



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 267 773**

⑤1 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01936609 .5**
⑧6 Fecha de presentación : **18.05.2001**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1280404**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **05.02.2003**

⑤4 Título: **Módulo de enfermedad neurodegenerativa.**

③0 Prioridad: **18.05.2000 GB 0012056**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

⑦3 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 113
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid**

⑦2 Inventor/es: **Hernández Pérez, Félix;
Ávila de Grado, Jesús y
Lucas Lozano, José Javier**

⑦4 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modelo de enfermedad neurodegenerativa.

5 La presente invención se refiere a modelos animales para enfermedad neurodegenerativa, en particular para la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común en los países desarrollados, y se caracteriza por la pérdida de memoria progresiva y trastornos en el lenguaje y el comportamiento que conducen en última instancia hasta la muerte (Alzheimer, 1911; Yankner, 1996). El deterioro cognitivo en la EA está acompañado por la pérdida y atrofia neuronal principalmente en la corteza, hipocampo y núcleo amigdalino (Gómez-Isla *et al.*, 1997). Además del modelo específico de la muerte de células neuronales, la EA se caracteriza por dos características neuropatológicas, placas seniles y marañas neurofibrilares (MNF).

Las placas seniles son depósitos extracelulares de fibrillas amiloides compuestas por el péptido β -amiloide (AB) de 39-43 aminoácidos a menudo rodeadas de axones distróficos (Glenner y Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985; Selkoe, 1994).

20 Las MNF son agregados generados intraneuronalmente de filamentos helicoidales apareados (FHA) que se ensamblan a partir de formas hiperfosforiladas de la proteína asociada al microtúbulo tau (Grennberg *et al.*, 1992; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1991; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Las MNF pueden encontrarse en todas las regiones del cerebro que experimentan degeneración en la EA y su patrón espacio-temporal de aparición se correlaciona bien con el de muerte celular y sintomatología (Arriagada *et al.*, 1992; Braak y Braak, 1991; Gómez-Isla *et al.*, 1997).

El conocimiento molecular de la patogénesis de la EA ha surgido de estudios genéticos en familias afectadas por las formas hereditarias de EA (EAF). Éstos explican sólo un pequeño porcentaje de los casos de EA pero han permitido la identificación de mutaciones en tres genes diferentes que son responsables de desencadenar la enfermedad. Estos genes son las presenilinas 1 y 2 (PS-1 y PS-2) y la proteína precursora del amiloide (PPA) (Hardy, 1996). Las mutaciones en la PPA dan como resultado un aumento de la producción de $A\beta$ (Price y Sisodia, 1998) mientras que las mutaciones de PS-1 y PS-2 favorecen el procesamiento de PPA dentro de la forma larga y más amiloidogénica de $A\beta$ ($A\beta_{42}$) (Citron *et al.*, 1997; Duff *et al.*, 1996; Price y Sisodia, 1998; Schmeuer *et al.*, 1996). Esta evidencia genética junto con los estudios *in vitro* e *in vivo* de $A\beta$ indujeron el punto de neurotoxicidad para la formación de $A\beta$ y/o la agregación como un acontecimiento clave en el desencadenamiento de la EA.

Se conoce poco acerca de los efectores intracelulares aguas abajo que explican la disfunción neuronal, aunque se ha propuesto la activación de la glucógeno sintasa cinasa- 3β (GSK- 3β).

40 La GSK- 3β es una serina/treonina cinasa dirigida a prolina que se identificó originalmente debido a su papel en la regulación del metabolismo de glucógeno y que es la más abundante en el SNC (Woodgett, 1990). Aparte de estar implicada en la transducción de señales mediada por la insulina y el IGF-1, la GSK- 3β también está involucrada en la ruta de señalización wnt/wingless como una enzima clave que regula la estabilidad de la β -catenina y, como consecuencia, su translocación hacia el núcleo y su actividad transcripcional (Anderton, 1999; Earth *et al.*, 1997).

45 La GSK- 3β es una de las mejores enzimas candidatas para generar la tau hiperfosforilada que es característica de los FHA (Lovestone y Reynolds, 1997). La GSK- 3β puede purificarse a partir de los microtúbulos (Ishiguro *et al.*, 1988) y ha demostrado fosforilar a tau en la mayoría de los sitios hiperfosforilados en los FHA tanto en células transfectadas (Lovestone *et al.*, 1994) como *in vivo* (Hong *et al.*, 1997; Muñoz-Montano *et al.*, 1997).

50 Además, la GSK- 3β se acumula en el citoplasma de neuronas en estado previo a la maraña y su distribución en cerebros en fase de cambios neurofibrilares de la EA coincide con la secuencia del desarrollo de estos cambios (Pei *et al.*, 1999; Shiurba *et al.*, 1996).

55 Se ha demostrado que la exposición de cultivos neuronales primarios del hipocampo y la corteza a $A\beta$ induce la activación de la GSK- 3β (Takashima *et al.*, 1996) la hiperfosforilación de tau (Busciglio *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 1997; Takashima *et al.*, 1998) y muerte celular (Busciglio *et al.*, 1995; Estus *et al.*, 1997; Forloni *et al.*, 1993; Loo *et al.*, 1993; Pike *et al.*, 1991; Takashima *et al.*, 1993). El bloqueo de la actividad o la expresión de la GSK- 3β o bien mediante oligonucleótidos antisentido o bien mediante litio, evita la neurodegeneración inducida por $A\beta$ de cultivos primarios del hipocampo y de la corteza (Álvarez *et al.*, 1999; Takashima *et al.*, 1993).

60 La PS-1 ha demostrado unirse directamente a GSK- 3β y tau en experimentos de inmunoprecipitación conjunta de muestras de cerebro humano (Takashima *et al.*, 1998). Por tanto, la capacidad de PS-1 para llevar a GSK- 3β y tau en proximidad cercana sugiere que la PS-1 puede regular la fosforilación de tau mediante GSK- 3β . Las formas mutantes de PS-1 en experimentos de transfección dan como resultado un aumento de la asociación de PS-1/GSK- 3β y un aumento de la fosforilación de tau (Takashima *et al.*, 1998). Además, PS-1 también ha demostrado formar un complejo con el sustrato de GSK- 3β , β -catenina en células transfectadas (Murayama *et al.*, 1998) e *in vivo* (Yu

et al., 1998; Zhang *et al.*, 1998) y esta interacción aumenta la estabilidad de la β -catenina (Zhang *et al.*, 1998). Las mutaciones de PS-1 patogénicas reducen la capacidad de PS-1 para estabilizar la β -catenina, que a su vez da como resultado una disminución de los niveles de β -catenina en pacientes con EA con mutaciones de PS-1 (Zhang *et al.*, 1998).

Bronnless *et al.*, (1997) describen ratones transgénicos que expresan la GSK-3 β bajo el control de promotores MSV o NF-L. Observan que la sobreexpresión de GSK-3 β puede ser letal *in vivo* y que no se encuentra aumento en la expresión de GSK-3 β en sus ratones transgénicos.

Mayford *et al.*, (1996) describen el uso del sistema del transactivador de la tetraciclina (tTA) bajo el control del promotor de CamKII α para expresar el gen CamKII α en ratones con la administración de doxiciclina.

Objeto de esta invención

Existe la necesidad de modelos animales que simulen estrechamente la patología de enfermedades neurodegenerativas tales como EA, que son vitales para el entendimiento de la enfermedad y la prueba de nuevas terapias.

La presente invención expone un enfoque de este problema de modelos animales.

Resumen de la invención

La invención proporciona un animal transgénico no humano, en el que la proteína GSK-3 β se sobreexpresa en el animal, en el que la expresión de la proteína GSK-3 β está bajo el control del sistema de expresión condicional regulado por tet (tetraciclina), que tiene un transgén de tTA bajo el control del promotor de CamKII α , de tal modo que se encuentra un aumento de los niveles de fosforilación de tau en el hipocampo pero no en la corteza ni el cuerpo estriado.

Realizaciones preferidas

Preferiblemente, la GSK-3 β es la única enzima que se sobreexpresa y en efecto se prefiere más que la GSK-3 β sea la única proteína que se sobreexpresa.

Sorprendentemente, la sobreexpresión de la proteína GSK-3 β sola produce una patología en el animal transgénico que simula estrechamente la EA. Específicamente, la sobreexpresión de GSK-3 β da como resultado una disminución de los niveles de β -catenina nuclear, un aumento de la fosforilación de la proteína tau, muerte de las células neuronales, microgliosis y astocitosis reactivas. La patología similar de modelo transgénico y el estado de la enfermedad natural hacen el modelo de la presente invención altamente valioso para análisis de la enfermedad.

Preferiblemente, el animal utilizado en los estudios es un mamífero, tal como un ratón, rata o primate. Otros animales adecuados para el uso en estudios transgénicos se conocen bien en la técnica.

La invención también proporciona el uso de un animal transgénico tal como se describió según un modelo para la enfermedad de Alzheimer.

El modelo animal de la invención es útil en las pruebas de nuevos fármacos o terapias para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como la EA. Por eso, la invención se extiende a un método de identificación de una terapia útil en el tratamiento de la EA, que comprende administrar la terapia al animal transgénico de la invención y monitorizar un efecto sobre la patología o el comportamiento.

Realizaciones detalladas de la invención

Se emplea un sistema regulado por tet en ratones. El sistema regulado por tet se ha usado para la expresión génica condicional en sistemas de células eucariotas y ratones (Gingrich y Roder, 1998). Usando este sistema para conducir la expresión transgénica de una forma mutada de huntingtina, se ha generado recientemente el primer modelo animal condicional de una enfermedad neurodegenerativa (Yamamoto *et al.*, 2000). El sistema regulado por tet puede ser particularmente útil si simulan las condiciones patológicas ya que puede usarse para salvar la mortalidad perinatal debido a la toxicidad del transgén, desencadenar la expresión del transgén sólo en la vida adulta, y detener la expresión del transgén una vez hayan tenido lugar los cambios fenotípicos relevantes (Kelz *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000).

La regulación del sistema se consigue a través del transactivador regulado por tetraciclina (tTA), una proteína química que comprende el dominio de unión al ADN represor de tet y el dominio de transactivación de VP16 (Gossen y Bujard, 1992). Esta proteína se une específicamente a la secuencia del operador tetO e induce la transcripción de un promotor mínimo de CMV adyacente. Por eso la combinación de tanto la tTA como los elementos de tetO permite la transactivación continua de un transgén dado. La tetraciclina y sus análogos pueden unirse a tTA. Cuando esto ocurre, se impide la unión de tTA a tetO, y se inhibe la transcripción.

De esta manera, se han producido ratones transgénicos condicionales que sobreexpresan GSK-3 β en el cerebro durante la edad adulta mientras se evita la mortalidad perinatal debido a la expresión del transgén embrionario. Es-

tos ratones muestran desestabilización de β -catenina e hiperfosforilación de tau en neuronas del hipocampo, dando como resultado esto último la localización somatodendrítica de tau similar al estado previo a la maraña. Las neuronas que manifiestan localización somatodendrítica de tau muestran a menudo morfologías anómalas y separación del neuropilo circundante. La microgliosis y la astrocitosis reactivas fueron indicativas del estrés y la muerte neuronal. Este hallazgo se confirmó además mediante la tinción de TUNEL de células granulares de la circunvolución dentada. La sobreexpresión de GSK-3 β en la corteza y el hipocampo conduce a una disminución de los niveles de β -catenina nuclear, un aumento de la fosforilación de tau en epítomos relevantes de la EA, muerte de las células neuronales, y microgliosis y astrocitosis reactivas. Por tanto los resultados demuestran que la sobreexpresión *in vivo* de GSK-3 β da como resultado la neurodegeneración y sugieren que estos ratones pueden utilizarse como un modelo animal para estudiar la relevancia de la desregulación de GSK-3 β para la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo del trabajo experimental.

