

Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer

Teresa García,* David Jay*

Recepción: 29 de enero de 2002

aceptación: 09 de septiembre de 2002

Resumen

Tau forma parte importante del citoesqueleto en neuronas; estabilizando microtúbulos, manteniendo la forma celular y como vía de transporte axonal. Sin embargo, por mecanismos desconocidos, tau sufre modificaciones importantes como son fosforilación anormal debida a la actividad desequilibrada de varias cinasas y fosfatasas, afectando su función biológica normal. Bajo estas circunstancias tau comienza a agregarse originando complejos protéicos denominados desarreglos neurofibrilares (NFTS) que son hallazgos histopatológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer junto con las placas seniles. Esta revisión esta enfocada principalmente a describir la estructura de tau y la participación de diferentes cinasas en su regulación.

Palabras clave: tau, enfermedad de Alzheimer, fosfoliración, cinasas.

Introducción

Tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), que se expresa principalmente en neuronas. La clonación y secuenciación del gen de tau han demostrado que seis isoformas diferentes pueden ser generadas por corte alternativo de un solo gen^{1,2} y están comprendidas en un intervalo de peso molecular aparente de 55 a 70 Kda. Tau participa en el ensamble de monómeros de tubulina dentro de los microtúbulos para dar lugar a la red de microtúbulos neuronales; los cuales contribuyen al mantenimiento de la forma celular y sirven como vía de transporte a través de los axones. Tau también establece vínculos entre microtúbulos y otros elementos del citoesqueleto como los neurofilamentos u otras proteínas como son espectrina y filamentos de actina³ Estudios anteriores demostraron que estas actividades están reguladas en gran parte por el estado de fosforilación de tau,^{4,5} así como por el número de dominios funcionales de unión a tubulina, localizados en el extremo C-terminal, esto último depende del corte alternativo del exon10.^{6,7}

Summary

Tau is an important component of neuronal cytoskeleton; the protein stabilizes microtubules, maintains cell shape and axonal transport mechanisms. However, for unknown reasons tau experiments important postranslation modifications including enhanced phosphorylation due to unbalanced activity between kinases and phosphatases, affecting its normal biological function. Under these circumstances tau begins to aggregate into neurofibrillary tangles (NFTS) complexes which are pathological hallmarks of Alzheimer's disease together with senile plaques. This review is mainly concerned with the role that different kinase play into the regulation of tau structure and function.

Key words: tau, Alzheimer's disease, phosphorylation, kinases.

Junto con el papel fisiológico de tau en el mantenimiento de la estabilidad del citoesqueleto, se sabe que la proteína también está involucrada en la patogénesis de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), caracterizada por la formación de desarreglos ("tangles") neurofibrilares (NFTs) patológicos en áreas específicas del cerebro junto con la formación de placas seniles.

Características de tau

Mediante microscopía electrónica tau parece ser una molécula elongada, con longitud aproximada de 35 nm.⁸ En solución, vista a través de rayos X, tau no presenta una forma bien definida. Como otras proteínas, su molécula es descrita como un polímero desarreglado; en otras palabras, tau en solución parece una proteína desnaturalizada. Tau puede ser tratada con desnaturalizantes (calor, ácidos diluidos) y no perder su actividad biológica. Estudios de espectroscopia mediante dicroísmo circular (CD) no

* Departamento de Biomedicina Cardiovascular. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: David Jay. Juan Badiano No. 1. Col. Sección Dieciséis, Tlalpan. CP 14080. México, D. F. Tel. +52 555573-2911 Ext. 1237. FAX +52 555573-0926. E-mail: gomdav@cardiologia.org.mx y jay@conacyt.mx

proporcionan evidencia alguna de estructura secundaria regular como hélices alfa o láminas beta.

Tau ha sido identificada en varias especies animales incluyendo: *caenorhabditis elegans*,^{9,10} *Drosophila*,^{11,12} goldfish,¹³ roedores,^{14,15} Bovinos,^{16,17} Cabra,¹⁸ mono¹⁶ humano^{19,20} localizada principalmente en neuronas, aunque en células no neuronales se han detectado huellas. En estados patológicos, tau puede expresarse en células de la glia,²¹ también es posible encontrar mRNA y proteína en varios tejidos periféricos como corazón, hígado, pulmón, músculo, páncreas, testículos y fibroblastos.²²⁻²⁴

El gen humano de tau está localizado 100Kb hacia arriba en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición 17q21.

