UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA
DIPARTIMENTO DI _SCIENZE CLINICHE APPLICATE E BIOTECNOLOGIE___

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale

Curriculum :Medicina sperimentale, clinica ed endocrinologia

XXXIV ciclo

Titolo della tesi

POTENZIALE RUOLO ONCOGENICO DELLA PROTEINA MULTIFUNZIONALE TAU

SSD MED/04

Dottorando

Letizia Clementi

Coordinatore del corso

Prof.ssa Mariagrazia Perilli

Tutor

Prof. Adriano Angelucci

a.a. 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE …….....5
1.1 La proteina Tau ……..5
1.2 Organizzazione genetica ed espressione ……...6
1.2.1 Isoforme della proteina Tau……....8
1.3 Struttura e funzione dei domini proteici ……..…10
1.3.1 Dominio di proiezione ……...11
1.3.2 Dominio di legame ai microtubuli MTBD……12
1.4 Modificazioni post-trasduzionali …….....14
1.4.1 Controllo della Fosforilazione ……16
1.4.2 Altre modificazioni ……..21
1.6 Aspetti patogeni della proteina Tau…….23
1.7 La proteina Tau e il ciclo cellulare…….27
1.8 La proteina Tau e i tumori…….30

2. SCOPO DEL LAVORO……34

3. MATERIALI E METODI……35
3.1 Colture cellulari.……35
3.2 Anticorpi e reagenti ……...35
3.3 Western blot……36
3.4 Immunofluorescenza……..38
3.5 Citofluorimetria a flusso……..……39
3.6 Vitalità e proliferazione ……40
3.7 Sincronizzazione delle linee cellulari ……40
3.8 Silenziamento della proteina Tau……..41

4. RISULTATI……42
4.1 Espressione del pattern basale della proteina Tau nelle linee cellulari prostatiche…….…….....……..42
4.2 L'inibizione dell'autofagia determina l'accumulo di oligomeri Tau….45
4.3 La formazione di oligomeri tau è associata a danni al DNA…… 48
4.4 L'autofagia protegge dalla citotossicità del Docetaxel ……51
4.5 Espressione del pattern di fosforilazione della proteina Tau nelle linee cellulari prostatiche....……57
4.6 Il Paclitaxel determina l'accumulo della Tau oligomerica iper-fosforilata in fase G2/M …….……...60
4.7 L'inibizione delle chinasi CDK5 potenzia l'effetto citotossico del Paclitaxel ……61
4.8 L'attivazione della fosfatasi PP2A coincide con la progressione del ciclo cellulare…..……..63

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI…… 68

6. BIBLIOGRAFIA……74

RIASSUNTO

La proteina Tau è stata individuata in diversi tumori umani inclusi il carcinoma della prostata, della mammella, dello stomaco, del pancreas e del colon retto dove, mostra una struttura e funzione simili alla più studiata Tau neuronale. La Tau viene considerata una proteina multifunzionale ma, il suo ruolo principale sembra essere quello di assemblaggio e stabilizzazione dei microtubuli. La proteina Tau è codificata dal gene MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau) e a seguito di splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 del trascritto primario, si ottengono sei isoforme. In aggiunta al differenziale processamento del trascritto primario, la proteina Tau è bersaglio di complesse modificazioni post-traduzionali che includono la fosforilazione. Quello che è noto dalla letteratura suggerisce che, il mantenimento dell'omeostasi tra l'attività delle chinasi e delle fosfatasi è fondamentale per regolare l'affinità di legame della proteina ai microtubuli. La perdita di questo equilibrio promuove una fosforilazione anomala della proteina, un evento che è stato associato alle sue funzioni patologiche. La Tau iper-fosforilata non è più in grado di legare la tubulina ma anzi, sembra svolgere un ruolo "infettivo" sequestrando altre forme della proteina e aggregando in strutture progressivamente più grandi e insolubili che compromettono l'integrità cellulare. A tal proposito è noto che l'Alzheimer (condizione patologica che rientra nelle taupatie) è associata a iper-fosforilazione della proteina che, si stacca dai microtubuli con conseguente distruzione del citoscheletro insieme alla formazione e all'accumulo di oligomeri Tau solubili e di grovigli neurofibrillari Tau non solubili.

In questa tesi di dottorato di ricerca abbiamo indagato le possibili implicazioni associate all'equilibrio monomeri/oligomeri e le modificazioni post-traduzionali aberranti che può subire la proteina Tau in un modello diverso da quello delle malattie neurodegenerative come i tumori. In particolare ci si è proposti di investigare come Tau, attraverso la sua associazione ai microtubuli del fuso mitotico e l'accumulo delle forme oligomeriche iper-fosforilate, possa interferire in un tratto distintivo del cancro quale la deregolamentazione del ciclo cellulare. I nostri studi in vitro hanno dimostrato che, in presenza degli inibitori dell'autofagia Clorochina o Bafilomicina, si assiste all'accumulo di oligomeri Tau e contemporaneamente alla formazione di fusi mitotici aberranti, con aumento delle rotture a doppio filamento del DNA. L'inibizione dell'autofagia in mitosi si è quindi rivelata sinergica rispetto all'azione citotossica dei taxani. Tale ipotesi è stata confermata tramite l'eliminazione degli oligomeri per inibizione chimica o per silenziamento della proteina. I nostri dati hanno inoltre evidenziato che la formazione di oligomeri in mitosi è strettamente legata alla fosforilazione di Tau in fase G2/M e che la modulazione delle chinasi e fosfatasi coinvolte è capace di interagire con l'azione degli agenti anti-mitotici. In particolare l'inibizione della CDK5 è risultata svolgere un ruolo chiave nella capacità delle cellule bloccate in fase G2/M di progredire in maniera forzata nelle fasi successive del ciclo.

In conclusione, considerando il nostro studio come preliminare per la comprensione del ruolo di Tau nei tumori, possiamo ipotizzare che Tau, potrebbe rivelarsi importante per la possibilità di migliorare l'efficienza delle terapie antimitotiche, agendo in particolare nella stabilizzazione del fuso mitotico. Quello che sembra più rilevante a livello patologico è il rapporto delle

varie forme post-traduzionali nelle diverse fasi del ciclo cellulare e come questo rapporto, condizioni la resistenza a farmaci antimitotici o la capacità delle cellule tumorali di avanzare durante i checkpoint del ciclo in condizioni aberranti.

- 1 -

INTRODUZIONE

1.1 La proteina Tau

La proteina Tau assembla e stabilizza i microtubuli, rigide fibre che formano il citoscheletro, struttura che mantiene la forma della cellula ed è coinvolta nel trasporto intracellulare e nel processo di divisione. Tra i fattori che si pensa regolino queste funzioni troviamo le proteine associate ai microtubuli MAPs (Microtubule Associated Protein MAPs), che promuovono l'assemblaggio dei microtubuli in vitro e stabilizzano i microtubuli in vivo. Nel cervello, sono state identificate due classi di MAPs, MAP1 (include MAP1A e MAP1B) e MAP2(include MAP2, MAP4 e la proteina Tau). Le MAPs sono presenti in tutti gli eucarioti e sono inoltre altamente conservate nella scala evolutiva in quanto presenti in Caenorabditis elegans, in Drosophila, nei pesci e negli anfibi, ma anche nei roditori, nei bovini, ovini ed infine nelle scimmie e nell'uomo [1,2]. In particolare nell'uomo, esse sono prevalentemente abbondanti nei neuroni ma, sono anche espresse in alcuni tessuti non neuronali periferici quali cuore, rene, polmone, muscolo, pancreas, testicolo e fibroblasti [3,1]. La proteina Tau è abbondantemente espressa nel sistema nervoso periferico (SNP) e centrale (SNC) a livello degli assoni, dei neuroni in crescita e maturi ed in quantità minore anche negli oligodendrociti e negli astrociti e regola l'assemblaggio e la manutenzione dei microtubuli, la crescita dei neuriti, l'allungamento assonale e il trasporto assonale [4].

1.2 Organizzazione genetica ed espressione

La proteina Tau umana è codificata dal gene MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau) localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q21) che si estende per circa 100 Kb. La proteina Tau prevalente nel cervello umano deriva da 16 esoni infatti, grazie allo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 si formano sei trascritti di mRNA che vengono tradotti in sei isoforme. Tali isoforme variano dai 352 ai 441 aa in lunghezza, con un peso molecolare apparentemente compreso tra i 50 e i 70 kDa. Le isoforme più piccole danno plasticità al citoscheletro, mentre quelle più lunghe le stabilizzano. L'analisi di restrizione e il sequenziamento del gene, mostrano che esso contiene due isole CpG, una associata con il promotore, caratteristica tipica di quelli neurone-specifici, l'altra con l'esone 9. Sono presenti inoltre due regioni omologhe alle sequenze murine Alu. La sequenza del promotore è priva della sequenza consenso TATA, caratteristica tipica di geni evolutivamente conservati (housekeeping) che esibiscono multipli siti d'iniziazione. In prossimità del primo sito di inizio della trascrizione, sono presenti infine siti consenso per i fattori SP1 e AP2, responsabili dell'inizio della trascrizione in promotori privi di sequenza TATA [1,2]. Come accennato le diverse isoforme espresse nel sistema nervoso centrale (SNC) derivano dal processo di splicing alternativo nel trascritto primario [5,6]. Dei 16 esoni del trascritto primario, tre (4A, 6 e 8) non sono presenti nel mRNA cerebrale. L'esone -1 è parte del promotore, è trascritto, ma non tradotto, così come l'esone 14. Gli esoni 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 e 13 sono esoni costitutivi in quanto sono presenti nel trascritto maturo. Gli esoni 2, 3 e 10 vanno incontro a splicing alternativo dando origine a sei diverse isoforme comprese in un intervallo da 352 a 441 residui amminoacidici di lunghezza. Le

trascrizioni MAPT sono espresse in modo differenziale nel sistema nervoso, a seconda dello stadio di maturazione neuronale e del tipo di neurone [5] (Figura1).

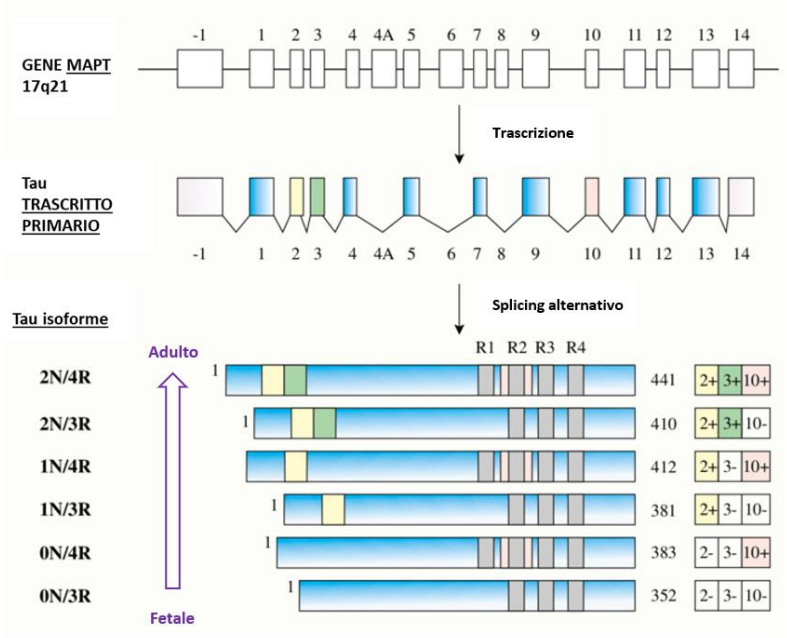


Figura 1: *Rappresentazione schematica del gene, del trascritto primario e delle isoforme di tau. Sono mostrate le isoforme fetali e adulte di tau. (Tratta e modificata da Fei Liu et al. 2006 Panminerva Medica 48(2):97-108)*

1.2.1 Isoforme della proteina Tau

Il differente processamento dell'esone 10 produce isoforme di tau con tre (esone 10- ,R2 assente) o quattro (esone 10+ ,R2 presente) domini ripetuti, note rispettivamente come isoforme 3R e 4R tau. R1, R3 e R4 sono codificati dagli esoni 9–12 e insieme a R2 codificato dal 10 sono i domini funzionali che permettono l'interazione fra tau e i microtubuli e consistono in ripetizioni di circa 18 aminoacidi separate da brevi sequenze interposte di 13-14 aminoacidi di lunghezza [6,7,8,9]. In aggiunta, il processamento differenziale degli esoni 2 e 3 genera isoforme di Tau 3R e 4R senza inserto (0N), con un inserto di 29 aminoacidi (1N) o di 58 aminoacidi (2N) di funzione non nota. Pertanto, le sei diverse isoforme sono note come 2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+ e rispettivamente possono essere denominate [10]. Per una semplificazione la loro denominazione 0N/3R, 0N/4R, 1N/3N, 1N/4R, 2N/3R, 2N/4R [11]. Nel cervello umano adulto, il rapporto stechiometrico tra le isoforme 3R e 4R, è circa 1 e le isoforme 1N, 0N e 2N sono rappresentate intorno al 54%, 37% e 9% rispettivamente sul totale di proteine Tau [12]. Quindi, in condizioni normali le isoforme sono tutte espresse e lo splicing degli esoni 2, 3 e 10 è rigorosamente regolato in modo tale da mantenere un livello eguale tra le isoforme 3R e 4R . L'alterazione del rapporto fra le isoforme promuove patologie neurodegenerative con la formazione di aggregati intra-neuronali insolubili di proteina Tau. Ciascuna delle isoforme ha probabilmente un particolare ruolo fisiologico poiché sono differentemente espresse durante lo sviluppo. Infatti nel cervello fetale è espressa solo l'isoforma più corta (3R/0N), mentre nel cervello adulto sono rappresentate tutte le altre 6 isoforme anche se, possono essere non egualmente espresse e diversamente distribuite in

sottopopolazioni neuronali [10]. Questo cambiamento evolutivo nell'espressione si traduce in un'elevata plasticità neuronale a livello cellulare e tissutale. Poiché le isoforme 4R legano i microtubuli ed assemblano in essi più stabilmente e più efficientemente (circa tre volte) delle isoforme 3R, la diversa modulazione dell'espressione durante il neuro-sviluppo, da fetale verso adulto, suggerisce una differente necessità funzionale di interazioni Tau-microtubuli, finalizzata a mantenere la stabilità dinamica del citoscheletro neuronale [11,13,14]. Nel sistema nervoso periferico è presente un'isoforma di tau ad alto peso molecolare (circa 120 kDa), che esprime l'esone 4A nella regione N-terminale chiamata big Tau [15,16]. Le isoforme di Tau esibiscono moduli amminoacidici diversi che differentemente ne influenzano la funzione biologica: gli esoni 2 e 3 modulano l'interazione con la membrana [17], l'esone 4a altera la spaziatura tra i microtubuli [18], l'esone 6 codifica per un dominio ricco in proline ed influenza l'elongazione neuritica [19], l'esone 10 infine aumenta l'affinità di tau per i microtubuli [8] ed è importante nella transizione dal più instabile citoscheletro fetale a quello più rigido tipico dell'adulto. Tali domini esibiscono inoltre numerosi potenziali siti di fosforilazione, una modificazione post-traduzionale che, come descritto successivamente, controlla la funzione biologica delle proteine Tau.

1.3 Struttura e funzione dei domini proteici

Le diverse isoforme di Tau sono proteine modulari, costituite cioè da diversi motivi funzionali. La Tau è una proteina di natura basica, tuttavia presenta dei residui nella parte N-terminale di natura acida e altri di natura neutra nella parte C-terminale. L'asimmetria delle cariche è fondamentale da un lato, nell'interazione con i microtubuli ed altre proteine e dall'altro, per il ripiegamento interno e l'aggregazione della proteina stessa. Possiamo quindi distinguere nella struttura della proteina Tau una regione acida amminica (N)-terminale e una regione ricca di prolina che insieme formano il dominio di proiezione, un dominio di legame dei microtubuli (MTBD) e una regione basica C-terminale che insieme formano il dominio di assemblaggio (Figura 2). Così, la proteina tau è un dipolo con due domini che hanno una carica opposta [20, 21].

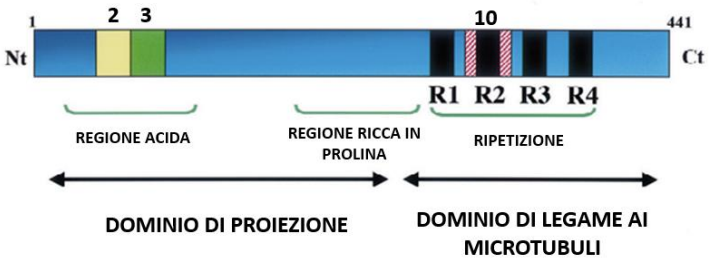


Figura 2 : *Rappresentazione schematica dei domini funzionali dell'isoforma Tau umana più lunga. Il dominio di proiezione, che include una regione acida ed una regione ricca in prolina, interagisce con i componenti del citoscheletro per determinare lo spazio tra i microtubuli negli assoni. La porzione C-terminale, denominata regione di legame ai microtubuli, regola la velocità di polimerizzazione dei microtubuli. (Tratto e modificato da Mehmet Ozandsoy et al. 2007 10/2 Balkan Journal of Medical Genetics 3-14)*

1.3.1 Dominio di proiezione

Il dominio di proiezione è prodotto da due sequenze di 29 aminoacidi codificate dagli esoni 2 e 3 del gene MAPT conferendo una diversa lunghezza all'N-terminale della proteina tau [22]. Il dominio include circa due terzi della intera proteina ed, a sua volta, può essere ulteriormente suddivisa in due subregioni: la regione più prossimale, che esibisce un'alta proporzione di residui amminoacidici acidi, e quella adiacente più distale (dei residui 150-240), che invece è altamente basica in quanto ricca in motivi PPXXP o PXXP, sequenze note per mediarne l'interazione con proteine contenenti domini SH3 come le tirosin-chinasi non recettoriali appartenenti alla famiglia src e fyn. Il dominio di proiezione possiede gli inserti 1N/2N. Sono stati proposti numerosi ruoli per questo dominio:

- Interazione con i componenti del citoscheletro per determinare lo spazio tra i microtubuli, negli assoni e nei dendridi neuronali [18].
- Essendo un dominio di proiezione esso protrude dalla superficie dei microtubuli quando tau è ad essi ancorata, consentendo l'interazione con altri elementi citoscheletrici, organelli citoplasmatici, la membrana plasmatica e influenzare il legame della chinesina e di altri motori proteici chinesina-simili sui microtubuli [17].
- Interagendo con la membrana plasmatica, lega anche proteine implicate in importanti vie di trasduzione del segnale quali fyn, un membro della famiglia di tirosin-chinasi non recettoriali della famiglia src, PLC-γ e PLA2, fosfolipasi di membrana implicate nella produzione di importanti secondi messaggeri intracellulari [23].

1.3.2 Dominio di legame ai microtubuli (MTBD)

Il dominio C-terminale si lega ai microtubuli e promuove il loro assemblaggio per questo è chiamato "dominio di assemblaggio" o "dominio di legame ai microtubuli" [24]. Le proteine Tau forniscono al microtubulo la propria identità e le proprie caratteristiche fisiche (rigidità, lunghezza, stabilità e capacità di interazione con altri organelli). Pertanto, regolando l'assemblaggio dei microtubuli, le proteine Tau possono avere un ruolo nel garantirne la corretta citoarchitettura, nel modulare l'organizzazione funzionale del neurone, e in particolare nella morfologia assonale, crescita e polarità assonale. Il dominio di legame ai microtubuli contiene tre (3R) o quattro (4R) sequenze ripetute, dovute allo splicing dell'esone 10, di 31 o 32 residui [8]. La Tau è in grado di promuovere la nucleazione, la crescita e il raggruppamento dei microtubuli [25, 26]. Il ruolo di Tau nello stabilizzare i microtubuli è stato inequivocabilmente dimostrato in quanto, eliminando la sua funzione in cellule neuronali mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso, si interferiva significativamente con i processi di elongazione e crescita neuritica [27]. La proteina Tau stabilizza i microtubuli interagendo con la tubulina in due modi:

- Attraverso le sue isoforme. Le sequenze ripetute legano direttamente i microtubuli attraverso la loro carica netta positiva che interagisce con i residui caricati negativamente dei monomeri di tubulina. Quindi la forza trainante di questa associazione è l'interazione elettrostatica tra i residui di Lys caricati positivamente negli MBD e microtubuli caricati negativamente [28]. In base a quanto descritto le isoforme a quattro ripetizioni (4R) promuovono più efficacemente l'assemblaggio dei microtubuli rispetto a quelle a tre ripetizioni (3R) [12]. La porzione che promuove in modo più forte la polimerizzazione è

l’inter-regione tra R1 e R2. Questa inter-regione è esclusiva delle isoforme 4R specifiche dell’adulto ed è responsabile della differenza di affinità di legame (circa 40 volte) tra le tau 3R e le 4R [29]. In conclusione il numero di ripetizioni di legame all’estremità C-terminale influenza l’affinità di tau per i microtubuli (Figura 3).