Generación del fragmento de inyección

Se utilizó para la microinyección un fragmento Ase I de 8,0 kb (BitetO). Para generar BitetO se escindió un fragmento Hind III de 1,5 kb correspondiente al ADNc de GSK-3 β de *Xenopus* con un epítipo MYC N-terminal, de un plásmido pADNc3-GSK-3 (Sánchez *et al.*, 2000). Se subclonó este fragmento en el vector de clonación pCRII (Invitrogen) digerido con Hind III. Se probó la orientación correcta mediante la digestión con Xho I. Entonces se escindió un fragmento de 1,5 kb mediante la digestión con Nsi I-Not I y se subclonó en los sitios Pst I-Not I de un plásmido que contiene una secuencia de tetO bidireccional flanqueada por promotores mínimos de citomegalovirus (CMV) con secuencias indicadoras de lacZ (pBI-3, (Baron *et al.*, 1995)). Por último, se microinyectó el fragmento Ase I BitetO de 8,0 kb dentro de embriones CBAXC57BL/6 de una única célula. Se identificaron los ratones fundadores mediante PCR y se confirmaron mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Southern. Entonces se cruzaron los ratones fundadores con ratones CBAXC57BL/6 de tipo natural y se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Southern sobre la progenie F1 para probar los acontecimientos de inserción múltiple del fragmento de microinyección. Todos los ratones indicados en el presente documento resultaron de un acontecimiento de integración única (no se muestran los datos).

Transfección de células COS

Se mantuvieron células COS-7 en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL) complementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades ml⁻¹ y estreptomicina 100 μ g ml⁻¹ y se incubaron en un 95% de aire/5% de CO₂ en una incubadora humidificada a 37°C. Se transfectaron de manera transitoria las células en una confluencia del 50-70% en placas de 35 mm de diámetro con LipofectAMINE (Gibco BRL)/5 μ g de ADN según las recomendaciones del fabricante. Se recogieron las células y se analizaron 48 h después de la transfección.

Animales

Se criaron ratones en la instalación para animales del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se enjaularon los ratones, 4 por jaula con alimentos y agua disponibles *ad libitum* (a voluntad) y se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada en un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas con el comienzo de la luz a las 07:00 horas.

Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-tau: 7.51 (Novak *et al.*, 1991) (un amable obsequio del Dr. C. Wischik, MRC, Cambridge, RU), PHF-1 (Greenberg *et al.*, 1992; Otvos *et al.*, 1994) (un amable obsequio del Dr. P. Davies, Albert Einstein Coll., Bronx, NY, EE.UU.), 12E8 (Seubert *et al.*, 1995) (un amable obsequio del Dr. P. Seubert, Athena, San Francisco, CA, EE.UU.), AD2 (Buee-Scherrer *et al.*, 1996) (un amable obsequio del Dr. C. Mourton-Gilles, Montpellier, Francia). Según el residuo que numera la isoforma de tau humana más larga de 441 aminoácidos (Goedert *et al.*, 1989), el anticuerpo 12E8 reacciona con tau cuando la serina 262 está fosforilada (Seubert *et al.*, 1995). Los anticuerpos PHF-1 y AD2 reconocen a tau cuando las serinas 396 y 404 están fosforiladas (Buee-Scherrer *et al.*, 1996; Otvos *et al.*, 1994). Otros anticuerpos monoclonales fueron: anti-GSK3- β (Transduction Laboratories), anti- β -catenina (Transduction Laboratories), anti- β -tubulina (Sigma), anti- β -galactosidasa (Promega), anti-myc (Developmental Studies Hybridoma Bank (Banco de hibridomas de estudios de desarrollo), Iowa, EE.UU.), anti-GFAP (PharMingen, CA, EE.UU.), OX42 (un amable obsequio de la Dra. P. Bovolenta, Instituto Cajal, España), ED1 (Serotec; RU). El anticuerpo producido frente a la proteína nuclear U⁷³snRNP fue donada amablemente por el Dr. J. Ortin (CNB, Madrid, España).

Inmunohistoquímica

Se anestesiaron profundamente los ratones con pentotal y se perfundieron de manera transcardíaca con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M durante 10 min. Se fijaron posteriormente los cerebros en paraformaldehído al 4% durante dos horas a temperatura ambiente y se pusieron en sacarosa al 30% en PBS durante 48 horas a 4°C. Se cortaron secciones sagitales (30 μ m) en un micrótopo de congelación y se recogieron en PBS. Se trataron previamente

te las secciones de flotación libre con H₂O₂ al 0,3% en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios: PHF-1 (1/150), AD-2 (1/2000), anti-myc (1/20), anti-GSK-3 β (1/500), anti- β -galactosidasa (1/5000), anti-GFAP (1/250), OX42 (1/1000) en PBS que contenía Triton X-100 al 0,2%, suero normal de cabra al 10% (GmCO) y BSA al 1% (Boehringer-Mannheim). Después de tres lavados con PBS, se llevaron las secciones a través de protocolos de inmunohistoquímica con avidina-biotina habituales utilizando un kit Elite Vectastain (Vector Laboratories). Se realizó la reacción de cromógeno con diaminobencidina (Sigma) y H₂O₂ al 0,003% durante diez minutos. Se montaron las secciones sobre portaobjetos recubiertos con cromalum y se taparon con cubreobjetos con Aqua-PolyMount (Polysciences). La omisión del anticuerpo primario dio como resultado la ausencia de marcaje.

10 Tinción de lacZ

La tinción de lacZ se realizó tal como sigue. Se fijaron posteriormente las secciones frescas congeladas durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% en tampón de Soren. Los portaobjetos se incubaron entonces durante 1 hora a 30°C en la disolución de tinción de lacZ (X-gal (4-cloro-5-bromo-3-indolil- β -galactosidasa, Boehringer-Mannheim) 1 mg/ml, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM y MgCl₂ 2 mM en PBS). Tras la tinción, se aclararon las secciones y se montaron secas.

Ensayo de túnel

20 Se detectó fragmentación de ADN característica de la apoptosis mediante el método TUNEL en cerebros fijados posteriormente en paraformaldehído. Se realizó la tinción de TUNEL de las secciones de vibratomo siguiendo las instrucciones del fabricante (*In situ* Cell Death Detection (detección de la muerte celular *in situ*), POD; Boehringer-Mannheim). Se utilizó el tratamiento con la ADNasa I como un control positivo.

25 Fraccionamiento subcelular

Se lavaron tejidos con solución salina tamponada de fosfato enfriada con hielo y se homogeneizaron en un tampón hipotónico (sacarosa 0,25 M, HEPES 20 mM, pH 7,4, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y pepstatina 10 μ g/ml) para preparar extractos citosólicos y de membrana. Se clarificó el homogeneizado (la fracción celular total) mediante centrifugación a 850 $\times$ g durante 15 min. a 4°C; el sobrenadante resultante se centrifugó entonces a 100.000 $\times$ g durante 1 h a 4°C para aislar la fracción de membrana como un sedimento y la fracción citoplasmática como el sobrenadante.

Se sedimentaron los núcleos cerebrales a través de un amortiguador de sacarosa 2 M. Se homogeneizaron las áreas cerebrales de tres animales en sacarosa 0,32 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, MgCl₂ 3 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 al 0,1%, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y pepstatina 10 μ g/ml utilizando un homogeneizador Potter provisto de una mano de mortero de teflón de ajuste holgado. Se filtró el homogeneizado a través de una estopilla y se centrifugó durante 10 min. a 1000 $\times$ g. Se resuspendió el sedimento en 3 ml de medio de homogeneización sin Triton y complementado con sacarosa 1,9 M. Se dispuso en capas esta preparación sobre un amortiguador de sacarosa 2 M (10 ml) y se centrifugó a 12.000 $\times$ g en un rotor HB4 (Sorvall). Se resuspendió el sedimento en 0,5 ml de sacarosa 0,32 M. Se evaluó la pureza de los núcleos cerebrales mediante microscopía óptica tras la tinción de cristal violeta. Además se utilizó U2snRNP, una proteína nuclear conocida, como un marcador nuclear en análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

45 Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se diseccionaron rápidamente los cerebros sobre una placa enfriada con hielo. Se prepararon extractos para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western homogeneizando las áreas cerebrales en tampón de extracción enfriado con hielo que consistía en HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, NaP 20 mM, Triton X-100 al 1%, ortovanadato de sodio 1 mM, EDTA 5 mM, e inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml y pepstatina 10 μ g/ml). Se homogeneizaron las muestras y se centrifugaron a 15.000 g durante 20 min. a 4°C. Se recogió el sobrenadante resultante, y se determinó el contenido en proteína mediante Bradford. Se sometieron a electroforesis treinta microgramos de proteína total sobre gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell). Se realizaron los experimentos utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales primarios: anti-GSK3 β (1/2000), PHF-1 (1/200), AD2 (1/2000), 12E8 (1/200), 7.51 (1/100), anti-MYC (1/100), anti- β -tubulina (1/5000), anti- β -galactosidasa (1/5000). Se incubaron los filtros con el anticuerpo a 4°C durante la noche en un 5% de leche desnatada en polvo. Se utilizaron un anticuerpo de cabra anti-ratón secundario (1/5000; Gmco) y reactivos de detección ECL (Amersham) para la inmunodetección. Se realizó la cuantificación de la inmunorreactividad mediante barrido densitométrico. Se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba de t de Student.

Procesamiento de tejidos para microscopia electrónica

Para la microscopia electrónica se utilizaron secciones de vibratomo. Una vez se inmunotñeron, se fijaron posteriormente las secciones en OsO₄ al 2% durante 1 h, se deshidrataron, se incluyeron en Araldite y se montaron en plano en portaobjetos recubiertos con Formvar, utilizando cubreobjetos de plástico. Tras la polimerización, se fotografiaron las áreas seleccionadas, se recortaron, se volvieron a incluir en Araldite y se volvieron a seccionar en 1 μ m. Se volvieron a fotografiar estas secciones semifinas y se volvieron a seccionar en secciones ultrafinas. Se observaron

las secciones ultrafinas en un microscopio electrónico Jeol, sin tinción con metales pesados para evitar precipitados de artefactos.

Figuras

5

Figura 1. Diseño de ratón. A, representación esquemática del constructo BitetO. Éste consiste en siete copias de la secuencia del operador tet palindrómica flanqueada por dos secuencias del promotor de CMV en orientaciones divergentes. Este promotor bidireccional va seguido de una secuencia de ADNc de GSK-3 β (que codifica para un epítipo de MYC en su extremo 5') en una dirección y una secuencia de β -galactosidasa (LacZ) que incluye una señal de localización nuclear (SLN) en la otra. B, las células COS se cotransfectaron con el plásmido que contiene el constructo BitetO y un vector de expresión que codifica para la tau humana (carriles 1 a 6), se añadió un tercer plásmido que permite la expresión de tTA (carriles 3 a 6) o bien en ausencia (carriles 3 y 4) o en presencia (carriles 5 y 6) de tetraciclina 1 μ g/ml en el medio de cultivo. Se trataron con sonda los extractos de proteínas con anticuerpos frente a GSK-3 β , tau fosforilada similar a EA (PHF-1), tau total (7.51) y β -galactosidasa (β -Gal). C, se generaron ratones Tet/GSK-3 β mediante cruzamiento de ratones que expresan tTA bajo control del promotor de CarnKIIa (tTA) con ratones que han incorporado el constructo BidetO en sus genomas (TetO). Se espera que la progenie transgénica doble (Tet/GSK-3 β) exprese GSK-3 β de manera constitutiva en el cerebro a menos que se administren por vía oral tetraciclina o análogos que eviten por tanto la transactivación por tTA.