El transcrito primario de tau contiene 16 exones (Figura 1), 3 de éstos (exon 4A, 6 y 8) no están presentes en el cerebro humano, porque son específicos de proteínas tau periféricas. El exon 4A se ha encontrado en tejidos periféricos de bovinos, humanos y roedores con un alto grado de homología. mRNA con exones 6 y 8 no han sido encontrados en humanos. Algunos transcritos con el exon 8 se han encontrado en cerebros de bovinos y monos rhesus.^{17,18}

Cuadro I. Resumen de los sitios de fosforilación de tau

Sitio	Cinasas	notas	Ref.
S46P ^a	ERK2, p38	Identificado sólo por Anticuerpo en PHF	48
T175P ^a	ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Identificado en PHF	48
T181P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3 GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma fetal	47, 48
S185 ^a	p38	Identificado en PHF	48
S199P ^a	TPKI, GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma fetal	48
S202P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38	Identificado en PHF e isoforma fetal	47,48
T205P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38	Identificado por anticuerpos en PHF	47,48
T212P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38	Identificado en PHF	47,48
S214 ^a	Cinasa p110, PKA	Afecta la interacción con microtúbulos. PKA, fosforila sólo la isoforma que contiene 3 de las 4 secuencias repetidas. Sitio implicado en los primeros pasos en la conversión de tau normal a tau en EA	45,49,50,51,52
T217P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma fetal	47, 48
T231P ^a	ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Característica específica de PHF-tau y marcador bioquímico para diagnóstico de EA. La fosforilación de este sitio provoca máxima inhibición de unión a microtúbulos porque se localiza en el primer dominio de unión a éstos. Identificado en PHF e isoforma fetal	46, 48
S235P ^a	ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Característica específica de PHF-tau y marcador bioquímico para diagnóstico de EA. Identificado en PHF e isoforma fetal.	46,48
T245 ^a	p38		48
S262	Cinasa p110, proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina, (CaMPK II), (MAP),	Afecta la interacción con microtúbulos. Sitio localizado en la región RI.	36,45,46
S285		Localizada entre las regiones RI Y R2	3
S305	p38	Localizada entre las regiones R2-R3	48
S324		Situado en la región R3	3
S352		Situado en la región R4	3
S356	JNK, p38	Identificado en PHF	48
S396 Pro ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Sitio localizado en la región R4. Sitio crítico para el ensamble de microtubulos. Identificado en PHF e isoforma fetal.	47,48
S400 ^a	GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma fetal.	48
S404P ^a	TPKII, ERK2, p38, GSK3 β	Sitio crítico para el ensamble de microtúbulos. Identificado en PHF e isoforma fetal.	47,48
S409	PKA	Sitio implicado en las primeras fases de conversión de tau normal a tau en EA	49,50,51,52
S413	GSK3 β		7

^a Sitios localizados fuera de los dominios de unión a microtúbulos.

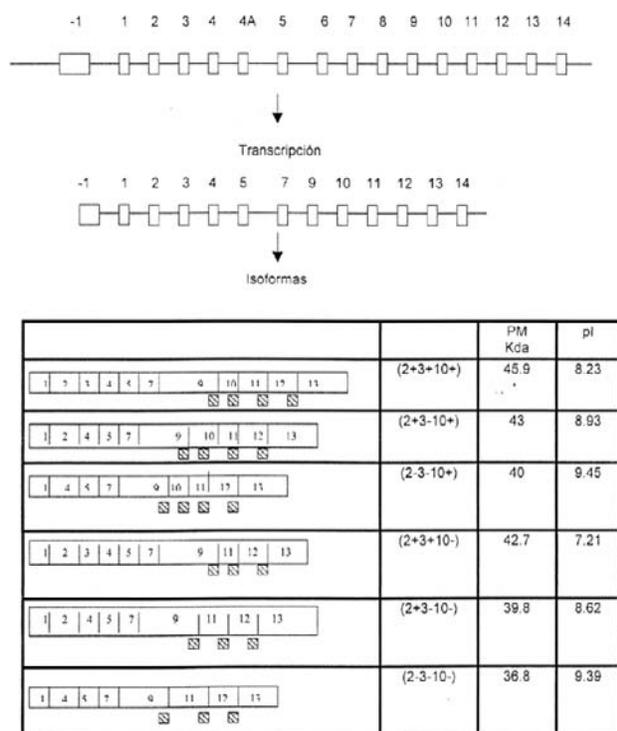


Figura 1. Representación esquemática del gen de tau humano² El exon 2 y 3 codifican una secuencia de 29 a.a.; el exon 10 codifica una secuencia ácida de 31 a.a.: regiones de unión a microtubulos.²⁹ Nomenclatura de acuerdo a Goedert.³⁰ PM - Peso Molecular; pl = Punto Isoeléctrico.

