

UCH-FC  
MAE-B  
C.246  
C.1

**INTERACCIONES MACROMOLECULARES ENTRE  
MICROTUBULOS Y FILAMENTOS INTERMEDIOS  
EN CELULAS EN CULTIVO**

**Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias con mención en Biología**

**Facultad de Ciencias  
por  
María Carolina Capote Jofré  
Diciembre, 1994**



**Director de Tesis: Dr. Ricardo Maccioni**

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

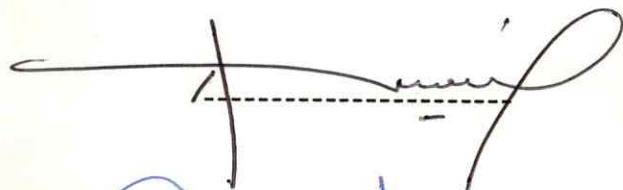
## INFORME DE APROBACION DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis  
de Magister presentada por la candidata

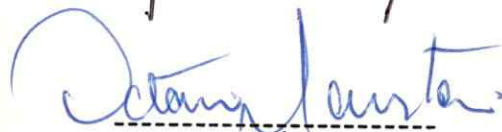
**María Carolina Capote Jofré**

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para  
la obtención del grado académico de Magister en Ciencias.

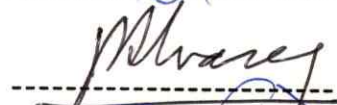
**Director de Tesis**  
Dr. Ricardo Maccioni



**Comisión Informante**  
Dr. Octavio Monasterio



Dr. Jaime Alvarez



Dr. Tulio Núñez



Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Ricardo B. Maccioni en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Esta tesis fue realizada con el apoyo del International Center for Cancer & Developmental Biology, ICC y financiada parcialmente por los siguientes proyectos: proyecto Fondecyt # 92-1180, Council Tobacco Research, USA # 1913R2 y de la Comunidad Europea Conicyt CEI\* 0876 al Director de la tesis; beca PG-079/093 de la Vicerrectoría Académica y Estudiantil de la Universidad de Chile a la tesista y por fondos provenientes de los programas de investigación del ICC.

A mi querida madre, Gabriela  
a mi amado esposo Francisco y  
a mi María José.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que durante mi estadía en este Programa de Postgrado contribuyeron no sólo a mi formación profesional sino también a mi desarrollo personal.

Al Dr. Ricardo Maccioni por haberme aceptado en su Laboratorio y por haber contribuido de manera importante en mi formación profesional. Le doy las gracias por toda la confianza que depositó en mí y en mi trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Claudio Barros por el cariño y confianza que me ha brindado, por el ejemplo recibido y por su apoyo económico en las etapas iniciales de este Programa.

A mis queridos y "especiales" compañeros de laboratorio: Verónica, Lucía, Juan Pablo, Gustavo, Daniel y Mauricio, a quienes agradezco profundamente el haberme acogido y apoyado durante todo el tiempo compartido. Resulta difícil expresar todo lo vivido y aprendido junto a todos y a cada uno de ellos. Agradezco en forma especial a Juan Pablo y a Daniel por su ayuda generosa y su inagotable paciencia y a Mauricio por su especial humor y sentido práctico que tanto me ayudaron.

A mis amigos de siempre, Clarisa, Ariel, Soledad, Paulina, Andrea, Nancy, Javier y Claudio, con quienes he compartido tantas ilusiones, ideales,

momentos felices e incluso difíciles, pero sin duda quienes han significado una valiosa compañía y apoyo. En especial a mi querida amiga Clarisa a quien agradezco todo su cariño y amistad.

Quiero agradecer a Rubén Peña por su excelente trabajo fotográfico y por su buena disposición y paciencia para aceptar mis trabajos.

A todos los Profesores del Programa de Postgrado en Ciencias, en especial al Dr. M. Roseblatt, a M. Rosa Bono y a Valeska Simon por su desinteresada ayuda en momentos importantes del desarrollo de esta tesis.

A mi familia, a mi querido y recordado padre, a mi madre, a mis hermanas Paulina y M. Gabriela y a mis suegros, cuyo constante apoyo y ayuda fueron de gran importancia.

Finalmente agradezco a mi amado Francisco y a mi hija María José por su apoyo y estímulo constante y sin los cuales nada tendría sentido.

De todo lo logrado y aprendido nada habría sido posible sin tu ayuda, Señor.

## INDICE DE MATERIAS

	Pag.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCION	6
1.1 El citoesqueleto	6
1.2 Los microtúbulos	7
1.3 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)	7
1.4 Proteínas de los filamentos intermedios	10
1.5 Interacciones macromoleculares que estabilizan la citoestructura	14
1.6 Objetivo central de la investigación	18
1.7 Modelo biológico	19
1.8 Objetivos específicos	20
2. MATERIALES Y METODOS	21
2.1 Cultivo celular	21
2.2 Preparación de proteínas del citoesqueleto	21
2.3 Preparación de citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios.	22
2.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida- SDS	23
2.5 Electrotransferencia de proteínas seguida por inmunotinción	23
2.6 Purificación de proteínas microtubulares	24
2.7 Purificación de la proteína tau	26



2.8	Ensayos de co-sedimentación	27
2.9	Ensayos de unión directa ("Overlay")	27
2.10	Cromatografía de afinidad de la proteína tau en columnas de DNA de hebra simple con vimentina unida.	28
2.11	Experimentos de inmunofluorescencia indirecta	29
2.12	Experimentos de inmunofluorescencia indirecta mediante citometría de flujo.	30
3.	RESULTADOS	32
3.1	Estudio del efecto de una red estructurada de FI sobre el resto de los componentes del citoesqueleto.	32
	-Análisis subcelular	34
	-Análisis de la presencia de proteínas del citoesqueleto en células SW-13 mediante citometría de flujo.	43
3.2	Estudios de interacción vimentina-MAPs	46
	-Ensayos de co-sedimentación entre vimentina y tau	46
	-Ensayos de unión directa entre vimentina y tau	48
	-Ensayos de unión directa entre vimentina y MAP-2	50
	-Interacción entre vimentina y tau en columnas de afinidad DNA de hebra simple.	54
	-Estudios de co-distribución de las redes de tubulina, vimentina y tau.	56
4.	DISCUSION	63
4.1	Las ventajas del modelo celular SW-13 y células mutantes para análisis de las interacciones vimentina-tau.	63

4.2	Relación entre filamentos intermedios y organización citoplasmática.	64
4.3	Interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina mediada por tau.	67
4.4	Importancia funcional de la interacción entre vimentina y tau.	75
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	80
	<b>APENDICE</b>	93

## INDICE DE FIGURAS

Pág.

FIGURA 1:	Caracterización de la presencia de proteínas del citoesqueleto de células SW-13 vim(+) y vim(-).	33
FIGURA 2:	Caracterización de la presencia de proteínas de los filamentos intermedios en células SW-13 vim(+) y vim(-).	35
FIGURA 3:	Presencia de tau en células SW-13 vim(+) y vim(-).	36
FIGURA 4:	Localización y distribución subcelular de tubulina en células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).	38
FIGURA 5:	Localización y distribución subcelular de actina en células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).	39
FIGURA 6:	Localización y distribución subcelular de proteínas de filamentos intermedios en células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).	40
FIGURA 7:	Localización y distribución de tau en células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).	41
FIGURA 8:	Localización y distribución subcelular de una proteína del tipo MAP-2 en células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).	42
FIGURA 9:	Distribución de la inmunofluorescencia de células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-) marcadas con anticuerpos contra diferentes proteínas del citoesqueleto.	44

FIGURA 10A: Estudio de la asociación de vimentina y tau en células SW-13 vim(+).	47
FIGURA 10B: Estudio de la asociación de tau y fracciones de citoesqueleto de células SW-13 vim(-).	49
FIGURA 11: Caracterización de proteínas del citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios de células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).	51
FIGURA 12: Estudio de la interacción entre vimentina y tau.	52
FIGURA 13: Estudio en células SW-13 vim(+) de la interacción entre vimentina y MAP-2 de proteína microtubular.	53
FIGURA 14: Estudio de la interacción entre tau y vimentina unida a una matriz de DNA de hebra simple-celulosa en células SW-13 vim(+).	55
FIGURA 15: Co-distribución de tau con microtúbulos en células SW-13 vim (+) en cultivo.	57
FIGURA 16: Co-distribución de las redes de microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina en células SW-13 vim(+) en cultivo.	58
FIGURA 17: Co-distribución de tau y filamentos intermedios de vimentina en células SW-13 vim(+) en cultivo.	59
FIGURA 18: Efecto de la despolimerización de microtúbulos y microfilamentos sobre la co-distribución de tau y filamentos de vimentina en células SW-13 vim(+).	61

- FIGURA 19:** Efecto de la recuperación de las redes de microtúbulos y de actina sobre la co-distribución de tau y vimentina en células SW-13 vim (+). 62
- FIGURA 20:** Representación esquemática de la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina mediada por tau. 79

## INDICE DE TABLAS

Pág.

TABLA I:	Estudio por citometría de flujo de la presencia de proteínas del citoesqueleto de células SW-13 vim(+) y vim(-).	45
----------	--	----

## ABREVIATURAS

BCIP	:	fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol
BSA	:	albúmina de suero de bovino
C-terminal	:	carboxilo-terminal
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
DNAsa I	:	desoxirribonucleasa I
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	:	ácido etilenglicoltetraacético
ELISA	:	ensayo inmunoabsorbente de unión enzimática
FAL	:	fosfatasa alcalina
FI	:	filamentos intermedios
FITC	:	isotiocianato de fluoresceína
GFAP	:	proteína ácida fibrilar de la glia
GTP	:	guanosin trifosfato
IgG	:	inmunoglobulina G
IFAPs	:	proteínas asociadas a filamentos intermedios
IFI	:	inmunofluorescencia indirecta simple
IMF	:	intensidad media de fluorescencia
kDa	:	kilo-Daltons
MAPs	:	proteínas asociadas a microtúbulos
MES	:	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MIP-90	:	proteína que interactúa con microtúbulos de 90 kDa
NBT	:	azul de nitrotetrazolio
N-terminal	:	amino-terminal
PBS	:	tampón fosfato salino
PAGE	:	electroforesis en geles de poliacrilamida
PMSF	:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SBTI	:	inhibidor del poroto de soya
SFB	:	suero fetal de bovino
TEM	:	tampón estabilizador de microtúbulos
TRITC	:	isotiocianato de tetraodamina
Tris	:	tris-(hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

Existe abundante evidencia que los distintos filamentos que constituyen el citoesqueleto se encuentran interconectados, y que la trama de interacciones macromoleculares que se establecen entre ellos junto a su dinámica de ensamblaje y desensamblaje es la base de numerosos procesos celulares. Al respecto, estudios *in vitro* apuntan hacia las interacciones entre microtúbulos y los sistemas de microfilamentos y filamentos intermedios. Se ha planteado que las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) actuarían como mediadores en estas interacciones. Recientemente, experimentos realizados con diferentes líneas celulares humanas y de ratón han sugerido que tau jugaría un papel crítico en la regulación de la interacción entre microtúbulos y fibras de estrés formadas por actina (Cross et al., 1993).

Mediante un enfoque integrado que incluyó estudios bioquímicos e inmunológicos, analizamos la participación de la proteína tau como mediadora de la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina en la línea de adenocarcinoma SW-13. Esta línea celular presenta la ventaja de poseer clones que son deficientes en la expresión de filamentos intermedios (vim-). Así hemos analizado la relación entre la presencia de una red estructurada de filamentos de vimentina y la organización del citoesqueleto. Experimentos de co-sedimentación de tau purificada de cerebro de bovino con vimentina de preparaciones enriquecidas en filamentos intermedios, unión directa de tau a vimentina electrotransferida, unión de tau a columnas de DNA conteniendo vimentina junto con estudios de inmunofluorescencia realizados en células tratadas con drogas que despolimerizan las redes de microtúbulos y de actina, indican que tau juega un papel mediador en la interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina a nivel celular.



Por otra parte, experimentos de inmunofluorescencia en estas células sugieren que la ausencia de una red estructurada de vimentina en células vim (-) no afectaría la organización citoplasmática de las redes de microtúbulos y filamentos de actina, así como la distribución de MAP-2 y tau, al compararse con los patrones de estos filamentos en el clón vim (+). Estos resultados fueron confirmados mediante un análisis cuantitativo por inmunofluorescencia y citometría de flujo de tubulina, vimentina y tau en células vim+ y vim-. En este contexto, una observación interesante fue la disminución en el contenido de tau asociada a la red del citoesqueleto en las células vim- que carecen de vimentina, lo cual indica que existiría una relación entre la presencia de una red de vimentina y la organización de tau. Estas evidencias entregan una valiosa información en relación al modelo propuesto en el cual tau cumpliría un papel modulador en la estabilización de los patrones de interacción que determinan la organización de la red arquitectónica de la célula.

## ABSTRACT

There is cumulative evidence that the filamentous structures that form the cytoskeletal network are interconnected, and that their interaction patterns along with their intrinsic dynamics are the basis for a number of cellular processes essential for cell's life. Within this context, *in vitro* studies point to the interactions between microtubules with microfilaments and the intermediate filament system. It has also been postulated that microtubule-associated proteins (MAPs) are directly involved in mediating these interactions. Furthermore, recent studies using human and rodent cell lines have indicated that tau play a critical role in the regulation of microtubule interactions with stress fibers in transformed cells (Cross et. al., 1993).

The involvement of tau in modulating interactions between microtubules and vimentin filaments was analyzed in SW-13 adenocarcinoma cells, through an integrated approach that included biochemical and immunological studies. This cell line has the advantage of presenting mutant clones (vim-) which are deficient in the expression of vimentin. Thus, we analyzed the relationship between the presence of an structured vimentin network and cytoskeleton organization. Co-sedimentation experiments of microtubular protein with vimentin in cell extracts enriched in intermediate filaments, studies on the direct interaction of tau to vimentin immobilized in nitrocellulose, analysis of tau interaction with vimentin bound to single strand DNA columns, combined with immunofluorescence experiments in cells treated with drugs that depolymerize the microtubule or actin filament networks, indicate that tau play a role in modulating microtubule interactions with the vimentin network at the cellular level.

On the other hand, immunofluorescence studies on the SW-13 cells suggest that the absence of an structured network of vimentin in the mutant vim- cells

does not affect the cytoplasmic organization formed by microtubules and actin filaments, as well as tau and MAP-2 distribution patterns, when those were compared with the vim+ cells. These results were confirmed by an analysis of the immunofluorescence patterns and a quantitative study of cytoskeleton-associated tubulin, tau and vimentin using flow cytometry. In this regard, it was noteworthy to observe a decrease in the levels of tau associated to the cytoskeletal network in the mutant vim- cells as compared with the wild clone. These studies suggest the involvement of tau in modulating the interaction patterns between microtubules and vimentin filaments in cultured cells. This set of evidence provide valuable information in relation to the proposed model in which tau plays a critical role in the stabilization of the interaction patterns that define the organization of cell architecture.

## INTRODUCCION

### El citoesqueleto

El citoesqueleto de las células eucarióticas se encuentra estructurado por una red fibrosa de tres tipos de polímeros, esencialmente microtúbulos (Mt), formados por el ensamblaje de dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, microfilamentos de actina (Mf) y filamentos intermedios (FI), cuya composición proteica varía dependiendo de la naturaleza del filamento y de cada tipo celular. Los distintos polímeros que forman el citoesqueleto se encuentran interconectados formando una red tridimensional compleja donde ocurren numerosos procesos vitales para la célula, a la vez que contribuyen a la compartimentación de organelos citoplasmáticos. Esta red de filamentos, con la participación de un conjunto de proteínas asociadas determina la arquitectura interna de las células. Su integridad es de importancia para la morfogénesis citoplasmática, movimiento de los cromosomas en el huso mitótico, movimientos dirigidos de organelos y vesículas de transporte, así como el movimiento de cilios y flagelos (Maccioni y Arechaga, 1987; Wiche y cols., 1991). La organización dinámica del citoesqueleto, que le permite cumplir con las demandas celulares tanto en el lugar como en el momento apropiado, es el resultado de complejos procesos de ensamblaje y desensamblaje de la estructura de los polímeros que la constituyen. Los mecanismos de asociación de proteínas de los diferentes filamentos de la red del citoesqueleto están determinados por los equilibrios monómero-polímero, los cuales involucran interacciones macromoleculares homólogas entre un tipo de componentes ó heterólogas entre los componentes filamentosos y proteínas asociadas, y entre el citoesqueleto con otras estructuras de la célula (Ellisman y Porter, 1980; Vallee y cols., 1984; Maccioni, 1986; Correia y cols., 1983).

Los análisis morfológicos del citoesqueleto han mostrado que los distintos elementos que conforman esta red no se organizan en forma independiente, sino más bien integrados a nivel intracelular (Schliwa y cols., 1981). Dentro de este contexto, esta investigación se orientó hacia el estudio de los patrones de interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina y su contribución a la estabilización estructural de la red del citoesqueleto.

### Los microtúbulos

Los microtúbulos, aunque existen en prácticamente todas las células eucarióticas, se encuentran distribuidos en una mayor proporción en la célula neuronal diferenciada, principalmente en el cerebro (Maccioni, 1986; Hirokawa y cols., 1988; Himmler y cols., 1989). Están involucrados en diferentes funciones esenciales para la célula, incluyendo modulación de la forma celular, transporte intracelular de organelos, motilidad, secreción y división celular (Bershadsky y cols., 1988). Los microtúbulos juegan un papel importante en la determinación y mantención de la morfología de la célula nerviosa y son necesarios para la arquitectura del axón y en el transporte axonal (Mitchison y Kirschner, 1988). Estos son estructuras cilíndricas de 25nm de diámetro externo, constituidos por 13 protofilamentos que se disponen en forma paralela a su eje longitudinal, formados por el ensamblaje inducido por GTP de heterodímeros de  $\alpha$ - $\beta$ -tubulina (Maccioni y cols., 1977; Weisenberg, 1972; Maccioni y cols., 1986).

### Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)

Al aislar tubulina de cerebro, mediante ciclos de ensamblaje-desensamblaje, junto a ella copurifica un grupo de proteínas que han sido denominadas proteínas asociadas a microtúbulos, MAPs (Weingarten y cols., 1975; Hirokawa y cols., 1988). Estudios *in vitro* han demostrado que las MAPs aumentan la velocidad y los niveles de ensamblaje de la tubulina, ya que en su

ausencia se requiere una concentración significativamente mayor de tubulina para obtener niveles similares de ensamblaje (Morgan y Seeds, 1975; Lee y Timasheff, 1975). Esto indica que las MAPs reducen la concentración crítica de tubulina necesaria para formar los microtúbulos (Maccioni y Seeds, 1978; Maccioni y cols., 1985a). Las MAPs juegan un papel crucial en la regulación del ensamblaje de tubulina, estimulando la formación y la estabilidad de los microtúbulos. Algunas MAPs participan en interacciones de los microtúbulos con otros componentes del citoesqueleto (Griffith y Pollard, 1982; Maccioni y cols., 1989; Drubin y cols., 1984). Por otra parte, se han acumulado evidencias que indican que el ensamblaje *in vivo* de tubulina es dependiente de las MAPs (Olmsted, 1986). Los componentes de MAPs encontrados en tejido nervioso incluyen a las isoformas de alto peso molecular de MAP-1 y MAP-2 y los componentes de la proteína tau, de peso molecular intermedio (Bloom y cols., 1985; Wiche, 1985). Entre las MAPs de origen nervioso, las más extensamente estudiadas han sido la MAP-2 y tau (Vallee y cols., 1984).

La asociación de las MAPs a la tubulina parece estar mediada por la interacción de dominios con una carga neta positiva presentes en las MAPs con la tubulina y sus isoformas. Estos dominios de unión de las MAPs interactúan con dominios específicos de la región ácida C-terminal presentes en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la molécula de tubulina (Maccioni y cols., 1985 a,b). Evidencias más recientes han permitido demostrar que la región de baja homología entre las subunidades, definida por las secuencias aminoacídicas  $\alpha$ -(430-441) y  $\beta$ -(422-434), está directamente involucradas en la unión de MAP-2 y tau (Maccioni y cols., 1988; Cann y cols., 1988; Cross y cols., 1991). Estos últimos dominios que se encuentran expuestos en la superficie externa del microtúbulo, juegan un papel regulador importante en la interacción de las MAPs con tubulina (Maccioni y cols., 1985a; Serrano y cols., 1984).

La proteína tau funcionalmente activa en la polimerización de microtúbulos fue la primera MAP en la que se demostró una gran heterogeneidad, con isoformas entre 55-65 kDa (Cleveland, 1990; Lee y cols., 1989). Tau es codificada por un gen simple a partir del cual se producen las distintas isoformas de una manera que es regulada en el desarrollo a través de un procesamiento de empalme ("splicing") alternativo del RNA mensajero (Himmler y cols., 1989; Aniello y cols., 1991). Las secuencias primarias de los distintos isotipos de tau son altamente similares en sus dominios C-terminales, los cuales contienen tres o cuatro repeticiones que representan el dominio de unión a microtúbulos (Maccioni y cols., 1989). Los polipéptidos de tau son homólogos dentro de una misma especie, y muy conservados en general entre distintas especies, sobre la base de la información de su estructura primaria, mapas peptídicos y epítopes comunes (Kosik y cols., 1989). Se han podido diseñar métodos eficaces para la purificación de tau de tejido nervioso, basados en su asociación reversible al microtúbulo a través de repetidos ciclos de ensamblaje y desensamblaje, su termoestabilidad y solubilidad en ácido perclórico (Goedert y cols., 1988). La proteína tau y sus isoformas se encuentran distribuídas principalmente en las células del sistema nervioso, y estudios inmunocitoquímicos han demostrado que mensajeros de tau se encuentran localizados principalmente en los axones nerviosos (Drubin y cols., 1984; Couchie y cols., 1988; Himmler y cols., 1989). Más aún, se ha demostrado que la proteína tau anormalmente fosforilada es un componente importante de los filamentos helicoidales pareados en la enfermedad de Alzheimer (Wisshik y cols., 1988; Kosik y cols., 1986; Wood y cols., 1986; Farias y cols., 1993). Estudios inmunológicos realizados en diversas líneas celulares en cultivo, demostraron la presencia de componentes similares a tau en células en cultivo (Drubin y Kirschner, 1986), lo que ha llevado a sugerir que este componente de la familia de las MAPs podría no ser

exclusivo de las células de origen neuronal sino estar más ampliamente distribuido. Así, estudios recientes en este laboratorio, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales sitio-dirigidos contra los dominios de unión a microtúbulos presentes en tau, demostraron la presencia de proteínas tipo tau en diferentes líneas celulares en cultivo de origen humano y de ratón (Cross y cols., 1993). Componentes del tipo tau funcionalmente activos en sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* han sido identificados (Cambiazo y cols., 1994)

Tau copolimeriza con tubulina para inducir la formación de microtúbulos y proporcionar estabilidad a éstos, a través de la formación de conexiones laterales (Hirokawa y cols., 1988a). Sin embargo, la proteína tau representa un importante estabilizador de los microtúbulos en la célula (Drubin y cols., 1986) e induce el empaquetamiento de éstos para formar manojos (Kanai y cols., 1989; Lee y Rook, 1992). Esta observación llevó a sugerir que la capacidad de tau para promover el crecimiento de los microtúbulos podría jugar un papel crítico en el desarrollo y establecimiento de la morfología axonal (Knops y cols., 1991).

### Proteínas de los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios son un componente fundamental del citoplasma de todas las células eucarióticas. A pesar que la composición proteica de estos filamentos difiere de una manera que es específica para cada tipo celular, ellos están presentes en casi todas las células de los vertebrados (Traub, 1985). Los filamentos intermedios tienen usualmente un diámetro de 10nm, y contienen proteínas específicas para cada filamento en una configuración de ovillo sobreenrollado ("coiled-coil") (Goldman y cols., 1986). A pesar de su similitud morfológica, física y química, ellos representan una familia multigénica altamente diversa de elementos del citoesqueleto (Zackroff y cols., 1981; Steinert y cols., 1984; Wang y cols., 1985). Las proteínas de los filamentos intermedios



han sido subdivididas tradicionalmente en seis clases principales sobre la base de su expresión tejido-específica y comparaciones de secuencia (Stewart, 1990). El tipo I está formado por las keratinas ácidas (44-60 kDa); tipo II, las keratinas neutras y básicas (50-70 kDa), encontradas en los epitelios; el tipo III está formado por vimentina (58 kDa) de origen mesenquimal encontrada en muchas células en cultivo, la desmina de células miogénicas (53 kDa), y la proteína ácida fibrilar de células de glia y astrocitos, GFAP (51 kDa). Entre otras, las proteínas de los neurofilamentos del sistema nervioso NF-L (60-70 kDa), NF-M (105-110 kDa), NF-H (135-150 kDa) corresponden al tipo IV (Steinert y Roop, 1988). Recientemente se han incluido dentro de la familia de las proteínas de los filamentos intermedios, a proteínas que forman el complejo de la lámina nuclear en la superficie interna de la membrana nuclear (Franke, 1987). Todas las proteínas de los filamentos intermedios poseen un extenso dominio central de estructura elongada que contiene segmentos con configuración  $\alpha$ -hélice, delimitado por dominios globulares de cabeza N-terminal y de cola C-terminales, de tamaño y secuencia variables. El dominio central se encuentra interrumpido por tres sub-dominios cortos llamados LI, LI-II y LII. La longitud del dominio central (310 aminoácidos) y la posición de los subdominios es altamente conservada entre las distintas proteínas de los filamentos intermedios (Goldman y cols., 1986). A pesar que la principal interacción molecular en los filamentos intermedios ocurre entre dominios centrales, los dominios globulares también contribuyen a su ensamblaje a través de interacciones laterales y entre los extremos de la proteína.