10

15

20

Figura 2. Patrón de expresión del transgén en ratones Tet/GSK-3 β . A-B, tinción con X-gal de secciones sagitales de cerebro de ratones PO Tet/GSK-3 β que o bien no tuvieron tratamiento previo con el fármaco (A) o nacieron después de administrar doxiciclina a la madre durante cinco días inmediatamente antes del nacimiento (B). C-E, la inmunohistoquímica de β -galactosidasa en secciones sagitales de cerebro de ratones Tet/GSK-3 β adultos (3 meses) revela la expresión en capas neuronales diferentes de la corteza (C), el hipocampo (D), y en el cuerpo estriado (E). H, hipocampo; Cx, corteza; St, cuerpo estriado; 11-VI, capas de corteza; cc, cuerpo calloso; DG, circunvolución dentada, Hil; hilio; GP, globus pallidus. La barra de escala en B corresponde a 1 mm en A-B. La barra de escala en E corresponde a 200 μ m en C-E.

25

30

Figura 3. Sobreexpresión de GSK-3 β en la corteza e hipocampo de ratones Tet/GSK-3 β . A, inmunotransferencia tipo Western de extractos de proteínas de la corteza (carriles 1 y 2), cerebelo (carriles 3 y 4), e hipocampo (carriles 5 y 6) de ratones de tipo natural (carriles 1, 3 y 5) o Tet/GSK-3 β (carriles 2, 4 y 6). B, histograma que muestra el aumento en porcentaje de los niveles de GSK-3 β en ratones Tet/GSK-3 β . C-E, inmunohistoquímica en secciones de corteza de ratones de tipo natural (C) o Tet/GSK-3 β (D y E); realizada con anticuerpos frente a GSK-3 β (C y D) o MYC (E). F-H, inmunohistoquímica en secciones de hipocampo de ratones de tipo natural (F) o Tet/GSK-3 β (G y H); realizada con un anticuerpo frente a GSK-3 β (F y G) o MYC (H). I-K, se muestra en F-H un aumento de gran potencia de las circunvoluciones dentadas. La barra de escala corresponde a 100 μ m en C-E, 200 μ m en F-H, 60 μ m en I-I, y 40 μ m en K.

35

40

Figura 4. Efecto de la sobreexpresión de GSK-3 β sobre los niveles de β -catenina y la fosforilación de tau. A, inmunotransferencia de tipo Western de preparaciones celulares totales, de membrana, citosólicas y nucleares de la corteza (Cx) e hipocampo (Hipp) de ratones tipo natural (Wt) o Tet/GSK-3 β tratados con sonda con anticuerpo anti- β -catenina. B, inmunotransferencia de tipo Western de extractos de proteínas de la corteza (Cx), del cerebelo (Cb), e hipocampo (Hipp) de ratones de tipo natural (Wt) o Tet/GSK-3 β tratados con sonda con anticuerpos PHF-1 y β -tubulina. C, inmunotransferencia de tipo Western de extractos del hipocampo de ratones de tipo natural (Wt), tTA, TetO, o Tet/GSK-3 β tratados con sonda con los anticuerpos indicados.

45

50

Figura 5. Localización somatodendrítica de tau en ratones Tet/GSK-3 β . A-D, inmunohistoquímica con PHF-1 en la circunvolución dentada de ratones de tipo natural (A y B) o Tet/GSK-3 β (C y D). E-F, inmunohistoquímica realizada con anticuerpo 7.51 en la circunvolución dentada de ratones de tipo natural (E) o Tet/GSK-3 β (F). La flecha en B indica las fibras musgosas débilmente teñidas. El recuadro en C muestra el aumento superior de una célula granular inmunoteñida con PHF-1. La barra de escala corresponde a 200 μ m en A-D, y 60 μ m en E-F.

55

60

Figura 6. Estudio de microscopía electrónica de neuronas positivas a PHF-1. A, micrografía electrónica de dos neuronas de la circunvolución dentada del hipocampo del ratón Tet/GSK-3 β . N1: núcleo de una neurona inmunopositiva a PHF-1 que muestra la mayoría de su perímetro separado del neurópilo circundante (puntas de flecha), además de la inmunotinción citoplasmática difusa. N2: núcleo de una neurona inmunonegativa a PHF-1. B, otra neurona inmunopositiva a PHF-1 de la circunvolución dentada del mismo ratón que 4A que muestra el producto de reacción con PHF-1 en pequeñas extensiones y asociada con el retículo endoplasmático rugoso. N: núcleo no marcado. C, aumento alto de la porción enmarcada en la figura 4B, que muestra las pequeñas extensiones del producto de reacción (flechas) y el marcaje del retículo endoplasmático rugoso. No se realizó ninguna tinción con metales pesados.

La barra de calibración corresponde a 0,5 μ m en todos los paneles.

65

Figura 7. Muerte neuronal y gliosis reactiva en ratones Tet/GSK-3 β . A-B, tinción de TUNEL de la circunvolución dentada de ratones de tipo natural o Tet/GSK-3 β . Las flechas indican los núcleos positivos a TUNEL. C-D, inmunohistoquímica con GFAP en la circunvolución dentada de ratones de tipo natural (C) o Tet/GSK-3 β (D). E, micrografía electrónica de la circunvolución dentada del hipocampo de ratón Tet/GSK-3 β que muestra un proceso astrocítico hipertrófico que rodea una neurona inmunoteñida con PHF-1. N: núcleo. Asterisco: inmunotinción citoplasmática difusa.

Estrella negra: proceso astrocítico hipertrófico. Recuadro: aumento alto del proceso astrocítico que muestra haces característicos de filamentos intermedios gliales. F, inmunotinción con OX-42 de la circunvolución dentada de un ratón Tet/GSK-3 β . Las flechas indican procesos microgliales inmunorreactivos finos. Las puntas de flecha indican los cuerpos celulares reactivos inmunoteñidos. SM, estrato molecular; SG, estrato granular; H, hilio. Las barras de escala corresponden a 50 μ m en A-B, 60 μ m en C-D, 0,5 μ m en E y 30 μ m en F.

Construcción del ratón

Se generó un plásmido (BitetO) llevando el promotor sensible a tet bidireccional (Baron *et al.*, 1995) seguido de tanto un ADNc de GSK-3 β (que codifica para un epítipo de MYC en su extremo 5') en una dirección y, como de un ADNc que codifica para una β -galactosidasa (β -gal), en la otra dirección, fusionado a una señal de localización nuclear (figura 1A). Este plásmido se sometió a ensayo en experimentos de transfección realizados en células COS (figura 1B). Este plásmido por sí mismo o cotransfectado con un vector de expresión que codifica para tau (figura 1B, carriles 1 y 2) no tiene efecto sobre los niveles de GSK-3 β tal como se evidenció mediante la inmunotransferencia de tipo Western con un anticuerpo frente a GSK-3 β . Cuando se cotransfectó con un plásmido que permite la expresión de tTA (figura 1B, carriles 3 y 4) fue evidente un aumento marcado en los niveles de GSK-3 β . Esto dio como resultado un aumento de la fosforilación de tau tal como se evidenció mediante la inmunotransferencia de tipo Western con el anticuerpo PHF-1 que reconoce un epítipo de fosforilación de tau de FHA. Cuando estuvo presente la tetraciclina (figura 1B, carriles 5 y 6), se suprimió la transactivación de GSK-3 β . Por tanto estos experimentos demuestran la expresión condicional de GSK-3 β a partir del constructo BitetO (figura 1A).

Entonces el constructo BitetO se microinyectó dentro de ovocitos y se designaron genéricamente las cinco líneas de ratón transgénico resultantes como TetO (figura 1C). En las líneas de ratón tTA, el transgén tTA está bajo control del promotor de la calciocalmodulina cinasa IIa (líneas de CamKIIa-tTA E y B) (Mayford *et al.*, 1996). Estas líneas de tTA se eligieron para permitir la expresión condicional restringida en el SNC, con expresión particularmente alta en el prosencéfalo (Mayford *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2000). Cuando se cruzan los ratones TetO con los ratones tTA, se espera que la progenie transgénica doble resultante (designada como Tet/GSK-3 β) exprese de manera constitutiva ambos transgenes (figura 1C). Sin embargo esta expresión puede suprimirse en presencia de tetraciclina o sus análogos.

La experiencia previa en generar ratones transgénicos condicionales con el sistema regulado por tet indica que el sitio de inserción genómico y/o el número de copias del constructo tetO influye en el patrón final y el nivel de la transactivación mediante tTA. La secuencia indicadora de β -Gal en el constructo BitetO permite análisis rápidos del patrón de la expresión del transgén en los ratones transgénicos dobles o bien mediante tinción con X-Gal o bien mediante inmunohistoquímica frente a β -Gal, y además, permite probar la eficacia del silenciamiento del transgén mediante tetraciclina. Se aprovechó esto para decidir qué líneas de ratón TetO eran más adecuadas para el estudio.

Caracterización de las diferentes líneas de ratón tet/gsk-3 β

Cuando se reprodujeron las cinco líneas de TetO con las líneas de tTA, tres de ellas mostraron expresión de β -Gal solamente en el cuerpo estriado (no se muestran los datos). Las dos líneas de TetO restantes (líneas G6 y G7) fueron adecuadas especialmente para el estudio ya que mostraron niveles altos de expresión del transgén en regiones del cerebro relevantes para la EA tales como la corteza o el hipocampo y por tanto se enfocó el resto del estudio sobre las líneas G6 y G7. Estas dos líneas transactivan β -Gal en un patrón espacial muy similar a aquel de CamKII α endógeno, con expresión evidente en la corteza, hipocampo, cuerpo estriado y núcleo amigdalino (figura 2). La inmunohistoquímica en secciones del cerebro de ratones Tet/GSK-3 β adultos muestra la expresión de β -Gal en las distintas capas neuronales de la corteza, los diferentes campos del hipocampo (incluyendo subículo, CA1, CA2, CA3 y circunvolución dentada) y en el cuerpo estriado 1.1 (figura 2C-E). No se detectó expresión de β -Gal en otras regiones del cerebro tales como globus pallidus, tálamo, tronco encefálico y cerebelo (figura 2A, 2E, 3A y no mostradas). Se obtuvo un nivel y un patrón similares de la expresión transgénica cuando se combinó cada línea de CamKII α -tTA (E o B) con una línea de TetO (G6 o G7). Se ha utilizado en este estudio cada combinación de manera intercambiable y por tanto en lo sucesivo se utilizará el término tTA y TetO para ratones transgénicos únicos, y Tet/GSK-3 β para animales transgénicos dobles.

Los ratones Tet/GSK-3 β fueron viables y fértiles y parecieron normales sin intervención farmacológica para suprimir la expresión del transgén. Esto pareció contradecir la toxicidad postulada previamente del aumento de la expresión de GSK-3 β en el cerebro (Brownlee *et al.*, 1997). Sin embargo, los cruzamientos heterocigóticos entre ratones tTA y TetO no dieron la frecuencia esperada del 25% para cada genotipo (de tipo natural, tTA, TetO y Tet/GSK-3 β). Los ratones Tet/GSK-3 β estaban subrepresentados (el 14%, n = 401). Esto podría ser indicativo de mortalidad debido a la sobreexpresión embrionaria de GSK-3 β en ratones Tet/GSK-3 β .

Se había observado previamente la expresión del transgén y mortalidad perinatal en el modelo animal conducido por CamKII α -tTA para la enfermedad de Huntington (HD94) (Yamamoto *et al.*, 2000). En el caso de los ratones HD94, si se administra el análogo de la tetraciclina, doxiciclina (2 mg/ml) a ratones hembras embarazadas en el agua de bebida *ad libitum* (a voluntad) desde E15 hasta el nacimiento, solamente tiene lugar la expresión transgénica posnatal y la frecuencia de los cuatro genotipos esperados se reestableció al 25%. Por tanto se decidió aplicar el mismo programa de tratamiento perinatal de doxiciclina a los ratones Tet/GSK-3 β . Se encontró que los ratones PO no tratados mostraron tinción con X-gal en el prosencéfalo mientras que la tinción estuvo ausente en los ratones tratados (figura 2A y 2B). Esto demuestra que la expresión del transgén en los ratones Tet/GSK-3 β comienza durante la vida embrionaria y que

puede inhibirse con doxiciclina. Tal como se esperaba, el tratamiento prenatal de doxiciclina normalizó la frecuencia de los ratones Tet/GSK-3 β al 25% y por tanto para maximizar el rendimiento de ratones transgénicos dobles en las crías, se empleo de manera rutinaria el tratamiento perinatal de doxiciclina.