- Attraverso la fosforilazione. La fosforilazione può neutralizzare la carica positiva [30], alterare la conformazione e staccare la Tau dai microtubuli [31]. Questo potrebbe essere il motivo per cui la Tau non è legata ai microtubuli quando è iper-fosforilata. La regione C-terminale ha un ruolo nel modulare lo stato di fosforilazione delle proteine Tau stesse. Infatti la sequenza di Tau 2N4R, inclusa tra i residui 224 e 236 è sia sito di legame ai microtubuli che di interazione con la protein-fosfatasi 2A (PP2A), cosicché il citoscheletro potrebbe indirettamente inibire l’attività della PP2A competendo per il legame di Tau su tale dominio [32].

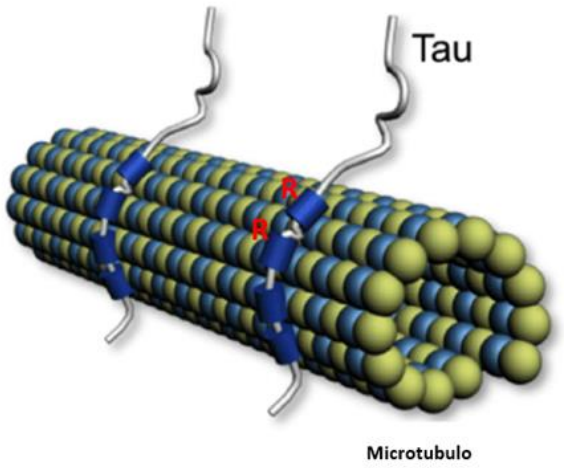


Figura 3: *Rappresentazione schematica del legame della proteina Tau con i microtubuli. (Tratto e modificato da Valerie Vingtdeux 2012;3:229 frontiers in Physiology)*

L’interazione tra Tau e i microtubuli può avvenire con due diverse modalità:

- Diretta, in cui o la Tau si lega sulla superficie esterna dei microtubuli precedentemente già assemblati [33] o, incubata con la tubulina, è incorporata nei microtubuli in crescita come una struttura integrale [34].
- Indiretta, in cui la tau è influenzata da altre proteine che possono o non possono interagire con i microtubuli da sole. Queste interazioni possono richiedere il dominio di proiezione di Tau [35,36].

1.4 Modificazioni post-trasduzionali

In aggiunta al differenziale processamento dell’mRNA, le proteine Tau esibiscono complesse modificazioni post-traduzionali (PTM) che includono fosforilazione, glicazione, nitrazione, o-GlcNAcilazione, acetilazione, ossidazione, ubiquitinazione, sumoilazione, metilazione e troncamento. Le modifiche post-trascrizionali sono proposte come la causa principale del meccanismo attraverso il quale la proteina Tau diventa un'entità non funzionale. Tutte le modificazioni, eccetto la glicazione, sono presenti a basso livello in condizioni fisiologiche [37]. Infatti, un livello normale di fosforilazione è richiesto per la funzione ottimale della Tau, mentre una Tau iper-fosforilata perde la sua attività biologica [38]. Queste modificazioni causano anche l’acquisizione di nuove funzioni potenzialmente tossiche da parte della proteina, quali ad esempio il sequestro della stessa Tau e/o delle MAP1A/MAP1B e MAP2, inducendo il collasso del citoscheletro e l’inibizione del trasporto

assonale [39]. La Ser 199/202/205, Thr-212/231, Ser235/262/356 e Ser404 sono i siti che più criticamente sono coinvolti nella conversione di Tau in una proteina dannosa. L'aumento del grado di fosforilazione nella Tau è indipendente dall'incremento dei livelli totali d'espressione della proteina [40].La fosforilazione sito-specifica delle proteine Tau è la più importante tra tutte le modificazioni post-traduzionali, in quanto:

- controlla l'affinità di Tau per i microtubuli. Come detto precedentemente, alcuni eventi di fosforilazione cambiano lo stato conformazionale della tau [41], altri portano a una diminuzione del legame con i microtubuli abbassando la sua attività nel promuoverne l'assemblaggio e quindi promuovendo l'instabilità dinamica dei microtubuli [26,42,43].
- è regolata da un equilibrio di attività tra diverse protein-chinasi e fosfatasi. L'iper-fosforilazione anormale di Tau potrebbe essere il risultato di un' up-regulation della Tau chinasi o di una down-regulation della Tau fosfatasi.
- è infine modulata durante il neuro-sviluppo, come lo splicing alternativo del trascritto primario. La fosforilazione di Tau è alta nei neuroni allo stadio fetale e diminuisce progressivamente con l'avanzare dell'età a causa della comparsa delle isoforme adulte e della modificazione del rapporto tra chinasi e fosfatasi, per attivazione delle fosfatasi [44].

1.4.1 Controllo della fosforilazione

L'isoforma più lunga della proteina Tau umana (441 residui/2N4R) contiene circa 85 siti di fosforilazione in residui di serina (45 Ser, S) e treonina (35 Thr, T) e 5 residui di tiroxina (Tyr, Y), molti dei quali strettamente mappanti nelle regioni fiancheggianti il dominio di legame ai microtubuli (adiacenti ai residui di prolina) (Figura 4).

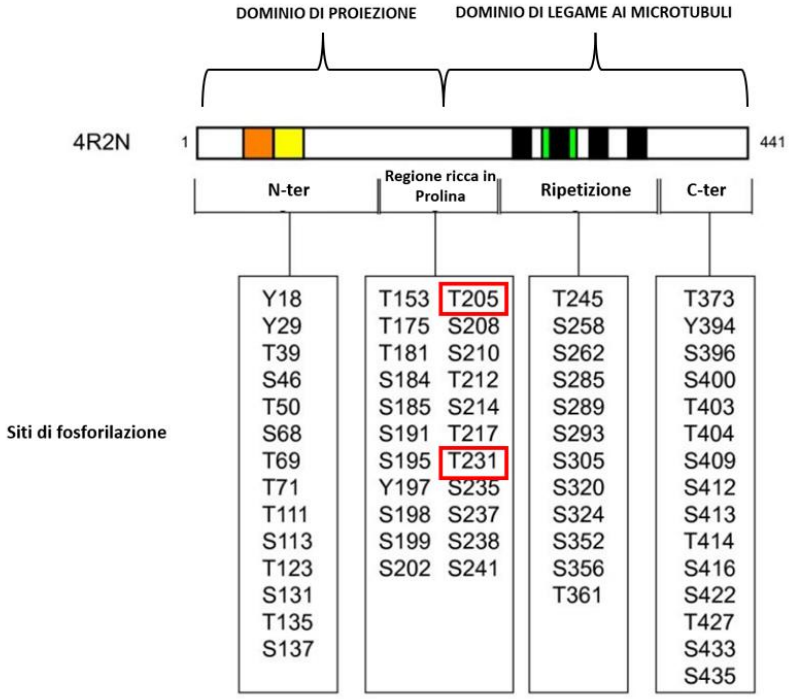


Figura 4: *Rappresentazione dei siti di fosforilazione della Tau più lunga 2N4R. La maggior parte dei siti di fosforilazione sono raggruppati nella la regione ricca di prolina. Sono evidenziati in rosso il residuo Thr-231 e Thr-205 presi in considerazione nella nostra ricerca. (Tratto e modificato da Tania F Gendron 2009 Molecular Neurodegeneration)*

Circa il 20% della molecola può essere potenzialmente fosforilata. La fosforilazione di tau ai residui Ser-262, Thr-231 e Ser-235 inibisce la sua capacità di legare i microtubuli di circa 35%, 25% e 10% rispettivamente [45]. La fosforilazione ai siti Thr-231, Ser-396 e Ser-422 promuove l'aggregazione reciproca di Tau in filamenti. E' stato ipotizzato infatti che un evento iniziale di fosforilazione, diminuendo l'affinità di Tau per i microtubuli, aumenta il pool di Tau libera o non legata, rendendola così disponibile a successive fosforilazioni che la fanno. Lo stato di fosforilazione della Tau è una conseguenza dell'equilibrio tra la quantità e l'attività delle proteine chinasi e delle fosfatasi (Figura 5). Le chinasi che lavorano sulla proteina Tau sono divise in due gruppi principali: chinasi prolina dirette (PDPK) e non-prolina dirette (NPDPK) [46]. Al primo gruppo appartengono la glicogeno sintasi chinasi 3β (GSK3β) , la chinasi ciclina-dipendente 5 (CDK5) , una MAP chinasi (p38), JNK e altre stress chinasi. Al secondo gruppo troviamo la protein chinasi calcio-calmodulina-dipendente (CaMKII), la protein chinasi C (PKC), la casein chinasi I e II, la PKA (AMPc-dependent-protein kinase), CDC2-cyclin-A chinasi, la Tau tubulin-chinasi, la protein-chinasi DNA a doppia elica-dipendente, MARK (microtubule-affinity regulating kinase), PKB (protein kinase B o Akt) Rho-chinasi e tirosin chinasi come le chinasi della famiglia Src, tra cui Src, Fyn e c-Abl [46,44]. La fosforilazione da parte delle NPDPK avviene all'interno della regione di legame ai microtubuli e né risulta in una diminuzione del legame [47], mentre le PDPK sembrano influenzare l'auto-aggregazione di Tau [48]. GSK-3β e CDK5, sono chinasi espresse ad alto livello nel cervello, ed entrambe sono associate a tutti gli stadi di patologia neurofibrillare in casi accertati di AD [49,50]. La glicogeno sintasi chinasi-3b (GSK-3) appartiene alla classe delle

PDPK ed è una serina/treonina specifica la cui attività è regolata dalla fosforilazione. GSK-3 è inattivata attraverso la fosforilazione della serina 21 (isoforma GSK-3α) o della serina 9 e 389 (isoforma GSK-3β). L'attivazione di GSK-3 dipende dalla fosforilazione alla tirosina 279 (GSK-3α) o alla tirosina 216 (GSK-3β) [40,46]. Questa chinasi può modificare più di 30 siti di fosforilazione e la sua sovra-espressione nel cervello del topo ha provocato iper-fosforilazione e neuro-degenerazione della Tau [40,51,52].La fosforilazione al residuo bersaglio Thr-231 da parte di GSK-3β regola l'abilità di Tau nel legare e stabilizzare il citoscheletro [53], portando ad una diminuzione notevole della capacità della Tau di legare i microtubuli. L'inibizione di GSK3β attraverso la somministrazione del litio non è sufficiente a modificare la propensione all'aggregazione intrinseca della Tau durante il decorso patologico [54,55]. Per GSK-3β sono stati ipotizzati due tipi di meccanismi di fosforilazione: uno richiede una fosforilazione precedente del substrato da parte di un'altra chinasi (fosforilazione innescata) e che sembra essere quello utilizzato nella regione di legame ai microtubuli (Thr-231) e l'altro, diretto, che non sembra avere effetti sui microtubuli (Ser-396 o -404) [56]. GSK-3β gioca inoltre anche un ruolo importante nella catabolismo e quindi nella degradazione di Tau da parte del proteasoma: la fosforilazione di Tau da parte di tale chinasi ne causa infatti il legame di Hsc70 e il reclutamento da parte della E3 ubiquitin-ligasi CHIP, con conseguente ubiquitinizzazione e degradazione [57]. Nella Tau sono stati identificati 42 siti fosforilabili di GSK-3b. Tra questi, 29 sono fosforilati nel cervello della malattia di Alzheimer (AD) [52,58,59]. Questi e altri risultati forniscono prove estremamente forti che la Tau è un substrato in vivo di GSK-3β e che la fosforilazione anormale della Tau da parte di GSK-3β potrebbe

contribuire ai processi neurodegenerativi dell'AD. La chinasi ciclina-dipendente 5 (CDK5) è una serina/treonina chinasi. L'attività di CDK5 è regolata dalla fosforilazione. La fosforilazione alla tirosina 15 attiva CDK5, in contrasto con la fosforilazione alla treonina 14 e alla serina 159 che inibisce l'attività di CDK5 [60]. Inoltre, l'attivazione di CDK5 richiede l'interazione molecolare con le subunità p39 o p35 o meglio, con i loro prodotti proteolitici p29 o p25, che sono proteine regolatorie generate nei neuroni post-mitotici per taglio da parte della calpaina. I p25 e p29,sono più stabili dei p35 o p39 e quindi causano un effetto più prolungato attivazione di CDK5. Il p25 differisce poi da p35 in due aspetti. Mentre p35 è N-miristoilato e pertanto membrana-associato, p25 è largamente citosolico e colocalizza con la Tau iper-fosforilata nei NFTs. Sulla base della diversa localizzazione cellulare è stato ipotizzato che CDK5/p25 fosforila Tau meglio che CDK5/p35, dato che Tau è una proteina che sporge largamente nel citosol. La p25/CDK5 oloenzima fosforila la Tau e riduce la sua capacità di legarsi ai microtubuli, altera la morfologia delle cellule, provoca la distruzione del citoscheletro e morte cellulare apoptotica [60,61]. CDK5 sembra anche essere coinvolto nella regolazione della fosforilazione di Tau da parte di GSK-3b. Tau, CDK5 e GSK-3b sono componenti di un complesso di 450 kDa in cui CDK5 fosforila Tau e la prepara per la fosforilazione da parte di GSK-3b[62]. Le fosfatasi proteiche (PP) responsabili della defosforilazione della Tau sono PP1, PP2A (protein Ser/Thr phosphatase type 2A), PP2B (calcineurina) e PP5 [63]. Tra questi, PP2A è noto per rappresentare circa il 70% dell'attività della fosfatasi Tau nel cervello umano [64]. La ridotta attività di PP2A osservata nel cervello di AD può contribuire a un'anormale iper-fosforilazione della Tau [65,66]. PP2A contiene una subunità C catalitica, una subunità A e una subunità

regolatrice PR55/Bα (PP2AT55α) e defosforila Ser202/Thr205 e Thr231. La PP-2A è inibita da due proteine termostabili. La prima è I-1PP2A, una proteina citosolica di 30KDa e la seconda è I-2PP2A una proteina nucleare di 39KDa. Nel cervello di pazienti AD, è stata osservata un'alterata traslocazione dal nucleo al citosol, della I-2PP2A. Il livello di I-1PP2A, che interagisce con il sito catalitico della PP-2A, è diminuito di circa il 20% nei cervelli di casi AD, rispetto a quelli di controllo di anziani di pari età non-dementi, un decremento che probabilmente è causa della riduzione dell'attività enzimatica della PP-2A, già riportata in tale malattia [39]. L'acido okadaico è spesso usato per inibire l'attività cellulare di PP1 e PP2A e elevare i livelli di Tau iper-fosforilata in modelli cellulari e animali in coltura [67]. Il ruolo di PP2A nella defosforilazione di Tau, inoltre, supportato dall'osservazione che PP2A localizza nei microtubuli dove è direttamente legata alla proteina [64].

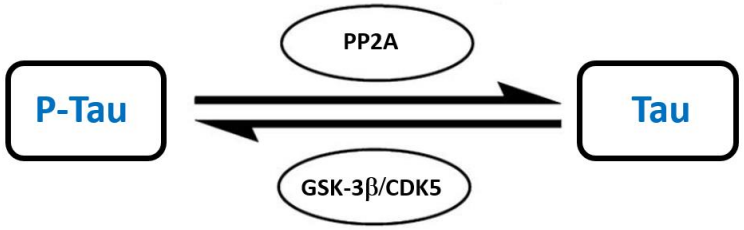


Figura 5: *Rappresentazione schematica dell'equilibrio delle chinasi / fosfatasi nella modulazione della fosforilazione di Tau sul residuo Thr231*

1.5.2 Altre modificazioni

Lo stato di fosforilazione della Tau è influenzato da altre modificazioni post-traslazionali. La sequenza temporale di glicosilazione, glicazione, nitrazione, ossidazione, poliaminazione, sumoilazione e ubiquitinazione non è chiara, ma queste modifiche sembrano verificarsi prima dell'eccessiva fosforilazione della Tau e della formazione di NFT [68]. Le modifiche della Tau ai residui di Lys, tra cui acetilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e metilazione, sono emerse come PTM altrettanto importanti nella regolazione l'aggregazione patologica [69]. Ad esempio nella glicosilazione gli oligosaccaridi si attaccano covalentemente alla catena laterale dei polipeptidi con la catalisi di diversi enzimi. Galattosio, mannosio, N-acetilglucosamina e acido sialico sono i principali monosaccaridi che modificano la Tau [70]. Secondo la natura dei legami glicosidici, possiamo distinguere due tipi di glicosilazione: O-linked (in cui gli zuccheri sono legati ai gruppi idrossilici dei residui di serina o treonina) e N-linked (in cui gli zuccheri sono legati al gruppo ammidico di catena laterale dell'asparagina delle proteine). La N-glicosilazione di Tau si ha nella forma iper-fosforilata, mentre la forma non modificata può essere O-glicosilata [71]. Il primo passo nella cascata di eventi che portano alla modifica finale della tau è una down-regulation della glicosilazione Tau che causa cambiamenti conformazionali che portano all'esposizione dei siti per la fosforilazione. La down-regolazione della glicosilazione è seguita dall'iperattivazione di GSK3β che così attivata, a sua volta facilita la fosforilazione anormale di Tau [72]. Inoltre, la glicazione innesca la produzione di radicali liberi che amplificano lo stress ossidativo s, che a sua volta aumenta la fosforilazione della tau [73]. La glicosilazione aberrante può precedere l'iper-

fosforilazione di Tau nel cervello di AD. Quando l'AD-Tau è stata usata come substrato per la fosforilazione in vitro con GSK-3b, CDK5 rispettivamente, è stato scoperto che l'AD-Tau deglicosilata veniva fosforilata ad un tasso inferiore e in misura minore rispetto al controllo trattato AD-Tau [74]. AD P-tau, che è anormalmente iper-fosforilata e glicosilata, viene usata come substrato per PP2A e PP5 dopo la deglicosilazione, ed è stato riscontrato che l'AD P-tau deglicosilato è stato defosforilato ad un tasso più veloce e in misura maggiore in alcuni siti di fosforilazione [74]. Quindi l'aberrante glicosilazione facilita l'iper-fosforilazione della Tau sia promuovendo la fosforilazione che inibendo la defosforilazione della proteina. Tau è anche O-GLcNAcilata. La O-GLcNAcilazione, che, diversamente dalla N- e O-glicosilazione, implica l'aggiunta di un singolo zucchero a residui amminoacidici di serina/treonina, modifica post-traduzionalmente sia proteine nucleari che citoplasmatiche, con una modalità dinamica analoga alla fosforilazione. La O-GLcNAcilazione e la fosforilazione si regolano reciprocamente. Nell'AD, probabilmente a causa di un alterato trasporto intracellulare e/o metabolismo del glucosio, la O-GLcNAcilazione di Tau è significativamente ridotta e la diminuzione del metabolismo del glucosio nelle cellule in colture e nel topo, produce un'anormale iper-fosforilazione di tale proteina [75].

1.6 Aspetti patogeni della proteina Tau

La Tau è una proteina nativamente spiegata, altamente solubile e mostra poca tendenza all'aggregazione. Tuttavia, quest'ultima è caratteristica di diverse malattie neurodegenerative note come taupatie, che attualmente colpiscono quasi 30 milioni di persone. Questo gruppo eterogeneo comprende il morbo di Alzheimer, la taupatia primaria legata all'età, la paralisi sopranucleare progressiva, l'encefalopatia traumatica cronica, la demenza frontotemporale con parkinsonismo legato al cromosoma 17, la degenerazione corticobasale, complesso Parkinson-demenza di Guam, morbo di Pick e altre malattie che colpiscono il cervello. Le taupatie sono caratterizzate da un metabolismo anormale della proteina Tau mal ripiegata, che si traduce nella auto-aggregazione e formazione di grovigli neurofibrillari che si accumulano all'interno della cellula. I meccanismi di degenerazione neurofibrillare nell'AD e in altre taupatie sono:

- Modello di perdita di funzione: disfunzione di Tau come MAP, e quindi non capacità di regolare l'instabilità dinamica dei microtubuli.
- Modello di acquisizione di nuove funzioni: diretta citotossicità della proteina alterata.
- Modello di aggregazione della proteina tau (In tutti questi disordini neurodegenerativi umani, come anche nei modelli animali in condizioni sperimentali indotte, gli aggregati di tau sono sempre anormalmente iper-fosforilati, indicando dunque che alcuni eventi specifici di fosforilazione ne possono significativamente aumentare la tendenza a fibrillare).