Estudios de microscopía electrónica de alta resolución de neurofilamentos *in vitro*, han sugerido que el dominio central conservado entre los filamentos intermedios proporcionaría una base de la cual los dominios globulares hipervariables se proyectarían para especificar las funciones de estos filamentos

(Goldman y cols., 1986). Pese a que los estudios para identificar el papel de dominios en el ensamblaje y su contribución a la estabilidad del filamento han sido exitosos, no se ha logrado identificar los residuos importantes involucrados en las interacciones moleculares. Las propiedades estructurales y bioquímicas de los filamentos intermedios han sido extensamente estudiadas y descritas (Klymkowsky y cols., 1989). Debido a su relativa insolubilidad en condiciones fisiológicas y a la reducida fracción soluble de proteínas *in vivo*, los filamentos intermedios a menudo son considerados como componentes estables del citoesqueleto (Coleman y cols., 1992). Estudios recientes, sin embargo, han demostrado que los filamentos intermedios son estructuras dinámicas (Steinert y cols., 1990) y vitales para mantener la integridad mecánica de las células (Coulombe y cols., 1991). Las relaciones entre estructura y función de las proteínas de los filamentos intermedios han sido poco caracterizadas. A pesar del hecho que la estructura primaria y la distribución celular de muchas de estas proteínas es ampliamente conocida, sólo existe una limitada información molecular sobre su comportamiento *in vivo*. Esta limitación se ha debido principalmente a la escasez de métodos específicos para el estudio de la función intracelular de estas proteínas. Al respecto, el uso de drogas y anticuerpos específicos que bloquean la función y organización de las proteínas de los filamentos no han resultado del todo exitosos, debido principalmente a que afectan a un número de diferentes funciones celulares. Se ha demostrado, por ejemplo, que muchas de las drogas utilizadas tienen efectos sobre el metabolismo celular (Zeive y cols., 1988). Un enfoque alternativo al estudio de las funciones de los filamentos intermedios *in vivo*, ha sido la microinyección de quinasas y proteasas que alteran la organización de esta red citoplasmática (Lamb y cols., 1989). La inyección intracelular de anticuerpos anti-FI ha mostrado tener efectos específicos y dramáticos sobre la organización de estos filamentos

(Gawlitta y cols., 1981), los cuales parecen depender del tipo celular en estudio (Klymkowsky, 1981). Sin embargo, en células en cultivo la destrucción de la organización de la red de filamentos intermedios debido a la inyección de anticuerpos específicos no ha demostrado tener efectos importantes sobre el comportamiento celular (Klymkowsky y cols., 1983). La expresión de proteínas de los filamentos intermedios con mutaciones negativas dominantes ha sido otra forma de destruir específicamente la organización de la red endógena de estos filamentos (Albers y Fuchs, 1987, 1989; Chin y cols., 1991). Estudios recientes han mostrado que la expresión de keratinas mutantes en ratones transgénicos produce la formación de una epidermis que es sensible al trauma mecánico (Coulombe y cols., 1991). Por otra parte, uno de los rasgos notables de la red de filamentos intermedios citoplasmáticos es la estrecha asociación con el núcleo en muchos tipos celulares (Goldman y cols., 1986). Estas observaciones fueron confirmadas más tarde con los trabajos de Georgatos y cols., 1987), quienes mediante estudios bioquímicos mostraron la capacidad de unión de la proteína vimentina a distintas fracciones de membrana a través de dos dominios diferentes. Sitios localizados en el dominio de cabeza N-terminal interactúan con la fracción de membrana celular, mientras que la fracción de membrana nuclear se asocia al extremo de cola C-terminal de vimentina (Georgatos y Blobel, 1987). Esta observación ha llevado a sugerir que los filamentos intermedios estarían involucrados en un anclaje nuclear (Sangiorgi y cols., 1990) y participarían como integradores mecánicos del espacio celular transmitiendo información desde la superficie nuclear hasta la membrana celular y desde ésta hacia el núcleo (Lazarides, 1980; Geiger, 1987). Recientemente, estudios realizados en la línea celular de adenocarcinoma humano, SW-13, describieron por primera vez una función bioquímica específica, transporte de colesterol derivado de lipoproteínas,

que parece ser dependiente de la presencia de una red estructurada de filamentos intermedios de vimentina (Sarria y cols., 1992).

Las proteínas de los filamentos intermedios nucleares parecen interactuar tanto con la cara interna de la envoltura nuclear como con la cromatina. Se ha observado que el desensamblaje y re-ensamblaje de la lámina nuclear estaría involucrado en la ruptura y re-formación de la envoltura nuclear durante la mitosis (Newport y Forbes, 1987). Sin embargo, no se han demostrado claramente relaciones directas entre la lámina nuclear, la membrana nuclear y los cromosomas. En relación a la función de los filamentos intermedios neuronales, los neurofilamentos, existen diversas posiciones. Se ha postulado que podrían mantener la organización axoplásmica y proporcionar al axón una fuerza mecánica a lo largo de su extensión (Lásek y cols., 1983), o regular el calibre axonal (Cleveland y cols., 1991).

#### Interacciones macromoleculares que estabilizan la citoestructura

A la luz del conocimiento de la biología celular y molecular de los distintos elementos que organizan la compleja trama del citoesqueleto, resulta clave el estudio de los mecanismos de interacción macromolecular que se establece entre estos sistemas. Ellos, junto con la dinámica de los procesos de ensamblaje y desensamblaje de los polímeros, constituyen la base de numerosos procesos celulares en los cuales el citoesqueleto participa activamente (Maccioni, 1986). Los componentes filamentosos del citoesqueleto parecen estar interconectados mediante estructuras finas o "puentes" que fueron observadas por microscopía electrónica de alto voltaje, y que llevó a plantear la idea de una matriz citoplasmática (Ellisman y Porter, 1980). Posteriormente, Schliwa y col. (1981) mediante la utilización de métodos de extracción, demostraron la existencia de una trama altamente organizada de interacciones estructurales entre los elementos

que conforman el citoesqueleto de células epiteliales y fibroblastos. Existen abundantes evidencias que apoyan la interacción entre microfilamentos de actina y de proteínas de los filamentos intermedios con los microtúbulos. Gran parte de éstas vienen de la asociación entre actina y tubulina a través de estudios *in vitro*, donde se ha observado la interacción entre filamentos de actina y proteína microtubular (Griffith y cols., 1978; Satillaro y cols., 1981; Nishida y cols., 1981; Griffith y Pollard, 1982). Al respecto, se ha demostrado la interacción de actina con MAPs, especialmente MAP-2, la cual puede inducir el ensamblaje de actina en manojos discretos de filamentos (Satillaro y cols., 1980). Sin embargo, hay relativamente poca evidencia directa de la interacción entre estos componentes en la célula. Trabajos realizados *in vivo* con drogas que depolimerizan microtúbulos, o agentes que destruyen las fibras de estrés formadas por polímeros de actina indicaron una clara relación funcional entre microtúbulos y filamentos de actina en células en cultivo (Danowsky, 1989). También se ha sugerido que MAP-1 podría interactuar con fibras de estrés *in vivo* (Asai y cols., 1985). La participación de otros componentes MAPs en la interacción entre microtúbulos y fibras de estrés de actina fue demostrada recientemente en nuestro laboratorio mediante la utilización de anticuerpos monoclonales sitio-dirigidos que reconocen los dominios de unión a microtúbulos en MAP-2 y tau (Cross y cols., 1993). Se demostró la presencia de una proteína similar a tau que co-localizaba con fibras de actina del tipo fibras de estrés en diferentes líneas celulares, y el papel de esta proteína como reguladora de los patrones de interacción entre microtúbulos y filamentos de actina. Estudios más recientes indican una interacción entre vimentina con estructuras que contienen filamentos de actina *in vivo*, que estarían mediadas por los dominios del extremo distal, los dominios de cola de los filamentos de vimentina (Cary y cols., 1994).

Existen también evidencias que indican que las proteínas de los filamentos intermedios y los microtúbulos interactúan entre sí en la célula. Estudios inmunocitoquímicos han sugerido una extensa co-distribución de tubulina con proteínas de diferentes clases de filamentos intermedios (Ball y Singer, 1981; Geiger y Singer, 1980). Diversas líneas de evidencia indican que estos dos sistemas del citoesqueleto, a pesar que están compuestos de distintos polímeros, estarían interconectados y que la morfología de los filamentos de tipo intermedio dependería de las interacciones definidas con los microtúbulos. Así, se ha visto que la destrucción y redistribución de los microtúbulos inducida por drogas específicas, tales como colchicina, nocodazol, vinblastina y taxol, produce la desorganización de la red de filamentos intermedios (Osborn y cols., 1980; Geuens y cols., 1983; Forry-Schaudies y cols., 1986) y la microinyección de anticuerpos anti-tubulina tuvo un efecto similar (Blose y cols., 1984). Por el contrario, la microinyección de anticuerpos contra vimentina y desmina en fibroblastos y células musculares respectivamente (Klymkowsky, 1981), o proteínas asociadas a los filamentos intermedios (Lin y Feramisco, 1981) no tuvo efecto sobre la distribución de los microtúbulos, sino sobre el plegamiento de los filamentos intermedios en la región perinuclear. Estudios de transporte axoplásmico han revelado que los polipéptidos que constituyen los neurofilamentos son transportados coordinadamente con la tubulina, proporcionando un apoyo fisiológico para una asociación entre microtúbulos y neurofilamentos (Hoffman y Lasek, 1975).

Por otra parte, diferentes estudios ultraestructurales han identificado filamentos que entrecruzan los microtúbulos con los filamentos intermedios en la célula (Hirokawa, 1982). Sin embargo, la identidad molecular de estos elementos es aún desconocida. Posibles candidatos para mediar esta interacción serían proteínas específicas que se unen a microtúbulos o a filamentos intermedios,

entre ellas las MAPs y proteínas asociadas a estos filamentos (IFAPs) respectivamente. Existe poco conocimiento de las propiedades estructurales de las IFAPs, por lo que el estudio ha estado enfocado hacia la participación de componentes MAPs en la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios. Las MAPs, por el contrario, y particularmente aquellas obtenidas de cerebro de bovino, han sido ampliamente caracterizadas. Sub-clases de las proteínas MAP-2 (Herzog y Weber, 1978; Kim y cols., 1979) y MAP-1 (Vallee y Bloom, 1983), muestran una apariencia de finas proyecciones filamentosas sobre la superficie del microtúbulo, lo que ha conducido a sugerir que podrían mediar la interacción entre microtúbulos y otros organelos o estructuras del citoplasma. Se ha postulado que diferentes MAPs podrían definir la naturaleza de los entrecruzamientos entre microtúbulos con filamentos de actina o con filamentos intermedios regulando así la organización de la citoestructura en respuesta a distintas demandas celulares (Maccioni y cols., 1992; Cross y cols., 1993). Existe evidencia de la unión de MAPs a diferentes estructuras celulares y se ha demostrado la presencia de puentes filamentosos formados por MAPs entre microtúbulos y mitocondrias (Ellisman y Porter, 1980). Diferentes estudios biofísicos han intentado evaluar el papel para estas proteínas como mediadoras de las interacciones de neurofilamentos con microtúbulos en el tejido cerebral (Leterrier y cols., 1982). Se sugirió que preparaciones de neurofilamentos y proteína microtubular capaces de formar un complejo, podrían tener un significado *in vivo* (Runge y cols., 1981). MAP-2 ha sido extensamente estudiada y se ha demostrado su interacción *in vitro* con variadas estructuras, incluyendo filamentos de actina, vesículas cubiertas y filamentos intermedios (Aamodt y cols., 1983; Leterrier y cols., 1982; Nishida y cols., 1982; Sattilaro y cols., 1980). Estudios bioquímicos demostraron la asociación de la proteína MAP-2 a preparaciones puras de la subunidad de 70 kDa del triplete de los

neurofilamentos (Heimann y cols., 1985; Miyata y cols., 1986). En esta misma línea de evidencias, estudios inmunocitoquímicos realizados en cultivos primarios de cerebro de rata demostraron la presencia de MAP-2 en fibras citoplasmáticas que co-localizaron con tubulina y con vimentina. Además, el pretratamiento de los cultivos con vinblastina, una droga que despolimeriza microtúbulos, indujo una re-distribución de MAP-2 hacia cables perinucleares que contenían vimentina (Bloom y Vallee, 1983). Se ha sugerido que esta interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios no sería exclusiva de células nerviosas, sino que podría ocurrir en otros tipos celulares e involucrar no sólo MAP-2 sino también isoformas de la proteína tau (Vial y cols., 1993). Sin embargo no se ha estudiado en profundidad la participación de tau como mediadora de las interacciones entre microtúbulos con los distintos componentes de la citoarquitectura. Junto con las funciones relacionadas a la formación y estabilidad de los microtúbulos, se ha demostrado que tau es un componente de MAPs ampliamente distribuido ya que se ha detectado su presencia en variadas líneas celulares en cultivo (Cross y cols., 1993). Por otra parte, dada su distribución celular compleja aparece como un regulador *in vivo* de la interacción entre microtúbulos y fibras de estrés de actina (Cross y cols., 1991; Cross y cols., 1993).

### Objetivo central de la investigación

En base a los antecedentes señalados, es de gran interés el estudio de los dominios estructurales y funcionales involucrados en las interacciones proteína-proteína de importancia en la estabilización del citoesqueleto. Resulta de gran importancia analizar si diferentes componentes MAPs y sus isoformas están implicadas en la unión de los microtúbulos con otros sistemas proteicos del citoesqueleto. Al respecto han habido grandes avances en cuanto al significado estructural y funcional de los dominios de tubulina y MAPs (Serrano y cols.,



1984a,b; Maccioni y cols., 1985a,b; Vera y cols., 1989; Maccioni y cols., 1989; Padilla y cols., 1990; Rivas-Berrios y cols., 1990). Siguiendo este fundamento, tendría un gran significado el estudiar en profundidad los patrones de interacción entre diferentes MAPs y sus isoformas con microfilamentos y proteínas de los filamentos intermedios de importancia en la célula.

A la luz de lo antes señalado, el presente trabajo se enmarca en el estudio de los patrones de interacción entre los elementos que constituyen la citoestructura. Este estudio se orientó específicamente hacia las interacciones macromoleculares entre microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina, y a la participación de tau como un elemento mediador de este proceso. Dentro de este objetivo general se ha planteado como **hipótesis de trabajo** que algunos componentes de las MAPs, especialmente tau jugarían un papel como mediadores de las interacciones entre microtúbulos con filamentos intermedios del tipo vimentina. Los estudios sobre el papel *in vivo* de la interacción moduladora de MAPs dentro de las conexiones entre microtúbulos y las proteínas de los filamentos intermedios son escasos, y se han realizado principalmente mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica y microscopía electrónica. En esta tesis y dentro del contexto de un modelo celular sobre la dinámica de interacciones entre los elementos de la citoestructura, se utilizó un enfoque integral usando técnicas tanto bioquímicas como inmunológicas, y estudios de microscopía mediante técnicas de inmunofluorescencia.

### Modelo biológico

El estudio se llevó a cabo en una línea celular derivada de un adenocarcinoma suprarrenal humano, SW-13, que a pesar de presentar una morfología y patrones de crecimiento característicos de células epiteliales en cultivo, no presentó reacción con ningún anticuerpo anti-keratina utilizado en el

laboratorio. Con respecto a la expresión de vimentina, mediante el subclonamiento se obtuvieron algunos clones que expresan vimentina como la única proteína de filamentos intermedios en células SW-13, y clones que carecen de una expresión detectable de filamentos intermedios citoplasmáticos (Hedberg y Chen, 1986). Datos de inmunofluorescencia obtenidos por Sarría et al. (1989) en líneas celulares vim (+) indicaron que más del 99% de las células presentaban filamentos de vimentina detectables. Sin embargo, el mismo análisis realizado en líneas vim (-) indicó que más del 99% de las células no presentaba ningún tipo de filamentos intermedios. Además, el análisis en geles bidimensionales y electrotransferencia e inmunotinción de extractos insolubles en Tritón X-100 de células marcadas con metionina-[<sup>35</sup>S] fue consistente con los datos de inmunofluorescencia (Sarría y cols., 1994). Por otra parte, se observó la ausencia de expresión de vimentina y la ausencia de mRNA para vimentina en células de los clones vim (-) (Sarría y cols., 1994; Evans, comunicación personal).

### Objetivos específicos

La tesis se desarrolló sobre la base de tres objetivos esenciales en torno a las preguntas de cómo se relacionan intracelularmente los microtúbulos y filamentos intermedios, y el papel de tau en estas interacciones. Estos objetivos fueron: (a) Analizar la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios del tipo vimentina en células en cultivo. (b) Estudiar la participación de componentes de las MAPs, y más específicamente tau en relación a la interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina. (c) Estudiar el posible efecto de una red estructurada de filamentos intermedios sobre la organización de los componentes filamentosos del citoesqueleto .

## MATERIALES Y METODOS

### Cultivo celular

La línea celular SW-13 (ATCC CCL 2.2) de adenocarcinoma suprarrenal humano utilizada para el desarrollo de esta tesis, fue donada por el Dr. Robert Evans del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Colorado. Las células SW-13 expresan vimentina con un patrón en mosaico y han sido subclonadas (Hedberg y Chen, 1986). Para los estudios de esta tesis se seleccionó un subclón de las células positivas para vimentina (vim+), designado clón 1 y células negativas para vimentina (vim-), designado como clón 2. Las células vim(-) no expresan la proteína vimentina. Células del clón 1 de la línea SW-13 así como del clón mutante (vim-) fueron crecidas en placas de cultivo de 150 mm (Falcon) en medio de cultivo Dulbecco suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) y 10% de suero fetal de bovino (SFB) y mantenidas con una atmósfera húmeda a 37°C, con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días hasta obtener un cultivo confluyente, ó cultivos subconfluentes en el caso de las inmunofluorescencias (Cross y cols., 1993).

### Preparación de proteínas del citoesqueleto

Las proteínas del citoesqueleto de células de la línea SW-13 del clón 1 y del clón 2 en cultivo fueron preparadas de acuerdo al protocolo descrito por Solomon et al, (1979), con algunas modificaciones. Para cada una de las proteínas estudiadas es importante señalar que no se trabajó con un número equivalente de células. Los cultivos confluentes fueron lavados con un tampón estabilizador de microtúbulos (TEM; MES 50 mM pH 6,8, glicerol 2M, EGTA 1mM y MgCl<sub>2</sub>

1mM) a temperatura ambiente. Las células fueron tratadas en la placa con el tampón TEM en presencia del detergente no iónico NP-40 0,1% y 1mM GTP por 10 min. En el estudio de la presencia de las proteínas de los filamentos intermedios se utilizó una mayor concentración de detergente para facilitar la visualización de estas proteínas. El material celular remanente fue recuperado raspando las placas con la ayuda de una bagueta de vidrio con terminal de goma y centrifugando el material celular obtenido a 1.600 rpm por 5 min. en una centrífuga clínica. Las pellas fueron lavadas con el mismo tampón (TEM) y resuspendidas en tampón muestra (Laemmli, 1970) para un posterior análisis electroforético e inmunológico. En las distintas etapas de la preparación se utilizaron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 0,5 mM, aprotinina 2 µg/ml, inhibidor del poroto de soya 20 µg/ml y leupeptina 2 µg/ml.

#### Preparación de citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios

El citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios del tipo vimentina fue preparado de acuerdo a protocolos descritos previamente (Domingo y cols., 1992; Klymkowski y cols., 1989) con algunas modificaciones. Células de adenocarcinoma SW-13 de los clones 1 y 2 crecidas en las condiciones de confluencia y adheridas a placas de cultivo, fueron lavadas con tampón salino (PBS) a 37°C. Luego de retirar el exceso de la solución tampón en las placas, se recuperaron las células mediante raspado con la ayuda de una bagueta o espátula de goma y posterior centrifugación a 1.600 rpm por 5 min. en una centrífuga clínica. El pellet de células fue tratado con un tampón de alta fuerza iónica (MES 50mM pH 6,8, Tritón X-100 1% y KCl 0,6M), y homogenizado posteriormente en hielo con un homogenizador de vidrio con vástago de teflón. El homogenizado fue centrifugado a 15.000 rpm por 5 min. y el material insoluble en Tritón, obtenido en las pellas luego de la centrifugación fue tratado con DNAsa I 0,5

mg/ml y  $MgCl_2$  10mM por al menos 30 min. a 37°C. Las pellas obtenidas por centrifugación a 15.000 rpm por 15 min fueron lavadas dos veces en tampón MES 50 mM, pH 6,8. Finalmente el material así obtenido, enriquecido en filamentos intermedios, fue solubilizado en urea 8-9 M preparada en tampón MES. Luego de calentar a 100°C la proteína solubilizada fue resuspendida en tampón muestra (Laemmli, 1970) para posteriores análisis electroforéticos, inmunológicos y de cromatografía de afinidad.

#### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

La separación electroforética de proteínas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970) en geles de tamaño regular (12x15x0.12 cm). Se prepararon geles separadores de 7,5% y 6% (para la separación electroforética de la proteína microtubular de cerebro de bovino) y un gel espaciador de 4% de poliacrilamida. Luego de la electroforesis los geles fueron teñidos por 30 min. con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0,25%, metanol 50% y ácido acético 10% y desteñidos con una solución de metanol al 25% y ácido acético 7%.

#### Electrotransferencia de proteínas seguida por inmunotinción

La electrotransferencia del tipo "western blots" de proteínas se realizó según el procedimiento descrito por Towbin y cols., (1979), en el cual una parte del gel con las proteínas electroforéticamente separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0,45  $\mu m$ ). Este procedimiento se realizó en una cámara seca a 5,5 mA/cm<sup>2</sup> por 30 min. en Tris 50mM, glicina 380 mM, SDS 0,1% y metanol 20%. Para revelar la presencia de las proteínas electrotransferidas, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con una solución de rojo Ponceau S por 15 min., y se cortaron las franjas de papel correspondientes a

las corridas electroforéticas. Finalmente el rojo Ponceau S fue removido mediante lavados exhaustivos con agua desionizada. Para bloquear los sitios activos remanentes en la nitrocelulosa, las membranas fueron incubadas toda la noche a 40°C en un tampón salino (PBS; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 7,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 136 mM y KCl 2 mM) más Tween-20 al 0,5%. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario específico preparado en tampón PBS/0,05% Tween-20 por 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y las respectivas diluciones utilizadas en este estudio fueron las siguientes: anticuerpo monoclonal anti-vimentina (Sigma, dil. 1:500), monoclonal anti-β-tubulina (Sigma, dil. 1:200), policlonal anti-tau TN-2 obtenido y caracterizado en el laboratorio (Capote y cols., 1993) (dil. 1:500), monoclonal anti-actina (Amersham, dil. 1:100) y monoclonal anti-MAP2 (Sigma, dil. 1:500). Luego de la incubación con el anticuerpo primario las cintas de nitrocelulosa fueron lavadas tres veces por 5 min. cada una con tampón salino (PBS) más 0,05% Tween-20 e incubadas por una hora a temp. ambiente con proteína-A conjugada a fosfatasa alcalina a una dilución 1:2.000 preparada en tampón salino (Rivas y cols., 1988). La proteína-A remanente fue removida por tres lavados de 5 min. cada uno con tampón salino (PBS) más 0,05% Tween-20. Para revelar la presencia del complejo antígeno-proteína-A, se incubó la membrana con una mezcla de 66 µl de NBT 5% (p/p) y 33 µl de BCIP 5% (p/p) en un tampón Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La reacción fue detenida con EDTA 20 mM (Harlow y Lane, 1988).

#### Purificación de proteínas microtubulares

La proteína microtubular fue obtenida a partir de cerebros de bovino mediante tres ciclos de polimerización-despolimerización según el método propuesto por Shelanski et al. (1973), con algunas modificaciones (Maccioni y

cols., 1981). Cerebros de bovino adulto fueron procesados para retirar las meninges, tejido vascular y sangre superficial. Luego fueron pesados y homogenizados a 4°C con la mitad de volumen respecto a su peso, de tampón MES 0,1M pH 6,8, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glicerol 1M e inhibidores de proteasas (PMSF 0,2 mM, aprotinina 10 µg/ml y SBTI 5 µg/ml). El homogenizado fue centrifugado (Ultracentrífuga Beckman modelo L) a 45.000xg por 60 min. a 4°C. Al sobrenadante separado, se le agregaron los siguientes componentes, a las concentraciones finales que se indican: GTP 1 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y glicerol 2,5 M. El sistema de ensamblaje de microtúbulos se incubó entonces por 30 min. a 37°C. Los microtúbulos formados fueron colectados por centrifugación a 45.000xg durante 60 min. a 30°C. A nivel de esta etapa se separó la fracción sedimentada o pellas que contenían microtúbulos y se descartó el sobrenadante. Los microtúbulos así obtenidos fueron resuspendidos en tampón MES 0,1M, pH 6,8 que contenía EGTA 0,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, seguido por una homogenización en frío en un homogenizador Dounce e incubación a 4°C durante 15 min. El material resuspendido se sometió a una centrifugación a 45.000xg durante 45 min. a 4°C que eliminó proteínas agregadas durante el proceso. El sobrenadante fue ajustado a concentraciones finales de GTP 1 mM y glicerol 4M, realizando un nuevo ensamblaje luego de una incubación por 30 min. a 37°C y sedimentando los microtúbulos a 45.000xg por 45 min. a 30°C. Las pellas microtubulares fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -75°C hasta su posterior uso. En estas condiciones, la proteína microtubular mantenía su actividad polimerizante por aproximadamente 30 días. Antes de ser utilizadas las pellas fueron descongeladas y resuspendidas en tampón MES 0,1M pH 6,8 para los ensayos de unión directa.