Los ratones Tet/GSK-3 β sobreexpresan GSK-3 β en la corteza y el hipocampo. Entonces se confirmó mediante un análisis de inmunotransferencia de tipo Western que las regiones del cerebro que muestran expresión de β -Gal también presentan un aumento de los niveles de GSK-3 β . Tratando con sonda extractos de proteínas con un anticuerpo anti-MYC se demostró que el mayor nivel de expresión de GSK-3 β transgénica tiene lugar en el hipocampo, seguido por la corteza (figura 3A) mientras que podía detectarse poca expresión en el cuerpo estriado (no mostrado). Por consiguiente, se observó tratando con sonda extractos de ratones de tres meses con un anticuerpo producido frente a GSK-3 β (figura 3A y B) un aumento significativo ($p < 0,02$) del 40 $\pm$ 12,4% en los niveles de GSK-3 β en el hipocampo de ratones Tet/GSK-3 β con respecto a los ratones de tipo natural. Extractos de la corteza también mostraron un aumento (17 $\pm$ 5%) de los niveles de GSK-3 β en ratones Tet/GSK-3 β . No se encontraron diferencias en los niveles de GSK-3 β en el cuerpo estriado (no mostrado) o en las regiones del prosencéfalo tales como el cerebelo (figura 3B). Entonces se monitorizó el aumento en GSK-3 β que tiene lugar en el hipocampo y la corteza de ratones Tet/GSK-3 β , en edades que oscilan desde 1 hasta 12 meses. El nivel de sobreexpresión fue similar en todas las edades probadas (no mostrado) y se realizaron el resto de los experimentos en el presente estudio sobre ratones adultos en edades de entre 2,5 y 6 meses.

Para llegar a comprender bien que poblaciones celulares están sobreexpresando GSK-3 β , se realizó inmunohistoquímica con los dos anticuerpos anti-MYC y anti-GSK-3 β . En la corteza, se encontró un aumento de la inmunorreactividad (IR) para GSK-3 β en neuronas piramidales de la corteza de las capas II y III (figura 3C-E) y en neuronas de la lámina VI adyacentes al cuerpo calloso (no mostrado).

En el hipocampo, fue evidente la sobreexpresión de GSK-3 β en todas las regiones (subículo, CA1, CA2, CA3 y circunvolución dentada) mostrando la circunvolución dentada y CA2 el aumento más frecuente (figura 3F-H). La circunvolución dentada de los ratones de tipo natural mostró IR muy débil para GSK-3 β (figura 3F y 3I) mientras que cada neurona en la circunvolución dentada de ratones Tet/GSK-3 β sobreexpresaron GSK-3 β (figura 3G y 3I). Algunas de estas neuronas mostraron una tinción sorprendentemente alta con ambos anticuerpos anti-GSK-3 β y anti-MYC (figura 3I-K) y a menudo mostraron morfologías anómalas tales como cuerpos celulares contraídos (no se muestran). En neuronas piramidales de CA2, se vio una tinción prominente tanto en los cuerpos celulares como en las dendritas en ratones Tet/GSK-3 β (figura 3G-H).

A continuación se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western, el efecto de la sobreexpresión de GSK-3 β sobre sus sustratos relacionados con la EA, β -catenina y tau. β -catenina es un componente de las uniones adherentes célula-célula pero también se asocia a factores de transcripción con caja HMG de la familia de Tcf/LEF y promueve la transcripción de genes diana. GSK-3 β es la enzima clave que regula la estabilización de β -catenina y la translocación nuclear subsiguiente (Anderton, 1999; Barth *et al.*, 1997).

En primer lugar se analizaron los niveles de β -catenina en extractos del hipocampo y de la corteza total (figura 4A). No se encontraron diferencias entre los ratones de tipo natural y los Tet/GSK-3 β . Entonces se analizaron los niveles de β -catenina en compartimentos celulares diferentes. Tal como puede verse en la figura 4A, no se observaron cambios en los niveles de β -catenina en extractos de membrana o citosólicos de o bien la corteza o bien el hipocampo. Cuando se analizaron los extractos nucleares, no se observaron diferencias significativas en los niveles de β -catenina en la corteza. Sin embargo, se observó en el hipocampo una reducción significativa ($p < 0,05$, $n = 6$) del 35 $\pm$ 8% en los niveles de β -catenina nuclear de los ratones Tet/GSK-3 β en comparación con los compañeros de camada de tipo natural. También fue evidente esta disminución de la β -catenina nuclear mediante la microscopía inmunoelectrónica en la circunvolución dentada de ratones Tet/GSK-3 β (no mostrado).

A continuación, se realizaron las inmunotransferencias de tipo Western con anticuerpos de tau en aquellas regiones del cerebro que presentan expresión de MYC (corteza, cuerpo estriado e hipocampo) así como en el cerebelo. Solamente el hipocampo mostró aumento de los niveles de fosforilación de tau tal como se detectó mediante el anticuerpo PHF-1 (figura 4B y no mostradas). Se reprodujo el aumento de la fosforilación de tau similar a EA detectado con el anticuerpo PHF-1, utilizando el anticuerpo AD2 producido frente el mismos fosfoepítipo de tau (figura 4C). El aumento de la IR de AD2 y PHF-1 en ratones Tet/GSK-3 β no es debido a niveles alterados de la tau total ya que no se observó aumento con anticuerpo de tau independiente de la fosforilación 7.51 que reconoce todas las isoformas de tau. Además, la fosforilación en la serina 262 que no es adyacente a un residuo de prolina y que se ha demostrado que es independiente de GSK-3 β *in vivo* (Muñoz-Montano *et al.*, 1997) no está afectada en ratones Tet/GSK-3 β tal como se detectó mediante el anticuerpo 12E8 (figura 4C).

Se comparó la fosforilación y la expresión de proteína transgénica en los cuatro genotipos posibles (de tipo natural, tTA, TetO, y Tet/GSK-3 β) (figura 4C). Solamente los ratones Tet/GSK-3 β mostraron expresión de β -Gal y aumento de niveles de GSK-3 β , y tau de AD2 y PHF-1, que demuestran por tanto que la expresión transgénica y los efectos subsiguientes en ratones Tet/GSK-3 β se debieron a la transactivación mediante tTA del constructo BitetO y no debido a la pérdida de este último en los ratones TetO.

Localización somatodendrítica de tau hiperfosforilada similar a EA

Se analizó mediante inmunohistoquímica qué poblaciones neuronales del hipocampo muestran el aumento en IR de PHF-1 observada mediante inmunotransferencia de tipo Western. El aumento de la inmunotinción con PHF-1 fue más evidente en la circunvolución dentada (figura 5). En ratones de tipo natural, las células granulares de la circunvolución dentada muestran IR de PHF-1 no detectable (figura 5A), aunque podría detectarse cierta tinción en las fibras musgosas que se proyectan hacia CA3 (figura 5B). Los ratones Tet/GSK-3 β muestran un aumento marcado frente a la tinción de fibras musgosas (figura 5D) y, de manera interesante, la mayoría de las células granulares muestran inmunotinción con PHF-1 somatodendrítica fuerte, pareciéndose por tanto al estado previo a la maraña de la degeneración neurofibrilar de EA (figura 5C).

La fosforilación de tau por GSK-3 β disminuye la afinidad de tau por los microtúbulos *in vitro* y en células transfectadas (Lovestone *et al.*, 1996). Esto puede explicar en parte el hallazgo de la tinción somatodendrítica con el anticuerpo PHF-1. Para probar esto, se realizó la inmunohistoquímica con 7.51, un anticuerpo producido frente al dominio de tau de unión a tubulina y que por tanto reconoce tau solamente cuando no está unida a microtúbulos. De manera interesante, el anticuerpo 7.51 tiñó somas de Tet/GSK-3 β pero no células granulares de la circunvolución dentada del tipo natural (figura 5F). La morfología de las células teñidas con 7.51 fue muy similar a la que se observa con el anticuerpo PHF-1 (véase el recuadro en la figura 5C).

También la inmunotinción somatodendrítica fuerte de tau hiperfosforilada puede ser indicativa de formas de tau agregadas aberrantes tales como los FHA. La tinción con tioflavina-S en cerebros con la EA revela tanto marañas neurofibrilares como placas amiloides. Por tanto se realizó la tinción con tioflavina-S en secciones de cerebro de ratones Tet/GSK-3 β . No se detectó fluorescencia con tioflavina-S ni en las células granulares de la circunvolución dentada ni en cualquier otra región del cerebro, lo que indica la ausencia de haces de FHA y de agregados de proteína de lámina β . La ausencia de fluorescencia con tioflavina-S puede ser aún compatible con la existencia de unos pocos FHA cortos, representando por tanto etapas iniciales de degeneración neurofibrilar.

Entonces, para analizar esta posibilidad, se estudiaron las células granulares de Tet/GSK-3 β mediante microscopía electrónica ya que muestran inmunomarcaje somatodendrítico fuerte para PHF-1. Estuvo presente un producto de reacción difuso en el pericarión de estas neuronas (figura 6A-C), aunque en algunos casos también se observaron pequeñas extensiones de productos de reacción oscuro (figura 6C). Sin embargo, no se observaron FHA ni en las pequeñas extensiones de producto de reacción oscuro ni en otra parte del citoplasma de inmunomarcaje difuso. De manera interesante, el material inmunomarcado se vio a menudo a lo largo de la cara citoplasmática de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (RER), y las pequeñas extensiones teñidas oscuras mencionadas anteriormente estuvieron en algunas ocasiones en proximidad cercana a estas cisternas del RER marcado (figura 6C). De manera interesante, las neuronas de Tet/GSK-3 β con marcaje citoplasmático con PHF-1 difuso aparecieron muy frecuentemente separadas del neurópilo circundante, mostrando un espacio extracelular ensanchado a lo largo de la mayor parte de su periferia (figura 6A) mientras que las neuronas no marcadas no mostraron ninguna separación. Tampoco se observó ninguna separación de neuronas de células granulares de ratones de tipo natural.

Muerte de células neuronales y gliosis reactiva en el hipocampo de ratones tet/gsk-3 β

Estudios previos han demostrado que GSK-3 β se inhibe mediante la ruta de supervivencia de la PI 3-cinasa/PKB, que evita la apoptosis (Cross *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 1994; Hurel *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 1994). Esto, junto con la observación de que la desestabilización de la β -catenina mediante mutaciones en PS-1 potencia la apoptosis neuronal (Zhang *et al.*, 1998), da lugar a explorar si la apoptosis estaba teniendo lugar en ratones Tet/GSK-3 β como consecuencia de la sobreexpresión de GSK-3 β .

Las diferentes poblaciones neuronales de ratones Tet/GSK-3 β mostraron marcaje de TUNEL que estuvo ausente en ratones de tipo natural. Esto se observó principalmente en las células granulares de la circunvolución dentada (hasta 5 células granulares marcadas por sección de 30 μ m de la circunvolución dentada de Tet/GSK-3 β frente a sin marcaje en la circunvolución dentada de tipo natural, figura 4A y B). También se observaron algunas células positivas a TUNEL adyacentes al cuerpo calloso en la lámina VI de la corteza de ratones Tet/GSK-3 β (no mostrado).