Sebbene i livelli di fosforilazione della proteina Tau aumentino durante lo sviluppo, nei cervelli AD l'estensione della fosforilazione sito-specifica aumenta di circa quattro volte rispetto ai valori normali. Infatti, in condizioni fisiologiche, la Tau è in costante equilibrio dinamico con i microtubuli e l'affinità della proteina è principalmente controllata dal suo stato di fosforilazione (equilibrio funzionale tra chinasi e fosfatasi). In condizioni patologiche, l'equilibrio di legame di Tau ai microtubuli è perturbato causando un aumento dei livelli citosolici della frazione non-legata della proteina, la quale è così più esposta al taglio proteolitico da parte di diverse proteasi cellulari e/o a profondi cambiamenti conformazionali che innescano i processi di oligomerizzazione e aggregazione dalla proteina, promuovendo la neuro-degenerazione [76]. La tau patologica induce neurotossicità a causa della sua perdita di funzione, del guadagno di funzioni tossiche o della sua localizzazione errata. Le conseguenze patologiche di tale cascata di eventi produce: la destabilizzazione dei microtubuli, alterazione del trasporto assonale di sostanze [77], disfunzione postsinaptica, compromissione della segnalazione cellulare e, di conseguenza, ne derivano danni cognitivi [78]. La fosforilazione anomala converte la Tau da una molecola biologicamente funzionale in una proteina tossica, che da un lato sequestra il pool endogeno di Tau legato ai microtubuli e dall'altro si aggrega in strutture progressivamente più grandi e insolubili. Il processo di fibrillazione di Tau, è convenzionalmente suddiviso in più stadi sequenziali: nel primo, la fisiologica funzione di legame della Tau ai microtubuli è abrogata, cosicché la proteina si accumula all'interno della cellula suggerendo che, l'aggregazione può essere un evento concentrazione dipendente oltre che determinato da una perdita di omeostasi della fosforilazione della proteina. Nel secondo stadio,

raggiunta la concentrazione critica, i monomeri di tau non ripiegati, privi cioè di alcuna struttura secondaria, oligomerizzano transitando, attraverso profondi e lenti cambi conformazionali, in strutture a foglietto-β (piccoli oligomeri tau solubili). Quanto detto si realizza inizialmente con l'interazione monomero-monomero per formare i dimeri. La dimerizzazione coinvolge interazioni tra motivi esapeptidi nelle ripetizioni 2 e 3 (R2-R3) o i residui di cisteina presenti nel dominio MTB, che guidano il cambiamento conformazionale da una struttura disordinata e spiegata, ad una struttura ricca di β-foglietti con capacità di aggregazione. Il terzo stadio prevede la formazione di strutture più mature cioè i piccoli oligomeri solubili e i monomeri di Tau formano oligomeri di Tau granulari (GTO) che interferiscono stericamente con i normali meccanismi di traffico intracellulare. Infine, l'ultimo stadio coinvolge la nucleazione dei filamenti Tau cioè piccoli oligomeri e GTOs formano filamenti elicoidali appaiati (PHF), le strutture patologiche osservate nell'AD, che a loro volta si raggruppano in grovigli neurofibrillari (NFT) che portano alla morte neuronale [79,80] (Figura 6). In conclusione l'iper-fosforilazione anormale è sufficiente di per sé a causare il reciproco assemblaggio e l'aggregazione di Tau nei filamenti, e tale modificazione post-traduzionale può essere il meccanismo molecolare principalmente responsabile della formazione di tali lesioni patologiche, nell' AD e in altre taupatie [39].

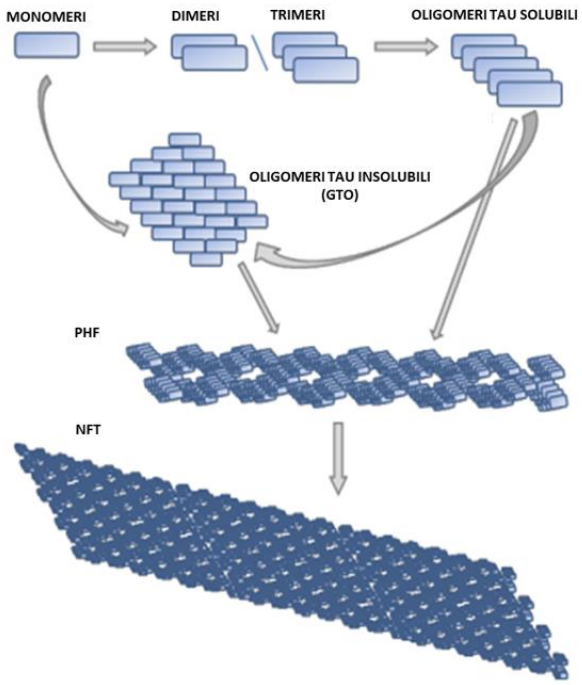


Figura 6: *Sequenza proposta di fasi che portano alla patologia tau. Distacco della tau dai microtubuli aumenta la quantità di monomeri di tau mal ripiegati. I monomeri si aggregano in piccoli oligomeri tau solubili. I piccoli oligomeri di tau solubile e i monomeri di tau possono procedere a formare oligomeri di tau granulari (GTO). Probabilmente entrambi, piccoli oligomeri e GTOs formano filamenti elicoidali appaiati (PHF). Successivamente i PHF si aggregano spontaneamente in grovigli neurofibrillari (NFT).(Tratto e modificato da Catherine M.Cowan 2013 frontiers in Neurology)*

1.7 La proteina Tau e il ciclo cellulare

L'organizzazione dei microtubuli cambia notevolmente a seconda delle loro diverse funzioni nel ciclo cellulare [81]. Nelle cellule in interfase i microtubuli sono responsabili del mantenimento dell'architettura cellulare e del trasporto intracellulare mentre, durante la mitosi formano l'apparato del fuso che assicura la formazione di due cellule figlie. La transizione dalla interfase alla mitosi, richiede la rapida riorganizzazione della rete di microtubuli [82] ed è accompagnata da cambiamenti nelle loro proprietà dinamiche [83,84]. Il dimero della tubulina e i microtubuli sono i componenti chiave nella formazione del fuso mitotico. Il processo si basa sulla realizzazione di un fuso bipolare a base di microtubuli che funge da struttura meccanica primaria per guidare la convergenza cromosomica lungo il piano mediano della cellula in metafase e per l'uguale segregazione del DNA in due cellule figlie [85]. Esistono tre elementi chiave per la corretta funzione del fuso dei microtubuli: i poli del fuso, il fuso stesso dei microtubuli e i cinetocori. I poli del fuso, ancorano le estremità meno dei microtubuli e fungono da siti di nucleazione per i microtubuli del fuso. Nella maggior parte delle cellule animali, il centrosoma funge da centro primario di organizzazione dei microtubuli (MTOC) e polo del fuso per la cellula in divisione [86]. I microtubuli del fuso forniscono l'architettura della struttura per il fuso e comprendono i microtubuli astrali, che si irradiano verso la periferia cellulare, le fibre k (o microtubuli cinetocore) che vengono catturate nel cinetocore e microtubuli polari (o interpolari), che si estendono verso i cromosomi e formano un ponte di comunicazione con un microtubulo polare opposto. Infine il cinetocore è una grande struttura proteica che collega

l'interazione tra una fibra k e il DNA centromerico dei cromosomi [82] ed è importante per la cattura e il movimento di questi ultimi (Figura 7).

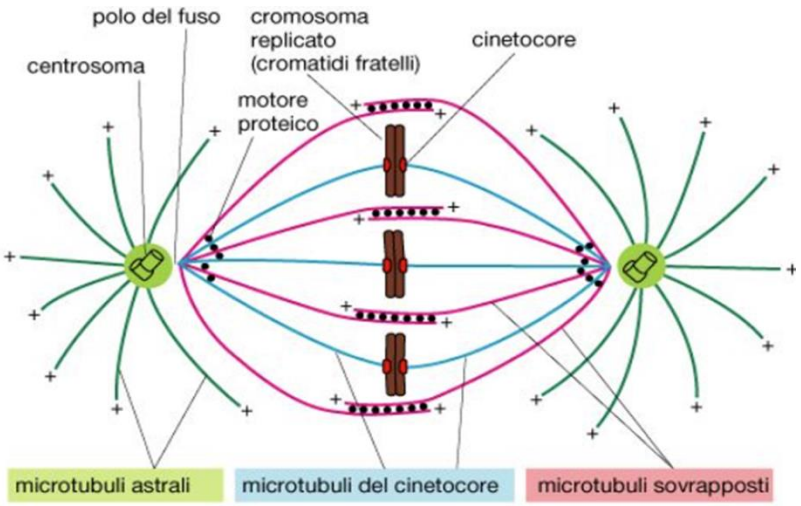


Figura 7: *Rappresentazione schematica del fuso bipolare a base di microtubuli. (Tratto e modificato da Cristina Cavazzuti 2012 Zanichelli)*

Come detto precedentemente, il fuso dei microtubuli è una macchina complicata infatti durante la divisione cellulare, essi subiscono un'instabilità dinamica, in cui la loro lunghezza cambia rapidamente a causa del fenomeno di crescita (polarizzazione) e di accorciamento (depolimerizzazione). In più il fuso stesso è permeato da una serie di motori e proteine associate ai microtubuli che influenzano la dinamica di polimerizzazione/depolarizzazione, la generazione di forza e la propagazione dello stress meccanico [87]. Sebbene non sia stato ancora identificato un ruolo chiaro per la proteina Tau nella mitosi o nell'assemblaggio del fuso, essa è fosforilata in modo differenziale durante il ciclo cellulare [88,89,90]. La Tau è in uno stato di bassa fosforilazione nelle cellule in interfase, mentre durante la mitosi diventa altamente fosforilata infatti, una frazione

sostanziale di Tau si trova nel citoplasma distaccato dai microtubuli. L'inizio della mitosi è correlato da un'ondata di fosforilazione in cui le MAP e altre proteine vengono fosforilate [91, 92, 93, 94]. Pertanto, si ritiene che la fosforilazione delle MAP possa essere un meccanismo attraverso il quale il legame ai microtubuli sia indebolito in modo che essi diventino più dinamici e pronti per il riarrangiamento del citoscheletro [95]. Nella mitosi, la proteina Tau è fosforilata a Thr231 e Ser235 perdendo l'affinità ai microtubuli [96]. Prove del potenziale coinvolgimento di difetti del ciclo cellulare nell'AD derivano dal fatto che la Tau è sempre più fosforilata durante la mitosi [90,93]. Ciò suggerisce che la regolazione fisiologica della fosforilazione di queste proteine è importante per la corretta progressione della mitosi. Un ruolo così deleterio di un eccesso di Tau sulla mitosi non è mai stato mostrato ma, dati recenti riscontrano un aumento del livello di aneuploidia nei linfociti splenici di modelli murini transgenici di tauopatie [97]. Ulteriore prova è stata data dalla dimostrazione che gli individui con la mutazione TauP301L, che è associata alla demenza frontotemporale con una sovraespressione della Tau , presentano diverse aberrazioni cromosomiche [98], sollevando la questione dei meccanismi cellulari coinvolti. In conclusione possiamo dire che nelle cellule in ciclo, la tau ha un basso livello di fosforilazione ed è principalmente legata ai microtubuli durante l'interfase, mentre all'inizio della mitosi, che si correla con un incremento della fosforilazione, riduce la sua affinità per i microtubuli permettendo l'instabilità dinamica richiesta per i rapidi movimenti mitotici [90,99].

1.8 La proteina Tau e i tumori

Un tratto distintivo del cancro è la deregolamentazione del ciclo cellulare. Una complessa serie di percorsi di segnalazione determina il modo in cui le cellule crescono, copiano il loro DNA e si dividono. Esistono anche sistemi di controllo (checkpoints), in grado di rilevare alterazioni a carico del DNA o dei processi utili alla corretta segregazione cromosomica e ad arrestare temporaneamente il ciclo cellulare, permettendo l'intervento di meccanismi di riparazione. Qualora, pur rallentando la progressione del ciclo cellulare, il danno non sia riparabile la cellula attiva il programma di apoptosi. La presenza dei punti di controllo è fondamentale, perché nel corso delle generazioni l'alterazione progressiva del patrimonio genetico aumenterebbe le probabilità di innesco del processo di trasformazione neoplastica. Quando i malfunzionamenti del ciclo cellulare e i processi di regolazione non riescono a correggere questi errori, il risultato è una proliferazione cellulare incontrollata. Quindi, nei tessuti normali la crescita cellulare è un fenomeno attentamente controllato da segnali antiproliferativi che mantengono così uno stato di omeostasi nel numero di cellule presenti. Questi segnali sono il prodotto di geni definiti oncosoppressori la cui funzione è proprio quella di inibire la divisione cellulare. Nei tessuti tumorali invece, si verifica una perdita di funzione di tali geni che porta ad una proliferazione sostenuta o la resistenza alla morte cellulare [100,101]. L'incremento della mutagenesi è ottenuto attraverso una maggiore sensibilità agli agenti mutageni ed anche attraverso l'inattivazione di uno o più componenti del macchinario di manutenzione genomico [102]. L'indiscutibile eterogeneità a livello genetico è accompagnata da un'altrettanta ben documentata eterogeneità fenotipica. La proteina Tau è una molecola al crocevia tra tumori cerebrali e

malattie neurodegenerative [103,104]. L'accumulo di Tau e la fosforilazione aberrante sono un fattore determinante del morbo di Alzheimer e l'espressione di tau è stata anche riconosciuta come un marker prognostico o predittivo per la risposta chemioterapica in diversi tumori [105,104]. La chemioterapia è una delle principali modalità utilizzate per il trattamento dei tumori avanzati e delle loro metastasi. I chemioterapici rappresentano un ampio gruppo di farmaci con diversi meccanismi d'azione molecolari. Essi agiscono sia prendendo di mira i meccanismi che regolano la proliferazione cellulare, al fine di uccidere le cellule tumorali, o prendendo di mira molecole specifiche del cancro per fermare la proliferazione. Tuttavia, l'esistenza di una resistenza acquisita e intrinseca ai farmaci antitumorali spesso diminuisce il loro effetto terapeutico. I taxani come Paclitaxel (Taxol) e Docetaxel (Taxotere) sono farmaci chemioterapici stabilizzanti i microtubuli che agiscono sulle cellule proliferanti durante lo stadio della mitosi e ne causano la morte [104]. L'uso clinico dei taxani include i tumori dell'ovaio, della mammella, del polmone, della prostata, dello stomaco, della testa e del collo, dell'esofago, del pancreas e del collo dell'utero, nonché il sarcoma di Kaposi. Per comprendere il meccanismo dei taxani è necessario spiegare l'innesco dell'uscita mitotica. Durante una mitosi imperturbata, l'uscita è innescata dalla rapida degradazione della ciclina B1. Quest'ultima è impedita dall'attività del SAC (spindle assembly checkpoint) fino a quando i cromosomi non sono correttamente allineati (metafase). Infatti quando i cinetocori sono attaccati correttamente, SAC smette di segnalare e questo promuove l’attivazione dell’APC/C cdc20 (anaphase promoting complex) che va a promuovere l’ubiquitinazione e proteolisi della ciclina B1 e della securina inattivata dalla separasi. Questo promuove l’uscita mitotica e la separazione dei

cromatidi fratelli. In una mitosi perturbata da taxani, che vanno ad interferire con i microtubuli del fuso, l'attivazione del SAC è cronica e va ad inibire il complesso promotore dell'anafase inducendo così un prolungato arresto mitotico, che si conclude con la morte cellulare [106]. È stato dimostrato che la resistenza al trattamento con taxani nel cancro può insorgere attraverso vie multiple e diversificate, che coinvolgono la riduzione della concentrazione del farmaco nelle cellule, i cambiamenti nel metabolismo del farmaco, la sovra-regolazione delle molecole che interferiscono con il legame del taxano ai microtubuli e la regolazione della sopravvivenza e dell'apoptosi [107]. Uno di questi meccanismi dipende dal fatto che nelle cellule di mammifero, esposte agli agenti anti-mitotici, la ciclina B1 è ancora lentamente degradata nonostante l'attivazione cronica del SAC. Alla fine, la quantità di ciclina B1 scende sotto la soglia richiesta per mantenere lo stato mitotico e la cellula esce dalla mitosi, un processo noto come "scivolamento mitotico". Un altro potenziale meccanismo dipende dalla proteina Tau associata ai microtubuli. La Tau si lega allo stesso sito sul lato interno dei microtubuli che è anche occupato da Paclitaxel o Docetaxel e diversi studi hanno dimostrato che un'espressione di Tau bassa o assente è significativamente correlata con una migliore risposta al trattamento con taxani, suggerendo che i livelli di espressione di Tau potrebbero avere un valore predittivo nella preselezione delle coorti di pazienti che probabilmente trarranno beneficio dal trattamento. Poiché la Tau compete con i taxani per lo stesso dominio di legame della tubulina, una maggiore espressione di questa proteina è stata collegata alla resistenza a questo tipo di composti, principalmente nei tumori non neuronali [103] (Figura 8). Recentemente, la Tau è stata considerata come potenziale biomarcatore di risposta al taxano nel

trattamento dei tumori della mammella, dell'ovaio, dello stomaco, della vescica e del polmone [108,108,110,111]. Tuttavia il ruolo della tau come biomarcatore della risposta al Paclitaxel è ancora in evoluzione. Legandosi ai microtubuli, il Paclitaxel induce la loro stabilizzazione e previene la depolimerizzazione, con conseguente stallo della progressione del ciclo cellulare nella fase G2/M della mitosi. L'effetto terapeutico del Paclitaxel consiste proprio nel bloccare la divisione cellulare nelle cellule tumorali a causa della loro propensione alla proliferazione illimitata. Le tossicità associate al Paclitaxel sorgono anche a causa del blocco della divisione cellulare, in cellule non patologiche [112,113]. In conclusione la Tau è un attore importante nel cancro, poiché è stata identificata una relazione tra l'espressione della proteina e la risposta al Paclitaxel. Numerosi studi su colture cellulari hanno indicato che la modulazione dell'espressione di tau è correlata alla risposta al Paclitaxel, delineando così una strategia praticabile per la ri-sensibilizzazione dei casi resistenti al Paclitaxel.

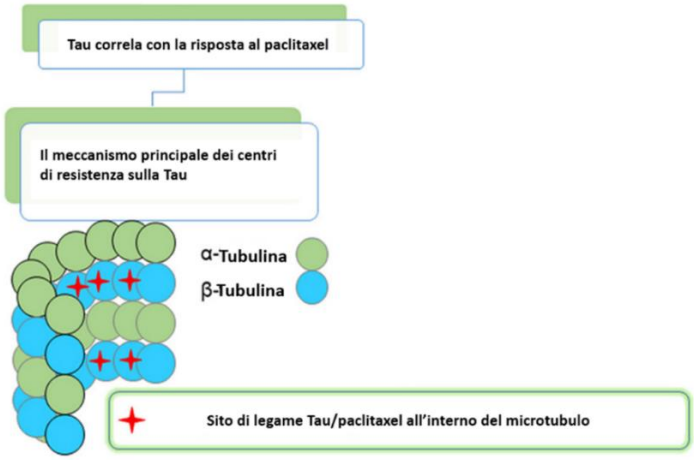


Figura 8: *Rappresentazione schematica del potenziale legame della proteina Tau al cancro.(Tratto e Modificato da Maria V.Barbolina Pharmacological Research Volume 168, 2021)*

- 2 -

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro sperimentale, presentato in questa tesi di dottorato, è quello di portare nuove conoscenze sulla funzione oncogena della proteina Tau, sostenuta attraverso due ipotesi principali. In primo luogo, l'attenzione è stata rivolta al possibile ruolo dell'equilibrio monomeri-oligomeri nella dinamicità dei microtubuli. Poiché gli oligomeri di Tau, sono considerati forme patologiche della proteina in grado di avviare specifiche malattie da accumulo, chiamate taupatie, è possibile ipotizzare che la presenza degli oligomeri possa condizionare la vitalità della cellula tumorale. Nello specifico, condizionare la capacità di progressione in quella fase del ciclo cellulare in cui Tau è maggiormente espressa come la fase G2/M. In secondo luogo, dal momento che, la letteratura indica gli oligomeri come elementi formati principalmente a valle della fosforilazione è stato possibile ipotizzare il ruolo delle forme iper-fosforilate della proteina Tau nella capacità della cellula tumorale di progredire in G2/M. Per verificare queste ipotesi abbiamo intrapreso uno studio in vitro su linee cellulari prostatiche tuttora in corso, che valuta i meccanismi che controllano la fosforilazione di Tau nella fase G2/M e in particolare il rapporto con il checkpoint in fase M.

