



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**Estudio de la interacción entre la Proteína
Asociada a Microtúbulos 1B y la enzima
Tirosina Tubulina Ligasa en Neuronas**

Erick Alejandro Contreras Vallejos

Memoria para optar al título de Bioquímico

Director de Memoria

Dr. Christian González-Billault
Instituto Milenio de Dinámica Celular
y Biotecnología
Laboratorio de Neurociencias
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

**Santiago – Chile
2008**

Dedicado a todos quienes hacen de la ciencia su vida y a aquellos que nos apoyan en este camino....

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que participaron en este largo proceso, que empezó ya hace algunos años atrás cuando comencé el primer año de Bioquímica. Por su constante apoyo, debo en primer lugar agradecer a mi familia, en especial a mis padres Víctor Contreras e Irma Vallejos, sin los cuales no hubiese logrado ser lo que actualmente soy.

Agradecimientos especiales a Jéssica Cortés quien me acompañó durante mi paso por la universidad y fue un constante apoyo en todo los aspectos de mi existencia. Agradecer a mis amigos, que siempre han estado cuando los he necesitado, en las buenas y en las malas: Mauro, Mario, Fernando, Cristian , Coty, Monse, Pancho, Roger, Ale, Pame, Daniel, Carola y muchos otros más. A mis profesores y guías que me mostraron como hacer ciencia.

A todos los integrantes del Laboratorio de Neurociencias, a Carolina Montenegro y Cristina Olmos, por su constante ayuda en todos los aspectos tanto laborales como personales, a Sebastián Rojas por compartir sus conocimientos y ser muy buen partner , a Cristian de Gregorio y Vicente Valenzuela por su constante simpatía y colaboración, a Elías Utreras, por entregarme sus conocimientos sin esperar nada a cambio, y por último a Christian González –Billault, mi director de memoria, quien me dio muchas posibilidades para mi desarrollo como Bioquímico, agradezco su confianza y sinceridad, y el constante aliento e incentivo para ser un mejor científico.

Financiamiento

Proyecto Fondecyt 1060040, Iniciativa Científica Milenio ICM P05-001-F,
ICGEB CRP CHI06-01

Esta memoria dio lugar a las siguientes presentaciones a congresos y publicaciones:

XX Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile.

2006, Pucón, Chile

Poster Regulación de la interacción entre la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) y la enzima tubulina tirosina ligasa (TTL)

Erick Contreras-Vallejos¹, Sebastián Rojas¹, Elías Utreras¹, Eva-María Jiménez-Mateos², Lorena Saragoni³, Ricardo B-Maccioni³, Didier Job⁴, Jesús Avila² y Christian Gonzalez-Billault¹.

(1) Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (2) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, España (3) Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (4) CEA-INSERM, Grenoble, Francia.

XX Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile.

2006, Pucón, Chile

Presentación en simposio de neurociencias El rol de la proteína asociada a microtúbulos 1B en migración neuronal.

Christian Gonzalez-Billault¹, Erick Contreras-Vallejos¹, Sebastián Rojas¹, Nancy Farfán¹, Vicente Valenzuela¹, Elías Utreras¹, Eva Maria Jiménez-Mateos^{1,2} and Jesús Avila²

(1) Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (2) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, España.

XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile.

2007, Pucón, Chile

Poster La interacción entre MAP1B y TTL regula la tirosinación de la alfa tubulina en neuronas

Erick Contreras-Vallejos¹, Sebastián Rojas¹, Elías Utreras¹, Eva-María Jiménez-Mateos², Ricardo B-Maccioni³, Didier Job⁴, Jesús Avila² y Christian Gonzalez-Billault¹.

(1) Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (2) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, España (3) Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (4) CEA-INSERM, Grenoble, Francia.

The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting.

2007, Washington DC, Estados Unidos

Poster MAP1B Interaction with TTL Modulates Microtubule Tyrosination.

E. Contreras-Vallejos, E. Utreras, E. Jimenez-Mateos, S. Rojas, E. Tortosa, R. B. Maccioni, J. Avila, C. Gonzalez-Billault

C. Gonzalez-Billault¹

(1) Biology, Faculty of Sciences, Institute for Cell Dynamics and Biotechnology, Universidad de Chile, Chile, (2) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain, (3) Faculty of Sciences Universidad de Chile.

Microtubule-Associated Protein 1B Interaction with Tubulin Tyrosine Ligase Contributes to the Control of Microtubule Tyrosination

Elías Utreras, Eva Maria Jiménez-Mateos, **Erick Contreras-Vallejos**, Elena Tortosa, Mar Pérez, Sebastián Rojas, Lorena Saragoni, Ricardo B. Maccioni, Jesús Avila, Christian González-Billault. Dev Neurosci 2008;30:200-210

Índice General

| | |
|--|-------------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| FINANCIAMIENTO..... | iv |
| CONGRESOS Y PUBLICACIONES..... | v |
| ÍNDICE GENERAL..... | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | ix |
| ABREVIATURAS | xi |
| RESUMEN..... | xii |
| SUMMARY..... | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Reseña general..... | 1 |
| 1.2 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)..... | 3 |
| 1.3 Tubulina y modificaciones post-traduccionales..... | 7 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 10 |
| 3. OBJETIVOS | 11 |
| 3.1 Objetivo general..... | 11 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 11 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| 4.1 Materiales..... | 12 |
| 4.1.1 Líneas celulares..... | 12 |
| 4.1.2 Cultivo celular..... | 12 |
| 4.1.3 Anticuerpos..... | 13 |
| 4.1.4 Inmunodetección, inmunoprecipitación y <i>pull-down</i> | 14 |
| 4.1.5 Inmunocitoquímica..... | 14 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.1.6 | Animales..... | 14 |
| 4.1.7 | Bacterias..... | 15 |
| 4.1.8 | Plasmidios..... | 15 |
| | | |
| 4.2 | Métodos..... | 16 |
| 4.2.1 | Cultivo celular..... | 16 |
| 4.2.2 | Cultivo primario de neuronas..... | 16 |
| 4.2.3 | Extracción de proteínas a partir de líneas celulares y cultivos primarios..... | 17 |
| 4.2.4 | Inmunodetección..... | 17 |
| 4.2.5 | Inmunohistoquímica..... | 18 |
| 4.2.6 | Coinmunoprecipitación..... | 18 |
| 4.2.7 | <i>Pull-down</i> | 19 |
| 4.2.8 | Tratamiento con nocodazol..... | 19 |
| 4.2.9 | Producción y recolección de reelina recombinante..... | 20 |
| 4.2.10 | Estimulación de cultivos primarios con reelina recombinante..... | 21 |
| 4.2.11 | Análisis estadístico..... | 21 |
| | | |
| 5. | RESULTADOS..... | 22 |
| 5.1 | La sobreexpresión de la enzima TTL induce un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados..... | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 MAP1B participa en el control de la tirosinación de los microtúbulos..... | 23 |
| 5.3 Interacción de MAP1B y la enzima TTL..... | 25 |
| 5.4 La Enzima TTL interactúa con la cadena pesada (HC) de la proteína MAP1B | 29 |
| 5.5 La interacción entre MAP1B y TTL no se debe a un efecto entrecruzador de los microtúbulos..... | 30 |
| 5.6 La sobreexpresión condicional de Gsk3 β en células N2a es regulada por tetraciclina..... | 32 |
| 5.7 Gsk3 β sobreexpresada por el sistema de expresión Condiciona en células N2a es capaz de fosforilar a MAP1B en modo I..... | 35 |
| 5.8 La interacción entre MAP1B y TTL no es regulada por la fosforilación de MAP1B en modo I..... | 37 |
| 5.9 Reelina, una proteína de matriz extracelular es capaz de inducir un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados en neuronas..... | 38 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 42 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 46 |
| 8. PROYECCIONES..... | 47 |
| 9. REFERENCIAS..... | 48 |

Índice de Figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Diagrama del procesamiento proteolítico de MAP1B..... | 4 |
| Figura 2. | Distribución de la fosforilación de MAP1B en neuronas piramidales de hipocampo..... | 5 |
| Figura 3. | La ausencia de MAP1B genera deficiencias en el desarrollo normal de los axones..... | 6 |
| Figura 4. | Ciclo de tirosinación / destirosinación de microtúbulos..... | 8 |
| Figura 5. | Sobreexpresión de la enzima TTL en células N2a..... | 23 |
| Figura 6. | Tratamiento con nocodazol de neuronas de ratones de estirpe silvestre y ratones hipomorfos para MAP1B..... | 24 |
| Figura 7. | Interacción entre la proteína MAP1B y la enzima TTL..... | 26 |
| Figura 8. | En células N2a que sobreexpresan TTL aumenta la interacción con MAP1B..... | 27 |
| Figura 9. | Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MAP1B y MAP1A..... | 28 |
| Figura 10. | Esquema representativo del sistema de expresión condicionada..... | 29 |
| Figura 11. | La interacción de la cadena pesada de MAP1B con TTL induce un aumento de microtúbulos tirosinados en células Cos7..... | 30 |
| Figura 12. | Tratamiento con nocodazol de células N2a transfectadas con TTL..... | 31 |
| Figura 13. | Evidencia bioquímica de la sobreexpresión de Gsk3 β en células N2a..... | 33 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 14. | Inmunocitoquímica de expresión del sistema condicional de sobreexpresión de Gsk3 β | 34 |
| Figura 15. | La sobreexpresión de Gsk3 β induce la fosforilación de MAP1B en modo I..... | 36 |
| Figura 16. | La interacción entre MAP1B y TTL no es regulada por la fosforilación en modo I de MAP1B..... | 37 |
| Figura 17. | Reelina induce un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados en neuronas..... | 39 |
| Figura 18. | Neuronas tratadas con Reelina poseen microtúbulos tirosinados más dinámicos..... | 40 |

Abreviaturas

| | |
|-------|--|
| ADNc | ADN complementario |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| Cdk5 | Quinasa dependiente de ciclina 5 |
| DMEM | Medio Eagle de Dulbecco modificado |
| DTT | Ditiotreitol |
| ECL | Reactivo de quimioluminiscencia aumentada |
| EDTA | Ácido etilendiaminoacético |
| FITC | Fluoresceína Isotiocianato |
| Gsk3b | Glicógeno sintasa Quinasa 3 beta |
| GST | Glutación-S-transferasa |
| HBSS | Solución salina balanceada de Hanks |
| HC | Cadena pesada de la MAP1B |
| IPTG | Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido |
| kDa | Kilodalton |
| KO | <i>Knock out</i> |
| LC | Cadena liviana de la MAP1B |
| MAP1A | Proteína asociada a microtúbulos 1A |
| MAP1B | Proteína asociada a microtúbulos 1B |
| PBS-T | Solución tampón de fosfato-tween 20 |
| PMSF | Floruro de fenilmetanosulfonil |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SOB | Medio de crecimiento para bacterias sin glucosa |
| SOC | Medio de crecimiento para bacterias (Caldo Súper Óptimo) |
| TBS-T | Solución tampón de Tris-tween 20 |
| TRITC | Tetrametil rodamina isotiocianato |
| TTL | Tubulina Tirosina Ligasa |

Estudio de la interacción entre MAP1B y la enzima TTL en cerebro

Las modificaciones post-traduccionales de la α -tubulina contribuyen a determinar las propiedades dinámicas de ciertas poblaciones de microtúbulos. Esto es particularmente importante para procesos que requieren cambios rápidos en la estabilidad del citoesqueleto que permitan la modificación de las propiedades morfológicas o motiles de las neuronas. Estas modificaciones deberían regularse localmente durante los procesos de elongación axonal, migración neuronal y guía axonal. La proteína asociada a microtúbulos 1 B (MAP1B) es una proteína que participa y regula los tres procesos antes mencionados. Se ha descrito que la presencia de una variante fosforilada de MAP1B está enriquecida en el extremo distal de axones, esencialmente la zona más dinámica del axón. Se ha descrito que conjuntamente con el gradiente de MAP1B fosforilada, se produce un gradiente de microtúbulos alfa-tirosinados. Esta modificación post-traducciona es efectuada por acción de la enzima tubulina tirosina ligasa (TTL) .

La hipótesis planteada en nuestro trabajo es: “hipótesis:“La proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) interactúa con la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) aumentando de esta forma la tirosinación de los microtúbulos neuronales ”.

Nuestros resultados indican que MAP1B y TTL interaccionan, evidenciado mediante ensayos de inmunoprecipitación y pull-down. Adicionalmente se muestra que la sobre-expresión regulada de la enzima glicógeno sintasa quinasa 3 beta ($Gsk3\beta$) en neuroblastomas murinos (N2a), induce cambios en el patrón de fosforilación de MAP1B y que esta modificación no produce cambios en la interacción entre ambas proteínas. La interacción de ambas proteínas es independiente de un entrecruzamiento originado por los microtúbulos y se produce con la cadena pesada de la MAP1B.

En base a estos resultados se espera comprender de mejor forma como la modificación post-traducciona de los microtúbulos, particularmente la adición de un residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal de la α -tubulina, juega un papel importante en procesos como migración, guía y/o elongación axonal de las neuronas.

SUMMARY

Studies on the interaction between MAP1B and TTL in brain

Post-translational modifications of α -tubulin contribute to determine the dynamic properties of certain microtubule populations. This is particularly important in processes that require fast changes in the cytoskeleton stability to allow the modifications of the motility and morphologic properties of neurons. These modifications must be regulated locally during axonal elongation, neuronal migration and axonal guidance process. The Microtubule Associated Protein 1B (MAP1B) participates and regulates the three processes mentioned above. It has been described that the presence of a variant phosphorylated form of MAP1B is enriched in the distal end of axons, essentially in the most dynamic regions of the axon. Interestingly, it has been described that together with the gradient of phosphorylated MAP1B, a gradient of tyrosinated microtubules takes place. This post-translational modification is carried out by the action of the tubulin tyrosin ligase (TTL) enzyme.

The hypothesis proposed in our work is: “The Microtubule Associated Protein 1B (MAP1B) interact with the tubulin tyrosin ligase (TTL) enzyme regulating the tyrosination of neural microtubules”.

Our results indicate that MAP1B and TTL interact; this was studied by immunoprecipitation and pull-down experiments. Additionally we showed that the regulated over expression of the glycogen synthase kinase 3 beta (Gsk3 β) enzyme in murine neuroblastoma (N2a), induces changes in the phosphorylation patterns of MAP1B and that this modification do not produces changes in the interaction between these proteins. The interaction of both proteins is independent of a crosslinking originated by the microtubules and it occurs with the heavy chain of MP1B.

Based on these results we expect to understand better how the post-translational modifications of microtubules, particularly the addition of a tyrosine residue in the C-terminal domain of the α -tubulin, play a important role in processes like neuronal migration, axonal elongation and axonal guidance.