A continuación se probó si las alteraciones neuronales y/o la muerte desencadenada por la sobreexpresión de GSK-3 β en ratones Tet/GSK-3 β estuvo acompañada por alteraciones gliales tales como la microgliosis o la astrocitosis reactiva. La inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo producido frente a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) reveló astrocitosis reactiva en diferentes regiones del cerebro. Coincidiendo con el marcaje de TUNEL, la tinción con GFAP fue la más frecuente en la circunvolución dentada y en las capas profundas de la corteza (figura 7C y D, y no mostradas). Estudios de microscopía electrónica confirmaron la presencia de procesos astrocíticos altamente activados, llenos de filamentos intermedios gliales, en la circunvolución dentada de los ratones Tet/GSK-3 β . Estos se encontraron a menudo rodeando a neuronas de IR de PHF-1 (figura 7E).

Para probar si la microgliosis estaba teniendo lugar en el hipocampo de ratones Tet/GSK-3 β se realizó la inmunohistoquímica con anticuerpos OX42, LN-3, y ED1. Se obtuvieron resultados similares con cada uno de los tres anticuerpos (la figura 7F muestra la inmunohistoquímica con OX-42). Cuando se comparó con las secciones del hipocampo de tipo natural, se encontró un aumento en los procesos microgliales finos en el estrato granular de ratones Tet/GSK-3 β .

Además se encontraron cuerpos de células inmunotñidos que corresponden a la microglía reactiva solamente en ratones Tet/GSK-3 β , principalmente en el estrato molecular del hipocampo (puntas de flecha en 7F).

Discusión

Mediante la utilización de un enfoque transgénico condicional se muestra en el presente documento que la sobreexpresión *in vivo* de GSK-3 β da como resultado neurodegeneración. Los ratones transgénicos condicionales que sobreexpresan GSK-3 β , también simulan diferentes aspectos bioquímicos y celulares de la EA tales como la desestabilización de la β -catenina y la localización somatodendrítica de tipo previa a la maraña de la tau hiperfosforilada. Por tanto, los resultados apoyan la hipótesis que la desregulación de GSK-3 β podría ser un acontecimiento crítico en la patogenia de la EA y plantea la posibilidad de que estos ratones puedan servir como un modelo animal útil para estudiar algunos aspectos de esta patología.

GSK-3 β está activa durante el desarrollo animal como un componente de la ruta de señalización Wnt y desempeña un importante papel en las decisiones de destino celular y la formación de patrones. (Bourouis *et al.*, 1990; Rue *et al.*, 1993; Siegfried *et al.*, 1992; Siegfried *et al.*, 1994). Por consiguiente, se ha sugerido la capacidad del litio para inhibir GSK-3 β para explicar sus efectos teratogénicos (Klein y Melton, 1996; Stambolic *et al.*, 1996). Aparte de sus papeles bien establecidos en el desarrollo temprano, la señalización Wnt y GSK-3 β han mostrado participar en la sinaptogénesis de células granulares del cerebelo posnatal (Hall *et al.*, 2000; Lucas y Salinas, 1997). La toxicidad de la sobreexpresión de GSK-3 β durante el desarrollo embrionario y posnatal del SNC puede explicar por qué Brownlees y colaboradores no fueron capaces de generar ratones transgénicos con sobreexpresión de GSK-3 β detectable incluso con promotores específicos neuronales. Eso dio lugar a que estos autores sugirieran el uso de sistemas de expresión inducibles fuertemente controlados (Brownlees *et al.*, 1997). En este caso, también se encuentra que una fracción de ratones transgénicos dobles mueren de manera perinatal y que esto puede salvarse mediante el silenciamiento de la expresión del transgén durante la vida embrionaria. Sin embargo, algunos ratones pueden sobrevivir sin intervención farmacológica. Hay al menos dos razones de por qué puede ocurrir esto. En primer lugar, el promotor que se usa (CamKII α) tiene un patrón de expresión más limitado que el empleado por Brownlees y colaboradores (NF-L). En segundo lugar, en el sistema binario el transgén es por sí mismo silencioso. Esto evita la mortalidad de los fundadores debido a la toxicidad del transgén. La reproducción posterior con ratones tTA permita seleccionar aquellos descendientes transgénicos dobles con antecedentes genéticos permisivos para la sobreexpresión embrionaria del transgén.

La acumulación somatodendrítica de tau hiperfosforilada es un acontecimiento temprano en la evolución de la degeneración neurofibrilar de la EA (Braak *et al.*, 1994). La inmunotinción de tau de tipo previa a la maraña se encuentra en ratones transgénicos que sobreexpresan isoformas de tau diferentes (Brion *et al.*, 1999; Gotz *et al.*, 1995; Ishihara *et al.*, 1999; Spittaels *et al.*, 1999). La localización somatodendrítica de tau en estos ratones podría deberse a la saturación de la capacidad de unión a tau de los microtúbulos. Entonces el exceso de tau es susceptible de acumularse en el soma y experimentar modificaciones posteriores tales como fosforilación y cambios conformacionales. En ratones Tet/GSK-3 β , la hiperfosforilación y la localización somatodendrítica de tau tienen lugar sin afectar al nivel total de tau, por tanto en similitud cercana a la situación encontrada en la EA y otras taupatías. Según el aumento en la inmunotinción con 7.51 encontrado en los ratones Tet/GSK-3 β y los estudios *in vitro* previos (Novak *et al.*, 1991), el aumento de la fosforilación de tau en los ratones Tet/GSK-3 β conduce de la manera más probable a un descenso de la afinidad de tau por los microtúbulos y la acumulación posterior de la proteína en el soma.

Se encuentra que la tau somatodendrítica en ratones Tet/GSK-3 β se asocia a menudo con el retículo endoplasmático. Se encontraron resultados similares en ratones transgénicos que sobreexpresan la isoforma de tau más corta (Brion *et al.*, 1999) y en ovejas de edad avanzada (Nelson *et al.*, 1993). En todos estos casos, se realizó la inmunodetección con anticuerpos que reconocen epítopos de fosforilación o conformación que se encuentran en tau de FHA. De manera interesante, los FHA en cerebros con la EA se encuentran a menudo surgiendo del retículo endoplasmático y otras estructuras de membrana (Gray *et al.*, 1987; Metuzals *et al.*, 1988; Papasozomenos, 1989). Por tanto es posible que en modelos animales, la asociación de tau con el retículo endoplasmático represente una fase temprana en la formación de lesiones neurofibrilares. Una explicación compatible y adicional de la asociación de tau con el retículo endoplasmático podría ser su interacción con PS-1. Se ha encontrado que PS-1 se une tanto a tau como a GSK-3 β en experimentos de inmunoprecipitación conjunta realizados en extractos de cerebro humano (Takashima *et al.*, 1998), y PS-1 se sitúa predominantemente en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (Selkoe, 1998).

Varios mecanismos pueden explicar el estrés y la muerte neuronal (revelados mediante la tinción de TUNEL y neuroglia reactiva) detectado en ratones Tet/GSK-3 β . En vista de los efectos de la sobreexpresión de GSK-3 β sobre la compartimentación y la fosforilación de tau, un posible mecanismo podría ser la desorganización del citoesqueleto de los microtúbulos. En este caso, como consecuencia de una disminución de la estabilización de los microtúbulos por tau, podría esperarse en ratones Tet/GSK-3 β una disminución en el contenido de microtúbulos similar al encontrado en cerebros con la EA (Ferry, 1998). De manera adicional, GSK-3 β está regulada negativamente por la ruta de supervivencia que implica la PI-3 cinasa (Cross *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 1994; Hurel *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 1994) y la exposición de las neuronas de la corteza cultivadas con la retirada del factor trófico o con inhibidores de la PI-3 cinasa conduce a la estimulación de GSK-3 β que da como resultado la apoptosis (Hetman *et al.*, 2000; Pap y Cooper, 1998). Finalmente, la transcripción mediada por la disminución de β -catenina ha demostrado potenciar la apoptosis neuronal en cultivos neuronales primarios expuestos a β -amiloide (Zhang *et al.*, 1998) o transfectados con PS-1 mutante (Weihl *et al.*, 1999). Se conoce poco acerca de los genes diana transactivados por β -catenina que son responsables del aumen-

to de la susceptibilidad a la apoptosis. Los ratones Tet/GSK-3 β pueden ser un sistema útil para identificar tales genes mediante presentación diferencial o enfoques de micromatrices de ADN.

Se han producido un progreso sustancial durante los últimos años hacia la generación de modelos de ratón transgénicos de la EA, particularmente con respecto a la cascada toxica de β -amiloide y la formación de placas (Price y Sisodia, 1998). Se han conseguido mejoras secuenciales mediante la generación de ratones con niveles de expresión superiores de formas mutadas de PPA y mediante la reproducción de éstos con ratones transgénicos PS-1 mutantes que favorecen el procesamiento de PPA en A β 42 (Guenette y Tanzi, 1999). Sin embargo, si la desregulación de GSK-3 β es un acontecimiento clave en la patogenia de la EA, los ratones Tet/GSK-3 β pueden constituir un modelo de ratón alternativo y/o complementario de la EA.

La mayoría de los esfuerzos realizados para actualizar modelos transgénicos de la EA se ha enfocado en la simulación de las características neuropatológicas de la EA. Esto puede requerir modificaciones excesivamente artificiales para reproducirlas dentro de la vida del ratón, algo que se forma durante muchos años en un ser humano. De manera alternativa, simplemente puede no ser posible simular todos los aspectos de la neuropatología de la EA en ratones porque requiere claves específicas humanas (como es el caso de toxicidad inducida por β -amiloide *in vivo* (Geula *et al.*, 1998). GSK-3 β es una enzima que se encuentra en la convergencia de las rutas implicadas en la hiperfosforilación de tau, toxicidad inducida por β -amiloide y mutaciones de PS-1 similares a la EA. Si se comparan los modelos de ratón que ya existen de la EA, los ratones Tet/GSK-3 β son únicos en el sentido de que reproducen disfunciones intraneuronales aguas abajo que pueden ser responsable en última instancia de algunos aspectos de la EA. Una predicción de esta hipótesis puede ser que los niveles (o actividad) de GSK-3 β y los sustratos deben encontrarse alterados en los pacientes con EA. Ya se ha informado de evidencias a favor a esto (Pei *et al.*, 1999; Shiurba *et al.*, 1996).

La neurodegeneración en los ratones Tet/GSK-3 β concuerda bien con el efecto neuroprotector del litio, un inhibidor relativamente específico de GSK-3 β . Los efectos neuroprotectores del litio se han atribuido a su capacidad para inhibir GSK-3 β (Álvarez *et al.*, 1999; Hetman *et al.*, 2000) y para regular por incremento Bcl-2 (Chen *et al.*, 1999) y regular por disminución proteínas Bax (Chen y Chuang, 1999) en neuronas (modificado por Manji *et al.*, 1999). Por tanto, los ratones Tet/GSK-3 β son una buena herramienta para probar el efecto neuroprotector de próximos inhibidores específicos de GSK-3 β . Además, su eficacia puede compararse con el efecto del silenciamiento de la expresión del transgén mediante la administración de análogos de la tetraciclina.

Bibliografía

Álvarez, G., Muñoz-Montano, I. R., Satrustegui, I., Avila, I., Bogonez, E., and Diaz-Nido, I. (1999). Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453, 260-4.

Alzheimer, A. (1911). Ober eigernartige krankheitsfülle des späteren alters. *z. Ges. Neurol. Psychiat.* 4,356-385.

Anderton, B. H. (1999). Alzheimer's disease: clues from flies and worms. *Curr Biol* 9, R106-9.

Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., and Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42,631-9.

Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., and Bujard, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23, 3605- 6.

Barth, A. I., Nathke, I. S., and Nelson, W. J. (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Bio* 19, 683-90.

Bourouis, M., Moore, P., Ruel, L., Grau, Y., Heitzler, P., and Simpson, P. (1990). An early embryonic product of the gene shaggy encodes a serine/threonine protein kinase related to the CDC28/cdc2+ subfamily. *Embo* 19, 2877-84.

Braak, E., Braak, H., and Mandelkow, E. M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87, 554-67.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-59.

Brion, J. P., Tremp, G., and Octave, J. N. (1999). Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease [see comments]. *Am J. Pathol* 154, 255-70.

