



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Efecto de proteínas secretadas de linfocitos infectados con HTLV-I sobre la fosforilación de proteínas motoras en células PC12 como modelo de cultivo neuronal

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Matías Mauricio Esteban Rivera Báez

Patrocinante y Director

Dr. Javier Puente Piccardo

Depto. Bioquímica y Biología Molecular

Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Director

Dra M Antonieta Valenzuela

Depto. Bioquímica y Biología Molecular

Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago de Chile 2013

Agradecimientos

En este momento cuando se acaba esta etapa y comienza una nueva, quisiera agradecer a las personas que han estado presentes en ella y me han brindado su ayuda, apoyo conocimiento y confianza.

A mis padres, Mauricio y Elizabeth, a quienes amo y quienes me han enseñado todo lo que sé de esta vida, y que con su ejemplo me han inculcado los mejores valores que una persona puede tener. A mis hermanos, Ignacio y Valentina, por apoyarme siempre y por amar a este hermano que no siempre ha sido el mejor. A mi familia, que a pesar de la distancia, siempre se ha sentido la cercanía de quienes se preocupan y quieren unos a otros.

A mis profesores, de quienes he obtenido el conocimiento que me permite desempeñarme en este querido mundo llamado Ciencia, la que me ha traído muchas satisfacciones, además de la oportunidad de conocer gente muy valiosa. Agradecer en especial a mi profesora-tutora Dra. María Antonieta Valenzuela (Profe Toña) de la cual he aprendido más de lo que cualquiera pudiese esperar, agradezco su confianza, su gran cariño, preocupación e infinita paciencia, para este pupilo que intentó dar lo mejor de sí. Agradezco también al Dr. Javier Puente, Dr. Mario Chiong y Dr. Alfonso Paredes por la revisión crítica de mi trabajo y sus importantes aportes y correcciones.

Con especial cariño al grupo Paraparesia Espástica (Para-Parade) y otros: Javy, Seba, Cris, Mae, Ñaño, (An)drés (Barr)iga, Fabián (Gerente), Andrés (igualado), Fannita y Fanny (Igualada 2), Sr. Molina, Sra. Leo y Dostora Alberti, quienes hicieron más que sólo apoyarme en mi trabajo y en actividades recreativas (Bellavista y otros). Gracias a todos uds. por permitirme conocerlos, ser su amigo y compañero, esperando no dejar de serlo. A Yeca y Paty, quienes me apoyaron mucho en todo momento y me ayudaron durante mi trabajo, les estoy profundamente agradecido a todos.

A mis compañeros de generación: Panchita, Gerardo, Daniel, Naty, Javy con quienes pasamos penas y glorias (más de lo primero que lo de lo segundo) durante años en la carrera, espero no dejar de verlos, ya que siempre han sido un pilar importante en mi decisión de continuar en esto.

A la Prof. Alicia Rodríguez y al grupo Aceite de Belly/Crudo de Salmón y otros: Mae, María de la Macarena, Andrea, Cata, Cristian por permitirme trabajar con uds, conocerlos y aprender algo nuevo, que finalmente es lo que siempre he querido hacer: aprender.

A mis amigos (ex-compañeros) de Bachi: Caro, Jorge, Sanae, Cami con quienes primero disfrute de la experiencia de la Universidad, muchas gracias por su cariño y apoyo.

A mis amigos de siempre: Nicolás(es) Escalona, Castro e Irrarázaval (Rara), Enrique, Raúl, Paulo, los cuales nunca terminaron de entender (excepto Enrique) que este trabajo nunca se trató de microalgas. Gracias por su amistad, cariño y apoyo de años pasados y futuros. Sé que tendrían que pasar muchos más para que nos aburramos unos de otros y espero que eso nunca ocurra.

A todos: Muchas gracias.

Financiamiento

El trabajo de investigación fue financiado por el proyecto **FONDECYT 1080396**, titulado “PAPEL DE LA PROTEINA VIRAL TAX EN LA PROGRESION DE LA PARAPRESIA LIGADA A HTLV-I Y SU ACCION EXTRACELULAR EN UN MODELO DE CULTIVO NEURONAL”.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág
Agradecimientos	ii
Financiamiento	iv
Tabla de contenidos	v
Índice de figuras	viii
Índice de Tablas	ix
Abreviaturas	x
1. Resumen	1
1.1 Abstract	3
2. Introducción	5
2.1. Enfermedades asociadas al virus HTLV-I	5
2.2. Características del retrovirus HTLV-I	6
2.3. Proteína Viral Tax	7
2.4. Transporte Axoplásmico	8
2.5. Características, regulación y alteraciones de kinesinas	10
2.6. Características, regulación y alteraciones de dineínas	12
2.7. Utilización de líneas celulares diferenciables a tipo neuronal como modelos de estudio de la Paraparesia	13
3. Hipótesis	17

4. Objetivos	17
4.1. Objetivo General	17
4.2. Objetivos Específicos	17
5. Materiales y Métodos	18
5.1. Reactivos	18
5.2. Material biológico	19
5.3. Mantenición de los cultivos celulares	19
5.4. Diferenciación de cultivos celulares PC12	20
5.5. Medición del largo neurítico	20
5.6. Efectos del medio condicionado de K562, MT2 y RPMI sobre el largo neurítico de los cultivos de PC12. Utilización de anticuerpos anti-Tax y anti-Gizzerosina.	21
5.7. SDS-PAGE y Western blot	22
5.8. Electroforesis en 2 dimensiones	23
5.9. Tinción de geles	24
5.10. Análisis estadísticos	24
6. Resultados	25
6.1 Objetivo 1. Determinar si Tax es uno de los productos virales secretados desde células linfocitarias infectadas que produce el efecto de retardo de crecimiento neurítico de PC12	25
6.2. Objetivo 2. Determinar los niveles proteicos de las subunidades asociadas al control de funcionalidad de kinesina KIF5 y dineína citoplasmática en células PC12 diferenciadas.	31
6.3. Objetivo 3. Estandarizar protocolos de separación de proteínas mediante electroforesis en 2 dimensiones y comparar el punto isoeléctrico de las subunidades (KHC, KLC y DIC) de proteínas motoras en células expuestas a productos secretados de linfocitos infectados con HTLV-I y células no infectadas.	34
6.3.1. Estandarización de la electroforesis en dos dimensiones.	34

6.3.2 Comparación de la migración relativa de kinesina y dineína en 2D	39
7. Discusión	43
8. Conclusiones	49
9. Referencias	50

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Genoma del retrovirus HTLV-I inserto en linfocitos T infectados en humano.	7
Figura 2. Representación esquemática de las proteínas participantes en el transporte axoplásmico.	10
Figura 3. Esquema de la estructura de kinesina 1 y dineína citoplasmática.	12
Figura 4. Regulación del transporte axoplásmico sus alteraciones.	14
Figura 5. Western blot para proteína viral Tax de medios condicionados de células MT2 y K562.	25
Figura 6. Imágenes representativas de cultivos PC12 durante la diferenciación sometidos a medios RPMI, medios condicionados MT2 y control K562.	27
Figura 7. Longitud neurítica/célula en PC12 durante la diferenciación en distintas condiciones.	28
Figura 8. Imágenes representativas de cultivos PC12 durante la diferenciación sometidos a medios RPMI, condicionados MT2, con y sin anticuerpos (anti-Tax; anti-GZ).	29
Figura 9. Longitud neurítica/célula en PC12 durante la diferenciación con presencia o ausencia de anticuerpo en distintas condiciones.	30
Figura 10. Western blot representativos de las proteínas kinesina y dineína en lisados celulares de PC12 diferenciadas sometidas a medios condicionados K562 y MT2 y medio RPMI durante 4 días.	32
Figura 11. Niveles relativos de subunidades de kinesina y dineína en el modelo PC12 durante la diferenciación.	33
Figura 12. Isoelectroenfoque y SDS-PAGE de proteínas estándares de punto isoelectrico.	35
Figura 13. Imagen representativa de electroforesis en 2D de líquido céfalo-raquídeo.	37
Figura 14. Electroforesis en 2D de cerebro de rata.	37
Figura 15. Imágenes representativas de electroforesis en 2D de lisados celulares de PC12.	38
Figura 16. Imágenes representativas de electroforesis en 2D de lisados celulares de PC12 en distintas condiciones del SDS-PAGE.	38
Figura 17. Electroforesis en 2D de lisado celular PC12 y el posterior Western blot.	40
Figura 18. Western blot de geles de dos dimensiones de subunidades de motores	41

moleculares en lisados de PC12 diferenciadas tratado o no con medio de MT2.
Figura 19. Gráficos de movilidad electroforética relativa en Western blot de 2D de proteínas en lisados PC12 al tercer día de diferenciación sometidos a medios condicionados de K562 y MT2. 42

Índice de tablas

	Pág
Tabla 1. Proteínas que conforman el estándar de isoelectroenfoco.	36

Abreviaturas

APP: Proteína precursora del amiloide
ATL: Leucemia de Células T del Adulto
BCA: Ácido bicinconánico
CDK5: Quinasa dependiente de ciclina 5
CRMP-2: Proteína mediadora de respuesta a colapsina-2
DNA: Ácido desoxiribonucleico
DMEM: Medio Mínimo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditioneitol
Dync: Dineína citoplasmática
GAPDH: Gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa
GSK3 β : Glicógeno sintasa quinasa 3 β
hrs: Horas
HAM: Mielopatía asociada al HTLV-I
HTLV-I: Virus linfotrópico humano tipo I
kDa: Kilodalton
KIF: miembro de la familia kinesina
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LTR: Secuencia terminal repetida larga
mAb: Anticuerpo monoclonal
MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos
min: minutos
NES: Señal de exportación nuclear
NGF: Factor de crecimiento neuronal
NLS: Señal de localización nuclear
PBS: Solución amortiguadora salina de fosfato
PMSF: Fenilmetilsulfonil fluoruro
RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
SD: Desviación Estándar
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SE: Suero equino
SEM: Error estándar de la media
SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

SUMO: Modificador pequeño tipo Ubiquitina

TBS-T: Solución amortiguadora salina de Tris con Tween-20

TEMED: Tetrametiletiléndiamina

TSP: Paraparesia espástica tropical

U.A.: Unidades arbitrarias

1. Resumen

El virus HTLV-I (Virus Linfotrópico humano Tipo I) es el agente etiológico de dos patologías principales, la Mielopatía asociada al HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), una axonopatía neurodegenerativa, donde existe falla en el transporte axonal y la Leucemia de células T del adulto (ATL). No se ha detectado infección por HTLV-I en neuronas, desconociéndose el mecanismo por medio del cual se produce la neurodegeneración en HAM/TSP. Puesto que el reservorio principal del virus son los linfocitos T CD4+, algunos productos virales secretados por estos linfocitos infectados infiltrados en el sistema nervioso central, podrían afectar vías de transducción de señales relacionadas con la reorganización de citoesqueletos y transporte axonal, produciendo el daño axonal de distal a proximal observado en pacientes HAM/TSP.

Los productos secretados por células MT2 (linfocitos infectados con HTLV-I) provocan retracción en células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas y disminuyen la velocidad de crecimiento neurítico en células PC12 durante su diferenciación a tipo neuronal. Entre las proteínas virales secretadas, se encuentra Tax, la disminución de la velocidad de crecimiento neurítico en células PC12, podría estar mediada por esta proteína viral a través de la vía transduccional que involucra a semaforinas y sus receptores Plexinas. Como un ejemplo, en el caso de Sema3A-Plexin A, un aumento de la actividad de Cdk5 causa hiperfosforilación de Tau y CRMP-2. El fallo en el transporte axoplásmico, podría explicarse por una desregulación de la fosforilación de las subunidades de los motores moleculares kinesina KIF5 y dineína citoplasmática Dync en este escenario.

En este trabajo, se propuso estudiar el efecto de los productos secretados desde linfocitos infectados que incluyen Tax sobre el proceso de diferenciación neuronal. Para esto, se utilizó la línea celular de feocromocitoma de rata, células PC12 diferenciables a tipo neuronal por acción de NGF. La Hipótesis planteada es la siguiente: “La exposición a productos secretados de linfocitos infectados por HTLV-I provoca un aumento en el estado de fosforilación de proteínas motoras en modelo neuronal de células PC12”.

El primer objetivo desarrollado, fue determinar si Tax es uno de los productos virales secretados desde medio de cultivo de células MT-2 responsable del efecto de retardo de crecimiento neurítico de PC12. La adición al cultivo celular de anticuerpos monoclonales anti-Tax mostró que se bloqueó este efecto de retardo de crecimiento, lo que apunta a que este efecto se debe a la acción de Tax presente en el medio de secreción de las células MT-2.

El segundo objetivo, contempló estandarizar protocolos de inmunodetección selectivos para determinar las subunidades asociadas al control de funcionalidad de kinesina KIF5 y dineína citoplasmática en células PC12. Los análisis por Western blot mostraron que las cantidades de las subunidades de kinesina KIF5 (cadena pesada y liviana) y dineína citoplasmática (cadena intermedia) presentes en las células PC12, no varían durante el período de diferenciación estudiado. Esto significa, que Tax no estaría alterando su expresión proteica.

El tercer objetivo planteado fue comparar el grado de fosforilación de las subunidades de proteínas motoras en células expuestas a productos secretados desde células MT-2 con la condición control con medio de cultivo de la línea celular K562. Al no disponer de anticuerpos contra las formas fosforiladas de estas proteínas motoras, se procedió a separarlas mediante la técnica de electroforesis de geles en dos dimensiones. Este objetivo requirió inicialmente estandarizar esta técnica y luego se emplearon las muestras de lisados de PC12 provenientes del tercer día de diferenciación que habían sido sometidas al medio condicionado MT-2 y al de K562. Estos análisis no mostraron diferencias significativas en las migraciones electroforéticas, que podrían dar cuenta de cambios del estado de fosforilación de estas subunidades motoras.

No obstante, estos resultados no se puede descartar que existan diferencias en el grado de fosforilación de las subunidades de estos motores moleculares, puesto que las diferencias en el grado de fosforilación pueden ser muy menores para ser observadas como cambios en la migración electroforética. Se debiera usar un método inmunológico más sensible empleando anticuerpos que reconozcan fosforilaciones determinadas estas proteínas.

1.1 Abstract

Effect of secretable proteins from HTLV-I infected lymphocytes on phosphorylation of motor proteins in PC12 cells as a model of neuronal culture

HTLV-I virus (Human T-cell lymphotropic virus type I) is the etiologic agent of two main pathologies, the Myelopathy associated to HTLV-I/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP), a neurodegenerative axonopathy with impairment of axonal transport, and the Leukemia of adult T-cells (ATL). No infection in neurons has been detected, being unknown the mechanisms of the neurodegeneration in HAM/TSP. Lymphocytes T-CD4⁺ represent the main reservoir of the virus. Therefore, some secreted products from these infected lymphocytes infiltrated into the central nervous system could produce alteration of signal transduction pathways related with cytoskeletons and axonal transport, thus accounting for the distal to proximal axonal damage observed in HAM/TSP patients.

Secreted products from MT-2 cells (HTLV-I infected lymphocytes cell line) produce retraction in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells and reduced the rate of neurite growing during PC12 cell differentiation to neuronal type. Among the viral secretable proteins is Tax, hence, the reduction of PC12 neurite growing could be mediated by this viral protein through transduction signalings that involves semaphorins and their receptor Plexins. As an example, in the case of Sema3A-Plexin A, an increase in Cdk5 activity causes Tau and CRMP-2 hyperphosphorylations. The failure of axonal transport could be explained by deregulation of phosphorylation of molecular motor subunits kinesin KIF5 and cytoplasmatic dynein Dync.

In this work it was proposed to study the effect of secreted products, including Tax, from infected lymphocytes on the neuronal differentiation process. We employed the rat pheochromocytoma cell line, PC12 cells during NGF-differentiation to neuronal type. The Hypothesis stated expresses that: "Exposure to secreted products from HTLV-I infected lymphocytes causes an increase in the phosphorylation state of motor proteins in a neuronal model of PC12 cells"

The first goal developed was to determine if Tax was one of the viral secreted products to the culture medium of MT-2 cell line responsible of retardation of PC12 neurite growing. Addition to the cell culture monoclonal antibodies anti-Tax blocked the effect on retardation

rate of neurite growing, this pointed to the action of Tax present in the secretion medium of MT-2 cells.

The second goal consisted in the standardization of selective protocols for immunodetection of subunits associated with the functional control of kinesin KIF5 and cytoplasmic dynein present in PC12 cells. Western blots analyses showed that levels of kinesin KIF5 (heavy and light chains) and cytoplasmic dynein (intermediate chain) present in PC12 cells did not change during the followed period of differentiation. This result suggests that their protein expression is not altered by Tax.

The third goal included the comparison of phosphorylation levels of the subunits of the motor proteins exposed to MT-2 cell secreted products with the control condition with K562 cell line medium. Due to non-availability of the antibodies against phosphorylated forms of motor proteins, we separated them by two-dimensional gel electrophoresis. This goal initially required the standardization of the technique, and then PC12 lysates obtained at third day of differentiation in the presence of either MT-2 or K562 cell culture medium were used. These analyses did not show significant differences in the electrophoresis migrations of KIF5 and dynein that could account for changes in the phosphorylation levels of these subunits of motor proteins.

In spite of our results, it cannot be discarded the existence of differences in the phosphorylation degree of the molecular motor subunits because the differences in the phosphorylation degree could be minors and undistinguishable by electrophoretic migration changes. Thereby, it should be used more sensitive immunological methods employing antibodies capable of distinguish motor proteins phosphorylations.

2. Introducción

2.1. Enfermedades asociadas al virus HTLV-I.

El virus de la leucemia humana de células T tipo 1 (HTLV-I, *Human T cell leukemia virus type 1*) fue el primer retrovirus identificado como agente etiológico de cáncer en humanos (Gallo, 2011). Este virus, además de ser responsable de la leucemia de células T en adulto (ATL), es responsable de otras patologías como la Mielopatía Asociada al HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) (Gessain y cols, 1992; Cartier y cols, 1997), al igual que a otras de tipo inflamatorias como dermatitis, uveítis, artritis, polimiositis y síndrome de Sjögren (Eguchi y cols, 1992; Araya y cols, 2011).

Se estima que entre 15 a 40 millones de personas se encuentran infectadas en el mundo, siendo un virus endémico en países como Japón, algunas regiones de África y el Caribe, Medio Oriente y en América Central y del Sur (Proietti y cols, 2005, Lairmore y cols, 2011). En Chile, la seroprevalencia del virus alcanza el 0,5% (Cartier y cols, 2007). De ésta, los individuos infectados que desarrollan el HAM/TSP corresponden a un 0,25-3% (Cartier y cols, 1992, 1997). Destaca la alta prevalencia de infección que existe en pueblos originarios chilenos que alcanza entre el 1 y 6,5% (Cartier y cols, 1993; Vásquez, 2003; Verdonck y cols, 2007).