1. RESULTADOS

1.1 Reseña General

El desarrollo del cerebro es un proceso complejo que requiere la presencia de células con una morfología y funcionamiento altamente especializados. Estas células denominadas neuronas se caracterizan por poseer ramificaciones citoplasmáticas que emergen desde el cuerpo celular denominadas axón y dendritas, las cuales son capaces de formar contactos sinápticos (Dotti *et al.*, 1988). Las dendritas y el axón son compartimentos que forman parte de una misma célula, pero que sin embargo poseen características morfológicas, bioquímicas, estructurales y funcionales muy distintas (Arimura y Kaibuchi, 2007). El citoesqueleto en la neurona juega un rol fundamental en la especificación de estos compartimentos y su correcto funcionamiento; por ello el estudio de los componentes del citoesqueleto nos entrega información importante para comprender como funciona una neurona.

Los microtúbulos son el componente principal del citoesqueleto y juegan un rol importante en muchos procesos vitales para las células como la división celular, el transporte de organelos y la determinación de la forma celular. Están compuestos por heterodímeros de alfa y beta tubulina, los que alternados a su vez forman un protofilamento. Trece protofilamentos ordenados en forma paralela conforman finalmente el microtúbulo que posee una estructura tubular hueca. Esta estructura de los microtúbulos le confiere la capacidad de polimerizar y despolimerizar, y en este hecho en particular radica la capacidad de regular los procesos anteriormente mencionados (Ávila, 1990).

Los microtúbulos están presentes en todos los tipos celulares eucarióticos, sin embargo, se encuentran mayor cantidad en neuronas, donde promueven el crecimiento polarizado de las dendritas y el axón (Ávila, 1990; Mitchison y Kirschner, 1988; Ávila *et al.*, 1994). Esto indica que los microtúbulos son esenciales en el funcionamiento normal de las neuronas, lo que queda claramente evidenciado por el hecho de que en algunas enfermedades neurodegenerativas se produce una disfunción severa de los microtúbulos (Ávila *et al.*, 1994).

Se ha propuesto que el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos son procesos importantes para el desarrollo del axón o axonogénesis (Mitchison y Kirschner, 1988). Los microtúbulos están elongándose y acortándose constantemente, fenómeno que se denomina inestabilidad dinámica. Gracias a este proceso las neuronas pueden sufrir cambios rápidos en la estabilidad del citoesqueleto que le permitan la modificación de las propiedades morfológicas o mótilas de las células durante los procesos de elongación axonal, migración neuronal y guía axonal (Morrison, 2007), proceso mediante el cual el axón es atraído o repelido hacia alguna zona en particular para formar contactos sinápticos. Un ejemplo de esto es la migración neuronal que ocurre luego de la modificación de la forma celular, donde se ha observado que existe un cambio en la dinámica de ambos componentes del citoesqueleto, actina y microtúbulos, que es esencial para el movimiento neuronal (Edmondson y Hatten, 1987; Gasser y Hatten, 1990; Rivas y Hatten, 1995)

Tanto en las dendritas como en el axón, los microtúbulos se organizan en largos manojos de forma tubular, organización que favorece su estabilización (Lee y Brandt, 1992; Ávila *et al.*, 1994). Cuando los cultivos de neuronas se tratan con drogas despolimerizantes de microtúbulos se observa que tanto el axón como las dendritas se retraen debido a la pérdida de la organización del citoesqueleto de tubulina (Matus, 1988), sin embargo al retirar las drogas los microtúbulos vuelven a polimerizarse y las neuronas recuperan su morfología. Las MAPs, proteínas asociadas a microtúbulos, son capaces de estabilizar a los microtúbulos permitiendo que estos puedan elongar y formar manojos que permiten mantener o modificar la morfología de la neurona. Por otra parte, otras MAPs son capaces de producir un entrecruzamiento entre microtúbulos o bien con otros componentes del citoesqueleto como microfilamentos o filamentos intermedios.

1.2 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)

El crecimiento y estabilización del axón durante el desarrollo del sistema nervioso y la reorganización de las conexiones axonales en el cerebro adulto dependen de la dinámica del citoesqueleto. La organización de los microtúbulos en las neuronas depende de gran manera del ensamblaje y estabilización de estos (Mitchison y Kirschner, 1988) dado por el balance entre proteínas que favorecen o inhiben la estabilidad de los microtúbulos (Andersen, 2000). Los principales factores estabilizadores de éstos son las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), de las cuales existen cuatro familias principales: proteínas MAP1 (Vallee, 1990), proteínas MAP2 (Murphy *et al.*, 1977), proteínas MAP3/MAP4 (Olmsted, 1991), y proteína tau (Cleveland *et al.*, 1977). La mayoría de estas, a excepción de MAP3/MAP4, se encuentran en el cerebro y son capaces de estabilizar a los microtúbulos *in vivo* (Ávila *et al.*, 1994).

La proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) es la primera de las MAPs en expresarse durante desarrollo del cerebro (Bloom *et al.*, 1985). MAP1B es una proteína de 332 kDa con forma de barril aplanado, con un dominio terminal globular (Sato-Yoshitake *et al.*, 1989) que posee dos cadenas: una cadena pesada (HC, del inglés *Heavy Chain*) de 300 kDa y una liviana (LC, del inglés *Light Chain*) de 32 kDa (Hammarback *et al.*, 1991), las que se encuentran codificadas en un solo gen y que luego de ser expresadas son procesadas mediante proteólisis dando origen a ambas cadenas (Halpain y Dehmelt, 2006) (Figura 1). Existe además una tercera cadena accesoria que se denomina LC3, la cual puede ser encontrada en el complejo HC-LC en proporciones muy bajas, sin embargo usualmente no se considera como parte de la familia de proteínas MAP1 (Halpain y Dehmelt, 2006). Ambas cadenas poseen secuencias de unión a microtúbulos (Zauner *et al.*, 1992; Togel *et al.*, 1998), no obstante se ha propuesto que la cadena pesada de MAP1B es capaz de suprimir la capacidad de la cadena liviana de unirse a microtúbulos. Por otra parte LC posee secuencias de unión a filamentos de actina (Togel *et al.*, 1998). Sin embargo aún no se sabe si MAP1B es capaz de unir actina y tubulina al mismo tiempo y de esta forma producir un entrecruzamiento entre ellos.

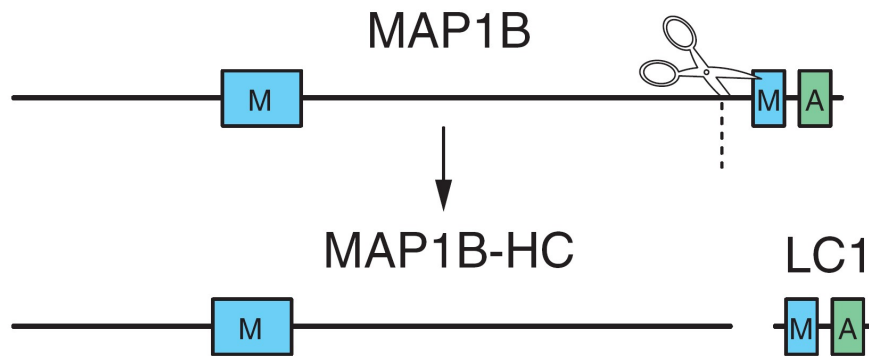


Figura 1. Diagrama del procesamiento proteolítico de MAP1B .

MAP1B se encuentra codificada en un solo gen, cuyo producto es procesado proteolíticamente (ejemplificado por las tijeras en el diagrama) generando dos fragmentos proteolíticos: una cadena pesada HC correspondiente al fragmento aminoterminal y una cadena liviana LC1 correspondiente al fragmento carboxilo terminal del producto sin procesar. Los cuadros de color celeste con la letra M representan sitios de unión a microtúbulos, mientras que los de color verde con la letra A, sitios de unión a actina. (Adaptado de Halpain y Dehmelt, 2006).

MAP1B presenta patrones de expresión distintos a las otras MAPs que se expresan en cerebro, pues es la primera de las MAPs en expresarse y disminuye gradualmente durante el desarrollo del cerebro, lo cual se ha visto en la raíz del ganglio dorsal en pollos (Riederer and Barakat-Walter, 1992).

Las MAPs fueron descubiertas y caracterizadas debido a su habilidad de unirse a los microtúbulos (Sato-Yoshitake *et al.*, 1989). Estudios realizados *in vitro* han mostrado que la capacidad estabilizadora de microtúbulos de MAP1B es menor que las de otras MAPs encontradas en cerebro (Vandecandelaere *et al.*, 1996). En parte esto podría deberse al hecho de que MAP1B puede ser fosforilada en forma diferencial en dos modos distintos (Ulloa *et al.*, 1993a; Ulloa *et al.*, 1993b). La fosforilación en modo I es catalizada por proteínas quinasas dirigidas por prolina (PDPK) como Cdk5 y GSK3 β (Pigino *et al.* 1997; Goold *et al.* 1999), las que son capaces de fosforilar residuos de serina o treonina que se encuentran inmediatamente contiguos a una prolina. La fosforilación por Gsk3 β ha sido

muy bien estudiada, encontrándose que MAP1B fosforilada en modo I se encuentra específicamente en los axones en crecimiento (Trivedi *et al.*, 2005). Adicionalmente se ha observado que la fosforilación en modo I de MAP1B hace más vulnerables a los microtúbulos frente a drogas despolimerizantes (Goold *et al.*, 1999), lo que indica que esta modificación podría regular la dinámica de los microtúbulos en el axón en crecimiento.

La fosforilación en modo II es catalizada por proteínas quinasas no dirigidas por prolina (NPDPK) como CKII la cuales no dependen de la presencia de una prolina inmediatamente contigua al residuo de serina o de treonina que será fosforilado. La MAP1B fosforilada en modo II se encuentra presente tanto en axón como en los compartimentos somatodendríticos (Ulloa *et al.*, 1993b) (Figura 2).

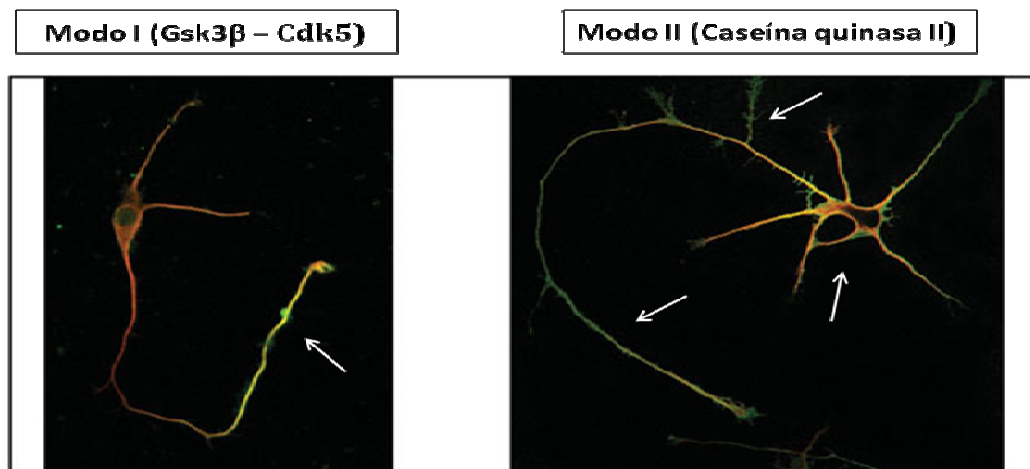


Figura 2. Distribución de la fosforilación de MAP1B en neuronas piramidales de hipocampo.

Inmunofluorescencias de neuronas piramidales de hipocampo de ratón de 18 días de estadio embrionario y 2 días *in-vitro*, tratadas con anticuerpos contra MAP1B fosforilada (verde) y contra α -tubulina (rojo). Gsk3 β y Cdk5 son capaces de fosforilar a MAP1B en modo I, mientras que la caseína quinasa puede hacerlo en modo II. Ambas fosforilaciones presentan distintos patrones de distribución: se observa que el modo I se encuentra principalmente hacia el extremos distal del axón, mientras que el modo II en los compartimentos somatodendríticos. Las flechas blancas muestran las zonas de distribución. Aumento 40x (modificada de González-Billault *et al.*, 2004).

Por otro lado, la inhibición de la actividad estabilizadora de microtúbulos de la cadena liviana por la cadena pesada (Togel *et al.*, 1998) puede ser causal de la menor capacidad estabilizadora de microtúbulos de MAP1B. Sin embargo, se ha visto que la ausencia de MAP1B genera deficiencias en el desarrollo normal de axones (Figura 3) (Meixner *et al.*, 2000; González-Billault *et al.* 2001; González-Billault *et al.* 2002) lo que sugiere que MAP1B podría tener además una actividad como proteína adaptadora, ya que se ha visto que es capaz de interactuar con otras proteínas (Allen *et al.*, 2005; Jimenez-Mateos *et al.*, 2005a).

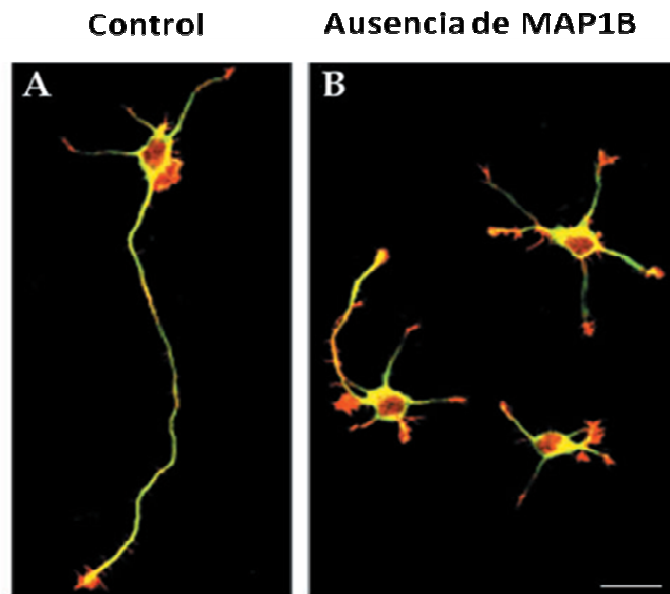


Figura 3. La ausencia de MAP1B genera deficiencias en el desarrollo normal de los axones.