Brownlee, J., Irving, N. G., Brion, J. P., Gibb, B. J., Wagner, U., Woodgett, J., and Miller, C. C. (1997). Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3 β transgenes. *Neuroreport* 8, 3251-5.

Buee-Scheffer, V., Condamines, O., Mourton-Gilles, C., Lakes, R., Goedert, M., Pau, B., and 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., and Yankner, B. A. (1995). beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879-88.

Chen, G., Zeng, W. Z., Yuan, P. X., Huang, L. D., Jiang, Y. M., Zhao, Z. H., and Manji, H. K. (1999). The mood- stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem* 72, 879-82.

Chen, R. W., and Chuang, D. M. (1999). Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 274, 6039-42.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., and Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42- residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice [see comments]. *Nat Med* 3,67-72.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378,785-9.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Vandenheede, J. R., McDowell, H. E., Hundal, H. S., and Cohen, P. (1994). The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 303,21-6.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., and Younkin, S. (1996). Increased amyloid- beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383,710-3.

Estus, S., Tucker, H. M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M., and Rydel, R. E. (1997). Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 17,7736- 45.

Ferreira, A., Lu, Q., Orecchio, L., and Kosik, K. S. (1997). Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. *Mol Cell Neurosci* 9,220-34.

Forloni, G., Chiesa, R., Smioldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F., and Angeretti, N. (1993). Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 4, 523-6.

Geula, C., Wu, C. K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., and Yankner, B. A. (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity [see comments]. *Nat Med* 4, 827-31.

Gingrich, J. R., and Roder, J. (1998). Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu Rev Neurosci* 21, 377-405.

Glenner, G. G., and 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, 885-90. 1

Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, /., and Crowther, R. A. (1989). 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* 18, 393-9.

Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, I. H., Petersen, R. C., Parisi, I. E., and Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41 , 17-24.

Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5547-51.

Gotz, J., Probst, A., Spillantini, M. G., Schafer, T., lakes, R., Burki, K., and Goedert, M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J* 14, 1304-13.

Gray, E. G., Paula-Barbosa, M., and Roher, A. (1987). Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. *Neuropathol Appl Neurobio* 113 , 91-110.

Greenberg, S. G., Davies, P., Schein, I. D., and Binder, L. I. (1992). Hydrofluoric acid- treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* 267, 564-9.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4913-7.

Guenette, S. Y., and Tanzi, R. E. (1999). Progress toward valid transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20, 201-11.

Hall, A. C., Lucas, F. R., and Salinas, P. C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT -7a signaling [In Process Citation]. *Cell* 100, 525-35.

Hardy, I. (1996). New insights into the genetics of Alzheimer's disease. *Ann Med* 28, 255-8.

Hetman, M., Cavanaugh, I. E., Kimelman, D., and Xia, z. (2000). Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Neuronal Apoptosis Induced by Trophic Withdrawal. *J Neurosci* 20,2567-2574.

Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S., and Lee, V. M. (1997). Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 272, 25326-32.

Hurel, S. J., Rochford, J. J., Borthwick, A. C., Wells, A. M., Vandenheede, J. R. Turnbull, D. M., and Yeaman, S. J. (1996). Insulin action in cultured human myoblasts: contribution of different signalling pathways to regulation of glycogen synthesis. *Biochem J* 320,871-7.

Ishiguro, K., Ihara, Y., Uchida, T., and Imahori, K. (1988). A novel tubulin-dependent protein kinase forming a paired helical filament epitope on tau. *J Biochem* (Tokyo) 104, 319-21.

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M. K., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751-62.

Kelz, M. B., Chen, J., Carlezon, W. A., Jr., Whisler, K., Gilden, L., Beckmann, A. M., Steffen, C., Zhang, Y. J., Marotti, L., Self, D. W., Tkatch, T., Baranauskas, G., Surmeier, D. J., Neve, R. L., Duman, R. S., Picciotto, M. R., and Nestler, E. J. (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401,272-6.

Klein, P. S., and Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,8455-8459.

Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L., Jr., and Trojanowski, J. Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675-8.

Loo, D. T., Copani, A., Pike, C. J., Whittemore, E. R., Walencewicz, A. J., and Cotman, C. W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90,7951-5.

Lovestone, S., Hartley, C. L., Pearce, J., and Anderton, B. H. (1996). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73, 1145-57.

Lovestone, S., and Reynolds, C. H. (1997). The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 78, 309-24.

Lovestone, S., Reynolds, C. H., Latimer, D., Davis, D. R., Anderton, B. H., Gallo, J. M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S., and et al. (1994). Alzheimer's disease- like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase : kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 4, 1077-86.

Lucas, F. R., and Salinas, P. C. (1997). WNT- 7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* 192, 31-44.

Manji, H. K., Moore, G. J., and Chen, G. (1999). Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? *Biol Psychiatry* 46, 929- 40.

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82,4245-9.

Mayford, M., Bach, M. E., Ruang, Y. Y., Wang, L., Rawkins, R. D., and Kandel, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-83.

- Metuzals, J., Robitaille, Y., Roughton, S., Gauthier, S., Kang, C. Y., and Leblanc, R. (1988). Neuronal trans-
formations in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 252,239-48.
- 5 Morishima-Kawashima, M., Rasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, R., Titani, K., and Ihara, Y.
(1995). Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270,823-9.
- Muñoz-Montano, J. R., Moreno, F. J., Avila, J., and Diaz-Nido, J. (1997). Lithium inhibits Alzheimer's disease-
like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* 411, 183-8.
- 10 Murayama, M., Tanaka, S., Palacino, J., Murayama, O., Ronda, T., Sun, X., Yasutake, K., Nihonmatsu, N.,
Wolozin, B., and Takashima, A. (1998). Direct association of presenilin-1 with beta-catenin. *FEBS Lett* 433, 73-7.
- Nelson, P. T., Marton, L., and Saper, C. B. (1993). Alz-50 immunohistochemistry in the normal sheep striatum:
a light and electron microscope study. *Brain Res* 600, 285-97.
- 15 Novak, M., Iakes, R., Edwards, P. C., Milstein, C., and Wischik, C. M. (1991). Difference between the tau protein
of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423
and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5837-41.
- 20 Otvos, L., Jr., Feiner, L., Lang, E., Szendrei, G. I., Goedert, M., and Lee, V. M. (1994). Monoclonal antibody
PHF -1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 39, 669-73.
- Pap, M., and Cooper, G. M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3- Kinase/Akt
cell survival pathway. *J Biol Chem* 273, 19929-32.
- 25 Papasozomenos, S. C. (1989). Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type: II. Electron mi-
croscopy and pathogenetic implications. Effects of fixation on the morphology of the Alzheimer's abnormal filaments.
Lab Invest 60,375-89.
- 30 Pei, J. J., Braak, E., Braak, R., Grundke-Igbal, I., Igbal, K., Winblad, B., and Cowburn, R. F. (1999). Distri-
bution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary
changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 1010-9.
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1991). *In vitro* aging of beta-amyloid protein
causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563, 311-4.
- 35 Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu
Rev Neurosci* 21, 479-505.
- 40 Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., and Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat
glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature* 362, 557-60.
- Saito, Y., Vandenheede, J. R., and Cohen, P. (1994). The mechanism by which epidermal growth factor inhibits
glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J* 303,27-31.
- 45 Sanchez, S., Sayas, L., Lim, F., Diaz-Nido, J., Avila, J., and Wandosell, F. (2000). The inhibition of P13-K
induces neurite retraction and activates GSK-3b. *submitted*.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton,
50 M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi,
R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the
senile plaques of Alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial
Alzheimer's disease [see comments]. *Nat Med* 2,864-70.
- 55 Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease.
Trends Cell Bio 18, 447-53.
- Selkoe, D. J. (1994). Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci*
17,489-517.
- 60 Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G. V., Litersky, J. M., Schenk,
D., Lieberburg, I., Trojanowski, J. Q., and *et al.* (1995). Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau,
and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270, 18917-22.
- 65 Shiurba, R. A., Ishiguro, K., Takahashi, M., Sato, K., Spooner, E. T., Mercken, M., Yoshida, R., Wheelock,
T. R., Yanagawa, H., Imahori, K., and Nixon, R. A. (1996). Immunocytochemistry of tau phosphoserine 413 and tau
protein kinase I in Alzheimer pathology. *Brain Res* 737, 119-32.

Siegfried, E., Chou, T. B., and Perrimon, N. (1992). Wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* 71, 1167- 79.

Siegfried, E., Wilder, E. L., and Perrimon, N. (1994). Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 367, 76-80.

**Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Merc-
ken, M., Sciote, R., Van Lommel, A., Loos, R., and Van Leuven, F. (1999).** Prominent axonopathy in the brain and
spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155,2153-65.

Stambolic, V., Ruel, L., and Woodgett, J. R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and
mimics wingless signalling in intact cells [published erratum appears in *Curr Biol* 1997 Mar 1;7(3):196]. *Curr Biol* 6,
1664-8.

**Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K., and Yama-
guchi, H. (1998).** Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35)
enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 31, 317-23.

**Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Merc-
ken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., and Wozolzin, B. (1998).** Presenilin 1 associates with glycogen synthase
kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 95,9637-41.

Takashima, A., Noguchi, K., Michel, G., Mercken, M., Hoshi, M., Ishiguro, K., and Imahori, K. (1996). Ex-
posure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3
kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 203, 33-6.

Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., and Imahori, K. (1993). Tau protein kinase I is essential for
amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90,7789-93.

Terry, R. D. (1998). The cytoskeleton in Alzheimer disease. *J Neural Transm Suppl* 53, 141-5.

Weihl, C. C., Ghadge, G. D., Kennedy, S. G., Hay, N., Miller, R. J., and Roos, R. P. (1999). Mutant presenilin-1
induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J Neurosci* 19, 5360-9.

Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase- 3/factor A. *Embo* 19,2431-
8.

Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a condi-
tional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57-66.

Yankner, B. A. (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16,921-32.

**Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D. M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y.,
Duthie, M., St George-Hyslop, P. H., and Fraser, P. E. (1998).** The presenilin 1 protein is a component of a high
molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem* 273, 16470-5.

**Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., Sturcwer-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B.,
van de Watering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., and Yankner, B. A. (1998).** Destabilization of
beta- catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395, 698- 702.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Animal transgénico no humano en el que la proteína GSK-3 β se sobreexpresa en el animal, en el que la expresión de la proteína GSK-3 β está bajo el control del sistema de expresión de GSK-3 β condicional regulado por tet (tetraciclina), que tiene un transgén de tTA bajo el control del promotor de CamKII α , de tal modo que se encuentra un aumento de los niveles de fosforilación de tau en el hipocampo pero no en la corteza ni en el cuerpo estriado.
- 10 2. Animal transgénico según la reivindicación 1, en el que GSK-3 β es la única enzima que se sobreexpresa.
3. Animal transgénico según la reivindicación 1, en el que GSK-3 β es la única proteína que se sobreexpresa.
4. Animal transgénico según cualquier reivindicación anterior, que es un mamífero.
- 15 5. Animal transgénico según la reivindicación 4, en el que el mamífero es un ratón, rata o primate.
6. Uso de un animal transgénico según cualquier reivindicación anterior como modelo para la enfermedad de Alzheimer.
- 20 7. Uso de un animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la prueba de un fármaco o terapia para tratar las enfermedades neurodegenerativas.
- 25 8. Método de identificación de una terapia útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar la terapia al animal transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y monitorizar un efecto sobre la patología o el comportamiento.

