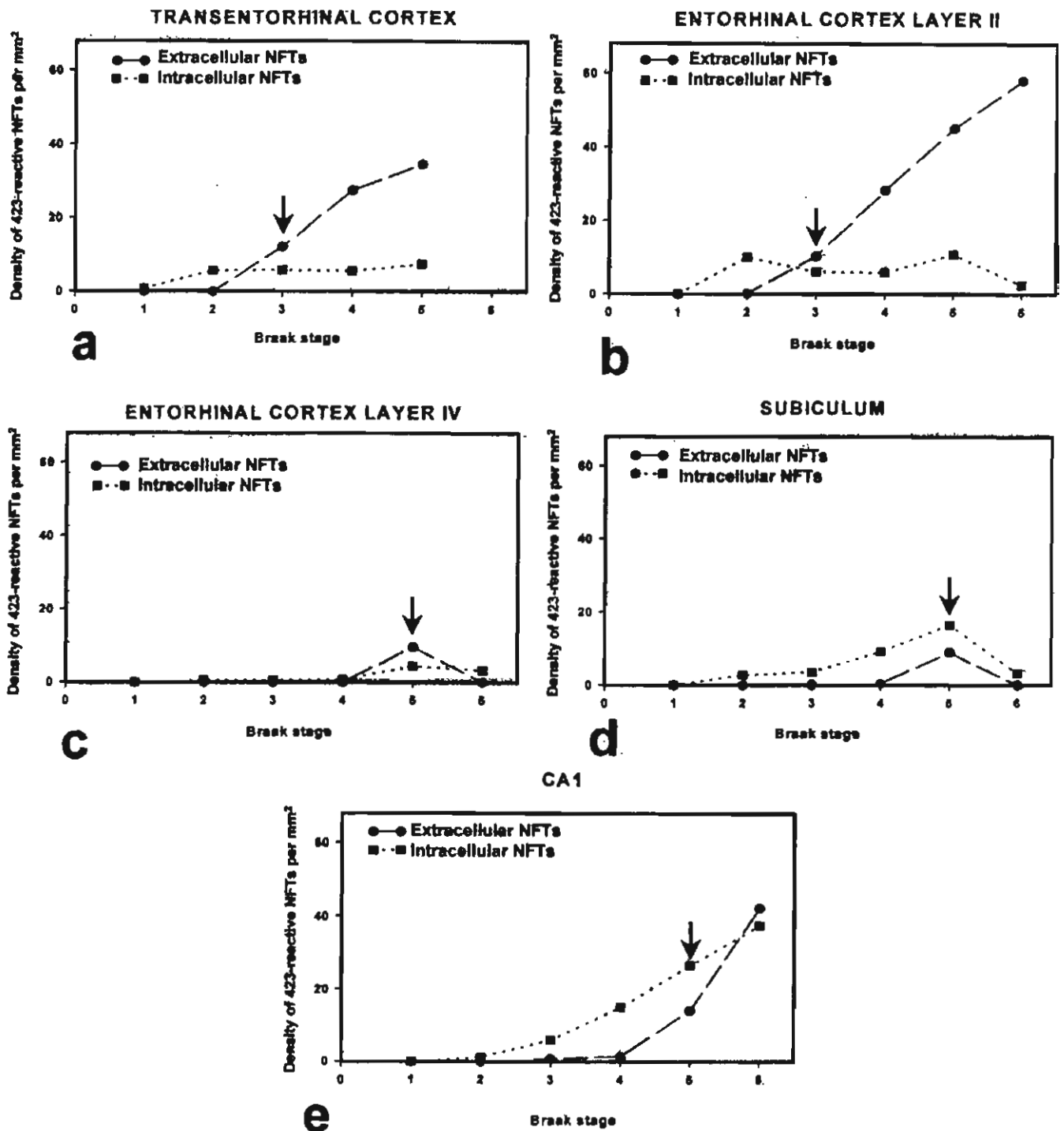


Fig. 3. Tangle density in allocortical areas according to Braak stages. (a) Transentorhinal cortex; (b) layer II of the entorhinal cortex; (c) layer IV of the entorhinal cortex; (d) subiculum; and (e) CA1. Arrows indicate the stage at which extracellular NFTs are first observed. The results of a correlation analysis for the data are given in Table 1. Appropriate tissue was not available from the transentorhinal area of the sole case classified as Braak stage VI.

stage (Table 1). This pattern of progression was not observed in the other allocortical areas (Fig. 3c–e). In the subiculum, CA1 and the layer IV of the entorhinal cortex, extracellular NFTs were only observed at Braak stage V (Fig. 3c–e). In contrast, the density of intracel-

lular tangles in CA1 exceeded that of the extracellular tangles up to Braak stage III (Fig. 3e).

In summary, therefore, the strongest correlation between tangle density and Braak stages was found for extracellular tangles in the entire hippocampal complex

and for intracellular tangles in CA1/subiculum and entorhinal cortical layer IV. The pathological staging of these cases can, therefore, be predicted on the basis of mAb 423-immunoreactivity in this area of the brain.

3.4. Association between tangles and clinical severity of dementia

In the original Braak staging, several hundred brains were assessed from consecutive autopsies to create the six proposed stages (Braak and Braak, 1991). In the latter study, no clinical assessment of the patients was available. With the case material used in our study, we were able to examine the development of neurofibrillary pathology not only in relation to a pathological scale, but also with respect to the clinical signs of dementia. When data from all areas were analysed together, a significant correlation was found between the severity of dementia and the density of extracellular NFTs ($r = 0.38$, $P = 0.011$). In contrast, no correlation was found between the degree of clinical dementia and the number of intracellular NFTs. The density of the extracellular tangles in allocortical areas made the greatest contribution with respect to the severity of the dementia (Fig. 4a and b). Few extracellular NFTs were present in non-demented or minimally demented cases (clinical severity of 0 or 1), whereas they were abundant in the transentorhinal region and layer II of the entorhinal cortex emerged in patients where there was overt clinical dementia (severity of 2–4) (Fig. 4a and b). The density of extracellular NFTs was significantly correlated with clinical severity of dementia in the transentorhinal region but not in layer II of the entorhinal cortex, although the value in this area approached significance (compare values in Table 2). There were few intracellular NFTs in transentorhinal and entorhinal cortices and their presence was not significantly correlated with severity of dementia (Table 2). In CA1, however, the presence of either type of tangle was significantly correlated with severity of dementia (Table 2 Fig. 4c).

Clinical severity of dementia was correlated with tangles in parietal cortex and with intracellular tangles in temporal cortex (Table 2). The number of tangles in these areas, however, was much lower than in the allocortex (Fig. 2), and generally only observed in cases with overt clinical symptoms. Thus, the clinical severity of dementia and Braak pathological stages both appear to be predicted by the appearance of extracellular tangles in allocortical regions and, in particular, transentorhinal cortex and CA1/subiculum areas.

3.5. Double labelling with mAb 423 and thiazin red in the allocortex of AD

Immunoreactive structures of various types were ob-

served in entorhinal cortical layer II in double labelling with mAb 423 and thiazin red (Fig. 5A). As earlier described for the hippocampus (Mena et al., 1995, 1996) these structures displayed a differential labelling with thiazin red. Extracellular tangles tended to lose their thiazin red-binding sites, and were mainly detected in the green channel, due to labelling with mAb 423 (Fig. 5A, arrows). Some non-NFT-bearing neuronal cells were observed mingled with a cluster of tangles (Fig. 5A, small arrows). These cells were not labelled with thiazin red. A large V-shaped structure, which appears to be a tangle, is not labelled with mAb 423 (Fig. 5A, small arrowhead). As described earlier (Mena et al., 1996), transition to the fibrillar state of tau aggregation is associated with acid-reversible occlusion of the Glu-391 epitope. Thus, the mAb 423 fails to detect truncated tau unless sections have been pre-treated with formic acid.

Plaques of different sizes were observed in the molecular layer of the dentate gyrus in CA4. These had a granular appearance and were labelled with mAb 423 (Fig. 5B). They were either associated with (Fig. 5D-2) or without fibrillary β -amyloid deposits (Fig. 5B and 5C-2). β -Amyloid deposits were visualised by labelling with thiazin red (Fig. 5D-2), a dye that binds to structures that are fibrillar in nature. These plaques were not found in entorhinal cortex and they have been described earlier in hippocampus and neocortex (Mena et al., 1991, 1992). Dystrophic neurites labelled with mAb 423 were also observed in association with the periphery of some of these plaques (Fig. 5B and C, arrows).

3.6. Triple labelling with mAbs 423 and Alz-50, and thiazin red in the allocortex in AD

To further define the nature of the neurofibrillary structures in brain tissue, we have combined the labelling with two mAbs (423 and Alz-50) to the binding of thiazin red (Fig. 6). Colocalisation of blue (mAb 423), green (mAb Alz-50) and red (thiazin red) fluorophores in this system is characterised by white when the images are merged. Intermediate shades of colour are produced when two or three labels co-exist, with the exact hue depending on the relative proportion of the different labels. The appearance of the intracellular NFT illustrated in Fig. 6B indicates that all three markers are co-localised in the cytoplasm. The mAb 423-reactive products (blue channel) take the form of small patches. Neuronal cells also demonstrated pre-tangle structures that were characterised by dense perinuclear deposits. These were labelled with both antibodies but not with thiazin red, suggesting again that they exist in a non-fibrillar state (Fig. 6A, arrows). In this case, the fibrillary appearance of a normal tangle is not observed and a granular morphology throughout

the cytoplasm is seen. Many of these granules colocalise with both antibodies and thiazin red, although punctate staining that appears red or green is also observed. The perinuclear area of these cells in general displayed a green fluorescence (Fig. 6A, small arrow). Extracellular tangles displayed an intense purple to blue fluorescence (Fig. 6C, arrowhead), indicating that these were predominantly labelled with mAb 423 but had bound some thiazin red. mAb Alz-50-immunoreactivity was ob-

served in small neurites in the vicinity of extracellular NFTs (Fig. 6C). Some of these structures were not detected by thiazin red (Fig. 6A–C, arrowheads), suggesting that the epitope was present in a non-fibrillar state of assembly. Other enlarged neurites were detected only by mAb 423 and thiazin suggesting that the epitope is PHF-associated. Such neurites tended to appear as red-purple fluorescent structures (see Fig. 6D, arrow). Deposits were associated with smaller deposits