Inmunofluorescencias de neuronas provenientes de: **A)** ratones de estirpe silvestre para MAP1B de 18 días de estadio embrionario y 2 días de cultivo *in-vitro* **B)** ratones hipomorfos para MAP1B de 2 días de cultivo *in-vitro*. Se utilizaron anticuerpos contra α -tubulina (verde) y faloidina-rodamina para actina (rojo). Se observa que existen deficiencias en la formación del axón en neuronas hipomorfas para MAP1B. Aumento 40x, barra 20 μ m. (González-Billault *et al.* 2001)

1.3 Tubulina y modificaciones post traduccionales

Las modificaciones del citoesqueleto de la neurona son requeridas para llevar a cabo cambios morfológicos que permitan a la neurona llevar a cabo funciones propias de este tipo celular. Un ejemplo claro de esto es la migración neuronal, donde modificaciones del citoesqueleto son fundamentales para que ocurra este proceso (Edmondson y Hatten 1987; Gasser y Hatten 1990; Rivas y Hatten 1995). Las modificaciones post-traduccionales de la α -tubulina contribuyen a determinar las propiedades dinámicas de ciertas subpoblaciones de microtúbulos, entre las cuales se encuentra la tirosinación/destirosinación de la α -tubulina. Durante la axonogénesis se produce la polimerización de nuevos microtúbulos, los cuales se caracterizan por poseer un residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal de la α -tubulina (Tanaka *et al.*, 1995), el cual se encuentra codificado en el ARNm de la α -tubulina (Villasante *et al.*, 1986). Sin embargo, esta tirosina puede ser removida por una actividad enzimática carboxipeptidasa, que aún no ha sido adjudicada a ninguna enzima, una vez que el heterodímero se incorpora a los microtúbulos (Argarana *et al.*, 1980). Cuando estos microtúbulos son despolimerizados, la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) vuelve a adicionar el residuo de tirosina a la subunidad α -tubulina del heterodímero (Beltramo *et al.*, 1987), con lo cual cuando esta subunidad es nuevamente reensamblada, formando microtúbulos que están enriquecidos en α -tubulina tirosinada. De este modo se establece un ciclo de tirosinación-destirosinación. (Figura 4).

Estudios *in vitro* de migración neuronal han mostrado que tanto el citoesqueleto de actina, como el citoesqueleto de tubulina son modificados para que la neurona pueda moverse (Rivas y Hatten, 1995). En este mismo contexto en nuestro laboratorio se demostró que ratones mutantes para MAP1B muestran graves defectos en la estructura de su cerebro (González-Billault *et al.*, 2000; González-Billault *et al.*, 2005) y que estos problemas se deben a defectos en la migración neuronal, particularmente en la migración comandada por Reelina, (González-Billault *et al.*, 2005). La Reelina es una glicoproteína de matriz extracelular de 380 kiloDalton que ha sido postulada como una señal que les indica a las neuronas cuándo dejar de migrar durante su posicionamiento, de esta forma dirige la

migración de las neuronas en una de las estructuras laminadas del cerebro, que corresponde a la corteza cerebral (Ogawa *et al.*, 1995). En esta región del cerebro, la Reelina es secretada por las células de Cajal-Retzius en la zona marginal o más externa (Howell *et al.*, 1999).

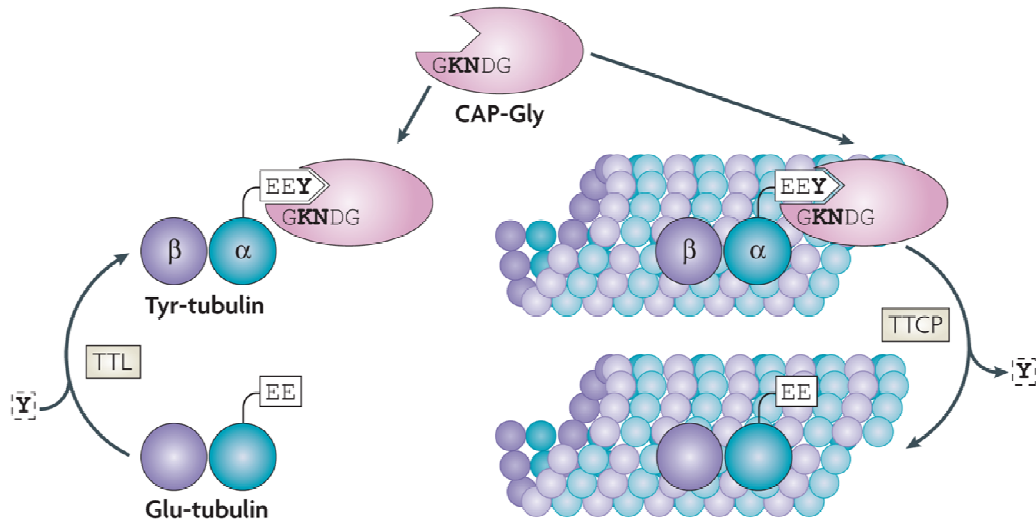


Figura 4. Ciclo de tiosinación / destiosinación de microtúbulos. Una enzima con actividad Tubulina Carboxipeptidasa (TTCP) es capaz de remover el residuo de tiosina desde el extremo carboxilo terminal de la α -tubulina generando microtúbulos más estables. Este residuo de tiosina puede ser nuevamente incorporado a los microtúbulos mediante la acción de la enzima Tubulina Tiosina Ligasa (TTL) permitiendo que el dímero sea integrado al microtúbulo generando microtúbulos más dinámicos. (modificado de Akhmanova y Steinmetz, 2008).

Aún más, las neuronas deficientes de MAP1B presentan un desbalance en el contenido de microtúbulos tiosinados y destiosinados en cultivos neuronales, tanto de sistema nervioso periférico como central (González-Billault *et al.*, 2001; González-Billault *et al.*, 2002). La tiosinación de la subunidad alfa de la tubulina ha sido asociada con la capacidad de los microtúbulos de ser más dinámicos. De esta misma forma aquellos microtúbulos que poseen un mayor contenido de tubulina destiosinada, se consideran menos dinámicos (Kreis, 1987), lo que sugiere que el correcto posicionamiento de las neuronas depende de las propiedades dinámicas de sus microtúbulos.

En ratones que carecen de la enzima TTL se ha observado que poseen una desorganización en las redes neuronales en el cerebro, lo que culmina con la muerte de los ratones durante el periodo perinatal (Erck *et al.*, 2005). Lo anterior indica que esta modificación post-traducciona l de la tubulina es necesaria para procesos que requieren un cambio rápido en la dinámica del citoesqueleto neuronal, los antecedentes presentados sugieren que la tirosinación de la α -tubulina facilita la modificación de las propiedades mótil es y/o morfológicas de las neuronas durante eventos fundamentales como migración neuronal, elongación y guía axonal.

2. HIPOTESIS

De acuerdo a los antecedentes presentados anteriormente, podemos plantear la siguiente hipótesis:

“La interacción de la Proteína Asociada a Microtúbulos 1B (MAP1B) y enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) aumenta la tirosinación de la α -tubulina en microtúbulos neuronales”.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer si existe interacción la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) y la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) tanto en cerebro como en líneas celulares provenientes de neuronas murinas.

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Analizar si la enzima tubulina tirosina ligasa (TTL) interactúa con la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B)
- 2.- Montar un sistema de fosforilación de MAP1B regulable basado en la expresión condicionada de la proteína quinasa GSK3 β , mediante el sistema del transactivador de tetraciclina (Tet off) .
- 3.- Evaluar si la fosforilación en modo I de MAP1B altera la interacción entre MAP1B y TTL.
- 4.- Estudiar si la interacción entre MAP1B y TTL se produce en los microtúbulos polimerizados o despolimerizados.
- 5.- Analizar los dominios de interacción de MAP1B con TTL.
- 6.- Evaluar si el tratamiento con Reelina induce una variación en el contenido de microtúbulos tirosinados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Neuroblastoma murino N2a (ATCC CCL 131, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EEUU).
- Fibroblasto de riñón de mono verde africano COS-7 (ATCC CRL 1651, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EEUU).
- Células epiteliales de riñón humano HEK 293T (ATCC CRL-11268, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EEUU).

4.1.2 Cultivo celular

Para el cultivo de líneas celulares se utilizó Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO), suplementado con suero fetal bovino (HyClone), penicilina, estreptomycin y fungizona (GIBCO), adicionalmente OptiMEM (GIBCO). Para el cultivo primario de neuronas se utilizó medio Neurobasal suplementado con B27 (GIBCO), solución salina balanceada Hank (HBSS) (GIBCO), suero de Caballo (HyClone), tripsina/EDTA 10X (GIBCO), Poli-D-lisina (Sigma Chemicals, St Lois, Missouri, EEUU).

4.1.3 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- N19, contra MAP1B (SC-8970, Santa Cruz Biotechnology, California, EEUU)
- SMI31, contra MAP1B fosforilada en modo I (SMI-31R, Sternberger Monoclonals, Maryland, EEUU).
- Anti alfa-tubulina clon DM1A contra alfa tubulina total (T9026, Sigma Chemical, St Louis, Missouri, EEUU).
- Tub- 1A2, contra alfa-tubulina tirosinada (T9028, Sigma Chemical, St Louis, Missouri, EEUU)
- Glu, contra alfa-tubulina destirosinada (donado gentilmente por el Dr. H Barra, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).
- Anti β -tubulina (SC-9104, Santa Cruz Biotechnology, California EEUU).
- ID3, anti TTL (Donado gentilmente por el Dr. D. Job, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Francia).
- 9E10, contra epítipo c-myc (SC-40, Santa Cruz Biotechnology, California EEUU).
- A14, contra epítipo c-myc (SC-789, Santa Cruz Biotechnology, California EEUU).
- Anti beta-galactosidasa (Z3781, Promega, Missouri, EEUU).
- Anti Reelina (MAB5364, Chemicon international, California, EEUU.).
- Anti GSK3 β (G4414, Sigma Chemical, Missouri, EEUU).
- Anti MAP1A (SC-8969, Santa Cruz Biotechnology, California EEUU).
- DCX, anti doblecortina (donado por la Dra. Susan McConnell, Stanford University).
- Anti-IgG de conejo y ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (711-035-152, 715-035-150 Jackson ImmunoResearch Labs, Pensilvania, EEUU).
- Anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (SC-2020, Santa Cruz Biotechnology, California EEUU).
- Anti-IgG de conejo y ratón acoplado a Alexa Fluor 546 y 488 (Molecular Probes, California, EEUU).

4.1.4 Inmunodetección, inmunoprecipitación y pull-down

Se utilizaron los siguientes reactivos: Acrilamida/Bis-acrilamida (Sigma Chemicals Co), N,N,N,N -Tetrametil-Etilenediamina (TEMED) (Sigma Chemicals Co), persulfato de amonio (APS) (Merck, Darmstadt, Alemania), reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California), Ditiotreitól (DTT) (Sigma Chemicals Co, St Louis, Missouri, EEUU), marcador de peso molecular de proteínas preteñido de amplio rango 25-250 kDa, membrana de nitrocelulosa (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts), reactivo de quimioluminiscencia ECL (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts), líquido revelador y líquido fijador (Fotokina, Santiago, Chile), metanol técnico (TCL, Santiago, Chile), placas fotográficas HR-U30 (Fujifilm), proteína G recombinante acoplada a sefarosa, proteína A recombinante acoplada a sefarosa (Sigma Chemicals Co), glutatión Sefarosa 4B (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire), tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

4.1.5 Inmunocitoquímica

Se utilizó los siguientes reactivos: paraformaldehído (PFA) (Sigma Chemicals Co), albúmina de suero bovino (BSA) (Calbiochem), triton-X 100 (Sigma Chemicals Co), faloidina-TRIC (Molecular Probes), ToPro3 (T3605, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) y FluorSave (Calbiochem).

4.1.6 Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) la cepa de NMRI Donados por el Dr. Jesús Ávila, Universidad Autónoma de Madrid, España. Los animales fueron tratados según el protocolo de manipulación de animales, diseñado por la Comisión de Ética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

4.1.7 Bacterias

- Se utilizó la cepa BL21 de *Escherichia coli*.

4.1.8 Plasmidios

Los siguientes plasmidios fueron utilizados:

- pSV SPORT derivado del laboratorio de Peter Brophy (Centre for Neuroscience Research, Edinburgh University)
- pBI-G (631004, Clontech, Mountain View, California, EEUU)
- pcDNA 3.1 (V790-20, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU)

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo celular

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 mg/mL de fungizona, en placas de 100 mm a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ y humedad controlada al 95%.

4.2.2 Cultivo primario de neuronas

Los cultivos primarios de neuronas se realizaron a partir de cortezas de embriones de ratones de 15 días post-fecundación (E15) y de neuronas hipocampales de 18 días post-fecundación (E18). Para obtener las cortezas y los hipocampos, las ratonas preñadas fueron sacrificadas utilizando un exceso de anestesia (éter) y se procedió a obtener los embriones. Los embriones fueron depositados en Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) y se les extrajo la corteza y el hipocampo, los cuales fueron depositados por separado en HBSS – EDTA tripsina 1X durante 10 minutos a 37°C. Luego, se realizaron 3 lavados con HBSS y el tejido fue disgregado suavemente con una pipeta Pasteur, se centrifugó a 500xg durante 20 segundos en una centrífuga clínica. Se rescató el sobrenadante el cual fue mantenido en hielo para realizar un recuento de células utilizando un hemocitómetro. Posteriormente las neuronas fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en una razón de 12.500 neuronas por centímetro cuadrado sobre un cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro o en placas de 100 mm en una razón de 170.000 células por centímetro cuadrado recubiertos del sustrato adhesivo poli-D-lisina en medio neurobasal-10% suero de caballo (HS) suplementado con glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, durante 3 horas. Luego de este intervalo de tiempo, el medio fue reemplazado por medio neurobasal suplementado con B27, glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, 100 µg/mL de

penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Posteriormente las placas se mantuvieron en incubador a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

4.2.3 Extracción de proteína a partir de líneas celulares y cultivos primarios

Las células fueron lisadas utilizando una solución tampón para la extracción de proteínas (Tris 20 mM pH 7,4 / NaCl 100 mM/EDTA 1 mM/Tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas PMSF 0,2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM y Pepstatina 0,2 mM) y/o en solución tampón de inmunoprecipitación (Tris 10 mM pH 7,4 / NaCl 150 mM / EDTA 1 mM / EGTA 1 mM / Tritón X-100 1% / ortovanadato de sodio 0,2 mM / ácido okadaico 1µMNP-40 0,5% / DTT 1 mM e inhibidores de proteasas PMSF 0,2 mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM y Pepstatina 0,2 mM). Posteriormente el extracto fue centrifugado a 20.000xg por 15 minutos, obteniendo el sobrenadante el cual fue considerado como el extracto total de proteínas citoplásmáticas. Se cuantificó el lisado total de proteínas mediante el protocolo descrito por Bradford (Bradford, 1976).

4.2.4 Inmunodetección

Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 6% ó 12% dependiendo del peso molecular de las proteínas a caracterizar. Una vez separadas las proteínas por electroforesis, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 µm, y posteriormente bloqueadas con PBST o TBST saturado con leche al 5% e incubadas con los anticuerpos primarios en PBST o TBST- leche 1% a diluciones particulares, dependiendo de cada anticuerpo y según lo que recomendado por cada proveedor. Posteriormente las membranas fueron lavadas 6 veces con PBST o TBST durante 5 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados, también preparados en PBST ó TBST- leche 1%. A continuación, las membranas fueron nuevamente lavadas nuevamente 6 veces con PBST ó TBST durante 5 minutos. Finalmente, las membranas fueron incubadas con ECL y se revelaron las películas autoradiográficas. Para los análisis densitométricos se normalizaron las señales obtenidas

contra una proteína constitutiva como α -tubulina o β -tubulina como controles de carga. Se utilizó TBST para la inmunodetección de proteínas fosforiladas.