### Purificación de la proteína tau

La proteína microtubular fue obtenida a partir de extractos de cerebro de bovino mediante ciclos de ensamblaje y desensamblaje dependientes de temperatura como se ha indicado (Maccioni y cols., 1981). La proteína tau fue purificada a partir de proteína microtubular de cerebro haciendo uso de su termoestabilidad y solubilidad en ácido perclórico (Grundke-Ikbal y cols., 1986). Las pellas de proteína microtubular de segundo ciclo de ensamblaje-desensamblaje fueron resuspendidas en tres volúmenes de tampón MES 0,1 M, pH 2,7 a 4°C e incubadas a la misma temperatura por 15 min. Con la finalidad de desnaturar y precipitar posteriormente la tubulina que existe en alta proporción en esta preparación y otras proteínas, la suspensión fue hervida durante 5 min. y luego enfriada. La proteína sometida a calentamiento fue centrifugada a 25.000xg por 20 min. a 4°C y se recuperó la fracción sobrenadante que aún contenía MAP-2, tau y otras proteínas termoestables. Se agregó al sobrenadante una solución de ácido perclórico a una concentración final de 2,5% y se centrifugó a 25.000xg por 20 min. a 4°C. En estas condiciones la proteína tau permanecía soluble y la tubulina, junto con MAPs de alta masa molecular y otros componentes menores, se perdió en el precipitado. Finalmente se recuperó el sobrenadante el que fue dializado contra tampón MES 1M a 4°C por 24 hrs. En el dializado se estimó una concentración de proteínas de 1 mg/ml (Bradford, 1976) y una pureza de 99% según análisis electroforético en PAGE-SDS. La proteína fue alicuotada y guardada congelada a -70°C hasta su posterior uso, siendo estable. Para la obtención de la proteína tau de células SW-13, éstas fueron homogenizadas a 4°C, y el materia homogenizado fue centrifugado a 45.000xg por 15 min. El sobrenadante se hirvió por 5 min. y las proteínas denaturadas fueron decantadas a 45.000xg por 15 minutos y este sobrenadante resultante se ajustó con ácido



perclórico a una concentración final de 2,5%. La mezcla se incubó al menos 5 min. y luego se realizó una nueva centrifugación para decantar las proteínas denaturadas en el medio ácido, de la forma descrita. El sobrenadante final fue dializado contra un tampón MES 10 mM pH 6,8 y concentrado por dialisis contra una solución de sacarosa al 40%, y almacenado a -20°C para su uso posterior.

### Ensayos de co-sedimentación

Se preparó citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios del tipo vimentina a partir de células del clón 1 de SW-13 según el protocolo antes descrito. El material insoluble resistente al Tritón X-100 fue finalmente solubilizado en urea 8M y utilizado para el experimento de co-sedimentación con proteína tau purificada a partir de cerebro de bovino. Una alícuota de la preparación de citoesqueleto enriquecida en vimentina (0,3 mg/ml) fue incubada junto con una muestra de tau purificada (1 mg/ml) en tampón MES 50mM, pH 6,8 durante la noche a 4°C con constante agitación. Se centrifugó a 15.000 rpm por 10 min. a 4°C, y después de eliminar el sobrenadante las pellas fueron resuspendidas en tampón muestra (Laemmli, 1970) para un posterior análisis electroforético e inmunológico. Como control para este ensayo, se incubó una muestra de tau purificada de cerebro con una fracción de citoesqueleto de células del clón 2 de SW-13 (vim-). Después de una centrifugación y de descartar el sobrenadante, el material precipitado fue resuspendido en tampón muestra (Laemmli, 1970) para un posterior análisis electroforético e inmunológico.

### Ensayos de unión directa ("Overlay")

Una preparación de citoesqueleto enriquecida en filamentos intermedios de células del clón 1 de SW-13 fue separada por electroforésis y posteriormente

electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa. Esta fue bloqueada con albúmina sérica de bovino (BSA) 3% en tampón MES 50mM por 4 hrs. a temperatura ambiente. Las proteínas inmovilizadas en la nitrocelulosa fueron incubadas toda la noche con la preparación de proteína ligando: a) tau purificada de cerebro de bovino 0,1, 0,5 y 1 mg/ml en MES 50mM pH 6,8. b) proteína microtubular de cerebro de bovino obtenida por el método de Shelanski et al, (1973). Para revelar la presencia de la proteína ligando unida a la proteína inmovilizada se incubó con los anticuerpos primarios anti-tau y anti-MAP-2 respectivamente por 2 horas a temperatura ambiente. Como controles del ensayo de unión se incubó la preparación de proteínas inmovilizadas en nitrocelulosa con las siguientes soluciones: a) albúmina sérica de bovino 1 mg/ml y b) solución tampón sin tau. En ambos casos se trató con un anticuerpo policlonal anti-tau, y en segundo lugar con proteína-A conjugada a fosfatasa alcalina (FAL) para revelar la unión de ambas proteínas. Como control adicional se preparó citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios de células del clón 2 y se separó por electroforesis y posterior electrotransferencia a nitrocelulosa. Estas proteínas inmovilizadas fueron incubadas de igual forma que las anteriores con una preparación de tau pura de cerebro de bovino (0,5 mg/ml) y la unión de ambas proteínas se reveló con un anticuerpo primario anti-tau y finalmente con proteína-A conjugada a FAL. Al revelar con el sistema NBT/BCIP preparado en tampón Tris 100 mM pH 9,5 fue posible observar un producto coloreado en el lugar donde interactúan ambas proteínas.

#### Cromatografía de afinidad de la proteína tau en columnas de DNA de hebra simple con vimentina unida.

Se preparó una columna de afinidad de DNA (hebra simple)-celulosa según el procedimiento de Domingo et al. (1992) con algunas modificaciones, a la cual

se acopló una preparación de citoesqueleto enriquecido en vimentina proveniente de células del clón 1 de SW-13. Para esto, 1 ml de preparación de vimentina solubilizada en 8M urea fue mezclada con 1 ml de resina de DNA (hebra simple)-celulosa en tampón Tris-urea (Tris-HCl, pH 7,2, 6M urea, 1 mM EDTA y 1 mM DTT) durante 24 hrs. a 4°C. La columna de afinidad fue equilibrada en tampón Tris-urea, y una muestra de tau purificada de cerebro de bovino (1 mg/ml) fue aplicada sobre 1 ml de columna con un flujo de 0,05 ml/min. La proteína tau unida a la resina fue eluída por la adición de 1 ml de solución de KCl 0,3M preparada en tampón MES 50 mM pH 6,8. Se analizó el contenido de las fracciones obtenidas de la columna mediante electroforesis y electrotransferencias e inmunotinción. Como control se preparó una columna de DNA (hebra simple)-celulosa a la cual se acopló una fracción de citoesqueleto de células del clón 2 de SW-13. En las mismas condiciones que la columna anterior se sembró una muestra de tau purificada de cerebro (1 mg/ml) que fue eluída posteriormente con una solución de KCl 0,3M.

#### Experimentos de inmunofluorescencia indirecta

Se estudiaron los patrones de distribución subcelular de las siguientes proteínas del citoesqueleto: tubulina, vimentina y la proteína asociada a microtúbulos (MAP) de baja masa molecular, tau, en células de los clones 1 y 2 de SW-13. Se realizaron estudios de inmunofluorescencia indirecta simple y doble para lo cual, las células fueron crecidas por 18 h. sobre cubreobjetos en un medio de cultivo Dulbecco suplementado con SFB 10% y antibióticos en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos subconfluentes mantenidos sobre vidrios fueron lavados por una vez en tampón salino pH 7,2 (PBS) a 37°C y las células sujetas a permeabilización en un tampón estabilizador de microtúbulos (TEM) que contiene Tritón X-100 0.5% por 45 seg. a la misma

temperatura. Inmediatamente las células fueron fijadas en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min. y lavadas una vez por 5 min. con tampón salino. Se utilizaron los siguientes primeros anticuerpos para los estudios de inmunolocalización: policlonal anti-tubulina, monoclonal anti-vimentina y policlonal anti-tau. En el caso de las inmunofluorescencias dobles, se incubó simultáneamente con dos primeros anticuerpos considerando los factores de dilución. Las incubaciones con estos anticuerpos fueron por 2hrs. a temperatura ambiente en un tampón salino (PBS) más 0,05% Tween-20. Se removió el anticuerpo primario no-unido mediante tres lavados de 5 min. en tampón PBS a temperatura ambiente. El primer anticuerpo unido a la proteína fue detectado mediante un segundo anticuerpo conjugado a una molécula de fluorocromo, y para el caso de las inmunofluorescencias dobles con una mezcla de los respectivos segundos anticuerpos por una hora a temperatura ambiente. En los casos en que el primer anticuerpo era un anticuerpo monoclonal se utilizó una anti-IgG de ratón conjugada a rodamina-isotiocianato (TRITC; dil. 1:200) y en los casos en que el primer anticuerpo era un policlonal, se utilizó una anti-IgG de conejo conjugada a fluoresceína-isotiocianato (FITC; dil. 1:80) como segundo anticuerpo. El exceso de segundo anticuerpo fue removido luego de tres lavados de 5 min. en tampón salino (PBS). Finalmente las células tratadas fueron montadas sobre una mezcla de glicerol/PBS (9:1) e inmediatamente observadas con un microscopio Zeiss equipado con un sistema de epifluorescencia.

#### Experimentos de inmunofluorescencia indirecta mediante citometría de flujo.

Con el objeto de estimar cuantitativamente los diferentes componentes organizados en la red del citoesqueleto tanto en células SW-13 vim+ como el mutante vim(-), se estudió la presencia de tubulina, vimentina y tau en estas células mediante IFI simples y un posterior análisis por citometría de flujo.

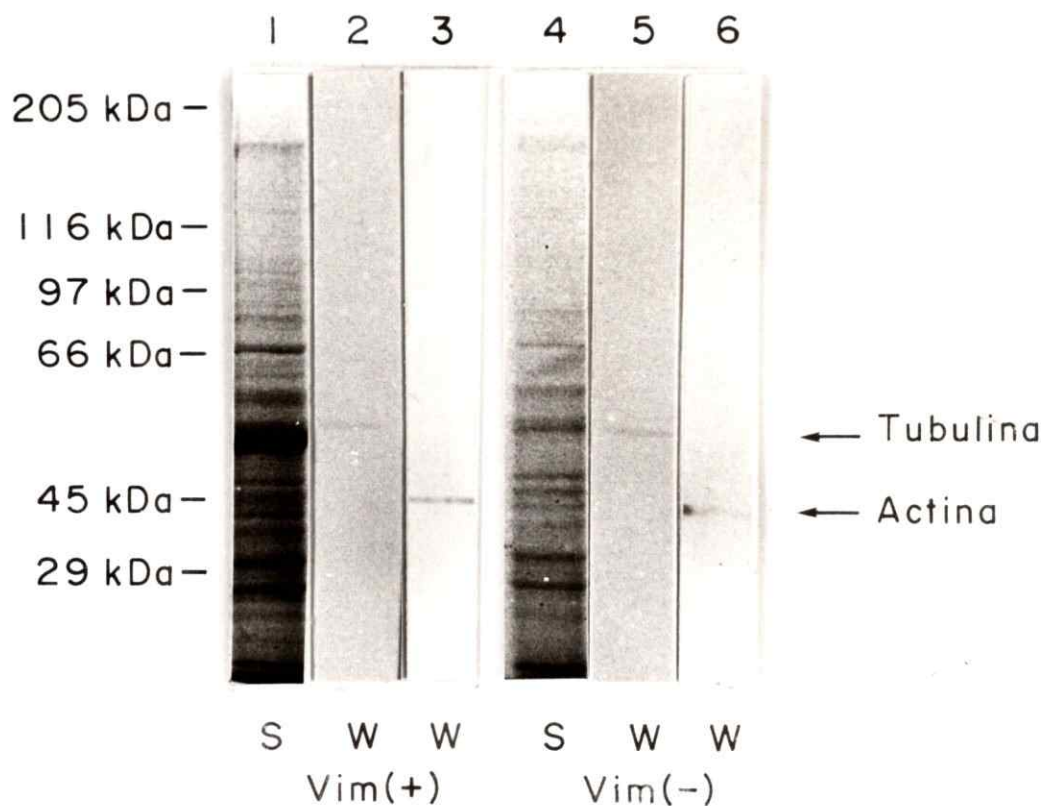
Células del clón 1 y del clón 2 de SW-13 crecidas a confluencia en medio de cultivo suplementado con SFB 10% fueron tripsinizadas y posteriormente recuperadas en un tampón salino pH 7,2 (PBS) más SFB 2%. Se realizaron determinaciones del número de células y se ajustó éste de modo de tener en las alícuotas a analizar 600.000 células/ml. Las pellas de células fueron resuspendidas en fijador metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min., y luego de un lavado con tampón PBS/SFB 10% se incubó con el anticuerpo primario por 45 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los anticuerpos primarios utilizados fueron: monoclonal anti-vimentina (dil. 1:40), policlonal anti-tubulina (dil. 1:40) y policlonal anti-tau (dil. 1:20). Se removió el anticuerpo primario no unido mediante un lavado luego de resuspensión en un tampón PBS/SFB y centrifugación a 2.500 rpm por 4 min. a  $4^{\circ}\text{C}$  y la reacción de inmunofluorescencia fue revelada con un segundo anticuerpo unido a FITC incubado por 30 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron como anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón-FITC (dil. 1:250) y anti-IgG de conejo unido a FITC (dil. 1:80). Finalmente, después de dos lavados en PBS/SFB para remover el anticuerpo no unido, las pellas de células fueron resuspendidas en tampón PBS/SFB 10% para ser analizadas inmediatamente por citometría de flujo en el equipo del Centro de Equipamiento Mayor de la Facultad de Ciencias (Facscan, Becton Dickinson). Se registró una intensidad media de fluorescencia para cada uno de los anticuerpos, las que fueron comparadas con las intensidades obtenidas para los respectivos anticuerpos secundarios, o anticuerpos monoclonales contra proteínas no presentes en SW-13, utilizados como controles negativos de los respectivos anticuerpos primarios.

## RESULTADOS

### A. Estudio del efecto de una red estructurada de FI sobre el resto de los componentes del citoesqueleto.

Antes de iniciar el estudio de las interacciones macromoleculares entre la proteína tau y las proteínas de los filamentos intermedios, se identificaron y se analizaron las distribuciones subcelulares de los componentes que forman la red del citoesqueleto, fundamentalmente de polímeros de tubulina, actina, vimentina y los componentes de MAPs, MAP-2 y tau, en las células SW-13 (vim+) y SW-13 (vim-) (Clones 1 y 2).

Células de los clones 1 y 2 de SW-13 crecidas a confluencia en un medio de cultivo suplementado con SFB 10% fueron tratadas de acuerdo al protocolo propuesto por Solomon et al. (1979) para extraer, en condiciones de alta estabilidad, los componentes del citoesqueleto. Dicho medio contiene un tampón estabilizador de microtúbulos y la presencia de detergentes no iónicos para facilitar la permeabilización de las células. El material celular obtenido fue analizado por electroforesis y electrotransferencias. Las electroforesis de las preparaciones de citoesqueleto mostraron la presencia de un amplio conjunto de proteínas en ambos tipos celulares (Figura 1, carriles 1 y 4). Cuando las preparaciones de citoesqueleto extraído de estas células fueron electrotransferidas e incubadas con anticuerpos específicos contra estas proteínas seguido por inmunotinción, se lograron reconocer algunos de los componentes de la red del citoesqueleto individualmente. Se observó así una banda con un peso molecular cercano a los 55 kDa (Figura 1, carriles 2 y 5) correspondiente a tubulina (Ludueña y cols., 1973) y que reaccionó con el anticuerpo monoclonal anti-tubulina, en preparaciones de los clones 1 y 2 respectivamente. Otra banda



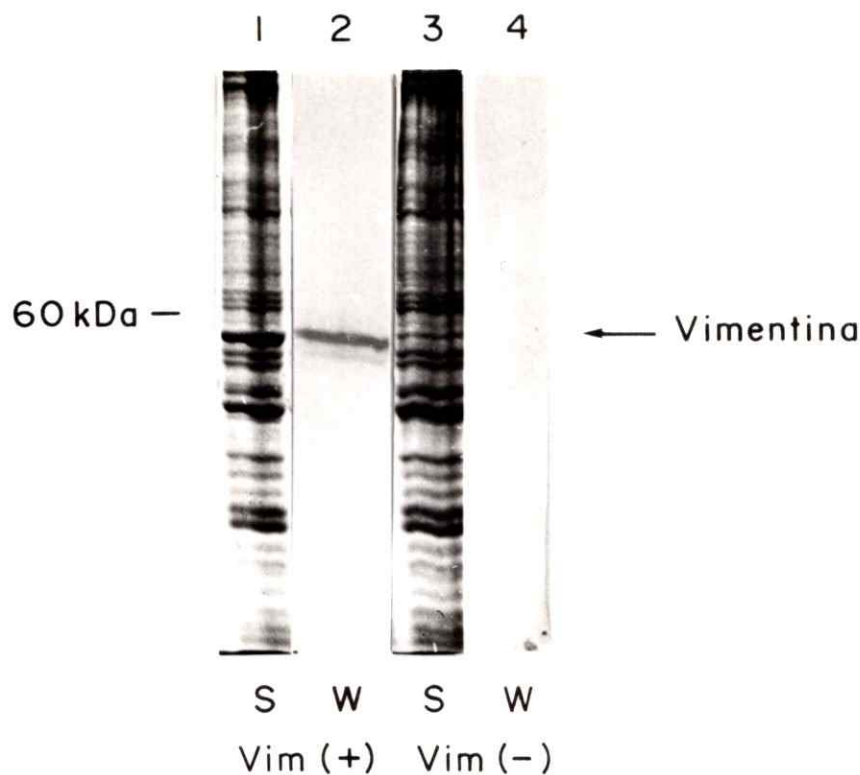
**Figura 1: Caracterización de la presencia de proteínas del citoesqueleto de células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).** Se obtuvieron preparaciones de citoesqueleto de células de los clones 1 y 2 y se analizó la presencia de tubulina, actina, vimentina y tau en estas preparaciones mediante electroforésis (S) y electrotransferencias seguidas por inmunotinción (W). El análisis por PAGE-SDS reveló la presencia de un amplio conjunto de proteínas (carriles 1 y 4). La presencia de tubulina se analizó mediante un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina (carriles 2 y 5), y la de actina mediante un anticuerpo monoclonal anti-actina (carriles 3 y 6). En todos los casos la inmunotinción fue revelada por la adición de un segundo anticuerpo proteína-A conjugada a fosfatasa alcalina y su respectivo sustrato BCIP/NBT. Las flechas indican la migración de tubulina y actina con masas moleculares de 55 kDa y 45 kDa respectivamente.

presente en una proporción significativa en el extracto mostró una reacción frente a un anticuerpo monoclonal anti-actina en ambos tipos celulares (Figura 1, carriles 3 y 6). Para el análisis de proteínas de los filamentos intermedios se identificó una banda con una migración cercana a los 58 kDa que corresponde al peso molecular descrito para vimentina, y que mostró una fuerte reacción con el anticuerpo monoclonal anti-vimentina en preparaciones del clón 1 (Figura 2, carril 2). El análisis realizado con una preparación de citoesqueleto de células del clón 2 (vim-), no mostró inmunorreacción con el anticuerpo anti-vimentina (Figura 2, carril 4). El análisis electroforético y de electrotransferencia e inmunotinción de la proteína tau en preparaciones de citoesqueleto de células SW-13 vim (+) y vim (-) dió resultados negativos, lo cual podría deberse a los bajos niveles de tau en células en cultivo (Maccioni, 1986; Cross et al., 1993) en comparación a los existentes en tejido nervioso. Sin embargo, haciendo uso de la propiedad de termoestabilidad y de la solubilidad en ácido perclórico de la tau, fue posible purificar parcialmente esta proteína a partir de extractos crudos de células SW-13 vim(+) y obtener así un grupo de proteínas con pesos moleculares cercanos a los 60 kDa, las cuales presentaron reacción con el anticuerpo policlonal anti-tau y que podrían corresponder a isoformas de esta proteína en el clon 1 de SW-13 (Figura 3, carriles 2 y 3). Tau pudo ser también detectada con un patrón similar usando este anticuerpo en extractos de células del clón 2 mutante (Figura 3, carriles 4 y 5).

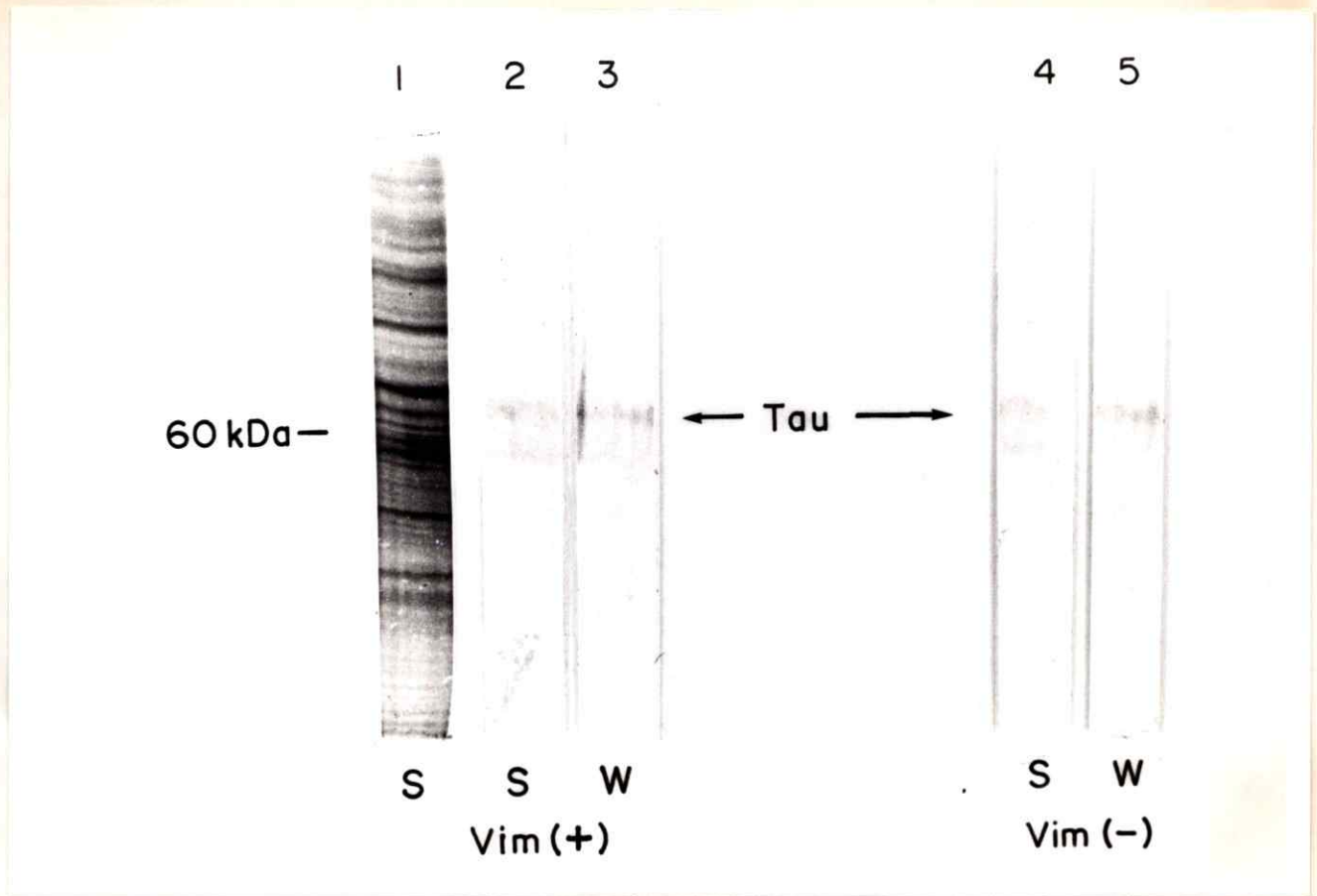
### Análisis subcelular

Se estudió la distribución intracelular y su organización en polímeros de la citoestructura de proteínas claves del citoesqueleto, esencialmente, tubulina, actina, vimentina, MAP-2 y tau, en células de los clones 1 y 2 de SW-13. Células crecidas hasta condiciones de subconfluencia en un medio de cultivo





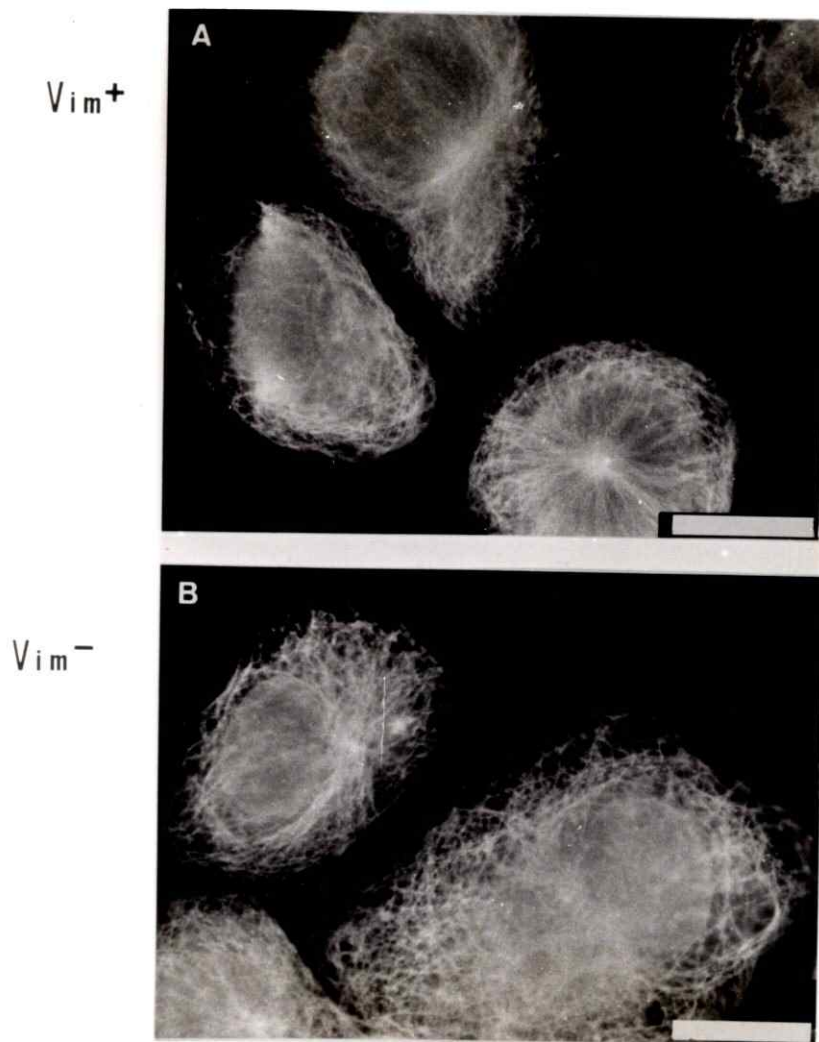
**Figura 2: Caracterización de la presencia de proteínas de los filamentos intermedios en células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).** La presencia de vimentina en los clones 1 y 2 de células SW-13 fue analizada en preparaciones de citoesqueleto mediante electroforésis (S) y por electrotransferencia e inmunotinción (W). El análisis por PAGE-SDS mostró la presencia de una prominente banda con una migración cercana a una masa molecular de 58 kDa en células del clón 1 (carril 1) y la ausencia de ésta en células del clón 2 (carril 3). La identificación de vimentina en células vim(+) se realizó mediante un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (carril 2), sin embargo el mismo anticuerpo no mostró reacción en células del clón vim(-) mutante (carril 4). La inmunotinción fue completada mediante un segundo anticuerpo que en todos los casos fue proteína-A conjugada a fosfatasa alcalina y la adición del sistema de sustratos BCIP/NBT. La flecha corresponde a la migración de vimentina.