- 3 -

MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Per gli esperimenti di questo lavoro di tesi sono state utilizzate linee cellulari PC3 (derivata da metastasi ossee del carcinoma prostatico umano), DU145 (derivata da metastasi del sistema nervoso centrale di adenocarcinoma prostatico umano) e LNCaP (cancro alla prostata androgeno-dipendente). La linea PC3 è stata mantenuta in coltura nel terreno di crescita DMEM HIGH GLUCOSE mentre DU145 e LNCaP in terreno RPMI 1640. Per tutte le linee cellulari il terreno di crescita è stato arricchito con 10% FBS (Siero fetale bovino) supplementato con L-glutammina all' 1% e antibiotici (penicillina e streptomicina) all'1%. Le linee PC3, DU145 e LNCaP sono state tenute in condizioni di temperatura e atmosfera controllate, rispettivamente a 37°C e 95% di O2 e 5% di CO2.

3.2 Anticorpi e reagenti

L'anticorpo anti-Tau (D1M9X) è stato acquistato da Cell Signaling Technology. L'anticorpo Tau fosforilato in Thr-231 (p-Thr231) è stato acquistato da SignalChem. L'anticorpo Tau fosforilato in Thr-205 (p-Thr205) (E7D3E) è stato acquistato da Cell Signaling Technology. L'anticorpo anti-GAPDH (D16H11) è stato acquistato da Cell Signaling Technology. L'anticorpo secondario Anti-rabbit IgG, HRP-liked e l'anticorpo secondario Anti-mouse IgG, HRP-liked sono stati acquistati da Cell Signaling Technology. L'anticorpo anti-Cicilina B1

(GNS1) è stato acquistato da Santa Cruz Biotechnology. L'anticorpo anti-βtubulina è stato acquistato da Cell Signaling Technology. Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 è stato acquistato da Invitrogen. Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 594 è stato acquistato da Invitrogen. Gli inibitori dell'autofagia, Clorochina e Bafilomicina A1 sono stati acquistati da Cell Signaling Technology. Il Nocodazolo è stato acquistato da Enzo. La Roscovitina è stata acquistata da Cell Signaling Technology mentre RO-3306 da Enzo.

3.3 Western blot

L'analisi in Western Blotting nelle cellule PC3, DU145 LNCaP è stata realizzata utilizzando anticorpi primari anti-tau (D1M9X), anti-pThr231, anti-Thr205 anti-GAPDH, anti-Ciclina B1 secondo la diluizione suggerita dal produttore. Gli anticorpi secondari utilizzati, IgG anti-coniglio o IgG anti-topo HRP coniugati, sono stati utilizzati secondo la diluizione suggerita dal produttore. Sono state utilizzate piastre petri da 100 mm in cui sono state seminate le linee cellulari PC3, DU145 e LNCAP alla densità di 50000 cellule. Dopo 24h le cellule sono state trattate con diversi composti Clorochina (Chl), Docetaxel (DTX) Paclitaxel (PTX), Nocodazolo, Roscovitina e RO-3306. Terminato il tempo di trattamento prestabilito per ogni esperimento abbiamo ottenuto gli estratti proteici totali. Per l'estrazione delle proteine è stato recuperato il monostrato cellulare, in PBS, mediante l'aiuto dello strumento "scraper". Le cellule sono state poi centrifugate a 3000 rpm per 10 minuti. Successivamente è stata eseguita la lisi cellulare

aggiungendo, al pellet ottenuto, il tampone Ripa buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% Na desossicolato, 0,1% SDS, 50 mM Tris HCl a pH 8.0) e gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (Sigma) diluiti 1:100. Attraverso l'ausilio di un sonicatore abbiamo effettuato due sonicazioni da un minuto a monte e a valle di un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio. Questa procedura ha permesso di estrarre efficacemente le proteine per lisi delle membrane cellulari. Infine, è stata effettuata una centrifuga a 4°C per 10 minuti a 13000 rpm per eliminare i nuclei e i detriti cellulari di grandi dimensioni e recuperare il surnatante ricco di proteine. La concentrazione delle proteine è stata determinata spettrofotometricamente mediante saggio colorimetrico, utilizzando lo specifico kit (Bradford reagent 5x, SERVA). Dopo aver dosato le proteine esse sono state separate elettroforeticamente, sulla base del peso molecolare, in gel di SDS-poliacrilammide al 10% caricando circa 35 μg di proteina per ogni campione. Parallelamente sono stati caricati i marcatori molecolari proteici di riferimento sharpmass VII (Euroclone, Milano, Italia). Successivamente le proteine risolte elettroforeticamente sono state elettro-trasferite su membrana di nitrocellulosa Amersham protran 0,2 m (Cytiva Europe) per 90 minuti a 350 mA. Per controllare il trasferimento, il filtro è stato colorato con Rosso Ponceau (Ponceau 2%, TCA (Acido Tricloroacetico) 3%) per circa 3 minuti e decolorato con lavaggi di H2O bidistillata. Dopo il trasferimento la membrana è stata immersa in una blocking solution al 10% di latte liofilizzato (PanReacAppliChem) in TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween 20) per 1h a RT. Terminato il tempo della blocking solution, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario (diluizione a concentrazione opportuna in latte liofilizzato all' 1% e TBS-T) a 4°C per tutta la notte. Successivamente sono stati eseguiti 2 lavaggi con TBS-T

da 10 minuti ognuno. In seguito, abbiamo incubato con l'anticorpo secondario diretto contro l'isotipo specifico e coniugato all'enzima perossidasi (diluizione a concentrazione opportuna in latte liofilizzato all' 1% e TBS-T) per 1h. Al termine di quest'ultima incubazione sono stati eseguiti 2 lavaggi da 10 minuti in TBS-T e due lavaggi finali da 10 minuti in TBS (Tris-buffered saline). Terminati i lavaggi la membrana è stata immersa in una soluzione di ECL per circa 2 minuti. I segnali chemiluminescenti sono stati acquisiti dal sistema Chemidoc XRS ed elaborati digitalmente con il software Imagelab (Bio-Rad Laboratories).

3.4 Immunofluorescenza

Sono state utilizzate piastre multiwell da 24 pozzetti in cui sono stati posizionati dei vetrini trattati con 30 μg/mL di poli-L-lisina per promuovere l'aderenza. Le cellule sono state seminate a una densità di 30.000 cellule/cm^2 per pozzetto. Dopo 24h le cellule sono state trattate con Clorichina e al termine del trattamento sono state fissate con paraformaldeide al 4% (Euroclone, Milano, Italia) per 10 minuti a 4 °C poi permeabilizzate con il Triton X- 100 (0,05%) (Biorad) in PBS per 10 minuti a RT e infine sottoposti a 3 lavaggi in PBS da 5 minuti ognuno. In seguito, le cellule sono state incubate con BSA 3% in PBS per 30 minuti. Dopo questa fase iniziale, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo primario anti-tau (D1M9X) o anti-β-Tubulina (tutti da Cell Signaling Technology) in PBS + BSA 1% a 4 °C per tutta la notte; sono stati poi eseguiti 3 lavaggi in PBS da 10 minuti ciascuno. In seguito le cellule sono state prima incubate con BSA 1% in PBS per 15 minuti e poi per 30 minuti a RT con una soluzione contenente l'anticorpo secondario coniugato: Alexa 488, anti-mouse, che dà fluorescenza verde e Alexa

594, anti-rabbit, che dà fluorescenza rossa (Jackson ImmunoResearch laboratories Baltimore Pike, PA, USA) in PBS + BSA 1% al buio. I controlli sono stati eseguiti omettendo l'anticorpo primario. Successivamente sono stati eseguiti 3 lavaggi 10 minuti in PBS e poi i vetrini, recuperati dai pozzetti, sono stati montati su vetrini portaoggetto con ProLong Gold antifade mounting medium con DAPI (Cell Signaling). Infine, le cellule sono state osservate con Zeiss Axio Vert. A1 (Zeiss, Jena, Germania) e le immagini acquisite sono state elaborate digitalmente con un software modulare di elaborazione e analisi delle immagini (Zen 2012 SP2 Blue Edition).

3.5 Citofluorimetria a flusso

Per valutare la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare le cellule abbiamo effettuato la colorazione con lo ioduro di propidio (PI). Per realizzarla è necessario ottenere una lisi della membrana citoplasmatica poiché il PI non è in grado di colorare in maniera proporzionale la quantità di DNA a doppia elica delle cellule con la membrana integra. Le cellule sono state lavate due volte in tampone fosfato (PBS) e fissate in etanolo freddo al 70% per 30 minuti a 4 °C e infine sono state lavate in tampone fosfato (PBS 1x) e centrifugate. Successivamente, i pellet cellulari sono stati in 0,5 mL PBS, 50 μL RNase A (5 μg/mL) (Sigma-Aldrich), e colorate con 0,5 mL di 100 mg/mL di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich) in PBS. L'uso dell'RNAasi è necessario per eliminare l'RNA a doppia elica che potrebbe potenzialmente legare il PI e quindi influenzare la colorazione specifica del DNA. I campioni sono stati così incubati per 30 minuti a RT al buio e in seguito analizzati per il contenuto di DNA.

L'intensità di fluorescenza è stata misurata utilizzando il citometro a profilo Accuri C6 (BD Technologies, Durham, NC, USA).

3.6 Vitalità e proliferazione

Dopo trattamento con clorochina, Bafilomicina, Docetaxel, Paclitaxel, Roscovitina o RO-3306, le linee cellulari PC3, DU145 sono state sottoposte ad una valutazione di vitalità con lo scopo di avere una panoramica sulla percentuale di cellule vive e morte. Per effettuare la colorazione vitale con il metodo della colorazione per esclusione è stato utilizzato il Trypan blue (0,4%), in quanto le membrane cellulari sono impermeabili a questo colorante, mentre le cellule morte si colorano di blu. Dopo aver centrifugato, il pellet cellulare è stato risospeso in un piccolo volume di terreno completo (100 µl) a cui è stato aggiunto un ugual volume di Trypan Blue (0,4%). Dopo circa 3 minuti (tempo che impiega il colorante per agire), sono stati prelevati 10 µl da caricare nella camera di conta di Burker e effettuata la conta vitale mediante il Cytosmart (Corning).

3.7 Sincronizzazione cellulare

Per sincronizzare le linee cellulari PC3, LNCaP e DU145 è stato utilizzato il Nocodazolo, inibitore della polimerizzazione dei microtubuli. Sono state utilizzate piastre petri da 100 mm in cui sono state seminate le linee cellulari PC3, DU145 e LNCaP alla densità di 50000 cellule/piastra. Dopo 24h, le cellule sono state trattate con 60ng di Nocodazolo per 18h. Terminato il tempo di

trattamento prestabilito le cellule sono risultate sincronizzate in fase G2/M del ciclo cellulare e il Nocodazolo è stato lavato via (w).

3.8 Silenziamento della proteina Tau

Le cellule sono state seminate, in una piastra da 6 pozzetti, ad una densità di 5000 cellule/pozzetto in condizioni di coltura standard. 24h dopo la semina, un pool di quattro diversi costrutti di siRNA (Qiagen, Valencia, CA, USA) è stato diluito in 200 µl di mezzo di coltura senza siero per ottenere una concentrazione finale di 15 nM. Successivamente al siRNA diluito è stato aggiunto il reagente di trasfezione, Interferin (Polyplus, Illkirch, Francia) secondo il protocollo del produttore, agitando su vortex. L'Interferin è compatibile sia con siero che con antibiotici ed è stata specificamente progettato per fornire un'elevata efficienza di silenziamento utilizzando basse concentrazioni di siRNA. La soluzione con siRNA e Interferin è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente e poi aggiunta nei pozzetti. Le cellule sono state incubate con i complessi di trasfezione nelle loro normali condizioni di crescita e il silenziamento genico è stato controllato dopo 48 ore, mediante western blot. Come controllo negativo sono state usate cellule non silenziate con siRNA scramble(Qiagen, Valencia, CA, USA).

- 4 -

RISULTATI

4.1 Espressione del pattern basale della proteina Tau nelle linee cellulari prostatiche

I dati riguardanti l'espressione della proteina Tau al di fuori del sistema nervoso centrale sono ancora scarsi. Il primo passo del nostro lavoro è stato quello di verificarne l'espressione, tramite western blot, in linee cellulari di tumore della prostata, rispettivamente PC3, LNCaP e DU145 (Figura 9). Il risultato mostra un pattern proteico che va da 50 kDa fino a 200 kDa. Possiamo distinguere le isoforme monomeriche della proteina tau (mTau) a basso PM ,dovute a splicing alternativo, in un intervallo tra 40 kDa fino 100 kDa e le forme oligomeriche solubili (oTau) a PM più alto. Per tutte le linee cellulari, l'espressione basale non evidenzia un particolare accumulo delle forme oligomeriche.

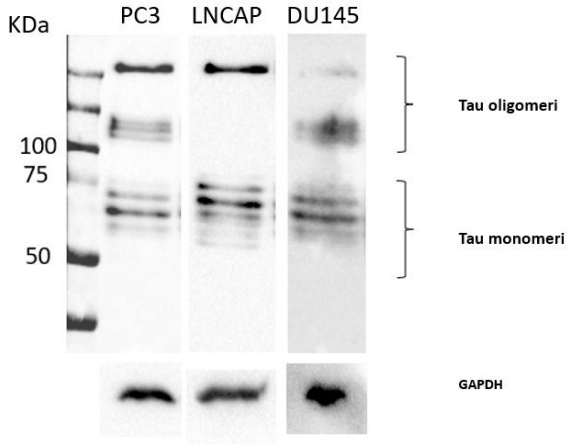


Figura 9*: Analisi mediante western blot del pattern basale di espressione della proteina tau nelle linee cellulare PC3 LNCaP e DU145. L'espressione di GAPDH è stata utilizzata come controllo di caricamento.*

Parallelamente la nostra indagine ha visto la valutazione della localizzazione cellulare della proteina Tau, nella linea prostatica DU145. Attraverso il saggio di immunofluorescenza, che permette di verificare in maniera semiquantitativa la posizione di una determinata proteina, è stata confermata la positività per la Tau soprattutto nelle cellule in fase di divisione G2/M localizzandosi prevalentemente al livello del fuso mitotico e parzialmente libera nel citoplasma. Nel saggio abbiamo utilizzato l'anticorpo anti-β-tubulina portatore di un fluorocromo verde e l'anticorpo anti-Tau portatore di un fluorocromo rosso mentre, il DNA è stato colorato in blu con il colorante DAPI (Figura 10).

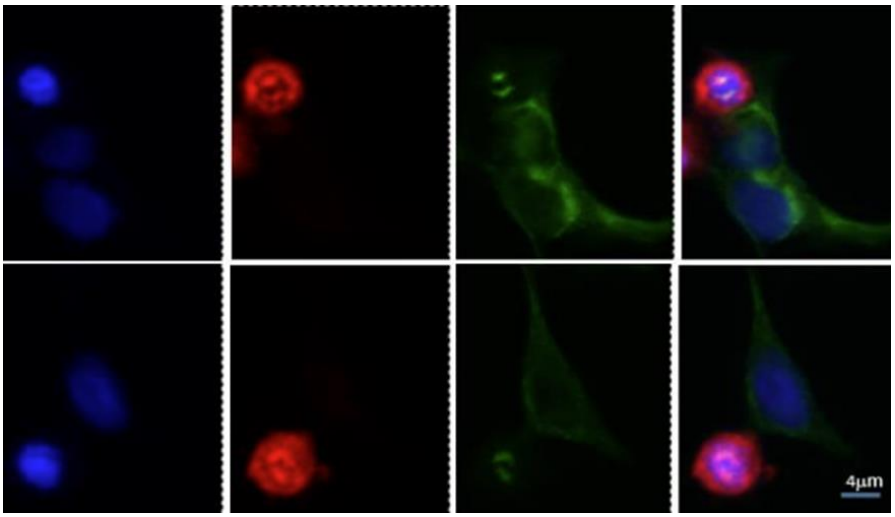


Figura 10: *Test di immunofluorescenza condotto sulla linea cellulare DU145. I nuclei sono colorati in blu (DAPI), β-tubulina in verde (Alexa 488) e Tau in rosso (Alexa 594). La colocalizzazione di Tau e β-tubulina determina una colorazione gialla, evidente sul fuso mitotico.*

A valle di questi risultati abbiamo costruito la nostra prima ipotesi da verificare: la presenza degli oligomeri della proteina Tau può condizionare la vitalità cellulare, in particolare interferendo con la capacità di progressione nella fase G2/M del ciclo cellulare, fase in cui la Tau è maggiormente espressa? Per dimostrare l'ipotesi il primo passo è stato quello di indurre una perturbazione dell'omeostasi cellulare mediante l'utilizzo della Clorochina (Chl) o della Bafilomicina (Bfl), inibitori dell'autofagia che interferiscono nella formazione dell'autolisosoma, al fine di forzare l'accumulo delle forme oligomeriche di Tau.

4.2 L'inibizione dell'autofagia determina l'accumulo di oligomeri Tau

Le cellule DU145 sono considerate cellule resistenti all'autofagia in alcune condizioni sperimentali perché non esprimono ATG5, uno dei marcatori classici del processo di trasduzione del segnale autofagico. Per questo motivo, abbiamo voluto verificato, in queste cellule, se l'autofagia fosse comunque indotta da condizioni di stress del reticolo endoplasmatico (ER). Abbiamo trattato PC3 e DU145 con 0,5 mM DTT per 48 h, un noto induttore di stress ER, e verificato l'espressione di Beclin-1 come marcatore precoce autofagico (Figura 11a). Il trattamento DTT ha effettivamente determinato la sovra-regolazione di Beclin-1 in entrambe le linee cellulari, mentre la Clorochina(20 mM per 72 h) è stata in grado di contrastare questo incremento. L'analisi in western blot dei lisati cellulari di PC3 e DU145 trattate con Chl, ha rivelato uno spostamento della quantità relativa delle diverse forme della proteina Tau. Infatti, l’inibizione dell’autofagia ha determinato un evidente accumulo della proteina Tau, assente nella condizione basale, principalmente come oligomeri ad alto peso molecolare in entrambe le linee cellulari (Figura 11b).

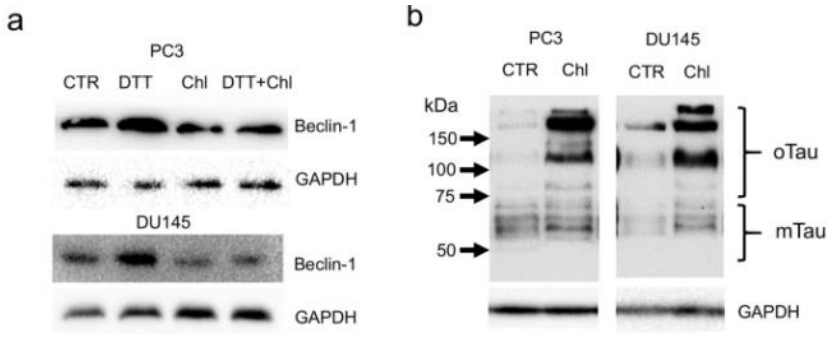


Figura 11: *a) l'espressione di Beclin1 è stata analizzata mediante western blot in cellule PC3 e DU145 dopo 48 ore di trattamento con DTT 0,5 mM, Clorochina 20 μM (Chl) e combinazione (DTT + Chl). b) Analisi mediante western blot del pattern di espressione della proteina Tau basale e dopo trattamento con Chl (20 μM per 72h) nelle linee cellulare PC3 e DU145. L'analisi ha rilevato uno spostamento dell'abbondanza relativa delle diverse forme della proteina Tau trattate con Chl rispetto alla condizione sperimentale senza l'inibitore. In figura sono evidenziate le forme le forme oligomeriche (oTau) e monomeriche (mTau). L'espressione di GAPDH dagli stessi lisati cellulari è stata mostrata come controllo di caricamento.*

Il passo successivo è stato quello di ripetere, sulle DU145, il saggio di immunofluorescenza basale e parallelamente eseguirlo su cellule trattate con Chl (20 μM per 72h) . Dall'osservazione è stata confermata la distribuzione della positività, con l'espressione della proteina Tau, appena osservabile nelle cellule in fase G1 e più evidente nelle cellule in fase G2/M con una chiara associazione con il fuso mitotico (Figura 12a). Nelle cellule trattate con Clorochina abbiamo riscontrato un diverso schema di colorazione. La positività è risultata più evidente nel citoplasma piuttosto che sul fuso mitotico suggerendo questa delocalizzazione come accumulo di forme oligomeriche della proteina Tau. La concomitante analisi della β-tubulina ha rivelato frequentemente un fenotipo aberrante, per esempio fuso monoastrale, associato a cromosomi non allineati (Figura 12b). Questo fenotipo è stato interpretato come conseguenza dell'inibizione dell'autofagia che, contrastando la clearance di Tau, porta

all’aggregazione della proteina che si accumula libera al livello citoplasmatico con conseguenze disfunzionali per la cellula a partire da una interferenza con la formazione del fuso mitotico.