La paraparesia espástica tropical, se caracteriza por ser una enfermedad de progresión lenta y crónica, causando degeneración y desmielinización de las neuronas motoras corticales (haces corticales), que hacen sinapsis a nivel de la medula dorso-lumbar. Los pacientes presentan espasticidad en los músculos proximales de las extremidades inferiores (Buczynski y cols, 2001; Zaninovic, 2001, Kettlun y cols, 2003), conservando movilidad de manos y brazos, lo que implica un patrón distal en el compromiso axonal, presentando además hiperreflexia y debilidad muscular. Los estudios histológicos revelan lesiones relativamente simétricas en el haz piramidal con pérdida de axones y mielina sin compromiso del soma neuronal, volviéndose aún mayor en las regiones dorsales y lumbares. El signo de Babinski y vejiga neurogénica entre otros, también son característicos de esta enfermedad (Cartier y cols, 1999; Godoy y cols, 1995).

2.2. Características del retrovirus HTLV-I.

El genoma del HTLV-I (**Fig 1**), al igual que la gran parte de los retrovirus, posee regiones genómicas conocidas como *gag*, *pol* y *env* y secuencias terminales repetidas largas (LTRs) (Gallo y cols, 2005; Rafatpanah y cols, 2006). La particularidad de este virus es que posee una región adicional llamada *pX*. *Gag* codifica para proteínas core p19 y p21, *pol* para una DNA polimerasa dependiente de RNA y *env* para una glicoproteína transmembrana gp21 y una envoltura externa gp46. La zona *pX* codifica para las proteínas Tax, Ref, Tof, Rof y posiblemente otras que son producto del procesamiento alternativo del mRNA (Rafatpanah y cols, 2006). Este virus infecta principalmente linfocitos del tipo T CD4+ y en menor grado linfocitos T CD8+ aunque, se ha demostrado *in vitro* que también puede infectar linfocitos B, macrófagos y astrocitos (Franchini y cols, 1995; Méndez y cols, 1997). Para este proceso, se requiere del contacto célula-célula, facilitado por la interacción con dos glicoproteínas de superficie viral ubicadas en la membrana plasmática de las células infectadas: la proteína de envoltura gp46 y la proteína transmembrana gp21. Estas glicoproteínas median la formación de una sinapsis virológica entre linfocitos infectados y linfocitos libres del virus (Derse y Heidecker, 2003; Igakura y cols, 2003; Pais-Correia y cols, 2010).

El mecanismo de entrada del virus desde una célula infectada a otra no infectada aún es incierto, pero se ha demostrado que el virus se transmite por medio del contacto célula-célula (entre linfocitos T), seguido de la transferencia del genoma viral a la célula receptora. Se considera además, que el aporte de viriones es mínimo, ya que la producción de estos por los linfocitos infectados es bajísima, y de estos solo una millonésima parte llega a ser infectivo (Igakura y cols, 2003). Posteriormente, la amplificación de la infección se produce por expansión clonal de las células infectadas (Van Doren y cols, 2004; Tanaka y cols, 2005).

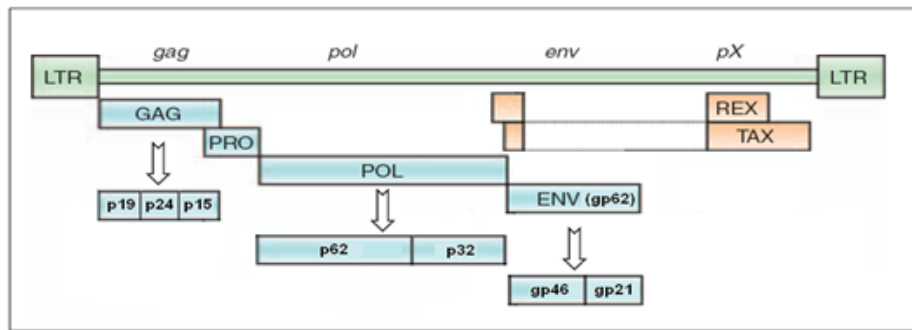
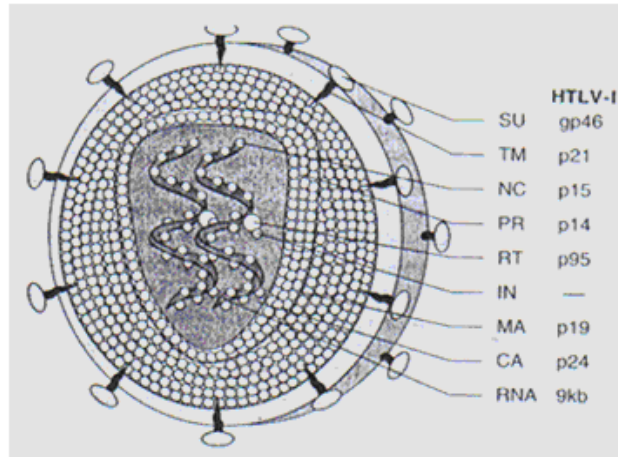


Figura 1. Genoma del retrovirus HTLV-I inserto en linfocitos T infectados en humano. El genoma del HTLV-I contiene genes comunes de los retrovirus (*gag*, *pol*, *pro* y *env*) que codifican proteínas estructurales y enzimáticas. Además poseen una región *pX* exclusiva de este virus que codifica principalmente las proteínas regulatorias Tax y Rex (rojo) (Modificado de Boxus y col., 2009).

2.3. Proteína viral Tax.

Tax corresponde a una fosfoproteína de 40 kDa, responsable de la activación de las secuencias LTRs virales y de la modulación de la transcripción de genes celulares que codifican para diversas interleuquinas y sus receptores (Mogensen y Paludan, 2001; Chiari y cols, 2004; Durkin y cols, 2006). Esta proteína, se encuentra asociada también con el aumento de la expresión de factores de transcripción y de proteo-oncogenes y con la represión de la expresión de genes que participan en la reparación del DNA y apoptosis, generando un ambiente propicio para la transformación de células T (Barmak y cols, 2003; Marriott y Semmes, 2005). Tax se encuentra localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células infectadas y es capaz de ser transportada entre estos dos compartimentos (Kashanchi y Brady, 2005; Kfoury y cols, 2012). Esto se debe en parte a la presencia de una señal de exportación nuclear rica en

leucina (NES) y una señal de localización nuclear (NLS) en la zona amino terminal (Chiari y cols, 2004; Jain y cols, 2007).

Se han descrito varios tipos de modificaciones postraduccionales para esta proteína viral, además de la fosforilación que se relaciona directamente con la activación de vías de señalización CREB y NF-κB. Se ha observado acetilación de residuos aminoacídicos necesaria para la activación de esta última vía, así como ubiquitinación y sumoilación (Peloponese y cols, 2004; Wycuff y Marriot, 2005; Journo y cols, 2009; Bidoia, 2012). Tax ubiquitinada se encuentra involucrada en la regulación de la actividad del proteosoma y de la vía de señalización de NF-κB. Por otro lado, se sabe que la sumoilación de Tax se encuentra relacionada con su localización intracelular, puesto que se presenta modificada de esta manera exclusivamente en el núcleo (Peloponese y cols, 2004).

La presencia de Tax secretada al plasma y su existencia en el LCR de pacientes con HAM/TSP (Cartier y Ramírez, 2005; Godoy, 2011) sumado a la presencia de anticuerpos contra Tax en la mayoría de los pacientes infectados con HTLV-I, demuestra que Tax secretada está disponible para el reconocimiento y acción del sistema inmune y posiblemente para mediar efectos extracelulares deletéreos sobre otros tipos celulares no infectados. Además, se ha demostrado la secreción de Tax en células transfectadas con el gen *Tax* (Alefantis y cols, 2005).

En el año 2003, Ramírez y cols llevaron a cabo un estudio en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con paraparesia espástica progresiva, encontrando la presencia de un provirus HTLV-I deficiente en algunos pacientes seronegativos, esto debido a la amplificación de productos génicos de *Tax* y *env/Tax*, lo que sugiere un rol patogénico del mismo. Estos resultados hacen pensar que esta proteína viral podría ser, al menos en parte, responsable del daño observado en el SNC (sistema nervioso central) en los haces córticoespinales.

2.4. Transporte axoplásmico.

Las neuronas son células altamente polarizadas con dos dominios molecular y funcionalmente distintos, el axón y las dendritas junto con el soma (Conde y Cáceres, 2009). Las

dendritas son principalmente cortas y se encuentran en gran número en una sola célula nerviosa, las cuales están especializadas en recibir señales neuroquímicas. El axón por su parte tiene una estructura delgada y frecuentemente muy extensa por donde se transmiten las señales generadas desde el soma. La gran mayoría de las proteínas y precursores necesarios para los procesos axonales, se sintetizan en el soma cerca del núcleo y deben ser transportados a lo largo del axón hasta el cono axonal/neurítico, que en el caso de los haces córticoespinales corresponden a motoneuronas de más de un metro (Duncan y Goldstein, 2006; Hirokawa y cols, 2010). A su vez, el transporte retrógrado se requiere para el ingreso de señales fisiológicas desde el exterior al núcleo.

Un número importante de desórdenes neurodegenerativos presentan defectos en genes que codifican para proteínas involucradas de manera directa en el transporte axonal. Una característica de enfermedades donde existe daño axonal y desmielinización es la acumulación de la proteína precursora del amiloide (APP, amyloid precursor protein) lo que se ha descrito como marcador de falla en el transporte anterógrado, debido a que es transportada desde el soma hacia las regiones distales del axón por kinesinas (Coleman, 2005; De Vos y cols, 2008; Tang y cols, 2009). La acumulación de esta proteína en cortes histológicos de pacientes de HAM/TSP apoya la existencia de una falla en el transporte, como parte de la patogenia de esta enfermedad (Cartier y cols, 1997). La HAM/TSP presenta semejanzas clínicas e histológicas con la Paraparesia Espástica Familiares o Hereditaria (Evans y cols, 2006; Park y cols, 2010; Blackstone, 2012), en las cuales su origen se asocia a mutaciones en distintas proteínas que perturban el transporte axoplásmico, sugiriendo también una patogenia de esta índole en pacientes HAM/TSP.

En el transporte axoplásmico (**Fig 2**) se encuentran involucrados los motores moleculares asociados a sus rieles o citoesqueleto de microtúbulos, encontrándose entre los motores al menos tres superfamilias: kinesinas, dineínas y miosinas (Conde y Cáceres, 2009; Hirokawa y cols, 2009 y 2010).

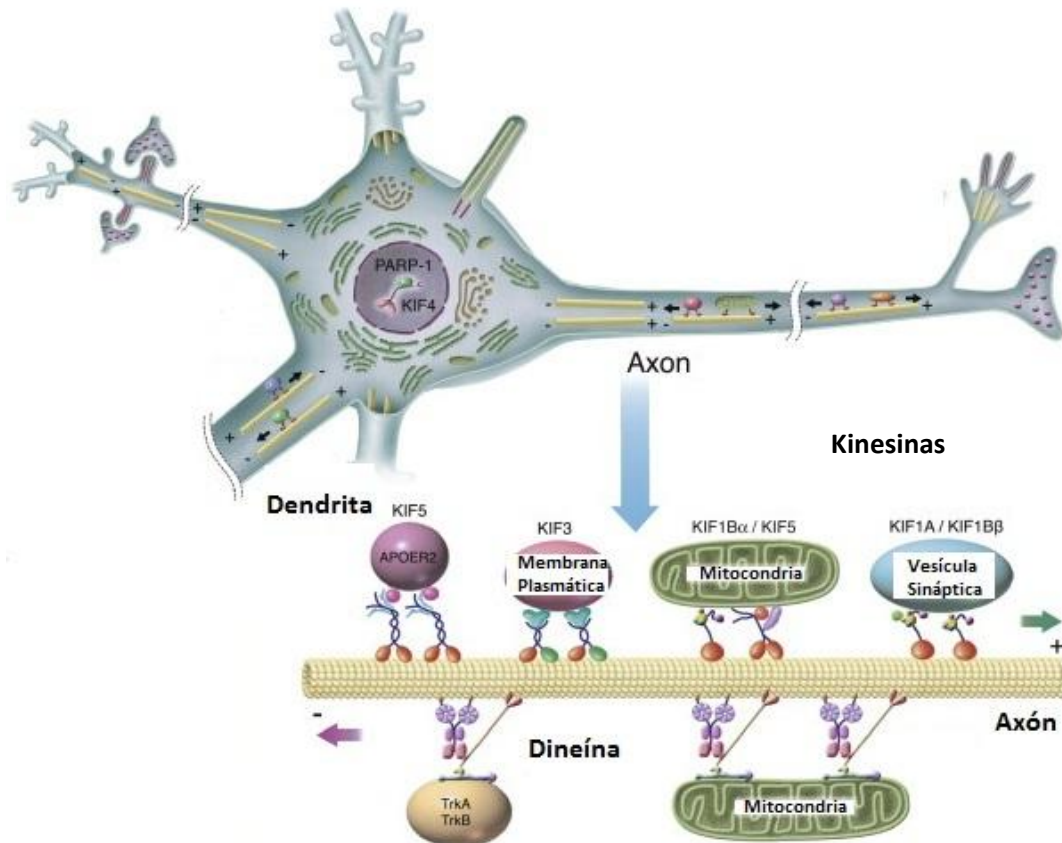


Figura 2. Representación esquemática de las proteínas participantes en el transporte axoplásmico. Esquema representativo de los diferentes motores moleculares (kinesinas, dineína) presentes en las células del SNC, encargadas del transporte de cargas (vesículas, receptores, organelos, entre otros) a lo largo del axón y las dendritas. (Modificado de Hirokawa y cols, 2010).

2.5. Características, regulación y alteraciones de kinesinas.

Las kinesinas comprenden 15 familias, de entre ellas, la familia kinesina-1 (**Fig 3**) correspondiente a la primera en ser identificada y la más abundante en mamíferos (Hirokawa y cols, 2008) de la cual se conocen 3 subtipos: Kinesina 5A (KIF5A), Kinesina 5B (KIF5B) y Kinesina 5C (KIF5C). Mientras que KIF5B es expresada de forma ubicua, KIF5B y KIF5C son neurona-específicos.

Dentro de la célula, el 50% de las proteínas KIF5 presentes se encuentran formando tetrámeros, al unirse un homo o hetero-dímero de cadena pesada de kinesina (KHC) y un homodímero de cadena liviana de kinesina (KLC), ya sea en esta conformación o en una

conformación libre de KLCs (Gyoeva y cols, 2004). KIFs pueden unir cargos que transportan elementos hacia el axón y botón sináptico, así como organelos de manera anterógrada y en menor medida de manera retrógrada. Estas proteínas presentan un dominio motor el cual utiliza energía química (ATP) que provoca cambios conformacionales que generan fuerza motriz al unirse a microtúbulos y un dominio de cola que une cargos (Khodjakov y cols, 1998; Gyoeva y cols, 2004).

En ausencia de cargos, la actividad de las kinesinas debe estar fuertemente controlada para evitar el uso fútil de energía. Hay estudios recientes que han mostrado que estas proteínas pueden adoptar conformaciones extendidas (funcionales) y compactas, plegadas (inactivas), donde el dominio de cola se une al dominio motor impidiendo la hidrólisis de ATP y la unión a microtúbulos (Kirchner y cols, 1999; Conde y Cáceres, 2009). Por otra parte, se ha introducido el concepto de que la fosforilación de las proteínas motoras sería otro mecanismo de control de tráfico (Lee y Hollenbeck, 1995; Morfini y cols, 2002a). Las kinesinas son fosfoproteínas por lo que los estados de esta modificación pueden regular su función de dos maneras, la primera, a través de la unión y liberación de cargos y la segunda, la unión o desunión a microtúbulos.

La función de KIF5 puede ser modulada por fosforilación mediada por proteína quinasa A (PKA) y GSK-3 β (Morfini y cols, 2002b). Se ha sugerido, que JNK también puede fosforilar estos tipos de motores moleculares. Así como las fosfatasas PP1 y PP2 que pueden regular desfosforilando (Morfini y cols, 2004). GSK-3 β puede provocar fosforilaciones en KIF5 y evitar su unión a microtúbulos, la fosforilación de la cadena liviana de las kinesinas 5 mediada por esta quinasa provoca la liberación de cargos. La cadena pesada posee un dominio motor (Hirokawa y Noda, 2009) el cual transita entre dos estados: unido a ATP, lo que provoca un cambio conformacional de la región de unión que le permite unirse a protofilamentos en los microtúbulos, y un siguiente estado provocado por la desfosforilación a ADP y liberación de fosfato al medio, lo que resulta en un estado conformacional con menor afinidad por los microtúbulos. Este motor es altamente procesivo, hidrolizando más de 100 moléculas de ATP y traslocando a través del microtúbulos sucesivamente antes de separarse completamente, debido a que las subunidades monoméricas se liberan de los microtúbulos después de cada

ciclo, la dimerización es esencial para el movimiento a mayor distancia sobre los microtúbulos (Hancock y Howard, 1998, 1999).

Los estudios en ratas muestran que el *knock out* de genes *kif5* es esencial para el correcto desarrollo del sistema nervioso (Karle y cols, 2012). Uno de los tipos de mutaciones encontradas en la Paraplegia Espástica Hereditaria es una mutación sin sentido de KIF5A (Reid y cols, 2002; Fichera y cols, 2004; Blair y cols 2006; Musumeci y cols 2011).

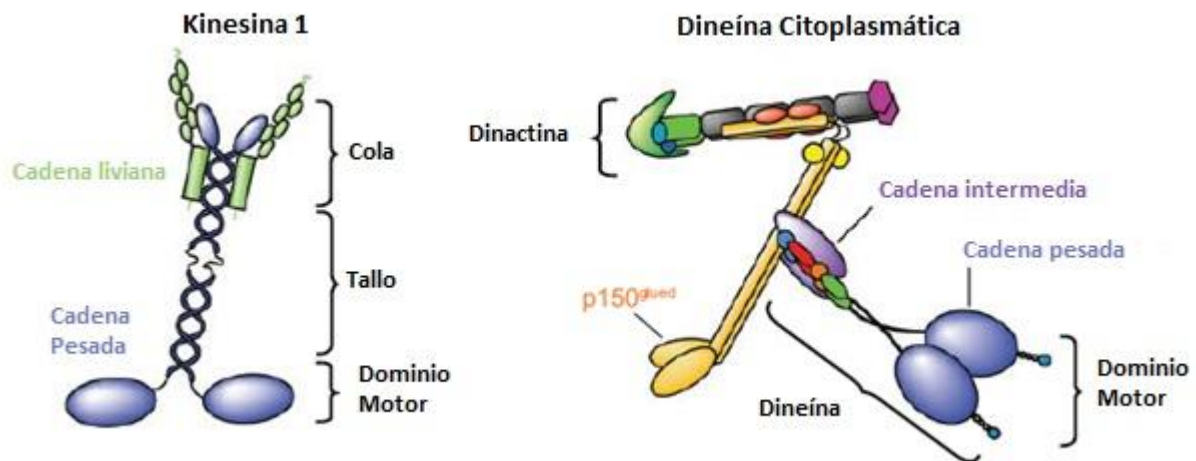


Figura 3. Esquema de las estructuras de Kinesina 1 y Dineína citoplasmática. Esquema que representa las estructuras y principales subunidades de la familia de kinesina-1 y dineína citoplasmática. Se observan las subunidades cadena pesada y liviana de la kinesina y la cadena intermedia de la dineína (Modificado de De Vos y cols, 2008).