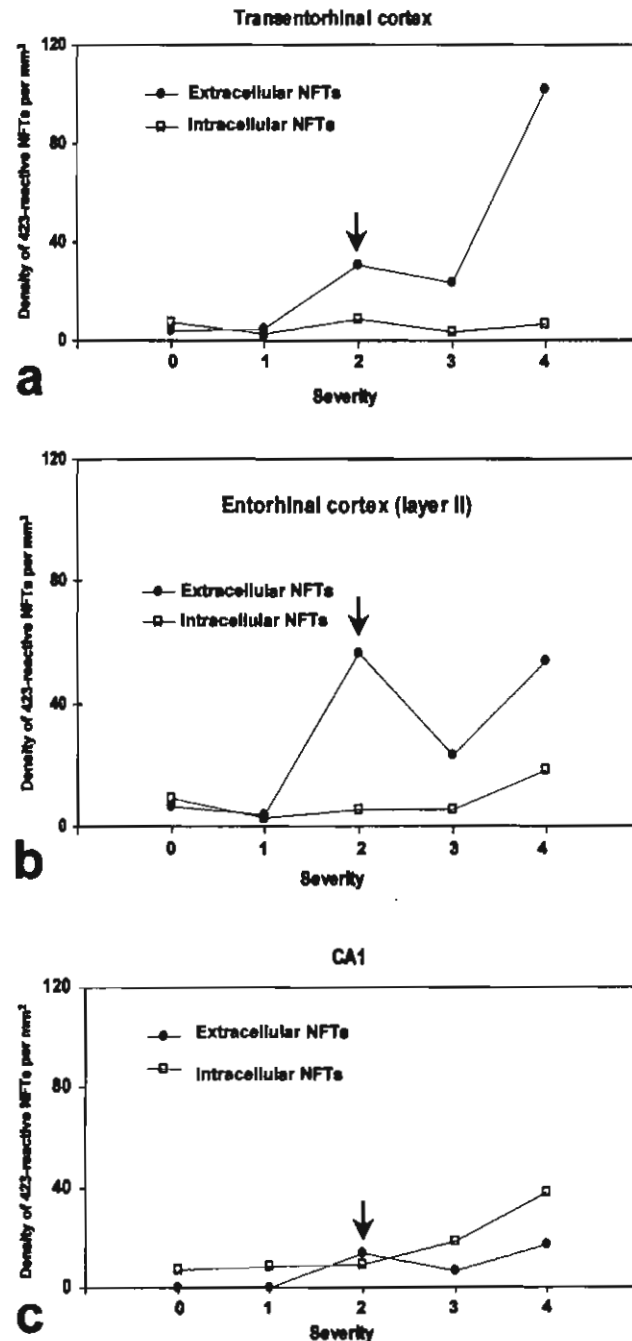


Fig. 4. Tangle density in allocortical areas according to the clinical index of severity of dementia. Cases were grouped according to their severity: (0) none; (1) minimal; (2) mild; (3) moderate; and (4) severe. Values correspond to the mean value of the density of intracellular and extracellular NFTs at each severity by individual area. (a) Transentorhinal cortex; (b) layer II of the entorhinal cortex; (c) CA1 area. Arrows indicate the stage at which extracellular NFTs first appear. The results of a correlation analysis for the data are given in Table 2.

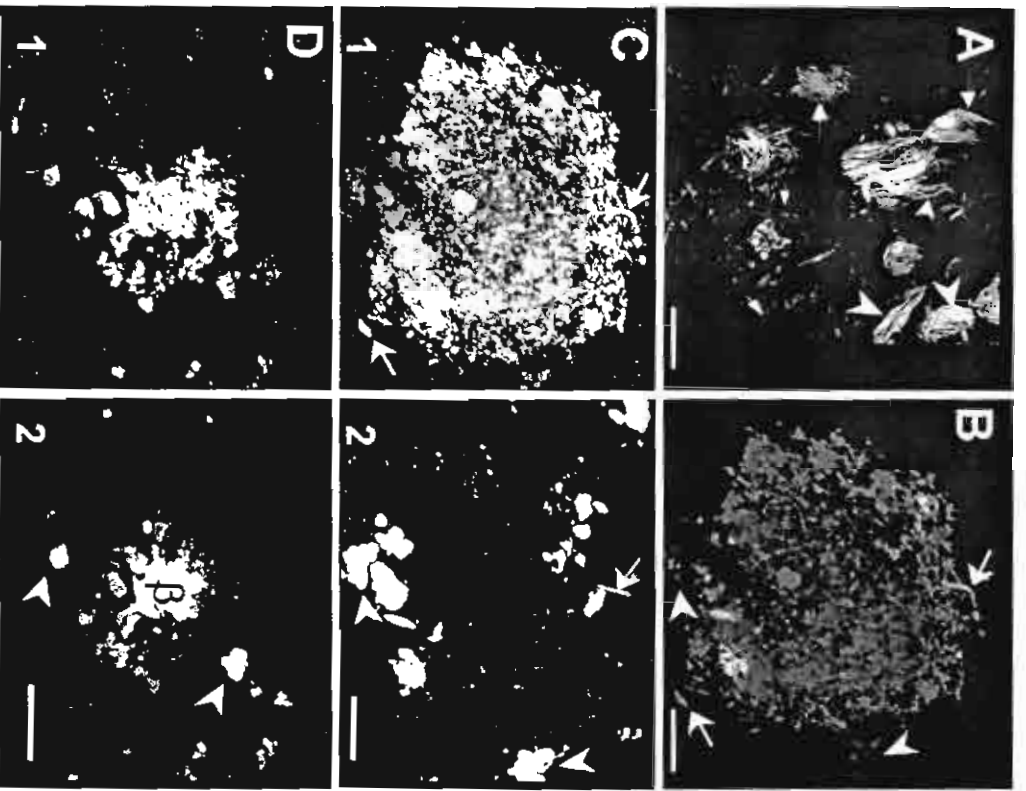


Fig. 5

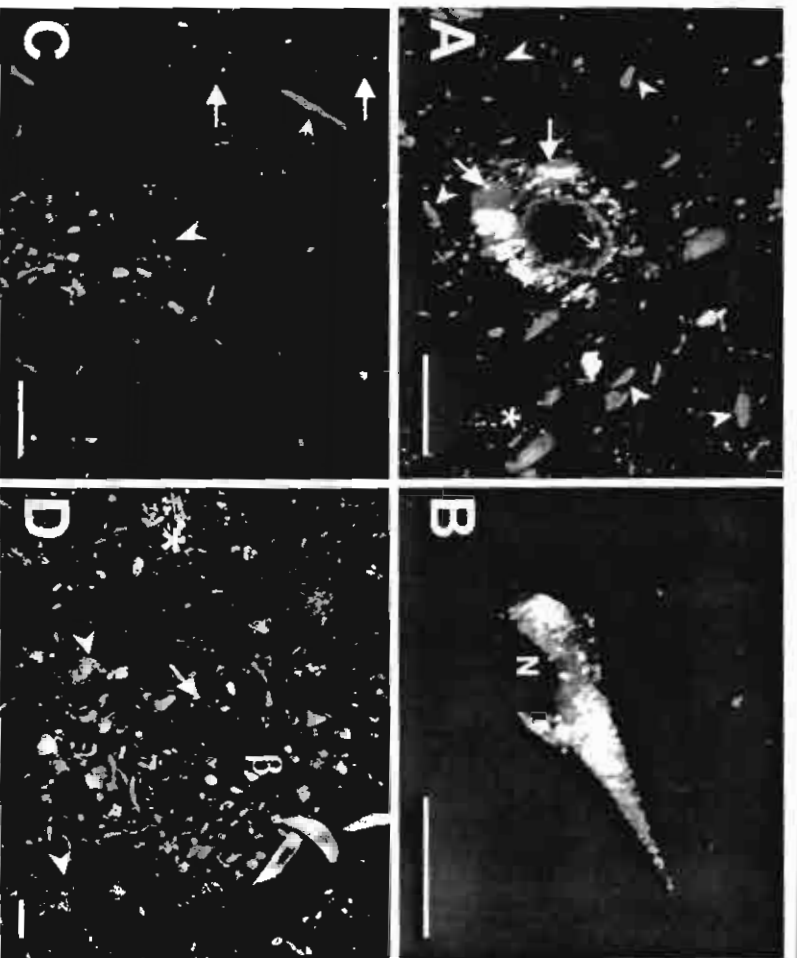


Fig. 6

Fig. 5. Double labelling with mAb 423 and thiazin red in entorhinal cortical layer II (A) and subiculum (B, C and D) from an AD subject: (A) Tangles exhibit different stages of truncated tau assembly: (i) Some NFTs, detected by mAb 423 in the green channel (large arrows), are poorly labelled by thiazin red whereas others are labelled by both markers (large arrowheads) (ii) In contrast, the V-shaped tangle detected in the red channel (small arrowhead) is poorly labelled with mAb 423, whereas thiazin red labels this structure only faintly (better observed in C-2, the corresponding unmerged image). (B) A plaque-like structure of granular appearance is densely labelled with mAb 423, whereas thiazin red labels this structure only faintly (better observed in C-2, the corresponding unmerged image). Isolated neurites, located toward the periphery of the plaque, are indicated by arrows. (C) some mAb 423 plaque-like structures are associated with β -amyloid fibrillar deposits (D-2, D) which are detected with thiazin red (D). Autofluorescent lipofuscin granules are only detected in the red channel (arrowheads in B, C-2 and D-2). Scale bar = 20 μ m. Fig. 6. Triple labelling with mAbs 423 and Alz-50, and thiazin red in the subiculum from an AD case: (A) two large deposits, labelled with mAb Alz-50, partially colocalise with mAb 423 (large arrows). mAb Alz-50 immunoreactivity is also observed in the perineuronal area (small arrow). Autofluorescent lipofuscin is observed in the red channel (star). (B) In this intracellular tangle, there is colocalisation of all three markers. The pattern of immunolabelling with both mAbs Alz-50 and 423 is granular. (C) abundant small neurites immunolabelled with mAb Alz-50 are seen in close association with the extracellular tangle which is immunolabelled predominantly with mAb 423 (large arrowhead). The enlarged neuritic present in the upper left (small arrowhead) is not labelled with either thiazin red or mAb 423. In contrast, thiazin red identifies two tangles (arrows; upper left, and arrowhead in A) which go undetected by either mAb. (D) A large neuritic plaque, in which deposits of β -amyloid fibrils bind thiazin red (B), are associated with several small dystrophic neurites that are labelled only with mAb Alz-50 and detected in the green channel. A large neurite is double labelled with mAb and thiazin red (arrow). An extracellular tangle, intensely immunolabelled with mAb 423 (star; left), is not detected with mAb Alz-50 and fails to bind thiazin red. Scale bar = 20 μ m.