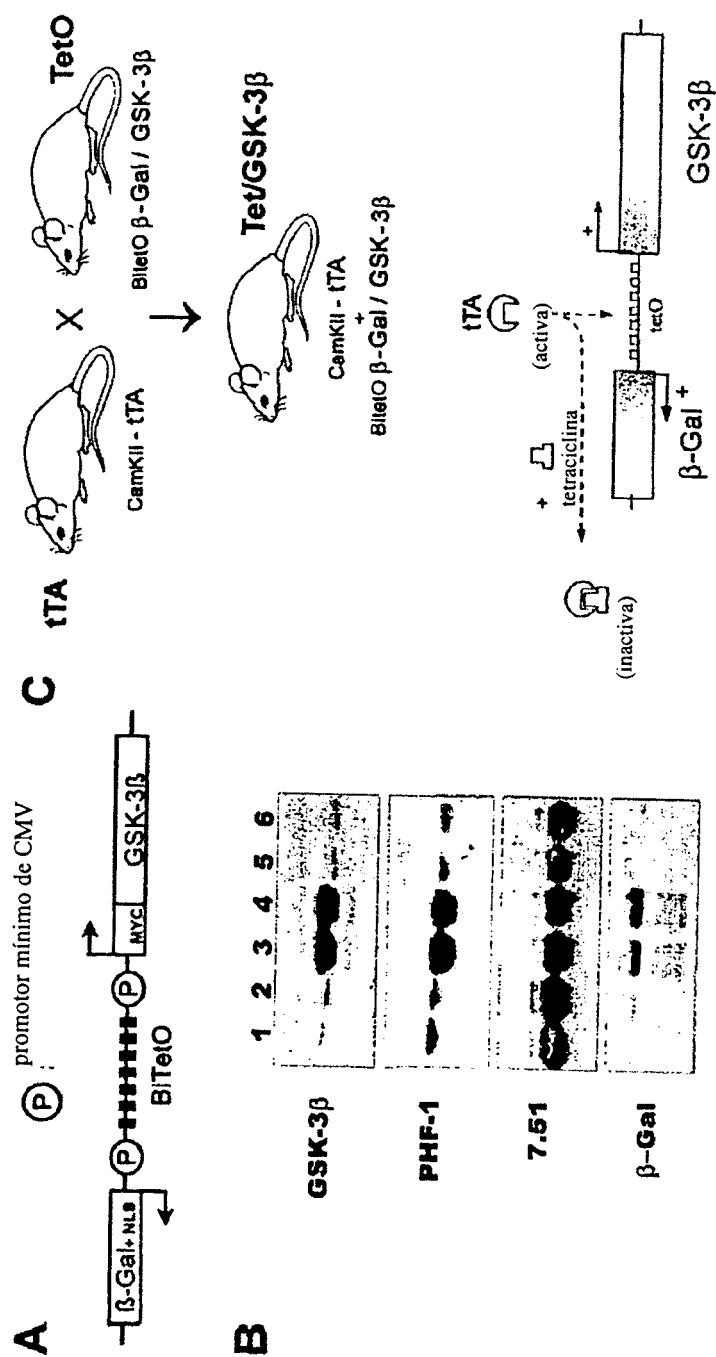


Fig.1

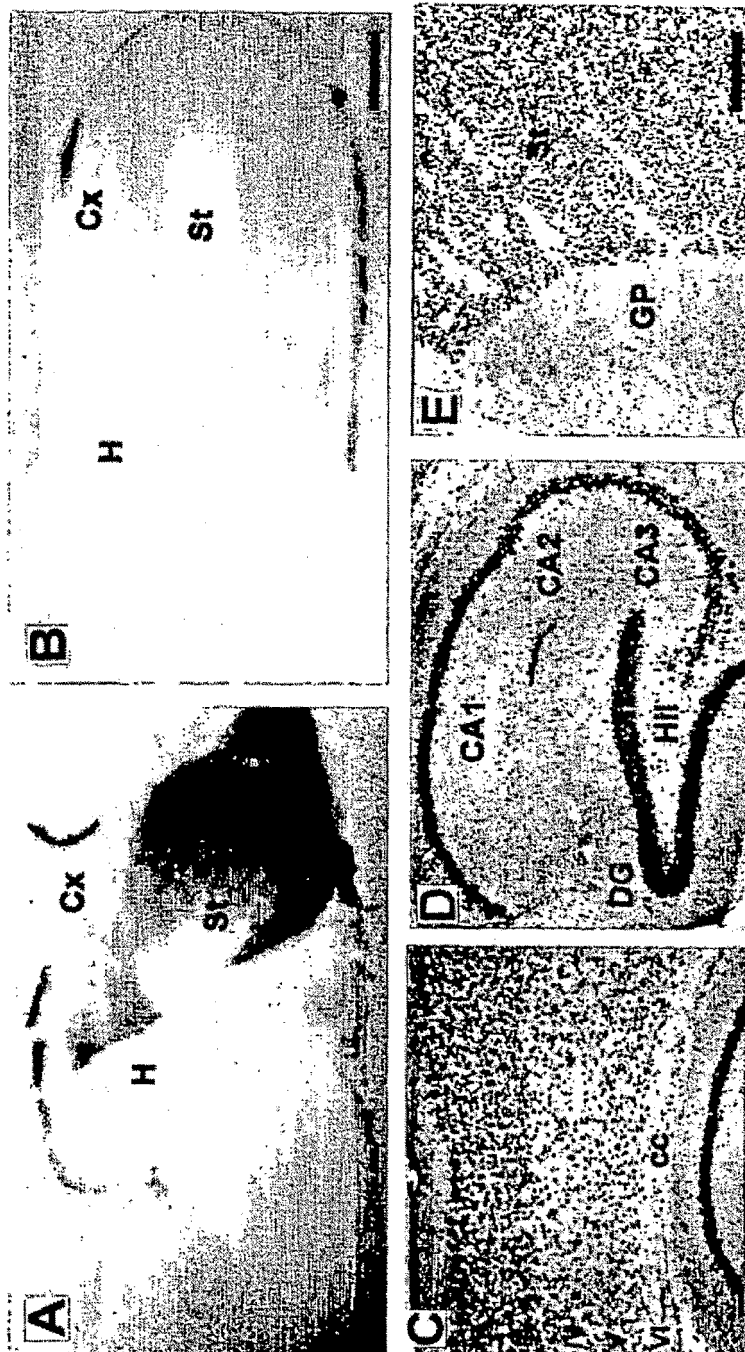


Fig.2

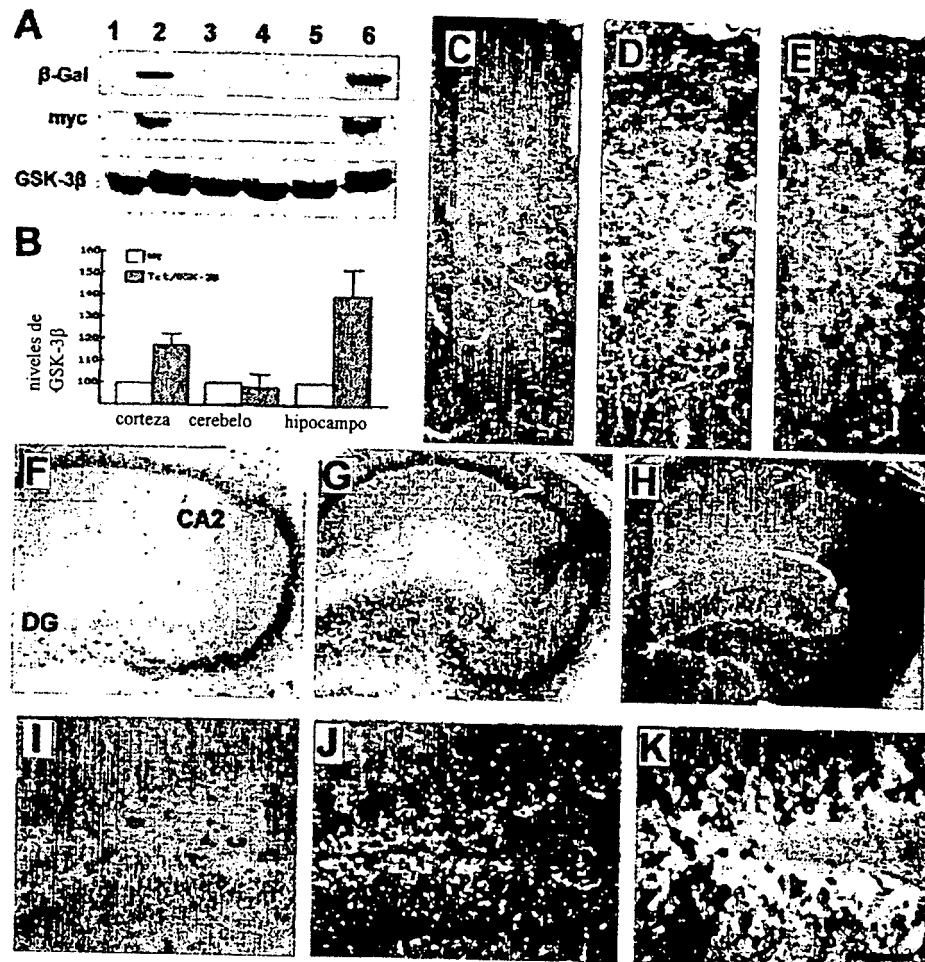


Fig.3

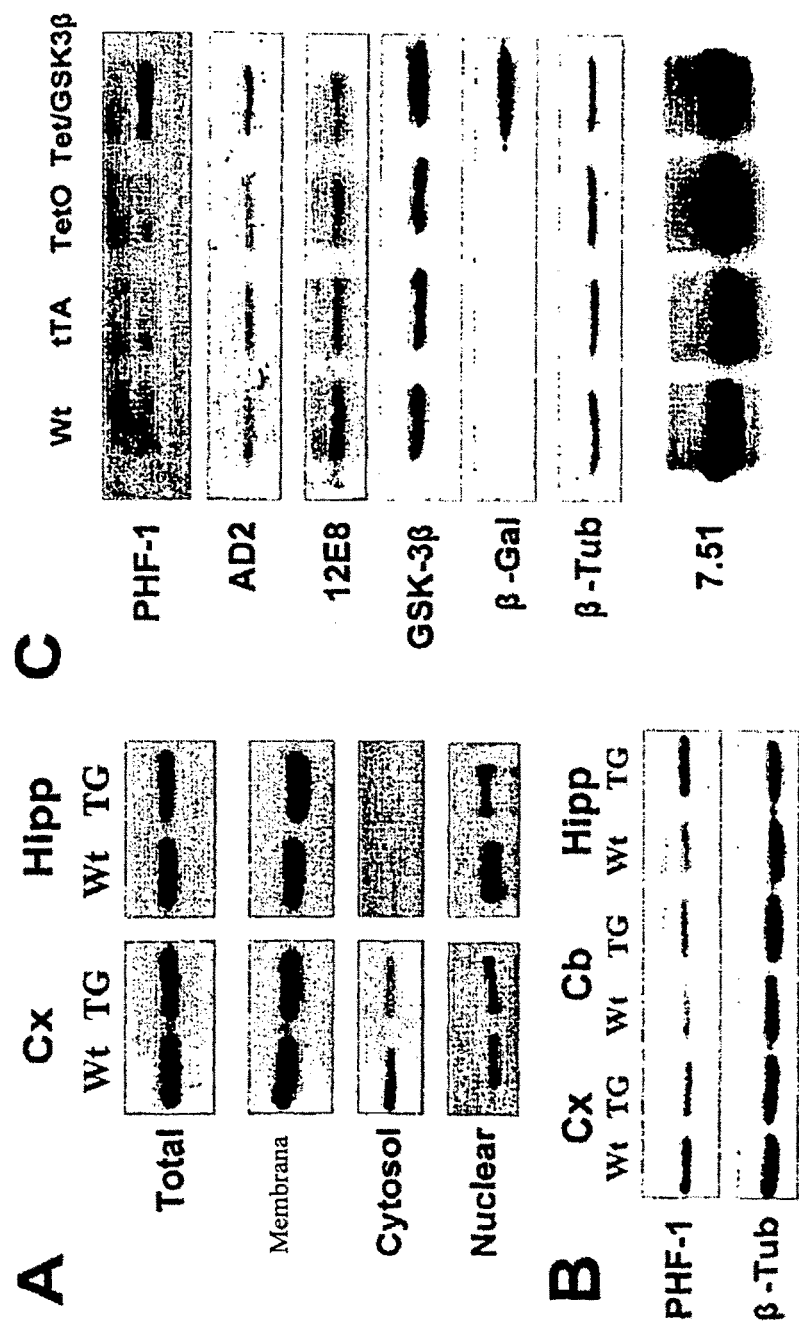