2.6. Características, regulación y alteraciones de dineínas.

La superfamilia de dineínas comprende dos grupos principales, dineínas citoplasmáticas y dineínas axonémicas (Hirokawa y cols, 2010). Ambas corresponden a mecano-enzimas que se mueven a través de los microtúbulos por hidrólisis de ATP. Comparado con la diversidad existente en la superfamilia de kinesinas, las de dineínas citoplasmáticas (**Fig 3**) tienen sólo 2 miembros en la familia de cadenas pesadas, cadena pesada 1 de dineína citoplasmática (Dync1h1) y cadena pesada 2 de dineína citoplasmática (Dync2h1) (Tanaka y cols, 1995). Se sabe que sólo Dync1h1 se encuentra involucrada en el transporte retrógrado en el axón, ésta dineína puede unirse a distintos tipos de cargos ya sea mediante unión directa o el

reclutamiento de formas alternativas de subunidades como cadenas intermedias, ligeras y complejos con dinactina (Hirokawa y cols, 2010).

El proceso de fosforilación controla la función de dineínas en diversos sistemas móviles basados en microtúbulos de distintos organismos, así como en estructuras axonémicas (cilios y flagelos). La implicancia de esta forma de control en las funciones de otras proteínas encargadas del transporte como las mismas kinesinas permite suponer que la fosforilación puede controlar las funciones de las dineínas en neuronas. A través de estudios de fosforilación *in vivo* utilizando P^{32} (ortofosfato) en el SNC de modelo murino se determinó que todas las subunidades de la dineína citoplasmática neuronal se fosforilaban. A su vez la incorporación de ATP^{32} (derivado del P^{32}) en la subunidad motora de dineínas en zonas distales del axón, se encontraban menos fosforiladas que aquellas detectadas en tejido nervioso completo, dando cuenta de la regulación de la actividad motora de dineínas por medio de fosforilación (Dillman y Pfister, 1994). Se ha observado además, que estos motores moleculares son desfosforilados por fosfatasas, específicamente PP2, y la inhibición de actividad de ésta conlleva una menor actividad ATPasa de la dineína y la pérdida de la capacidad de unir cargos (Runnegar y cols, 1999).

2.7. Utilización de líneas celulares diferenciables a tipo neuronal como modelos de estudio de la Paraparesia.

Estudios previos del grupo de Laboratorio en un modelo de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, muestran una posible desregulación en la fosforilación/desfosforilación de componentes involucrados en el remodelado y estabilización del citoesqueleto neurítico como las proteína Tau y CRMP-2 (Collapsin response mediator protein-2) (Maldonado y cols, 2008, 2011; Reyes, 2011). En ambos casos hay una hiperfosforilación en presencia de medio de cultivo de células MT-2 que corresponden a una línea celular linfocitaria infectada con HTLV-I (Kobayashi y cols, 1984). Tau es la principal proteína asociada a microtúbulos, que se distribuye a lo largo del axón, cuya función es promover la polimerización y estabilización de estos a través de su interacción con tubulina (Avila y cols, 2004; Liu y cols, 2007). CRMP-2 se distribuye en la parte distal del axón en crecimiento regulando el ensamblaje de microtúbulos y

filamentos de actina, y es una proteína mediadora de la respuesta a la colapsina o semaforina (Deo y cols, 2004; Fukata y cols, 2002; Brown y cols, 2004; Chae y cols, 2009).

Las funciones de estabilización y remodelado del citoesqueleto de microtúbulos y de microfilamentos de actina se encuentran moduladas principalmente por fosforilaciones sitio-específicas. Es por esto, que la alteración de actividades quinásicas y fosfatásicas se ha asociado a fosforilaciones anormales de Tau y CRMP-2 en enfermedades neurodegenerativas (**Fig 4**) como en el Alzheimer, Esclerosis Múltiple, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. En estas enfermedades Tau se encuentra hiperfosforilada (Buee y cols, 2000; Liu y Wang, 2009; Hanger y cols, 2009; Rudrabhatla y Pant, 2011).

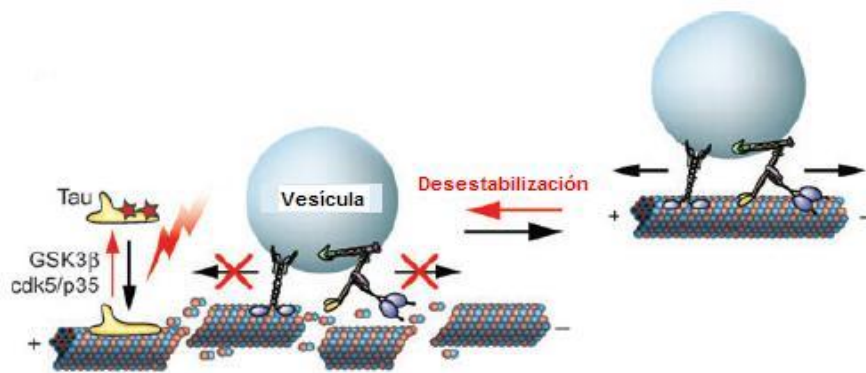


Figura 4. Regulación del transporte axoplásmico sus alteraciones. Los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas siendo este comportamiento regulado por diversos mecanismos. La desregulación de estos mecanismos puede llevar a la pérdida del transporte axonal normal, como es el caso de la hiperfosforilación de tau mediada por GSK3β y cdk5 que lleva a una desestabilización de estos (Modificado de De Vos y cols, 2008).

En muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con HAM/TSP y en células SH-SY5Y diferenciadas a tipo neuronal expuestas a productos virales del HTLV-I (medio de cultivo de células MT-2), donde hay retracción neurítica, se ha encontrado un aumento en la fosforilación de Tau en el residuo de T¹⁸¹ y CRMP-2 en el residuo de S⁵²² (Maldonado y cols; 2008, 2011). Estos resultados sugieren un aumento en la actividad de la Cdk5 presente mayoritariamente en el sistema nervioso que al aumentar las fosforilaciones anómalas puede producir retracción o alterar el crecimiento neurítico de células neuronales. En células SH-SY5Y se encontró efectivamente que la retracción neurítica, se asociaba a un aumento en la actividad de esta

enzima (Maldonado y cols, 2011). Por otra parte, en el Laboratorio se han realizado estudios con células PC12, donde se observó que los productos virales del HTLV-I producen una disminución de la diferenciación a tipo neuronal, reduciendo la velocidad del crecimiento neurítico. Se encontró también una mayor fosforilación de CRMP-2 en S⁵²² (Pando, 2010; Reyes, 2011).

El proceso de desarrollo y crecimiento axonal está controlado por señales extracelulares tanto positivas como negativas. Las familias de las semaforinas constituyen señales de colapso durante el desarrollo axonal y éstas interactúan con las células blanco a través de los receptores Plexina y Neuropilina (Mitsui y cols, 2002). El receptor Plexina A tiene un sitio fosforilable en tirosina por las quinasas que incluye Fer/Fes y Fyn que participan en la señalización en respuesta a semaforinas aumentando la fosforilación de Cdk5, la cual a su vez fosforila CRMP-2, que es parte de esta vía de señalización (Inagaki y cols, 2001; Ito y cols, 2006). CRMP-2 fosforilada en el residuo de S⁵²² disminuye su afinidad por los dímeros de tubulina provocando colapso del crecimiento del cono axonal (Arimura y cols, 2005; Rembutsu y cols, 2008; Hou y cols, 2009; Crews y cols, 2011). En enfermedades como el Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob y Encefalitis asociada al VIH se ha visto un aumento de la actividad en Cdk5 (Uchida y cols, 2005; Cole y cols, 2008; Petratos y cols, 2008; Crew y cols, 2011).

Además del aumento de fosforilación de proteínas asociadas a la formación de citoesqueleto que puede alterar sus estructuras, también podría encontrarse alterada la funcionalidad de proteínas motoras por un aumento en su grado de fosforilación. Con los antecedentes expuestos, en este trabajo se ha decidido continuar con el modelo celular de PC12 para determinar por una parte, si es la proteína viral Tax la que extracelularmente produce los efectos observados en líneas celulares y por otra, estudiar si las proteínas motoras kinesina y dineína se encuentran desreguladas por un aumento en su grado de fosforilación.

Todos estos resultados permiten proponer un modelo de acción de algún producto viral, presumiblemente de Tax, el cual se secretaría de los linfocitos asociada, probablemente asociado a semaforinas (Alberti, 2012), aumentando el efecto negativo de estas señales sobre el desarrollo del cono axonal. Esta vía da cuenta de la mayor actividad de Cdk5, enzima

responsable de la hiperfosforilación tanto de tau T¹⁸¹ como de CRMP-2 S⁵²², mediada por la fosforilación de esta quinasa en Y¹⁵ a través de Fyn.

3. Hipótesis

La exposición a productos secretados de linfocitos infectados por HTLV-I provoca un aumento en el estado de fosforilación de proteínas motoras en modelo neuronal de células PC12.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Describir los cambios en el grado de fosforilación de subunidades asociadas al control de la función de KIF5 y de dineína citoplasmática (DC) y asociarlos a la retracción observada en células tipo neuronal expuestas a productos de linfocitos infectados con HTLV-I.

4.2. Objetivos específicos

1.- Determinar si Tax es uno de los productos virales secretados desde células linfocitarias infectadas que produce el efecto de retardo de crecimiento neurítico de PC12.

2.- Determinar los niveles proteicos de las subunidades asociadas al control de funcionalidad de kinesina KIF5 y dineína citoplasmática en células PC12 diferenciadas.

3.- Estandarizar protocolos de separación de proteínas mediante electroforesis en 2 dimensiones y comparar el punto isoeléctrico de las subunidades de proteínas motoras en células expuestas a productos secretados de linfocitos infectados con HTLV-I y células no infectadas(control).

5. Materiales y Métodos

5.1 Reactivos

Abcam Inc, Cambridge, Inglaterra: Anticuerpo monoclonal (6C5) contra GAPDH (Cat. ab8245).

Alamone Labs, Jerusalem, Israel: Mouse Nerve Growth Factor 2.5S, N-100.

Amresco, Solon, Ohio, USA: N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina, TEMED (Cat. 0761).

BD, Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France: Multiwell™ 24 well (Cat. 353047), Tissue Culture Dish (Cat. 353003).

Biorad, Hercules, Ca, USA: Trans-Blot® Transfer Medium Pure Nitrocellulose (0,45µm) (Cat. 162-0115).

GE Healthcare Bio-Science Corp, NJ, USA: 2-D Clean-Up Kit (Cat. 80-6484-51), Immobiline DryStrip pH 3-10NL, 7 cm (Cat. 17-6001-12), IPG Buffer pH 3-10 NL (Cat. 17-6000-88), DeStreak Rehydration Solution (Cat. 17-6003-19).

Merck, Darmstadt, Alemania: Metanol, ácido acético, etanol, butanol, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, persulfato de amonio.

NIH, AIDS Reagent Program, Germantown, MD, USA: Hibridoma: "HTLV-I Tax Hyb 168A51-2" (Cat. 1316). Líquido ascítico anti-Tax producido a partir de hibridoma: "HTLV-I Tax Hyb 168A51-2".

PancReac, Barcelona, España: Dimetil sulfóxido.

Pierce, IL, USA: Anticuerpo secundario contra ratón conjugado con peroxidasa. Inmuno-Pure® Goat Anti Mouse IgG (H+L), Peroxidase Conjugated (Cat. 1452); anticuerpo secundario contra conejo conjugado con peroxidasa. Inmuno-Pure® Goat Anti Rabbit igG (H+L), Peroxidase Conjugated (Cat. 31462); CL-Xposure™ film RX-B (Cat. 34090); Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit, Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Chemiluminescent Substrate (Cat. 34095); Gelcode Blue stain (Cat. 1860957).

Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover, Germany: Azul de bromofenol.

Roche, Basilea, Suiza: PhosStop® Phosphatase inhibitor cocktail tablets (Cat. 04 906 845 001); Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, 04 693 124 001.

Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA: Anticuerpo contra cadena intermedia de La dineína citoplasmática. Dynein IC1/2, cytosolic Antibody (74-1) (Cat: sc-13524).

Sigma-Aldrich, Inc, Saint Louis, Mo, USA: Dulbecco's Modified Eagle Medium, High glucose. (Cat. D1152), acrilamida, bisacrilamida, SDS, azul de Coomassie R 250, azul de Coomassie G520, NONIDET P-40, ditioneitol (DTT), iodoacetamida, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), β -mercaptoetanol, Triton X-100, TEMED, aceite mineral.

US Biological, Swanpscott, MA, USA: Tween 20, 9005-64-6, Trizma base, glicina.

5.2 Material Biológico

El material biológico empleado consistió en cerebros de rata (*Mus musculus*), donados por la Dra. Monika Greiner, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Líneas celulares linfocitarias MT-2 y K-562, donadas por el Dr. Eugenio Ramírez, Programa de virología, ICBM, Facultad de Medicina y Departamento de Virología, Instituto de Salud Pública. Línea celular PC12, donadas por la Dra. Francisca Bronfman, Facultad de Biología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

5.3. Mantención de los cultivos celulares

Las células PC12 se mantuvieron desdiferenciadas y en proliferación en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) con 6% de SBF (suero fetal bovino) y 6% de SE (suero equino) y mantenidas en condiciones controladas a 37°C y 5% de CO₂. Una vez alcanzada una confluencia del 80%, las células se removieron con tripsina de la placa suspendiéndolas en medio de cultivo, algunas alícuotas se sometían a diferenciación y otras se congelaban en SBF con DMSO (dimetilsulfóxido) al 10% v/v a -60°C a razón de 2×10^6 células/mL. El descongelamiento de células se realizó diluyendo la alícuota congelada en medio de cultivo seguida de una centrifugación a 2000 x g por 5 min a temperatura ambiente y la pella se resuspendió en DMEM con 6% SFB y 6% de SE, cultivándose en placas.

Se utilizaron dos líneas celulares humanas, la línea linfocitaria MT2 que posee el provirus del HTLV-I y la línea celular de una eritroleucemia K562 no infectada. Ambas se mantenían en RPMI 1640 con 10% de SFB. Los medios condicionados, se obtuvieron al cultivar 1×10^6 células/mL durante 7 días sin recambio de medio de cultivo, filtrando posteriormente el medio antes de su aplicación sobre los cultivos de PC12.

5.4. Diferenciación de cultivos celulares PC12

Se sembraron aproximadamente 90.000 células PC12 por pocillo en placas de 24 pocillos sin matriz y con medio DMEM, 6% de SFB y 6% de SE. La diferenciación a tipo neuronal se indujo mediante la adición al medio de 50 ng/mL de NGF (nerve growth factor) y disminución gradual del porcentaje de ambos sueros desde el 6% al 0% durante cuatro días (Kwon y cols, 2002; Pando, 2010).

5.5. Medición del largo neurítico

Las células diferenciadas se examinaron en microscopio óptico de fase invertida obteniéndose fotografías digitales de estas. Se fotografiaron 6 campos alrededor de cada pocillo de cultivo con un aumento de 20X y se fotografiaron 3 pocillos por cada condición (MT2, K562 y RPMI) durante el mismo experimento. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado independiente. El largo neurítico de cada neurita primaria más larga se midió con el programa “NIH ImageJ-1.38d program plug in NeuronJ”. Se contaron entre 20 a 40 neuritas por campo fotografiado y solo se contaron aquellas a las cuales se les observaba inicio desde el cuerpo celular, que fueran de largo superior a este y se les observara el final.

5.6. Efectos del medio condicionado de K562, MT2 y RPMI sobre el largo neurítico de los cultivos de PC12. Utilización de anticuerpos anti-Tax y anti-Gizzerosina.

Se sembraron células PC12 como se describe en la sección 5.4. Para el estudio del efecto de los productos virales, el proceso de diferenciación de las células PC12 se hizo en presencia de una dilución de 1/8 del sobrenadante del medio de cultivo de células (medio condicionado) de K562, del medio condicionado MT2 o de medio de cultivo RPMI (control) adicionando diariamente nuevo medio suplementado con NGF durante 4 días. Se obtuvieron fotografías de cada uno de los días en las distintas condiciones para su posterior análisis de largo neurítico (sección 5.5). Se realizaron experimentos similares a los anteriormente descritos utilizando sólo medio de cultivo RPMI y medio condicionado MT2 en presencia además de anticuerpos contra

Tax (líquido ascítico preparado del “HTLV-I Tax hybridoma 168A51-2 culture supernatant NIH”, AIDS Reagent Program, Germantown, MD, USA. Cat. 1316), y como control negativo la Dra María Inés Becker de Biosonda proporcionó como anticuerpo irrelevante el denominado anti-GZ 8G7 de isotipo IgG2a, anti-Gizerosina (anti-GZ) agregándose volumen suficiente para lograr una dilución de cada anticuerpo 1:100. Después de 24 horas de siembra de las células PC12 se adicionó una dilución de 1/8 del medio de cultivo de las células MT2 o de las células K562, adicionando diariamente nuevo medio de MT2 o RPMI suplementado con NGF y la presencia o ausencia de los anticuerpos correspondientes. Los ensayos se siguieron durante 4 días. Se obtuvieron fotografías de cada uno de los días en las distintas condiciones para su posterior análisis de largo neurítico (sección 5.5). Posteriormente se lisaron 2 pocillos por condición correspondientes a cada día de ensayo de acuerdo al protocolo de Joshi y cols (1989) con una mezcla de solución amortiguadora RIPA (“RadioImmunoPrecipitation Assay” que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 1% v/v de desoxicolato de sodio y 0,1% p/v de SDS) en presencia de inhibidores de proteasas (“Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets”) y fosfatasas (“PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets”). Las células se despegaron de la placa de cultivo con tripsina y luego se sonicaron por 5 min a 4 °C, se centrifugaron a 16.000 x g por 15 min a 4°C, guardándose el sobrenadante a -60°C para su posterior análisis. Las proteínas totales provenientes de los lisados celulares se cuantificaron en microplacas mediante el kit MicroBSA (Pierce) según las indicaciones del fabricante.