Table 2

Correlation between the density of mAb 423-reactive NFTs and the clinical severity of AD (E-NFTs/NFTs = extracellular/intracellular neurofibrillary tangles, TC, temporal cortex; FC, frontal cortex; PC, parietal cortex; TR, transentorhinal; ECII/IV, layer ECII/IV from the entorhinal cortex; SUB, subiculum)^a

Structure	TC	FC	PC	TR	ECII	ECIV	SUB	CA1
E-NFTs	0.26	ns	0.42*	0.36*	0.28	0.33*	0.523*	0.461*
	0.094	ns	0.006	0.021	0.067	0.033	<0.005	0.002
I-NFTs	0.37	ns	0.42*	-0.05	0.08	0.30*	0.20	0.37*
	0.015	ns	0.006	0.711	0.612	0.047	0.203	0.015

^a For each pairwise comparison the correlation coefficient *r* (upper) and the significance value (below) are given. *Significant correlation values, ns not significant and no values obtained by the statistical analysis.

that were labelled by all three markers indicating their fibrillar nature. Abundant, enlarged neurites observed in the adjacent neuropil were also labelled only by mAb Alz-50.

A neuritic plaque is shown in Fig. 6D. Here, the dense fibrillar β -amyloid core is detected using thiazin red. The majority of thread-like neurites located in the vicinity of the plaque were labelled only with mAb Alz-50 (green). In contrast, enlarged neurites (arrow) and tangles (star) in the adjacent neuropil were labelled mostly with mAb 423 and thiazin red. Only a few tangles were detected by thiazin red alone (figure A, arrowhead and C, arrows), an indication that the C-terminal Glu-391 epitope was occluded in these cases.

4. Discussion

The neurofibrillary pathology of AD consists of NFTs, neuritic plaques and dystrophic neurites, and neuropil thread-like structures. All these are sites of accumulation of PHFs that contain tau protein as an integral constituent (Kondo et al., 1988; Wischik et al., 1988a). Tau protein, antigenically related to that found in PHFs, also accumulates at early stages of neuronal degeneration as diffuse amorphous cytoplasmic deposits (Mena et al., 1996). A common feature of at least some of the tau protein found in all of these deposits is that they are detectable with an antibody that recognises C-terminally truncated tau (Novak et al., 1993). The temporal sequence, however, in which tau truncation occurs is not understood. This can only be determined in brain tissues in which all stages of neurofibrillary pathology are present.

From their findings on brain tissue examined from patients without clinical assessment, Braak and Braak (1991) proposed that the progression of neurofibrillary changes can be staged on the basis of the spread of NFTs within hippocampal, entorhinal and transentorhinal structures. In particular, using Gallyas impregnation, they reported that the earliest sites of involvement appear to be in the transentorhinal and layer II of the entorhinal cortices, and CA1/subiculum

area of hippocampus. Only at later stages do NFTs appear in neocortical areas. In the present study, we have investigated how the Braak stages of neurofibrillary development can be demonstrated using morphometry of mAb 423-reactive tangles on cases of defined clinical severity.

We have found that the density of mAb 423-reactive NFTs was significantly higher in AD cases than in non-demented, control individuals. Furthermore, there is a differential pattern of development of intra- and extra-cellular tangles in the isocortex, hippocampal formation and the transentorhinal and entorhinal cortices. The occurrence of extracellular NFTs in defined areas is in distinct contrast to the distribution of intracellular NFTs. In particular, the transentorhinal region and layer II of the entorhinal cortex were the most affected regions, and where extracellular tangles presumably represent dead neurons (Cras et al., 1995; Gómez-Isla et al., 1996, 1997). We can speculate, therefore, that neuronal cells in these areas are more prone to neurofibrillary pathology associated with the accumulation of truncated tau protein. Intracellular NFTs were observed predominantly in CA1/subiculum, suggesting that neurons in these areas are more resistant to neurofibrillary pathology than cells from entorhinal cortex, where extracellular tangles develop.

It is not understood how the selective neuronal vulnerability in AD arises, although many different processes may be involved. Several processes have been implicated. Mitochondrial metabolism may be decreased in selective neuronal populations (Chandrasekaran et al., 1998). Dendritic reorganisation and reduced levels of the glutamate receptor in the entorhinal cortex has been suggested both predispose and precede the accumulation of NFTs (Ikonomic et al., 1997; Thorns et al., 1997; Arendt et al., 1998). Furthermore, cerebral neurotrophic factors are decreased in the entorhinal cortex (Narisawa-Saito et al., 1996). Finally, damage to the genetic material and apoptosis have been observed in entorhinal cortex in AD (Anderson et al., 1996).

Increased concentration of free radicals and an imbalance in proteolytic activities have been implicated in

AD (Smith and Perry, 1994; Smith et al., 1994a,b). Tau protein is toxic when over-expressed in the truncated form in cell culture (Canu et al., 1998; Fasulo et al., 1998; Novak et al., 1999). Since the presence of truncated tau is observed in neurons in the absence of NFTs, truncation of the tau protein may initiate cell death prior to the formation of NFTs. In addition to neurotoxic conditions that may arise in AD, decreased susceptibility of neurons in CA1 may play a role in the development of AD. Over-expression of ceruloplasmin (Loeffler et al., 1996) and clusterin (Giannakopoulos et al., 1998) in the CA1 area indicates that compensatory mechanisms or neuroprotection might occur in AD.

Our results indicate that truncated tau protein associated with NFTs in vulnerable neuronal populations may reflect the hierarchical pattern of neurofibrillary degeneration in AD as described by Braak and Braak (1991). In this respect, it was found that it was the extracellular NFTs, which proved the best predictor for dementia.

The columnar organisation of tangles in the perirhinal cortex may reflect the 'modular' function of the perirhinal cortex that has been ascribed to this area (Van Hoesen and Solodkin, 1994; Van Hoesen et al., 2000). The perirhinal cortex is a relay center of cortico-cortical association inputs and is powerfully interconnected with the superficial layers of the more posterior entorhinal cortex (Van Hoesen and Pandya, 1975; Amaral et al., 1987; Green and Mesulam, 1988). Thus, a disturbance of this modular organisation, by the progressive accumulation of truncated tau protein, may be an important component of AD pathology. We suggest, therefore, that the pattern of mAb 423 immunoreactivity in perirhinal and entorhinal cortices supports the proposal that a single early focus residing in these cortices may initiate the cognitive failure in the AD pathogenesis (Braak and Braak, 1985, 1991). The distribution of mAb 423-immunoreactive tangles in the perirhinal cortex was similar to that described for tangles in the transentorhinal region using Gallyas-impregnated material from AD brains (Braak and Braak, 1985). Furthermore, the densities of extracellular, but not intracellular tangles increased as the disease progressed.

The transentorhinal region and the layer II of entorhinal cortex serve as the perforant pathway that provides for the connection and transport of information coming from the isocortex to the hippocampus. Our findings suggest that the perforant pathway is affected substantially by the presence of extracellular NFTs in which C-terminally truncated tau accumulates.

Neurofibrillary pathology in AD demonstrates considerable heterogeneity as a result of the different ways in which structures may develop with time. In this study, we have been able to reveal a certain amount of this heterogeneity with the combined use of antibodies

and ligands that recognise particular conformations or assembly states of proteins. The mAb Alz-50 selectively recognises individual monomers of tau protein adopting a specific conformation preceding or during PHF formation (Carmel et al., 1996). According to the latter study, intramolecular folding of the N-terminus over the repeats region of tau could create the epitope detected in the PHFs. In contrast, mAb 423 detects C-terminally truncated tau that is characteristic of PHFs. Full-length tau, labelled with mAb Alz-50 was more characteristically associated with intracellular rather than extracellular NFTs. The co-localisation of mAbs 423 and Alz-50 in intracellular NFTs suggests, therefore, that the tau molecules within an intracellular NFT appear to have undergone both a conformational change and a process of truncation.

During the maturation of neurofibrillary structures, modifications of the tau molecule can occur which lead to the occlusion of some epitopes (Mena et al., 1995, 1996). This would account for the presence of NFTs that are only detected with thiazin red (Fig. 5A, Fig. 6C). Thus, the labelling of tau aggregates with individual antibodies is unable to distinguish whether such aggregates are assembled into fibrils or not.

Neurofibrillary pathology in neurites may involve a different pattern of PHF formation to that observed in the soma. We found that most of the thread-like neurites associated with plaques and tangles appear to be formed from tau that has not yet been assembled into aggregates (i.e. mAb Alz-50-positive, thiazin red-negative; see Fig. 6A and C, small arrowheads). Larger dystrophic neurites were associated with tau protein in fibrillar state of aggregation that contain truncated tau protein (i.e. mAb 423-positive; thiazin red-positive; see Fig. 6D, arrow). The pattern of labelling displayed by these two types of neurites may indicate different mechanisms of development. In the first case, enlarged neurites may represent a degenerative process associated with the neurofibrillary pathology occurring simultaneously in the proximal cell body. The earliest accumulation of mAb 423 immunoreactivity has been reported to take the form of diffuse granular staining in the perinuclear area of the neuronal cell (Mena et al., 1996). These findings would be consistent with the view that early pathological deposits of tau proteins are truncated at both N- and C-termini and located in the somatic compartment of the cell. Furthermore, such truncated tau species are capable of assembly into PHF-like structures, albeit in non-physiological *in vitro* conditions (Crowther et al., 1992). The second type of neurites are those with a thread-like appearance and which are distributed either throughout the neuropil or in association with β -amyloid deposits. These structures, that were mainly detected using mAb Alz-50, may represent a population of neurons undergoing regeneration, as has been suggested (Masliah et al.,

1991). The presence of truncated tau within a hippocampal plaque could represent a way in which tau may have a role in the molecular pathogenesis of AD through an association with β -amyloid.