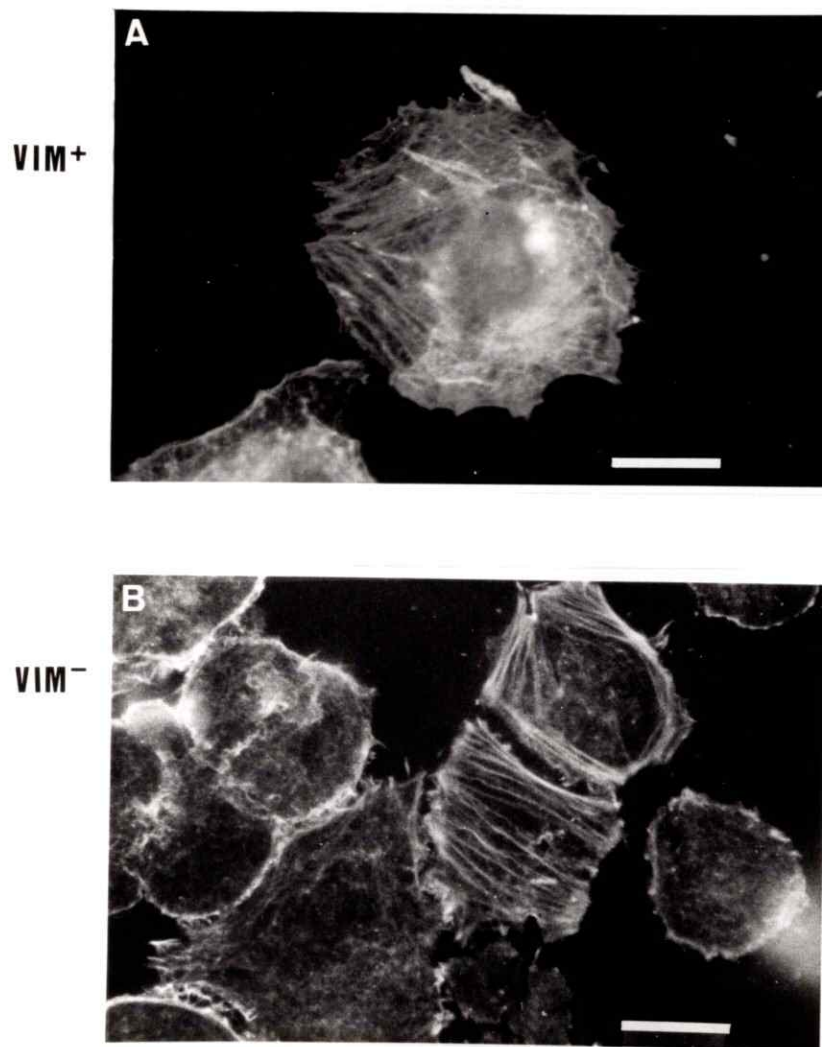
**Figura 3: Presencia de tau en células SW-13 vim(+) y vim(-).** Se purificó tau a partir de preparaciones de citoesqueleto de células de los clones 1 y 2 de SW-13 según protocolo descrito en Materiales y Métodos. El análisis por PAGE-SDS (S) de las proteínas del citoesqueleto de células del clón 1 mostró la distribución de éstas en un amplio rango de pesos moleculares (carril 1). Mediante el protocolo de purificación de tau se obtuvo un grupo de proteínas con masas moleculares cercanas a los 60 kDa (carril 2 y 4), las que a través de un análisis por electrotansferencia e inmunotinción (W) mostraron reacción con un anticuerpo policlonal anti-tau (carril 3 y 5). La inmunotinción se completó mediante un segundo anticuerpo que fue proteína-A conjugada a fosfatasa alcalina que reaccionó con su sustrato BCIP/NBT. La flecha indica la migración de tau en los 60 kDa.

suplementado con SFB 10% según (Cross y cols., 1993), fueron permeabilizadas, fijadas y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas indicadas. El análisis de inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-tubulina mostró una red estructurada de microtúbulos citoplasmáticos en ambos tipos celulares (Figura 4A y B). La presencia de actina fue reconocida con un anticuerpo monoclonal anti-actina que mostró filamentos de actina del tipo de las fibras de estrés citoplasmáticas poco prominentes en ambos tipos celulares (Figura 5A y B).

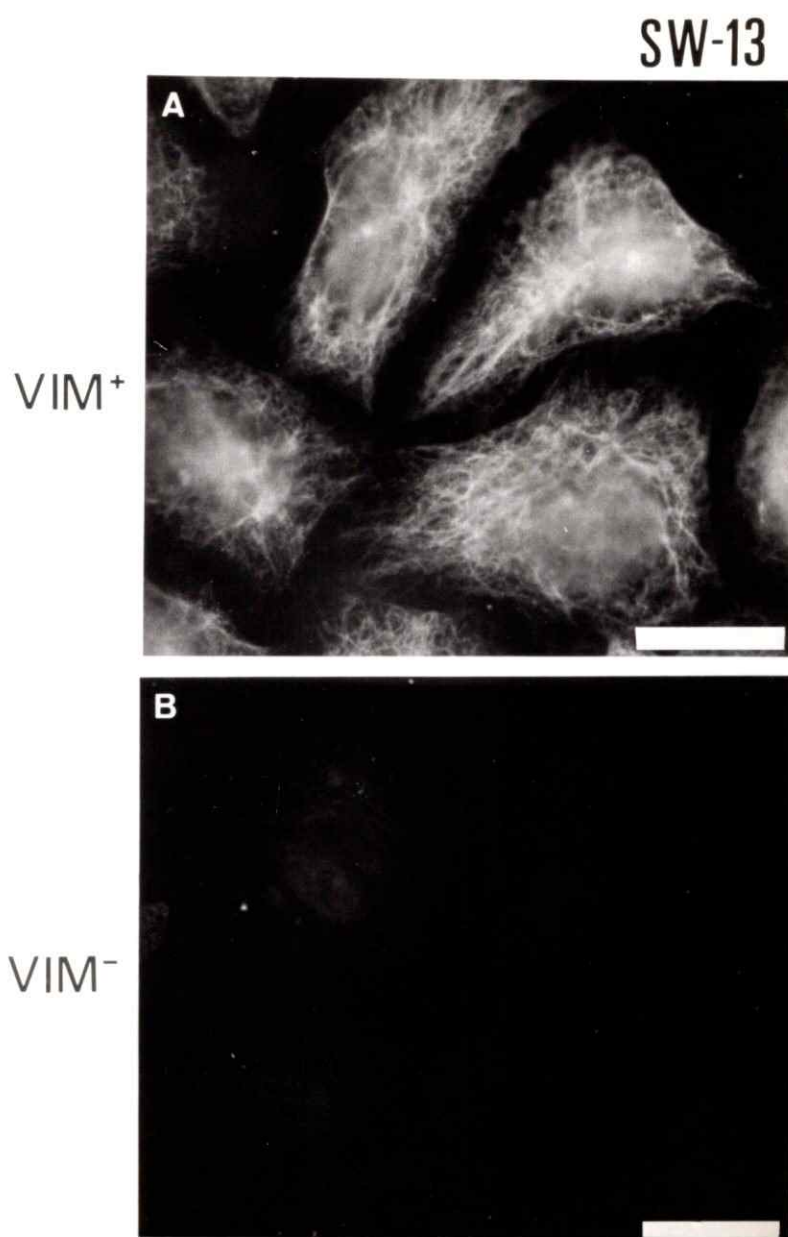
Un hallazgo interesante resultó del análisis realizado para la proteína de los filamentos intermedios, vimentina. Experimentos de inmunofluorescencia usando un anticuerpo monoclonal anti-vimentina permitieron observar la presencia de una red estructurada de filamentos citoplasmáticos en células del clón 1 (Figura 6A), lo cual está de acuerdo con el análisis realizado mediante electrotransferencia e inmunotinción. Sin embargo, células del clón 2 presentaron una reacción de inmunofluorescencia negativa para la presencia de una red de vimentina (Figura 6B), lo que confirma los estudios precedentes que indican la carencia de una estructura organizada de vimentina en las células mutantes. La localización subcelular de la proteína tau con un anticuerpo policlonal anti-tau mostró que esta proteína está principalmente asociada a la red de microtúbulos citoplasmáticos (Figura 7A y B), de acuerdo a los patrones para la distribución de microtúbulos como se muestra en la Figura 4. Una situación similar ocurrió en el caso de la proteína MAP-2 con un anticuerpo monoclonal anti-MAP2 (Figura 8A y B). A pesar que la imagen de la distribución de tau en células vim- pareciera mostrar una mayor fluorescencia que en las células vim+, no es posible cuantificar tal observación y en consecuencia este tipo de estudio fue



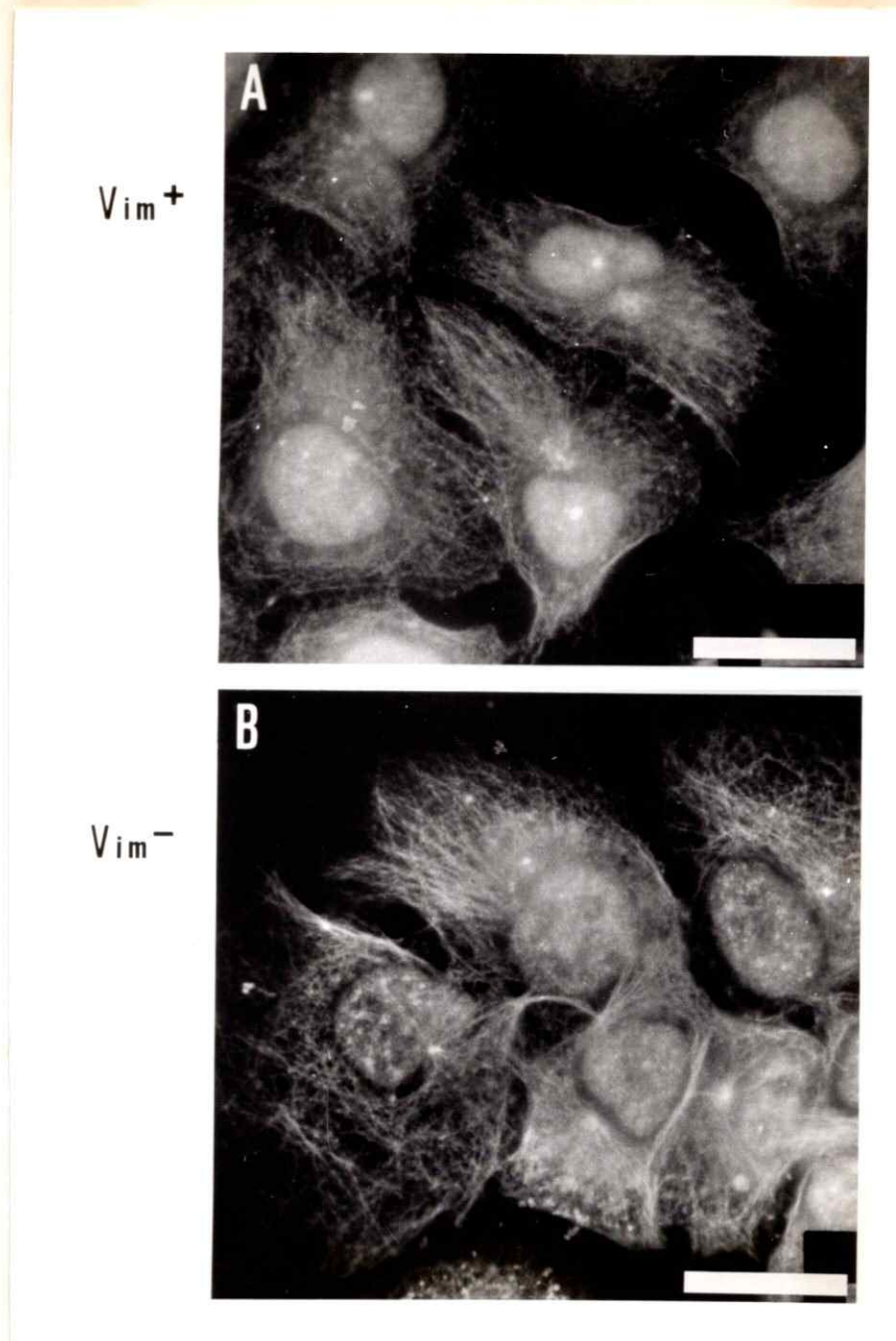
**Figura 4:** Localización y distribución subcelular de tubulina en células SW-13 vim(+) (A) y SW-13 vim(-) (B). La distribución de tubulina en relación a la ausencia de una red de filamentos intermedios del tipo vimentina en células vim(-) mutantes fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta simple usando un anticuerpo policlonal anti-tubulina. Este anticuerpo reaccionó con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado al fluorocromo FITC. El patrón de inmunofluorescencia para tubulina correspondiente a la distribución de microtúbulos no mostró diferencias en células de los clones 1 y 2. La barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .



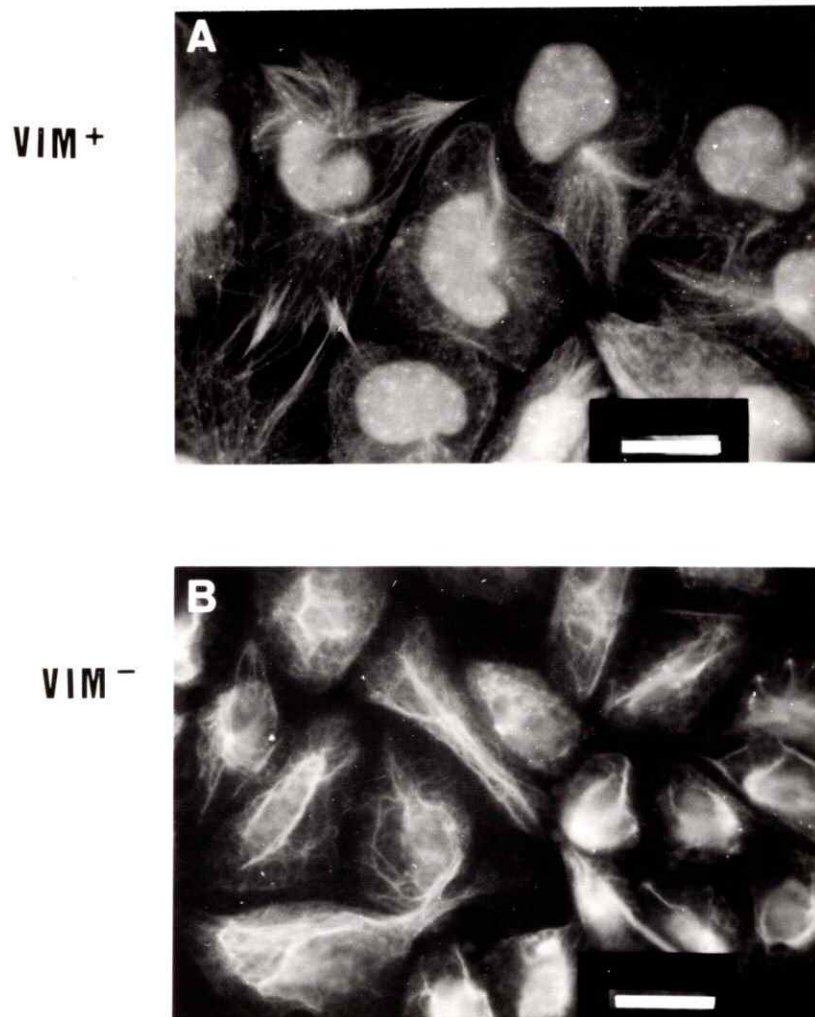
**Figura 5:** Localización y distribución subcelular de actina en células SW-13 vim(+) (A) y SW-13 vim(-) (B). La distribución de actina y su organización en células que carecen de filamentos de vimentina (células del clón 2 mutante) y en la cepa silvestre fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia simple usando un anticuerpo monoclonal anti-actina. La inmunoreacción fue completada con la adición de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo FITC. El patrón de inmunofluorescencia coincidió con la presencia de filamentos de actina del tipo fibras de estrés con una distribución y apariencia similar en ambos tipos celulares. La barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6: Localización y distribución subcelular de proteínas de filamentos intermedios en células SW-13 vim(+)(A) y SW-13 vim(-) (B).** La presencia de la proteína de los filamentos intermedios, vimentina fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta simple usando un anticuerpo monoclonal anti-vimentina. Este anticuerpo reaccionó con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo TRITC. El patrón de inmunofluorescencia mostró la presencia de una red estructurada de filamentos intermedios citoplasmáticos en células del clón 1 y la ausencia de estos filamentos en las células del clón 2 mutante. La barra corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 7: Localización y distribución subcelular de tau en células SW-13 vim(+) (A) y SW-13 vim(-) (B).** La presencia de tau en células de los clones 1 y 2 fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta simple con un anticuerpo policlonal anti-tau. Este anticuerpo fue detectado con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugada al fluorocromo FITC. El patrón de inmunofluorescencia indica la asociación de tau con microtúbulos en ambos tipos celulares. La barra equivale a 20 µm.



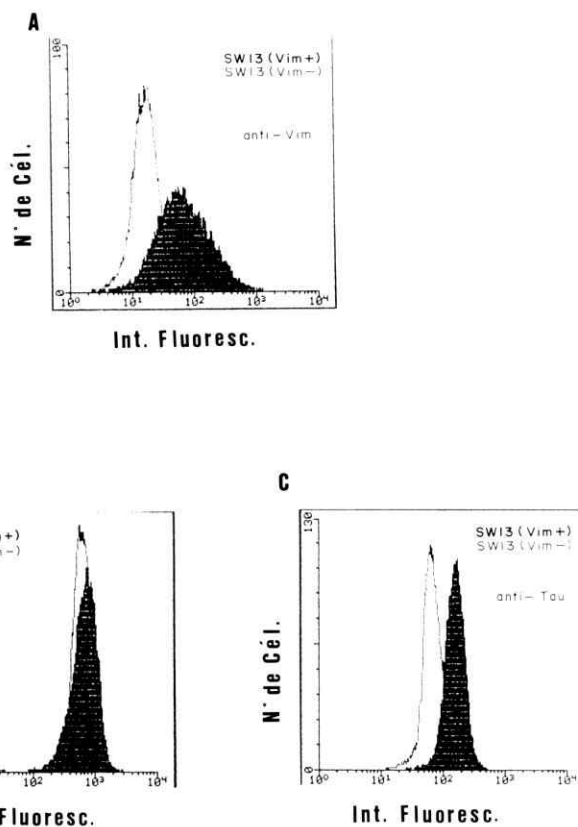
**Figura 8:** Localización y distribución subcelular de una proteína del tipo MAP-2 en células SW-13 vim(+) (A) y SW-13 vim(-) (B). La presencia de una proteína inmunoreactiva con anticuerpos contra la MAP-2, y su relación a la ausencia de una red de filamentos de vimentina en células mutantes vim(-) fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta simple usando un anticuerpo monoclonal anti-MAP-2. La inmunoreacción fue completada con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluorocromo TRITC. El patrón de inmunofluorescencia indica la asociación de MAP-2 a microtúbulos en ambos tipos celulares. La barra equivale a 20  $\mu\text{m}$ .



complementado con un análisis por citometría de flujo de la presencia de tau asociada a la red de polímeros.

Análisis de la presencia de proteínas del citoesqueleto en células SW-13 mediante citometría de flujo.

El estudio de caracterización de los componentes del citoesqueleto de células de los clones 1 y 2 de la línea SW-13 mostró que, aparentemente mediante el análisis morfológico, no existe una relación entre la ausencia de una red estructurada de filamentos del tipo vimentina y la distribución de componentes del citoesqueleto principalmente, tubulina, actina, MAP-2 y tau. No fue posible observar mediante estudios de inmunofluorescencia una alteración significativa en la organización de estos componentes producto de la ausencia de una red de vimentina en el clón 2 de estas células. De este modo, este tipo de estudio fue complementado con un análisis de IFI simples por citometría de flujo para detectar la presencia de proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto, fundamentalmente, tubulina, vimentina y tau. Esta técnica permite evaluar la presencia de estas proteínas formando parte de filamentos, ya que mediante el procedimiento de permeabilización de las células, la fracción soluble de estas proteínas es eliminada y sólo quedan los elementos estructurados del citoplasma. Los valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada uno de los anticuerpos específicos utilizados resulta ser proporcional a la cantidad de antígeno presente en la célula, lo que permitió comparar la presencia de estas proteínas en los clones 1 y 2 de SW-13. En primer lugar, la presencia de tubulina en ambos tipos celulares fue estudiada mediante un anticuerpo policlonal anti-tubulina que no mostró una IMF distinta (valores relativos de 740,1 respecto a 682,3) en un clón silvestre con respecto al mutante (Figura 9, Tabla I). Sin embargo, la IMF para un anticuerpo monoclonal anti-vimentina fue mayor en



**Figura 9:** Distribución de la inmunofluorescencia de células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-) marcadas con anticuerpos contra diferentes proteínas del citoesqueleto. La presencia de proteínas del citoesqueleto fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia por citometría de flujo. Las células de los clones 1 (perfil negro) y 2 (perfil blanco) fueron tratadas con los anticuerpos: monoclonal anti-vimentina (A), policlonal anti-tubulina (B) y policlonal anti-tau (C) e incubadas con los respectivos segundos anticuerpos conjugados al fluorocromo FITC. Los valores de intensidad promedio de fluorescencia obtenidos para vimentina y tau mostraron una relación entre la ausencia de una red de vimentina y la organización de tau. Otros detalles en Materiales y Métodos.

## ESTUDIO POR CITOMETRIA DE FLUJO DE LA PRESENCIA DE PROTEINAS DEL CITOESQUELETO DE CELULAS SW-13 (VIM+) Y (VIM-)

Anticuerpos	Intensidad media de fluorescencia <sup>1</sup>	
	SW-13 (Vim+)	SW-13 (Vim-)
Control anti-IgG (ratón)	3,8± 1,17	3,3± 3,13
anti-vimentina	106,1± 126,12	19,2± 19,98
Control anti-IgG (conejo)	29,12± 8,61	31,7± 30,7
anti-tubulina	740,1± 322,4	682,3± 238,4
anti-tau	166,3± 62,06 <sup>2</sup>	73,0± 29,94

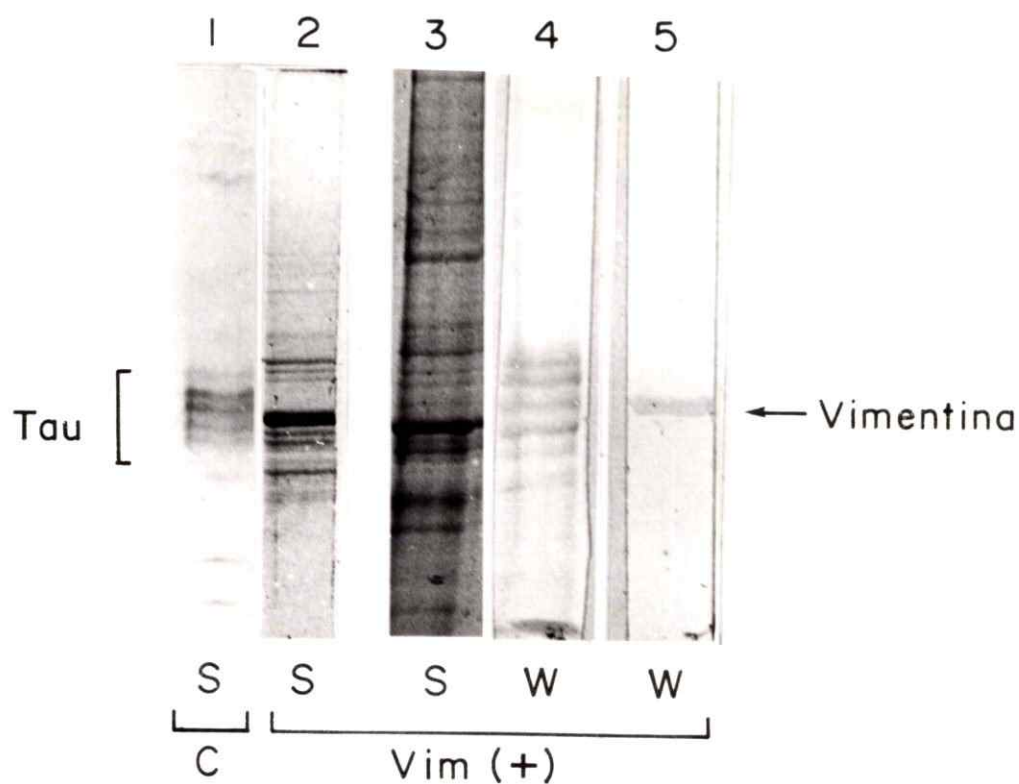
<sup>1</sup> Los valores de intensidad promedio de fluorescencia (IMF), que siguen una relación logarítmica, corresponden a cada una de las proteínas en estudio, en un experimento realizado bajo las mismas condiciones de calibración del instrumento. <sup>2</sup> Los valores de S.D. para cada medición se derivan de la distribución normal de intensidades para una población observable de 10.000 células de este experimento. En este análisis se observaron diferencias en la expresión de tau en dicha población de células entre células Vim (+) y el mutante Vim(-). Otros dos experimentos realizados en días diferentes y bajo condiciones experimentales similares también mostraron diferencias en tau entre los dos clones celulares. Debido a que por la naturaleza del instrumento, el citómetro de flujo fue calibrado para cada uno de los experimentos realizados en días diferentes, las determinaciones de inferencia estadística basadas en los parámetros de IMF y los errores estándares respectivos obtenidos de dichos experimentos tendrían un sesgo derivado de los cambios en dicha calibración. Los estudios indican una tendencia observada que mostró diferencias entre los valores de tau de Vim(+) y Vim(-) en los tres diferentes experimentos.

células del clón 1 con respecto a las del clón 2, mostrando valores relativos de 106, 1 y 19,2 respectivamente. Esta diferencia en la cantidad de vimentina formando parte de polímeros entre ambos tipos celulares estuvo acompañada de una disminución en la IMF revelada con el anticuerpo policlonal anti-tau TN-2 en células del clón 2, variando los valores relativos desde 166,3 en las células de la cepa silvestre a 73,0 para el mutante carente de filamentos de vimentina (Figura 9, Tabla I). Los datos obtenidos mediante este análisis cuantitativo sugieren una posible relación entre la presencia de una red de polímeros de vimentina y la organización de la proteína tau.