4.2.5 Inmunocitoquímica

Los ensayos de inmunocitoquímica fueron realizados según protocolos descritos por González-Billault *et al*, 2001. Para esto, las neuronas cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas con una solución de sacarosa 4% / paraformaldehído 4%, luego permeabilizadas con PBS 1X / Tritón X-100 0,2% durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron con PBS-BSA 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a esto, se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios en solución PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de lavar 3 veces con PBS, los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos secundarios en solución PBS-BSA 1% conjugados a FITC y TRITC. Inmediatamente después de la incubación con los anticuerpos secundarios se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo FluorSave. Adicionalmente, el citoesqueleto de actina fue detectado utilizando Faloidina-TRIC y el núcleo con ToPro. Finalmente, las células fueron visualizadas en un microscopio confocal invertido LSM 510 (Zeiss).

4.2.6 Coinmunoprecipitación

Las células fueron lisadas de acuerdo a lo descrito anteriormente, y los extractos cuantificados por el método de Bradford (Bradford, 1976), obteniéndose de esta forma la concentración total de proteínas citoplasmáticas. Se incubaron 500 μ g de esta preparación con 1-5 μ g de anticuerpos específicos en un volumen final de 1 mL de solución tampón de inmunoprecipitación (Tris 10 mM / NaCl 150 mM / EDTA 1 mM / EGTA 1 mM / Tritón X-100 1% / ortovanadato de sodio 0,2 mM / NP-40 0,5% pH 7,4 / DTT 1 mM). Esta mezcla se dejó interactuar durante 1 hora a 4°C. Luego, se agregaron 20 μ L de una solución Proteína A-agarosa o G-agarosa al 50% en PBS dependiendo si el anticuerpo primarios era policlonal o monoclonal, se mezcló y se dejó agitando durante 60 minutos a 4°C. Después

de centrifugar la mezcla durante 15 minutos a 1.000xg a 4 °C. Se recuperó el sedimento y se lavó tres veces con solución tampón de inmunoprecipitación y se resuspendió en la cantidad necesaria de solución tampón de carga 4X (Tris HCl 20 mM pH 6,8 , SDS 8 %, Azul Bromofenol 0,4 %, Glicerol 40 % y β -mercaptoetanol 400 mM). Las proteínas finalmente se separaron por electroforesis en condiciones desnaturantes y caracterizadas mediante inmunodetección.

4.2.7 Pull-down

Las proteínas recombinantes GST (glutación S-transferasa) y GST-TTL fueron clonadas en el plasmidio de expresión pGEX-4T (Amersham Biosciences) y expresadas en *Escherichia coli* BL21. Las bacterias transformadas fueron cultivadas en medio SOC (Tryptona 20 g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y luego cultivadas en medio SOB (SOC sin glucosa). La inducción de la expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo por la adición de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida) 1 mM durante 2 horas a 37°C. Las células fueron lisadas y centrifugadas a 20.000 g durante 15 minutos, se incubaron 500 μ g de proteínas del sobrenadante con 50 μ l de esferas de glutación-sefarosa durante 2 horas. Esta mezcla luego fue incubada con 500 μ g de extracto de cerebro de ratón o extractos de proteínas de células N2a preparados en solución tampón que contiene Tris/HCl 20 mM (pH 6.8), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1% e inhibidores de proteasas. Posteriormente, las esferas fueron lavadas cuatro veces y luego resuspendida es solución tampón de carga para electroforesis 4X. Finalmente la mezcla fue hervida y separada por electroforesis (Jimenez-Mateos *et al.* 2005b).

4.2.8 Tratamiento con nocodazol

Las neuronas hipocampales de ratones controles y ratones deficientes para MAP1B en estadio embrionario de 18 días post-fecundación (E18), se cultivaron en cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina. Después de 48 horas de cultivo, cuando la mayoría de las

neuronas se encuentra en etapa III de desarrollo (Dotti *et al.*, 1988), las neuronas fueron tratadas con nocodazol a una concentración final de 10 μM . Luego de 30 minutos de tratamiento el medio fue reemplazado por uno sin nocodazol y las neuronas fueron fijadas a distintos tiempos de recuperación. Posteriormente se realizó inmunocitoquímica contra α -tubulina tirosinada y se utilizó faloidina asociada a rodamina para detectar actina. La faloidina es una toxina que se une específicamente a actina polimerizada. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada en axones de 20 a 30 neuronas para cada tiempo de recuperación.

Las células Cos7 fueron tratadas con 10 μM de nocodazol durante 1 hora, luego de ser transfectadas con plásmidos que codifican para la cadena pesada, la cadena liviana, la forma completa de MAP1B y la enzima TTL. Posteriormente fueron lisadas con solución tampón de lisis para obtener un extracto de proteínas citoplasmáticas. A continuación estos extractos fueron analizados mediante electroforesis e inmunodetección con el fin de estudiar los niveles de α -tubulina tirosinada.

4.2.9 Producción y recolección de Reelina recombinante

Líneas celulares HEK-293T transfectadas establemente con un ADNc que codifica para Reelina fueron crecidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin y geneticina (G418) 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para seleccionar las células establemente transfectadas. Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de cultivo de 100 mm a 37°C, en un incubador con 5% de CO_2 y humedad controlada al 95% hasta alcanzar una densidad de 80 a 90%. Para inducir la producción de la proteína recombinante se reemplazó el medio por medio fresco sin geneticina y suero fetal bovino. Este procedimiento se realizó cada 24 horas durante 3 días. El medio recolectado tras la inducción fue filtrado a través de membranas porosas de 0,22 μm para eliminar restos celulares y luego concentrado utilizando filtros amicon ultra (Millipore) con corte de peso molecular de 100 kDa, por medio de centrifugación a 500xg. Posteriormente el medio enriquecido fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

4.2.10 Estimulación de cultivos primarios con Reelina recombinante

Los cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro embrionario de ratón de 15 días de desarrollo fueron tratados con el medio enriquecido en Reelina, después de 2 días de cultivo *in vitro*. El tratamiento se realizó durante distintos tiempos en un rango de 1 a 5 horas. Posteriormente las neuronas fueron fijadas para realizar inmunocitoquímica o se lisaron para extraer las proteínas y analizarlas mediante técnicas bioquímicas.

4.2.11 Análisis estadístico

Se realizó estudio de variables cuantitativas; promedio, desviación estándar e intervalo de confianza mediante análisis de ANOVA

5. RESULTADOS

5.1 La sobreexpresión de la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) induce un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados

La enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) cataliza la tirosinación del extremo carboxilo terminal de la α -tubulina. Nuestro interés fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de esta enzima en la línea celular neuroblastoma murino N2a. Se escogió esta línea celular debido a sus altos niveles de expresión de la proteína MAP1B. Para este estudio, transfectamos estas células con ADNc que codifica para la forma completa de la enzima TTL, y se analizó los niveles de α -tubulina tirosinada mediante inmunodetección. Se demostró que al transfectar la enzima, estos niveles se encuentran aumentados un 68% respecto a los niveles sin transfectar (Figura 5). También se analizó los niveles de α -tubulina destirosinada en la cual se encuentra un residuo de ácido glutámico (Glu) en el extremo carboxilo terminal, se encuentran disminuidos un 60% respecto al contenido original de microtúbulos destirosinados (Figura 5). La variación de los niveles de α -tubulina tirosinada y α -tubulina destirosinada no se deben a un aumento de α -tubulina total, pues estos permanecen constantes. Estos resultados sugieren que no se encuentran alterados respecto al control sin transfectar debido a algún artefacto de la transfección.

Este experimento demuestra que el modelo celular N2a de sobreexpresión de TTL, es un muy buen modelo para estudiar la participación de MAP1B en la regulación de la tirosinación efectuada por la enzima TTL.

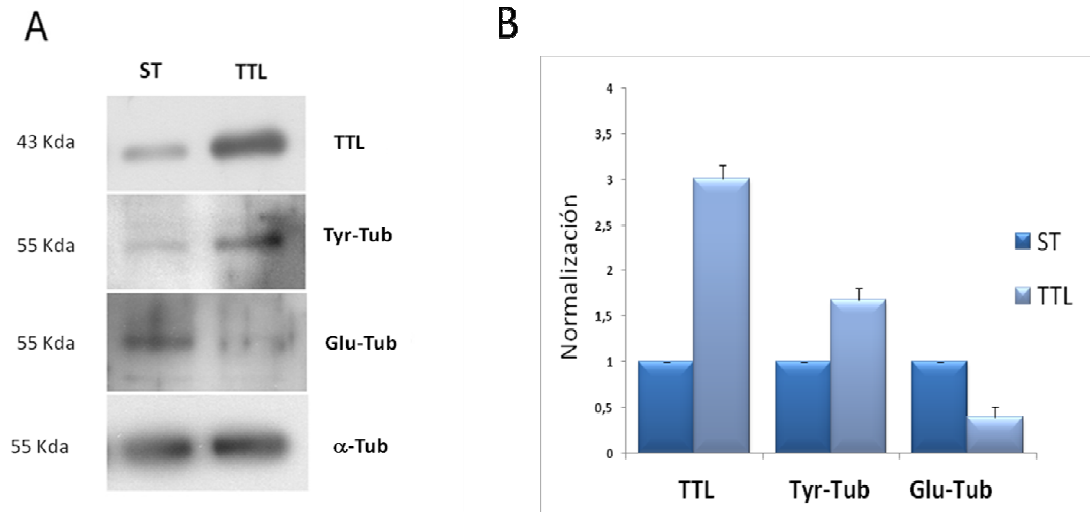


Figura 5. Sobreexpresión de la enzima TTL en células N2a.

A) Inmunodetección representativa (n=3) correspondiente a los niveles de la enzima TTL (TTL), α -tubulina tirosinada (Tyr-Tub), α -tubulina destirosinada (Glu-Tub) y α -tubulina (α -Tub) total en células N2a sin transfectar (ST), el panel derecho corresponde a células transfectadas con el ADNc que codifica para la enzima TTL (TTL). **B)** Normalización de la cuantificación densitométrica de las inmunodetecciones.

5.2 MAP1B participa en el control de la tirosinación de los microtúbulos

Debido a que se ha descrito que la ausencia de MAP1B genera deficiencias en el desarrollo normal de axones (González-Billault *et al.*, 2001; González-Billault *et al.*, 2002), decidimos investigar si esta ausencia tenía algún efecto sobre el contenido de microtúbulos tirosinados en neuronas provenientes de ratones hipomorfos para MAP1B, es decir que poseen una pérdida en la función y una muy baja expresión para esta proteína. Para estudiar esto, se realizaron cultivos de neuronas hipocampales de ratones silvestres (control) y de ratones hipomorfos (MAP1B KO) de la cepa NMRI, las cuales fueron tratadas con nocodazol, una droga despolimerizante de microtúbulos. Posterior al tratamiento, el medio con nocodazol fue reemplazado por medio fresco y las neuronas se sometieron a tiempos de recuperación (de 0 a 60 minutos), Se observó que la aparición de fluorescencia debida a los microtúbulos tirosinados en las neuronas control (Figura 6), mientras que en las neuronas MAP1B KO esta fue muy baja (Figura 6), lo que indica que los mecanismos de re-tirosinación se encuentran alterados en neuronas que carecen de MAP1B.

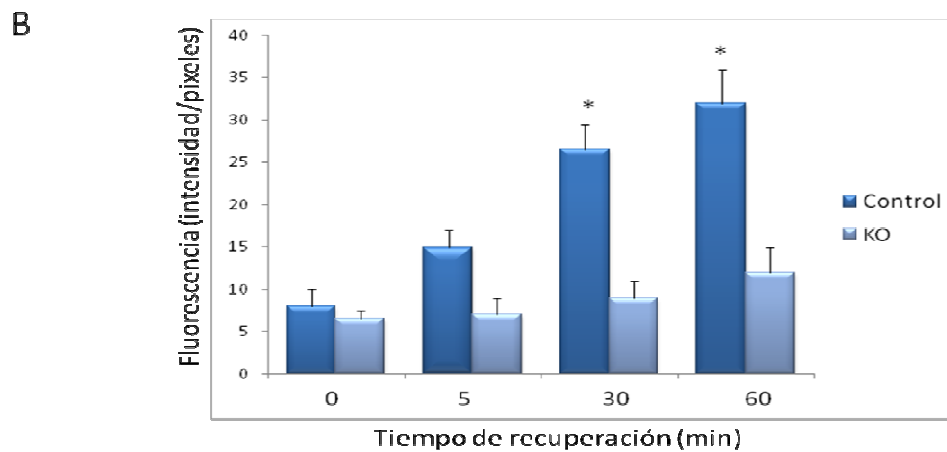
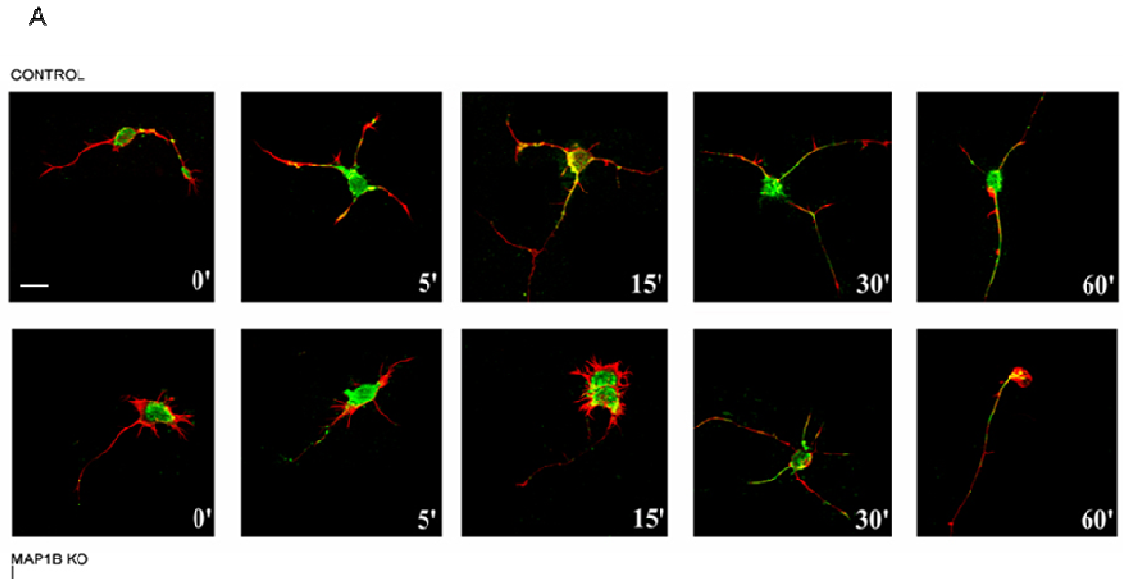


Figura 6. Tratamiento con nocodazol de neuronas de ratones de estirpe silvestre y ratones hipomorfos para MAP1B.

A) Panel superior: neuronas provenientes de hipocampus de ratones de estirpe silvestre (control) de 18 días de estadio embrionario y 2 días de cultivo *in vitro* tratadas con nocodazol a las cuales se dio distintos tiempos de recuperación luego del tratamiento. Panel inferior: neuronas provenientes de ratones hipomorfos para MAP1B (MA1B KO). Aumento 40x, barra 20 μ m. **B)** Se muestra la cuantificación de la fluorescencia del axón de 20 a 30 neuronas, graficada como la razón entre la intensidad y los pixeles para microtúbulos tiosinados. $p < 0,005$.