The methods for immunohistochemical staging of AD that we have deployed in this study represent a means with which to further investigate the early molecular changes involved in neurofibrillary pathology. Such studies should lend themselves to a better understanding of the biochemical sequence of events that occur during the progression of the disease.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from CONA-CyT-26319M (to R.M), the Medical Research Council (UK), the Addenbrooke's Alzheimer's Disease Research Funds, and the Leopold Muller Estate. For this project F.G.-S. received financial support from CONA-CyT (México).

References

- Amaral, D.G., Insausti, R., Cowan, W.M., 1987. The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organisation. *J. Comp. Neurol.* 264, 326–355.
- Anderson, A.J., Su, J.H., Cotman, C.W., 1996. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of post-mortem delay. *J. Neurosci.* 16, 1710–1719.
- Arendt, T., Bruckner, M.K., Gertz, H.J., Marcova, L., 1998. Cortical distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease matches the pattern of neurons that retain their capacity of plastic remodelling in the adult brain. *Neuroscience* 83, 991–1002.
- Ball, M.J., Griffin-Brooks, S., MacGregor, J.A., Nagy, B., Ojalvo-Rose, E., Fewster, P.H., 1988. Neuropathological definition of Alzheimer's disease: multivariate analysis in the morphometric distinction between Alzheimer's dementia and normal aging. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2, 29–37.
- Blessed, G., Tomlison, B.E., Roth, M., 1968. The association between quantitative measures of dementia and of neuritic change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry* 114, 797–811.
- Bondareff, W., Wischik, C.M., Novak, M., 1990. Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Am. J. Pathol.* 137, 711–723.
- Bondareff, W., Mountjoy, C.Q., Wischik, C.M., Hauser, D.L., LaBree, L.D., Roth, M., 1993. Evidence of subtypes of Alzheimer's disease and implications for etiology. *Arch. Gen. Psychiatry* 50, 350–356.
- Braak, H., Braak, E., 1985. On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 68, 325–332.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Braak, E., Braak, H., Mandelkow, E.M., 1994. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* 87, 554–567.
- Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Brancolini, C., Rinaldi, A.M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A., Calissano, P., 1998. Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurosci.* 18, 7061–7074.
- Carmel, G., Mager, E., Binder, L., Kuret, J., 1996. The structural basis of monoclonal antibody Alz-50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 271, 32789–32795.
- Chandrasekaran, K., Hatanpaa, K., Brady, D.R., Stoll, S., Rapoport, S.I., 1998. Downregulation of oxidative phosphorylation in Alzheimer disease: loss of cytochrome oxidase subunit mRNA in the hippocampus and entorhinal cortex. *Brain Res.* 796, 13–19.
- Cras, P., Smith, M.A., Richey, P.L., Siedlak, S.L., Mulvihill, P., Perry, G., 1995. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 89, 291–295.
- Crowther, R.A., Olesen, D.F., Jakes, R., Goedert, M., 1992. The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 309, 199–202.
- Fasulo, L., Visintin, M., Novak, M., Cattaneo, A., 1998. Tau truncation in Alzheimer's disease: expression of a fragment encompassing PHF core tau induces apoptosis in COS cells. *Alzheimer's Reports* 1, 25–32.
- Gertz, H.J., Xuereb, J., Huppert, F., Brayne, C., McGee, M.A., Paykel, E., Harrington, C., Mukaetova-Ladinska, E., Erendt, T., Wischik, C.M., 1998. Examination of the validity of the hierarchical model of neuropathological staging in normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 95, 154–158.
- Giannakopoulos, P., Kovari, E., French, L.E., Viard, I., Hof, P.R., Bouras, C., 1998. Possible neuroprotective role of clusterin in Alzheimer's disease: a quantitative immunocytochemical study. *Acta Neuropathol.* 95, 387–394.
- Gómez-Isla, T., Price, L.J., McKeel, W.D., Jr. Morris, C.J., Growdon, H.J., Hyman, T.B., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., Hyman, B.T., 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 41, 17–24.
- Green, R.C., Mesulam, M.M., 1988. Acetylcholinesterase fiber staining in the human hippocampus and parahippocampal gyrus. *J. Comp. Neurol.* 273, 488–499.
- Harrington, C.R., Mukaetova-Ladinska, E.B., Hills, R., 1991. Measurement of distinct immunohistochemical presentations of tau protein in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5842–5846.
- Huppert, F.A., Brayne, C., Gill, C., Paykel, E.S., Beardsall, L., 1995. CAMCOG – a concise neuropsychological test to assist dementia diagnosis: socio-demographic determinants in an elderly population sample. *Br. J. Clin. Psychol.* 34, 529–541.
- Ikonomovic, M.D., Mizukami, K., Davies, P., Hamilton, R., Sheffield, R., Armstrong, D.M., 1997. The loss of GluR2(3) immunoreactivity precedes neurofibrillary tangle formation in the entorhinal cortex and hippocampus of Alzheimer brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 1018–1027.
- Kondo, J., Honda, T., Mori, H., 1988. The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1, 827–834.
- Kowall, N.W., Kosik, K.S., 1987. Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 22, 639–643.
- Loeffler, D.A., LeWitt, P.A., Juneau, P.L., Sima, A.A., Nguyen, H.U., DeMaggio, A.J., Brickman, C.M., Brewer, G.J., Dick, R.D., Troyer, M.D., Kanaley, L., 1996. Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 738, 265–274.

- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., Alford, M., Albright, T., DeTeresa, R., Terry, R.D., Baudier, J., Saitoh, T., 1991. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer disease. *Neuron* 6, 729–739.
- Mena, R., Wischik, C.M., Novak, M., Milstein, C., Cuellar, A.C., 1991. A progressive deposition of paired helical filaments (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50, 474–490.
- Mena, R., Robitaille, Y., Cuellar, A.C., 1992. New patterns of intra-neuronal accumulation of the microtubular binding domain tau in granulovacuolar degeneration. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 5, 132–141.
- Mena, R., Edwards, P.C., Pérez-Olvera, O., Wischik, C.M., 1995. Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 89, 50–56.
- Mena, R., Edwards, P., Harrington, C.R., Mukaetova-Ladinska, E.B., Wischik, C.M., 1996. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 91, 633–641.
- Mukaetova-Ladinska, E.B., Harrington, C.R., Roth, M., Wischik, C.M., 1993. Biochemical and anatomical redistribution of tau protein in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 143, 565–578.
- Narisawa-Saito, M., Wakabayashi, K., Tsuji, S., Takahashi, H., Nawa, H., 1996. Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 7, 2925–2928.
- Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M., 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J.* 12, 365–370.
- Novak, M., Ugolini, G., Fasulo, L., Visisntin, M., Ovecka, M., Cattaneo, A., 1999. Truncation of tau and neurodegeneration. In: Iqbal, K., Swaab, D.F., Winblad, B., Wisniewski, H.M. (Eds.), *Alzheimer's Disease and Related Disorders*. New York, Wiley, pp. 281–291.
- Paykel, E.S., Huppert, F.A., Brayne, C., 1988. Incidence of dementia and cognitive decline in over-75s in Cambridge: overview of cohort study. *Soc. Psychiatry Epidemiol.* 33, 387–392.
- Paykel, E.S., Brayne, C., Huppert, F.A., Gill, C., Barkley, C., Gehlhaar, E., Beardsall, L., Girling, D., Pollit, P., O'Connor, D., 1994. Incidence of dementia in a population older than 75 years in the United Kingdom. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 325–332.
- Roth, M., Tym, E., Mountjoy, C.Q., Huppert, F.A., Hendrie, H., Verma, S., Goddard, R., 1986. CAMDEX: a standardized instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br. J. Psychol.* 149, 698–709.
- Rose, M., 1927a. Der Allocortex beim Tier und Mensch. I. Teil. *J. Psychol. Neurol.* 34, 1–111.
- Rose, M., 1927b. Riechrinde beim Menschen und beim Affen. II. Teil des 'Allocortex bei Tier und Mensch'. *J. Psychol. Neurol.* 34, 261–401.
- Smith, M.A., Perry, G., 1994. Alzheimer disease: an imbalance of proteolytic regulation? *Med. Hypoth.* 42, 277–279.
- Smith, M.A., Taneda, S., Richey, L.P., Miyata, S., Yan, S.D., Stern, D., Sayre, L.M., Monnier, V.M., Perry, G., 1994a. Immunocytochemical demonstration of advanced Maillard reaction products in Alzheimer disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5710–5714.
- Smith, M.A., Richey, L.P., Kutty, R.K., Taneda, S., Monnier, V.M., Sayre, L.M., Perry, G., 1994b. Advanced Maillard reaction end products, free radicals and protein oxidation in Alzheimer disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 738, 447–454.
- Thorns, V., Mallory, M., Hansen, L., Masliah, E., 1997. Alterations in glutamate receptor 2/3 subunits and amyloid precursor protein expression during the course of Alzheimer's disease and Lewy body variant. *Acta Neuropathol.* 94, 539–548.
- Van Hoesen, G.W., Pandya, D.N., 1975. Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. III. Efferent connections. *Brain Res.* 95, 39–59.
- Van Hoesen, G.W., Solodkin, A., 1994. Cellular and systems neuroanatomical changes in Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 747, 12–35.
- Van Hoesen, G.W., Hyman, B.T., Damasio, A.R., 1991. Entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 1, 1–8.
- Van Hoesen, G.W., Augustinack, J.C., Dierking, J., Redman, S.J., Thangavel, R., 2000. The parahippocampal gyrus in Alzheimer's disease: clinical and preclinical neuroanatomical correlates. *Ann. NY Acad. Sci.* 911, 254–274.
- Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A., 1988a. Isolation of fragment of tau derived from the core of the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4506–4510.
- Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A., 1988b. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4884–4888.