## **B. Estudios de interacción vimentina-MAPs.**

### Ensayos de co-sedimentación entre vimentina y tau

Como un primer enfoque al estudio de la interacción entre la red de microtúbulos y las proteínas de los filamentos intermedios mediada por componentes de la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), se ensayó la capacidad de asociación *in vitro* de vimentina con la proteína tau. Con esta finalidad, se preparó vimentina según el protocolo descrito por Domingo et al. (1992) proveniente de células del clón 1, la que fue solubilizada en un tampón MES 50mM pH 6,8 y urea 8M. El análisis por electroforesis mostró una prominente banda cercana a los 58 kDa (Figura 10A, carril 2). La proteína tau fue purificada a partir de cerebro de bovino según se detalló en la sección anterior y la inmunotinción con un anticuerpo policlonal anti-tau mostró un grupo de bandas con masas moleculares entre los 55 y los 65 kDa (Figura 10A, carril 1). La asociación de la proteína tau con la preparación enriquecida en vimentina de células del clón 1 fue ensayada en un experimento de co-sedimentación, luego de una incubación toda la noche a 4°C y centrifugación a

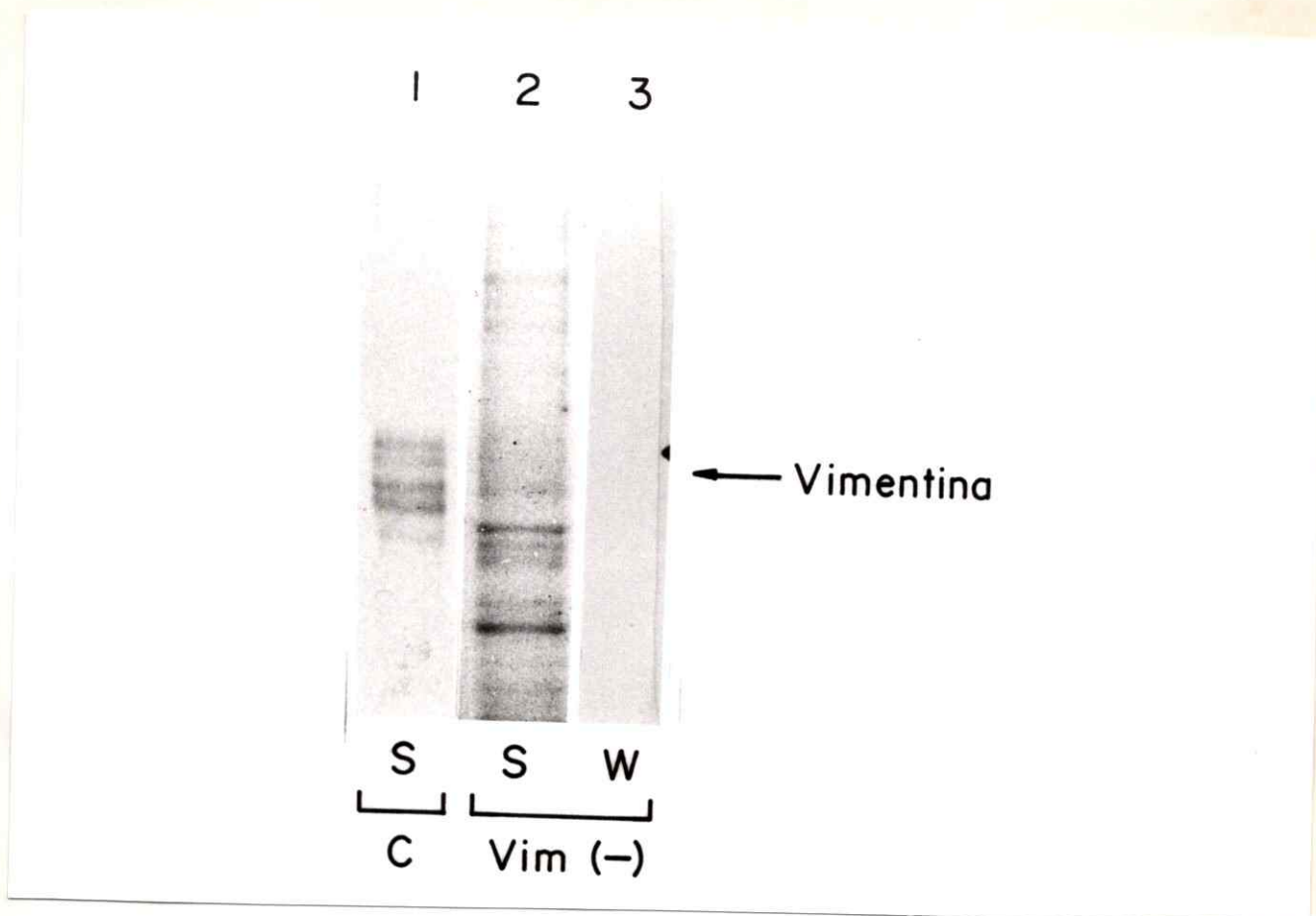


**Figura 10A: Estudio de la asociación de vimentina y tau en células SW-13 vim (+).** Se realizó un ensayo de co-sedimentación entre vimentina proveniente de una preparación de citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios de células del clón 1 y tau purificada de cerebro de bovino (C). El análisis por electroforesis (S) de estas preparaciones mostró una prominente banda en los 58 kDa (carril 2) correspondiente a vimentina y un grupo de bandas entre los 55 y 65 kDa (carril 1) en el caso de tau. El material obtenido como producto de co-sedimentación fue analizado por PAGE-SDS (S) (carril 3). La electrotransferencia e inmunotinción (W) con un anticuerpo anti-tau (carril 4) y un anticuerpo anti-vimentina (carril 5) detectó la presencia de tau y vimentina en las pellas. La posición de vimentina se indica con la flecha.

15.000 rpm. El material presente en las pellas resuspendidas en tampón muestra fue analizado mediante PAGE-SDS y mostró la presencia de un grupo de proteínas con masas moleculares entre los 55 y 65 kDa (Figura 10A, carril 3). Por otra parte, la inmunotinción con un anticuerpo policlonal anti-tau indicó un patrón complejo de proteínas entre los 55 y 65 kDa, que podría corresponder a isoformas de esta proteína que presenta heterogeneidad (Figura 10A, carril 4), mientras que la inmunoreacción con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina mostró una única banda reactiva con una masa molecular de 58 kDa (Figura 10A, carril 5). Tanto vimentina como las especies moleculares de tau fueron detectadas en el material resultante de la co-sedimentación (Figura 10A, carriles 4 y 5). Con el propósito de visualizar los componentes en estudio, en dicho análisis la proteína aplicada al gel fué menor en los carriles 1 y 2 en relación al carril 3 que contenía el producto total de co-sedimentación. Como control, se realizó también el mismo ensayo entre una fracción de citoesqueleto de células del clón 2 mutante y una muestra de tau purificada a partir de cerebro de bovino (Figura 10B, carril 1). El análisis del producto de esta co-sedimentación mediante electroforesis (Figura 10B, carril 2) e inmunotransferencias, en contraste a células vim(+) reveló la ausencia de tau (Figura 10B, carril 3), indicando que esta proteína no se asocia a otras proteínas sedimentables, puesto que vimentina no está presente en dichas células.

#### Ensayos de unión directa entre vimentina y tau

Se preparó citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios según el protocolo descrito por Domingo et al. (1992) a partir de células de los clones 1 y 2 de la línea SW-13 crecidas en cultivo, y el material resultante fue analizado mediante PAGE-SDS y por electrotransferencia seguida por inmunotinción.



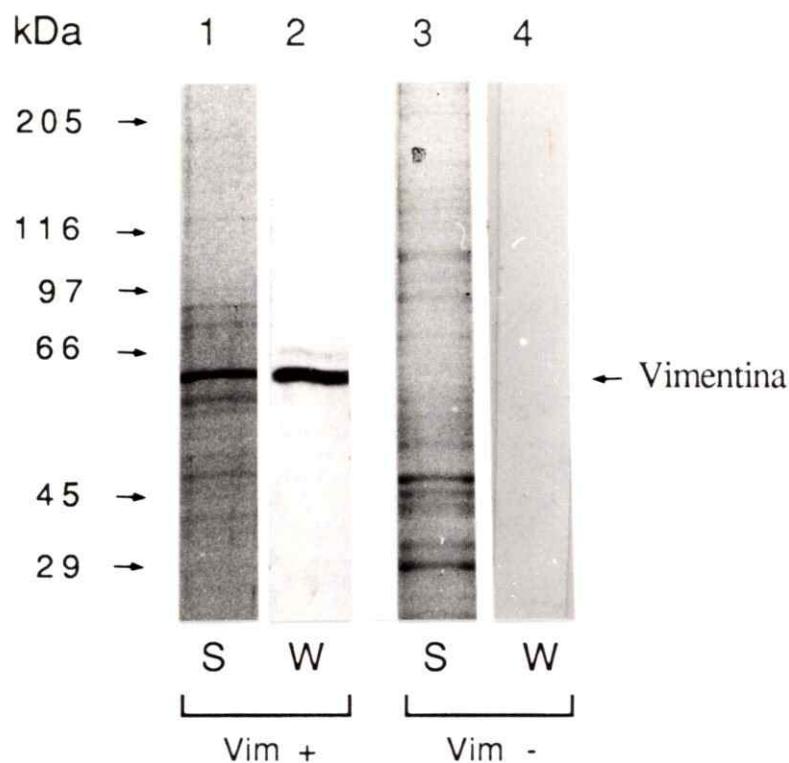
**Figura 10B: Estudio de la asociación de tau y fracciones de citoesqueleto de células SW-13 vim (-).** Como control de la asociación de vimentina con tau se realizó un ensayo de co-sedimentación entre tau purificada de cerebro de bovino (C) y una fracción de citoesqueleto de células del clón 2 mutante. El material obtenido de esta co-sedimentación fue analizado por PAGE-SDS (S) (carril 2) y mediante electrotransferencia e inmunotinción (W) con un anticuerpo anti-tau (carril 3) no fue posible detectar la presencia de tau que estuvo asociada a una ausencia de vimentina en estas células.

Estos análisis mostraron la presencia en células del clón 1, de una prominente banda en torno a los 58kDa que correspondió a vimentina según la inmunotinción con un anticuerpo monoclonal contra esta proteína (Figura 11, carriles 1 y 2), y la ausencia de esta proteína en células del clón 2 (Figura 11, carriles 3 y 4). Esta preparación de vimentina de células del clón 1 fue utilizada para ensayar la capacidad de unión de vimentina a tau, la proteína asociada a microtúbulos de masa molecular intermedia. Para esto, una preparación de citoesqueleto rica en vimentina de células del clón 1 separada por PAGE-SDS y electrotransferida a nitrocelulosa (Figura 12, carriles 2 y 3) fue incubada con tau purificada a partir de cerebro de bovino (Figura 12, carril 1). La unión de tau a la vimentina inmovilizada en nitrocelulosa, del material electrotransferido, fue detectada con un anticuerpo policlonal anti-tau, observándose así una banda inmunoreactiva con una migración correspondiente a vimentina (Figura 12, carril 4). Como primer control del ensayo de unión, se incubó la preparación rica en vimentina con tampón sin tau, y como segundo control una preparación de citoesqueleto de células del clón 2 (que no expresa vimentina) separada y transferidas de la misma forma que las células del clón 1 fue incubada con tau pura. En ambos casos la incubación con un anticuerpo anti-tau no mostró reacción (Figura 12, carriles 5 y 6).

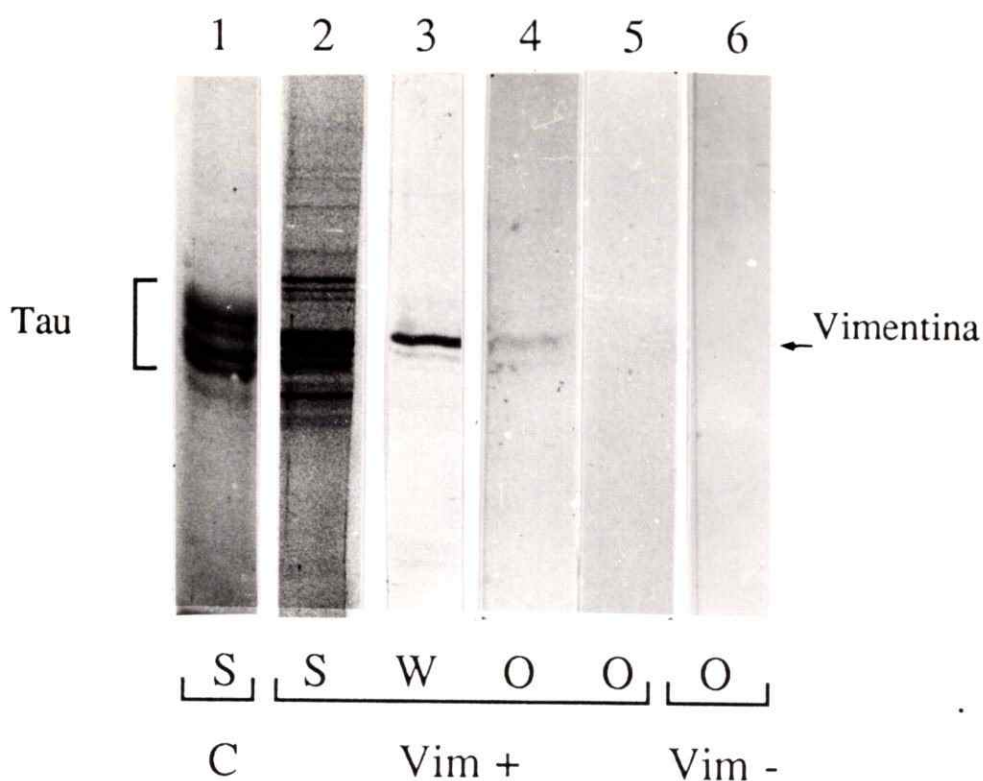
#### Ensayos de unión directa entre vimentina y MAP-2

Se estudió la interacción entre vimentina con el componente de la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos de alto peso molecular, MAP-2. Para ello, una preparación de citoesqueleto rica en vimentina de células del clón 1 separada y electrotransferida a nitrocelulosa fue incubada con una preparación de proteína microtubular de cerebro de bovino obtenida según el protocolo de Shelanski et al. (1973) conteniendo MAP-2 (Figura 13, carriles 1 y 2).

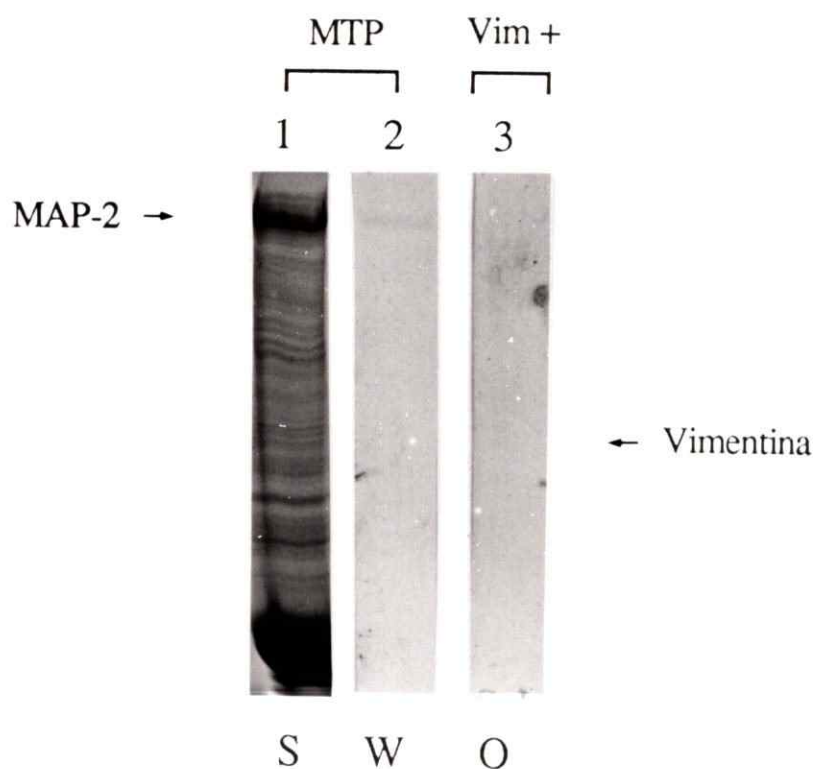




**Figura 11: Caracterización de proteínas del citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios de células SW-13 vim(+) y SW-13 vim(-).** La presencia de vimentina en preparaciones de citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios fue analizada mediante electroforésis (S) y electrotransferencia e inmunotinción (W). El análisis por PAGE-SDS reveló la presencia de un grupo de bandas, de las que se destaca por su mayor abundancia una proteína con una migración en el peso de los 58 kDa (carril 1), y la ausencia de esta prominente banda en preparaciones del clón 2 (carril 3). La presencia de vimentina fue analizada con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina que inmunoreaccionó con una banda de 58 kDa en preparaciones del clón 1 (carril 2). Una ausencia de reacción se observó en células del clón 2 (carril 4). La inmunotinción fue completada en todos los casos con la adición de un segundo anticuerpo que fue proteína-A conjugada a fosfatasa alcalina con su sustrato BCIP/NBT. La flecha indica la posición de vimentina en los 58 kDa.



**Figura 12: Estudio de la interacción entre vimentina y tau.** La interacción entre vimentina proveniente de células SW-13 vim(+) y tau purificada a partir de cerebro de bovino (C) fue analizada mediante ensayos de unión directa de tau sobre vimentina electrotransferida e inmobilizada en nitrocelulosa ("overlay"). Se preparó citoesqueleto enriquecido en filamentos intermedios (carril 2) y un análisis por PAGE-SDS (S) y posteriormente con un anticuerpo anti-vimentina (W) reveló la presencia de vimentina en la muestra (carril 3). La vimentina electrotransferida fue incubada con tau pura (carril 1) y la reacción de unión (O) fue analizada luego de la incubación con un anticuerpo anti-tau que reveló la presencia de una banda con migración en los 58 kDa (carril 4). Como control se incubó la vimentina electrotransferida con tampón sin tau, y en forma adicional se preparó citoesqueleto de células del clón 2 mutante que fue electrotransferido e incubado con tau pura. En ambos casos no se observó reacción con un anticuerpo anti-tau (carriles 5 y 6). La flecha corresponde a la migración de vimentina en los 58 kDa.

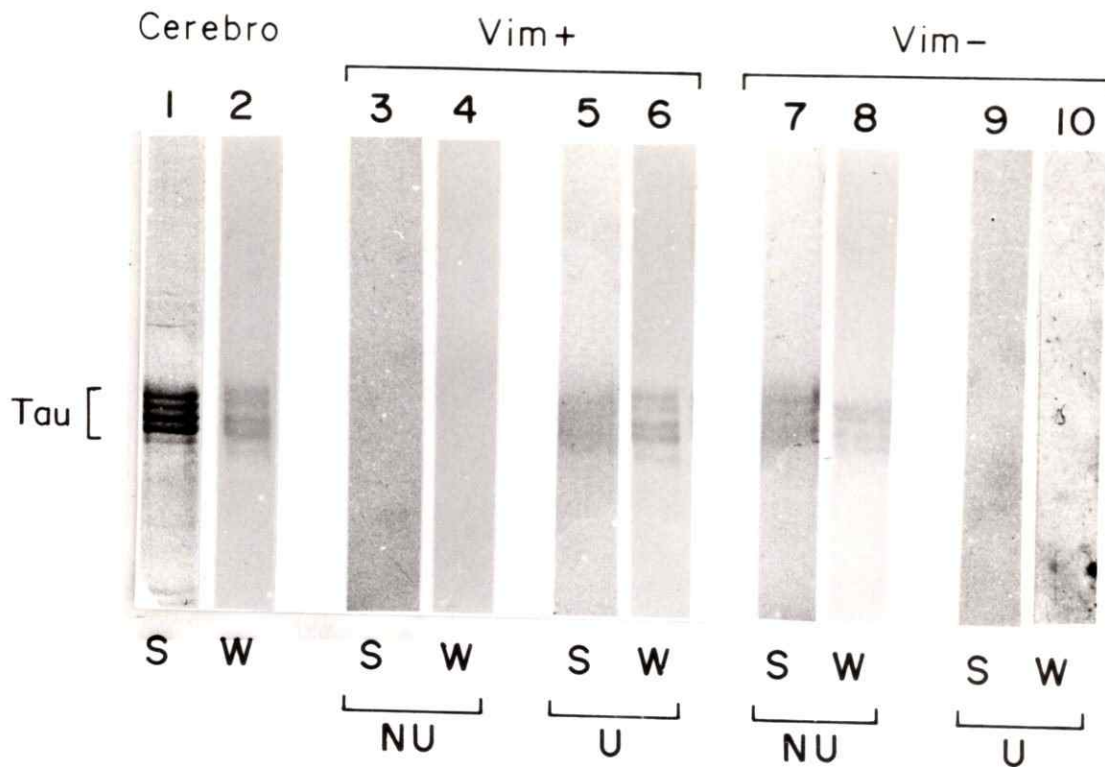


**Figura 13: Estudio en células SW-13 vim (+) de la interacción entre vimentina y MAP-2 de proteína microtubular.** La interacción entre vimentina proveniente de células del clón 1 y MAP-2 fue estudiada mediante ensayos de unión directa entre vimentina electrotransferida a nitrocelulosa y una preparación de proteína microtubular de cerebro de bovino (MTP). La presencia de MAP-2 fue analizada por electroforesis (S) y revelada por inmunotinción (W) con un anticuerpo anti-MAP-2 (carril 2). Se incubó una preparación de citoesqueleto enriquecido en vimentina de células vim (+) con proteína microtubular conteniendo MAP-2 (O) y la reacción negativa con un anticuerpo anti-MAP-2 (carril 3) mostró que vimentina no se asocia con MAP-2 en las condiciones ensayadas. La flechas indican la migración de MAP-2 y de vimentina con masas moleculares de 270 y 58 kDa respectivamente junto con los respectivos marcadores de peso molecular.

La presencia de MAP-2 fue verificada en un conjunto de experimentos (n=4) con resultados similares. La reacción negativa con un anticuerpo monoclonal anti-MAP-2 (Figura 13 , carril 3) mostró que MAP-2 no se unió a vimentina en las condiciones ensayadas.

#### Interacción entre vimentina y tau en columnas de afinidad DNA de hebra simple

Como un enfoque adicional al estudio de la interacción entre vimentina, con la tau, se preparó una columna de DNA de hebra simple unida a celulosa, a la cual se acopló vimentina presente en una preparación de citoesqueleto rica en filamentos intermedios proveniente de células del clón 1 vim (+). Se sembró sobre esta columna de DNA-vimentina una muestra de tau purificada de cerebro de bovino (Figura 14, carriles 1 y 2). Una fracción importante de esta proteína fue retenida por la columna y posteriormente eluída con 0,3M KCl (Figura 14, carriles 5 y 6), en tanto que en las fracciones de lavado de la columna correspondientes a las alícuotas de material no retenido (Figura 14, carriles 3 y 4) no se detectó inmunoreactividad para tau. Como control de la presencia de vimentina unida a la matriz de DNA-celulosa al finalizar la cromatografía se agregó una solución de 0,6M KCl con la cual se logró eluir una proteína que fue detectada con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina. Como control de la unión de tau a la columna de DNA-vimentina se preparó una columna de DNA-celulosa con una fracción de citoesqueleto de células del clón 2 vim (-) sobre la cual se sembró tau pura. La cromatografía en la columna fue desarrollada en las mismas condiciones que el experimento anterior, pero en este caso la proteína tau no fue retenida por la columna y pudo ser detectada en las alícuotas del lavado (Figura 14, carriles 7 y 8). Luego de aplicar 0,3M KCl a la columna, no se logró eluir ninguna proteína detectable con el anticuerpo anti-tau (Figura 14, carriles 9 y 10).