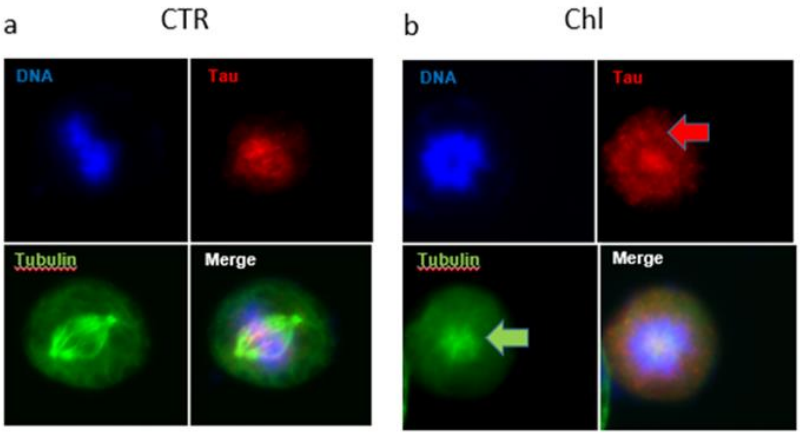


Figura 12: *Saggio di immunofluorescenza condotto sulla linea cellulare DU145 dopo il trattamento con clorochina (Chl) alla concentrazione di 25μM per 24 ore. I nuclei sono stati colorati in blu (DAPI), la β-tubulina, in verde(Alexa 488) e in rosso la Tau (Alexa 594). L'analisi di immunofluorescenza ha rilevato che rispetto al controllo (a) dopo il trattamento con Chl la Tau si localizzava prevalentemente libera nel citoplasma (b). La quarta immagine per ciascuna serie rappresenta la combinazione digitale (unione) delle tre precedenti immagini acquisite mediante microscopia a immunofluorescenza. Le frecce indicano lo schema peculiare di tau (freccia rossa) e β-tubulina (fuso monoastrale, freccia verde) nelle cellule trattate con clorochina rispetto alle cellule di controllo.*

4.3 La formazione di oligomeri tau è associata a danni al DNA

I risultati ottenuti fin qui hanno dimostrato che, la proteina Tau è importante nell'omeostasi cellulare in quanto esiste un collegamento tra l'accumulo delle sue forme oligomeriche e la formazione di fusi mitotici aberranti nel momento in cui l'equilibrio funzionale della proteina viene perturbato. Per giustificare il potenziale ruolo tossico dell'accumulo degli oligomeri, siamo andati a valutare se la formazione del fuso mitotico aberrante e l'inibizione della corretta separazione dei cromosomi fosse associata al danno del DNA. Abbiamo utilizzato l'anticorpo contro l'istone fosforilato H2AX (p-H2AX) marcatore di rotture a doppio filamento (DSB) e eseguito un saggio di immunofluorescenza trattando le PC3 con Clorochina (20 mM per 48 h) per analizzare con maggiore attenzione le cellule che presentavano fusi mitotici aberranti. L'analisi di immunofluorescenza ha rivelato l'associazione di p-H2AX con cromosomi non segregati in cellule con un fuso mitotico aberrante (Figura 13a). Quindi in presenza di accumulo di oligomeri della proteina, non solo c'è un'interferenza con la formazione del corretto fuso mitotico ma, anche una maggiore propensione verso le rotture a doppio filamento con una Tau. La nostra ipotesi è che l'interferenza con il fuso mitotico sia già di per se sufficiente ad indurre queste rotture però non possiamo escludere, come è proposto da altri studi, che Tau possa avere un coinvolgimento diretto nella protezione del DNA. La Tau è una proteina multifunzionale, ed è dimostrato avere anche un ruolo come "guardiano" del DNA e quindi è una proteina essenziale nella protezione dell'integrità dei cromosomi. Tau è presente nelle regioni fibrillari dei nucleoli interfasici e nelle NORs (nucleolar organizer regions) dei cromosomi acrocentrici in mitosi.

Tale evidenza va a confermare che: l'alterazione dell'omeostasi della proteina fa accumulare oligomeri Tau tossici, formare fusi mitotici scorretti con un aumento del rischio di rotture a doppio filamento. Per avere una ulteriore conferma di queste associazioni abbiamo trattato le cellule (PC3 e DU145) con Docetaxel (DTX) 5 mM , Clorochina (Chl) 20 mM o la loro combinazione per 24h e siamo andati a valutare in western blot l'espressione di diversi marcatori, tra i quali Tau, Ciclina B1 per la valutazione del blocco in fase G2/M e p-H2AX (Figura 13b). Il DTX è un taxano in grado di bloccare le cellule in fase G2/M del ciclo cellulare per interferenza sui microtubuli del fuso, innescando una morte cellulare apoptotica. Come atteso, gli oligomeri Tau sono evidenti nelle cellule trattate con Clorochina sia nelle PC3 e sia nelle DU145. Inoltre, l'analisi del lisato proteico ottenuto a seguito di trattamento combinato mostra che l'accumulo di Tau è stato stimolato dalla Clorochina anche in presenza di Docetaxel. L'aumento della ciclina B1 ha confermato il blocco in G2/M associato al trattamento con taxano. Analizzando il p-H2AX, la cui espressione è associata a rotture a doppio filamento del DNA, vediamo che già il solo trattamento con Clorochina è capace di indurre un aumento della sua espressione rispetto al controllo. Questo è visibile soprattutto sulle PC3 mentre per le DU145 è meno evidente. L'aumento di espressione di p-H2AX è visibile anche nei combinati, rispetto ai singoli trattamenti e al controllo. La combinazione Chl-DTX rimane efficace nella rottura a doppio filamento nelle PC3 e risulta efficace anche sulle DU145. Questo ci lascia ipotizzare che l'accumulo degli oligomeri è tossico per la cellula perché, attraverso questi, viene sottratta anche la Tau che svolgeva un ruolo di protezione del DNA determinando un aumento delle rotture a doppio filamento. Con questa serie di esperimenti abbiamo messo in luce che

la perturbazione dell'omeostasi cellulare ottenuta tramite inibizione dell'autofagia, favorisce l'accumulo degli oligomeri Tau tossici e che questa condizione di stress cellulare può favorire l'azione di sostanze genotossiche.

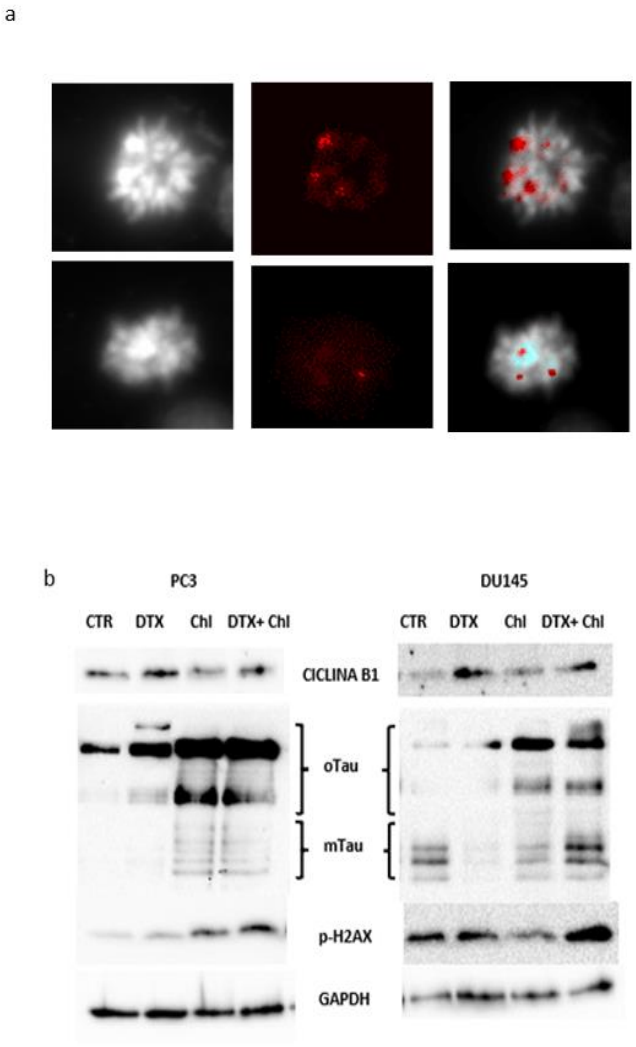


Figura13: *a) Saggio di immunofluorescenza di cellule PC3 mitotiche aberranti trattate con Docetaxel (5 mM) in combinazione con Clorochina (20 μM). Viene mostrano il contenuto di DNA colorato con DAPI (bianco) e il pattern di pH2AX immunorilevato (rosso). Viene mostrata una combinazione digitale delle due immagini precedenti per visualizzare la localizzazione di DSB sul DNA. b) Analisi mediante western blot sulle linee cellulari PC3 e DU145, dopo trattamento con Docetaxel (0,5 nM) e Clorochina (Chl) (20 μM) o la loro combinazione, per valutare l'espressione di marcatori selezionati: Ciclina B1(marcatore della fase a G2/M del ciclo), Tau (con l'indicazione*

di oligomeri e monomeri) e p-H2AX (marcatore del DNA DSB). L'espressione di GAPDH è stata valutata come controllo di caricamento.

4.4 L'autofagia protegge dalla citotossicità del Docetaxel

Per verificare la potenziale interazione tra la citotossicità indotta dai Taxani e l'autofagia, le linee cellulari PC3 e DU145, sono state trattate per 72h con Bafilomicina (Bfl 1 μM) o Clorochina (Chl 20 μM) in combinazione con diverse concentrazioni di DTX (0,5 e 5 nM). Quando le cellule vitali sono state contate dopo 72 ore di trattamento, una diminuzione significativa del numero di cellule è stata registrata in presenza della combinazione Docetaxel più inibitore dell'autofagia rispetto a tutte le altre condizioni sperimentali (Figura 14a). Questo effetto è stato osservato sia nelle cellule PC3 che DU145 e ha dimostrato una tendenza simile per la Bfl e per la Chl. L'analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria ha rivelato che l'effetto antitumorale della combinazione non era associato ad un aumento del numero di cellule bloccate nella fase G2/M del ciclo cellulare, infatti l'aggiunta di Bfl e Chl al DTX ha stimolato una riduzione del numero di cellule in fase G2/M rispetto al solo DTX (Figura 14b). Allo stesso tempo la misurazione del numero di cellule morte ha rivelato che la maggiore efficacia antitumorale del trattamento combinato dipendeva da una maggiore capacità di indurre la morte cellulare (Figura 14c).

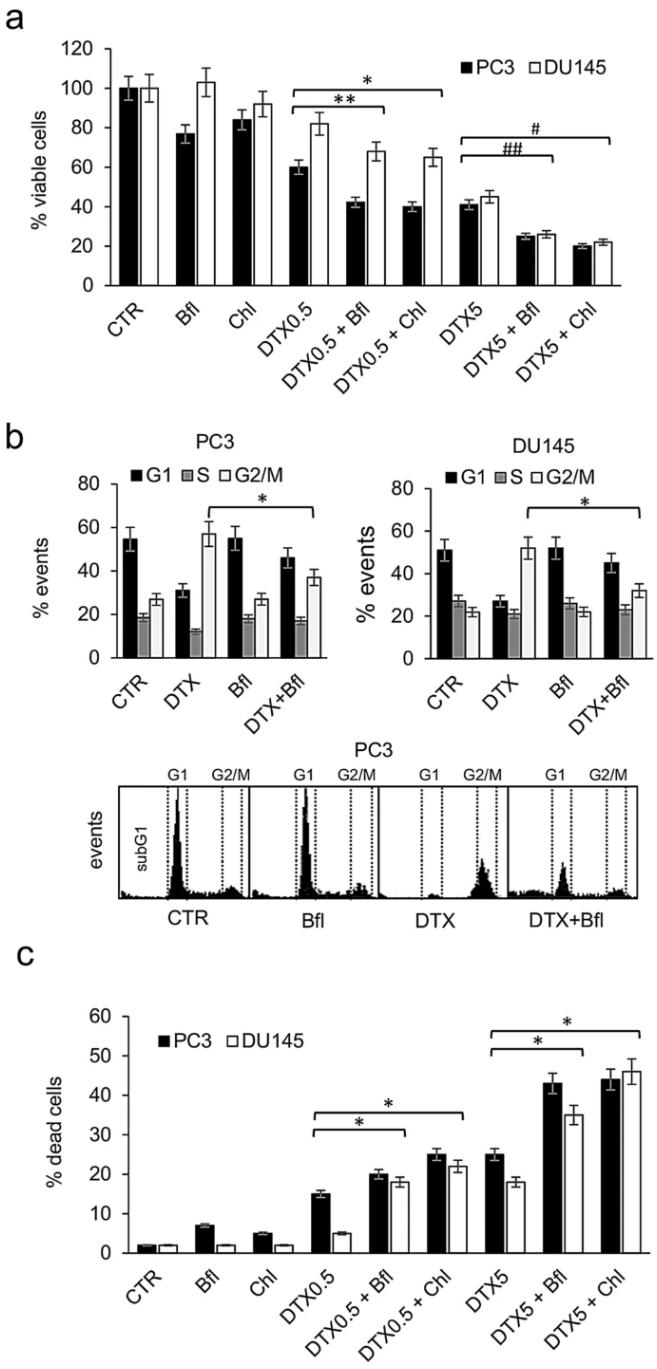


Figura 14: *a) Analisi del trattamento combinato con Docetaxel e inibitori dell'autofagia. a) cellule PC3 e DU145 sono state trattate per 72 ore con due concentrazioni di Docetaxel (DTX, 0,5 e 5 nM) da solo o in combinazione con due diversi inibitori dell'autofagia, Bafilomicina (Bfl 1 µM) e Clorochina (Chl 20 µM); è stato misurato il numero di cellule vitali e nell'istogramma è stata riportata la media di cinque diverse misure con SD. Le differenze tra DTX da solo e trattamenti combinati sono risultate statisticamente significative(test t di Student, $p < 0.05$) e sono indicate nell'istogramma con i simboli: (*) DTX0.5 + Chl vs DTX0.5; (**) DTX0.5 + Bfl vs DTX0.5; (#) DTX5 + Chl vs DTX5; (##) DTX5 + Bfl vs DTX5. b) Le cellule PC3 e DU145 sono state trattate per 72 ore con docetaxel da solo (DTX, 0,5 nM) o in combinazione con bafilomicina (Bfl 1 µM) e il numero di eventi nelle fasi del ciclo cellulare è stato misurato mediante citofluorimetria. L'esperimento è stato ripetuto tre volte e nell'istogramma sono stati riportati i valori medi più SD, mentre i profili*

rappresentativi ottenuti dall'analisi delle cellule PC3 sono mostrati nel pannello inferiore. L'asterisco indica un valore p < 0,05(test t dello student) tra il numero di cellule in fase G2/M tra DTX + Bfl e solo DTX. c) Dopo 72 h di trattamento eseguito come descritto nel pannello (a), le cellule PC3 e DU145 sono state valutate per la presenza di cellule morte. L'istogramma mostra le medie e le SD di cinque diversi esperimenti e le differenze statisticamente significative tra DTX da solo e trattamenti combinati sono indicate da asterischi(test t di Student, p <0,05)

È ben nota la capacità del Docetaxel di indurre l'arresto nella fase G2/M del ciclo cellulare e la concomitante comparsa di cellule multinucleate [114]. Infatti nel blocco in fase G2/M le cellule tumorali possono rispondere con un meccanismo di resistenza basato sul superamento del checkpoint di fase G2/M chiamato SAC (spindle assembly checkpoint) con la formazione di cellule polinucleate. Abbiamo voluto verificare questo fenomeno nel nostro modello sperimentale sulle linee cellulari PC3 e DU145. Dopo 72 ore di trattamento con 5mM Docetaxel la percentuale di cellule multinucleate era ben visibile anche con la microscopia a contrasto di fase (cerchi neri) dimostrando un aumento a circa il 15% e il 13% in PC3 e DU145, rispettivamente (Figura 15a). È ipotizzabile quindi che l'autofagia possa modulare essa stessa la progressione delle cellule tumorali nella fase G2/M. Infatti, l'aggiunta di Bfl o Chl nelle cellule trattate con DTX ha contrastato significativamente la formazione di cellule multinucleate, che sono risultate inferiori al 5% del numero totale di cellule (Figura 15b).

I nostri dati suggeriscono quindi che, durante la chemioterapia, l'autofagia possa svolgere un ruolo di promozione della crescita del tumore, facilitando la degradazione della proteina Tau e bloccando l'effetto antimitotico degli oligomeri Tau accumulati.

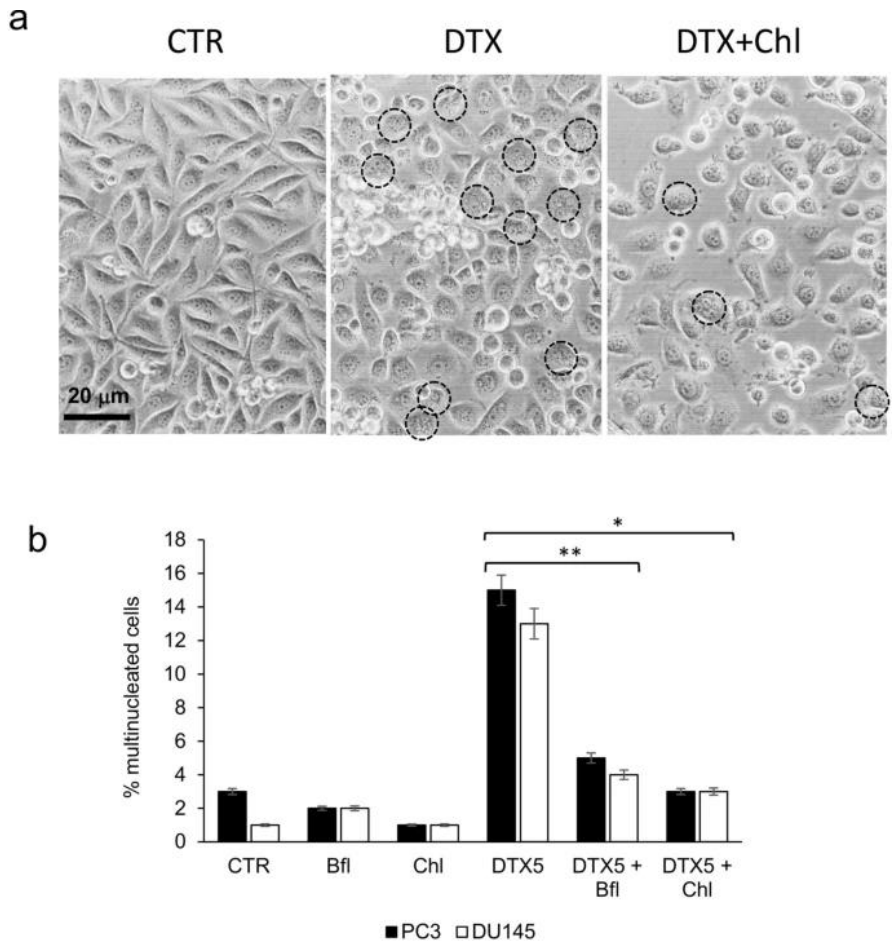


Figura 15: *a) Le cellule PC3 e DU145 sono state trattate per 72 ore con Docetaxel 5 nM (DTX) da solo o in combinazione con Bafilomicina (Bfl 1 µM) o Clorochina (20 µM), quindi le cellule sono state osservate con microscopia a contrasto di fase per la presenza di cellule multinucleate evidenziate da cerchi neri. b) Il numero medio di cellule multinucleate per ciascun punto sperimentale è stato contato valutando dieci diversi campi ottici con ingrandimento 40×, ed è stato riportato con SD nell'istogramma in basso. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa(test t di Student, p < 0,05) tra numero di cellule multinucleate: (*) DTX5 + Chl vs DTX5; (**) DTX5 + Bfl vs).*

Considerando che il mantenimento dell'omeostasi della proteina Tau possa proteggere dalla citotossicità del DTX e che l'accumulo di Tau (causato da una perturbazione della sua omeostasi) possa cooperare con farmaci antimitotici, abbiamo valutato gli effetti del silenziamento della proteina Tau a breve termine, con il metodo dell'interferenza siRNA. Il silenziamento della proteina imita la

carenza di regolazione della omeostasi della proteina stessa, condizione necessaria per approfondire l'indagine sul rapporto con la progressione tumorale. L'espressione di Tau è stata valutata in PC3 e DU145 48 ore dopo la trasfezione con Tau-targeted siRNA (Tau-sil) o controllo casuale siRNA (CTR-sil) (Figura 16a). Le cellule PC3 e DU145 silenziate per Tau e quelle non silenziate sono state trattate per 48 ore con 2nM di PTX e poi sono state osservate al microscopio a contrasto di fase per la presenza di cellule giganti multinucleate (Figura 16b). Le stesse serie sperimentali sono state analizzate per la presenza di cellule vitali (Figura 16c). Il silenziamento di Tau è stato associato ad una significativa riduzione della vitalità cellulare solo in associazione con il trattamento PTX, rafforzandone la sua attività citotossica.