Francisco García-Sierra · Jean J. Hauw
 Charles Duyckaerts · Claude M. Wischik
 José Luna-Muñoz · Raúl Mena

The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old

Received: 23 April 1999 / Revised: 27 July 1999, 11 October 1999 / Accepted: 12 October 1999

Abstract Neurofibrillary pathology as found in Alzheimer's disease (AD) is also found in the normal elderly, suggesting that these changes may be part of the aging process. In this study, we assessed the densities and distribution of structures recognized by the monoclonal antibody (mAb) to phosphorylated tau (AT8) in the hippocampal formation and medial temporal isocortex of 19 centenarians. Of these, 4 cases were demented and 15 non-demented. AT8 immunoreactivity correlated with the global deterioration scale (GDS). The density of both intraneuronal neurofibrillary tangles (I-NFTs) and neuritic clusters (NCs) significantly correlated with the GDS in the layer II of the entorhinal cortex ($r = 0.66$, $P = 0.005$ and $r = 0.611$, $P = 0.01$, respectively). Density of I-NFTs in the subiculum ($r = 0.491$; $P = 0.034$) also correlated significantly. No other area was found to be statistically significant. Importantly, no correlation was found when demented and non-demented centenarian cases were analyzed separately, suggesting that the difference marks a fundamental shift between AD and non-demented individuals. This assertion is supported by the significantly higher densities of I-NFTs and NCs in the transentorhinal ($P = 0.043$ and $P = 0.011$, respectively) and layer II of the entorhinal cortex ($P = 0.02$ and $P = 0.007$, respectively), and I-NFTs in the subiculum ($P < 0.001$) and CA1 ($P = 0.011$) in the demented group when compared with the non-demented cases. Granular diffuse deposits, an early stage parameter of the neurofibrillary pathology involving

accumulation of non-fibrillar abnormally phosphorylated tau protein did not correlate with the GDS or between the two groups studied. This study, combining morphometric and confocal analyses, not only provides further evidence that, in the brains of patients with AD, the perforant pathway is highly sensitive to tau pathology but also that involvement is distinct from the changes of normal aging, even of the oldest old.

Key words Alzheimer's disease · AT8 · Hyperphosphorylated tau protein · Neurofibrillary tangles · Entorhinal cortex

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is histopathologically characterized by the presence of neuritic plaques (NPs), neurofibrillary tangles (NFTs) and neuropil threads (NTs) distributed along transentorhinal and entorhinal cortices, the hippocampal formation and the isocortex. Similar pathological changes are also found in normal elderly subjects [17, 26, 32, 37], although in lesser amounts than in AD.

The distribution of fibrillar and non-fibrillar pathology in isocortical areas has been considered a major criteria for the accurate diagnosis of AD [16, 27] since it is not severely affected in aging. On the other hand, neurofibrillary changes in the entorhinal cortex and hippocampus are often present in non-demented elderly people. For this reason, the histopathological changes in these areas have not been considered diagnostic for AD [3, 16, 27]. Determining if the range of neuropathological and clinical changes described in the elderly [1, 6, 17, 26, 32, 37] actually represent pre-clinical stages of AD or are alterations merely related to normal aging is a major issue in understanding AD. In this study, we address this issue by studying the histopathology in the hippocampus of a cohort of centenarians with the goal of determining if the changes of AD are distinct from aging.

Abnormally phosphorylated microtubule-associated tau protein is a conspicuous component of the paired helical

F. García-Sierra · J. Luna-Muñoz · R. Mena (✉)
 Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences,
 CINVESTAV-IPN, PO Box 14-740,
 07000, México, D. F., México
 e-mail: rmena@fisio.cinvestav.mx,
 Tel.: +525-747-7000 ext 5129; Fax: +525-747-7105

J. J. Hauw · C. Duyckaerts
 Laboratoire de Neuropathologie R. Escourolle,
 Hôpital de la Salpêtrière, Paris, France

C. M. Wischik
 Department of Mental Health,
 University of Aberdeen, Aberdeen, UK

filaments (PHFs) which accumulate in degenerating neurons in AD [12, 15, 28]. Phosphorylation of serines 199, 202 and threonine 205 in the PHF-associated tau protein is specifically recognized by the monoclonal antibody (mAb) AT8 [4, 20, 21]. Nevertheless, phosphorylated tau protein is also found by immunoblotting in both AD and control individuals aged over 70 years [39].

Previous analyses of very old normal subjects showed that neurofibrillary changes, while present, were less frequent than in AD cases [25]. In a group of demented centenarians, neurofibrillary changes were distributed in the CA1 of the hippocampus as well as the neocortex, an area preserved at the earliest stages of AD in younger cases [18, 19].

In the present study, using conventional and confocal microscopy we immunocytochemically assessed the densities and distribution of AT8-immunoreactive (IR) structures in the hippocampal formation and superior temporal isocortex of 19 centenarian cases. The quantitative data were correlated with the global deterioration scale (GDS) a clinical parameter of cognitive state. Our findings support a distinct increase in neurofibrillary pathology with onset of dementia.

Material and methods

Cases

Clinical and neuropathological data for the 19 centenarian cases studied have been previously reported [13, 14, 24]. The severity of the mental deterioration was retrospectively staged according to the GDS. The series included 15 cases classified as non-demented (GDS ≤ 3), and 4 demented cases; 1 affected with AD and 3 with mixed dementia (combined vascular and AD changes). Brains were fixed in formalin and embedded in paraffin. Adjacent sections, 7 μm thick, from the superior temporal gyrus, hippocampal formation and entorhinal cortex were obtained and used for immunocytochemistry with mAb AT8.

Immunocytochemistry

Prior to the immunolabeling, deparaffinized sections were incubated in 0.5% hydrogen peroxide-phosphate buffered saline (PBS) to inactivate endogenous peroxidase. Specimens were then incubated with the primary mAb AT8 (1:500) diluted in PBS containing 0.2% Triton X-100, for 1 h at room temperature. A goat anti-mouse immunoglobulin horseradish peroxidase conjugate (HRP) was used as secondary antibody for 1 h. Bound peroxidase was revealed by the addition of 0.06% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide in PBS (pH 7.4). When the reaction was completed slides were washed by immersion in PBS. For morphometry sections were counterstained with hematoxylin, then dehydrated and mounted in DPX.

Morphometry and statistics

Counts of AT8-IR structures were performed blindly to the clinical diagnosis. The density of NFTs in the hippocampal formation and entorhinal cortex was established by counting three adjacent fields per section randomly chosen in each sub-area. For the superior temporal gyrus, the measurements were made in six fields in the vicinity of the sulcus. Identification and counting of AT8-IR structures were made using $\times 25$ and $\times 40$ objective lens. The den-

sity of IR structures was expressed as the number of structures per mm^2 [33]. Correlations between the density of the IR structures in different areas with the GDS were determined by Spearman's r coefficient. Comparisons between the demented and non-demented groups were made using the non-parametric test of Mann-Whitney.

Confocal microscopy

Selected samples were double labeled with the mAb AT8 and the dye thiazin red (TR; Fluka, Busch); after mAb AT8 incubation for 1 h, sections were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-tagged goat anti-mouse IgG for 1 h, and washed with PBS-0.2% Triton X-100. Sections were counterstained with TR (0.01% in water) for 5 min, then washed and mounted in an anti-quenching media (Vectashield, Vector Labs). TR is a red fluorescence dye which differentiates between non-fibrillar and fibrillar state of aggregation of tau antigens associated with the PHFs [30]. Double-immunolabeled sections were viewed with a $\times 60$ (N. A. 1.4) oil immersion objective on an epi-fluorescence Nikon microscope with attached confocal system (Bio-Rad MRC 600, Watford, UK). From each area, 10–15 optical Z-sections (around 0.2–0.5 μm thick) were scanned using the dual channel imaging system of the laser confocal microscope. When both channels were merged, the correspondent pseudocolors green for FITC, red for TR and yellow for colocalization were displayed at the monitor screen.

Results

Distribution of AT8-IR structures in demented and non-demented cases

In all the centenarian cases mAb AT8 identified intracellular tangles (I-NFTs), granular diffuse deposits (GDD) in the cytoplasm, as well as neuritic clusters (NCs) and neuritic plaques (NPs) (see Fig. 3A–H). For morphometry, NPs and NCs were considered together. Neuropil threads were also immunolabeled with mAb AT8, but were not considered in the morphometrical analysis.

When all the cases were analyzed together, layer II of the entorhinal cortex, the subiculum and CA1 areas showed the highest number of AT8-IR structures (Fig. 1). In each region, the number of I-NFTs was significantly higher than any other AT8-IR structure ($P < 0.05$), with the exception of the superior temporal isocortex (Fig. 1).

Correlations between the densities of AT8-IR structures and the GDS

When all the areas were considered together, the density of AT8-IR I-NFTs correlated significantly with the GDS ($r = 0.547$, $P = 0.016$; Table 1), while no significant correlation of the GDS was found with the other two AT8-IR structures (GDD and NC).