5.7. SDS-PAGE y Western blot

La electroforesis se realizó empleando 50 µg totales de muestra y 5 µL de estándares de peso molecular (Fermentas, USA) por carril, en condiciones reductoras y desnaturantes. Las muestras se hirvieron durante 5 min con solución amortiguadora de muestra 4x y la separación de las proteínas se efectuó en un gel de poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970). La incorporación de las proteínas al gel se logró a 80 V por 15 min, luego se mantuvo a 120 V por 2 h. La tinción de geles se hizo utilizando azul de Coomassie coloidal G-250 (Candiano y cols, 2004). El Western blot se realizó según Towbin y cols (1979), donde la transferencia, posterior a la electroforesis, se realizó en membranas de nitrocelulosa (BioRad, poro 0,45 µm) a 600 mA totales con solución

de electrotransferencia compuesta de 25 mM de Tris, 190 mM de glicina y 20% metanol, posteriormente la membrana se bloqueó con una solución amortiguadora de TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,1% v/v, pH 7,6) y leche descremada 6% (p/v) durante 1 h. Se incubó con el respectivo anticuerpo primario H2 anti-KHC diluido 1:2500, 63-90 anti-KLC 1:1000, anti-DIC (Dynein Intermediary Chain) 1:2500, anti GAPDH 1:20000 en TBS-Tween durante toda la noche a 4°C, seguido de lavados con solución amortiguadora TBS-Tween 3 veces durante 10 min. Incubación por 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:500.000 en TBS-Tween seguido de 3 lavados durante 10 min con solución TBS-Tween. La reacción positiva se identificó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit de Pierce (“SuperSignal West Femto Substrate”) con luminol y H₂O₂ y posterior exposición a placa fotográfica (Pierce). Para los experimentos con el anticuerpo primario anti-Tax líquido ascítico proveniente de “HTLV-I Tax hybridome 168A51-2 culture supernatant NIH” se utilizó en una dilución 1:1000, durante toda la noche a 4°C, seguido de lavados con solución amortiguadora TBS-Tween 3 veces durante 10 min. Incubación por 1 hora con el anticuerpo secundario inmuoabsorbido conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:50000 en solución TBS-Tween seguido de 3 lavados durante 10 min con solución TBS-Tween. La reacción positiva se identificó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit de Pierce (“SuperSignal West Pico Substrate”) con luminol y H₂O₂ y posterior exposición a placa fotográfica (Pierce).

La deshibridación se realizó con 2 lavados de 10 min cada uno con solución deshibridadora (200 mM de glicina, 3,5 mM de SDS y Tween-20 al 1% v/v pH 2,2) seguidos de 3 lavados de 5 min cada uno con solución amortiguadora TBS-Tween.

5.8. Electroforesis en 2 dimensiones

Para las muestras de líquido céfalo-raquídeo se utilizaron 50 µg de proteínas totales en un solución amortiguadora de rehidratación UTAH (3,2 mM de ASB-14, 69 mM de HED, 9,7 M de Urea y 2,7 M de Tiourea) cargadas en las tiras IPG (immobilized pH polyacrylamide gel) de 7 cm con gradiente inmovilizada de pH 3 a 11 no lineal (General Electric Healthcare) rehidratándose estas durante mínimo 10 hrs. Una vez rehidratadas se procedió con el isoelectroenfoque (IEF) en el equipo IPGphor Ettan 3 (GE Healthcare) aplicando 500 V hasta alcanzar 250 Volts/hora

(Vh) como primer paso, luego como segundo paso se aplicaron 5000 V hasta alcanzar 500 Vh y como paso final se aplicaron 5000 V logrando 8000 Vh. Una vez terminado el IEF las tiras se utilizaron inmediatamente para una electroforesis SDS-PAGE o almacenadas a -60°C hasta su posterior uso.

Se aislaron proteínas de los lisados celulares mediante el uso del kit "2-D Clean-Up" (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. El precipitado resultante se incorporó a una solución amortiguadora de rehidratación para las tiras IPG 7 cm con gradiente inmovilizada de pH 3 a 11 no lineal (GE Healthcare), estas una vez rehidratadas, se sometieron a isoelectroenfoco en el equipo IPGphor Ettan 3 (GE Healthcare) utilizando las condiciones de corrida propuestas por el fabricante con pequeñas modificaciones. Brevemente se aplicó un paso de 10 V durante 30 min, seguido de un paso de 300 V hasta alcanzar los 200 Vh, luego una gradiente de 1000 V hasta alcanzar los 300 Vh, otra gradiente de 5000 V hasta lograr los 4000 Vh para finalizar con un paso de 5000 V hasta alcanzar los 2000 Vh. Las tiras se utilizaron inmediatamente para una electroforesis SDS-PAGE o congeladas a -60°C para su posterior uso.

Posterior al IEF, las tiras IPG se equilibraron en una solución amortiguadora compuesta de urea 6 M, glicerol 30% v/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl 75 mM pH 8,8, donde para el primer paso de equilibrado se agregó ditioneitol (DTT) 65 mM y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó una segunda etapa de equilibrado a la cual se le agregó iodoacetamida 135 mM a la solución tampón y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez equilibradas las tiras se colocaron sobre los geles de poliacrilamida del 4-18% o del 10% sin gel separador y se corrieron a 80 V constante durante 15 min y luego a 120 V durante 1,5 h.

5.9. Tinción de geles

La tinción con azul de Coomassie GelCode Blue Stain (Thermo Scientific) se realizó según las indicaciones del fabricante. Para la tinción de azul de Coomassie coloidal "Blue Silver" (Candiano y cols, 2004) se fijaron los geles con una solución de metanol 40% v/v y etanol 10% v/v durante 30 min a temperatura ambiente en agitación. Luego, se agregó una solución de tinción compuesta de azul de Coomassie G-250 0,12% p/v, sulfato de amonio 10% p/v, ácido fosfórico

10% v/v y metanol 20% v/v durante toda la noche a temperatura ambiente. La destinción se realizó con agua destilada 5 lavados de 10 min a temperatura ambiente y agitación.

5.10. Análisis estadísticos

Los experimentos analizados estadísticamente, se realizaron a lo menos por triplicado. Los datos se analizaron utilizando los programas GraphPad Prism y SPSS v12. La normalidad de estos se determinó usando el test Shapiro-Wilk y la homocedasticidad a través del test de Levene. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA (test paramétrico) o Kruskal Wallis (test no paramétrico) según el caso. La significancia se consideró de un valor de $p < 0,05$ para todos los casos.

6. Resultados

6.1 Objetivo 1.- Determinar si Tax es uno de los productos virales secretados desde células linfocitarias infectadas que produce el efecto de retardo de crecimiento neurítico de PC12.

Inicialmente fue necesario demostrar la presencia de Tax en el medio de cultivo (medio condicionado) de las células infectadas con HTLV-I (células MT2). Esto se determinó través de Western blot, observándose una señal reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-Tax de un peso aproximado de 40 kDa, presente sólo en el medio condicionado de MT2 y no en el medio de cultivo de la línea celular no infectada (K562). Aunque se ha descrito que Tax puede experimentar intracelularmente modificaciones postraduccionales (Peloponese y cols, 2004; Wycuff y Marriot, 2005; Journo y cols, 2009; Bidoia, 2012), el peso molecular observado corresponde a una forma de la proteína sin modificaciones (**Fig. 5**).

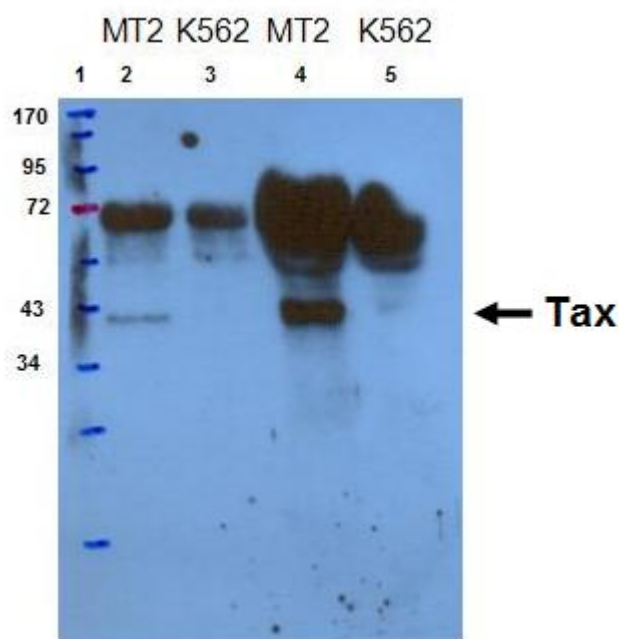


Fig 5. Western blot para proteína viral Tax de medios condicionados de células MT2 y K562. En el carril 1 se cargó el estándar de peso molecular; en los carriles 2 y 3 se adicionaron 25 μ L de concentrado 2X de medio condicionado de MT2 y de K562, respectivamente; en los carriles 4 y 5 se adicionaron 25 μ L de medio concentrado 20X en ambos casos. Las proteínas fueron concentradas por liofilización.

A continuación se realizaron los ensayos con las células PC12 observando el efecto de la adición de medios condicionados de células MT2 y de K562 sobre la diferenciación neuronal. Este efecto se siguió determinando el largo neurítico. En la **Fig. 6** se encuentran microfotografías representativas del proceso de diferenciación de las células PC12 seguido por 4 días, correspondientes a las siguientes condiciones de diferenciación con NGF: A) como control, adicionándole medio RPMI que corresponde al medio de cultivo de las células MT2 y K562; B) como un segundo control, adicionándole medio de cultivo de células K562; C) agregando medio de células MT2. Se midió el largo neurítico normalizado por el número de células para cada día y se compararon las distintas condiciones. Al hacer el análisis del largo neurítico en cada condición como se representa en la **Fig. 7** se encontró que los productos secretados al medio de cultivo por las células MT2 a partir del tercer día de cultivo presentan un efecto tóxico reflejado en la significativa reducción de la velocidad de aumento del largo o crecimiento neurítico comparado con las dos condiciones controles.

Con el fin de determinar si este efecto tóxico se debe a la presencia de Tax se realizaron los experimentos de diferenciación con NGF intentando bloquear selectivamente el efecto de Tax con anticuerpos monoclonales contra esta proteína viral. Para estos estudios se consideraron las siguientes condiciones de cultivo de las PC12: A) como control de crecimiento normal, adición de RPMI; B) adición de medio condicionado de MT2; C) adición simultánea de medio de MT2 y anti-Tax; D) como control del efecto selectivo de anti-Tax se cultivó conjuntamente medio de MT2 con un anticuerpo irrelevante (anti-Mollejzina o anti-GZ, del mismo isotipo del anti-Tax, IgG2a).

En la **Fig. 8** se encuentran microfotografías representativas de estos experimentos. El análisis estadístico del largo neurítico normalizado por el número de células para cada día presentado.

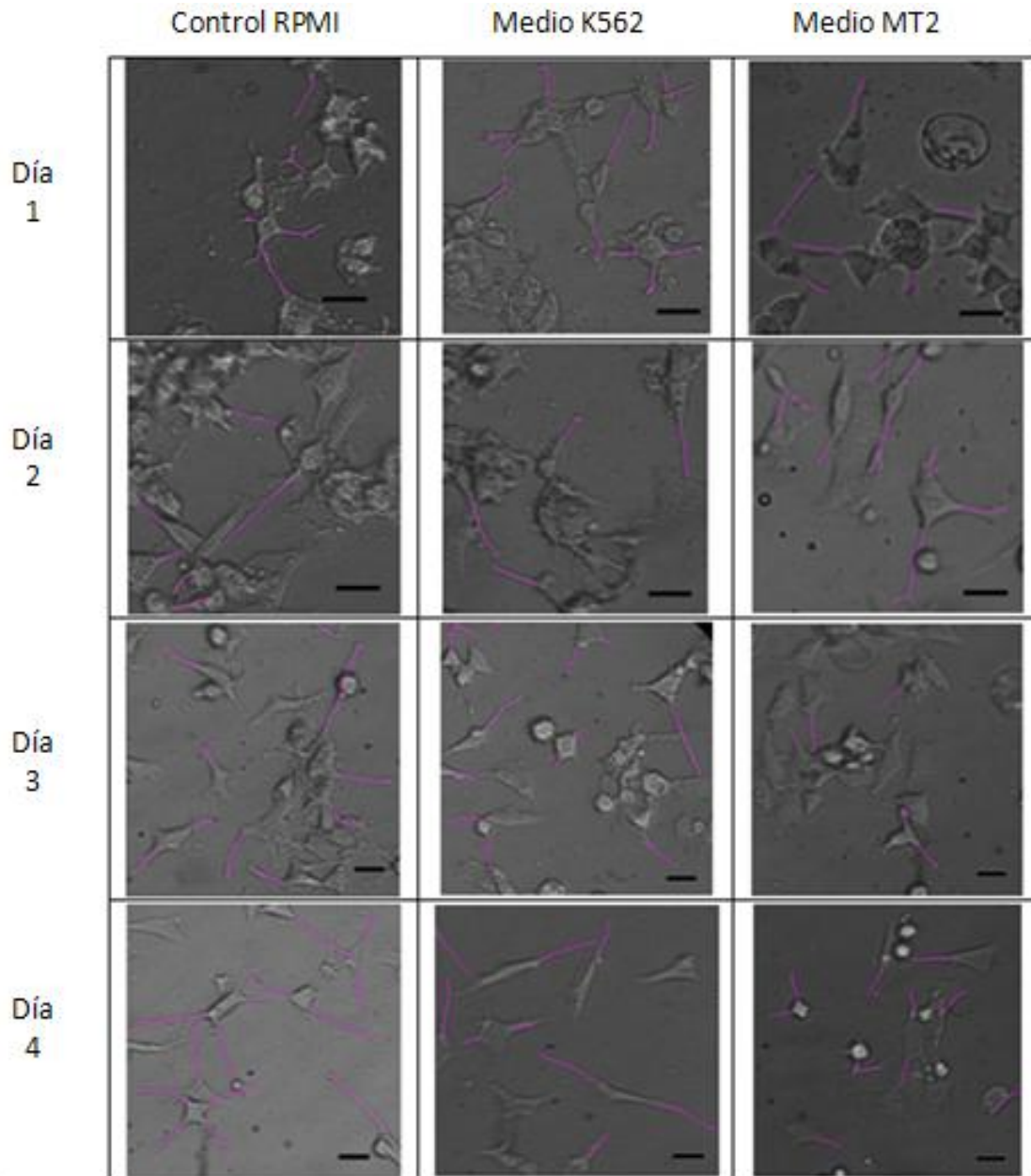


Figura 6. Imágenes representativas de cultivos PC12 durante la diferenciación sometidos a medio de RPMI, medio condicionado de células MT2 y medio de células K562. En color se observan los trazos correspondientes a las neuritas consideradas para cada célula. Barra negra: 50 μ m.

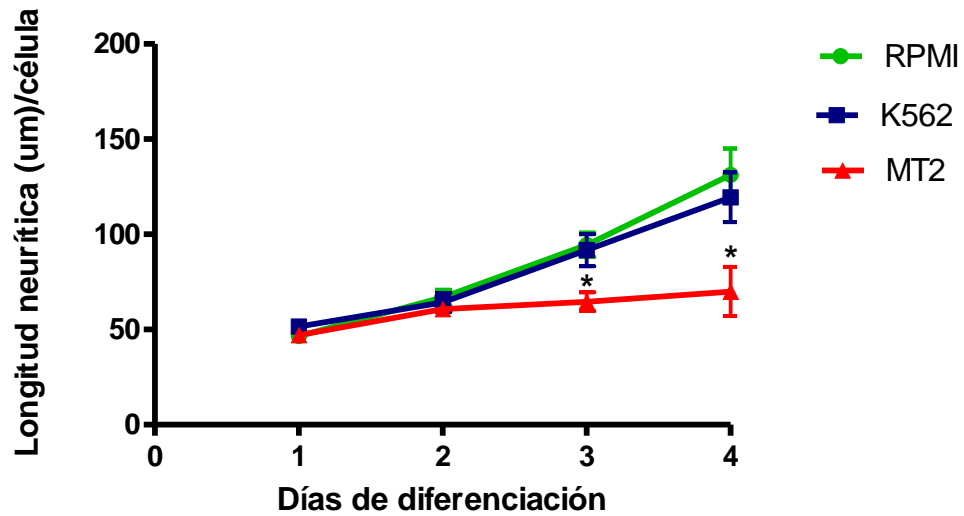


Figura 7. Longitud neurítica/célula en PC12 durante la diferenciación en las distintas condiciones del estudio. Promedio de la longitud neurítica (μm)/célula en las tres condiciones ensayadas, con RPMI, con medio de K562, con medio de MT2. Los datos corresponden al valor promedio \pm SD de 3 experimentos independientes ($n=3$). * Diferencia significativa del largo neurítico/célula entre células PC12 en medios condicionados MT2 comparadas con células PC12 en RPMI y medio condicionado K562 desde el tercer día de diferenciación con $p < 0,05$.