De este experimento se concluye que esta proteína asociada a microtúbulos juega un rol importante en el control de esta modificación post-traducciona. Se cuantificó la fluorescencia correspondiente a microtúbulos tirosinados, la cual se muestra en un histograma (Figura 6 B). Se observa claramente que en neuronas carentes de MAP1B la emisión de fluorescencia es significativamente menor que aquella de las neuronas control.

Debido a que la ausencia de MAP1B genera un desbalance en el contenido de microtúbulos tirosinados/destirosinados y a que TTL es la enzima que realiza la modificación post-traducciona de la α -tubulina, decidimos estudiar si la proteína asociada a microtúbulos 1B y la enzima Tubulina Tirosina Ligasa interactúan y de esta forma MAP1B ejerce un control sobre este ciclo.

5.3 Interacción de MAP1B y la enzima TTL.

Para responder a la interrogante de cómo MAP1B podría regular el ciclo de tirosinación/destirosinación, se realizó una coimmunoprecipitación recíproca y directa a partir de extractos de cerebro completo de embriones de ratones y células N2a transfectadas con el ADNc que codifica para la enzima TTL, utilizando anticuerpos contra MAP1B y TTL para coimmunoprecipitar y revelando de forma recíproca a la inmunoprecipitación. Al realizar el experimento con anticuerpos contra MAP1B encontramos que en complejo inmunoprecipitado se encuentra enriquecido en la enzima TTL (Figura 7A). Como control positivo de la coimmunoprecipitación se analizó la presencia de MAP1B. Al realizar la inmunoprecipitación contra TTL se observa que esta se encuentra enriquecida en la fracción correspondiente al inmunoprecipitado. Lo mismo sucede al realizar la inmunodetección con anticuerpos contra MAP1B (Figura 7 A) e inmunoprecipitar utilizando anticuepos contra TTL. En ambos casos detectamos la presencia de MAP1B y TTL en el complejo coimmunoprecipitado.

Para corroborar el resultado obtenido en el experimento anterior, se realizó un ensayo de *pull-down*. Este ensayo consiste en utilizar una proteína de fusión, la cual consta la enzima TTL, fusionada a la enzima glutatión sulfhidrilo transferasa (GST), previamente

producida y purificada en bacterias bacterias. Esta proteína de fusión se incubó con extractos frescos de cerebro embrionario de ratón. Posteriormente la proteína de fusión, unida a MAP1B se separa del extracto crudo de cerebro de ratón de estadio embrionario 18 (E18), utilizando esferas de sefarosa unidas a glutatión. Una vez aisladas, se procedió a separar las proteínas mediante electroforesis y posteriormente se detectaron mediante inmunodetección. Los resultados del ensayo de *pull-down* mostraron que efectivamente la enzima TTL es capaz de interactuar con la proteína asociada a microtúbulos 1B. Puede observarse también que se encuentra β -tubulina en la fracción “arrastrada” por la proteína de fusión TTL-GST, no así por la proteína GST sólo (Figura 7 B), lo cual sirve de control positivo del experimento, debido a que TTL posee dos sitios de unión a tubulina, uno de anclaje en la β -tubulina y otro donde se ocurre la reacción de adición de la tirosina al extremo carboxilo terminal de la α -tubulina (Ersfeld *et al.*, 1993).

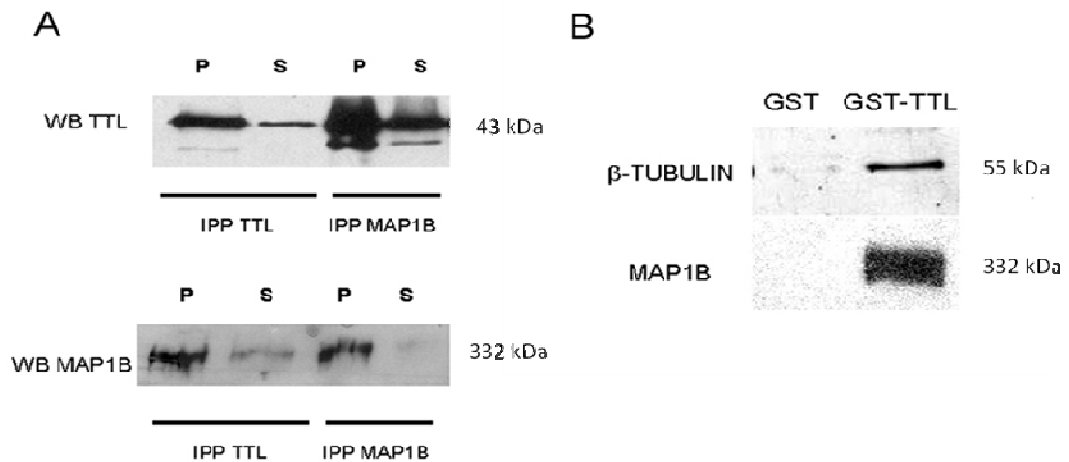


Figura 7. Interacción entre la proteína MAP1B y la enzima TTL.

A) Coinmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra MAP1B (IPP MAP1B) y TTL (IPP TTL), obteniéndose una fracción enriquecida (P) y un sobrenadante (S) en ambas coinmunoprecipitaciones. Luego se inmunodetectó a MAP1B y a TTL en las fracciones P y S. Los experimentos fueron realizados a partir de extractos de cerebro total de ratones E18 un total de 3 veces. **B)** *Pull-down* utilizando como cebo la proteína de fusión GST-TTL. Al realizar una inmunodetección del *pull-down* encontramos que tanto MAP1B y β tubulina son arrastradas por la proteína de fusión, no así cuando el experimento se realizó con GST en vez de la proteína de fusión (control negativo) n=3.

Al realizar coinmunoprecipitaciones en células N2a se observa que en células transfectadas con el ADNc que codifica para la enzima TTL, hay un aumento de la interacción entre ambas proteínas (Figura 8 A). Este resultado concuerda con lo esperado, dado que los niveles endógenos de la enzima TTL en células N2a son bajos (Figura 5 A)

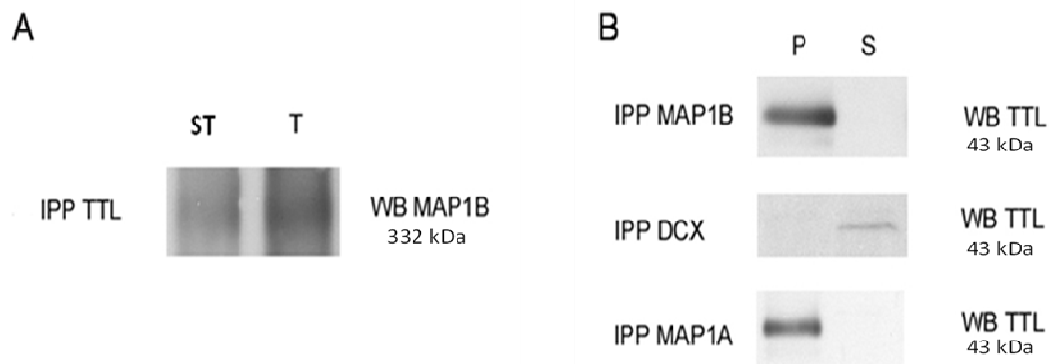


Figura 8. En células N2a que sobreexpresan TTL aumenta la interacción con MAP1B.

A) Coinmunoprecipitación de extractos de células N2a transfectadas con el ADNc que codifica para TTL (T), se utilizó el anticuerpo contra TTL para coinmunoprecipitar y se realizó la inmunodetección utilizando anticuerpos contra MAP1B. Sin transfectar. **B)** Coinmunoprecipitaciones con otras MAPs (IPP MAP1B, IPP DCX, IPP MAP1A). Fracción enriquecida (P), Sobrenadante (S).

También se estudió si TTL interactúa con otras proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Para ello se realizaron diversas coinmunoprecipitaciones utilizando anticuerpos contra las MAPs para inmunoprecipitar y posteriormente se inmunodetectó la presencia de TTL en la fracción enriquecida y en el sobrenadante de estas coinmunoprecipitaciones utilizando el anticuerpo contra la enzima TTL. En la figura 8 B se muestra que TTL no interactúa con doblecortina (DCX) (IPP DCX) encontrándose enriquecida en la fracción correspondiente al sobrenadante de la coinmunoprecipitación. Por otro lado, MAP1A, un

homólogo de MAP1B que se expresa en estadios adultos en el cerebro de ratón si interactúa con TTL (Figura 8 B).

Con el fin de analizar la zona de identidad entre MAP1A y MAP1B se realizó una alineación entre la secuencia aminoacídica de ambas MAPs mediante un BLASTp. Se encontró un 58% de identidad hacia el extremos amino terminal (Figura 9), lo que corresponde a las cadenas pesadas de ambas proteínas, indicando que esta región de la proteína MAP1B sería que la estaría interactuando con la enzima TTL.



Figura 9. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MAP1B y MAP1A .

Alineamiento de las proteínas MAP1B (Query) y MAP1A (Sbjct) mediante BLASTp. El símbolo + indica sitios donde no hay coincidencia entre los aminoácidos en el alineamiento, pero que sin embargo, poseen estructuras similares. La figura muestra parte de la secuencia total correspondiente a los primeros 600 aminoácidos de ambas proteínas. Arriba se muestra un diagrama representativo del alineamiento.

5.4 La Enzima TTL interactúa con la cadena pesada (HC) de la proteína MAP1B

Los resultados obtenidos anteriormente sugieren que la MAP1B podría interactuar con la enzima TTL mediante la cadena pesada (HC, del inglés *Heavy Chain*) de la MAP1B. Para estudiar si esto es efectivo se realizó una aproximación experimental que nos entregó la respuesta a esta pregunta en forma indirecta. Se escogieron las células Cos7 debido a que permiten realizar el experimento en un contexto libre de la MAP1B, dado que no la poseen endógenamente. Por esta razón se transfectó el sistema binario de transactivador de tetraciclina (Figura 10) (Lucas *et al.*, 2001) para expresar la forma completa (FL, del inglés *Full Length*) de la MAP1B, la cadena pesada (HC,) y la cadena liviana (LC, del inglés *Light Chain*) en estas células. La expresión en conjunto de la cadena pesada y TTL en las células Cos7 produjo un aumento de un 30% en el contenido de microtúbulos tirosinados, no así al transfectar TTL sola o TTL en conjunto con FL o LC (Figura 11).

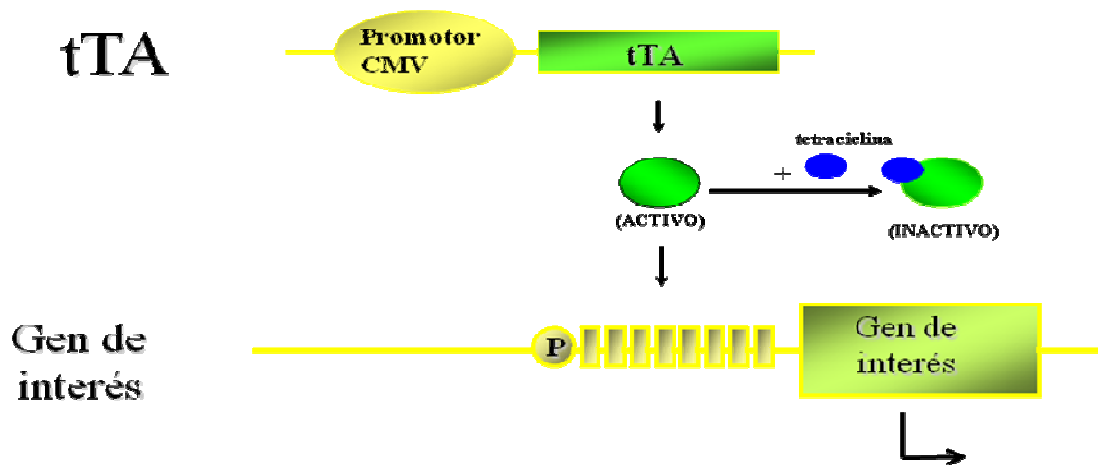


Figura 10. Esquema representativo del sistema de expresión condicionada.

El plasmidio que posee el gen que codifica para el transactivador de tetraciclina (tTA) y que esta comandado por el promotor mínimo de citomegalovirus (CMV). Una vez expresado este transactivador activo es capaz de unirse a las regiones reguladoras del otro plasmidio que posee el gen de interés y de esta forma inducir la expresión del gen. En presencia de tetraciclina se impide la unión del transactivador a las regiones reguladoras que comandan la expresión del gen de interés.

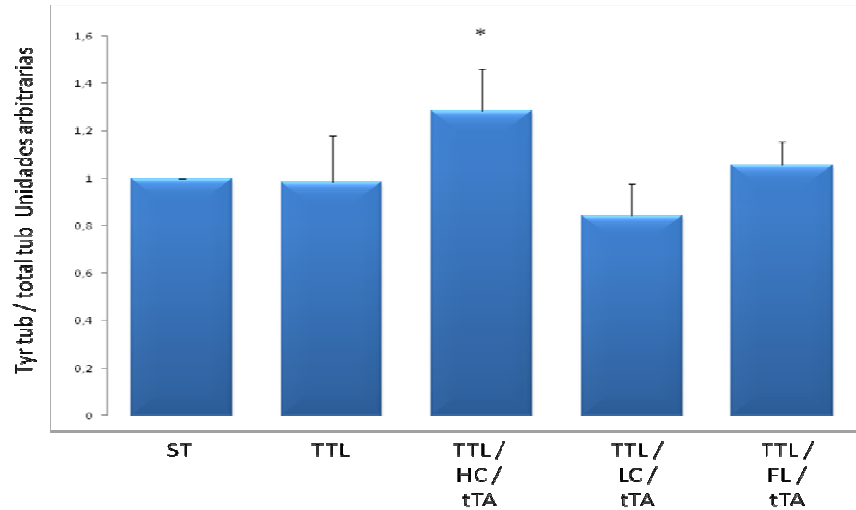


Figura 11. La interacción de la cadena pesada de MAP1B con TTL induce un aumento de microtúbulos tirosinados en células Cos7.

Histograma del análisis densitométrico de inmunodetecciones contra α -tubulina (n=3) y normalizada utilizando los niveles de α -tubulina total al estudiar células Cos7 transfectadas con el transactivador de tetraciclina (tTA), TTL y las cadenas pasada (HC), liviana (LC) o la forma completa (FL) de MAP1B. ST = Células sin transfectar. $p < 0,05$.