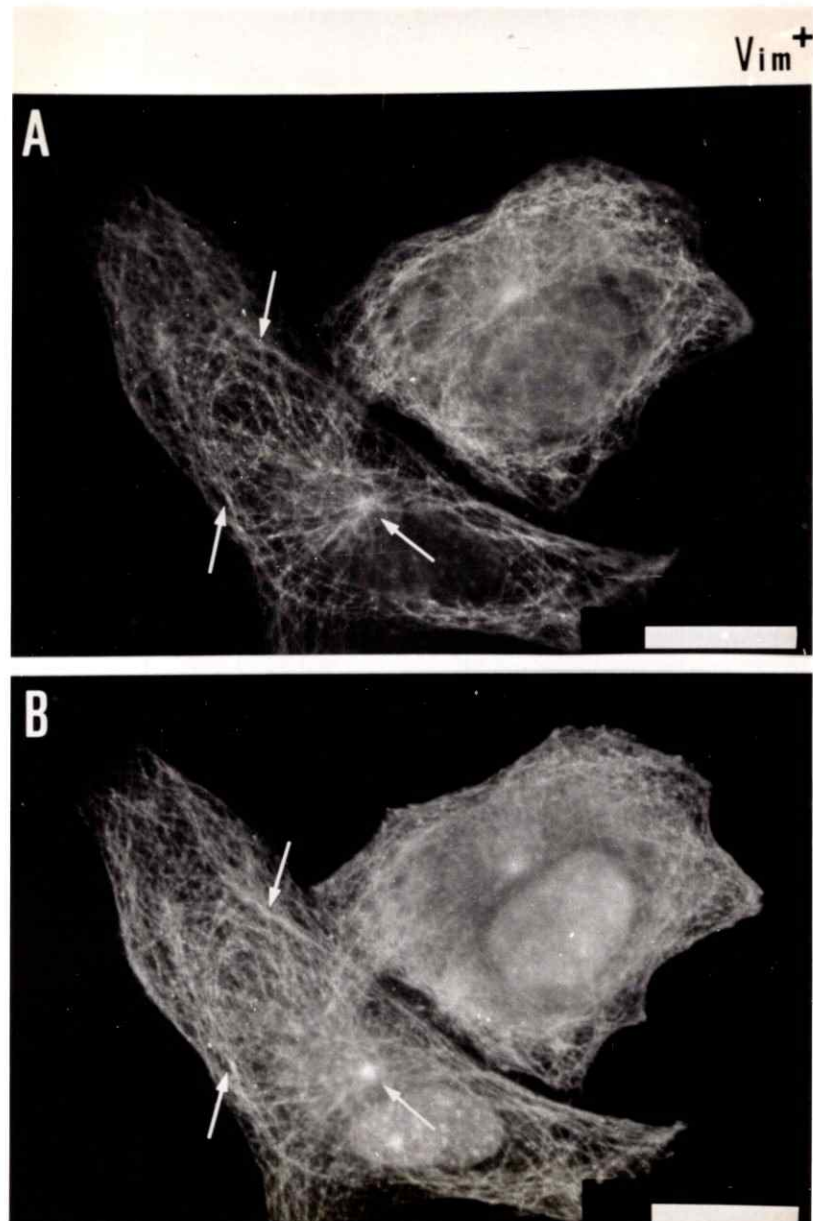


**Figura 14: Estudio de la interacción entre tau y vimentina unida a DNA de hebra simple-celulosa en células SW-13 vim (+).** La unión de vimentina de células del clón 1 y tau purificada de cerebro de bovino (Cerebro) fue analizada mediante cromatografía de afinidad de tau a una columna de DNA de hebra simple con vimentina unida. Se preparó citoesqueleto enriquecido en vimentina que fue acoplado a una matriz de DNA de hebra simple-celulosa y una muestra de tau pura, analizada por electroforesis (S) e inmunoteñida con un anticuerpo anti-tau (2) fue sembrada en esta columna. La presencia de tau en la fracción unida (U) y eluida con 0,3M KCl (carriles 5 y 6) así como la falta de inmunoreactividad con un anticuerpo anti-tau en las fracciones de lavado (carriles 3 y 4) del material no unido (NU) reveló la interacción de tau con vimentina presente en la columna. Como control se preparó una columna de citoesqueleto de células del clón 2 unido a DNA de hebra simple sobre la que se sembró tau pura. La tau no fue retenida por la columna y fue detectada en los lavados (carriles 7 y 8). La reacción negativa con el anticuerpo anti-tau mostró que en las fracciones eluidas con sal no pudo ser detectada ninguna proteína (carriles 9 y 10).

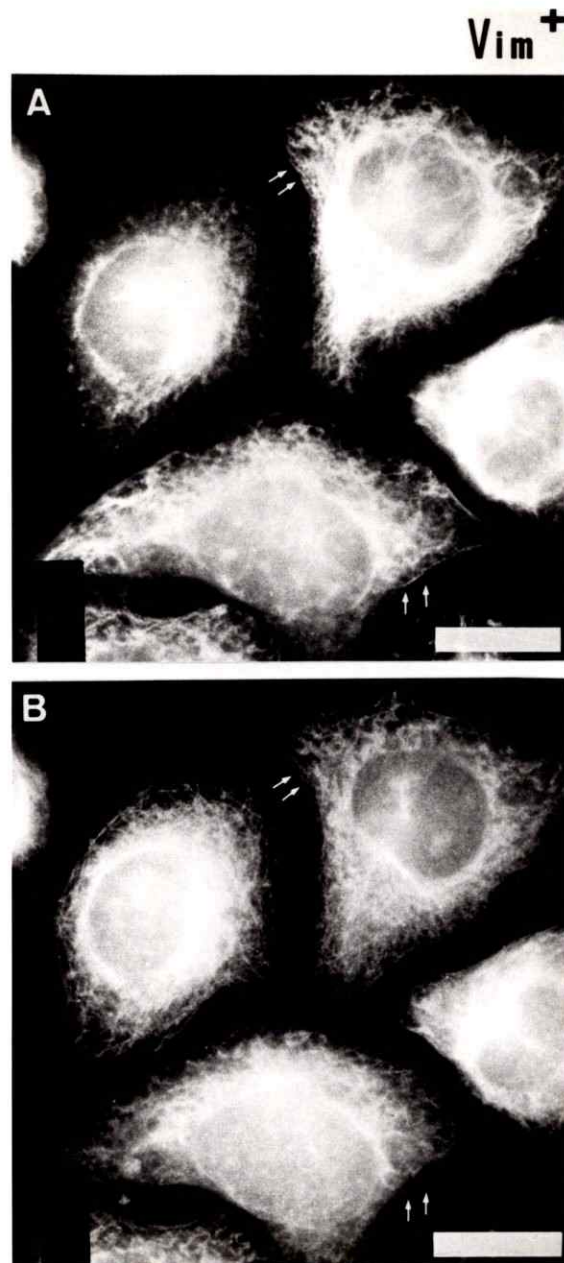
### Estudios de co-distribución de las redes de tubulina, vimentina y tau

Los resultados obtenidos previamente sugirieron una probable interacción entre la red de microtúbulos y la red de vimentina, mediada por la MAP de masa molecular intermedia, tau. En forma complementaria a los ensayos de co-sedimentación, de unión directa y de cromatografía en columna de afinidad, se realizaron estudios morfológicos con objeto de analizar una probable relación entre la distribución de vimentina, tubulina y la proteína tau. Estos estudios de interacción se llevaron a cabo mediante inmunofluorescencias indirectas dobles en que se analizó en forma simultánea la distribución de los sistemas: a) tubulina/tau, b) vimentina/tubulina y de c) vimentina/tau.

Células del clón 1 de SW-13 crecidas en condiciones de subconfluencia, en medio de cultivo suplementado con SFB 10% de acuerdo a Cross y cols., (1993), fueron permeabilizadas y fijadas previo a la incubación con los anticuerpos primarios específicos. La Figura 15 corresponde a una célula tratada en forma simultánea con un anticuerpo monoclonal anti-tubulina y un policlonal anti-tau y donde se observa la co-distribución de las redes de tubulina y de tau en dominios citoplasmáticos de la célula (Figura 15A y B, flechas) lo que ha sido previamente descrito (Cross y cols., 1993; Drubin y cols., 1986). El mismo patrón de co-localización de tau con la red de microtúbulos fue observado en estudios de inmunofluorescencia doble en células del clón mutante vim(-). El análisis realizado para estudiar las distribuciones de vimentina y tubulina en una misma célula mostró que ambas redes co-localizan en algunos dominios citoplasmáticos (Figura 16A y B, flechas) y la incubación simultánea con un anticuerpo anti-vimentina y un anti-tau sugirió una probable interacción entre las redes de microtúbulos y vimentina mediada por la proteína tau al observar que ambas proteínas co-distribuyen en ciertas regiones del citoplasma (Figura 17A y B, flechas). Los resultados obtenidos a través de un análisis subcelular de tubulina,

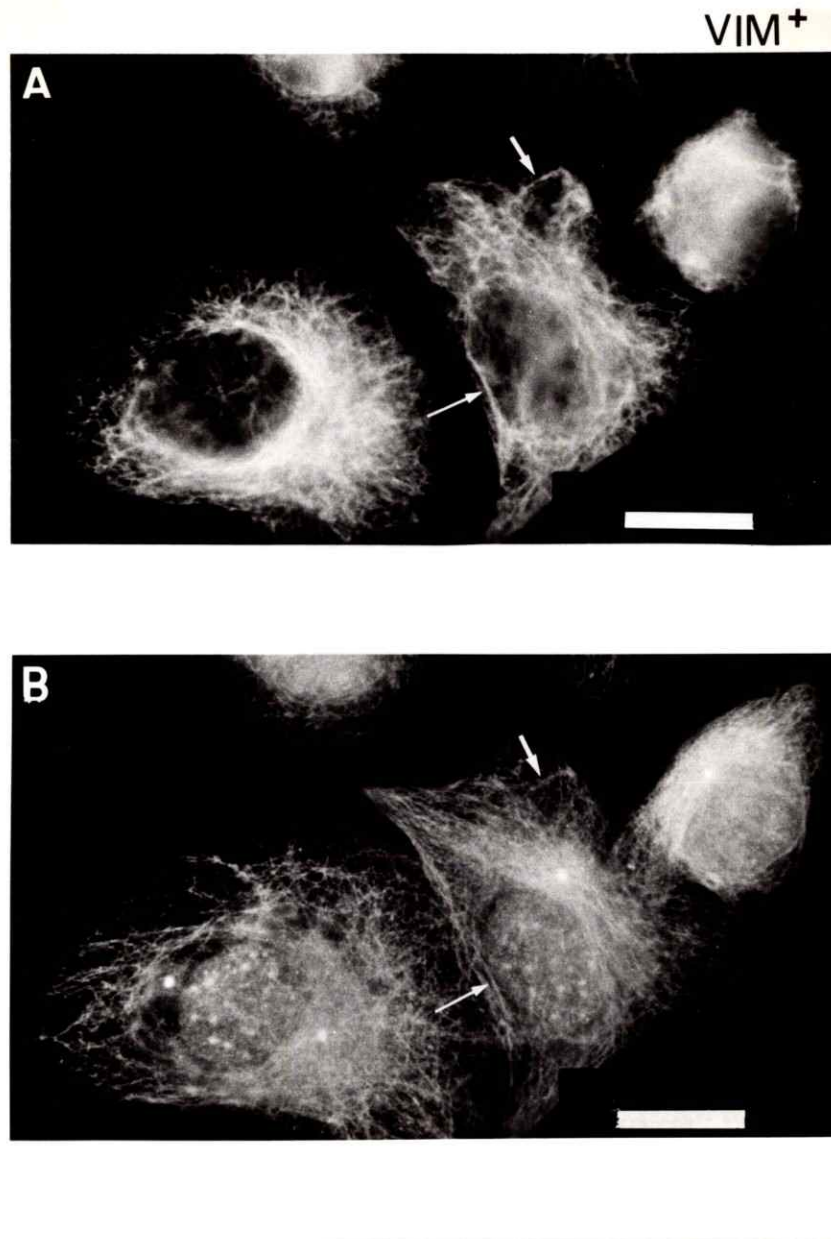


**Figura 15: Co-distribución de tau con microtúbulos en células SW-13 vim (+) en cultivo.** La distribución de tau en células del clón 1 fue analizada mediante doble inmunofluorescencia usando un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina (A) y un anticuerpo policlonal anti-tau (B). Como segundos anticuerpos se utilizó anti-IgG-FITC de conejo para revelar la reacción del anticuerpo policlonal y un anti-IgG-TRITC de ratón en el caso del monoclonal y las preparaciones fueron tratadas para su observación como se indicó en Materiales y Métodos. El patrón de inmunofluorescencia mostró que tau co-localiza con el patrón de polímeros de tubulina. La barra corresponde a 20  $\mu$ m.



**Figura 16: Co-distribución de las redes de microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina en células SW-13 vim (+) en cultivo.** La organización subcelular de tubulina y vimentina de células del clón 1 fue analizada mediante doble inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (A) y un anticuerpo policlonal anti-tubulina (B). Como segundos anticuerpos se utilizó anti-IgG-FITC de conejo para la reacción con el policlonal y anti-IgG-TRITC de ratón para el caso del monoclonal. El patrón de inmunofluorescencia para vimentina mostró una red estructurada de filamentos citoplasmáticos que co-localizaron con microtúbulos en algunos dominios de la célula (ref. flechas).

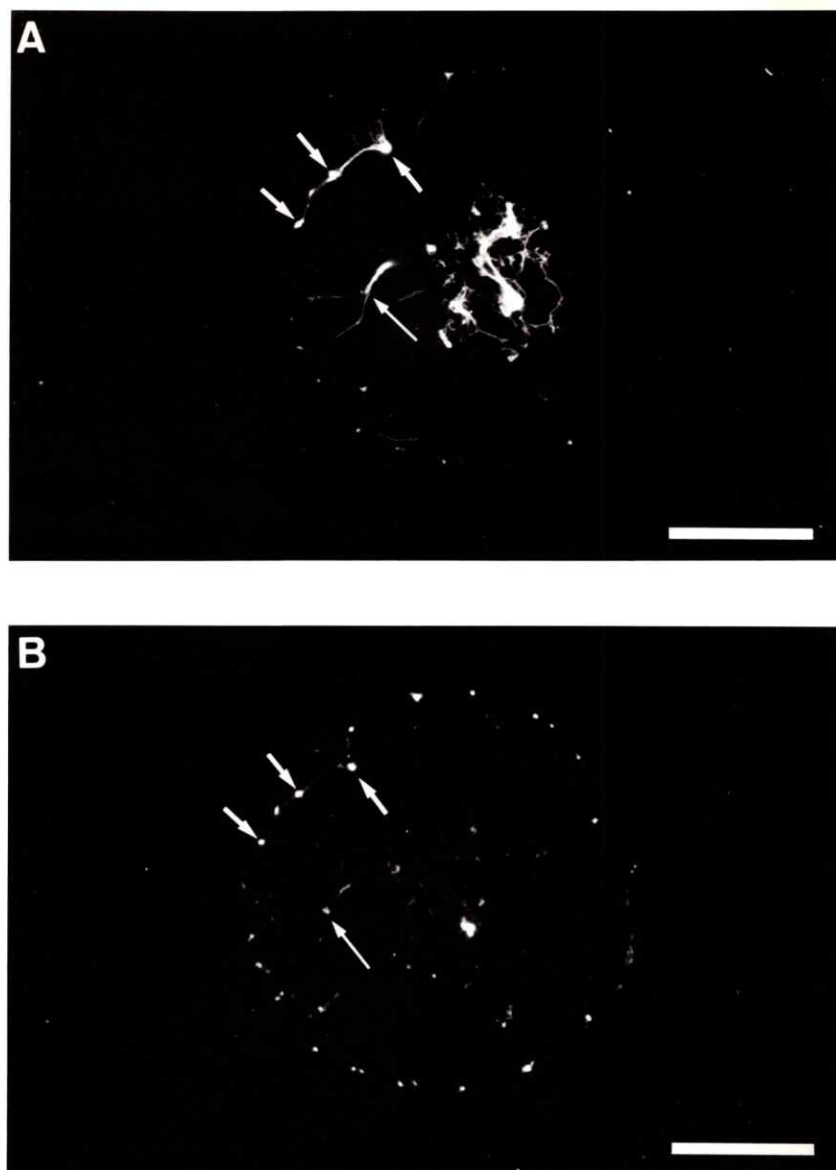




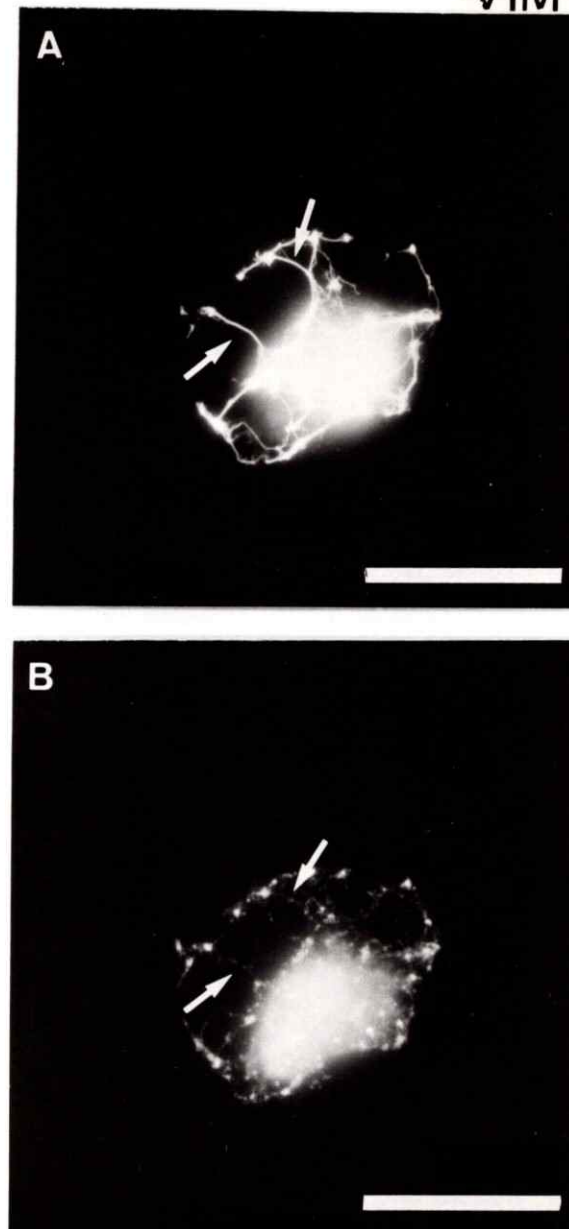
**Figura 17:** Co-distribución de tau y filamentos intermedios de vimentina en células SW-13 vim (+) en cultivo. La interacción entre tau y filamentos de vimentina fue analizada mediante doble inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (A) y un anticuerpo policlonal anti-tau (B). Como segundos anticuerpos se utilizó un anti-IgG-TRITC de ratón para la reacción con el monoclonal y anti-IgG-FITC de conejo en el caso del policlonal. El patrón de inmunofluorescencia para tau fue coincidente con la distribución de filamentos de vimentina en algunos dominios citoplasmáticos (ref. flechas), lo cual sugiere una probable interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina mediada por tau.

vimentina y tau, sugieren una probable relación en la distribución de estas proteínas. El estudio de co-localización de vimentina y tau en células vim(-) deficientes en la expresión de vimentina no mostró diferencias en términos de la organización de tau en comparación con las células vim(+).

Como un segundo enfoque morfológico al estudio de la interacción entre vimentina y la proteína tau, se trataron las células del clón 1 de SW-13 en cultivo con drogas que despolimerizan específicamente las redes de microtúbulos y actina, nocodazol (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y citocalasina B (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Cross y cols., 1993) respectivamente por 30 min. Sin dar tiempo de recuperación a las células, estas fueron permeabilizadas y fijadas para una evaluación subcelular mediante inmunofluorescencia indirecta doble. En ausencia total de una red estructurada de microtúbulos, de acuerdo a controles realizados previamente, se estudió el posible efecto sobre la co-distribución de vimentina y de la proteína tau. La Figura 18 corresponde a una célula del clón 1 que fue tratada con las drogas y posterior a la fijación fue incubada simultáneamente con un anticuerpo anti-vimentina y un anticuerpo anti-tau. Se observó una alteración dramática en la organización de la red de vimentina (Figura 18A) y de la proteína tau asociada a microtúbulos (Figura 18B). Junto a esta profunda alteración en los patrones de distribución de vimentina y de tau, se observó una co-distribución de ambas proteínas en regiones de la periferia celular (Figura 18, flechas). Al transferir las células a un medio libre de drogas, junto con la recuperación gradual de la red de microtúbulos observada en controles realizados previamente, se observó una re-organización de la red de vimentina (Figura 19A) y en consecuencia una co-distribución de la proteína tau en aquellas regiones citoplasmáticas donde los filamentos de vimentina se han organizado (Figura 19A y B, flechas).



**Figura 18:** Efecto de la despolimerización de microtúbulos y microfilamentos sobre la co-distribución de tau y filamentos de vimentina en células SW-13 vim (+). La interacción entre tau y vimentina fue analizada mediante doble inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (A) y un anticuerpo policlonal anti-tau (B) en células del clón 1 tratadas con nocodazol (10 mg/ml) y citocalasina B (1 mg/ml) por 30 min. Se retiró la droga del medio e inmediatamente se fijaron las células para su estudio por inmunofluorescencia. Junto con una alteración en la organización de la red de filamentos de vimentina y de la proteína tau asociada a microtúbulos, se observó una co-localización de tau y vimentina en regiones de la periferia celular (ref. flechas).



**Figura 19:** Efecto de la recuperación de las redes de microtúbulos y de actina sobre la co-distribución de tau y vimentina en células SW-13 vim (+). La interacción entre tau y vimentina fue analizada mediante doble inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (A) y un anticuerpo policlonal anti-tau (B) en células del clón 1 tratadas con nocodazol y citocalasina B por 30 min., luego de lo cual se retiraron las drogas y se permitió la recuperación de éstas por 10 min. Como segundos anticuerpos se utilizó anti-IgG-TRITC de ratón y anti-IgG-FITC de conejo para los anticuerpos señalados. Asociada a una recuperación de la organización microtubular se observó una co-localización del patrón de inmunofluorescencia para tau con regiones de re-organización de la red de vimentina.

## **DISCUSION**

### **Las ventajas del modelo celular SW-13 y células mutantes para el análisis de las interacciones vimentina-tau.**

En esta tesis hemos logrado profundizar el conocimiento de las interacciones macromoleculares que se establecen entre los diferentes componentes del citoesqueleto, y enfocado nuestro estudio hacia la interacción entre un componente de la familia de las MAPs, la proteína tau y vimentina, proteína de filamentos intermedios presente en un amplio grupo de líneas celulares. Mediante un enfoque experimental que incluyó procedimientos bioquímicos, inmunológicos y de inmunolocalización, logramos demostrar la capacidad de interacción de ambas proteínas. Los resultados de los experimentos de inmunofluorescencia en células SW-13 no tratadas y tratadas con drogas anti-citoesqueleto han entregado un fuerte apoyo a los estudios *in vitro* que muestran una interacción vimentina-tau.

Estos estudios se basaron en la existencia de clones que contienen o que carecen de una red estructurada de filamentos intermedios citoplasmáticos dentro de la línea celular SW-13 de adenocarcinoma humano, los que sin duda constituyen un modelo útil para evaluar estas interacciones y el significado funcional de los filamentos del tipo vimentina a nivel celular. Cabe hacer notar que SW-13 ha sido la primera línea celular humana en la que se han obtenido subclones que carecen de expresión de algún tipo de proteínas de los filamentos intermedios (Hedberg y Chen, 1986). En esta línea celular se ha logrado aislar clones que expresan (vim+) con un patrón en mosaico y clones que no expresan vimentina (vim-), a juzgar por estudios de inmunofluorescencia, microscopía electrónica y análisis en geles bidimensionales de preparaciones extraídas con detergentes (Sarría y cols., 1994). Además, estudios realizados en los clones

mutantes vim (-) demostraron la ausencia de mRNA para vimentina en estas células, lo que confirmaría que dicha proteína no se expresaría en el mutante (Evans, comunicación personal). Sin embargo, estudios de inmunofluorescencia mediante citometría de flujo realizados en esta tesis mostraron valores de intensidad para vimentina en las células mutantes que están por sobre los valores controles (ref. Tabla I). Los controles realizados fueron para cada uno de los anticuerpos secundarios utilizados y en este contexto resultaría de gran utilidad disponer de los respectivos valores control para cada uno de los anticuerpos primarios (controles de isotipo). Por lo tanto, resultaría esperable que las mediciones de intensidad de fluorescencia para vimentina en los mutantes correspondieran a valores basales. A pesar de que estas células tienen la morfología y un patrón de crecimiento en cultivo que es característico de células epiteliales, experimentos de inmunofluorescencia con un panel de anticuerpos anti-citokeratina dieron resultados negativos. Un análisis adicional de otras proteínas de los filamentos intermedios (GFA, neurofilamentos y desmina) no mostró evidencia de la presencia de otros sistemas de filamentos intermedios en estos subclones. Las proteínas de filamentos intermedios presentan en general una muy alta homología estructural. En este contexto, las células SW-13 tienen además la ventaja de no presentar reacción cruzada de anticuerpos anti-vimentina contra otras proteínas de filamentos intermedios.

### **Relación entre filamentos intermedios y organización citoplasmática**

En el presente trabajo se pudo identificar la presencia de diferentes componentes del citoesqueleto, principalmente tubulina, actina, vimentina, MAP-2 y tau en células de los clones vim (+) y la ausencia de vimentina en los clones vim (-) de SW-13. Por otra parte, estos estudios han sugerido que no existiría una relación entre la ausencia de una red estructurada de filamentos intermedios

del tipo vimentina y la organización citoplasmática de las redes de microtúbulos y filamentos de actina. En efecto, los experimentos de inmunofluorescencia indirecta no mostraron diferencias notables en el aspecto morfológico y la distribución de los microtúbulos presentes en ambos clones de SW-13. Por otra parte, patrones de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-actina mostraron una organización de fibras tipo estrés en ambos clones celulares. Las características del crecimiento en cultivo de células vim(+) y vim(-) no fueron significativamente diferentes, y tampoco se han detectado diferencias en los clones vim (+) y vim(-) en relación a la síntesis de macromoléculas comparando tasas relativas de síntesis de DNA, RNA y de proteínas (Sarria y cols., 1994). Así, los resultados de esta tesis, aunque con un enfoque diferente, apoyan la idea que los filamentos intermedios no contribuyen en forma determinante a la organización del citoplasma, de acuerdo con estudios previos de microinyección de anticuerpos anti-FI que inducían la destrucción de la red endógena de estos filamentos sin provocar cambios profundos en el citoplasma (Klymkowsky, 1981; Lin y Feramisco, 1981; Gawlitta y cols., 1981; Klymkowsky y cols., 1983; Summerhayes y cols., 1983; Tolle y cols., 1986).