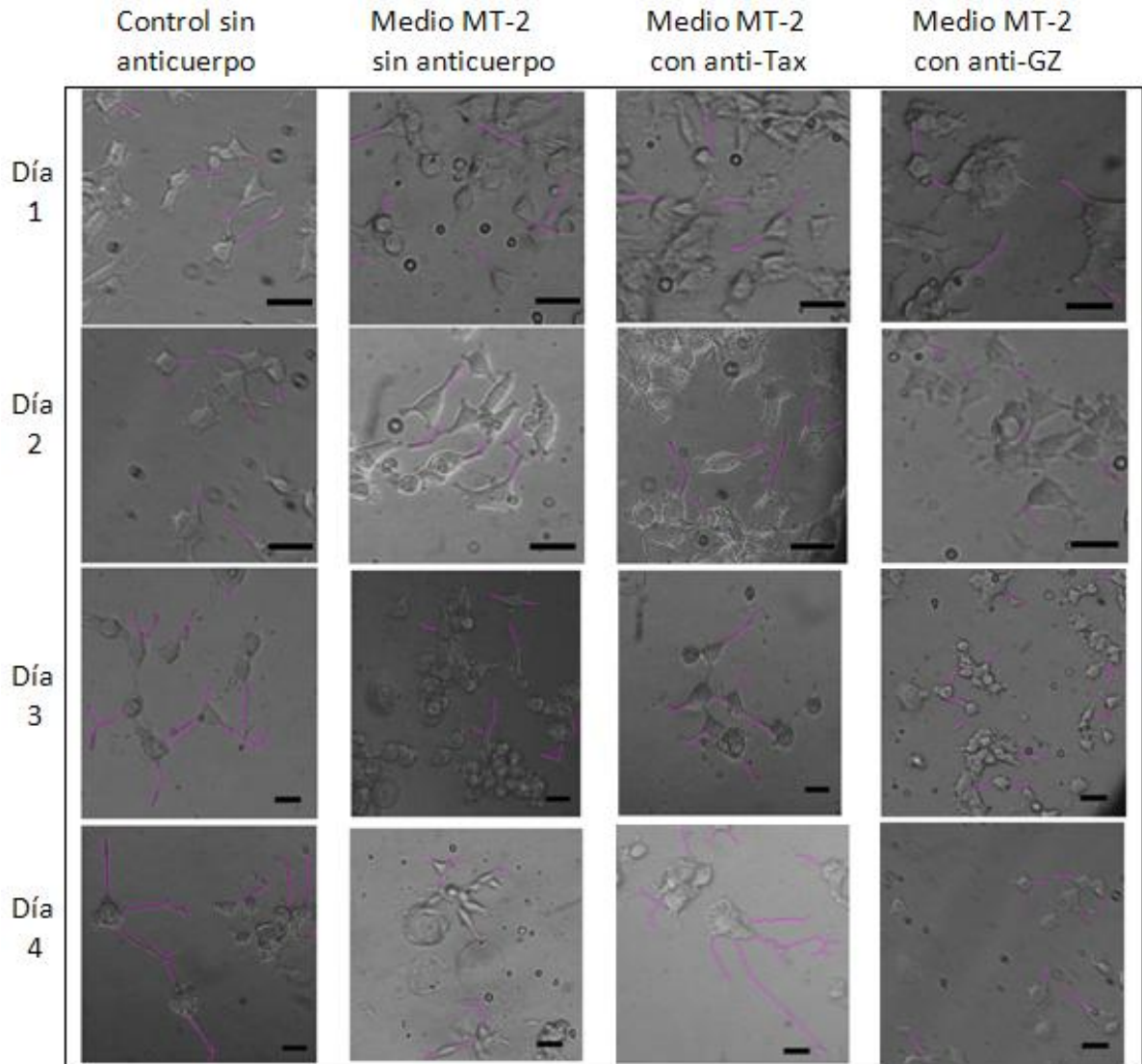


Figura 8. Imágenes representativas de cultivos PC12 durante la diferenciación sometidos a medio de RPMI, medio condicionado de células MT2, con y sin anticuerpos (anti-Tax; anti-GZ). En color se observan los trazos que corresponden a neuritas observadas en células PC12 diferenciadas. Barra negra: 50 μ m.

En la **Fig. 9** se muestra un crecimiento neurítico similar a la condición control sin anticuerpo y en la condición con anti-Tax, y por otra parte el anticuerpo irrelevante no es capaz de bloquear este efecto negativo de Tax que consiste en un retardo del crecimiento neurítico.

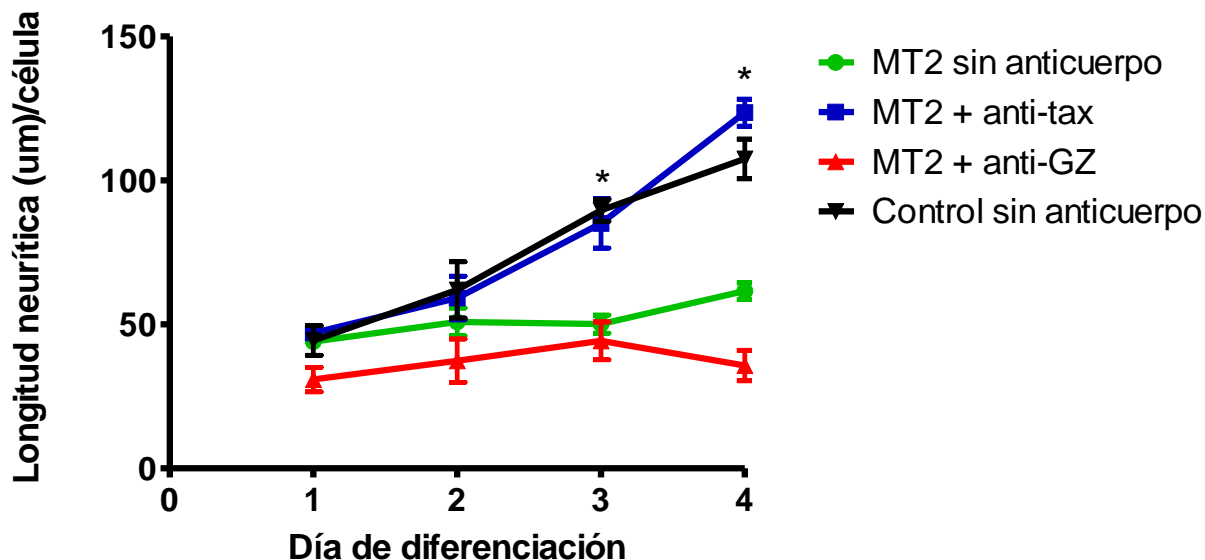


Figura 9. Longitud neurítica/célula en PC12 durante la diferenciación en presencia o ausencia de anticuerpos en las distintas condiciones del estudio. Promedio de la longitud neurítica (µm)/célula en las cuatro condiciones ensayadas, control con RPMI, con medio de MT2, con medio de MT2 junto con anti-Tax (dilución 1:100) y con medio de MT2 junto con un anticuerpo anti-GZ (dilución 1:100). Los datos corresponden al valor promedio \pm SD de 3 experimentos independientes (n=3). * Diferencia significativa entre PC12 con MT2 al que se le adicionó anti-Tax y células PC12 con MT2 sin anticuerpo desde el día 3 con $p < 0,05$.

En resumen, los resultados de este primer objetivo permitieron confirmar que el efecto de retardo del crecimiento neurítico de células PC12 por medio condicionado de MT2 está directamente asociado a Tax extracelular.

6.2. Objetivo 2. Determinar los niveles proteicos de las subunidades asociadas al control de funcionalidad de kinesina KIF5 y dineína citoplasmática en células PC12 diferenciadas.

Este objetivo se llevó a cabo utilizando lisados celulares de las PC12 durante la diferenciación en presencia de medios condicionados MT2 y K562, y medio de cultivo RPMI. La membrana de nitrocelulosa se reveló con anticuerpos anti-cadena pesada (KHC) y liviana de kinesina K1F5 (KLC), respectivamente (**Fig. 10**). La KHC migró en el gel de SDS/PAGE a un peso molecular de 120 kDa, mientras que la KLC mostró inmunoreactividad a de 66 y 72 kDa. En el caso de la KLC, se describe en neuronas dos isoformas KLC a y KLC b. Estas señales de kinesina corresponden a las descritas en la literatura (Hirokawa y Takemura, 2003; DeBoer y cols, 2008). Además del reconocimiento específico de la cadena intermedia de dineína citoplasmática correspondió una banda de peso molecular 74 kDa, valor reportando en la literatura (Dillman y Pfister, 1994) (**Fig. 10**).

Los valores del análisis densitométricos de estas películas fotográficas productos del Western blot se expresaron como una razón entre los pixeles de las señales de cada proteína/pixeles de señal del control de carga GAPDH. El análisis densitométrico de las películas fotográficas muestra que no hay diferencias en la cantidad para ninguna de las proteínas de estudio tanto en las distintas condiciones como en los distintos días de diferenciación (**Fig. 11**). Esto se corrobora ampliamente con el posterior análisis estadístico de estos resultados que señalan que no hay diferencias significativas.

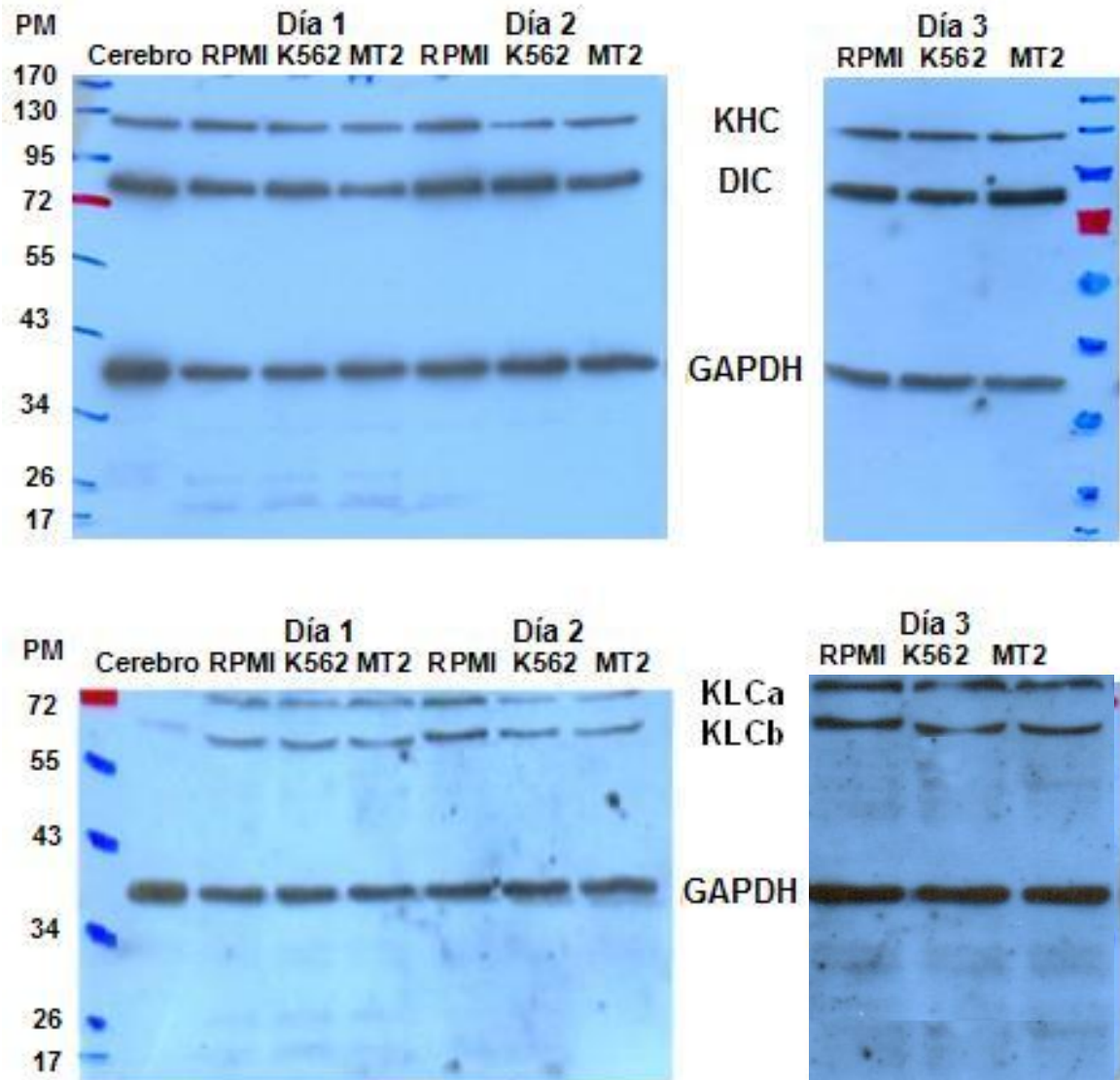


Figura 10. Western blot representativos de las proteínas kinesina y dineína en lisados celulares de PC12 diferenciadas sometidas a medios condicionados K562 y MT2 y medio RPMI durante 3 días. Cadena pesada de la kinesina (KHC), cadena liviana de la kinesina (isoformas KLC a y KLC b), cadena intermedia de dineína citoplasmática (DIC), GAPDH como control de carga. Carril C: Cerebro de rata como control positivo.

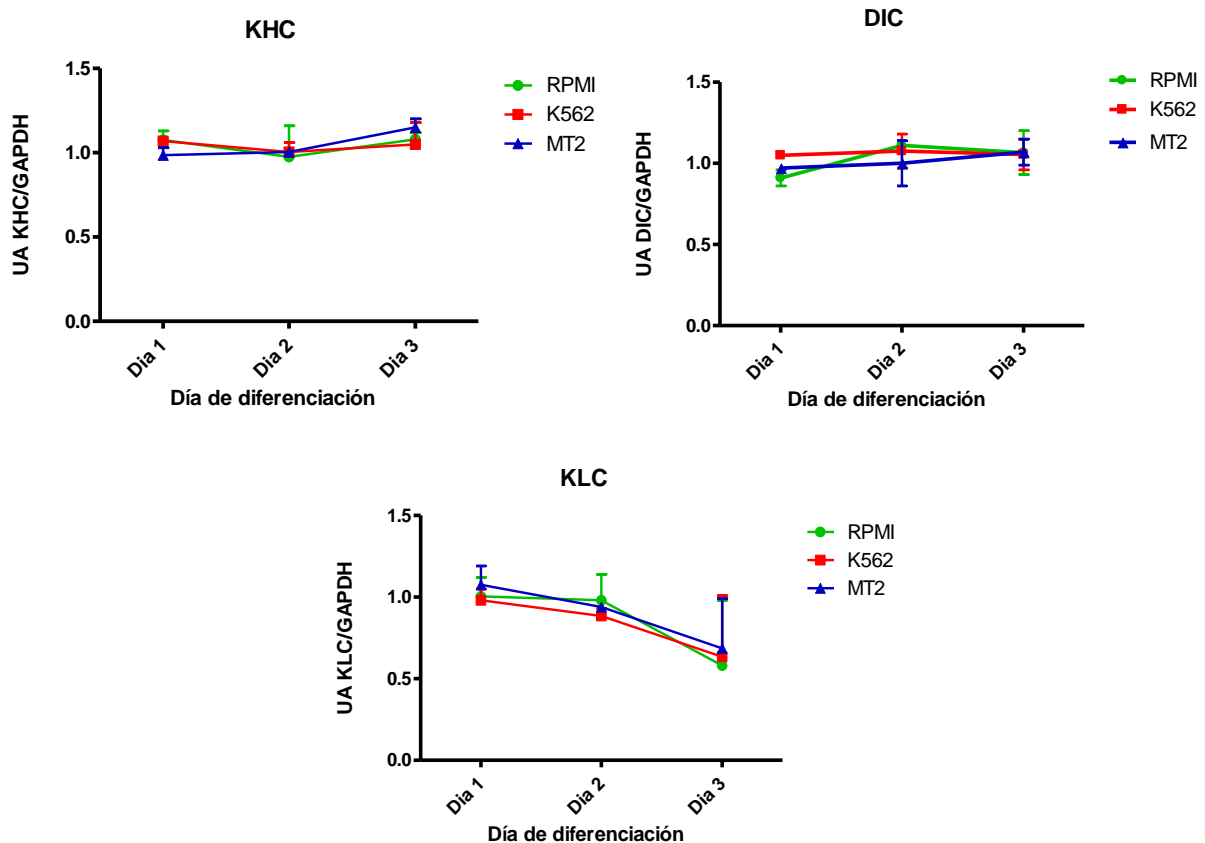


Figura 11. Niveles relativos de subunidades de kinesina y dineína en el modelo PC12 durante la diferenciación. Los resultados expresados en unidades arbitraria (píxeles producto del análisis densitométrico de la película fotográfica/píxeles de la GAPDH) correspondientes KHC, KLC y DIC en lisados PC12 diferenciadas expuestas a medios condicionados MT2, K562 y medio de cultivo RPMI durante 3 días. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=3).

La importancia de haber desarrollado este objetivo, se debe a la necesidad de lograr detectar específicamente las distintas unidades de kinesina y la cadena intermedia de dineína que son las descritas, que pueden experimentar cambios en su fosforilación y producir alteraciones en su funcionalidad en el transporte axonal. Al no existir anticuerpos disponibles para efectuar el seguimiento de cambios en las concentraciones de las formas fosforiladas durante la diferenciación de las células PC12 por acción de Tax, se optó por separar las proteínas por electroforesis en dos dimensiones, 2D; donde se espera puedan observarse separadas formas con mayor o menor grado de fosforilación ya que esta técnica se basa en separar por punto isoeléctrico en una primera dimensión y luego en una segunda por peso

molecular. Una vez separadas las proteínas se electrotransfieren y revelan con los anticuerpos como se efectuó en el procedimiento de Western blot antes descrito.

6.3. Objetivo 3. Estandarizar protocolos de separación de proteínas mediante electroforesis en 2 dimensiones y comparar el punto isoeléctrico de las subunidades de proteínas motoras (KHC, KLC y DIC) en células expuestas a productos secretados de linfocitos infectados con HTLV-I y células no infectadas (control).

Debido a que el éxito de la electroforesis en 2D, que es una técnica altamente resolutive, es muy dependiente del tipo de muestra a utilizar se necesitó estandarizar principalmente la etapa de isoelectroenfoque.

6.3.1. Estandarización de la electroforesis en dos dimensiones.

Se probaron distintos protocolos de isoelectroenfoque (IEF) para determinar aquel que otorgara mejor reproducibilidad de los experimentos (datos no mostrados). Finalmente se decidió por utilizar el protocolo de IEF propuesto por el fabricante de las tiras de gradiente inmovilizada (General Electric Healthcare) con pequeñas modificaciones señaladas en la sección 2.9. La **Fig 12A** muestra un estándar que contiene proteínas puras con distintos puntos isoeléctricos (pI) para confirmar la formación de una gradiente de pH al someter las tiras a IEF, mostrando que hubo una adecuada separación por pI. Luego en la **Fig 12B** se muestra la corrida en la segunda dimensión (SDS-PAGE) y en la Tabla 1 están los valores de pI y PM de las distintas proteínas observándose una señal para la glicoproteína Amiloglucosidasa igual o mayor a 95 kDa dependiendo del grado de glicosilación, para la Anhidrasa carbónica I y II una señal de 29 kDa y el Tripsinógeno con una señal de 24 kDa, las cuales se resuelven correctamente en un gel de poliacrilamida al 10%. Las demás señales correspondientes a las otras proteínas deben estar junto al frente de corrida por tener valores de peso molecular cercanos y menores a 17 kDa, por lo que no se resolvieron adecuadamente. Para el caso del inhibidor de tripsina se observa una señal pequeña y débil de peso aproximado a 20 kDa, que no es fácilmente apreciable.