Estos resultados confirman que la activación de TTL necesita al menos de la interacción con la cadena pesada de MAP1B. FL es capaz de producir un leve aumento en los niveles de tubulina tirosinada, sin embargo este aumento no alcanza a ser significativo, posiblemente LC podría inhibir la unión de TTL a HC al expresar la proteína completa

5.5 La interacción entre MAP1B y TTL no se debe a un efecto entrecruzador de los microtúbulos.

Debido al hecho de que MAP1B es una proteína que se encuentra unida a microtúbulos, el siguiente experimento se realizó con el fin de descartar que los microtúbulos estuviesen generando un efecto entrecruzador en la interacción de MAP1B y TTL. Para corroborar si la interacción es directa entre ambas proteínas, las células N2a fueron transfectadas con el ADNc que codifica para TTL y tratadas con nocodazol.

Posteriormente se compararon coimmunoprecipitados de extractos de células transfectadas con tratamiento con nocodazol (T + Noc), transfectadas con TTL (T) sin tratamiento, y sin transfectar (ST), y utilizando un anticuerpo contra MAP1B (Figura 11 A). Los resultados indican que no hay diferencias en la cantidad de TTL recuperado luego de la inmunoprecipitación en ausencia o presencia de 10 μ M de nocodazol (Figura 12). Este resultado complementa los anteriores, sugiriendo fuertemente que la interacción que se produce entre MAP1B y TTL es directa, y no mediada por los microtúbulos.

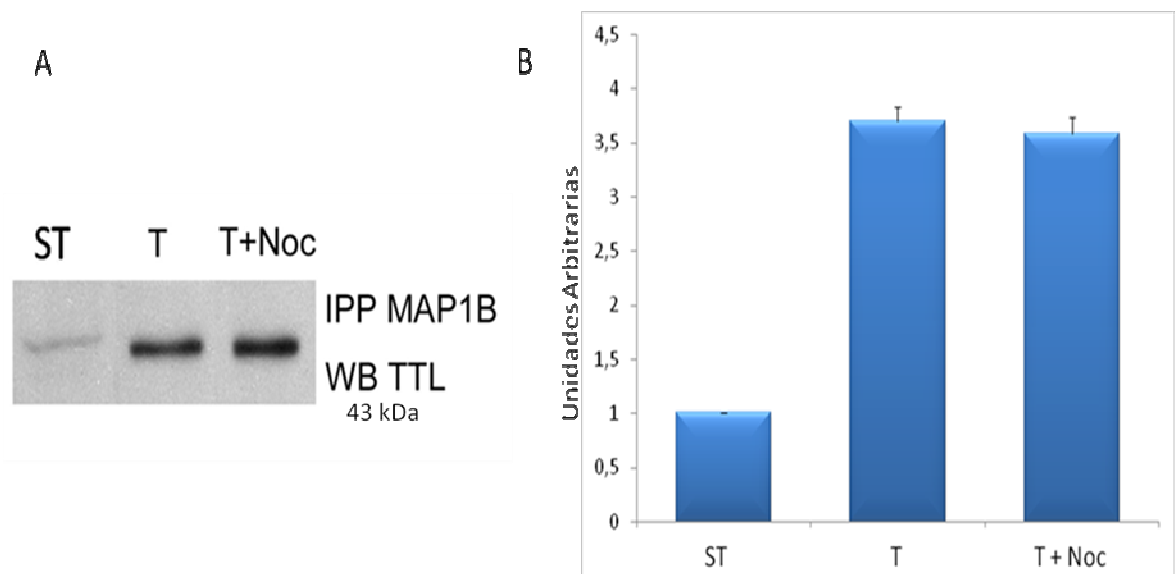


Figura 12. Tratamiento con nocodazol de células N2a transfectada con TTL.

A) Extractos de células N2a sin transfectar (ST), transfectadas con TTL (T) y transfectadas con TTL y tratadas con nocodazol (TTL + Noc), fueron inmunoprecipitados con anticuerpos contra MAP1B e inmunodetectados con anticuerpos contra TTL. **B)** cuantificación densitométrica de la inmunodetección mostrada en el panel A, no se observan cambios significativos en la cantidad de TTL recuperado por la inmunoprecipitación con y sin tratamiento con nocodazol.

5.6 La sobre expresión condicional de Gsk3 β en células N2a es regulada por tetraciclina.

Para estudiar si la fosforilación de MAP1B en modo I regula la interacción entre MAP1B y TTL, se estandarizó un sistema de expresión condicionada de Gsk3 β basado en el sistema binario Tet Off (Figura 10) (Lucas *et al.*, 2001). Este sistema consta de dos plasmidios, uno de los cuales contiene un ADNc que codifica para Gsk3 β que además posee un epítipo myc y el ADNc que codifica para β -galactosidasa en orientaciones divergentes. El otro plasmidio codifica para el transactivador de tetraciclina. Al transfectar ambos plasmidios en una célula, se produce la expresión del gen que codifica para el transactivador de tetraciclina, cuyo producto es capaz de unirse a las regiones regulatorias de Gsk3 β y β -galactosidasa, gatillando la expresión de ambas enzimas.

Para verificar si este sistema efectivamente produce un aumento en la expresión de Gsk3 β se transfectaron células N2a con ambos plasmidios y posteriormente los extractos celulares fueron analizados con el fin de estudiar la sobreexpresión de Gsk3 β . Utilizando anticuerpos específicos contra myc se encontró mediante inmunodetección que sólo en aquellas células transfectadas con ambos plasmidios existía una señal específica correspondiente al epítipo myc que posee la enzima Gsk3 β codificada en el plasmidio. Esto se analizó utilizando dos anticuerpos distintos que reconocen al epítipo myc: A14 y 9E10 (Figura 13). En concordancia con lo obtenido anteriormente, cuando se analiza la expresión de β -galactosidasa se observa la aparición de una banda específica correspondiente a β -galactosidasa (Figura 13). Aún más, al analizar la expresión de Gsk3 β mediante anticuerpos que reconocen específicamente a Gsk3 β , en las células transfectadas con ambos plasmidios, se observa la aparición de una banda con una movilidad electroforética más lenta, la cual corresponde a la enzima Gsk3 β con el epítipo myc, lo cual está indicando que efectivamente se está produciendo una sobreexpresión de esta quinasa, sin observar cambios en la expresión de Gsk3 β endógeno. Como control del sistema Tet Off, observamos que al agregar tetraciclina (tet), se suprime la expresión de

ambas enzimas (Gsk3 β / β -galactosidasa) y no se observa la aparición de bandas específicas en la inmunodetección para myc o para β -galactosidasa (Figura 13, Gsk3 β /tTa + tet). Los niveles de expresión de β -tubulina total no se ven alterados por la transfección o el tratamiento con tetraciclina.

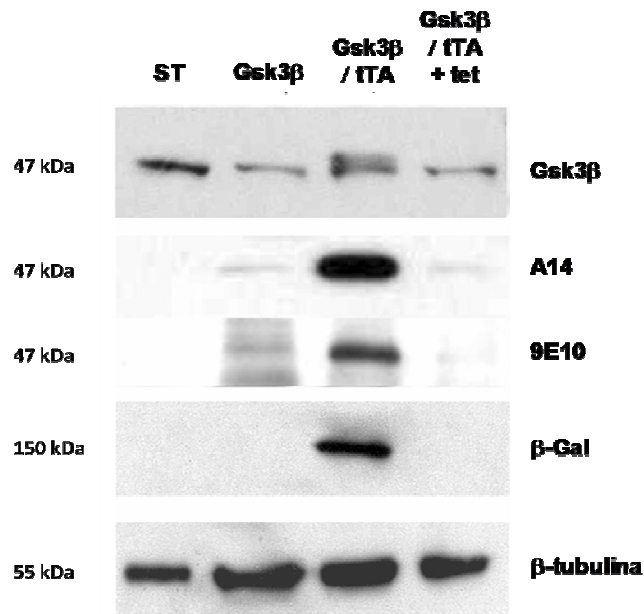


Figura 13. Evidencia bioquímica de la sobreexpresión de Gsk3 β en células N2a.

Extractos de células sin transfectar (ST), transfectadas con Gsk3 β -myc (Gsk3 β), transfectadas con Gsk3 β y tTA (Gsk3 β /tTA), y transfectadas con Gsk3 β y tTA y tratadas con tetraciclina (Gsk3 β /tTA + tet), fueron analizadas mediante inmunodetección. Gsk3 β es expresada solo cuando se transfectan juntos Gsk3 β y tTA. Esto se corroboró utilizando anticuerpos contra Gsk3 β , β -galactosidasa (β -Gal) y anticuerpos contra el epítipo myc que posee la enzima Gsk3 β sobreexpresada. Como control de carga de la inmunodetección se analizaron los niveles de β -tubulina.

Con el fin de corroborar mediante otra técnica la especificidad de la expresión de Gsk3 β en el sistema binario basado en el transactivador de tetraciclina, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra myc y contra β -galactosidasa.

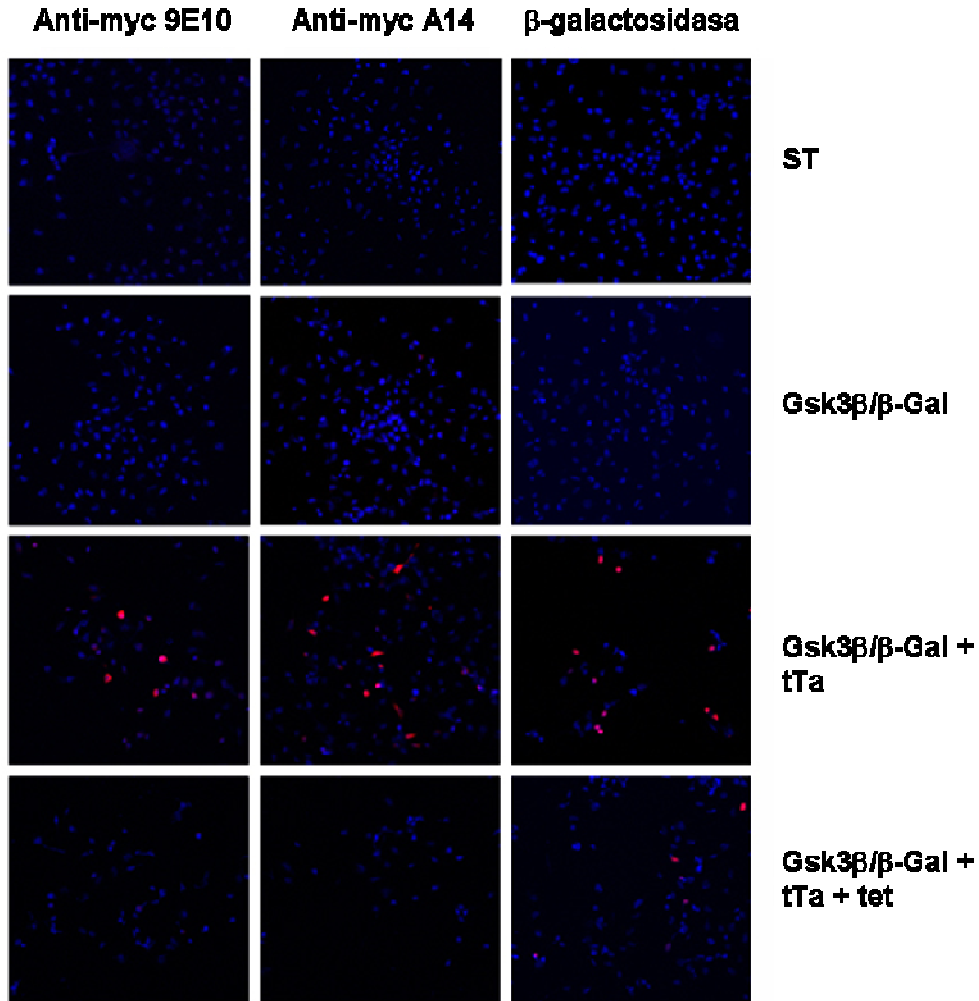


Figura 14. Inmunocitoquímica de expresión del sistema condicional de sobreexpresión de Gsk3 β .

Células N2a transfectadas con un plasmidio que codifica para Gsk3 β / β galactosidasa (Gsk3 β / β -Gal) y/o con un plasmidio que codifica para el transactivador de tetraciclina (tTA). Sólo las células transfectadas con ambos componentes del sistema de expresión condicional son positivas a β -galactosidasa o a myc. Al agregar tetraciclina (tet) a las células, se suprime la expresión de Gsk3 β / β -galactosidasa. Aumento 20x. Las células fueron teñidas utilizando ToPro un marcador de núcleo en color azul, el canal rojo corresponde a fluorescencia debida a β -galactosidasa.

Se observó que sólo en células que poseen ambos plasmidios, se detecta fluorescencia debido a myc o a β -galactosidasa (Figura 14), no así en células sin transfectar (ST), en células transfectadas sólo con el plasmidio que codifica para Gsk3 β y β -

galactosidasa , o en células que sólo poseen el plasmidio que codifica para Gsk3 β y β -galactosidasa, o bien en aquellas células transfectadas con ambos plasmidios, pero a las cuales se les trató con tetraciclina con el fin de apagar el sistema de expresión condicional. La tetraciclina es capaz de unirse a al transactivador, impidiendo de esta forma que pueda unirse a las regiones regulatorias de Gsk3 β y β -galactosidasa y así activar su expresión.

Particularmente en este último experimento se observó una señal debido a la fluorescencia correspondiente al anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario contra la β -galactosidasa en células transfectadas con ambos plasmidios y tratadas con tetraciclina. Posiblemente este hecho puede deberse a que antes de agregar la tetraciclina se expresó β -galactosidasa la cual posee señalización nuclear. Al ser transportada a este compartimento celular no fue degradada por proteasas y debido a eso la señal aún permanecía después de haber tratado a las células con tetraciclina.

5.7 Gsk3 β sobreexpresada por el sistema de expresión condicional en células N2a es capaz de fosforilar a MAP1B en modo I.

Una vez comprobado que el sistema de expresión condicional de Gsk3 β funcionaba correctamente y que se logró una sobreexpresión de la enzima Gsk3 β , el paso siguiente fue analizar si la quinasa era capaz de fosforilar a MAP1B en modo I. Para corroborar lo anteriormente expuesto se utilizó el mismo modelo celular, es decir la línea celular N2a. realizando transfecciones en células N2a con el sistema binario de expresión condicional Tet off de Gsk3 β , y se evaluaron los niveles de MAP1B fosforilada con un anticuerpo que reconoce particularmente el epítipo fosforilado de esta proteína asociada a microtúbulos. Se encontró a la MAP1B fosforilada en modo I en altas proporciones cuando se transfectó el sistema binario, al utilizar el anticuerpo SMI31 para su detección. Cuando se transfectaron células N2a con el sistema de expresión condicional, pero adicionalmente se les administró tetraciclina, se observó que la modificación de MAP1B fue abolida, pues los

niveles de fosforilación eran similares a los de las células sin transfectar o de aquellas en que sólo se había transfectado TTL. También se demostró que los niveles totales de MAP1B reconocidos por el anticuerpo NC19, no se ven alterados bajo estas condiciones. Esto indica que la expresión de MAP1B no ve alterada por la sobreexpresión de Gsk3 β , ni por la adición de tetraciclina (Figura 15). Estos experimentos se realizaron en presencia de ácido okadaico, un poderoso inhibidor de fosfatasas, para evitar que fosfatasas específicas pudiesen desfosforilar a MAP1B en modo I.