El exon -1 es parte del promotor, es transcrito pero no traducido. Los exones 1,4,5,7,9,11,12 y 13 son exones constitutivos. El exon 14 se encuentra en el mRNA pero no es traducido dentro de la proteína. Los exones 2, 3 y 10 son cortados alternativamente originándose 6 combinaciones diferentes (2-3-10-), (2+3-10-), (2+3+10-), (2-3-10+), (2+3-10+) (2+3+10+) y son específicos del cerebro humano adulto. El exon 3 nunca aparece independiente del exon 2.^{17,19,20}

Las variantes de tau entonces difieren una de otra por la presencia de 3 o 4 regiones repetidas en el extremo C-terminal codificadas por los exones 9-12²⁵ y por la ausencia o presencia de 1 o 2 insertos (29 o 58 a.a.) en el extremo N-terminal codificadas por los exones 2 y 3. Durante el desarrollo del cerebro, la expresión de las isoformas de tau cambia. Una isoforma caracterizada por la ausencia de un inserto en el extremo N-terminal y la presencia de 3 secuencias repetidas en el extremo C-terminal está presente en etapas fetales, mientras que las otras isoformas son expresadas en la edad adulta.^{26,27}

Las dos secuencias de 29 a.a. codificadas por los exones 2 y 3 son altamente ácidas y son seguidas de una región rica en prolina, éstas proporcionan diferentes longitudes al extremo N-terminal de la proteína tau.

El extremo N-terminal es denominado dominio de proyección, porque sobresale de la superficie del microtubulo, mediante lo cual puede interactuar con otros elementos del citoesqueleto y con la membrana plasmática.

Las uniones de tau a los microtúbulos incluyen principalmente las regiones comprendidas entre los a.a 241-304, mientras que la mínima región necesaria para la agregación de tau comprende los residuos 317-335. Estas dos secuencias se deben tomar en cuenta para posibles medidas terapéuticas.²⁸

Fosforilación de tau

En cerebro normal el equilibrio entre fosforilación y defosforilación de tau origina cambios estructurales y conformacionales lo que regula la estabilidad del citoesqueleto y consecuentemente la morfología axonal. Estudios previos han demostrado que el proceso de fosforilación/defosforilación puede controlar no sólo la funcionalidad biológica de tau sino también de otras proteínas que forman parte del citoesqueleto en plaquetas y endotelio como es la filamina (filamina no muscular o ABP-280).³¹⁻³³

Durante el desarrollo de la EA tau comienza a fosforilarse en múltiples sitios (Cuadro I) y se integra dentro de los filamentos helicoidales apareados (PHFs) para dar lugar a los NFTs, perdiendo sus funciones fisiológicas. La hiperfosforilación de tau es el resultado del desequilibrio de la acción de diferentes cinasas y fosfatasa. Las principales cinasas involucradas en las modificaciones de tau y degeneración neuronal han sido divididas en dos grupos: proteínas cinasas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina (P-ST), como son proteína cinasa activadora de mitógenos "mitogen activate protein kinase" (MAP), cinasa 3b de la glicógeno sintetasa "glycogen synthase kinase" 3b (GSK3 b), cinasa tau-tubulina "tau-tubulin kinase", cinasa ciclin-dependiente "cyclin dependent kinase" (cdc2 y cdk5), cinasas activadas por estrés "stress-activated protein kinases" (SAPK) y cinasas que fosforilan motivos distintos a P-ST, las cuales incluyen cinasa reguladora de afinidad a microtúbulos "microtubule-affinity regulating kinase" (MARK), proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II" (CaMPK II), proteína cinasa dependiente de AMP cíclico "cAMP-dependent Protein kinase" (PKA) y cinasa II de la caseína "casein kinase II".³

Los hallazgos de que la proteína cinasa 5 ciclin-dependiente (cdk5), y el activador neuronal p35 intervienen en la vía mediante la cual el péptido beta amiloide provoca muerte neuronal en enfermedades como EA ha generado gran interés en averiguar su mecanismo de acción. Cdk5 es una de las principales cinasas que fosforilan a tau,³⁴

por lo que se le ha llamado cinasa de tau II (TPKII). Cdk5 se encuentra distribuida en varios tejidos y líneas celulares, aunque su actividad primaria se ha identificado en tejido neuronal.