Additionally, when each area was analyzed separately, a significant correlation between the densities of AT8-IR I-NFTs and the GDS was found in layer II of the entorhinal cortex ($r = 0.66$, $P = 0.005$) and the subiculum ($r = 0.491$, $P = 0.034$), but not in CA1, regardless of the high number of AT8-IR structures present in this area (Table 1). The density of AT8-IR NCs correlated with GDS in

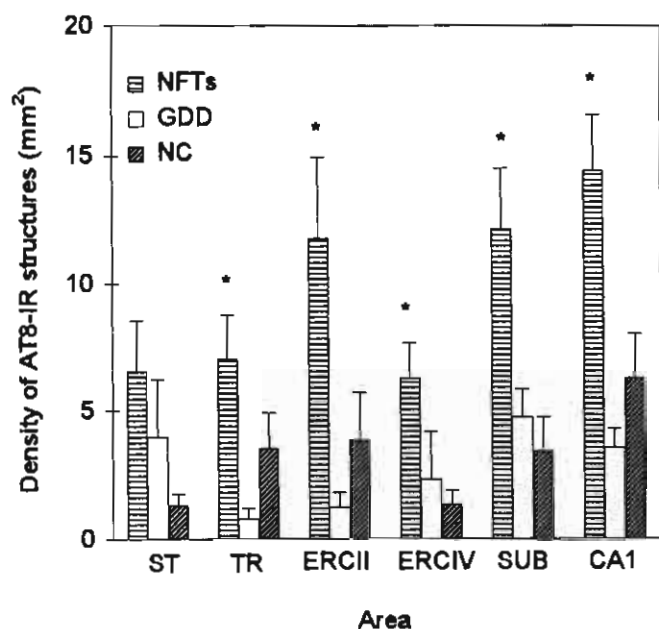


Fig. 1 Regional distribution of AT8-IR structures in a group of demented and non-demented centenarians. Six brain regions were assessed: superior temporal isocortex (*ST*), transentorhinal (*TR*), layer II of the entorhinal cortex (*ERC II*), layer IV of the entorhinal cortex (*ERC IV*), subiculum (*SUB*), and CA1. Three different lesions were quantified: I-NFTs, GDD, NC. Density of lesions corresponds to the average of 19 cases. Lesions are found most frequently in CA1, *ERC II* and *SUB*. For each region the statistical significance of differences between the three lesions is indicated with asterisks (Student-Newman-Keuls: * $P < 0.05$) (*IR* immunoreactive, *I-NFTs* intracellular tangles, *GDD* intracellular granular diffuse deposits, *NC* neuritic clusters)

layer II of the entorhinal cortex ($r = 0.611$, $P = 0.01$), but not in the other regions (Table 1).

Correlation between the density of AT8-IR structures and the GDS among demented and non-demented centenarians

To distinguish the effects of aging and AD we separated the centenarians into demented and non-demented groups. None of the previous correlations between the densities of these structures and the GDS were obtained when the de-

mented and non-demented centenarian cases were separated (data not shown).

Density of AT8-IR structures in the demented and non-demented groups

Considering all the areas together, the densities of AT8-IR I-NFTs and NCs were significantly higher in the demented group than in the non-demented one ($P < 0.006$ for I-NFTs and $P < 0.001$ for NCs) (Table 2, Fig. 2). When the different areas were analyzed separately, the number of AT8-IR I-NFTs was significantly higher in the demented than in the non-demented group in the transentorhinal ($P = 0.043$), the layer II of the entorhinal cortex ($P = 0.02$), the subiculum ($P < 0.001$) and CA1 ($P = 0.011$). In addition, the number of AT8-IR NCs was significantly higher in the demented group than in non-demented individuals in the transentorhinal region ($P = 0.011$) and layer II of the entorhinal cortex ($P = 0.007$). In contrast, the density of cells with AT8-IR GDD was not significantly different between the two groups (Table 2).

Double labeling with AT8 and TR

For some cases, sections immunolabeled with mAb AT8 were counterstained with the red fluorescent dye, TR, to monitor the state of assembly of abnormally phosphorylated tau protein in both I-NFTs and NCs, using confocal microscopy.

AT8-IR structures of various types were observed mainly in the CA1 area of the hippocampus. These AT8-IR structures displayed differential labeling with TR. The AT8-IR GDD appeared to be an earlier stage of neurofibrillary pathology since they were not detected by TR when they were present in neurons devoid of NFTs (Fig. 3 A). Similar results were obtained by confocal microscopy after immunolabeling with the mAb 423 [30, 31], which recognizes a C-terminal truncation at Glu-391 of the tau protein [35]. As shown in Fig. 3 A, the AT8-IR GDD were distributed throughout the soma and the proximal dendrites. The green immunolabeling was also present in the perikarya. Optical sections through the nuclear area demonstrated that the immunolabeling was associated

Table 1 Correlations between the density of AT8-IR structures and the mental deterioration scale (GDS) (*IR* immunoreactive, *ST* superior temporal isocortex, *TR* transentorhinal, *ERC II/IV* layer

II/IV of the entorhinal cortex, *SUB* subiculum, *I-NFT* intracellular neurofibrillary tangles, *GDD* intracellular granular diffuse deposits, *NC* neuritic clusters

Structure	ST	TR	ERC II	ERC IV	SUB	CA1	All areas
I-NFTs	0.264	0.392	*0.660	0.404	*0.491	0.347	*0.547
	0.299	0.107	0.005	0.106	0.034	0.143	0.016
GDD	0.321	-0.121	0.012	-0.242	-0.159	-0.402	-0.304
	0.205	0.627	0.959	0.342	0.508	0.088	0.203
NC	0.334	0.405	*0.611	0.468	0.270	0.296	0.430
	0.188	0.094	0.010	0.059	0.259	0.214	0.066

For each pairwise comparison the correlation coefficient r (*upper*) and the significance value P (*below*) are given.

*Significant correlation values

Table 2 Comparison of the density of AT8-IR structures between demented and non-demented cases. Analysis by area (ns not significant)

Structure	ST	TR	ERC II	ERC IV	SUB	CA1	All areas
I-NFTs	ns	0.043	0.02	ns	< 0.01	0.011	0.006
GDD	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NC	ns	0.011	0.007	ns	ns	ns	< 0.001

P values obtained by non-parametric statistics

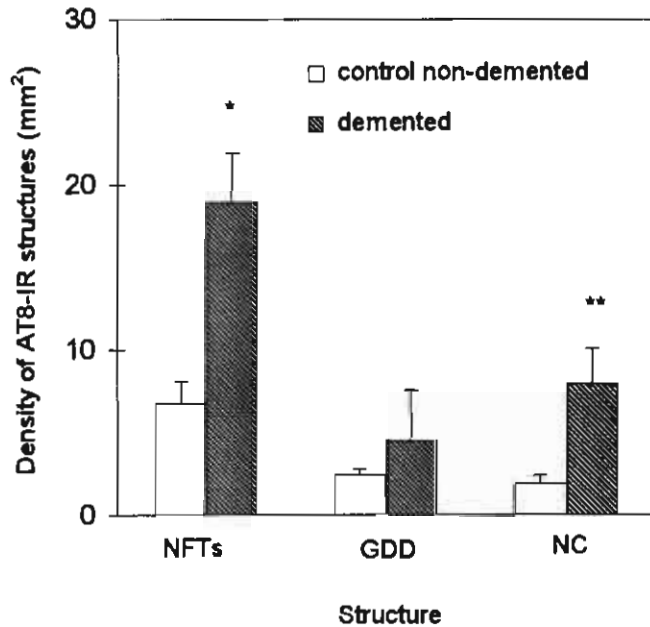


Fig. 2 Density of AT8-IR structures in demented and non-demented cases. The densities of I-NFTs and NC are significantly higher in the demented group than in the non-demented cases (* $P = 0.006$, ** $P < 0.001$). See the legend for Fig. 1 for the codes

with the nuclear envelope and absent inside the karyoplasm (not shown). GDD were not labeled with TR. The earliest evidence of phosphorylated tau aggregation was observed in both the somata and the proximal dendrites (Fig. 3B, C). These structures took the form of doubly labeled "pre-mature tangles" in the somatic compartment varying in number from a single (Fig. 3B) to several deposits (Fig. 3C). These AT8-IR fibrillar aggregates were characteristically associated with the GDD when present in the same cell (arrowhead, Fig. 3B). In a number of AT8-IR cells, aggregates were observed in the soma that were AT8-IR, while "tufts" were observed in the proximal neuritic tree. That the majority of "tufts" were double immunolabeled by mAb AT8 and TR (arrows, Fig. 3D) suggested a state of assembly similar to that observed in the soma. The adjacent neuritic processes remained undetected by TR (arrowhead, Fig. 3D). Typical AT8-IR I-NFTs were characteristically labeled by TR (arrow Fig. 3E). Some tangle-like structures detected by TR in the red channel were not labeled by mAb AT8 (Fig. 4C, D). Auto-fluorescent lipofuscin deposits were located in the soma and displayed a granular appearance in the red channel

(arrowhead, Fig. 3E). AT8-IR I-NFTs mingled with lipofuscin granules were a common finding (Fig. 4A, B).

AT8-IR NCs were found either associated with amyloid- β deposits (Fig. 3F) or as compact clusters with amyloid- β in the vicinity (Fig. 3G). Interestingly, contrasting with the neurites present in the vicinity of amyloid- β fibrils, which were labeled by the two markers, some compact clusters were labeled by mAb AT8 and differentially by TR, suggesting a differential aggregative state of phosphorylated tau protein in this lesion (arrow Fig. 3G). A common finding was extracellular tangles labeled by TR (arrows, Fig. 3H) whose associated enlarged neurites were labeled by the mAb AT8 as well as TR (arrowhead, Fig. 3H).

Discussion

There has been considerable controversy regarding the relationship of cognitive dysfunction and neurofibrillary changes occurring in the elderly. In the elderly, the neuropathological changes of amyloid- β plaques and I-NFT are more confined to the entorhinal cortex and hippocampus rather than spread throughout the neocortex as in AD [5, 8, 36]. However, the usefulness of these findings is limited by the fact that most studies lacked a history of cognition prior to death [11, 29, 38]. In contrast, the clinicopathological studies that contained the results of prior cognitive testing showed that neuropathological changes in the hippocampus are correlated with cognitive loss [7]. In the present immunocytochemical study, we quantitatively analyzed AT8-IR structures present in the hippocampal formation and the superior temporal isocortex of a group of French centenarians, who have been well documented in previous publications, both for their clinical and neuropathological features [13, 14, 24].

In the present study, we show that layer II of the entorhinal cortex, the subiculum and CA1 contain the highest densities of AT8-IR I-NFTs. The density of I-NFT was the only parameter that significantly correlated with cognition defined by the GDS (Table 1). I-NFT density in layer II of the entorhinal cortex correlated better with the stage of the mental decline than did I-NFT density in the other regions. In addition, in the same region, the number of AT8-IR NCs also correlated with GDS (Table 1). Taken together, these data support the high vulnerability of layer II entorhinal cortex neurons. Vulnerability of this area to develop NFTs both in the elderly and in AD has been previously reported [10, 22, 23]. In this cohort of centenarians, composed of normal and demented individuals, our results suggest that the extent of neurofibrillary pathology parallels incrementally impairment of cognition.