Fig.4

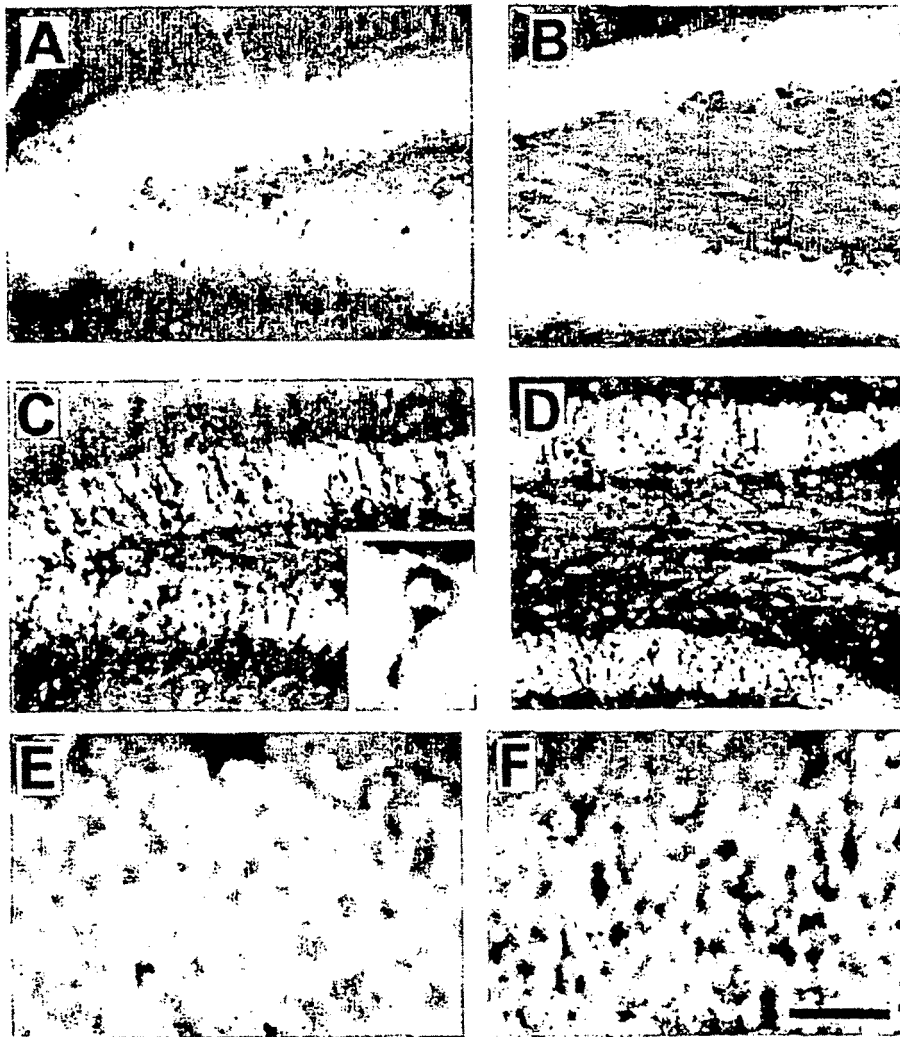


Fig.5

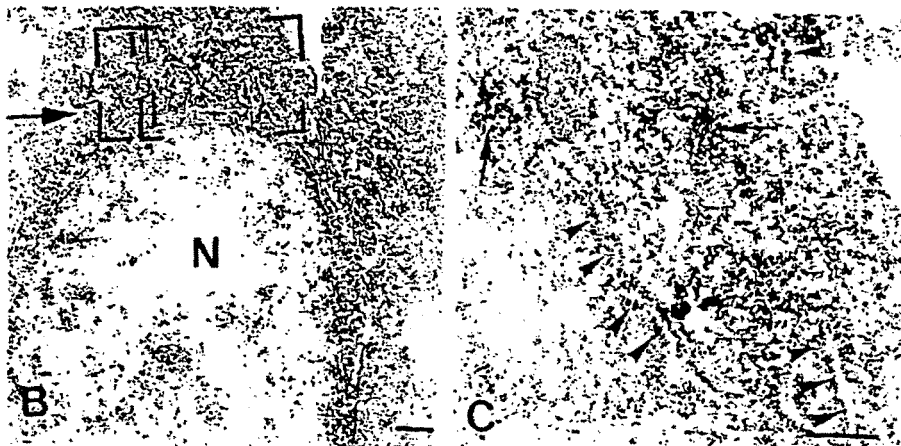
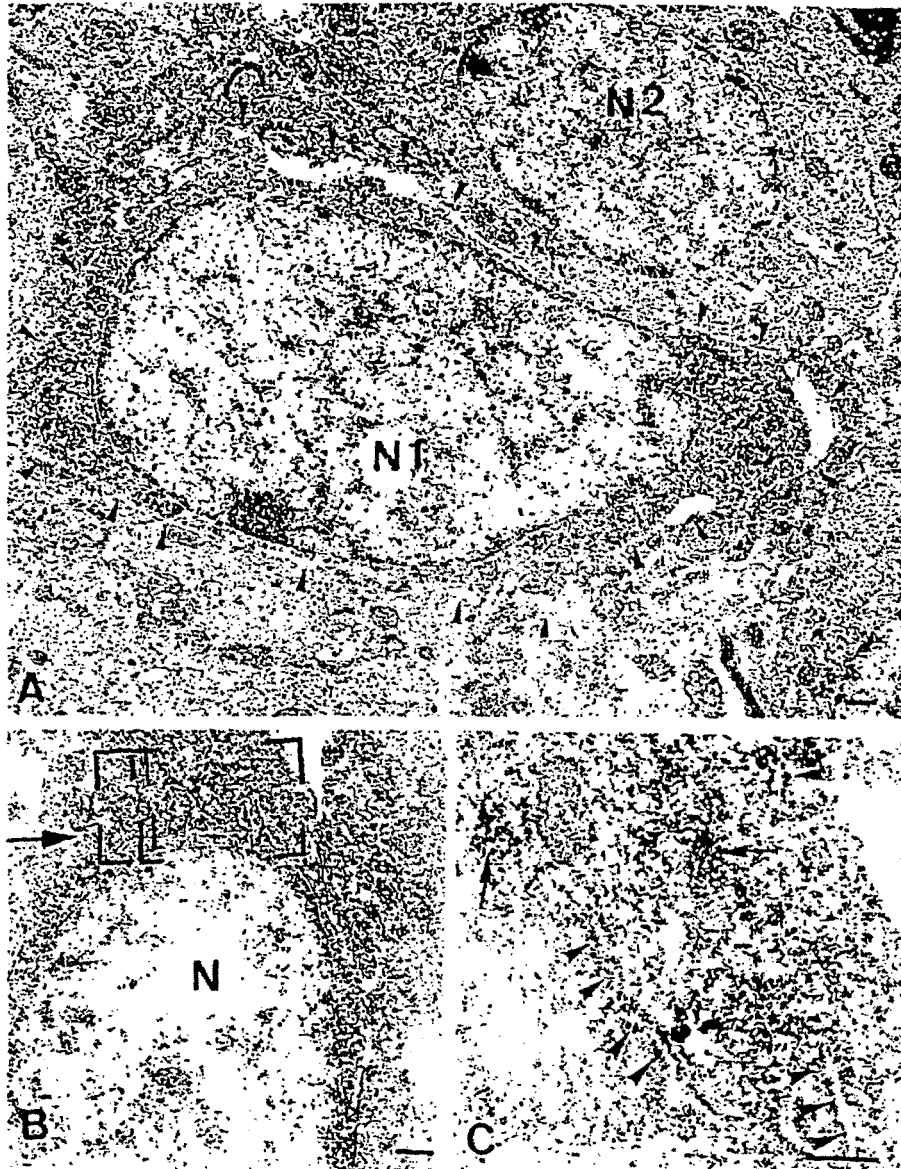


Fig.6

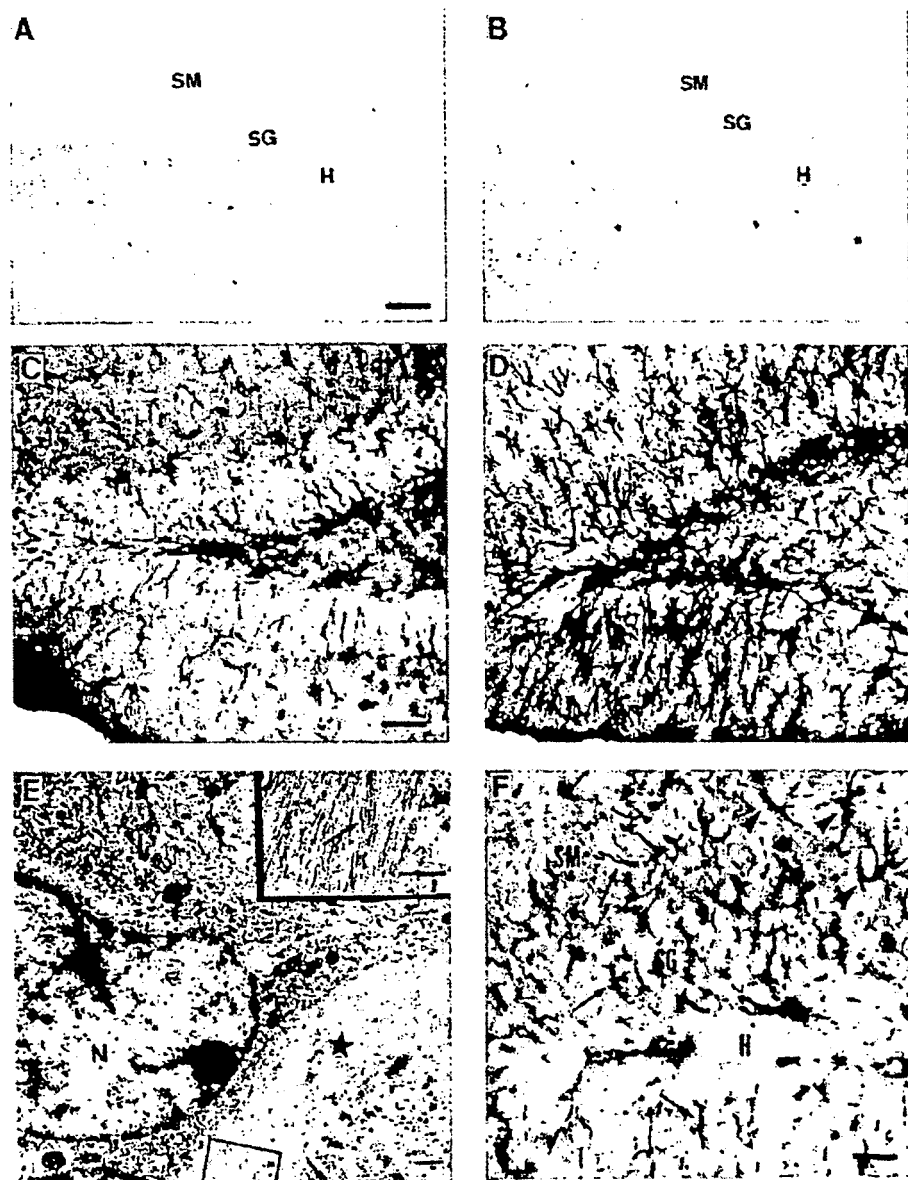


Fig.7