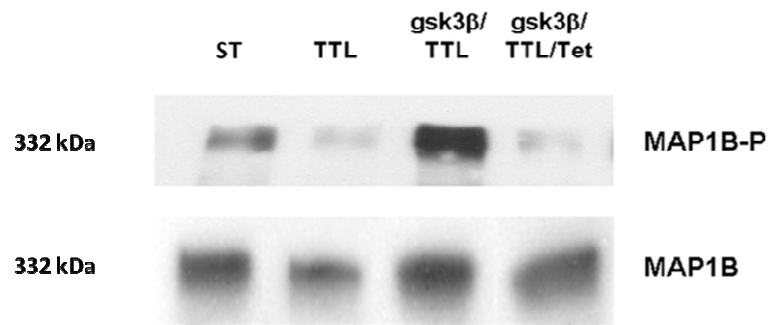


Figura 15. La sobreexpresión de Gsk3 β induce la fosforilación de MAP1B en modo I.

Extractos de células N2a transfectadas con el sistema de expresión condicionada de Gsk3 β (gsk3 β) y/o TTL fueron analizadas mediante inmunodetección (n=3) para evaluar los niveles de fosforilación de MAP1B en modo I en ausencia o presencia de tetraciclina. Los niveles totales de MAP1B no presentan diferencias significativas con los controles (ST, células sin transfectar y TTL, transfectadas sólo con el ADNc que codifica para la enzima TTL).

5.8 La interacción entre MAP1B y TTL no es regulada por la fosforilación de MAP1B en modo I.

El siguiente paso fue investigar si la presencia esta modificación post-traducciona de MAP1B regula la interacción entre MAP1B y TTL. Nos interesó analizar este aspecto en profundidad debido a que MAP1B fosforilada en modo I se encuentra específicamente en los axones en crecimiento (Trivedi *et al.*, 2005), zona que también se encuentra enriquecida en microtúbulos tirosinados.

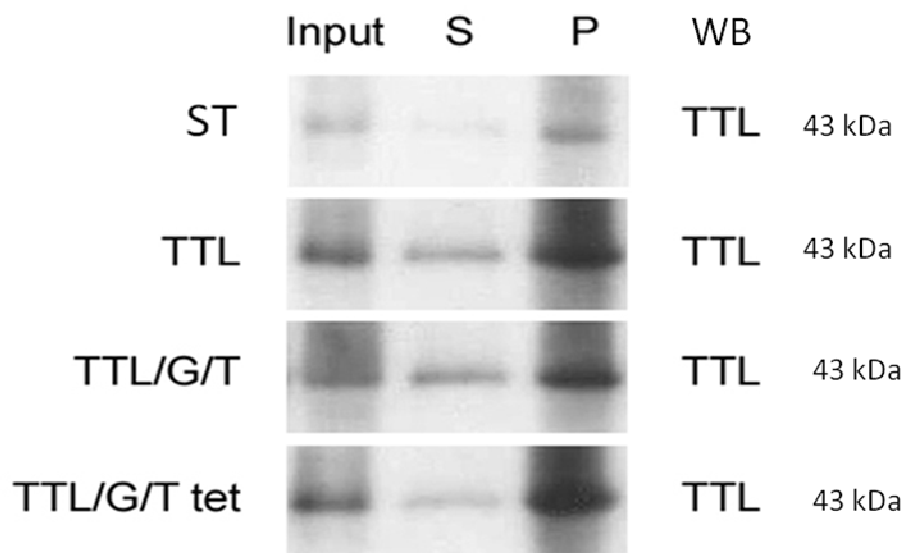


Figura 16. La interacción entre MAP1B y TTL no es regulada por la fosforilación en modo I de MAP1B.

Células N2a fueron transfectadas sistema binario de expresión condicional de Gsk3 β , (G/T) y/o TTL en ausencia o presencia de tetraciclina. Al agregar tetraciclina (tet) no se evidencia una variación significativa en los niveles de TTL recuperados en la porción enriquecida de la coimmunoprecipitación (P) o en el sobrenadante (S) indicando que la fosforilación no tiene un efecto regulatorio sobre la interacción.

Utilizando el sistema expresión condicional de Gsk3 β en células N2a, se realizaron extractos de proteínas y posteriormente coimmunoprecipitaciones utilizando un anticuerpo contra MAP1B total (NC19). Como se demostró anteriormente, la población de MAP1B se encuentra fosforilada en modo I en su gran mayoría. Posteriormente se analizó mediante inmunodetección los niveles de TTL recuperados tras la inmunoprecipitación, utilizando un anticuerpo específico contra TTL ID3. Se observó que la cantidad de enzima recuperada, no presenta variaciones significativas respecto a la coimmunoprecipitación en células transfectadas sólo con TTL o en aquellas en que el sistema de expresión condicional se encontraba apagado por la adición de tetraciclina (Figura 16), lo cual indica que la fosforilación de MAP1B no es un factor que regule la interacción entre ambas proteínas.

5.9 Reelina, una proteína de matriz extracelular es capaz de inducir un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados en neuronas.

La tirosinación de α -tubulina es necesaria para procesos que requieren un cambio rápido en la dinámica del citoesqueleto neuronal, de forma de facilitar la modificación de propiedades móviles y/o morfológicas de las neuronas durante eventos como migración neuronal, elongación y guía axonal. La Reelina es una señal extracelular que comanda la migración neuronal en la corteza (Herz y Chen, 2006). Este estímulo podría producir por lo tanto un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados con el fin de producir cambios en la dinámica del citoesqueleto que permitan la migración de la neurona.

Para estudiar si la Reelina induce un aumento en el contenido de microtúbulos tirosinados se prepararon cultivos primarios de neuronas corticales en estadio embrionario E15, los cuales después de dos días fueron estimulados durante diferentes tiempos con medio enriquecido con la proteína recombinante. Al término del periodo de tratamiento se analizó el contenido de microtúbulos tirosinados. El análisis de esta modificación se llevó a cabo utilizando dos aproximaciones experimentales: mediante ensayos de inmunodetección y análisis de inmunocitoquímica en que se utilizaron anticuerpos contra tubulina tirosinada y tubulina destirosinada.

Mediante inmunodetección se analizó el contenido de microtúbulos tiosinados utilizando anticuerpos contra tubulina tiosinada (Figura 17). A tiempos mayores de tratamiento con Reelina existe un aumento en la señal correspondiente a la tiosinación de los microtúbulos. En contraparte, los niveles de α -tubulina totales no varían tras la estimulación con Reelina. El panel derecho de la figura 17 muestra el análisis densitométrico de los ensayos de inmunodetección. Se observa que luego de una hora de tratamiento se produce un 23% de aumento en el contenido de microtúbulos tiosinados, el cual alcanza un 40% a las 4 horas de tratamiento.

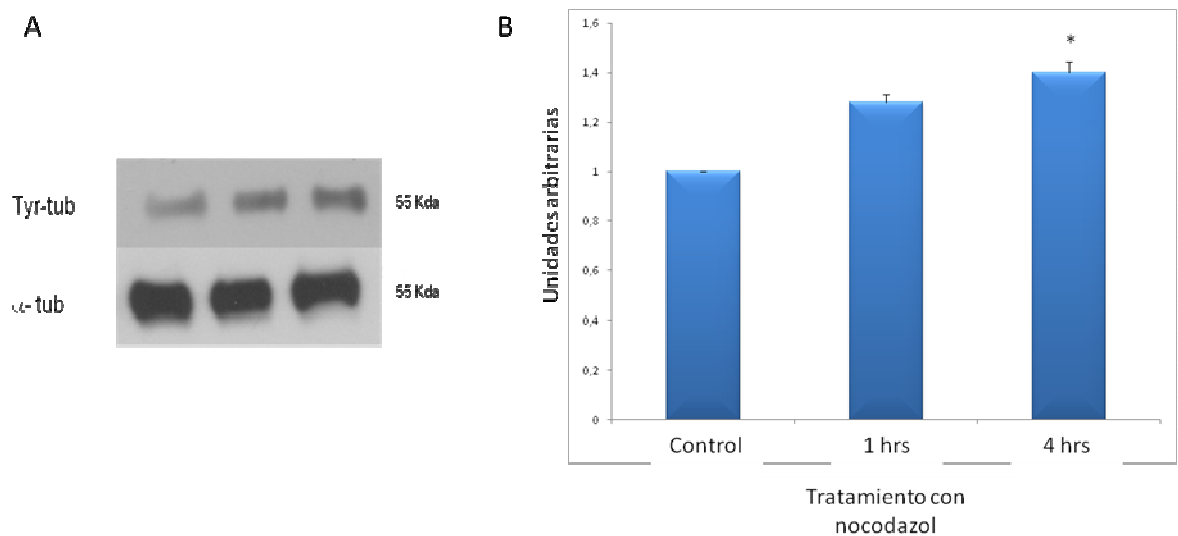


Figura 17. Reelina induce un aumento en el contenido de microtúbulos tiosinados en neuronas.

(A) Inmunodetecciones de los niveles de tubulina tiosinada (Tyr-tub) de extractos de neuronas de hipocampo de ratones de estirpe silvestre de 18 días de estadio embrionario tratadas con medio enriquecido en Reelina. (B) Análisis densitométrico de la inmunodetección mostrada en A. Se determinó que a 1 hora de tratamiento el aumento de los microtúbulos tiosinados es de un 23% y que a las 4 horas es de un 40% respecto a las neuronas control sin tratamiento (n=3). Los niveles de α -tubulina tiosinada fueron normalizados respecto a los niveles totales de α -tubulina ($p < 0.05$).

Por inmunocitoquímica se observó que a mayor tiempo de tratamiento hay un aumento de la fluorescencia debido a la presencia de microtúbulos tirosinados hacia el extremo distal del axón. Debido a que las neuritas, también denominadas procesos menores, se encuentran en un ciclo de constante retracción y elongación, y por lo tanto poseen un citoesqueleto de tubulina altamente dinámico, se puede observar que existe un alto contenido de microtúbulos tirosinados en estos procesos. A 5 horas de tratamiento el axón presenta una gran cantidad de microtúbulos tirosinados si se compara con una neurona control no tratada con Reelina (Figura 18). Se puede observar también que el contenido de microtúbulos destirosinados se encuentra disminuido a tiempos mayores de tratamiento.

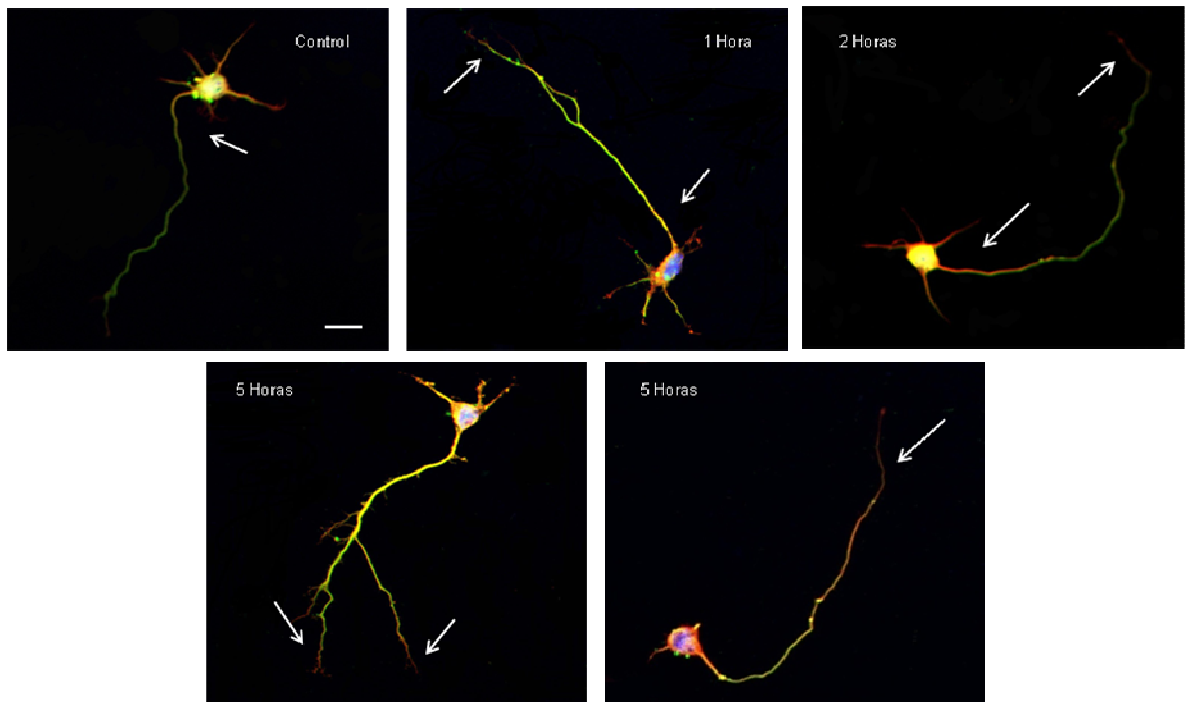


Figura 18. Neuronas tratadas con Reelina poseen microtúbulos tirosinados más dinámicos.

Inmunocitoquímica de neuronas de hipocampo de ratones de estirpe silvestre de 18 días de estadio embrionario tratadas con medio enriquecido en Reelina. El contenido de microtúbulos tirosinados aumenta (rojo) a medida que aumenta el tiempo de tratamiento (1,2 y 5 horas), adicionalmente, el contenido de microtúbulos destirosinados disminuye (verde). Las flechas indican las zonas con mayores niveles de microtúbulos tirosinados. Aumento 40x, barra 20 μm .

Estos resultados en su conjunto sugieren que los estímulos fisiológicos que producen cambios morfológicos necesarios para la migración de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso, ocurren con modificaciones en el citoesqueleto. En este contexto, los resultados mostrados indican que la MAP1B participa como modulador de estos procesos mediante la regulación positiva del contenido de microtúbulos tirosinados.