Most studies have correlated the severity of cognitive impairment in AD with development of NFTs and NPs in the neocortex [1, 3, 16, 27, 34] and not in the entorhinal cortex or hippocampus. The latter regions are less studied for clinicopathological correlation since NFTs are present in normal aging [3, 10, 16, 27]. In the centenarian cases analyzed in this study, the number of AT8-IR NFTs in

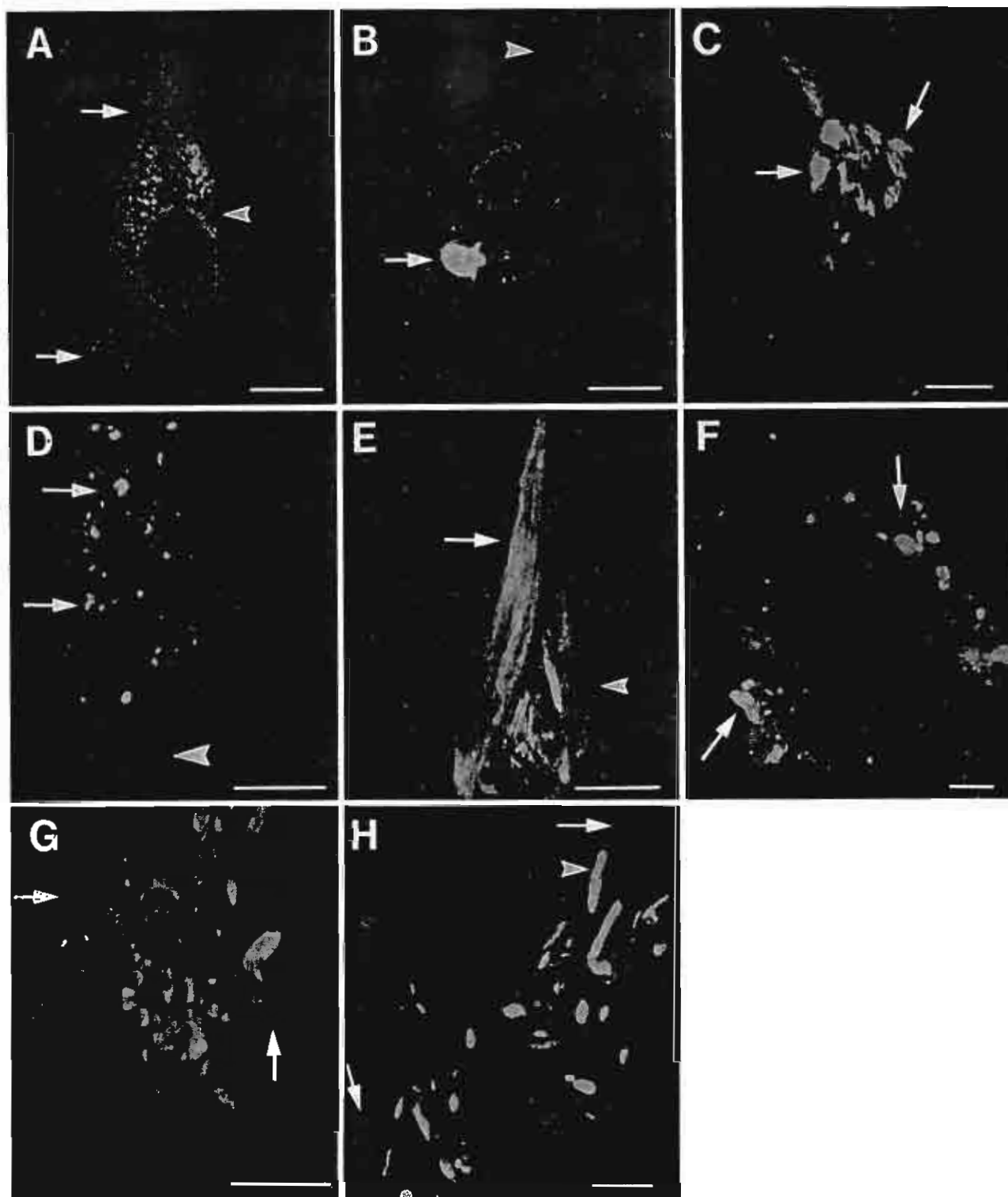


Fig. 3 A–H Double immunolabeling with mAb AT8 and TR. In merged images, colocalization of AT8-IR (*green*) and TR labeling (*red*) is seen as a *yellow* pseudocolour. **A** GDD in the cytoplasm, nuclear membrane and proximal dendrites in a pathological cell (*arrows*). Autofluorescent lipofuscin with a granular appearance is commonly found in the red channel (*arrowhead*). **B** In some cells, besides the presence of GDD (*arrowhead*), “pre-mature tangles” (*arrow*) are also present in the cytoplasm. **C** In the same cell a variety of immunoreactive structures are seen which may correspond to “pre-mature tangles” and distributed toward the nucleus (*arrows*). **D** In some cells, “tufts” in the proximal neuritic tree were double labeled by mAb AT8 and TR (*arrows*). An adjacent neu-

ritic process is also detected in the green channel (*arrowhead*). **E** Double labeling with mAb AT8 and TR of an intracellular tangle (*arrow*). Autofluorescent granules are detected only in the red channel (*arrowhead*). **F** Typically, the neuritic clusters associated with β -amyloid deposits are double labeled with mAb AT8 and TR (*arrows*). **G** Some neurites of the compact clusters not associated with amyloid- β deposits, were labeled by mAb AT8 but not by TR (*arrows*). **H** Extracellular NFTs (*arrows*) lose mAb AT8 immunoreactivity (*green*) but preserve binding sites to TR (*red*). The neurites present in the vicinity are double labeled by the two markers (*arrowhead*) (TR thiazin red). Bars A–H = 10 μ m

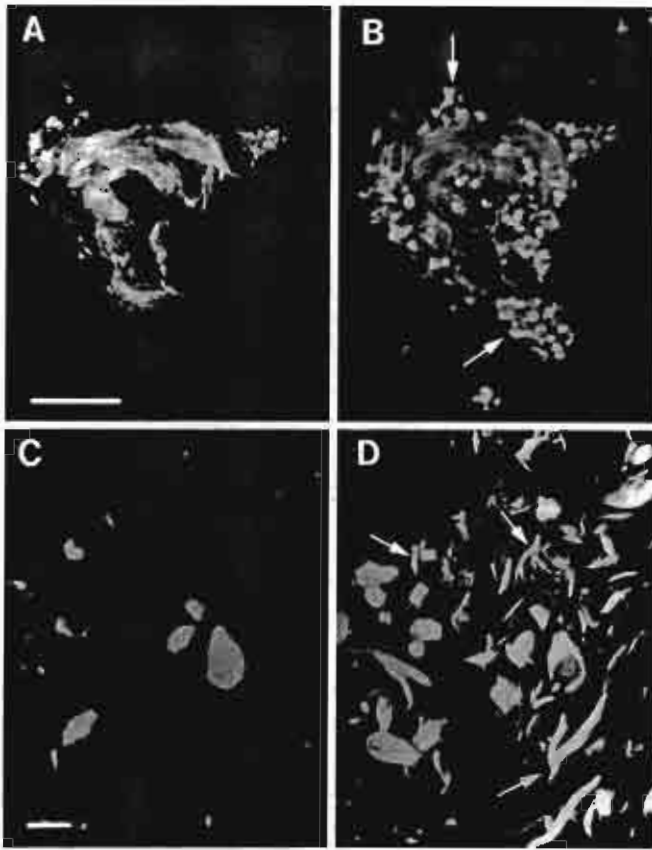


Fig. 4 A–D Double immunolabeling with mAb AT8 and TR. **A, B** mAb AT8-IR NFT detected in the green channel (**A**) is mingled with autofluorescent of lipofuscin deposits fluorescing in the red channel (*arrows* in **B**). **C, D** Some NFTs and dystrophic elements which are detected by TR (*arrows* in **D**) are not immunolabeled with mAb AT8 (**C**). Bars = 10 μ m

mented cases was significantly higher in the subiculum, layer II of the entorhinal cortex, transentorhinal cortex and CA1, when compared with the same regions in non-demented cases (Table 2). Similar differences were found for the density of NCs in layer II of the entorhinal cortex and transentorhinal area. No neuropathological difference between both groups was found in the superior temporal isocortex. These findings support the view that even with substantial cortical involvement, the key to dementia is involvement of the perforant pathway.

I-NFT formation appears to be preceded by accumulation of abnormally phosphorylated tau protein in a non-assembled state [2, 7], suggesting that this process is one of the earliest cytoskeleton abnormalities. Similar IR patterns have been observed in normal non-demented cases using mAb 423 [31], which identifies a truncation at the Glu-931 of the PHF-associated tau protein [35].

TR labeling demonstrated differential states of aggregation of abnormally phosphorylated tau protein in neurons. In particular, the “pre-mature” tangles (Fig. 3 B, C) appear to originate in more than one site in the soma. In later stages, the smaller tangles appear to have fused and form the typical I-NFT (Fig. 3 E). “Pre-mature” tangles may correspond to the group 2 of Braak in which the same

mAb AT8 was employed [7]. The observation of AT8-IR NFTs mingled with the granular deposits of lipofuscin suggests that lipofuscin may contribute to NFT formation (Fig. 4 A, B). AT8-IR was also seen in a perinuclear location in some cells lacking binding sites to TR, suggesting a non-fibrillar state. A previous study has described the presence of tau immunoreactivity inside the nucleus rather than on the outer membrane [9]. It certainly suggests that perinuclear tau accumulation can act as an organizing “center” for the assembly of “pre-mature tangles” that subsequently progress to I-NFTs.

Double labeling with mAb AT8 and TR for extraneuronal NFTs (Fig. 3 H) shows they have lost all AT8-IR, a result of extracellular proteolysis, while they are still detected by TR (a dye with high affinity for β -pleated-sheet assembled structures). Similar results were found in population of dystrophic neurites, also suggesting the extracellular nature (Fig. 4 C, D).