Evidencias recientes indican que el complejo cdk5/p35 participa en el crecimiento axonal normal y en la extensión de procesos neuríticos en neuronas. Además participa en la migración y diferenciación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso. En regiones como el sistema límbico del cerebro maduro puede mantener el potencial plástico neuronal. Cdk5 es importante para la regulación fina de eventos postraduccionales que originan cambios subcelulares en la organización del citoesqueleto. Investigaciones recientes han demostrado que la gran mayoría de cdk5 forma un complejo multimérico de alto peso molecular 60, 200, 400 y 670 Kda, en donde cdk5 está asociada con p35, p25, sinapsina, tau, CK1, b-cateninas y N-cadherinas.^{35,36} Estos hallazgos indican que cdk5 es una proteína multifuncional que asociada a otras proteínas celulares interactúa con el citoesqueleto y forma complejos supramoleculares. Cdk5 contribuye a la fosforilación de tau humana en los residuos S202, T205, 5235 y S404.³⁵

Evidencia reciente apoya la idea de que en la ruta neurodegenerativa, la fosforilación anómala inicial de tau por cdk5 estimula modificaciones en GSK3b.³⁶⁻³⁸

GSK3b es una de las principales cinasas involucradas en la fosforilación aberrante de tau y parece estar implicada en la patología de EA. Esta cinasa interactúa con presenilina PS1 sugiriendo que forma parte del complejo regulatorio de la fosforilación de tau.

La fosforilación de los residuos S214 y S409 por PKA sobre la isoforma que contiene 3 de las 4 secuencias repetitivas, es de particular interés debido a que está implicada en las primeras etapas de la conversión de tau normal a tau en EA.

La S214 se encuentra dentro de la región N-terminal rica en prolina (dominio de unión a microtúbulos), este sitio juega un papel crucial en la dinámica de los microtúbulos, mitosis e interacción con otras MAPs. Durante el desarrollo neuronal la S214 se encuentra principalmente en su forma fosforilada. Una vez que las neuronas se han diferenciado los niveles de fosforilación decrecen y permanecen así hasta que factores desconocidos perturban el sistema y se fosforila nuevamente causando la enfermedad.³⁹

Hallazgos recientes mostraron que miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs) eran capaces de fosforilar a tau *in vitro*, específicamente SAPK1 (c-Jun N-terminal cinasa, JNK), SAPK2a (p38), SAPK2b (p38b), SAPK3 (ERK6) y SAPK4. La activación de SAPKs ocurre en respuesta a múltiples formas de estrés celular (choque osmótico e inhibición de síntesis de proteínas) y por ciertas citocinas proinflamatorias

(interleucina 1 y factor a de necrosis tumoral). SAPKs fosforilan residuos serina y/o treonina precedidos por prolina.⁴⁰

La fosforilación anormal de tau evita la unión de fosfotau a microtúbulos. Estudios han demostrado que Pin-1 puede restaurar la unión de tau a microtúbulos,^{41,42} Pin1 es una proteína nuclear esencial perteneciente a la familia de prolil isomerasas. Pin1 consiste de un dominio catalítico carboxilo-terminal, así como un dominio amino-terminal de interacción proteína-proteína denominado WW, que reconoce específicamente residuos S/T precedidos por residuos de P. Pin1 se une sólo a motivos P-pS/T en tau y copurifica con PHFs, originando un agotamiento de pin1 soluble en el núcleo celular en cerebros de pacientes con EA. *In vitro* Pin1 puede restaurar la habilidad de tau fosforilada de unirse a microtúbulos y promover el ensamble de éstos. Como el agotamiento de Pin1 detiene la mitosis y genera muerte celular y apoptosis, el secuestro de Pin1 dentro de PHFs puede contribuir a la muerte neuronal.⁴¹

De los diferentes motivos P-ST encontradas en la isoforma larga de tau humana, Lu y colaboradores⁴² encontraron que sólo la T231 se requería para la unión con Pin1. Este residuo se localiza por arriba de las regiones de unión a microtúbulos en la sección rica en prolina, la cual es esencial para la completa actividad de tau.