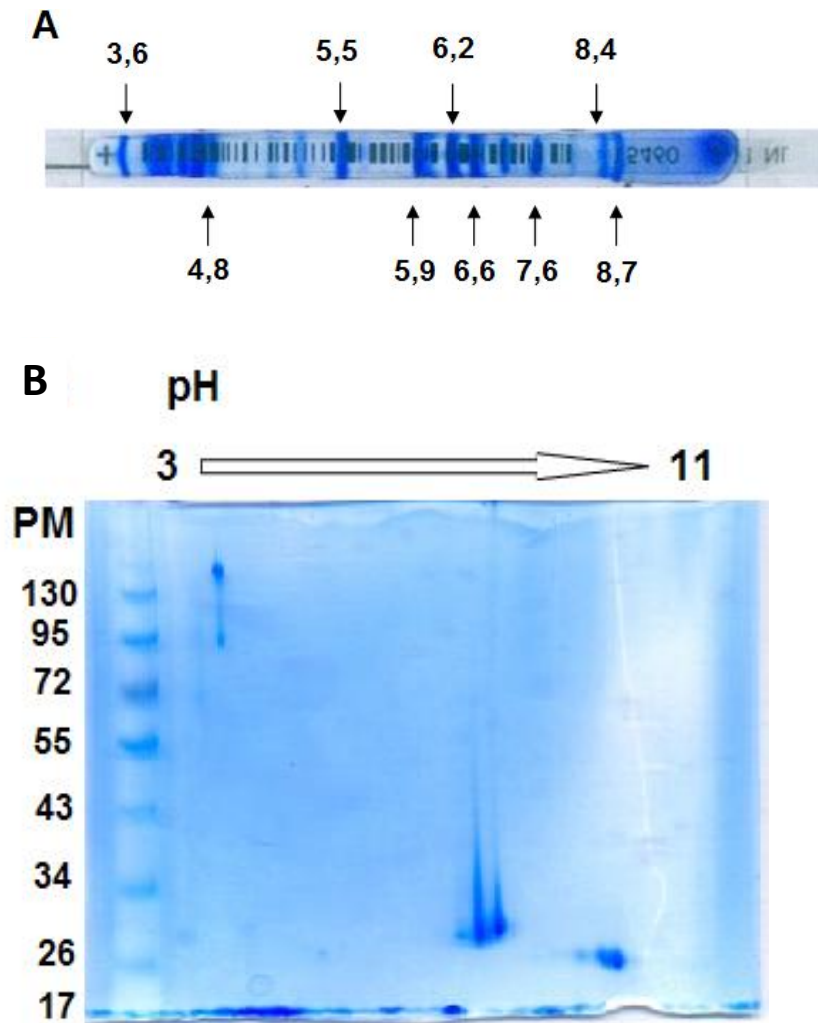


Figura 12. Isoelectroenfoque y SDS-PAGE de proteínas estándares de punto isoeléctrico. (A) Se utilizó una tira de gradiente inmovilizada embebida en un estándar comercial de proteínas con punto isoeléctrico desde 3,6 a 9,3. **(B)** SDS-PAGE de la tira con estándar comercial de punto isoeléctrico previamente enfocado.

Tabla 1. Proteínas que conforman el estándar de isoelectroenfoque. En la tabla se observan los valores de peso molecular y punto isoeléctrico aproximado para cada una de las especies presentes en el estándar.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico aprox.
Amiloglucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>	97	3,6
Inhibidor de Tripsina de <i>Glicine max</i> (soja)	20	4,6
β -Lactoglobulina A de leche bovina	18,4	5,1
Anhidrasa carbónica isoenzima II de eritrócitos bovinos	29	5,9
Anhidrasa carbónica isoenzima I de eritrócitos humanos	29	6,6
Mioglobina de tejido cardíaco equino	17,7	6,8 (banda secundaria) 7,2 (banda principal)
Lectina de <i>lens culinaris</i> (lenteja)	7 (subunidad α) 17 (subunidad β)	8,2; 8,6; 8,8
Tripsinógeno de tejido pancreático bovino	23,7	9,3

A continuación se probaron distintas muestras la primera de estas, empleando líquido cefalorraquídeo como se muestra en la **Fig. 13**. La flecha muestra una señal observada de PM entre 67 kDa y un valor de pI entre 5,8 (Dockal y cols, 1999) que correspondería a la albúmina, proteína en alta concentración dentro del líquido céfalo-raquídeo. Luego se utilizó lisado de tejido encefálico de rata como se muestra en la **Fig. 14**, donde se observa una gran cantidad de proteínas.

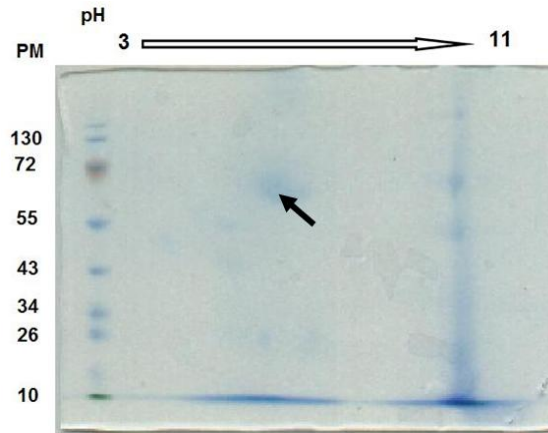


Figura 13. Imagen representativa de electroforesis en 2D de líquido céfalo-raquídeo. En la primera dimensión se cargaron 50 μ g de proteína total de líquido encéfalo-raquídeo de humano. La segunda dimensión se realizó en un gel al 10%. El gel de la segunda dimensión se tiñó con “GelCode Blue Safe protein stain”. La flecha muestra la señal que correspondería a albúmina.

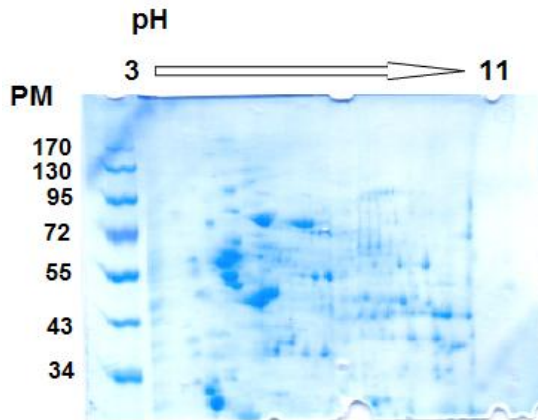


Figura 14. Electroforesis en 2D de cerebro de rata. Se cargaron 50 μ m de proteínas totales. El SDS-PAGE se realizó en un gel al 10%, la tinción corresponde a Azul de Coomassie coloidal.

Para demostrar reproducibilidad de la técnica, se hicieron experimentos independientes de electroforesis en 2D de lisados de células PC12 diferenciadas durante 3 días sometidos a medio control RPMI con NGF en geles en gradiente del 4-18% como lo muestra la **Fig 15**. Posteriormente, se trabajó con lisados celulares de PC12 diferenciadas durante 3 días con NGF y sometidos a medio control RPMI, los que se separaron en la segunda dimensión empleando dos tipos de geles de poliacrilamida: un gel en gradiente entre 4-18% y un gel al 10% como se muestra en la **Fig. 16**. Se puede observar, como indican las flechas y las circunferencias, las

similitudes en las señales presentadas en ambas condiciones, lo que permitió comparar ambos experimentos en cuanto a tiempo y recursos del laboratorio utilizados, optándose finalmente por la electroforesis en 2D con geles SDS-PAGE al 10% para todos los experimentos posteriores.

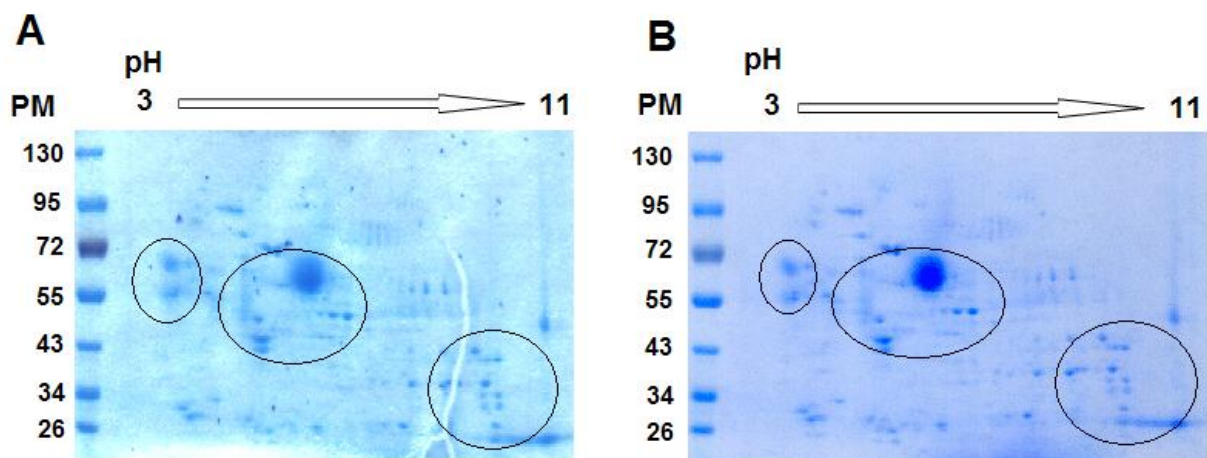


Figura 15. Imágenes representativas de electroforesis en 2D de lisados celulares de PC12. En la imagen se muestran 2 experimentos independientes (A y B) utilizando la misma muestra y empleando las mismas condiciones: Lisado de células PC12 diferenciadas durante 3 días con RPMI en gel SDS-PAGE en gradiente del 4-18%. Las circunferencias muestran similitudes en las señales observadas.

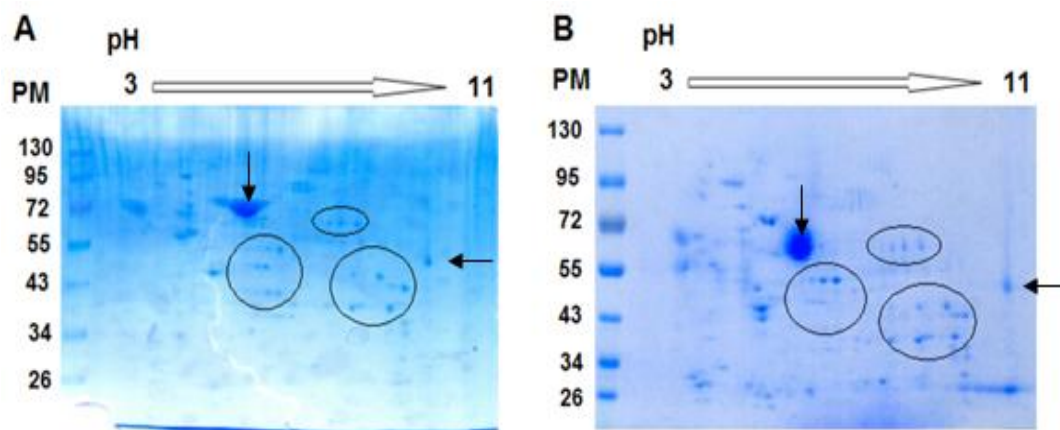


Figura 16. Imágenes representativas de electroforesis en 2D de lisados celulares de PC12 en distintas condiciones del SDS-PAGE. (A) Lisado de células PC12 diferenciadas durante 3 días con RPMI en gel SDS-PAGE al 10%. (B) Lisado de PC12 diferenciadas durante 3 días con RPMI en gel SDS-PAGE en gradiente del 4-18%. Las flechas y circunferencias muestran similitudes en las señales.

6.3.2 Comparación de la migración relativa de kinesina y dineína en 2D

Una vez encontradas las condiciones más adecuadas de la electroforesis en 2D, se realizaron Western blot de estas, utilizando como muestras lisados de PC12 diferenciados durante 3 días, los cuales se les agregaron medios condicionados K562 (control) y MT2, utilizando anticuerpos anti-KHC, anti-DIC y anti-KLC. Esto con el objetivo de determinar el pI de las proteínas de estudio y si existe un desplazamiento significativo de la señal, modificando de esta manera el valor de pI observado, lo que indicaría una alteración en la fosforilación general de estas subunidades.

Para determinar la zona donde se encontraban las subunidades de las proteínas en estudio se realizó un IEF paralelo de la misma muestra, donde se tiñó uno de los geles de la segunda dimensión con Azul de Coomassie coloidal y el otro gel se electrotransfirió para hacer un Western blot. **Fig. 17A** presenta el gel de SDS-PAGE teñido con y el correspondiente Western blot (**Fig. 17B y 17C**), señalándose la zona de proteínas donde hay inmuno-reactividad contra las subunidades de las proteínas motoras en estudio. La **Fig. 17B** corresponde al primer revelado con anticuerpo contra KHC y DIC y la **Fig. 17C** proviene de un proceso de deshibridización de la membrana anterior ahora revelada con anticuerpo contra KLC.

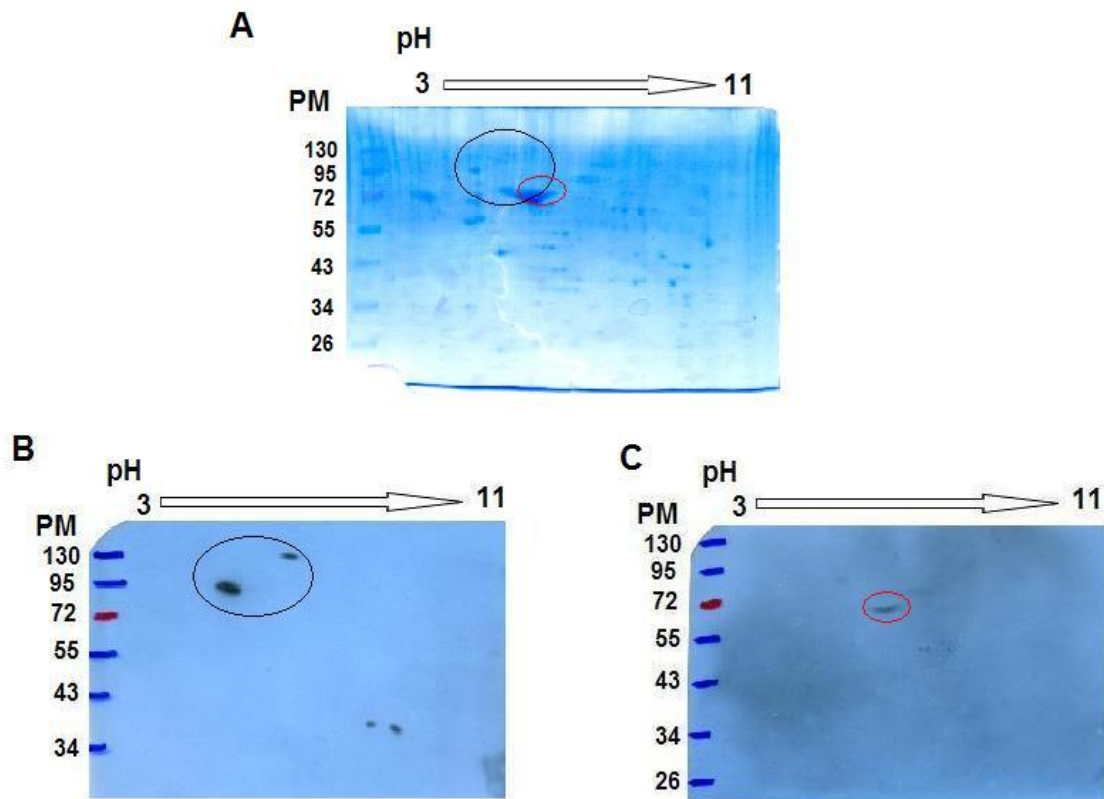


Figura 17. Electroforesis en 2D de lisado celular PC12 y el posterior Western blot. (A) Electroforesis en 2D de lisado celular PC12 al tercer día de diferenciación. En negro, se representa la zona con inmunoreactividad para KHC y DIC. En rojo se presenta la zona con inmunoreactividad para KLC. **(B)** Western blot de lisado celular PC12 diferenciado hasta el día 3, se observan las señales correspondientes a KHC y DIC. **(C)** Western blot de lisado celular PC12 diferenciado hasta el día 3, se observa la señal correspondiente a KLC.

La **Fig. 18** muestra los resultados del Western blot de una muestra de lisado celular de PC12 diferenciado por 3 días con NGF en presencia de medio condicionado de células K562 (condición control) (**Fig. 18A**) y la condición del mismo experimento a la que se le adicionó el medio condicionado de células MT2 (**Fig. 18B**). El análisis densitométrico de las señales de los Western blot no presenta diferencias significativas en el valor de pI de las subunidades de cadena pesada, cadena liviana de la kinesina, ni en la cadena intermedia de la dineína entre las dos condiciones (K562 y MT2) (**Fig. 19**).