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue estudiar si la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) interactúa con la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL). Esta interrogante surge de la observación de que las neuronas carentes de MAP1B presentan un desbalance en el contenido de microtúbulos tirosinados, lo que nos llevó a proponer que MAP1B podría jugar un papel en la regulación del ciclo tirosinación / destirosinación. Para dar respuesta a la hipótesis se plantearon diversas aproximaciones experimentales con el fin de dilucidar si MAP1B interactúa con TTL y de esta forma regula la tirosinación de la α -tubulina.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo efectivamente corroboraron nuestra hipótesis, mostrando que MAP1B y TTL interactúan. Esta unión facilita la tirosinación de la α -tubulina que ocurre principalmente en los heterodímeros despolimerizados, en los cuales TTL se une a la β -tubulina permitiendo la tirosinación de la α -tubulina (Wheland y Weber, 1987; Idriss, 2000). Probablemente este mecanismo no ocurra directamente en los microtúbulos ensamblados, puesto que el sitio de unión de TTL a la β -tubulina se encuentra enmascarado. Algunos investigadores han propuesto que MAP1B podría evitar la destirosinación de la α -tubulina en los microtúbulos ensamblados (Goold *et al.*, 1999). Sin embargo, los resultados mostrados en el presente trabajo sugieren que más que impedir la destirosinación, MAP1B estaría facilitando la tirosinación de la α -tubulina en heterodímeros desensamblados, dado que, como se comentó anteriormente, el sitio de unión de TTL a la β -tubulina puede encontrarse enmascarado. Debido a que MAP1B se une principalmente a la β -tubulina (Ávila *et al.*, 1994), y de acuerdo a nuestro resultado el cual indica que MAP1B interactúa con TTL (Figura 7), se podría pensar que esta interacción facilitaría la incorporación de la tirosina en la α -tubulina de los microtúbulos ensamblados. Sin embargo, al tratar con nocodazol, una droga despolimerizante de microtúbulos, y posteriormente permitir la recuperación de los microtúbulos (Figura 6), en condiciones en que los microtúbulos analizados se encuentran recién polimerizados, sugiere que el mecanismo no es el anteriormente descrito. Esto se

fundamenta en la observación de que las neuronas que carecen de MAP1B poseen menos α -tubulina tirosinadas en microtúbulos recién polimerizados luego del tratamiento con la droga. Por lo tanto, ya que las neuronas que carecen de MAP1B presentan un menor contenido de microtúbulos tirosinados, esta diferencia se podría atribuir a la pérdida del control del ciclo tirosinación / destirosinación debido a la ausencia de MAP1B. Sin embargo, no se puede descartar otras posibilidades de cómo la interacción entre MAP1B y TTL podría contribuir al aumento de tirosinación de la α -tubulina. Aún más, debido a que la enzima que controla la destirosinación de la α -tubulina no se encuentra caracterizada (Arce *et al.*, 1978; Kumar y Flavin, 1981; Barra *et al.*, 1988), no es posible descartar que MAP1B esté ejerciendo una doble regulación del ciclo. Por un lado que la interacción de TTL y MAP1B en su forma no fosforilada en modo I module la tirosinación de la α -tubulina, puesto que como mostramos la interacción entre ambas proteínas es independiente de esta fosforilación de MAP1B, y por otro lado que la forma fosforilada de MAP1B pudiese regular la actividad de la carboxipeptidasa por interacción directa con ella. Se ha demostrado que MAP1B no sólo actúa como una proteína asociada a microtúbulos, sino que también como una proteína adaptadora que puede asociarse con muchas otras proteínas (Allen *et al.*, 2005).

Otro estudio interesante realizado en un ratón mutante que carece de MAP1B indica que no existen cambios en los niveles de α -tubulina tirosinada o destirosinada en neuronas del ganglio dorsal (Bouquet *et al.*, 2004). Sin embargo, estos resultados no son del todo sorprendentes, pues el fenotipo de estos ratones es menos severo que el de los ratones hipomorfos utilizados en el presente trabajo, indicando que variaciones sutiles en el fondo genético del ratón pueden causar estas diferencias. Se ha visto que el fondo genético puede producir una compensación funcional mediante otras proteínas como EB1 frente a la ausencia de MAP1B (Jimenez-Mateos *et al.*, 2005b).

También en este trabajo hemos mostrado en forma preliminar que MAP1A es capaz de interactuar con TTL (Figura 8 B), al igual que MAP1B con TTL. MAP1A es una proteína homóloga a MAP1B que se expresa en estadio adulto y que presenta un alto porcentaje de identidad a MAP1B en su secuencia aminoacídica (58%) (Figura 9). El

mayor porcentaje de identidad se encuentra hacia el extremo amino terminal que corresponde a la cadena pesada y es precisamente en esta región en la que se produce la interacción con TTL (Figura 11). No es posible descartar que la asociación de MAP1A a TTL tenga efectos similares a los de la interacción descrita en este trabajo en estadio adulto en zonas de mayor plasticidad neuronal donde se requeriría una dinámica mayor de los microtúbulos. Sin embargo es necesario realizar un estudio más a fondo para entender si esta nueva interacción posee alguna relevancia fisiológica en el control de las propiedades dinámicas de los microtúbulos.

Los ratones que carecen de la enzima TTL presentan una desorganización de la placa cortical y del loop corticotalámico (Erk *et al.*, 2005). Estos dos fenómenos también han sido descritos en ratones hipomorfos para MAP1B (Del Río *et al.*, 2004; González-Billault *et al.*, 2005), sugiriendo que la interacción entre MAP1B y TTL que se describe en este trabajo tiene un rol fundamental en procesos como migración neuronal, guía axonal y elongación axonal. Hemos visto que la Reelina, una proteína extracelular que comanda el proceso de migración neuronal en la corteza, es capaz de inducir un aumento en el contenido de microtúbulos tiosinados en neuronas (Figuras 17 y 18), indicando que para llevar a cabo procesos en que se requiere un citoesqueleto más dinámico es requiere esta modificación post-traducciona l de la α -tubulina. Sin embargo, se debe realizar un estudio más profundo de cómo la Reelina produce este aumento. Posiblemente se encuentre involucrado MAP1B fosforilado en modo I, puesto que se ha visto que Reelina induce la fosforilación de MAP1B en este modo (González-Billault *et al.*, 2005). Aún más, se ha visto que la tiosinación de los microtúbulos es necesaria para la interacción de distintas proteínas que controlan la dinámica del citoesqueleto con los microtúbulos, por ejemplo CLIP170 (Peris *et al.*, 2006), o bien Tiam1 (Kunda *et al.*, 2001), una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanidina, la cual es una activadora específica de Rac1, una Rho GTPasa que modula tanto la dinámica del citoesqueleto de tubulina como el de actina. De este hecho surge un punto interesante: puesto que últimamente se ha propuesto que MAP1B es una proteína que podría producir una comunicación cruzada entre ambos citoesqueletos (Halpain y Dehmelt, 2006). De acuerdo a lo discutido anteriormente, la tiosinación de la α -tubulina podría ser una forma de establecer esta comunicación entre

ambos citoesqueletos modulando por ejemplo la actividad de Rac1, y de forma indirecta MAP1B podría controlar el contenido de microtúbulos tirosinados y de esta forma regular la dinámica del citoesqueleto de actina.

7. CONCLUSIONES

1. La proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) y la enzima Tubulina Tirosina Ligasa (TTL) son capaces de interactuar. Esta interacción resulta en un aumento de microtúbulos tirosinados.
2. TTL puede interactuar con MAP1A, un homólogo de MA1B que se expresa en estadio adulto.
3. La interacción de MAP1B y TTL se produce con la cadena pesada de MAP1B.
4. La interacción de MAP1B y TTL es independiente de un efecto entrecruzador causado por los microtúbulos polimerizados.
5. MAP1B es fosforilada en modo I al sobre-expresar Gsk3 β mediante un sistema de expresión condicional basado en el transactivador de tetraciclina.
6. La fosforilación de MAP1B en modo I no regula la interacción de MAP1B y TTL.
7. El tratamiento con Reelina generó un aumento de microtúbulos tirosinados, sin embargo el mecanismo por el cual se produjo este efecto aún no se ha dilucidado.

8. PROYECCIONES

Luego de los resultados obtenidos en este trabajo surgen tres proyecciones que podrían generar conocimientos más profundos de cómo se regula la dinámica del citoesqueleto en determinados procesos que requerirían cambios rápidos en la estabilidad de este.

1. Estudiar si MAP1B regula negativamente a la carboxipeptidasa encargada de remover la tirosina del extremo carboxilo terminal de la α -tubulina, particularmente enfocando en el estudio en el efecto de la fosforilación de MAP1B en modo I, para analizar esta posible regulación.
2. Realizar aproximaciones experimentales que ayuden a entender si MAP1A participa también en la regulación del contenido de microtúbulos tirosinados en neuronas, en estadios adultos y en regiones de alta plasticidad neuronal.
3. Dilucidar los mecanismos mediante los cuales Reelina produce un aumento en la tirosinación de la α -tubulina.

9. REFERENCIAS

- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:309-22.
- Allen E, Ding J, Wang W, Pramanik S, Chou J, Yau V, Yang Y (2005) Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival. *Nature* 438:224-228.
- Andersen S. (2000) Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and stathmin/ Op18. *Trends Cell Biol* 10:261-267.
- Animura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8:194-205.
- Arce CA, Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R (1978) Capability of tubulin and microtubules to incorporate and to release tyrosine and phenylalanine and the effect of the incorporation of these amino acids on tubulin assembly. *J Neurochem* 31:205-210.
- Ávila J (1990) Microtubule dynamics. *Faseb J* 4:3284-90.
- Ávila J, Domínguez J, Díaz-Nido J (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol* 38:13-25.
- Barra HS, Arce CA, Argarana CE (1988) Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol* 2:133-153.
- Beltramo DM, Arce CA, Barra HS (1987) Tubulin, but not microtubules, is the substrate for tubulin:tyrosine ligase in mature avian erythrocytes. *J Biol Chem* 262:15673-15677.
- Bloom GS, Luca FC, Vallee RB (1985) Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5404-5408.
- Bouquet C, Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Propst F, Nothias F (2004) Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci.* 24:7204-7213.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cleveland D, Hwo S, Kirschner M. (1977). Purification of tau, a microtubule associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol BioI* 116: 207-225.

Del Río JA, González-Billault C, Urena JM, Jiménez EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simo S, La Torre A, Wandosell F, Ávila J, Soriano E (2004). MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* 14:840-850.

Dotti C, Sullivan C, Banker G (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.

Edmondson JC, Hatten ME (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* 7:1928-1934.

Erck C, Frank R, Wehland J (2000) Tubulin-tyrosine ligase, a long-lasting enigma. *Neurochem Res* 25:5-10.

Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin PA, Job D, Wehland J (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7853-7858.

Ersfel K, Wehland J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K (1993) Characterization of the Tubulin-Tyrosine Ligase. *J Cell Biol*, Volume 120: 725-732

Gasser UE, Hatten ME (1990) Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells in vitro: glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation. *J Neurosci* 10:1276-1285.

González-Billault C, Demandt E, Wandosell F, Torres M, Bonaldo P, Stoykova A, Chowdhury K, Gruss P, Ávila J, Sanchez MP (2000) Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol Cell Neurosci* 16:408-421.

González-Billault C, Ávila J, Cáceres A (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* 12:2087-2098.

González-Billault C, Owen R, Gordon-Weeks PR, Ávila J (2002) Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res* 943:56-67.

González-Billault C, Jiménez-Mateos E, Cáceres A, Díaz-Nido J, Wandosell F, Ávila J (2004) Microtubule-Associated Protein 1B Function during Normal Development, Regeneration, and Pathological Conditions in the Nervous System. *J Neurobiol* 58:48-59.

González-Billault C, Del Río J, Urena J, Jimenez-Mateos E, Barallobre M, Pascual M, Pujadas L, Simo S, Torre A, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Ávila J (2005) A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex* 15:1134-1145.

Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.

- Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 7:224.
- Hammarback J, Obar R, Hughes S, Vallee R. (1991) MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* 7:129-139.
- Herz J, Chen Y (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7(11):850-859
- Howell BW, Herrick TM, Cooper JA (1999) Reelin-induced tyrosine phosphorylation of disabled1 during neuronal positioning. *Genes & development* 13: 643-648.
- Idriss HT (2000) Phosphorylation of tubulin tyrosine ligase: a potential mechanism for regulation of alpha-tubulin tyrosination. *Cell Motil Cytoskeleton* 46:1-5.
- Jiménez-Mateos EM, Wandosell F, Reiner O, Ávila J, González-Billault C (2005) Binding of microtubule-associated protein 1B to LIS1 affects the interaction between dynein and LIS1. *Biochem J* 389:333-341.
- Jiménez-Mateos EM, Paglini G, González-Billault C, Cáceres A, Ávila J. (2005) End binding protein-1 (EB1) complements microtubule-associated protein-1B during axonogenesis. *J Neurosci Res* 80:350-359
- Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K, Cáceres A (2001) Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation. *J Neurosci* (7):2361–2372
- Kreis E (1987) Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *Embo J* 9:2597-2606,
- Kumar N, Flavin M (1981) Preferential action of a brain detyrosinating carboxypeptidase on polymerized tubulin. *J Biol Chem* 256:7678-7686.
- Lafanechere L, Job D (2000) The third tubulin pool. *Neurochem Res* 25: 11–18
- Lee G, Brandt R (1992) Microtubule-bundling studies revisited: is there a role for MAPs? *Trends Cell Bio* 2: 286-289.
- Lucas J, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Ávila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20(1-2):27-39.
- Mitchison T, Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-772.

- Meixner A, Haverkamp S, Wassle H, Fuhrer S, Thalhammer J, Kropf N, Bittner R, Lassmann H, Wiche G, Propst F (2000) MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol.* 151:1169-1178
- Morrison E (2007) Action and interaction at microtubule ends. *Cell Mol Life Sci* 64:307–317
- Murphy D, Vallee R, G. Murphy D (1977) Identity and polymerization-stimulatory activity of the non-tubulin proteins associated with microtubules. *Biochemistry* 16: 2598-2605.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seine M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14:899-912.
- Olmsted J (1991). Non motor microtubule associated proteins. *Curr Op Cell Bio* 3: 52.58.
- Peris L, They M, Fauré J, Saoudi Y, Lafanechère L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, Wehland J, Andrieux A, Job D (2006) Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule ends. *J Cell Biol* 174:839-849.
- Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Ávila J, Cáceres A (1997) Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci* 110:257-270.
- Riederer BM, Barakat-Walter I (1992) Differential distribution of two microtubule-associated proteins, MAP2 and MAP5, during chick dorsal root ganglion development *in situ* and in culture. *Dev Brain Res* 68:111-123.
- Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:981-989.
- Sato-Yoshitake R, Shiomura Y, Miyasaka H, Hirokawa N (1989) Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* 3:229-238.
- Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol* 128:139-155.
- Trivedi N, Marsh P, Goold RG, Wood-Kaczmar A, Gordon-Weeks PR (2005) Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J Cell Sci* 118:993-1005.
- Togel M, Wiche G, Propst F (1998) Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* 143:695-707

Ulloa L, Ávila J, Díaz-Nido J (1993a) Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J Neurochem* 61:961-972.

Ulloa L, Diaz-Nido J, Ávila J (1993b) Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Embo J* 12:1633-1640.

Vallee R (1990). Molecular characterization of high molecular weight microtubule associated proteins: some answers, many questions. *Cell Motil Cytoskeleton* 15: 204-209.

Vandecandelaere A, Pedrotti B, Utton M, Calvert R, Bayley P (1996) Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motil Cytoskeleton* 35:134-146.

Villasante A, Wang D, Dobner P, Dolph P, Lewis SA, Cowan NJ (1986) Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol* 6:2409-2419.

Wehland J, Weber K (1987) Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on beta-tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J Cell Biol* 104:1059-1067.

Zauner W, Kratz J, Staunton J, Feick P, Wiche G (1992) Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur J Cell Biol* 57:66-74.