En el contexto de EA no se han reportado mutaciones en la molécula de tau. Sin embargo, diferentes formas mutadas de tau han sido identificadas en otras enfermedades neurodegenerativas como son demencia frontotemporal y Parkinson ligada al cromosoma 17.^{43,44}

La elucidación de los factores moleculares que disparan cambios en la maquinaria neuronal normal, originando neurodegeneración y los mecanismos transduccionales que llevan a la muerte neuronal en la Enfermedad de Alzheimer, contribuirán al entendimiento de las bases patológicas de ésta enfermedad, así como a la aplicación correcta de medidas terapéuticas efectivas.

Este trabajo fue apoyado en parte por el donativo 30558-M de CONACYT otorgado a David Jay

Referencias

1. **Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA.** Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's Disease. *Clin Neurosci.* 1989;3:519-526.
2. **Himmler A.** Structure of the bovine tau gene: Alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 1989;9:1389-1395.
3. **Luc Buée, Thierry Bassière, Valérie Buée-Scherrer.** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Review* 2000;33:95-130.
4. **Lovestone S, Reynolds CH.** The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative process. *Neurosci* 1997;78:309-324.
5. **Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinezek B, Mandelkow E.** Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol. Aging* 1995;16:355-362.

6. **Goedert M, Jakes R.** Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with tau patten in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 1990;9:4225-4230.
7. **Scott CW, Blowera DP, Barth PT, Lo MMST, Salana AI, Capato CB.** Differences in the abilities of human tau isoforms to promote microtubule assembly. *J Neurosci Res* 1991;30:4225-4230.
8. **White H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow EM.** Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 1992;118:573-584.
9. **Goedert MT, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini M, GT Smith M, J, Hill F.** PTL-1 a microtubule-associated protein with tau-like repeats from nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sc* 1996;109:2661-2672.
10. **McDermott J. B, Aamodt S.** p11-1 *Caenorhabditis elegans* gene whose products are homologous to the tau microtubule-associated proteins. *Biochem* 1996;35:9415-9423.
11. **Cambiazio V, Gonzalez MT Maccioni RB.** DMAP-85: a tau like protein from *Drosophila melanogaster* larvae. *J Neurochem* 1995;64:1288-1297.
12. **Irminger-Finger IT Laymond R. A Goldstein LS.** Analysis of the primary sequence and microtubule binding region of the *Drosophila* 205 K MAD. *J Ceil Bol* 1990;111:2563-2572.
13. **Liu YT Xia JT Maa DT Faber D. ST Fischer I.** Tau like proteins in the nervous system of goldfish. *Neurochem Res* 1997;22:1511-1516.
14. **kosik KS, Finch EA.** MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neu rites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* 1987;7:3142-31 53.
15. **Lee GT, Cowan NT, kirshner M.** The primary structure and heterogeneity from mouse brain. *Science* 1988;239:285-288.
16. **Lu QT, kanamury RT, Wood JG.** Abnormal phosphorylation of Tau Associated with Bovine Brain Microtubules: Activation by Excess ATP and Dephosphorylation. *J Neurosci Res* 1994;37:759-768.
17. **Himmler A, Drechsel O, Kirschner MWT, Martin Jr.DW.** Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 1989;9:1389-1396.
18. **Nelson PTT, Stefansson KT, Gulcher J, Saper CB.** Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1996;67:1622-1632.
19. **Goedert MT, Spillantini MGT, Jakes RT, Rutherford DT, Crowther RA.** Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: secueneces and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989;3:519-526.
20. **Goedert MT, Spillantini MGT, Potier MC, Ulrich JT, Crowther RA.** Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 1989;8:393-399.
21. **Chin SS, Goldman JE.** Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:499-508.
22. **Gu YT, Qyama FT, Ihara Y.** Tau is widely expressed in rat tissue. *J Neurochem* 1996;67:1235-1244.
23. **Ingelsson MT, Vanmechelen E, Lannfelt L.** Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett* 1996;220:9-12.
24. **Vanier MT, Neuville PT, Michalik L, Launay JF.** Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cell. *J Cell Sci* 19981:1419-1432.