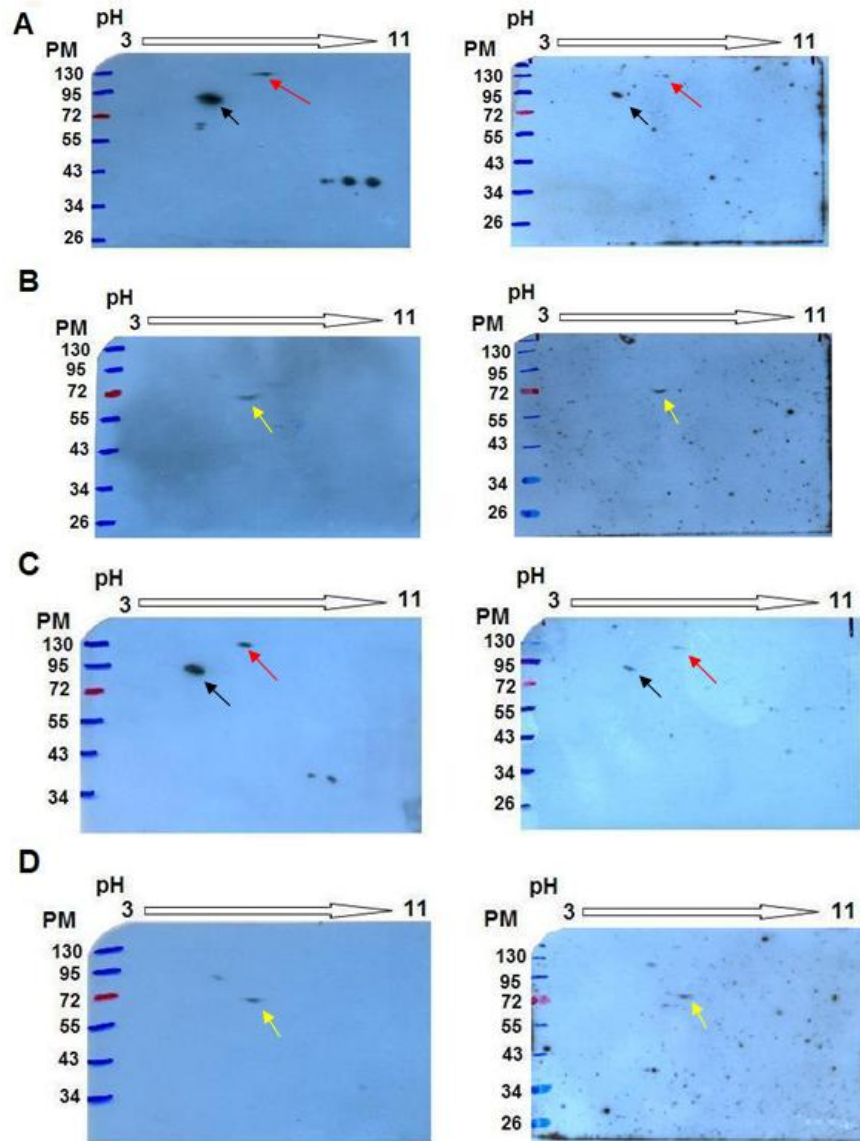


Figura 18. Western blot de geles de dos dimensiones de subunidades de motores moleculares en lisados de PC12 diferenciadas tratado o no con medio de MT2. Imágenes representativas del Western blot de geles en 2D de lisados celulares de PC12 al tercer día de diferenciación. **(A)** Lisado celular PC12 en presencia de medio condicionado K562 (control) y su duplicado al lado derecho, la flecha negra muestra la señal perteneciente a DIC, la roja la señal perteneciente a KHC; **(B)** lisado celular PC12 en presencia de medio condicionado K562 y su duplicado, la flecha amarilla representa la señal perteneciente a KLC; **(C)** Lisado celular PC12 en presencia de medio condicionado MT-2 y su duplicado al lado derecho, la flecha negra muestra la señal perteneciente a DIC, la roja la señal perteneciente a KHC; **(D)** lisado celular PC12 en presencia de medio condicionado MT-2 y su duplicado, la flecha amarilla representa la señal perteneciente a KLC.

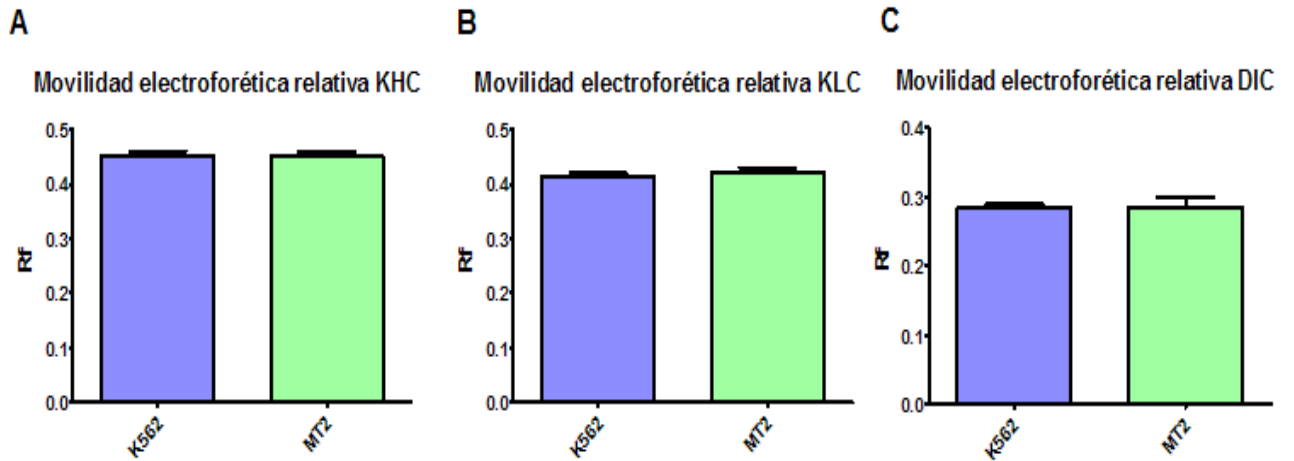


Figura 19. Gráficos de movilidad electroforética relativa en Western blot de 2D de proteínas en lisados PC12 al tercer día de diferenciación sometidos a medios condicionados de K562 y MT2. (A) Rf de cadena pesada de la kinesina (KHC). (B) Rf de cadena liviana de la kinesina (KLC) (C) Rf de cadena intermedia de la dineína (DIC). Los valores corresponden al promedio \pm SD de 3 experimentos independiente. No existen diferencias significativas entre las condiciones para cada proteína.

7. Discusión

Uno de los objetivos fundamentales de nuestro grupo de investigación es comprender como se produce el daño axoplásmico en los pacientes HAM/TSP sin que el virus HTLV-I, correspondiente al agente etiológico, infecte directamente las neuronas. Como fue presentado en la Introducción, se conoce que el reservorio del virus corresponde a células linfocitarias, principalmente T CD4+ y en menor grado las CD+8, las que pueden infiltrarse en el SNC. Se ha demostrado, en células cerebrales endoteliales que hay una alteración de la barrera hematoencefálica, por disminución en la expresión de proteínas de uniones estrecha que permiten el aumento de la permeabilidad de dichas células al SNC (Afonso y cols, 2008). En cortes histológicos de muestras de anatomía patológica de pacientes con paraparesia espástica tropical se ve una efectiva acumulación de linfocitos alrededor de los vasos sanguíneos (Cartier, 2009).

Los antecedentes previos hicieron sugerir la hipótesis *“La exposición a productos secretados de linfocitos infectados por HTLV-I provoca un aumento en el estado de fosforilación de subunidades de proteínas motoras en modelo neuronal de células PC12”*. Sin embargo, los resultados de este trabajo, utilizando la estrategia de observar cambios en la movilidad en electroforesis en dos dimensiones, no confirman esta hipótesis al no encontrar cambios significativos en el punto isoeléctrico de las subunidades de las proteínas motoras estudiadas, que puedan dar una idea del estado de fosforilación de estas. Esto no descarta, que puedan haber diferencias significativas empleando una metodología más sensible como es la de revelar el Western Blot con anticuerpos que reconozcan fosforilaciones específicas, con los que lamentablemente no dispusimos comercialmente. La ausencia de reporte de fosforilaciones en sitios específicos (Hirokawa y cols, 2010) aparentemente ha dificultado la obtención de anticuerpo comerciales. En su defecto, se puede comparar cambios en grado de fosforilación utilizando anticuerpos anti-serina, anti-treonina y anti-tirosina.

Dada las implicancias éticas que conllevan este tipo de estudios de enfermedades que afectan a los humanos, se ha descrito un modelo animal de ratas Wistar-King-Aptekman-Hokudai (WKA) a las que se les administran células MT-2, usando como control células K562,

en un periodo de 15 meses (Kushida y cols, 1994). No obstante, aunque este modelo presenta algunas similitudes con lo observado en HAM/TSP desde el punto de vista histopatológico, carece de otras características clínicas observadas en pacientes HAM/TSP, como la disfunción en esfínteres, uveítis, artritis, así como también la ausencia de infiltración linfocitaria en el SNC y la dificultad de detectar antígenos del HTLV-I en estas ratas. Por otra parte, se debe considerar el alto costo experimental y el tiempo requerido para ver efectos, por lo que se ha preferido el uso de modelos celulares.

Nuestro grupo comenzó a trabajar con dos líneas celulares diferenciables a tipo neuronal, células SH-SY5Y donde se observó que el medio de células linfocitarias infectadas con HTLV-I como células MT-2 y además medio de cultivo de linfocitos de pacientes (PBMCs) producía retracción de las células ya diferenciadas (Maldonado y cols, 2011; Alberti, 2012). Posteriormente, con el fin de determinar si en otras líneas celulares diferenciables a tipo neuronal los productos virales secretados desde las células MT-2 producían algún efecto sobre ellas, se procedió trabajar con células PC12. En este caso se encontró que el medio de MT-2 retardaba la velocidad del desarrollo neurítico por lo que pareció interesante continuar su estudio (Pando, 2010). Tanto en los efectos de retracción, como retardo del desarrollo neurítico hay involucrado un remodelamiento del citoesqueleto, incluyendo microtúbulos, microfilamentos de actina y neurofilamentos (Luo and O'Loery 2005). La diferencia del efecto deletéreo observable (retracción o retardo del crecimiento) apunta a mecanismos distintos en cada línea celular (Pando 2010, Maldonado y cols, 2011).

La estabilidad axonal depende de la capacidad del citoesqueleto de ensamblar y desensamblar sus componentes en respuesta a señales extracelulares, la retracción neurítica involucra el rápido remodelamiento del citoesqueleto mediado por señales extracelulares como las semaforinas (Sayas y cols, 2002). Por otra parte, el bloqueo del transporte axonal anterógrado y la pérdida del funcionamiento normal de este proceso, puede gatillar la degeneración (De Vos y cols, 2008).

Se confirmó la secreción de Tax desde las células MT-2, que son células linfoblastoides humanas tipo linfocito T CD4+ con provirus HTLV-I, mediante Western Blot (**Fig. 5**). Como control negativo se utilizaron medios de cultivo la línea celular K562, la cual pertenece a un

eritroblastoma, ampliamente usada en la literatura como control en estudios con HTLV-I (Watanabe y cols, 2005). En este estudio la proteína viral produce un retardo en el desarrollo neurítico a partir del tercer día de diferenciación (**Figs 8 y 9**).

Un resultado relevante de este trabajo fue confirmar que el bloqueo de Tax secretado desde células linfocitarias infectadas con HTLV-I previene el retardo de crecimiento neurítico de PC12, lo cual confirma que esta proteína es, en parte, responsable directo del efecto. La acción extracelular de esta proteína viral corresponde al de una forma de 40 kDa. que no contiene modificaciones postraduccionales, a diferencia de lo que ocurre con la proteína detectada en plasma de pacientes y en medio de cultivo de linfocitos humanos de estos mismos pacientes donde se demuestra que está poliubiquitinada (Medina, 2010; Godoy, 2011, Quintremil, 2012). En el modelo de retracción de células SH-SY5Y, se demostró que los medios de cultivo de células mononucleares periféricas de pacientes HAM/TSP también producen retracción neurítica similar a lo observado con medios de cultivo de células MT-2 (Alberti, 2012). Esto implica que sería importante analizar si el plasma o medio de cultivo de células mononucleares de sangre periférica de pacientes, donde Tax se encuentra ubiquitinado, produce la misma acción sobre el retardo del desarrollo neurítico de las PC12.

Otra etapa importante de este trabajo fue determinar si Tax producía cambios en el grado de fosforilación de subunidades de las proteínas motoras. Al no disponer de anticuerpos específicos para estas detecciones, se decidió intentar la técnica de electroforesis en dos dimensiones que podría permitir distinguir poblaciones de proteínas con un distinto punto isoeléctrico permitiendo suponer diferencias en el grado y tipo de modificaciones postraduccionales que afectaría la migración en la etapa de isoelectroenfoque, para posteriormente realizar un Western Blot con estos geles.

La presencia de las subunidades de la kinesina KIF5, cadena liviana y cadena pesada se determinó a través de Western Blot. Se observaron las especies de peso molecular 120 kDa correspondiente a la cadena pesada (KHC) y las especies de 74 kDa y 66 kDa, la primera pertenece a la señal de la cadena liviana isoforma a (KLCa) y la segunda a la cadena liviana isoforma b (KLCb), todas estas señales de acuerdo a lo descrito en la literatura se encuentran presentes en tejidos neuronales (Hirokawa y cols, 2008; DeBoer y cols, 2008; Dillman y Pfister,

1994). Como se concluye de las cuantificaciones de las señales, estas proteínas no se ven alteradas (aumentadas o disminuidas) en su expresión proteica en ninguno de los días y en ninguna condición. Estos resultados permiten suponer que la proteína Tax no estaría ejerciendo un efecto en la maquinaria que permite la traducción génica de estas subunidades. Por lo que el posible efecto deletéreo en el transporte axoplásmico podría deberse a una desregulación en el grado de fosforilación de estas subunidades de proteínas motoras.

Como no se encuentra descrito que en SDS-PAGE se pueda distinguir la presencia de fosforilación en dichas proteínas, se procedió a montar la técnica del 2D para luego realizar Western Blot. La comparación de la migración relativa de proteínas en 2D podría permitir la determinación de modificaciones postraduccionales, como las fosforilaciones, de las subunidades de motores moleculares estudiados, kinesina y dineína citoplasmáticas. La aplicación de la técnica de separación electroforética en 2D requirió un montaje especial a fin de poder detectar el máximo número de proteínas separadas que permitiera obtener resultados reproducibles con los lisados de PC12 a fin de efectuar una comparación en las condiciones tratadas con medios de MT-2 o bien de K562. El uso de estándares comerciales para demostrar una efectiva separación por IEF logró confirmar que la técnica era eficiente tanto en la separación por pI como por peso molecular. A partir de ese punto se comenzaron a utilizar muestras con matrices cada vez más complejas, como el líquido cefaloraquídeo y homogeneizado de cerebro de rata, para finalmente, trabajar con lisados celulares de línea celular PC12. El punto clave mostró ser la limpieza de las muestras, lo que se logró eficientemente mediante sucesivas etapas de precipitación de proteínas mediante el kit "2-D Clean-Up" (GE Healthcare). Las condiciones de corrida del isoelectroenfoque utilizadas fueron las sugeridas por el fabricante del Ettan 3 IPGphor (GE Healthcare). La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 10% sin gel separador.

El gel de SDS-PAGE, producto de la corrida en la segunda dimensión, una vez electrotransferido permitió determinar específicamente la posición y migración relativa de las proteínas de interés. Al comparar las posiciones en las dos condiciones en presencia del medio de células infectadas con HTLV-I o del medio de células controles donde no se observan desplazamientos significativos de las señales, sugiere que los productos virales,

específicamente Tax, no altera el estado de fosforilación de las subunidades. Cabe destacar que estos resultados no descartan categóricamente cambios en el grado de fosforilación de las subunidades de las proteínas motoras. Esto se debe, a que las variaciones en carga al encontrarse fosforiladas pueden estar bajo el límite de resolución o sensibilidad del 2D. Para resolver estos puntos, una vez establecidos los valores de pI en los que se aprecian las señales que representan las proteínas de estudio, se debería utilizar rangos más estrechos de pH en el isoelectroenfoque lo que permitiría mejorar la resolución y observar diferencias en la movilidad relativa en las distintas condiciones. Por otra parte, sería importante identificar mediante Espectrometría de Masas las subunidades y determinar las modificaciones postraduccionales presentes en las células sometidas a medios con productos virales del HTLV-I en comparación con los controles, observando por tanto el grado de fosforilación. Finalmente, otra alternativa la constituye el uso del Western Blot de anticuerpos específicos para la detección de especies fosforiladas de las subunidades de estos motores, no disponibles en el tiempo en que se desarrollaron los experimentos presentados en este escrito.

La subunidad KLCs de kinesina 1 (KLC1), que transporta componentes del citoesqueleto, mitocondrias y otras vesículas membranosas, al ser fosforilada por GSK3- β disminuye la unión y velocidad del transporte anterógrado (Morfini y cols 2002a; Vagnoni y cols, 2011). También se ha visto que la CAMKII fosforila a la familia de kinesina 2 (KLC2). Por otra parte, KHC es fosforilado por JNK3 y se observa reducción de la unión a microtúbulos e inhibición del transporte (Morfini y cols, 2009) produciendo una liberación de los cargos (Guillaud y cols, 2007; Vagnoni y cols, 2011). Si efectivamente no hay cambios en el grado de fosforilación, significaría que Tax extracelular no afecta las vías que den cuenta del aumento de activación de dichas enzimas. Hay estudios en PC12 que muestran que la fosforilación de la cadena intermedia de dineína por MAP quinasa ERK 1/2 (Mitchell y col, 2012), que corresponde a una quinasa regulada extracelularmente por la vía de Trk, inicia el reclutamiento de dineína hacia los endosomas para su transporte retrógrado. Esta misma cadena fosforilada disminuye su interacción con dinactina, proteína considerada como un adaptador del cargo.

De estas quinasas, ya se ha descartado en nuestro grupo de investigación que Tax afecta la actividad quinásica de GSK3- β (Quintremil, 2012). Otro dato importante obtenido en el Laboratorio es que Tax, en células PC12, produce una disminución de la forma fosforilada de la fosfatasa PP2A, lo que sugiere que su actividad estaría aumentada, y junto con esto se ha encontrado una disminución de la actividad de Cdk5 (Quintremil, 2012). Esto en su conjunto implica que hay que realizar estudios sobre cambios en el balance entre actividades quinásicas y fosfatásicas, y además en su localización donde en el cono de crecimiento podrían dar cuenta del efecto del retardo en crecimiento neurítico producido por Tax.

La electroforesis bidimensional es una herramienta ampliamente utilizada en estudios de proteómica relacionados con la detección de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones, entre otras. El haber encontrado resultados reproducibles en muestras de los lisados celulares de PC12 sometidas a la exposición de productos virales de HTLV-I y su condición control es un importante logro para futuros estudios. Para poder estudiar fosforilaciones por ejemplo, mediante Espectrometría de Masas, se requiere de disponer de muestras de estas subunidades de kinesina y dineína mucho más concentradas, puesto que las bandas detectadas por Western Blot no correlacionan con bandas de proteínas en la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional. Para concentrar estas subunidades en lisados de células PC12, se podría inicialmente inmunoprecipitarlas, sometiéndolas luego a electroforesis bidimensional. Posteriormente, las bandas del gel que corresponden a dichas proteínas, deducido por el Western Blot, se removerían del gel para someterlas a proteólisis con tripsina con el objeto de identificar secuencias fosforiladas por Espectrometría de Masas.

Si se requiriera aún una mayor concentración de los péptidos fosforilados de las subunidades de kinesina y dineína presentes en las bandas proteolizadas del gel, se podrían absorber en columnas de Galio ampliamente utilizadas para concentrar fosfopéptidos. Así se dispondrían de muestras más concentradas de péptidos fosforilados lo que facilitaría la detección por Espectrometría de Masas de secuencias fosforiladas en muestras de PC12 sometidas a la exposición de productos virales comparado con condiciones controles.