In general, these findings using double labeling confocal microscopy indicate that abnormally phosphorylated tau protein is present in different stages of assembly in both tangles and neurites.

In summary, our study of centenarians shows that the density of neurofibrillary structures in the hippocampus of demented cases was significantly higher than in the non-demented individuals. Strikingly, neurons from the perforant pathway showed the greatest increase in dementia versus non-demented cases. These findings support the view that the dementia of AD marks a clear departure from normal aging even in the oldest old. In addition, our results show that tau deposits in a non-fibrillar state do not correlate significantly with dementia status as tangles do.

Acknowledgements We wish to thank Dr. George Perry for critical reading and editorial comments. This work was supported by a grant from CONACyT-26319M (México) to R. M. For this project F. G.-S. received financial support from CONACyT (México).

References

1. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman B (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631–639
2. Banerjee C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger KA, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal Y, Iqbal K, Wisniewski HM (1988) Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477: 90–99
3. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler D, Davies KL, Perl DP (1995) Neocortical neurofibrillary tangle correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arc Neurol* 52: 81–88
4. Biernat JM, Mandelkow EM, Schröter C, Lichtenberg-Kraus B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermere A, Goedert M, Mandelkow E (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J* 11: 1593–1597

5. Bouras C, Hof PR, Morrison HJ (1993) Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. *Neurosci Lett* 153: 131-135
6. Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison HJ (1994) Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: A quantitative evaluation of one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cereb Cortex* 4: 138-150
7. Braak E, Braak H, Mandelkow EM (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87: 554-567
8. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259
9. Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* 16: 479-486
10. Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G (1995) Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 89: 291-295
11. Crystal HA, Dickson DW, Sliwinski MJ, Lipton RB, Grober E, Marks-Nelson H, Antis P (1993) Pathological markers associated with normal aging and dementia in the elderly. *Ann Neurol* 34: 566-573
12. Delacourte A, Flament S, Dibe EM, Hublau P, Sablonniere B, Hemon B, Scherrer V, DeFossez A (1990) Pathological proteins Tau 64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 80: 111-117
13. Delaère P, He Y, Fayet G, Duyckaerts C, Hauw JJ (1993) β A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol Aging* 14: 191-194
14. Fayet G, Hauw JJ, Delaère P, He Y, Duyckaerts C, Beck H, Forette F, Gallinari C, Laurent M, Mouliras R, Piette F, Sachet A (1994) Neuropathology of 20 centenarians. I. Clinical data. *Rev Neurol (Paris)* 150: 16-21
15. Flament S, DeLacourte A, Hemon B, DeFossez A (1989) Characterization of two pathological tau protein variants in Alzheimer brain cortices. *J Neurol Sci* 92: 133-141
16. Geddes JW, Snowdon DA, Soultanian NS, Tekirian KP, Riley JW, Davis DG, Markesbery WR (1996) Braak stages III-IV of Alzheimer-related neuropathology are associated with mild memory loss, stages V-VI are associated with dementia: findings from the Nun Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 617
17. Giannakopoulos P, Hof PR, Mottier S, Michel JP, Bouras C (1994) Neuropathological changes in the cerebral cortex of 1258 cases from a geriatric hospital: retrospective clinicopathological evaluation of a 10-year autopsy population. *Acta Neuropathol* 87: 456-468
18. Giannakopoulos P, Hof PR, Vallet PG, Giannakopoulos AS, Chamay Y, Bouras C (1995) Quantitative analysis of neuropathological changes in the cerebral cortex of centenarians. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19: 577-592
19. Giannakopoulos P, Hof PR, Giannakopoulos AS, Herrmann FR, Michel JP, Bouras C (1995) Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of very old patients. *Arch Neurol* 52: 1150-1159
20. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lübke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5066-5070
21. Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 189: 167-169
22. Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16: 4491-4500
23. Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41: 17-24
24. Hauw JJ, Vignolo P, Duyckaerts C, Beck H, Forette F, Henry JF, Laurent M, Piette F, Sachet A, Berthaux P (1986) Neuropathological study of 12 centenarians: the incidence of Alzheimer type senile dementia is not particularly increased in this group of very old patients. *Rev Neurol (Paris)* 142: 107-115
25. Itoh Y, Yamada M, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E (1998) An immunohistochemical study of centenarian brains: a comparison. *J Neurol Sci* 157: 73-81
26. Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23: 138-144
27. Kazze AM, Eskin TA, Lapham LW, Gabriel KR, McDaniel KD, Hamill RW (1993) Clinicopathologic correlates in Alzheimer's disease: assessment of clinical and pathologic diagnostic criteria. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 7: 152-164
28. Lee VMY, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251: 675-678
29. Mann DMA, Tucker CM, Yates PO (1987) The topographic distribution of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brains of non-demented persons of different ages. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13: 123-139
30. Mena R, Edwards P, Pérez-Olvera O, Wischik CM (1995) Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 89: 50-56
31. Mena R, Edwards P, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM (1996) Staging the pathological assembly of tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 91: 633-641
32. Morris JC, Storandt M, McKeel DW, Rubin EH, Price JL, Grant EA, Berg L (1996) Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 46: 707-719
33. Mukaetova-Ladinska EB, Harrington CR, Roth M, Wischik CM (1993) Biochemical and anatomical redistribution of tau protein in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 143: 565-578
34. Nagy ZS, Esiri MM, Jobst KA, Morris JH, King EMF, McDonald B, Litchfield S, Smith A, Barnetson L, Smith AD (1995) Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* 6: 21-31
35. Novak M, Kabat J, Wischik CM (1993) Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filaments. *EMBO J* 12: 365-370
36. Pearson RCA, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TPS (1985) Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in AD. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4531-4534
37. Schmitt FA, Wekstein DR, Davies D, Beuscher A, Markesbery WR (1994) Neuropathological findings in cognitively normal older adults. *Neurobiol Aging* 15: S109-S110
38. Tomilson BE, Blessed G, Roth M (1968) Observations on the brains of non-demented old people. *J Neurol Sci* 7: 331-356
39. Vermersch P, David JP, Frigard B, Fallet-Bianco C, Watzet A, Petit H, Delacourte A (1995b) Cortical mapping of Alzheimer pathology in brains of aged non-demented subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19: 1035-1047

L. C. Walker · J. Pahnke · M. Madauss
S. Vogelgesang · A. Pahnke · E. W. Herbst
D. Stausske · R. Walther · C. Kessler · R. W. Warzok

Apolipoprotein E4 promotes the early deposition of A β 42 and then A β 40 in the elderly

Received: 18 June 1999 / Revised: 8 October 1999 / Accepted: 12 October 1999

Abstract The apolipoprotein E ϵ 4 allele (ApoE ϵ 4) is associated with a selective increase in deposition of the 40-amino acid form of the β -amyloid peptide (A β 40) in end-stage Alzheimer's disease. To determine how apoE genotype affects the early events in β -amyloid pathogenesis, we analyzed the medial temporal lobes of 244 elderly persons who were not clinically demented using antibodies selective for the C termini of A β 40 and A β 42. We found that: (1) the number of both A β 42- and A β 40-positive senile plaques increase with age; (2) A β 42 appears at younger ages, and in more amyloid deposits, than does A β 40 in all ApoE groups; (3) when compared at similar ages, older persons with ApoE ϵ 4 are more likely to have A β 42- and A β 40-immunoreactive deposits than are persons without ApoE ϵ 4; (4) A β 40-containing plaques arise at least a decade later than do A β 42 plaques, and are seldom found in the medial temporal lobe of older persons lacking ApoE ϵ 4; and (5) in the absence of overt Alzheimer's disease, cerebral amyloid angiopathy is rare in the elderly, but in our sample was significantly augmented in

ApoE ϵ 4 homozygotes. We conclude that ApoE ϵ 4 hastens the onset of A β 42 deposition in the senescent brain, which in turn fosters the earlier evolution of fibrillar, A β 40-positive plaques, thereby increasing the risk of Alzheimer's disease.

Key words Alzheimer's disease · β -Amyloid peptide · Senile plaques · Neurofibrillary tangles · Apolipoprotein E

Introduction

The apolipoprotein E ϵ 4 allele (ApoE ϵ 4) increases the risk of developing Alzheimer's disease (AD) [4, 5, 6, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 39, 42, 47] by an unknown pathogenic mechanism. ApoE ϵ 4 is associated with greater β -amyloid (A β) deposition in cerebral senile plaques and blood vessels in end-stage AD [20, 22, 23, 26, 43, 45, 49]. The greater plaque load in ApoE ϵ 4 cases is due to an increase in the number of deposits containing the 40-amino acid A β peptide (A β 40), whereas the deposition of the more polymerogenic A β 42 peptide is similar in AD patients with and without the ϵ 4 allele [19, 27, 34, 35]. Previously, we found in a representative population of elderly persons from eastern Germany that ApoE ϵ 4 promotes the deposition of total A β at an earlier age than does ApoE ϵ 3 [52]. In the present study, we sought to determine whether the relative increase in the amount of A β 40 that has been found in end-stage AD is due to a specific effect of ApoE ϵ 4 on the accumulation of A β 40. Our results indicate that the increased A β 40 in ApoE ϵ 4-positive AD cases probably is due to the earlier onset of the cerebral amyloidogenic process in these cases, which begins with the deposition of A β 42.

Patients and methods

Subjects

Two hundred and forty-four subjects from eastern Germany, who had died between the ages of 50 and 93 years (mean ages: males:

L. C. Walker (✉)
Neuroscience Therapeutics,
Parke-Davis Pharmaceutical Research,
Division of Warner-Lambert, 2800 Plymouth Road,
Ann Arbor, MI 48105, USA
e-mail: lary.walker@wl.com,
Tel.: +1-734-6227518, Fax: +1-734-6227178

J. Pahnke · M. Madauss · S. Vogelgesang · A. Pahnke
R. W. Warzok
Department of Neuropathology, University of Greifswald,
Greifswald, Germany

L. C. Walker · C. Kessler
Department of Neurology, University of Greifswald,
Greifswald, Germany

D. Stausske · R. Walther
Department of Biochemistry, University of Greifswald,
Greifswald, Germany

E. W. Herbst
Department of Pathology, Neubrandenburg Clinic,
Neubrandenburg, Germany