25. **Lee G, Neve RL, Kosik KS.** The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 1989;2:1615-1624.
26. **Goedert M, Jakes R.** Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 1990;9:4225-4230.
27. **Kosik KS, Orecchio LO, Bakalis ST, Neve RL.** Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 1989;2:389-1397.
28. **Avila J.** Agregation into fibrillar polymers: tau pathies. *FEBS lett* 2000;476 89-92.
29. **Janke C, Beck M.** Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implications for neurodegenerative disorders. *Mol Brain Res* 1999;68:119-128.
30. **Goedert M.** Tau Protein and neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993;16:460-465.
31. **Jay DT, García JE, Lara JE, Medina MA, Ibarra LM.** Determination of a cAMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Site in the C-Terminal Region of Human Endothelial Actin-Binding Protein. *Arch Biochem and Biophys* 2000;377:80-84.
32. **Jay O, Stracher A.** *Biochem Biophys Res Comun.* 1994;202:764-771.
33. **Jay O, Stracher A.** *Biochem Biophys Res Comun.* 1997;232:555-558.
34. **Maccioni BR.** *Cdk5. Eur J Biochem* 2001;268 1517.
35. **Morgan OO.** Cyclin-dependent kinase: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev* 1997;13:262-291.
36. **Alvarez A, Toro R, Cáceres A, Maccioni RB.** Inhibition of tau phosphorylation protein kinase Cdk5 prevents beta-amyloid induced neuronal death. *FEBS Lett* 1999;459: 421426.
37. **Sengupta A, Wu O.** Grundke-Iqbal, Iqbal K, and Singh T. Alzheimer-Like phosphorylation of human tau by Cdk5. *Moll Cell Biochem* 1997;167:99-105.
38. **Alvarez G, Muñoz J, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, and Olaz-Nido J.** Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 1999;453:260-264.
39. **Ihara Y, Nikina N, Miura R, Ogawara M.** Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J biochem* 1986;99:1807-1810.
40. **Jenkis SM, Zinnerman M, Gamber C, Johnson GVW.** Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J* 2000;345:263-270.
41. **Goedert M.** Pinning down phosphorylated tau. *Nature* 1999;399:739-740.
42. **Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP.** The prolyl isomerase Pin 1 restore the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 1999;399:784-788.
43. **Spillantini MG, Goedert M.** Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1998;21:428-433.
44. **Delacourte A.** Biochemical and molecular characterization of neurofibrillary degeneration in frontotemporal dementias. *Dement Geriatr Cogn Disod* 1999;10:75-79.
45. **Mass T, Eidenmuller J, Brandt R.** Interaction of Tau with the Neural Membrane Cortex Is Regulated by Phosphorylation at Sites That Are Modified in Paired Helical Filaments. *J Biol Chem* 2000;275:15733-15740.
46. **Daly LN, Hoffmann R, Otvos LJr, Craik OJ.** Role of phosphorylation in the Conformation of t Peptides Implicated in Alzheimer's Disease. *Bioch* 2000;39:9039-9046.
47. **Evans OB, Rank KB, Bhattachayra K, Thomsen OR, Gurney ME, Sharma SK.** Tau Phosphorylation at Serme 396 and Serme 404 by Human Recombinant Tau Protein kinase II Inhibits Tau's Ability to Promote Microtubule Assembly 2000;32:24977-24983.
48. **Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Andeson BH.** Phosphorylation Sites on Tau Identifies by Nanoelectrospray Mass Spectrometry: Differences *in Vitro* Between the Mitogen-Activated Protein Kinase ERK2. c-Jun N-Terminal Kinase and p38, and Glycogen Synthase Kinase-3b. *J Neuroch* 2000;74:1587-1595.
49. **Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P.** cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in AD. *J Neurosci* 1999;19:7486-7494.
50. **Illenberg S, Zheng-Fischhofer O, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Goemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E.** The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cell: Implications for AD. *Mol Biol Cell* 1998;9:1495-1512.
51. **Scott CW, Spreen RC, Herman JL, Chow FP, Davison MO, Young J, Caputo CB.** Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Bio Chem* 1993;268:1166-1173.
52. **Brandt R, Lee G, Teplow OB, Shaalloway O, Adbel-Ghany M.** Oofferential effect of phosphorylation and substrate modulations on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation. *J Biol Chem* 1994;269:11776-11782.