8. Conclusiones

1. El retardo en el crecimiento neurítico de células PC12 debido a la exposición de productos secretados del HTLV-I puede ser bloqueado con anticuerpo anti-Tax. Por lo que se deduce que esta proteína viral participa en el efecto deletéreo observado.
2. Las subunidades de kinesina KIF5, cadena pesada y liviana y la cadena intermedia de la dineína citoplasmática, no presentan cambios en sus niveles proteicos en células PC12 durante los 3 días de diferenciación al ser expuestas a la acción de Tax extracelular secretada de células MT-2. Al tercer día de diferenciación no existe diferencia significativa en el punto isoeléctrico de estas subunidades en la condición MT-2 comparada con el control K562.
3. La hipótesis propuesta *“La exposición a productos secretados de linfocitos infectados por HTLV-I provoca un aumento en el estado de fosforilación de proteínas motoras en modelo neuronal de células PC12”* no se cumple en vista de los resultados obtenidos en este trabajo; sin embargo, los métodos empleados no son suficientes para descartarla completamente, ya que se pueden utilizar otros métodos con mejor resolución y sensibilidad como es el uso de anticuerpos específicos contra especies fosforiladas.

9. Referencias

- Afonso PV, Ozden S, Cumont MC, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, Lambert S, Huerre M, Gessain G, Couraud PO, Pique C, Ceccaldi PE, Romero IA. Alteration of Blood–Brain Barrier integrity by retroviral infection. *Plos Pathogen*, 2008;4:e1000205.
- Alberti C. Estudio de la progresión de la Paraparesia Espástica Tropical mediante la cuantificación de marcadores de linfocitos T reguladores, variaciones en las modificaciones postraduccionales de Tax y migración de linfocitos hacia el Sistema Nervioso Central”. 2012. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Alefantis T, Jain P, Ahuja J, Mostoller K, Wigdahl B. HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *J Biomed Sci*. 2005;12:961-74.
- Araya N, Sato T, Yagishita N, Ando H, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and regulatory T Cells in HTLV-1 associated neuroinflammatory Disease. *Viruses* 2011;3:1532-48.
- Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, Kaibuchi K. Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9973-84.
- Avila J., Lucas J., Pérez M., Hernández F. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol Rev*. 2004;84:361–84.
- Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, and Wigdahl. Human T cell leukemia virus type-I induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*. 2003;308:1-12.
- Bidoia C. Human T-lymphotropic virus proteins and post-translational modification pathways. *World J Virol* 2012;1:115-30.
- Blackstone C. Cellular Pathways of Hereditary Spastic Paraplegia. *Annu Rev Neurosci* 2012; 35:25-47.
- Blair MA, Ma S, Hedera P. Mutation in KIF5A can also casue adult-onset hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics*. 2006;7:47-50.
- Brown M, Jacobs T, Eickholt B, Ferrari G, Teo M, Monfries C, Qi RZ, Leung T, Lim L, Hall C. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci*. 2004;24:8994-9004.
- Buczynski, Yanagihara R, Mora C, Cartier L, Verdugo A, Araya F, Castillo L, Gibbs CJ, Gajdusek CD, Rogers-Johnson P, Liberski PP. Tropical spastic paraparesis. *Folia Neuropathol*. 2001;39:265-9.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000. 33;95-130.

- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Camemolla B, Orecchia P, Zardi L, Rigetti PG. Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25:1327-33.
- Cartier L, Araya F, Castillo JL, Ruiz F, Gormaz A, Tajima K. Progressive spastic paraparesis associated with human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Intern. Med*. 1992;31:1257-61.
- Cartier L, Tajima K, Araya F, Castillo JL, Zaninovic V, Hayami M, Imai J, Born P, Cárdenas M, Moreno J, et al. Preliminary study of HTLV-I seroprevalence in Chilean Indian populations. *Rev Med Chil* 1993;121:241-6.
- Cartier L, Cea JG, Vergara C, Araya F, Born P. Clinical and neuropathological study of six patients with spastic paraparesis associated with HTLV-I: An axomyelinic degeneration of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:403-13.
- Cartier L, Ramírez E, Galeno H. HTLV-I Tax gene on the etiological identification of tropical spastic paraparesis. A clinical, serological and polymerase chain reaction (PCR) study in 72 patients. *Rev Med Chil*. 1999;127:945-52.
- Cartier L, Vergara C, Valenzuela MA. Inmunohistoquímica de los cambios degenerativos del sistema nervioso central en paraparesias espásticas asociadas al virus linfotrópico humano T tipo I (HTLV-I). *Rev Med Chil* 2007;135:1139-46.
- Cartier L. Paraparesia espástica progresiva asociada a HTLV-I en Chile: Estudio y seguimiento de 121 pacientes por diez años. *Rev. chil. neuro-psiquiatr*. 2009;47:50-66.
- Chae YC, Lee S, Heo K, Ha SH, Jung Y, Kim JH., Ihara Y, Suh P-G, Ryu SH. Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity. *Cell Signal*. 2009; 21:1818–26.
- Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C. Stable ubiquitination of human T cell leukemia virus type 1 Tax is required for proteasome binding. *J Virol*. 2004;78:11823-32.
- Cole AR, Soutar MP, Rembutsu M, Van Aalten L, Hastie CJ., Mclauchlan H, Peggie ., Balastik M., Lu KP, Sutherland C. Relative Resistance of CDK5-phosphorylated CRMP2 to dephosphorylation. *J Biol Chem*. 2008;283:18227-37.
- Coleman M. Axon degeneration mechanism: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:889-998.
- Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:319-32.
- Crews L, Ruf R, Patrick C, Dumaop W, Trejo-Morales M, Achim CL, Rockenstein E, Masliah E. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 disrupts neuronal maturation in a model of adult neurogenesis: Implications for neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener*. 2011;6:67.
- DeBoer SR, You Y, Szodorai A, Kaminska A, Pigino G, Nwabuisi E, Wang B, Estrada-Hernandez T, Kins S, Brady ST, Morfini G. Conventional Kinesin Holoenzymes Are Composed of Heavy and Light Chain Homodimers. *Biochemistry* 2008 47: 4535-4543.

- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:151-73.
- Deo RC, Schmidt EF, Elhabazi A, Togashi H, Burley SK, Strittmatter SM. Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO J* 2004;23:9-22.
- Derse D, Heidecker G. Virology. Forced entry—or does HTLV-I have the key?. *Science*. 2003; 299:670-1.
- Dillman JF 3rd, Pfister KK. Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles. *J Cell Biol*. 1994; 127:1671-81.
- Duncan JE, Goldstein LS. The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet*. 2006;2:e124.
- Durkin SS, Ward MD, Fryrear KA. Site-specific phosphorylation differentiates active from inactive forms of the Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax oncoprotein. *J Biol Chem* 2006;281:31705-12.
- Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, Kawakami A, Terada K, Shimada H, Kawabe Y. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: Clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis*. 1992; 51:769–76.
- Evans K, Keller C, Pavur K, Glasgow K, Conn B, Luring B. Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggest a common pathway for axonal maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 11; 103:10666-71.
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Gaeta L, Casari G, Ballabio A, Rugarli EI. Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest*. 2004;113:231-42.
- Fichera M, Lo Giudice M, Falco M, Sturnio M, Amata S, Calabrese O, Bigoni S, Calzolari E, Neri M. Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology*. 2004 Sep 28;63:1108-10.
- Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 1995;86:3619-39.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 2002;4:583-91.
- Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*. 2005;5;24:5926-30.
- Gallo RC. Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. *Best Pract Res Clin Hematol*. 2011;24:559-65.
- Gessain A, Gout O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med*. 1992;117:933-46.

- Godoy AJ, Kira K, Hasuo K, Goto I. Characterization of cerebral white matter lesions of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in comparison with multiple sclerosis and collagen-vasculitis: a semiquantitative MRI study. *J Neurol Sci.* 1995;133:102-11.
- Godoy F. Detección de la proteína viral Tax en muestras de plasma de pacientes infectados con HTLV-1. 2011. Memoria para optar al título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile.
- Guillaud L, Wong R, Hirokawa N. Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:19-29.
- Gyoeva FK, Sarkisov DV, Khodjakov AL, Minin AA. The tetrameric molecule of conventional kinesin contains identical light chains. *Biochemistry.* 2004;43:13525-31.
- Hancock WO, Howard J. Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:13147-52.
- Hancock WO, Howard J. Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol.* 1998. 23;140:1395-405.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 2009;15:112-9.
- Hirokawa N., Noda Y. 2008. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics. *Physiol Rev.* 2008;88:1089-118.
- Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y., Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 682-96.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron.* 2010;68:610-38.
- Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, Ferguson G, Slinn J, Hu H, Leung T, Kappler J, Kaibuchi K. CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity. *J Neurochem* 2009;111:870-81.
- Hurd D, Saxton W. Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics,* 1996;144:1075-85.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science,* 2003;299:1713-6.
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4:781-2.
- Ito Y, Oinuma I, Katoh H, Kaibuchi K, Negishi M. Sema4D/plexin-B1 activates GSK-3beta through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep.* 2006;7:704-9.
- Jain P, Mostoller K, Flaig KE, Ahuja J, Lepoutre V, Alefantis T, Khan ZK, Wigdahl B. Identification of human T cell leukemia virus type 1 Tax amino acid signals and cellular factors involved in secretion of the viral oncoprotein. *J Biol Chem.* 2007;;282:34581-93.

- Journo C, Douceron E, Mahieux R. HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol.* 2009;4:425-40.
- Joshi HC, Cleveland J. Differential utilization of β -tubulin isoforms in differentiating neurites. *J Cell Biol.* 1989;109:663-73.
- Karle KN, Möckel D, Reid E, Schöls L. Axonal transport deficit in a KIF5A^{-/-} mouse model. *Neurogenetics.* 2012;13:169–79.
- Kashanchi F, Brady JN. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene.* 2005;24:5938-51.
- Keeney JT, Swomley AM, Harris JL, Fiorini A, Mitov MI, Perluigi M, Sultana R, Butterfield DA. Cell cycle proteins in brain in mild cognitive impairment: insights into progression to Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 2012;22:220-30.
- Kettlun AM, Cartier L, García L, Collados L, Vásquez ., Ramírez E, Valenzuela M A. TIMPs and MMPs expression in CSF from patients with TSP/HAM. *Life Sciences.* 2003;72:2863–76.
- Kobayashi N, Konishi H, Sabe H, Shigesada K, Noma T, Honjo T, Hatanaka M. Genomic structure of HTLV-I (human T-cell leukemia virus): detection of defective genome and its amplification in MT-2 cells. *EMBO J.* 1984;3:1339-43.
- Kfoury Y, Nasr R, Journo C, Mahieux R, Pique C, Bazarbachi A. The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF- κ B activation. *Adv Cancer Res.* 2012;113:85-120.
- Khodjakov A, Lizunova EM, Minin AA, Koonce MP, Gyoeva FK. A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. *Mol Biol Cell.* 1998;9:333-43.
- Kushida S, Mizusawa M, Tanaka H, Ami Y, Hori M, Yagami K, Kameyama T, Tanaka Y, Yoshida A. High incidence of HAM/TSP-like symptoms in WKA rats after administration of human T-cell leukemia virus type 1-producing cell. *J Virol* 68:7221-7226.
- Kwon M, Seo S, Chun H, Chung J, Chung I, Hur K. Dual effect of nerve growth factor on cell death of PC12 cells induced by serum deprivation. *Mol Cells.* 2002;13:167-74.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
- Lairmore MD, Anupam R, Bowden N, Haines R, Haynes RA 2nd, Ratner L, Green PL. Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. *Viruses.* 2011;3:1131-65.
- Lee KD, Hollenbeck PJ. Phosphorylation of kinesin in vivo correlates with organelle association and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1995; 10;270:5600-5.
- Liu R, Wang JZ. Protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Pathophysiology.* 2009;16:273-7.
- Luo L, O'Leary DD. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:127–56.
- Maldonado H, Ortiz-Riaño E, Krause B, Barriga A, Medina F, Pando ME, Alberti C, Kettlun AM, Collados L, García L, Cartier L, Valenzuela MA. Microtubule proteins and their post-

- translationally forms in cerebrospinal fluid of patients with paraparesis associated to HTLV-I infection and in SH-SY5Y cells, an in vitro model of HTLV-I-induced disease. *Biol Res.* 2008;41:239-59.
- Maldonado H, Ramirez E, Utreras E, Pando ME, Kettlun AM, Chiong M, Kulkarni AB, Collados L, Puente J, Cartier L, Valenzuela MA. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 but not of glycogen synthase kinase 3- β prevents neurite retraction and tau hyperphosphorylation caused by secretable products of human T-cell leukemia virus type I-infected lymphocytes. *J Neurosci Res.* 2011;89:1489-98.
- Marriot S, Semmes O. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene.* 2005;24:5986-95.
- Medina F. Modificaciones potraduccionales e interaccion con calreticulina de la proteina viral Tax en linfocitos infectados con HTLV-1 y su relacion con la evolucion de la Paraparesia Espatica Tropical. 2010. Tesis de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Méndez E, Kawanishi T, Clemens K, Siomi H, Soldan SS, Calabresi P, Brady J, Jacobson S. Astrocyte-specific expression of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Tax: induction of tumor necrosis factor alpha and susceptibility to lysis by CD8+ HTLV-1-specific cytotoxic T cells. *J Virol.* 1997;71:9143-9.
- Mitchell D, Blasier K, Jeffery E, Ross M, Pullikuth A, Suo D, Park J, Smiley W, Lo K, Shabanowitz J, Deppmann C, Trinidad J, Hunt D, Catling A, Pfister K. Trk activation of the ERK1/2 kinase pathway stimulates intermediate chain phosphorylation and recruits cytoplasmic dynein to signaling endosomes for retrograde axonal transport. *J Neurosci.* 2012;32:15495-510.
- Mitsui N, Inatome R, Takahashi S, Goshima Y, Yamamura H, Yanagi S. Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *EMBO J.* 2002;21:3274-85.
- Mogensen TH y Paludan S. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001;65:131-50.
- Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* 2002a; 1;21:281-93.
- Morfini G, Pigino G, Beffert U, Busciglio J, Brady ST. Fast axonal transport misregulation and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2002b; 2:89-99.
- Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant HC, Pigino G, DeBoer S, Beffert U, Brady ST. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J.* 2004; 2;23:2235-45.
- Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, Brown RH Jr, Brown H, Tiwari A, Hayward L, Edgar J, Nave KA, Garberrn J, Atagi Y, Song Y, Pigino G, Brady ST. Axonal transport defect in neurodegenerative diseases. *J Neurosci.* 2009; 14;29:12776-86.
- Musumeci O, Bassi MT, Mazzeo A, Grandis M, Crimella C, Martuzzi A, Tosacno A. A novel mutation in KIF5A gene causing hereditary spastic paraplegia with axonal neuropathy. *Neurol Sci* 2011;32:665-8.

- Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-I cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med.* 2010;16:83-9.
- Pando ME. Efecto de productos de secrecion de celulas infectadas con el virus HTLV-I sobre el crecimiento y retraccion neuritica en celulas PC12. 2010. Tesis de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Park SH, Zgu PP, Parker RL, Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest.* 2010; 120:1097-110.
- Peloponese JM Jr, Iha H, Yedavalli VR, Miyazato A, Li Y, Haller K, Benkirane M, Jeang KT. Ubiquitination of human T-Cell leukemia virus type 1 Tax modulates its activity. *J Virol.* 2004;78:11686-95.
- Petratos S, Li QX, George AJ, Hou X, Kerr ML, Unabia SE, Hatzinisiriou I, Maksel D, Aguilar MI, Small DH. The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism. *Brain.* 2008;131:90-108.
- Proietti F, Carneiro-Proietti A, Cataln-Soares B, Murphy E. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005;24:6058-68.
- Quintremil S, Estudio de la secreción de Tax, su interacción con Calreticulina y sSEMA-4D en linfocitos infectados con HTLV-I y su efecto sobre las actividades quinásicas y fosfatásicas en células PC12 durante su diferenciación a tipo neuronal. 2012. Tesis de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Rafatpabah H., Farid R., Golanbar G., Jabbari A. HTLV-I Infection: virus structure, immune response to the virus and genetic association studies in HTLV-I-infected individuals. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2006;5:153-66.
- Ramirez E, Fernandez J, Cartier L, Villota C., Rios M. Defective human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/ HTLV-1 – associated myelopathy (TSP/ HAM) patients. *Virus Res.* 2003; 91:231-9.
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson ., Graham F, Gaskell ., Dearlove ., Pericak-Vance M, Rubinsztein ., Marchuk D. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 2002;71:1189-94.
- Rembutsu M, Soutar MP, Van Aalten L, Gourlay R, Hastie CJ, McLauchlan H, Morrice NA, Cole AR, Sutherland C. Novel procedure to investigate the effect of phosphorylation on protein complex formation *in vitro* and in cells. *Biochemistry* 2008; 47:2153-61.
- Reyes J. Proteínas secretadas por linfocitos T infectados con HTLV-I producen hiperfosforilación de la proteína CRMP-2 en células SH-SY5Y y PC12. 2011. Memoria para optar al título Profesional de Bioquímico. Universidad de Chile.
- Rudrabhatla P, Pant HC. Role of protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2011; 8:623-32.
- Runnegar MT, Wei X, Hamm-Alvarez SF. Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function. *Biochem J.* 1999; 15;342:1-6.

- Sayas CL, Avila J, Wandosell F. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:144–153.
- Tanaka E, Ho T, Kirschner MW. The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol*. 1995; 128:139-55.
- Tanaka G, Okayama A, Watanabe T. The clonal expansion of human T lymphotropic virus type I-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J Infect Dis* 2005;191:1140-47.
- Tang BL. Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors. *Cell Adh Migr*. 2009; 3:118-28.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76:4350-4.
- Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, Nakamura F, Takei K, Ihara Y, Mikoshiba K, Kolattukudy P, Honnorat J, Goshima Y. Semaphorin3A signalling is mediated via sequential CDK5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* 2005;10:165-79.
- Vagnoni A, Rodriguez L, Manser C, De Vos K, Miller C.. Phosphorylation of kinesin light chain 1 at serine 460 modulates binding and trafficking of calyculin-1. *J Cell Sci*. 2011;124:1032-42.
- Vásquez P. HTLV-I (Human T-cell lymphotropic virus), ¿algo que decir? *Rev Chil Infect* 2003;20 (Supl 1):S34-S37.
- Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* 2007;7:266-81.
- Watanabe M, Ohsugi T, Shoda M, Ishida T, Aizawa S, Maruyama-Nagai M, Utsunomiya A, Koga S, Yamada Y, Kamihira S, Okayama A, Kikuchi H, Uozumi K, Yamaguchi K, Higashihara M, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood*. 2005;106:2462-71.
- Wycuff DR, Marriott SJ. The HTLV-I Tax oncoprotein: Hyper-Tasking at the molecular level. *Front Biosci*. 2005;10:620-42
- Zaninovic V. Similarities between Tropical Spastic Paraparesis (TSP) and neurolathyrism. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*. 2001;2;11-4.