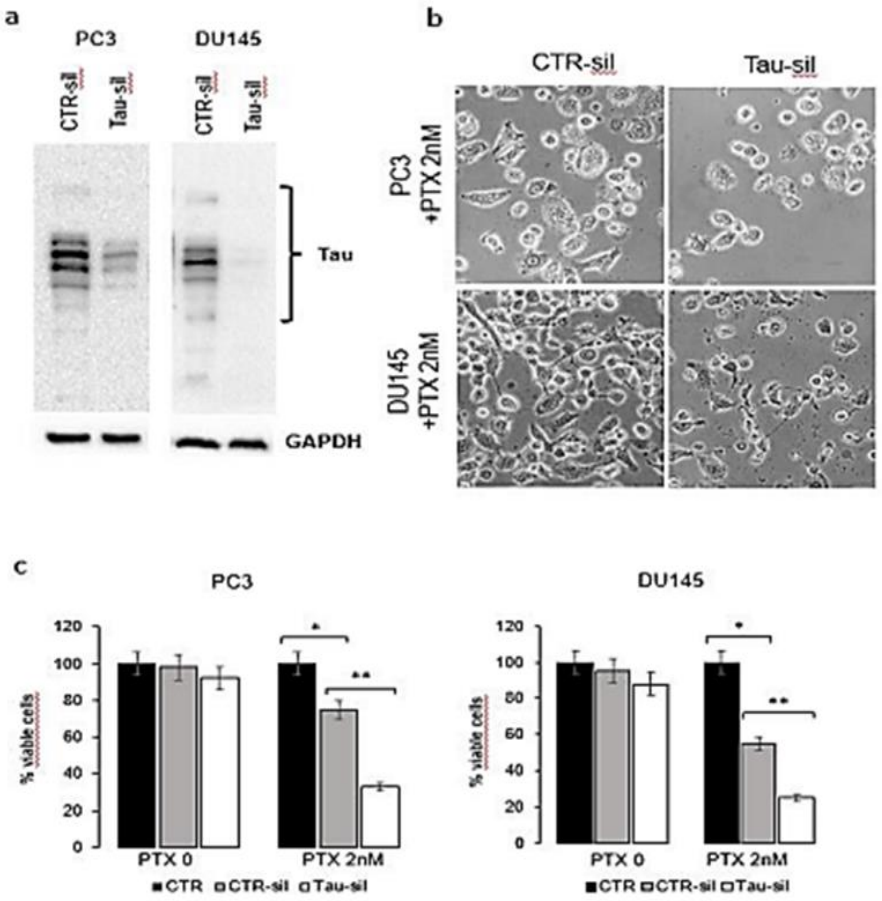


***Figura 16**: Il silenziamento a breve termine Tau è stato raggiunto in cellule tumorali prostatiche con il metodo di interferenza siRNA. a) L'espressione di tau è stata valutata in PC3 (sinistra) e DU145 (destra) 48 ore dopo la trasfezione con tau-targeted siRNA (tau-sil) o controllo casuale siRNA (CTR-sil). L'espressione di GAPDH è stata valutata come controllo di caricamento. b) Le cellule PC3 e DU145 silenziate con tau e CTR sono state trattate per 48 ore con 2nM paclitaxel (PTX) e osservate al microscopio a contrasto di fase per la presenza di cellule giganti multinucleate. c) Le stesse serie sperimentali sono state analizzate per la presenza di cellule vitali. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa(test t di Student, $p < 0,05$).*

I nostri risultati verificano la nostra prima ipotesi indicando che, la modulazione delle diverse forme di Tau può essere importante nel miglioramento della terapia antitumorale. Le strategie terapeutiche volte a stimolare la formazione di oligomeri Tau, come l'inibizione dell'autofagia, potrebbero essere un'efficace

terapia adiuvante antitumorale. Di conseguenza l'eliminazione efficiente degli oligomeri è un requisito fondamentale per la capacità di progressione nel ciclo cellulare delle cellule tumorali sotto il trattamento con taxani. La proteina Tau subisce molte modificazioni post-traduzionali, come la fosforilazione che, influenzano la sua funzione fisiologica di stabilizzare i microtubuli. Dal momento che la letteratura ci indica che gli oligomeri sono formati a valle soprattutto della iper-fosforilazione abbiamo ipotizzato che quest'ultima potesse svolgere un ruolo nella progressione in fase G2/M. Per verificare questa nostra seconda ipotesi abbiamo eseguito la seguente serie di indagini sperimentali.

4.5 Espressione del pattern di fosforilazione della proteina Tau nelle linee prostatiche

Dato che l'espressione della proteina Tau è evidente in fase G2/M ci siamo concentrati nello studio di questa fase del ciclo cellulare. Per realizzare tale tipo di studio, abbiamo individuato i composti chimici adeguati per la sincronizzazione del ciclo cellulare in fase G2/M. Tra questi è risultato di particolare utilità il composto Nocodazolo che interferendo con la polimerizzazione del fuso mitotico permette di bloccare le cellule prima della metafase. Il blocco del ciclo con Nocodazolo è stato realizzato trattando le DU145 con una concentrazione di 60 ng/ml per 18 ore. L'effetto del trattamento con il Nocodazolo è stato quindi valutato in Wester blot considerando anche i punti sperimentali ottenuti dopo il lavaggio del Nocodazolo (w). Inizialmente abbiamo valutato l'espressione della ciclina B1 marcatore della fase G2/M del

ciclo cellulare e poi è stata valutata l'espressione di due forme fosforilate della proteina: p-Thr231 Tau e p-Thr205 Tau (Figura 17). Entrambe le fosforilazioni sono su residui di treonina presenti nel dominio di legame ai microtubuli all'estremità C-terminale della proteina. I risultati mostrano che il blocco in fase G2/M, testimoniato dall'aumento della ciclina B1 è associato ad un accumulo reversibile delle forme fosforilate della proteina Tau fosforilata, che scompaiono quando le cellule progrediscono nel ciclo cellulare.

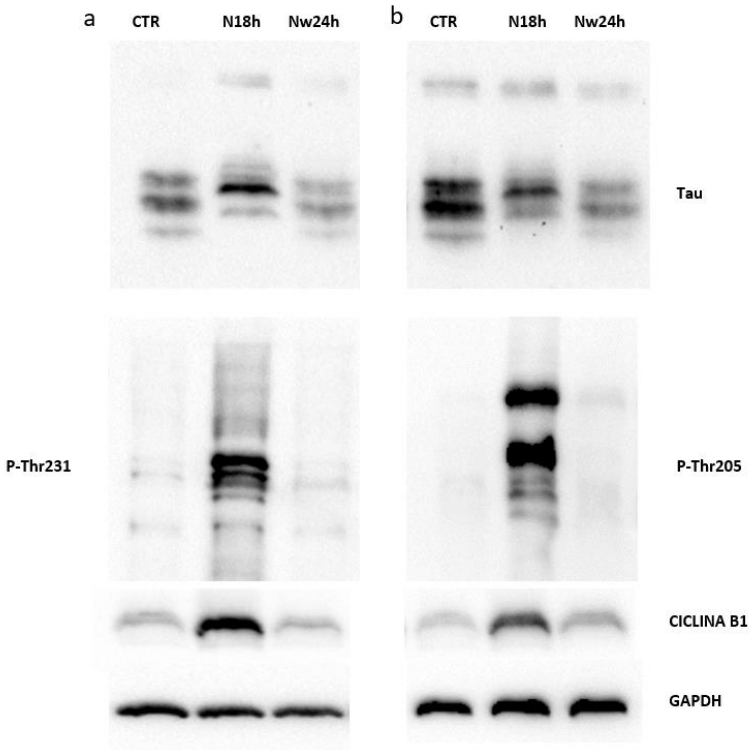


Figura 17: *Analisi mediante western blot dell'espressione di Tau, p-Thr231 Tau, p-Thr205 Tau e ciclina B1 nella linea cellulare DU145 dopo il trattamento con 60 ng/ml di Nocodazolo (N) per 18 ore. Successivamente, il Nocodazolo è stato lavato via (w) e l'espressione della proteina nelle sue forme è stata valutata dopo 24 ore. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo di caricamento.*

Successivamente abbiamo effettuato un esperimento sulle PC3, DU145 e LNCaP nelle stesse condizioni sperimentali del precedente per andare a valutare nel tempo l'andamento della riduzione dell'accumulo della forma fosforilata p-Thr231 Tau (Figura 18). Il risultato conferma per tutte le linee cellulari una riduzione dell'accumulo già dopo due ore dalla rimozione del Nocodazolo, suggerendo che la fosforilazione della proteina Tau sia un marcatore efficace della fase G2/M.

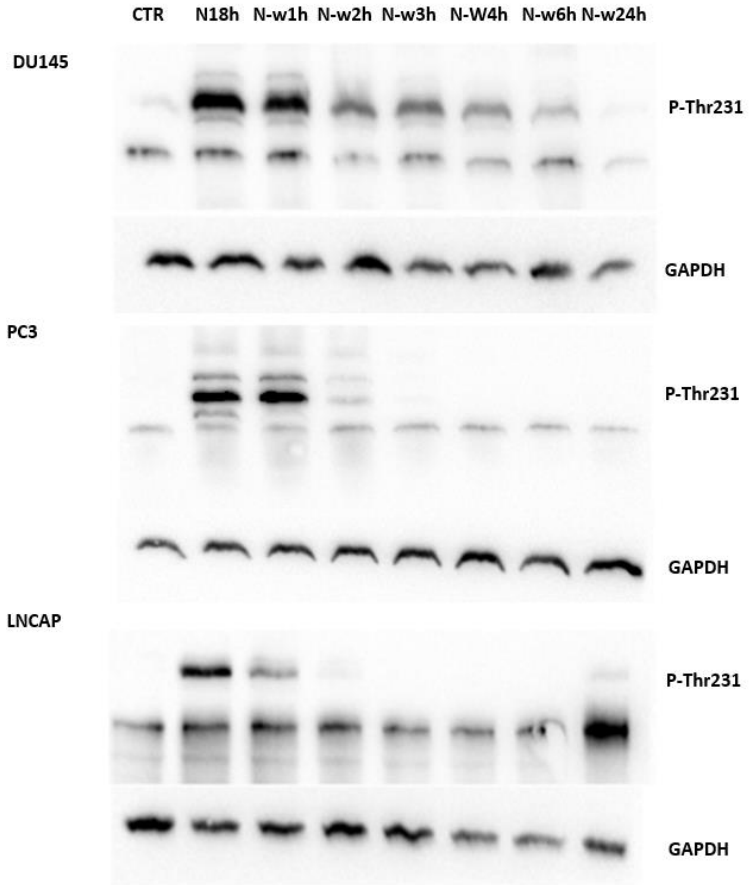


Figura 18*: Analisi tramite western blot dell'espressione p-Tau 231 Tau nelle linee cellulari LNCaP DU145 e PC3 dopo il trattamento con 60 ng/ml di Nocodazolo per 18 ore. Successivamente, il Nocodazolo è stato rimosso (w) e l'espressione p-Thr231 Tau è stata seguita nel tempo. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo di caricamento.*

4.6 Il Paclitaxel determina l'accumulo della Tau oligomerica fosforilata in fase G2/M

A questo punto abbiamo trattato le linee cellulari LNCAP e DU145 con il PTX (2-4 nM per 18 h) per valutare gli effetti sulla forma fosforilata della proteina Tau (Figura 19). L'interpretazione dei risultati suggerisce che il blocco in G2/M da parte del PTX, è associato con l'accumulo di forme iper-fosforilate di Tau. Alla rimozione del PTX così come notato anche con il Nocodazolo, vi era una significativa riduzione di p-Thr231 Tau indicando che le cellule progrediscono nel ciclo cellulare.

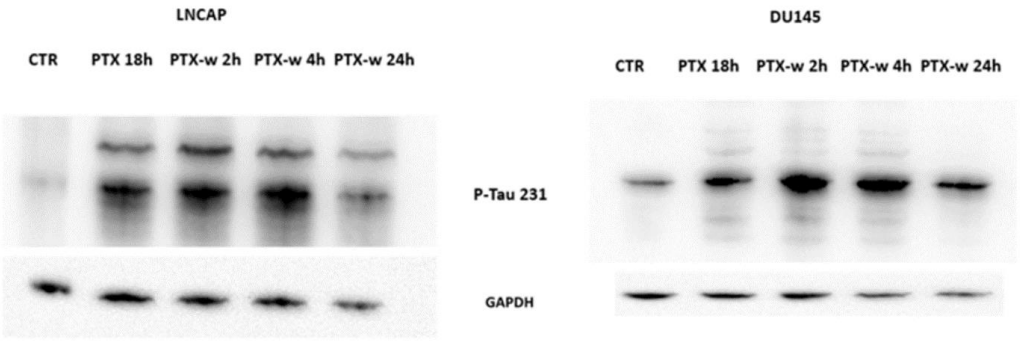


Figura 19: *Analisi tramite western blot dell'espressione di p-Thr231 Tau nelle linee cellulari DU145 e LNCaP dopo il trattamento con 2 nM PTX. L'espressione della fosforilazione della proteina Tau è stata seguita nel tempo dopo lavaggio del PTX e in particolare dopo 2-4-24h. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo di caricamento.*

4.7 L’inibizione delle chinasi CDK5 potenzia l’effetto citotossico del Paclitaxel

I dati presenti in letteratura e i nostri risultati suggeriscono l’esistenza di un equilibrio tra le chinasi e le fosfatasi attive sulla proteina Tau nella progressione del ciclo cellulare. Durante il blocco in fase G2/M a prevalere sono le chinasi con formazione di Tau iper-fosforilata/oligomeri mentre, con il passaggio in fase G1 a prevalere sono le fosfatasi con uno spostamento dell’equilibrio verso la defosforilazione della proteina Tau. Il passo successivo è stato quindi quello di perturbare questo equilibrio per meglio indagare i meccanismi che permettono alla fosforilazione di modulare potenzialmente la sensibilità a farmaci antimitotici. Abbiamo trattato la linea cellulare DU145 con PTX (2-4 nM per 18h), successivamente abbiamo rimosso il PTX (w) e aggiunto la Roscovitina (Ros) inibitore specifico della chinasi CDK5 attiva nella fosforilazione sul residuo Thr231 della proteina Tau (Figura 20a). Abbiamo poi effettuato un test di vitalità e proliferazione nelle stesse condizioni sperimentali (Figura 20b). Il trattamento con Paclitaxel ha provocato un accumulo di Tau iper-fosforilato che è stato contrastato dal trattamento con Roscovitina, e in parallelo si è verificato un significativo effetto sinergico del trattamento combinato sulla vitalità cellulare. Quindi la Roscovitina, impedendo la fosforilazione della Tau, sembra cooperare con all’effetto citotossico del PTX.

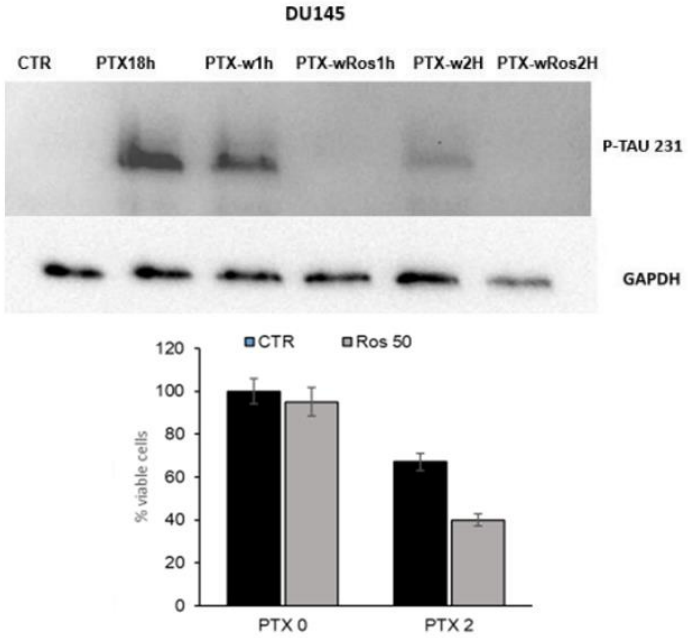


Figura 20: *a) Western blot per l'espressione p-Tau 231, b) Analisi delle cellule vitali a 24h nella linea cellulare DU145 dopo il trattamento con 2 nM PTX per 18 ore in combinazione con la Roscovitina (50 mM fino a 2h). Il trattamento con Paclitaxel ha provocato un accumulo di Tau iper-fosforilato che è stato contrastato dal trattamento con la Roscovitina, e in parallelo c'è stato un significativo effetto sinergico del trattamento combinato sulla vitalità cellulare. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo di caricamento.*

Tali dati rafforzano l'idea che la fosforilazione della proteina Tau giochi un ruolo importante nella progressione del ciclo cellulare. L'ipotesi prevalente suggerisce che la fosforilazione della Tau in G2/M serve perché, in questo momento di transizione, la proteina deve separarsi dai microtubuli che devono diventare più dinamici per consentire i movimenti del fuso necessari per la divisione mitotica. Quindi nella prima fase G2/M è utile la presenza di un'alta attività di chinasi e una bassa attività di fosfatasi. L'inibizione della chinasi CDK5 diventa vantaggiosa per l'attività citotossica dei taxani perché impedire la fosforilazione della Tau determina un fuso statico in G2/M che potenzia l'effetto del farmaco.

4.8 L’attivazione della fosfatasi PP2A coincide con la progressione del ciclo

Alla fine della mitosi la Tau non deve trovarsi fosforilata, perché deve tornare a legare i microtubuli, quindi l’attività delle fosfatasi può essere un ulteriore potenziale bersaglio per migliorare un trattamento terapeutico con taxani. Dalla letteratura sappiamo che la chinasi 1 ciclina-dipendente (CDK1) è considerata il "master switch" nella divisione cellulare, che mantiene lo stato mitotico delle cellule. La letteratura ci indica che CDK1, fosforila una proteina chiamata Set, la quale si attiva e inibisce la fosfatasi PP2A che ha come bersaglio la proteina Tau in particolare il residuo 231. Questa situazione è attiva fino alla metafase e successivamente nel momento in cui scendono i livelli di attività della CDK1 la PP2A si attiva e defosforila la Tau che può tornare sui microtubuli. Nelle nostre linee cellulari l’utilizzo di RO-3306, inibitore specifico di CDK1, ha rappresento quindi un strumento molecolare utile per studiare la funzione di CDK1/PP2A sulla fosforilazione della proteina Tau nella progressione del ciclo. L’RO-3306 è venduto come agente chimico in grado di arrestare reversibilmente le cellule umane proliferanti al confine della fase G2/M. Inizialmente abbiamo voluto confermato questa attività trattando le DU145 con RO-3306 (33) 5 mM per 18h. Terminate le 18 ore abbiamo lavato via l’RO-3306 (w) e misurato l’espressione della Ciclina B1 e del p-Thr231 Tau (Figura 21). Il risultato conferma il blocco in G2/M da parte dell’RO-3306 con l’aumento dei livelli di ciclina B1 che scendono quando l’agente chimico viene rimosso (w). Il trattamento con RO-3306 ha evidenziato anche un aspetto interessante per cui il blocco in G2/M non è associato con l’accumulo delle forme fosforilate della proteina Tau, a differenza del Nocodazolo visto precedentemente. Inoltre sembra

necessaria comunque un aumento delle forme fosforilate a seguito del lavaggio dell'RO-3306.