La ausencia de una red de vimentina en las células vim(-) tampoco parece afectar las distribuciones de tau y MAP-2, pues los experimentos de localización subcelular de tau y MAP-2 mostraron que ambas proteínas se distribuyen a lo largo de filamentos citoplasmáticos sin diferencias apreciables entre ambos clones. Sin embargo, un hecho notable en este estudio fue el identificar la presencia de MAP-2 y también de la proteína tau en esta línea celular, pues son proteínas de distribución tisular muy específica. Sobre la base de los estudios de distribución se pensaba que estas proteínas eran exclusivamente neuronales, y tau con una organización axonal exclusiva. Estudios recientes en nuestro laboratorio y por otros autores han planteado que tau existiría en una variedad de líneas

celulares en cultivo (Maccioni y cols., 1992; Cross y cols., 1993). Además una observación interesante en los estudios realizados mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-tau (TN-2) fue la detección de una proteína tipo tau asociada al núcleo de células SW-13 vim(+) y vim(-). Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por Wang y cols., (1993) donde detectaron la presencia de un nuevo transcrito para tau de 2-kb que codifica para tau localizada en el núcleo de células de neuroblastoma. Más aún, el hallazgo de MAP-2 en SW-13 agrega una valiosa información al estudio de las MAPs.

Una evaluación de los cambios en la organización de los componentes del citoesqueleto en relación a los filamentos de vimentina, por citometría de flujo, nos permitió analizar cuantitativamente los componentes del citoesqueleto organizados en redes de filamentos de actina, microtúbulos y filamentos de vimentina mediante inmunofluorescencias usando los anticuerpos respectivos, en células vim(+) y vim(-). De acuerdo a este enfoque experimental es posible medir proteínas celulares involucradas en la red del citoesqueleto y proteínas asociadas a éste y su efectividad ha sido demostrada por la correspondencia del contenido de microtúbulos en células HL-60 con los cambios esperados después del tratamiento de las células con colchicina y taxol (Leung y cols., 1992). Los estudios de citometría de flujo en esta tesis corroboraron las observaciones en el sentido que la red organizada de microtúbulos no se alteró significativamente en las células que carecen de filamentos de vimentina en relación a la cepa silvestre vim(+). Sin embargo, cabe destacar como una observación de interés en este contexto, la disminución en el contenido de tau asociada a la red del citoesqueleto en células vim (-) carentes de vimentina. La posibilidad que tal disminución en componentes de tau incorporados a la red sea producto de una disminución en el contenido total de tau en la célula fue descartada, pues controles realizados previamente mediante ensayos de ELISA mostraron que la cantidad total de tau



es similar en células vim(+) y vim(-). Estos experimentos contribuyen a clarificar la relación entre los componentes de tau asociados al citoesqueleto y los filamentos de vimentina. Otros estudios que incluyan un análisis cuantitativo de la asociación de proteínas que interactúan con el citoesqueleto como MAP-2 y Mip-90 a componentes estructurados de la citoestructura podrían entregar una valiosa información complementaria.

### **Interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina mediada por tau**

Los estudios precedentes sugieren una relación entre tau y filamentos de vimentina en el citoesqueleto de las células SW-13. Por otra parte los estudios de unión directa de tau a vimentina electrotransferida, además de experimentos de unión de tau a columnas de DNA conteniendo vimentina y los estudios de inmunofluorescencia apuntan hacia una interacción de tau con esta proteína de los filamentos intermedios. Estos estudios también sugieren un papel mediador para tau en la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios a nivel celular. Se ha observado una estrecha asociación entre microtúbulos y filamentos de vimentina o desmina en numerosas líneas celulares mediante diferentes técnicas (Goldman y cols., 1969; Ball y Singer, 1981). Estas observaciones han sugerido que ambos tipos de fibras mantienen una interacción estructural, actuando como una unidad funcional en la determinación de la polaridad celular y la organización citoplasmática (Geuens y cols., 1983). Por otra parte, se ha podido identificar la presencia de estructuras filamentosas que conectarían microtúbulos y filamentos intermedios en el citoplasma (Ellisman y Porter, 1980). En relación a los patrones de interacción que involucran a los filamentos intermedios, recientes estudios apuntan hacia una interacción entre la red de microfilamentos y filamentos de vimentina (Cary y cols., 1994). Sin embargo, en los estudios de

estos autores no se consideró la posible participación de elementos mediadores de estas interacciones. Estudios inmunocitoquímicos realizados en células neuronales demostraron que MAP-2 se encontraba asociada a filamentos intermedios después de la despolimerización de los microtúbulos, sugiriendo un posible papel de esta proteína como mediadora de la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios (Bloom y Vallee, 1983), aunque en los estudios de estos autores no se realizaron experimentos de unión directa de MAP-2 a componentes de la red. Siguiendo esta línea de evidencias, se ha demostrado la capacidad de asociación de MAP-2 y tau a la proteína de 70 kDa del neurofilamento (Miyata y cols., 1986), confirmando otros trabajos en esta dirección (Heimann y cols., 1985). Se agrega a esta información la de estudios recientes que han sugerido que la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios resultaría de la asociación de quinesina con alguna proteína asociada a vimentina (Gyoeva y Gelfand, 1991).

Los estudios presentados en esta tesis sobre la interacción *in vitro* entre tau y vimentina se realizaron a partir de preparaciones de citoesqueleto extraído con detergentes y enriquecidas en filamentos intermedios. Cuando las células SW-13 fueron extraídas con una solución de alta fuerza iónica en presencia de detergentes no iónicos y posteriormente tratadas con DNasa I, se obtuvo una preparación de citoesqueleto desprovista de otras proteínas estructurales como tubulina y actina. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados en fibroblastos y en células epiteliales mediante microscopía electrónica (Jones y cols., 1982). Un análisis electroforético y de electrotransferencia indicó la presencia de un número reducido de polipéptidos, siendo vimentina el componente mayor (Starger y Goldman, 1977). En nuestras preparaciones, junto con esta prominente especie molecular aparecía una menor proporción de otras proteínas en el citoesqueleto extraído. Otros estudios han identificado también un grupo de bandas en el rango de los 60-70 kDa, que de acuerdo a su tamaño y

localización podrían corresponder a proteínas de la lámina nuclear (Gerace y cols., 1984). Por último, existe un grupo de proteínas asociadas a filamentos intermedios y a matriz nuclear que también podrían ser extraídas con el método que empleamos para preparar un citoesqueleto rico en filamentos intermedios. Como se ha indicado, vimentina resultó ser el componente de este citoesqueleto que mostraba un patrón de interacciones con la co-localización de tau en SW-13.

Los ensayos de co-sedimentación realizados en esta tesis apoyan la capacidad de asociación de tau a elementos del citoesqueleto enriquecido en vimentina en células vim(+). Esta asociación se observó en condiciones desnaturantes que favorecían tanto la solubilización de los polímeros de vimentina y reducía la posibilidad de auto-agregación de tau. En estas condiciones el material co-sedimentado correspondía solamente a productos de la interacción de tau con el sistema de proteínas enriquecido en filamentos intermedios, pues controles realizados luego de incubar tau con la proteína solubilizada de células vim (-) no mostraron co-sedimentación. Evidencias más directas fueron obtenidas de los ensayos de unión en fase sólida de tau purificada a vimentina inmovilizada en nitrocelulosa. El análisis de la interacción de proteínas del citoesqueleto a macromoléculas inmovilizadas en nitrocelulosa luego de su electrotransferencia ha sido de enorme utilidad en el estudio de interacciones macromoleculares que estabilizan el citoesqueleto (Walker y cols., 1984; Cross y cols., 1991). Por otra parte, este método tiene la ventaja que permite la detección de proteínas que no son solubles en condiciones fisiológicas, como la vimentina, y reduce los efectos de proteasas endógenas. El experimento de unión a vimentina electrotransferida nos sugiere además que esta proteína presentaría sitios de reconocimiento para la unión de tau. La especificidad de la interacción fue corroborada por los experimentos controles con proteínas de las células vim (-) inmovilizadas en nitrocelulosa, en los cuales no se observó

reacción con tau, y controles positivos que muestran la unión de tau de proteína microtubular visualizada por reacción con el anticuerpo-anti-tau. Como control adicional para analizar la posibilidad que vimentina electrotansferida tenga tau como contaminante, por similitud de sus pesos moleculares, se realizó la reacción con el anticuerpo anti-tau directamente sin una preincubación con esta proteína, y no se observó reacción. Otros estudios hidrodinámicos para evaluar la unión de tau a vimentina son difíciles de realizar debido a la insolubilidad de vimentina y su extrema capacidad de auto-agregación. Experimentos en los que se reveló la posible unión de MAP-2 proveniente de una preparación de proteína microtubular, usando un anticuerpo contra esta proteína mostraron que, en las condiciones ensayadas, esta proteína no se une a vimentina immobilizada en nitrocelulosa, aunque no se descarta una competencia con tau presente en la proteína microtubular. En este contexto, otros estudios mostraron la capacidad de unión de [ $^{32}\text{P}$ ]-MAP-2 (preparación enriquecida en MAP-2) a la proteína 70 kDa del neurofilamento immobilizada en nitrocelulosa (Heimann y cols., 1985), aunque en estos experimentos no se puede descartar la posibilidad de una interacción de tau radioactiva como contaminante de la preparación de MAP-2. Por otra parte, no hay evidencias por estudios de unión directa que demuestren la interacción de MAP-2 a vimentina.

Otra aproximación al estudio de la interacción entre filamentos de vimentina y tau fue la demostración de la capacidad de interacción de ambas proteínas en una columna de afinidad de DNA de hebra simple unida a celulosa. La fundamentación teórica para la utilización de esta columna provino de la observación que vimentina se une a DNA de hebra simple *in vitro*, lo que ha sido ventajoso para la purificación rápida de proteínas de los filamentos intermedios (Nelson y cols., 1982). A pesar que no está claro si todas las proteínas de filamentos intermedios se unirán a este tipo de matriz, se ha observado la

asociación de DNA de hebra simple en suspensión con desmina, GFAP (Traub, 1985) y con neurofilamentos (Traub y cols., 1985). Basados en esta capacidad de asociación de vimentina con DNA de hebra simple, los datos obtenidos de la columna indicaron que tau se uniría al complejo entre vimentina y DNA de hebra simple a través de su unión a proteína de los filamentos intermedios. Dicha interacción fue destruída luego de agregar una solución KCl 0,3 M lo que sugeriría que la unión de tau a vimentina tendría un componente de interacción electrostática. Como control, la posibilidad de asociación de tau con el DNA de hebra simple fue descartada, ya que resultados obtenidos de una cromatografía de afinidad en una columna de DNA de hebra simple indicaron que tau no interactúa con DNA en esas condiciones. La especificidad de la interacción fue además corroborada al preparar una columna de idénticas características con una preparación de citoesqueleto proveniente de células vim(-). Al no estar presente vimentina en la columna de DNA la tau no se retuvo en la columna, ya que fue obtenida en las fracciones de lavado previas a la etapa de elución con KCl 0,3M.

Los estudios de doble inmunofluorescencia indicaron una posible interacción entre microtúbulos y filamentos de vimentina mediada por tau en células SW-13 en cultivo y apoyan los datos bioquímicos sobre el papel de tau en la interacción con vimentina. Este tipo de análisis, a pesar de su menor resolución con respecto a la microscopía electrónica, proporciona un panorama general de la organización y orientaciones intracelulares relativas de estos dos sistemas del citoesqueleto de células en cultivo. Los experimentos de interacción directa entre vimentina y tau mostraron la capacidad de asociación *in vitro* de ambas proteínas. Este tipo de estudio fue complementado con un análisis morfológico, mediante inmunofluorescencias indirectas dobles, de la distribución relativa de los componentes del citoesqueleto, principalmente, tubulina, vimentina y tau en células vim(+). Las inmunofluorescencias dobles entre tubulina y tau mostraron

patrones altamente coincidentes, sugiriendo una co-distribución de tau con microtúbulos citoplasmáticos. Esta observación es consistente con la capacidad de asociación *in vitro* e *in vivo* de tau a microtúbulos que ha sido reportada en numerosas líneas celulares en cultivo (Drubin y cols., 1986; Cross y cols., 1993). A pesar que los niveles de tau presentes en numerosos tejidos y líneas celulares indican que es una proteína cuya distribución es predominantemente en tejido nervioso, existen pruebas de la presencia de tau en líneas celulares no-nerviosas, lo que sugiere una distribución más amplia que lo que originalmente se describió (Drubin y cols., 1986; Cross y cols., 1993). En las células SW-13 hemos logrado identificar un grupo de proteínas tipo-tau obtenidas de preparaciones de citoesqueleto, por los procedimientos de purificación de tau que incluyen ácido perclórico y calentamiento. Este procedimiento de purificación está basado en la solubilidad de tau en ácido perclórico y su termoestabilidad (Farías y cols., 1992; 1993). El patrón de fluorescencia con un anticuerpo anti-tau mostró la co-localización de tau con tubulina en esta línea celular. Los estudios de distribución celular de tubulina y vimentina mostraron que, si bien los patrones de fluorescencia co-distribuyeron en regiones citoplasmáticas, no fueron totalmente coincidentes. Diferentes razones nos hacen pensar que esta co-distribución es específica y no producto de un artefacto de fijación o una co-agregación de estos filamentos por exclusión desde porciones adyacentes de la célula. Por un lado las distribuciones de filamentos de actina de tipo fibras de estrés no se correlaciona con las de microtúbulos o de vimentina en este mismo tipo celular. Además, inmunofluorescencias dobles realizadas en otros tipos celulares no mostraron una co-distribución de los filamentos de keratina y la de microtúbulos (Osborn y cols., 1980). Junto con la correspondencia observada en algunas regiones celulares entre la red de microtúbulos y de vimentina, se detectó en un número importante de experimentos que microtúbulos débilmente marcados fueron

coincidentes con filamentos de vimentina (Figura 15A y B, flechas). En el caso de la inmunomarcación para tubulina, ha sido establecido que aquellos filamentos débilmente marcados corresponden a microtúbulos individuales (Osborn y cols., 1980) y, por lo tanto se podría sugerir que los patrones de co-distribución para tubulina y vimentina observados en el microscopio de luz podrían corresponder a las estrechas aposiciones laterales entre estas estructuras que han sido ocasionalmente vistas en fotomicrografías electrónicas de células en cultivo (Goldman y Follett, 1969; Franke y cols., 1978). De acuerdo con el esquema de Porter et al. (1979) y al modelo de interacciones propuesto (Maccioni y cols., 1992), una explicación razonable para esta correspondencia entre microtúbulos y vimentina es que existirían uno o más tipos de "puentes" moleculares entre ellos. La evidencia obtenida en este trabajo apunta hacia la participación de tau como proteína mediadora entre microtúbulos y filamentos de vimentina. Por otra parte, las inmunofluorescencias dobles para vimentina y tau mostraron patrones que co-distribuyen en ciertos dominios citoplasmáticos e incluso fue posible encontrar regiones de estrecha correspondencia entre ambas proteínas (Figura 16A y B, flechas). Estudios de co-distribución de las redes de microtúbulos, de vimentina y de tau en células vim(-) mostraron que no existe una alteración observable en los patrones de co-localización para tubulina y tau asociada a una ausencia de vimentina en estas células. Por otra parte, la organización subcelular de tau tampoco mostró diferencias apreciables. Se ha demostrado que la destrucción o estabilización de los microtúbulos por inhibidores específicos induciría una desorganización de la red de filamentos intermedios normalmente extendida, hacia la región perinuclear (Wang y Goldman, 1978; De Brabander, 1975). El mecanismo por el cual estos compuestos alteran la organización de los filamentos intermedios no está claro. Sin embargo, se ha observado que en fibroblastos de ratón en cultivo el colapso de la red de vimentina en respuesta a la

despolimerización de los microtúbulos parece ser un proceso dependiente de energía y del sistema de microfilamentos (Hollenbeck y cols., 1989; Tint y cols., 1991). Se ha sugerido que tal redistribución en el sistema de filamentos intermedios sería el resultado de la ruptura de las interacciones que mantienen unidos al sistema de microtúbulos y de filamentos intermedios (Hynes y Destree, 1978). Con el uso de inhibidores se ha investigado en esta tesis, la interacción de microtúbulos y filamentos de vimentina mediada por tau en células vim(+) tratadas con nocodazol y citocalasina B simultáneamente sobre la base de estudios de doble inmunofluorescencia. Se observó que en células tratadas con ambas drogas se produjo una destrucción del sistema de microtúbulos y de fibras de estrés de actina de acuerdo a experimentos controles realizados y a trabajos anteriores (Maccioni, 1986). Esto estuvo acompañado de una desorganización del sistema de filamentos de vimentina. En esas condiciones de máximo estrés celular, experimentos de inmunofluorescencia doble mostraron la co-distribución de tau y vimentina en regiones de la periferia celular. La recuperación de las células del efecto de las drogas, produjo una re-polimerización de la tubulina en microtúbulos y la re-organización de los filamentos de vimentina. Se observó además una co-distribución de vimentina y tau en aquellas regiones donde la red de vimentina se había restablecido (Figura 18A y B, flechas), todo lo cual corrobora la relación funcional de tau y los filamentos de vimentina en la organización del citoesqueleto de filamentos intermedios.

Estudios realizados *in vitro* y en células en cultivo indicaron que tau puede interactuar con actina (Griffith y Pollard, 1978; Griffith y Pollard, 1982; Cross y cols., 1993). Por otra parte, existe evidencia de la interacción directa entre filamentos de vimentina y microfilamentos (Knapp y cols., 1983; Bershadsky y cols., 1987). Además, estudios moleculares realizados en células A6 de *Xenopus* demostraron la capacidad de asociación del dominio C-terminal de la vimentina



con estructuras que contienen actina (Cary y cols., 1994). A pesar que estos estudios han sugerido que los filamentos intermedios interactúan con los microfilamentos, la interacción de los filamentos intermedios con los microtúbulos parece ser más fuerte. La interacción entre filamentos intermedios y microfilamentos se hace evidente sólo en condiciones de despolimerización de los microtúbulos. En base a los antecedentes presentes en la literatura y a los datos aportados por nuestro trabajo, es razonable pensar que los sistemas de microtúbulos y los filamentos intermedios se encuentran interconectados en la célula y que la proteína tau sería un posible regulador de estas interacciones.

### **Importancia funcional de la interacción entre vimentina y tau**

La proteína tau está involucrada en la estabilización y en la dinámica de polimerización-despolimerización del citoesqueleto microtubular. Sin embargo, también se ha demostrado su interacción con fibras de estrés de actina (Cross y cols., 1993) lo que ha llevado a proponer un papel para tau como regulador *in vivo* de las interacciones entre microtúbulos y fibras de actina. Su capacidad de asociación a vimentina y los patrones de inmunofluorescencia observados para ambas proteínas en células en cultivo apoyarían una probable relación *in vivo* entre la presencia de un sistema estructurado de filamentos intermedios y la organización de tau.

Los estudios realizados con drogas como nocodazol y citocalasina B permitieron evaluar en células SW-13 vim (+) la correlación citoarquitectónica entre un citoesqueleto microtubular organizado y filamentos intermedios de vimentina, ya que a consecuencia de la despolimerización de la red de microtúbulos se observó una desorganización de la red de vimentina formándose característicos anillos perinucleares de fluorescencia. Se ha sugerido que la organización de los filamentos intermedios tendría una dependencia estructural

del citoesqueleto microtubular. Sin embargo, tal relación estructural entre ambas redes de filamentos parece ser unidireccional, ya que se ha descrito que cambios producidos en la red de filamentos intermedios a consecuencia de la microinyección de anticuerpos anti-FI no están acompañados de una alteración en los patrones de organización microtubular y de actina (Bloom y Vallee, 1983). Todo ello hace pensar en la existencia de elementos mediadores asociados preferentemente a los microtúbulos y una jerarquización de las funciones realizadas por microtúbulos, actina y filamentos intermedios. El estudio de los patrones de inmunofluorescencia para vimentina y tau en condiciones de desorganización de las redes de microtúbulos y de actina mostró una co-localización de ambas proteínas en dominios de la periferia celular lo cual sugiere un grado de compartimentación en relación a los patrones de interacción.

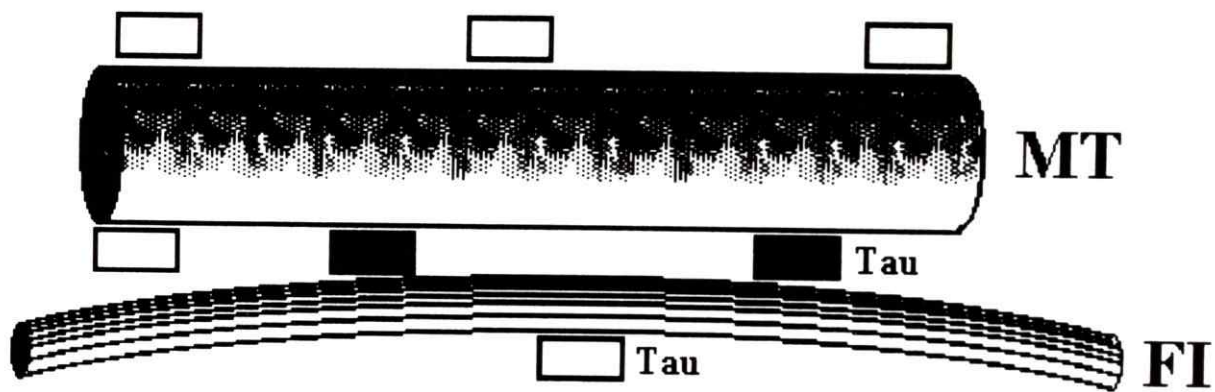
La presencia en nuestro estudio de una línea celular deficiente en la expresión de filamentos intermedios permitió evaluar las relaciones entre los componentes filamentosos del citoesqueleto, principalmente tubulina, vimentina y tau. La disminución observada en la cantidad de tau en las células mutantes sugirió un grado de dependencia de los patrones de interacción de tau con el citoesqueleto de microtúbulos y actina y la organización de los filamentos de vimentina. Esto hace pensar además en la posible existencia de una "subpoblación" de tau que interactúe preferentemente con filamentos de vimentina y juntos pudieran participar en procesos no relacionados con el citoesqueleto microtubular. En el contexto funcional, diferentes líneas de evidencia han sugerido la participación de filamentos intermedios en procesos relacionados con la diferenciación y con el estado diferenciado de la célula (Leung y cols., 1992). Numerosos estudios de inducción de la diferenciación en diferentes líneas celulares en cultivo han mostrado cambios en los patrones de expresión de proteínas asociadas principalmente al citoesqueleto. Se ha descrito

que los cambios en la organización de los componentes de la citoarquitectura al parecer ocurren en una forma ordenada y la síntesis de vimentina en grandes cantidades es anterior a los cambios morfológicos y a la inducción o pérdida de otras proteínas (Leung y cols., 1992). Se ha sugerido que este filamento intermedio podría cumplir un importante papel en la reorganización del citoesqueleto que apoya la diferenciación (Bernal y Chen, 1982). Además, trabajos recientes en la línea celular SW-13 han mostrado una relación entre la presencia de una red de vimentina y el metabolismo del colesterol derivado de lipoproteínas (Sarria y cols., 1992), un proceso metabólico realizado preferentemente por células especializadas en la producción de esteroides. Por lo tanto, a la luz de la evidencia presentada, el problema de la funcionalidad de los filamentos intermedios y sus relaciones con otros componentes de la citoarquitectura pueden ser analizados en el contexto de la célula en cultivo en la cual se han realizado estos estudios, ya que es posible que durante la diferenciación y/o en un estado diferenciado de la célula los filamentos intermedios se encuentren participando y estableciendo asociaciones diferentes a las observadas en un estado no diferenciado. Por otro lado, el hecho de no observar cambios en la organización del citoplasma en relación a una ausencia de filamentos intermedios en las células mutantes podría obedecer a la propiedad redundante que presentan los sistemas celulares que les permite sobreponer funciones en un momento en que algún componente está ausente. Así los filamentos intermedios en una situación poco diferenciada como es el caso de las células SW-13 pudieran cumplir funciones de apoyo en la estructuración de la red de microtúbulos y de actina que mantienen la citoarquitectura.

Con la evidencia presente en la literatura y la aportada por este trabajo es posible proponer un modelo integral en el cual tau estaría cumpliendo un papel como regulador de las interacciones que se establecen entre microtúbulos y

filamentos intermedios (Figura 20). Es posible que en la asociación de ambos filamentos, estén involucrados los dominios de proyección de tau que se encuentran expuestos en la superficie del microtúbulo. Así la molécula de tau podría asociarse a microtúbulos y a filamentos de vimentina por sus dominios de unión y las proyecciones de tau podrían mediar la interacción entre ambos tipos de filamentos.

Estudios en un futuro más inmediato podrían estar enfocados hacia el análisis de los patrones de interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios mediante microscopía confocal, que permitan dilucidar posibles dominios de interacción entre ambas redes del citoesqueleto y la participación de elementos mediadores como la proteína tau. Por otra parte, estudios ultraestructurales de inmunolocalización de vimentina, tubulina y tau serán de gran importancia para confirmar la participación de tau como un elemento mediador de la interacción entre filamentos de vimentina y microtúbulos. Por último, será interesante estudiar el papel de tau en los patrones de organización generados entre microtúbulos y filamentos de vimentina en otras líneas celulares o entre microtúbulos y otros tipos de filamentos intermedios.