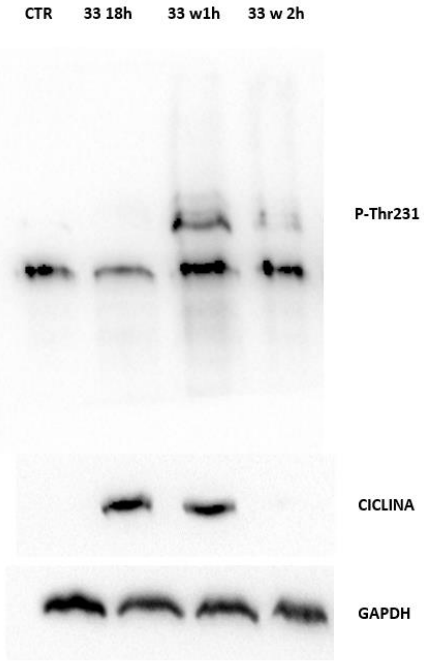


Figura 21: *Western blot per l'espressione della Tau p-Thr231 Tau e ciclina B1 nella linea cellulare DU145 dopo il trattamento con 5 mM RO-3306B (33) per 18 ore. Successivamente, RO-3306 è stato rimosso (w) e l'analisi è stata fatta dopo 1h e dopo 2h . I risultati confermano la capacità dell'RO-3306 di sincronizzare in modo reversibile le cellule e che il blocco non si associa all'accumulo del p-Thr231 Tau. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo di caricamento.*

Ci siamo allora interrogati su quali potessero essere gli effetti di un trattamento combinato PTX/RO-3306 .Le cellule sono state trattate con il PTX (2-4 nM per 18h) , è stato poi aggiunto RO-3306 (5mM fino a 2h) e valutata l'espressione della p-Thr231 Tau (Figura 22). I risultati evidenziano che, in tutte le associazioni è presente una condizione di ipo-fosforilazione della proteina Tau a differenza della condizione sperimentale con il solo PTX. L'RO-3306 inibendo CDK1 sblocca l'inibizione che era attiva su PP2A e quindi indirettamente

favorisce l'eliminazione di p-Tau. Di conseguenza RO-3306, aumentando l'attività della PP2A, inverte quella condizione vantaggiosa dell'accumulo della forma fosforilata di Tau durante il trattamento con PTX descritta precedentemente.

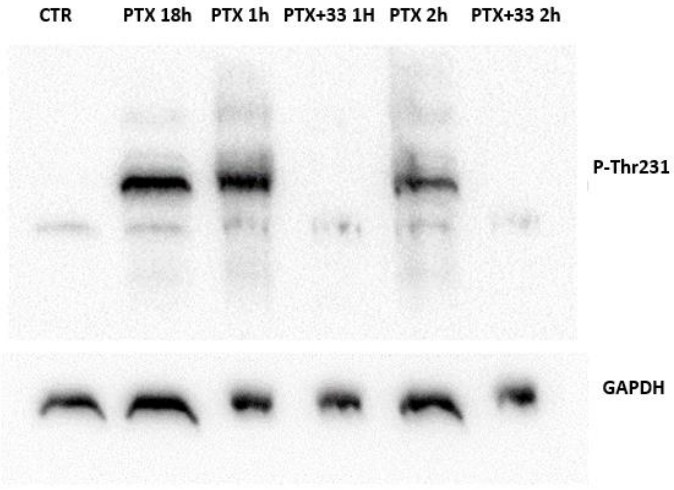


Figura 22: *Western blot per l'espressione p-Tau 231 Tau nella linea cellulare DU145 dopo il trattamento con 2 nM PTX in combinazione con l'RO-3306 (5 mM) ai tempi di 1h e 2h le 18 ore di trattamento con il solo PTX. L'espressione di GAPDH è stata usata come controllo di caricamento.*

Questi risultati ci consentono di considerare l'inibizione della fosfatasi PP2A come evento a vantaggio dell'azione chemioterapica dei taxani. Il controllo degli adeguati livelli di Tau fosforilata in fase G2/M è indispensabile perché il fuso dei microtubuli rimanga dinamico e sotto l'azione del PTX questo, comporta un aumento della possibilità di resistenza al farmaco. Per confermare ulteriormente

questo risultato abbiamo effettuato un test di vitalità e proliferazione in cui le DU145 e PC3 sono state trattate con PTX (4 nM) e RO-3306 (5 μM) o i loro combinati, scegliendo due punti sperimentali 24h e 24h-w (Figura 23). Dagli istogrammi di entrambe le linee cellulari si evince che l'attività della PP2A, stimolata dall'RO-3306, è vantaggiosa per la cellula tumorale perché nei trattamenti combinati con PTX a 24h si osserva un aumento della vitalità. Questo schema di comportamento non si rileva quando le cellule vengono lavate (w) dopo il trattamento con PTX e infatti, abbiamo una riduzione significativa della proliferazione cellulare. Quindi appare evidente che se da una parte lo status fosforilativo di Tau è sicuramente importante nella modulazione della risposta a PTX, i meccanismi con cui si realizza questo evento sono complessi e richiedono una più precisa valutazione dei tempi di realizzazione. Il lavoro sperimentale riportato in questa tesi è tutt'ora in corso proprio con l'intento di valutare il rapporto Tau/p-Tau nelle diverse fasi della mitosi, anche con l'utilizzo di inibitori diretti contro PP2A come l'acido okadaico per investigare in maniera più puntuale il ruolo della defosforilazione nel superamento del checkpoint mitotico.

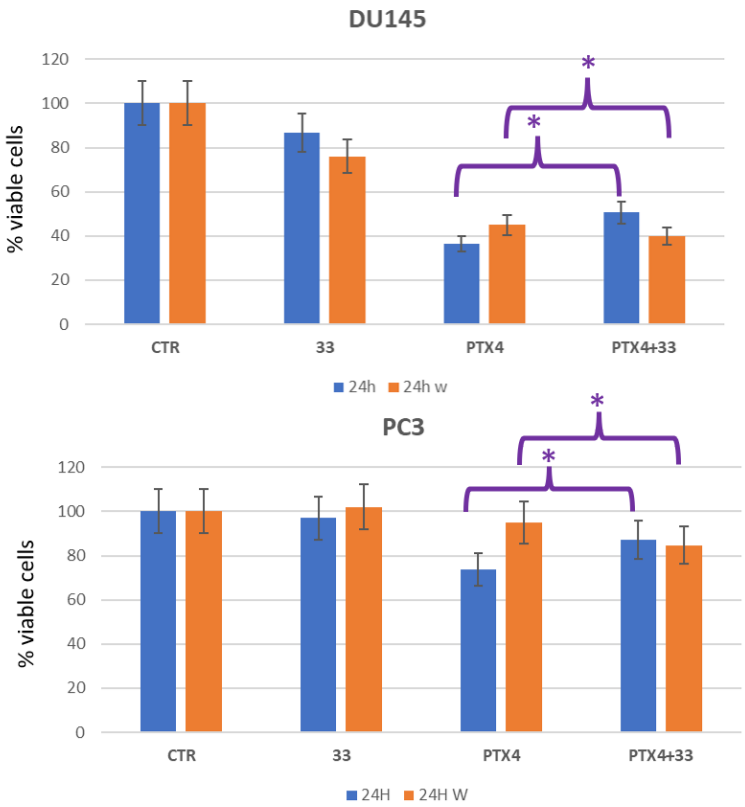


Figura 23 : *Test di vitalità e proliferazione per linee cellulari DU145 e PC3 dopo il trattamento per 24h con PTX (4nM) e RO-3306 (5 μM). Sono messi a confronto i dati ottenuti lasciando i farmaci insieme per i tempi indicati o dopo lavaggio del PTX (w) effettuato a 18h. Sono evidenziati con l'asterisco i cambiamenti significati nella percentuale delle cellule vive (*=P<0,05 test T di Student)*

- 5 –

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Allo stato attuale delle conoscenze i principali partner di legame della proteina Tau sono i microtubuli. La Tau è una proteina stabilizzatrice del microtubulo rilevabile in entrambi i compartimenti cellulari citosolici/citoscheletrici di cellule neuronali e non neuronali, con una regolazione della fosforilazione che è strettamente al suo ruolo fisiologico (nella mitosi per esempio) e patologico patologia (formazione di oligomeri nelle taupatie). Dalla consapevolezza che difetti mitotici sono presenti anche nelle taupatie, l'associazione tra Tau e mitosi è un intrigante campo di studio anche in cellule non neuronali. Con questo studio abbiamo confermato che il controllo dell'omeostasi strutturale di Tau è essenziale anche nelle cellule tumorali, in quanto perturbazioni della stessa determinano perdita della funzione di stabilizzatore dei microtubuli compromettendo la divisione cellulare. Di conseguenza in un contesto tumorale è possibile pensare ad un potenziale ruolo antimitotico anche per la proteina Tau. Nella prima parte del lavoro ci siamo concentrati sullo studio degli oligomeri della proteina Tau nella progressione delle cellule tumorali in quanto nelle taupatie sembrano essere proprio l'evoluzione degli oligomeri il principale agente eziologico. Il meccanismo alla base dell'effetto tossico degli oligomeri Tau è attualmente sconosciuto, tuttavia i dati disponibili in letteratura insieme ai risultati ottenuti permettono di ipotizzare una possibile interferenza nella corretta

formazione del fuso mitotico. I nostri studi in vitro, hanno dimostrano che in presenza di uno stress mitotico come quello indotto dagli inibitori dell'autofagia Clorochina o Bafilomicina, si ha la formazione di oligomeri di tau in concomitanza con la formazione di fusi mitotici aberranti. In questa condizione sperimentale la localizzazione della Tau appare prevalente a livello del compartimento citosolico e questo aspetto è in linea con l'accumulo della proteina come oligomeri Tau solubili. I dati in nostro possesso sembrano suggerire che Tau si trovi nelle cellule tumorali in uno stato di equilibrio tra le forme monomeriche e le forme oligomeriche, la cui attività sembra prevalentemente dannosa e questo potrebbe rappresentare un tallone d'Achille per la cellula tumorale. Infatti, per evitare la formazione di oligomeri Tau tossici, le cellule tumorali devono mantenere un elevato turnover proteico, soprattutto durante la mitosi, realizzato tramite l'attivazione costitutiva dell'autofagica. Secondo questa ipotesi l'inibizione dell'autofagia, interferendo con il turnover Tau e portando all'accumulo delle forme oligomeriche potrebbe rappresentare una strategia efficace per contrastare la resistenza agli agenti antimitotici. Infatti, i nostri dati suggeriscono che nelle cellule del cancro alla prostata, in condizioni basali l'inibizione dell'autofagia determina una piccola riduzione della proliferazione mentre in combinazione con il Docetaxel l'effetto citotossico è additivo. Concludendo, la nostra prima parte del lavoro sperimentale propone che l'autofagia è in grado di contrastare la tossicità del Docetaxel modulando il livello di accumulo della proteina Tau in forma oligomerica, forma che non è più in grado di legare i microtubuli. L'iper-fosforilazione anomala della tau è un segno distintivo della malattia di Alzheimer e delle cosiddette taupatie, malattie a insorgenza adulta caratterizzate dalla rottura del citoscheletro e deposizione di

filamenti di Tau iper-fosforilati nei neuroni e cellule gliali, con conseguente atrofia cerebrale e demenza. Nella seconda parte del lavoro ci siamo occupati dello studio delle modificazioni post-trasduzionali che portano alla formazione degli oligomeri Tau in particolar modo sulla fosforilazione. La proteina Tau viene fosforilata su moltissimi residui e la nostra indagine è stata mirata alla fosforilazione sul dominio di legame ai microtubuli nell'estremità C-terminale della proteina. Attraverso la sincronizzazione delle linee cellulari in fase G2/M abbiamo verificato che la fosforilazione di Tau segue un andamento ciclo-dipendente : durante il blocco in fase G2/M a prevalere sono le chinasi con formazione di Tau iper-fosforilata/oligomeri mentre, con il rientro in fase G1 a prevalere sono le fosfatasi con uno spostamento dell'equilibrio verso la defosforilazione. In questo schema ciclico è interessante capire se si verifichi una possibile associazione con l'azione dei ai taxani anche per le possibili applicazioni terapeutiche La fosforilazione fisiologica in G2/M porta la proteina Tau a perdere l'affinità di legame ai microtubuli e ad accumularsi nel citoplasma come oligomeri. Questo funzionalmente consente l'instabilità dinamica necessaria per i cambiamenti del fuso mitotico durante le prime fasi della mitosi. Uno dei problemi associati al trattamento con taxani è quello della resistenza cellulare. La cellula tumorale infatti può attivare dei meccanismi che consentono di superare il punto di controllo SAC (spindle assembly checkpoint). Tali meccanismi sono normalmente associati alla capacità di aggirare il controllo della ciclina B1 che quando scende sotto la soglia richiesta, anche in presenza di un agente antimitotico, stimola un processo noto come "scivolamento mitotico" (mitotic slippage). Con i nostri esperimenti abbiamo dimostrato che se viene alterato l'equilibrio chinasi/fosfatasi attive sulla tau ad esempio utilizzando

l'inibitore della chinasi CDK5 Roscovitina, viene meno l'aumento della fosforilazione in fase G2/M del ciclo cellulare, la Tau rimane con alta affinità di legame ai microtubuli e l'attività citotossica del taxano è potenziata. In altre parole la tau non fosforilata rimane legata ai microtubuli impedendone la plasticità dinamica e quindi la progressione alla metafase e contribuendo all'azione di stabilizzante dei microtubuli svolta dai taxani. Un ulteriore aspetto che però abbiamo solo iniziato a verificare è il possibile ruolo della defosforilazione di Tau sul superamento del SAC. Infatti una condizione di ipo-fosforilazione su Tau sembra essere necessaria per il passaggio in G1 in una cellula bloccata in fase M. Quindi può essere ipotizzabile che l'inibizione della fosfatasi potrebbe lavorare in sinergia con il taxano impedendo lo scivolamento mitotico (Figura 24).

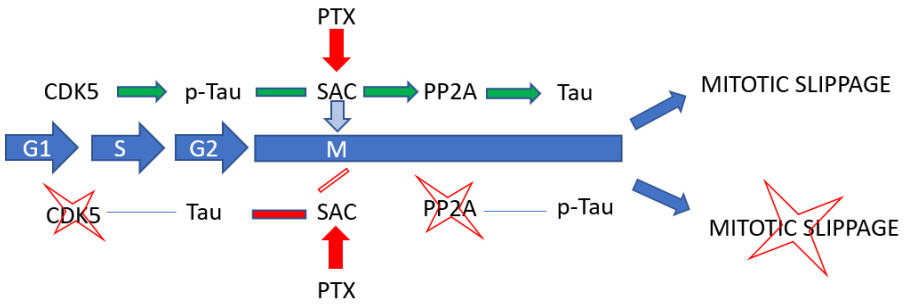


Figura 24: *Ipotesi di azione combinata di taxani e Tau sul checkpoint associato al fuso mitotico: il blocco del ciclo cellulare in fase G2/M da parte del Paclitaxel potrebbe essere parzialmente contrastato dalla fosforilazione della tau in un meccanismo che può spiegare la resistenza alla chemioterapia. In parallelo, l'inibizione della fosforilazione di Tau, tramite Roscovitina, si traduce in una ridotta capacità delle cellule di avanzare nel ciclo cellulare dopo il blocco della fase G2/M.*

Valutando collettivamente i risultati ottenuti nel nostro percorso di ricerca possiamo affermare di aver accumulato nuove evidenze su un argomento ancora poco studiato, cioè del potenziale ruolo oncogenico della proteina Tau. Quello che siamo riusciti ad evidenziare è soprattutto un ruolo nel rapporto delle varie forme della proteina Tau tra le diverse fasi del ciclo cellulare e come questo rapporto, condizioni la resistenza a farmaci antimitotici o la capacità delle cellule tumorali di avanzare durante i checkpoint del ciclo in condizioni aberranti. In particolare abbiamo dimostrato l'importanza del mantenimento di una omeostasi tra le forme della proteina Tau durante la mitosi. Abbiamo dimostrato che la presenza di Tau altamente dinamico può proteggere dalla citotossicità del Docetaxel/Paclitaxel e che interferendo con tale dinamismo, ad esempio forzando l'accumulo di tau si possa ottenere un'azione sinergica con il farmaco antimitotico. In base ai dati ottenuti è soprattutto l'interferenza con la regolazione ciclo-dipendente della fosforilazione che risulta particolarmente interessante. Se viene perturbato l'equilibrio sulle chinasi la Tau non viene fosforilata in G2/M e questo significa avere una Tau legata ai microtubuli. In questa situazione il PTX agisce meglio perché le cellule fanno più fatica a superare l'effetto stabilizzante del taxano. Allo stesso tempo però anche l'inibizione della fosforilazione sembra avere un ruolo tossico sinergico, perché sembra essere associato ad uno stadio intermedio della mitosi, a ridosso della metafase. Sebbene, l'identificazione di terapie mirate alla modulazione della fosforilazione della proteina Tau potrebbero quindi rappresentare una strategia per risensibilizzare i casi resistenti ai taxani e prolungare l'efficacia di questi potenti anti-farmaci contro il cancro, sarà molto importante ulteriormente

indagare i meccanismi di controllo della fosforilazione di Tau, soprattutto durante mitosi.

- 6 -

BIBLIOGRAFIA

1. Delacourte A, Buée L. Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. Curr Opin Neurol. 2000 Aug;13(4):371-6. doi: 10.1097/00019052-200008000-00002. PMID: 10970052.

2. Shahani N, Brandt R. Functions and malfunctions of the tau proteins. Cell Mol Life Sci. 2002 Oct;59(10):1668-80. doi: 10.1007/pl00012495. PMID: 12475178.

3. Wille H, Mandelkow EM, Dingus J, Vallee RB, Binder LI, Mandelkow E. Domain structure and antiparallel dimers of microtubule-associated protein 2 (MAP2). J Struct Biol. 1992 Jan-Feb;108(1):49-61. doi: 10.1016/1047-8477(92)90006-v. PMID: 1373291.

4. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. J Mol Biol. 1977 Oct 25;116(2):227-47. doi: 10.1016/0022-2836(77)90214-5. PMID: 146092.

5. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. Brain Res. 1986 Dec;387(3):271-80. doi: 10.1016/0169-328x(86)90033-1. PMID: 3103857.

6. Goedert M, Klug A, Crowther RA. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2006;9(3 Suppl):195-207. doi: 10.3233/jad-2006-9s323. PMID: 16914859.

7. Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of tau protein and interactions with microtubules. Biochemistry. 1994 Aug 16;33(32):9511-22. doi: 10.1021/bi00198a017. PMID: 8068626.

8. Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. Neurobiol Aging. 1995 May-Jun;16(3):355-62; discussion 362-3. doi: 10.1016/0197-4580(95)00025-a. PMID: 7566345.

9. Lu Q, Wood JG. Functional studies of Alzheimer's disease tau protein. J Neurosci. 1993 Feb;13(2):508-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-02-00508.1993. PMID: 8426226; PMCID: PMC6576632.

10. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, 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 Feb;8(2):393-9. PMID: 2498079; PMCID: PMC400819.

11. Makrides V, Shen TE, Bhatia R, Smith BL, Thimm J, Lal R, Feinstein SC. Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. J Biol Chem. 2003 Aug 29;278(35):33298-304. doi: 10.1074/jbc.M305207200. Epub 2003 Jun 12. PMID: 12805366.

12. 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 Dec;9(13):4225-30. PMID: 2124967; PMCID: PMC552204.

13. Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L. Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9548-53. doi: 10.1073/pnas.1633508100. Epub 2003 Jul 28. PMID: 12886013; PMCID: PMC170955.

14. Bunker JM, Wilson L, Jordan MA, Feinstein SC. Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. Mol Biol Cell. 2004 Jun;15(6):2720-8. doi: 10.1091/mbc.e04-01-0062. Epub 2004 Mar 12. PMID: 15020716; PMCID: PMC420096.

15. Georgieff IS, Liem RK, Mellado W, Nunez J, Shelanski ML. High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. J Cell Sci. 1991 Sep;100(Pt 1):55-60. doi: 10.1242/jcs.100.1.55. PMID: 1724450.

16. Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, Nunez J. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 May 15;89(10):4378-81. doi: 10.1073/pnas.89.10.4378. PMID: 1374898; PMCID: PMC49085.

17. Brandt R, Léger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. J Cell Biol. 1995 Dec;131(5):1327-40. doi: 10.1083/jcb.131.5.1327. PMID: 8522593; PMCID: PMC2120645.

18. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. Nature. 1992 Dec 17;360(6405):674-7. doi: 10.1038/360674a0. PMID: 1465130

19. Luo MH, Leski ML, Andreadis A. Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. J Cell Biochem. 2004 Apr 1;91(5):880-95. doi: 10.1002/jcb.20029. PMID: 15034924.

20. Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buée L. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. Expert Rev Proteomics. 2008 Apr;5(2):207-24. doi: 10.1586/14789450.5.2.207. PMID: 18466052.

21. Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Jul;2(7):a006247. doi: 10.1101/cshperspect.a006247. PMID: 22762014; PMCID: PMC3385935.

22. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 May;72(5):1858-62. doi: 10.1073/pnas.72.5.1858. PMID: 1057175; PMCID: PMC432646.

23. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The many faces of tau. Neuron. 2011 May 12;70(3):410-26. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.009. PMID: 21555069; PMCID: PMC3319390.

24. Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Söling HD, Drechsel D, Kirschner MW, Goedert M, Mandelkow E. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca2(+)-calmodulin

dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. EMBO J. 1990 Nov;9(11):3539-44. PMID: 2120043; PMCID: PMC552103.

25. Brandt R, Lee G. Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. J Biol Chem. 1993 Feb 15;268(5):3414-9. PMID: 8429017.

26. Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. Mol Biol Cell. 1995 Dec;6(12):1887-902. doi: 10.1091/mbc.6.12.1887. PMID: 8590813; PMCID: PMC366657.

27. Caceres A, Kosik KS. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. Nature. 1990 Feb 1;343(6257):461-3. doi: 10.1038/343461a0. PMID: 2105469.

28. Alonso AD, Zaidi T, Novak M, Barra HS, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. J Biol Chem. 2001 Oct 12;276(41):37967-73. doi: 10.1074/jbc.M105365200. Epub 2001 Aug 8. PMID: 11495914.

29. Goode BL, Feinstein SC. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. J Cell Biol. 1994 Mar;124(5):769-82. doi: 10.1083/jcb.124.5.769. PMID: 8120098; PMCID: PMC2119949.

30. Jho YS, Zhulina EB, Kim MW, Pincus PA. Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. Biophys J. 2010 Oct 20;99(8):2387-97. doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.056. PMID: 20959078; PMCID: PMC2955347.

31. Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. Biochemistry. 2009 Oct 27;48(42):10047-55. doi: 10.1021/bi901090m. PMID: 19769346.

32. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL 3rd, Mumby MC, Bloom GS. Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. J Biol Chem. 1999 Sep 3;274(36):25490-8. doi: 10.1074/jbc.274.36.25490. PMID: 10464280.

33. Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. J Cell Biol. 2002 Jun 24;157(7):1187-96. doi: 10.1083/jcb.200201048. Epub 2002 Jun 24. PMID: 12082079; PMCID: PMC2173547.

34. Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. EMBO J. 2003 Jan 2;22(1):70-7. doi: 10.1093/emboj/cdg001. PMID: 12505985; PMCID: PMC140040.

35. Sergeant N, Delacourte A, Buée L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. Biochim Biophys Acta. 2005 Jan 3;1739(2-3):179-97. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020. PMID: 15615637.

36. Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow EM, Song YH, Mandelkow E. Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. EMBO J. 2002 Sep 16;21(18):4896-905. doi: 10.1093/emboj/cdf503. PMID: 12234929; PMCID: PMC126299.

37. Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. Prog Neurobiol. 2008 Jun;85(2):148-75. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.03.002. Epub 2008 Mar 22. PMID: 18448228.

38. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Watanabe A, Titani K, Ihara Y. Hyperphosphorylation of tau in PHF. Neurobiol Aging. 1995 May-Jun;16(3):365-71; discussion 371-80. doi: 10.1016/0197-4580(95)00027-c. PMID: 7566346.

39. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. Biochim Biophys Acta. 2005 Jan 3;1739(2-3):198-210. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.09.008. PMID: 15615638.

40. Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. EMBO J. 2001 Jan 15;20(1-2):27-39. doi: 10.1093/emboj/20.1.27. PMID: 11226152; PMCID: PMC140191.

41. Hagestedt T, Lichtenberg B, Wille H, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. J Cell Biol. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1643-51. doi: 10.1083/jcb.109.4.1643. PMID: 2507554; PMCID: PMC2115827.

42. Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. J Biol Chem. 1984 Apr 25;259(8):5301-5. PMID: 6425287.

43. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol Biol Cell. 1992 Oct;3(10):1141-54. doi: 10.1091/mbc.3.10.1141. PMID: 1421571; PMCID: PMC275678.

44. Kosik KS, Shimura H. Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. Biochim Biophys Acta. 2005 Jan 3;1739(2-3):298-310. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.10.011. Epub 2004 Nov 26. PMID: 15615647.

45. Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. J Biol Chem. 1995 Mar 31;270(13):7679-88. doi: 10.1074/jbc.270.13.7679. PMID: 7706316.

46. Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhöfer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. Mol Biol Cell. 2002 Nov;13(11):4013-28. doi: 10.1091/mbc.02-03-0046. PMID: 12429843; PMCID: PMC133611.

47. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces tau binding to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. Neuron. 1993 Jul;11(1):153-63. doi: 10.1016/0896-6273(93)90279-z. PMID: 8393323

48. García de Ancos J, Correas I, Avila J. Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms. J Biol Chem. 1993 Apr 15;268(11):7976-82. PMID: 8463318.

49. Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. Nature. 1994 Sep 29;371(6496):423-6. doi: 10.1038/371423a0. PMID: 8090222.

50. Pei JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Bogdanovic N, Winblad B, Cowburn RF. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. Brain Res. 1998 Jun 29;797(2):267-77. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00296-0. PMID: 9666145.

51. Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. FEBS Lett. 1993 Jul 5;325(3):167-72. doi: 10.1016/0014-5793(93)81066-9. PMID: 7686508.

52. Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. Neuroscience. 1996 Aug;73(4):1145-57. doi: 10.1016/0306-4522(96)00126-1. PMID: 8809831.

53. Cho JH, Johnson GV. Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. J Neurochem. 2004 Jan;88(2):349-58. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02155.x. PMID: 14690523.

54. Forlenza OV, Aprahamian I, de Paula VJ, Hajek T. Lithium, a Therapy for AD: Current Evidence from Clinical Trials of Neurodegenerative Disorders. Curr Alzheimer Res. 2016;13(8):879-86. doi: 10.2174/1567205013666160219112854. PMID: 26892289.

55. Matsunaga S, Kishi T, Annas P, Basun H, Hampel H, Iwata N. Lithium as a Treatment for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Alzheimers Dis. 2015;48(2):403-10. doi: 10.3233/JAD-150437. PMID: 26402004.

56. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. Physiol Rev. 2004 Apr;84(2):361-84. doi: 10.1152/physrev.00024.2003. PMID: 15044677.

57. Shimura H, Miura-Shimura Y, Kosik KS. Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. J Biol Chem. 2004 Apr 23;279(17):17957-62. doi: 10.1074/jbc.M400351200. Epub 2004 Feb 12. PMID: 14963027.

58. Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):11074-9. doi: 10.1073/pnas.190297597. PMID: 10995469; PMCID: PMC27150.

59. Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. Mol Med Trends. 2009 Mar;15(3):112-9. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.003. Epub 2009 Feb 24. PMID: 19246243.

60. Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. Nature. 2000 May 18;405(6784):360-4. doi: 10.1038/35012636. PMID: 10830966.

61. Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. Nature. 1999 Dec 9;402(6762):615-22. doi: 10.1038/45159. PMID: 10604467.

62. Li T, Hawkes C, Qureshi HY, Kar S, Paudel HK. Cyclin-dependent protein kinase 5 triggers microtubule-associated tau protein in a site-specific manner for glycogen synthase kinase 3beta. Biochemistry. 2006 Mar 14;45(10):3134-45. doi: 10.1021/bi051635j. PMID: 16519508.

63. Sontag JM, Sontag E. Dysfunction of protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. Front Mol Neurosci. 2014 Mar 11;7:16. doi: 10.3389/fnmol.2014.00016. PMID: 24653673; PMCID: PMC3949405.

64. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. Eur J Neurosci. 2005 Oct;22(8):1942-50. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x. PMID: 16262633.

65. Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. J Neurochem. 1995 Aug;65(2):732-8. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65020732.x. PMID: 7616230.

66. Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. J Neurochem. 1993 Sep;61(3):921-7. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x. PMID: 8395566.

67. Kim JH, Kim E, Choi WH, Lee J, Lee JH, Lee H, Kim DE, Suh YH, Lee MJ. Aptamers RNA inhibitors of Tau oligomerization and their neuroprotective role against proteotoxic stress. Mol Pharm. 2016 Jun 6;13(6):2039-48. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00165. Epub 2016 May 4. PMID: 27120117.

68. Necula M, Kuret J. Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. J Biol Chem. 2004 Nov 26;279(48):49694-703. doi: 10.1074/jbc.M405527200. Epub 2004 Sep 10. PMID: 15364924.

69. Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. Nat Rev Neurosci. 2016 Jan;17(1):5-21. doi: 10.1038/nrn.2015.1. Epub 2015 Dec 3. PMID: 26631930.

70. Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. Neuroscience. 2002;115(3):829-37. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00510-9. PMID: 12435421.

71. Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussière T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. Biochim Biophys Acta. 2003 Jan 20;1619(2):167-76. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00477-4. PMID: 12527113.

72. Ledesma MD, Medina M, Avila J. The in vitro formation of recombinant tau polymers: effect of phosphorylation and glycation. Mol Chem Neuropathol. 1996 Apr;27(3):249-58. doi: 10.1007/BF02815107. PMID: 9147411.

73. Su B, Wang X, Lee HG, Tabaton M, Perry G, Smith MA, Zhu X. Lo stress ossidativo cronico causa un aumento della fosforilazione tau in cellule di neuroblastoma M17. Neurosci Lett. 2010 Jan 14;468(3):267-71. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.010. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19914335

74. Ono T, Yamamoto H, Tashima K, Nakashima H, Okumura E, Yamada K, Hisanaga S, Kishimoto T, Miyakawa T, Miyamoto E. Dephosphorylation of abnormal sites of tau factor by protein phosphatases and its implication for Alzheimer's disease. Neurochem Int. 1995 Mar;26(3):205-15. doi: 10.1016/0197-0186(94)00135-h. PMID: 7787767.

75. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 20;101(29):10804-9. doi: 10.1073/pnas.0400348101. Epub 2004 Jul 12. PMID: 15249677; PMCID: PMC490015.

76. Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat Rev Neurosci. 2007 Sep;8(9):663-72. doi: 10.1038/nrn2194. PMID: 17684513.

77. Eckert A, Nisbet R, Grimm A, Götz J. March separate, strike together - role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1842(8):1258-66. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.013. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24051203

78. Andrews-Zwilling Y, Bien-Ly N, Xu Q, Li G, Bernardo A, Yoon SY, Zwilling D, Yan TX, Chen L, Huang Y. Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. J Neurosci. 2010 Oct 13;30(41):13707-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4040-10.2010. PMID: 20943911; PMCID: PMC2988475.

79. Johnson GV, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. J Cell Sci. 2004 Nov 15;117(Pt 24):5721-9. doi: 10.1242/jcs.01558. PMID: 15537830.

80. Delacourte A, Buée L. Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly. Int Rev Cytol. 1997;171:167-224. doi: 10.1016/s0074-7696(08)62588-7. PMID: 9066128.

81. McIntosh JR, Hering GE. Spindle fiber action and chromosome movement. Annu Rev Cell Biol. 1991;7:403-26. doi: 10.1146/annurev.cb.07.110191.002155. PMID: 1809351.

82. . Karsenti E. Microtubule dynamics: severing microtubules in mitosis. Curr Biol. 1993 Apr 1;3(4):208-10. doi: 10.1016/0960-9822(93)90334-k. PMID: 15335768.

83. Belmont LD, Hyman AA, Sawin KE, Mitchison TJ. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. Cell. 1990 Aug 10;62(3):579-89. doi: 10.1016/0092-8674(90)90022-7. PMID: 2379239.

84. Saxton WM, Stemple DL, Leslie RJ, Salmon ED, Zavortink M, McIntosh JR. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. J Cell Biol. 1984 Dec;99(6):2175-86. doi: 10.1083/jcb.99.6.2175. PMID: 6501419; PMCID: PMC2113582.

85. Benjamin Lacroix, Gaëlle Letort, Laras Pitayu, Jérémy Sallé, Marine Stefanutti, Gilliane Maton, Anne-Marie Ladouceur, Julie C. Canman, Paul S. Maddox, Amy S. Maddox, Nicolas Minc, François Nédélec, Julien Dumont,Microtubule Dynamics Scale with Cell Size to Set Spindle Length and Assembly Timing,Developmental Cell,Volume 45, Issue 4,2018, Pages 496-511.e6, ISSN 1534-5807, doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.022.

86. Azimzadeh J. Exploring the evolutionary history of centrosomes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014 Sep 5;369(1650):20130453. doi: 10.1098/rstb.2013.0453. PMID: 25047607; PMCID: PMC4113097.

87. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 May;8(5):379-93. doi: 10.1038/nrm2163. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17426725.

88. . Prosser SL, Pelletier L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Mar;18(3):187-201. doi: 10.1038/nrm.2016.162. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28174430.

89. Pope WB, Lambert MP, Leypold B, Seupaul R, Sletten L, Krafft G, Klein WL. Microtubule-associated protein tau is hyperphosphorylated during mitosis in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Exp Neurol. 1994 Apr;126(2):185-94. doi: 10.1006/exnr.1994.1057. PMID: 7925819.

90. Saxton WM, Stemple DL, Leslie RJ, Salmon ED, Zavortink M, McIntosh JR. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. J Cell Biol. 1984 Dec;99(6):2175-86. doi: 10.1083/jcb.99.6.2175. PMID: 6501419; PMCID: PMC2113582.

91. Masson D, Kreis TE. Binding of E-MAP-115 to microtubules is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation. J Cell Biol. 1995 Nov;131(4):1015-24. doi: 10.1083/jcb.131.4.1015. PMID: 7490279; PMCID: PMC2200015.

92. Nigg EA. Cellular substrates of p34(cdc2) and its companion cyclin-dependent kinases. Trends Cell Biol. 1993 Sep;3(9):296-301. doi: 10.1016/0962-8924(93)90011-o. PMID: 14731846.

93. Preuss U, Döring F, Illenberger S, Mandelkow EM. Cell cycle-dependent phosphorylation and microtubule binding of tau protein stably transfected into Chinese hamster ovary cells. Mol Biol Cell. 1995 Oct;6(10):1397-410. doi: 10.1091/mbc.6.10.1397. PMID: 8573794; PMCID: PMC301295.

94. Vandré DD, Davis FM, Rao PN, Borisy GG. Distribution of cytoskeletal proteins sharing a conserved phosphorylated epitope. Eur J Cell Biol. 1986 Jun;41(1):72-81. PMID: 3792337.

95. Brugg B, Matus A. Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. J Cell Biol. 1991 Aug;114(4):735-43. doi: 10.1083/jcb.114.4.735. PMID: 1907976; PMCID: PMC2289883.

96. Preuss U, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells. J Cell Sci. 1997 Mar;110(Pt 6):789-800. doi: 10.1242/jcs.110.6.789. PMID: 9099953.

97. Rossi G, Conconi D, Panzeri E, Paoletta L, Piccoli E, Ferretti MG, Mangieri M, Ruggerone M, Dalprà L, Tagliavini F. Mutations in MAPT give rise to aneuploidy in animal models of tauopathy. Neurogenetics. 2014 Mar;15(1):31-40. doi: 10.1007/s10048-013-0380-y. Epub 2013 Nov 12. PMID: 24218087; PMCID: PMC3968519.

98. Rossi G, Dalprà L, Crosti F, Lissoni S, Sciacca FL, Catania M, Di Fede G, Mangieri M, Giaccone G, Croci D, Tagliavini F. A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. Cell Cycle. 2008 Jun 15;7(12):1788-94. doi: 10.4161/cc.7.12.6012. Epub 2008 Jun 25. PMID: 18583940.

99. Illenberger S, Zheng-Fischhöfer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E. The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. Mol Biol Cell. 1998 Jun;9(6):1495-512. doi: 10.1091/mbc.9.6.1495. PMID: 9614189; PMCID: PMC25374.

100. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer. 2006 Dec;6(12):924-35. doi: 10.1038/nrc2013. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17109012.

101. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. Nature. 1975 May 15;255(5505):197-200. doi: 10.1038/255197a0. PMID: 1143315.

102. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. Nature. 2012 Jan 18;481(7381):306-13. doi: 10.1038/nature10762. PMID: 22258609; PMCID: PMC3367003.

103. Papin S, Paganetti P. Emerging Evidences for an Implication of the Neurodegeneration-Associated Protein TAU in Cancer. Brain Sci. 2020 Nov 16;10(11):862. doi: 10.3390/brainsci10110862. PMID: 33207722; PMCID: PMC7696480.

104. Snyder HM, Ahles T, Calderwood S, Carrillo MC, Chen H, Chang CH, Craft S, De Jager P, Driver JA, Fillit H, Knopman D, Lotze M, Tierney MC, Petanceska S, Saykin A, Seshadri S, Shineman D, Ganguli M. Exploring the nexus of Alzheimer's disease and related dementias with cancer and cancer therapies: A convening of the Alzheimer's Association & Alzheimer's Drug Discovery Foundation. Alzheimers Dement. 2017 Mar;13(3):267-273. doi: 10.1016/j.jalz.2016.11.002. Epub 2016 Dec 18. PMID: 27998721; PMCID: PMC5548424.

105. Barbolina MV. Dichotomous role of microtubule associated protein tau as a biomarker of response to and a target for increasing efficacy of taxane treatment in cancers of epithelial origin. Pharmacol Res. 2021 Jun;168:105585. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105585. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33798735; PMCID: PMC8165012.

106. Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. Dev Cell. 2004 Nov;7(5):637-51. doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.002. PMID: 15525526.

107. Maloney SM, Hoover CA, Morejon-Lasso LV, Prosperi JR. Mechanisms of Taxane Resistance. Cancers (Basel). 2020 Nov 10;12(11):3323. doi: 10.3390/cancers12113323. PMID: 33182737; PMCID: PMC7697134.

108. Koo DH, Lee HJ, Ahn JH, Yoon DH, Kim SB, Gong G, Son BH, Ahn SH, Jung KH. Tau and PTEN status as predictive markers for response to trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-positive breast cancer. Tumour Biol. 2015 Aug;36(8):5865-71. doi: 10.1007/s13277-015-3258-9. Epub 2015 Mar 1. PMID: 25725586.

109. Mimori K, Sadanaga N, Yoshikawa Y, Ishikawa K, Hashimoto M, Tanaka F, Sasaki A, Inoue H, Sugimachi K, Mori M. Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment. Br J Cancer. 2006 Jun 19;94(12):1894-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6603182. Epub 2006 May 23. PMID: 16721363; PMCID: PMC2361361.

110. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, Hess KR, Gold DL, Stec J, Ayers M, Ross JS, Zhang P, Buchholz TA, Kuerer H, Green M, Arun B, Hortobagyi GN, Symmans WF, Pusztai L. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 7;102(23):8315-20. doi: 10.1073/pnas.0408974102. Epub 2005 May 24. PMID: 15914550; PMCID: PMC1149405.

111. Wosnitzer MS, Domingo-Domenech J, Castillo-Martin M, Ritch C, Mansukhani M, Petrylack DP, Benson MC, McKiernan JM, Cordon-Cardo C. Predictive value of microtubule associated proteins tau and stathmin in patients with nonmuscle invasive bladder cancer receiving adjuvant intravesical taxane therapy. J Urol. 2011

Nov;186(5):2094-100. doi: 10.1016/j.juro.2011.06.051. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21944130.

112. Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Ludueña RF, Downing KH. Structure of tubulin at 6.5 A and location of the taxol-binding site. Nature. 1995 Jun 1;375(6530):424-7. doi: 10.1038/375424a0. PMID: 7760939.

113. Pazdur R, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Cohen PR, Raber MN. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). Cancer Treat Rev. 1993 Oct;19(4):351-86. doi: 10.1016/0305-7372(93)90010-o. PMID: 8106152.

114. Mittal K, Donthamsetty S, Kaur R, Yang C, Gupta MV, Reid MD, Choi DH, Rida PCG, Aneja R. Multinucleated polyploidy drives resistance to Docetaxel chemotherapy in prostate cancer. Br J Cancer. 2017 Apr 25;116(9):1186-1194. doi: 10.1038/bjc.2017.78. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28334734; PMCID: PMC5418452.