**Figura 20:** Representación esquemática de la interacción entre microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina mediada por tau. Se propone que tau mediaría los patrones de interacción entre microtúbulos (MT) y filamentos de vimentina (FI). Tau se asociaría al microtúbulo y al filamento de vimentina a través de sus dominios de unión (dominios conteniendo los motivos repetitivos de unión), y podrían interactuar a través de sus dominios de proyección, sirviendo así como elemento modulador de la interacción entre estos dos tipos de filamentos del citoesqueleto. Al mismo tiempo, dada la existencia de distintas isoformas de tau, el modelo considera la existencia de subpoblaciones de tau con afinidad preferencial por microtúbulos ó por filamentos de vimentina.

**BIBLIOGRAFIA**

Aamodt, E. y Williams, R. C. (1983) "MAPs mediate association of microtubules and neurofilaments in vitro". *Biophys. J.* 41: 86a (Abstr.).

Albers, K. y Fuchs, E. (1987) "The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines". *J. Cell Biol.* 105: 791-806.

Albers, K. y Fuchs, E. E. (1989) "Expression of mutant keratin cDNAs in epithelial cells reveals possible mechanisms for initiation and assembly of intermediate filaments". *J. Cell Biol.* 108: 1439-1477.

Aniello, T., Couchie, D., Bridoux, A. M., Gripois, D. y Nunez, J. (1991) "The splicing of juvenile and adult tau mRNA variant is regulated by thyroid hormone". *PNAS USA* 88: 4035-4038.

Asai, D., Thompson, W., Wilson, L., Dresden, C., Schulman, H. y Purich, D. (1985) "Microtubule-associated proteins (MAPs): a monoclonal antibody to MAP-1 decorates microtubules in vitro but stains stress fibers and not microtubules in vivo". *PNAS USA* 82: 1434-1438.

Ball, E. y Singer, S. (1981) "Association of microtubules and intermediate filaments and its disruption upon transformation by a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus". *PNAS USA* 78: 6986-6990.

Bernal, S. y Chen, L. (1982) "Induction of cytoskeleton-associated proteins during differentiation of human myeloid leukemic cell lines". *Cancer Res.* 42: 5106-5116.

Bershadsky, A., Tint, I. y Svitkina, T. (1987) "Association of intermediate filaments with vinculin-containing adhesion plaques of fibroblasts". *Cell Motil. Cytoskel.* 8: 274-283.

Bershadsky, A. y Vasiliev, J. (1988) "Factors controlling the distribution of pseudopods: reorganization of microtubules". In: "Cytoskeleton", Plenum Press, New York, pp. 238-242.

Bloom, G. y Vallee, R. (1983) "Association of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells". *J. Cell Biol.* 96: 1523-1531.

- Bloom, G., Luca, F. C. y Vallee, R. B. (1985) "Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of neuronal cytoskeleton". *PNAS USA* 82: 5404-5408.
- Blose, S. H., Meltze, D. I. y Feramisco, J. R. (1984) "10-nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal and polyclonal antibodies against tubulin". *J. Cell Biol.* 98: 847-859.
- Bradford, M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cambiazio, V., González, M. y Maccioni, R. B. (1994) "DMAP-85: A tau-like protein from *Drosophila melanogaster* larvae". *J. Neurochem.* (In Press).
- Cann, J., York, E., Stewart, J., Vera, J. C. y Maccioni, R. B. (1988) "Small zone gel chromatography of interacting systems: theoretical and experimental evaluation of elution profiles for kinetically controlled macromolecule-ligand reactions". *Anal. Biochem.* 175: 462-473.
- Capote, C. y Maccioni, R. B. (1993) "Interacciones macromoleculares entre microtubulos y filamentos intermedios en células en cultivo". *Arch. Biol. y Med. Exp.* 1, pp. 55.
- Cary, R., Klymkowsky, M., Evans, R., Domingo, A., Dent, J. y Backhus, L. (1994) "Vimentin's tail interacts with actin-containing structures in vivo". *J. Cell Sci.* 107: 1609-1622.
- Chin, S., Macioce, P. y Liem, R. K. (1991) "Effects of truncated neurofilament proteins on the endogenous intermediate filaments in transfected fibroblasts". *J. Cell Sci.* 99: 335-350.
- Cleveland, D. (1990) "Microtubule MAPping". *Cell* 60: 701-702.
- Cleveland, D., Monteiro, M., Wong, P., Gill, S., Gearhart, J. y Hoffman, P. (1991) "Involvement of neurofilaments in the radial growth of axons". *J. Cell Sci. Suppl.* 15: 85-95.
- Coleman, T. y Lazarides, E. (1992) "Continuous growth of vimentin filaments in mouse fibroblasts". *J. Cell Science* 103: 689-698.

Correia, J. y Williams, R. (1983) "Mechanisms of assembly and disassembly of microtubules". *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12: 211-235.

Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I., Liem, R., Shelanski, M. L. y Nunez, J. (1992) "Primary structure of high molecular weight tau present in the perispherical nervous system". *PNAS USA* 89: 4378-4381.

Coulombe, P., Hutton, M., Vassar, R. y Fuchs, E. (1991) "A functions for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases". *J. Cell Biol.* 115: 1661-1674.

Cross, D., Domínguez, J., Maccioni, R. y Avila, J. (1991) "MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of beta tubulin. Studies with syntetic tubulin peptides". *Biochemistry* 30: 4362-4366.

Cross, D., Vial, C. y Maccioni, R. B. (1993) "A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines". *J. Cell Sci.* 105: 51-60.

Danowski, B. (1989) "Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors". *J. Cell Sci.* 93: 255-266.

De Brabander, M., Aerts, F., Van de Veire, R. y Borgers, M. (1975) "Evidence against interconversion of microtubules and filaments". *Nature* 253: 119-120.

Domingo, A., Sarria, A., Evans, R. y Klymkowsky, M. (1992) "Studying intermediate filaments". In: *The cytoskeleton. A practical approach.* (Carraway y Carraway, eds.) IRL Press, New York, Tokyo pp. 223-255.

Drubin, D. G., Caput, D. y Kirschner, M. (1984) "Studies on the expression of the microtubule associated protein tau during mouse brain development, with newly isolated complementary cDNA probes". *J. Cell Biol.* 98: 1090-1097.

Drubin, D., Kobayashi, S. y Kirschner, M. (1986) "Association of tau protein with microtubules in living cells". *Ann. New York Acad. Sci.:* 257-268.

Ellisman, M. y Porter, K. (1980) "Microtubule structure of the axoplasmic matrix: visualization of cross-linking structures and their distribution". *J. Cell Biol.* 87: 467-479.

Fariás, G., Vial, C. y Maccioni, R. B. (1992) "Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system". *Mol. Cell Biochem.* 112: 81-88.



- Farias, G., Vial, C. y Maccioni, R. B. (1993) "Functional domains on chemically modified tau protein". *Cell Mol. Neurobiol.* 13: 173-182.
- Forry-Schaudies, S., Murray, J., Toyama, Y. y Holtzer, H. (1986) "Effects of colcemid and taxol on microtubules and intermediate filaments in chick embryo fibroblasts". *Cell Motil. Cytoskel.* 6: 324-338.
- Franke, W., Schmid, E., Osborn, M. y Weber, K. (1978) "Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy". *PNAS USA* 75: 5034-5038.
- Franke, W. (1987) "Homology of a conserved sequence in the tail domain of the intermediate filament proteins with the loop region of calcium binding protein". *Cell Biol. Int. Rep.* 11: 831.
- Gawlitta, W., Osborn, M. y Weber, K. (1981) "Coiling of intermediate filaments induced by the microinjection of a vimentin-specific antibody does not interfere with locomotion and mitosis". *Eur. J. Cell Biol.* 26: 83-90.
- Geiger, B. y Singer, S. J. (1980) "Association of microtubules and intermediate filaments in chicken gizzard cells as detected by double immunofluorescence". *PNAS USA* 77: 4769-4773.
- Geiger, B. (1987) "Looking for a function". *Nature* 329: 392-393.
- Georgatos, S. D., Weber, K., Geisler, N. y Blobel, G. (1987) "Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes : evidence for a conserved site-specificity in intermediate filament-membrane interactions". *PNAS USA* 84: 6780-6784.
- Georgatos, S. D. y Blobel, G. (1987) "Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: A basis for vectorial assembly of intermediate filaments". *J. Cell Biol.* 105: 105-115.
- Gerace, L., Comeau, C. y Benson, N. (1984) "Organization and modulation of nuclear lamina structure". *J. Cell Sci. Suppl.* 1: 137-160.
- Geuens, G., de Brabander, M., Nuydens, R. y De Mey, J. (1983) "The interaction between microtubules and intermediate filaments in cultured cells treated with taxol and nocodazole". *Cell Biol. Int. Rep.* 7: 35-47.

- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, C. A., Walker, J. E. y Klug, A. (1988) "Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease. Identification as microtubule-associated protein tau". PNAS 85: 4051-4055.
- Goldman, R. D. y Follett (1969) "The structure of the major cell processes of isolated BHK-21 fibroblasts". Exp. Cell Res. 57: 263-276.
- Goldman, R., Goldman, A., Green, K., Jones, J., Jones, S. y Yang, H. (1986) "Intermediate filament networks organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements".
- Griffith, L. M. y Pollard, T. D. (1978) "Evidence for actin filaments microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins". J. Cell Biol. 76: 958-965.
- Griffith, L. y Pollard, T. (1982) "The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins". J. Biol. Chem. 257: 9143-9151.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y., Quinlan, M., Wisniewski, H. y Binder, L. (1986) "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology". PNAS USA 83: 4913-4917.
- Gyoeva, F. K. y Gelfand, V. I. (1991) "Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin". Nature 353: 445-448.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Hedberg, K. y Chen, L. (1986) "Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line". Exp. Cell Res. 163: 509-517.
- Heimann, R., Shelanski, M. y Liem, R. (1985) "Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein". J. Biol. Chem. 260: 12160-12166.
- Herzog, W. y Weber, K. (1978) "Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro". Eur. J. Biochem. 92: 1-8.

Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. y Martin, D. (1989) "Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains". *Mol. Cell Biol.* 9: 1381-1388.

Hirokawa, N., Shiomura, Y. y Okabe, Sh. (1988) "Tau proteins: The molecular structure and mode of binding in microtubules". *J. Cell Biol.* 107: 1449-1459.

Hoffman, P. y Lasek, R. J. (1975) "The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons". *J. Cell Biol.* 66: 351-366.

Hollenbeck, P., Bershadsky, A., Pletjushkina, O., Tint, I. y Vasiliev, J. (1989) "Intermediate filament collapse is an ATP-dependent and actin-dependent process". *J. Cell Sci.* 92: 621-631.

Hynes, R. y Destree, T. (1978) "10nm filaments in normal and transformed cells". *Cell* 13: 151-163.

Jones, J., Goldman, A., Yuspa, S., Steinert, P. y Goldman, R. (1982) "Dynamic aspects of the intermediate filament network in keratinocytes". *Cell Motil.* 2: 197-213.

Kanai, Y., Takemura, R., Oshima, T., Ihara, Y., Yanagisawa, R., Masaki, T. y Hirokawa, N. (1989) "Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundling formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA". *J. Cell Biol.* 109: 1173-1184.

Kim, H., Binder, L. y Rosenbaum, J. (1979) "The periodic association of MAP-2 with brain microtubules in vitro". *J. Cell Biol.* 80: 266-276.

Klymkowsky, M. W. (1981) "Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection of a monoclonal anti-intermediate filament antibody". *Nature* 291: 249-251.

Klymkowsky, M., Miller, R. y Lane, E. (1983) "Morphology, behavior and interaction of cultured epithelial cells after the antibody-induced disruption of keratin filament organization". *J. Cell Biol.* 96: 494-509.

Klymkowsky, M., Bachant, J. y Domingo, A. (1989) "Functions of intermediate filaments". *Cell Motil. and Cytoskel.* 14: 309-331.

Knapp, L., O'Guin, W. y Sawyer, R. (1983) "Drug-induced alterations of cytokeratin organization in cultured epithelial cells". *Science* 219: 501-503.

Knops, J., Kosik, K. S., Lee, G., Pardee, J. D., Cohen-Gould, L. y McConlogue, L. (1991) "Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes". *J. Cell Biol.* 114: 725-733.

Kosik, K., Joachim, C. y Selkoe, D. (1986) "Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease". *PNAS USA* 83: 4044-4048.

Kosik, K. S., Orechio, L. D., Bakalis, S. y Neve, R. L. (1989) "Developmentally regulated expression of specific tau sequences". *Neuron* 2: 1389-1397.

Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227: 680-685.

Lamb, N., Fernández, A., Feramisco, J. y Welch, W. (1989) "Modulation of vimentin containing intermediate filament distribution and phosphorylation in living fibroblasts by the cAMP-dependent protein-kinase". *J. Cell Biol.* 108: 2409-2422.

Lasek, R., Oblinger, M. y Drake, P. (1983) "Molecular biology of neuronal geometry: Expression of neurofilament genes influences axonal diameter". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48: 731-744.

Lazarides, E. (1980) "Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space". *Nature* 238: 249-256.

Lee, G. y Rook, S. L. (1992) "Expression of tau protein in nonneuronal cells: structural requirements for microtubule binding and stabilization". *J. Cell Sci.* 102: 227-237.

Leterrier, J., Liem, R. y Shelanski, M. (1982). "Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: A possible mechanism for intra-organellar bridging". *J. Cell Biol.* 95: 982-986.

Leung, M., Sokoloski, J. y Sartorelli, A. (1992) "Changes in microtubules, microtubule-associated proteins and intermediate filaments during the differentiation of HL-60 leukemia cells". *Cancer Res.* 52: 949-954.

Lin, J. y Feramisco, J. (1981) "Disruption of the in vivo distribution of intermediate filaments in fibroblasts through the microinjection of a specific monoclonal antibody". *Cell* 24: 185-193.

- Ludueña, R. F. y Woodward, D. O. (1973) "Isolation and partial characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin from outer doublets of sea urchin sperm and microtubules of chick embryo brains". PNAS USA 70: 3594-3598.
- Maccioni, R. B. y Seeds, N. (1977) "Stoichiometry of GTP hydrolysis and tubulin polymerization". PNAS USA. 74: 462-468.
- Maccioni, R. B. y Seeds, N. (1978) "Enhancement of tubulin assembly as monitored by a rapid filtration assay". Arch. Biochem. Biophys. 185: 262-272.
- Maccioni, R. B. y Mellado, W. (1981) "Characteristics of the in vitro assembly of brain tubulin of *Cyprinus carpio*". Comp. Biochem. Physiol. 70B: 357-380.
- Maccioni, R. B., Serrano, L., Avila, J. y Cann, J. (1985a) "Interaction of substance P with tubulin". Eur. J. Biochem. 156: 375-381.
- Maccioni, R. B., Serrano, L. y Avila, J. (1985b) "Structural and functional domains of tubulin". Bioessays 2: 165-169.
- Maccioni, R. B. (1986). In: "Molecular Cytology of Microtubules". RBC Editions. Basque Country Univ. Press-Springer Verlag, Heidelberg, pp. 139.
- Maccioni, R. B. y Arechaga, J. (1987). In: "The cytoskeleton in cell differentiation and development" (R. B. Maccioni y J. Arechaga, eds.). ICSU Press-IRL, pp.397.
- Maccioni, R. B., Rivas, C. y Vera, J. (1988) "Differential interaction of synthetic peptides from carboxyl-terminal regulatory domain on tubulin with microtubule-associated proteins (MAPs)". EMBO J. 7: 1957-1963.
- Maccioni, R. B., Vera, J., Domínguez, J. y Avila, J. (1989) "A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau". Arch. Biochem. Biophys. 275: 568-579.
- Maccioni, R. B., Vial, C., Cross, D. y González, M. (1992). *Progresos en Biología Celular*. J. Becerra Ratia, J. M. Perez-Figares and Fernandez-Llebrez eds. Universidad de Malaga, España.
- Martínez, J., Santibañez, J. F., Vial, C. y Maccioni, R. B. (1992) "The antineoplastic agent estramustine and the derivative estramustine-phosphate inhibit secretion of interleukin-3 in leukemic cells. Possible role of MAPs". Mol. Cell Biochem. 117: 165-173.

Miyata, Y., Hoshi, M., Nishida, E., Minami, Y. y Sakai, H. (1986) "Binding of microtubule-associated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70-kDa subunit protein. Its regulation by calmodulin". *J. Biol. Chem.* 261: 13026-13030.

Morgan, J. y Seeds, N. (1975) "Properties of tubulin prepared by affinity chromatography". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253: 260-271.

Nelson, J., Vorgias, C. y Traub, P. (1982) "A rapid method for the large scale purification of the intermediate filament protein vimentin by single-stranded DNA-cellulose affinity chromatography". *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 106: 1141-1147.

Newport, J. W. y Forbes, D. J. (1987) "The nucleus: structure, function, and dynamics". *Ann. Rev. Biochem.* 56: 535-565.

Nishida, E., Kuwaki, T. y Sakai, H. (1981) "Phosphorylation of microtubule-associated proteins (MAPs) and pH of the medium control interaction between MAPs and actin filaments". *Biochem.* 90: 575-578.

Nishida, E., Kotani, S., Kuwaki, T. y Sakai, H. (1982) In: *Biological Functions of Microtubules and Related Structures* (Sakai, H., Mohri, H. y Borisy, S. eds.) pp. 285-295, Academic Press, Tokyo.

Olmsted, J. B. (1986) "Microtubule-associated proteins". *Ann. Rev. Cell Biol.* 2: 421-458.

Osborn, M., Franke, W. W. y Weber, K. (1980) "Direct demonstration of the presence of two immunologically distinct intermediate-sized filament systems in the same cell by double immunofluorescence microscopy. Vimentin and cytokeratin fibers in cultured epithelial cells". *Exp. Cell Res.* 125: 37-46.

Padilla, R., Maccioni, R. B. y Avila, J. (1990) "Calmodulin binds to a tubulin binding site on the microtubule-associated protein tau". *Mol. Cell Biochem.* 97: 35-41.

Porter, K., Byers, H. y Ellisman, M. (1979) The cytoskeleton. In: Schmitt O y Worden F (eds). *The neurosciences, fourth study program*, the MIT Press, pp 703-722.

- Rivas, C., Vera, J.C. y Maccioni, R. B. (1988) "Anti-idiotypic antibodies reacting with MAPs in the sera of rabbits immunized with synthetic peptides from tubulin regulatory domain". PNAS USA 85: 6092-6096.
- Rivas-Berrios, A., Hernandez, M., Dominguez, J., Avila, J. y Maccioni, R. B. (1990) "Common antigenic determinants of the tubulin binding domains of the microtubule-associated proteins MAP-2 and tau". Biochim. Biophys. Acta 1040: 382-390.
- Runge, M., Laue, T., Yphantis, M., Lifshics, M., Saito, A., Altin, M., Reinke, K. y Williams, R. (1981). "ATP-induced formation of an associated complex between microtubules and neurofilaments". PNAS USA 78: 1431-1435.
- Sangiorgi, F., Woods, C. y Lazarides, E. (1990) "Vimentin downregulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage". Development 110: 85-96.
- Sarria, A. J. y Evans, R. M. (1989). Intermediate filaments in biology and disease. RBC Cell Biol. Rev. 22: 1-77.
- Sarria, A., Nordeen, S. y Evans, R. (1990) "Regulated expression of vimentin cDNA in cells in the presence and absence of a preexisting vimentin filament network". J. Cell Biol. 111: 553-565.
- Sarria, A., Panini, S. y Evans, R. (1992) "A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells". J. Biol. Chem. 267: 19455-19463.
- Sarria, A., Lieber, J., Nordeen, S. y Evans, R. (1994) "The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells". J. Cell Sci. 107: 1593-1607.
- Sattilaro, R., LeCluyse, E. y Dentler, W. (1980) "Associations between microtubules and coated vesicles in vitro". J. Cell Biol. 87(2, Pt.2): 250a (Abstr.).
- Sattilaro, R., Dentler, W. y Lecluyse, E. (1981) "Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro". J. Cell Biol. 90: 467-473.
- Schliwa, M. y van Blerkom, J. (1981) "Structural interaction of cytoskeletal components". J. Cell Biol. 90: 222-235.

- Serrano, L., Avila, J. y Maccioni, R. B. (1984a) "Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin. Localization of the site for MAP-2 interaction". *Biochemistry* 23: 4675-4681.
- Serrano, L., De la Torre, J., Maccioni, R. y Avila, J. (1984b) "Involvement of the carboxy-terminal domain of tubulin in microtubule assembly and regulation". *PNAS USA* 81: 5989-5993.
- Shelanski, M. L., Gaskin, F. y Cantor, C. R. (1973) "Assembly of microtubules in the absence of added nucleotides". *PNAS USA* 70: 765-768.
- Solomon, F., Magendantz, M. y Salzman, A. (1979) "Identification with cellular microtubules of one of the co-assembling microtubule-associated proteins". *Cell* 18: 431-438.
- Starger, J. y Goldman, R. (1977) "Isolation and preliminar characterization of 10nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells". *PNAS USA* 74: 24422-2426.
- Steinert, P., Jones, J. y Jones, R. (1984) "Intermediate filaments". *J. Cell Biol.* 99: 22s-27s.
- Steinert, P. M. y Roop, D. R. (1988) "Molecular and cellular biology of intermediate filaments". *Ann. Rev. Cell Biol.* 57: 593-625.
- Steinert, P. y Liem, R. (1990) "Intermediate filament dynamics". *Cell* 60: 521-523.
- Stewart, M. (1990) "Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions". *Curr. Opinion Cell Biol.* 2: 91-100.
- Summerhayes, I., Wong, D. y Chen, L. (1983) "Effects of microtubules and intermediate filaments on mitochondrial distribution". *J. Cell Sci.* 61: 87-105.
- Tint, I., Hollenbeck, P., Verkhovsky, A., Surgucheva, I. y Bershadsky, A. (1991) "Evidence that intermediate filament reorganization is induced by ATP-dependent contraction of the actinmyosin cortex in permeabilized fibroblasts". *J. Cell Sci.* 98: 375-384.
- Tolle, H., Weber, K. y Osborn, M. (1986) "Microinjection of monoclonal antibodies to vimentin, desmin and GFA in cells which contain more than one IF type". *Exp. Cell Res.* 162: 464-474.



- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". PNAS USA 76: 4350-4354.
- Traub, P. (1985). Intermediate Filaments. A Review. Springer-Verlag, Berlin.
- Traub, P., Perides, G., Scherbarth, A. y Traub, U. (1985). FEBS Lett. 193: 217-221.
- Vallee, R. B. y Bloom, G. S. (1983) "Isolation of sea urchin egg microtubules with taxol and identification of mitotic spindle microtubule-associated proteins with monoclonal antibodies". PNAS USA 80: 6259-6263.
- Vallee, R. B., Bloom, G. S. y Theurkauf, W. E. (1984) "Microtubule-associated proteins: subunits of the cytomatrix". J. Cell Biol. 99: 38s-44s.
- Vera, J. C., Rivas, C. y Maccioni, R. B. (1989) "Biochemical dissection of the role of the 1-kDa C-terminal domain of tubulin subunits in the assembly of microtubules". Biochemistry 28: 333-339.
- Vial, C., Armas-Portela, R., Avila, J., González, M. y Maccioni, R. B. (1994) "A 205 kDa protein from non-neuronal cells in culture contains tubulin binding epitopes". Mol. Biol. Biochem. (Submitted).
- Walker, J., Boustead, C. y Witzeman, V. (1984) "The 43-k protein V1 associated with the acetylcholine receptor containing membrane fragments is an actin binding protein". EMBO J. 3: 2287-2290.
- Wang, E. y Goldman, R. D. (1978) "Functions of cytoplasmic fibers in intracellular movements in BHK-21 cells". Eur. J. Cell Biol. 79: 708-726.
- Wang, E., Fishmann, D., Liem, R. y Sun, T. (1985). Ann. N. Y. Acad. Sci. 445.
- Wang, Y., Loomis, P., Zinkowski, R. y Binder, L. I. (1993) "A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau". J. Cell Biol. 121: 256-267.
- Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S. y Kirschner, M. (1975) "A protein factor essential for microtubule assembly". PNAS USA 72: 1858-1862.
- Weisenberg, R. C. (1972) "Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentration". Science 177: 1104-1105.

- Wiche, G. (1985) "High molecular weight microtubule associated proteins (MAPs): a ubiquitous family of cytoskeletal connecting links". *Trends Biochem. Sci.* 10: 67-70.
- Wiche, G., Oberkanins, Ch. y Himmler, A. (1991) "Molecular structure and function of microtubule-associated proteins". *Int. Rev. of Cytol.* 124: 217-273.
- Wischik, C., Novak, M., Thogersen, H., Edwards, P., Runawick, M., Jakes, R., Walker, J., Milstein, C., Roth, M. y Klug, A. (1988) "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease". *PNAS USA* 85: 4506-4510.
- Wood, J., Mirra, S., Pollock, N. y Binder, L. (1986) "Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau". *PNAS USA* 83: 4040-4043.
- Zackroff, R., Steinert, P., Aynardi-Whitman, M. y Goldman, R. (1981) "Intermediate filament in cytoskeletal elements and membrane organization". ed. G. Post y G. L. Nicholson), pp. 55-97. New York: Elsevier/North Holland.
- Zeive, G. y Roemer, E. (1988) "Cordycepin rapidly collapses the intermediate filament networks into yuxtannuclear caps in fibroblasts and epidermal cells". *Exp. Cell Res.* 177: 19-26.

## APENDICE

Capote, C. y Maccioni, R. B. (1993) "Interacciones macromoleculares entre microtúbulos y filamentos intermedios en células en cultivo". Arch. Biol. y Med. Exp. 1, pp.55.

Capote, C. y Maccioni, R. B. (1994) "Tau-mediated interactions between microtubules and vimentin intermediate filaments". (En preparación).

Capote, C. y Maccioni, R. B. (1994) "Interacciones entre microtúbulos y filamentos de vimentina mediadas por tau". XXXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. Puyehue, 23-26 Noviembre.