

UCH-FC

DOC-B

M827

C.1

**ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS  
PROTEINAS ASOCIADAS A MICROTUBULOS. ESTUDIOS  
UTILIZANDO INHIBIDORES ESPECIFICOS QUE ACTUAN A  
NIVEL DE LAS MAPs.**

**TESIS ENTREGADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA  
UNIVERSIDAD DE CHILE, EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE  
LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS CON MENCION EN BIOLOGIA.**

**DANIEL ELIAS MORAGA MUÑOZ**

**OCTUBRE 1993**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. R.B. MACCIONI  
LABORATORIO DE BIOLOGIA  
CELULAR Y MOLECULAR.  
FACULTAD DE CIENCIAS,  
UNIVERSIDAD DE CHILE,  
SANTIAGO, CHILE.**

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

## INFORME DE APROBACION DE LA TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias  
que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**Daniel Elías Moraga Muñoz**

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

**Director de Tesis**  
Dr. Ricardo Maccioni

**Comisión Informante**  
Dr. Enrique Brandán

Dr. Emilio Cardemil

Dr. Jorge Garrido

Dr. Tulio Nuñez

The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal dashed line. The signatures are: 1. A large, stylized signature at the top, likely Ricardo Maccioni. 2. A signature below it, likely Enrique Brandán. 3. A signature below that, likely Emilio Cardemil. 4. A signature at the bottom, likely Jorge Garrido. The signature for Tulio Nuñez is not clearly visible or is obscured by the other signatures.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Ricardo B. Maccioni en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular en 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: N°0037/90 para estudiantes de doctorado del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT); beca PG-094-92 de la Vicerrectoría Académica de la Universidad de Chile al tesista; proyecto Fondecyt 92-1180 al Director de la tesis y por fondos provenientes de los programas de investigación del ICC. El tesista, DEMM, fue financiado por una beca CONICYT para estudiantes de doctorado.

## Agradecimientos

Manifiesto mis sinceros agradecimientos a quienes de una u otra forma hicieron posible la realización de esta tesis.

Al Dr. R.B. Maccioni, mi Director de Tesis, quien acogiéndome en su laboratorio me brindó su apoyo académico y todos los elementos tanto materiales como intelectuales para llevar a cabo este trabajo de investigación. Sus continuos consejos y estímulos me permitieron no sólo superar innumerables escollos experimentales sino también soslayar algunos problemas emocionales.

A mis compañeros de laboratorio, Mauricio, Rodrigo, Gustavo, Leda, Clarisa, Verónica y Carolina con quienes compartí momentos inolvidables tanto en lo académico como en lo personal y de quienes recibí grandes muestras de solidaridad en la adversidad.

Al Dr. J. Garrido, quien me permitió iniciar un promisorio camino asociado al citoesqueleto de actina y a los miembros de su laboratorio, Lucy, Pepe y especialmente, a mi amigo Pato Nuñez, con quién realizamos gran parte del trabajo de la inducción de manojos de filamentos de actina.

A Victor Monasterio por su gran ayuda con el Microscopio Electrónico de la facultad y a Rubén Peña por su excelente trabajo fotográfico.

Al Dr. Jorge Babul, Director de la Escuela de Postgrado, por su resuelta disposición de ayuda a favor de los estudiantes de Postgrado, de la cual yo fuí uno de los tantos beneficiados.

Agradezco a una serie de académicos que me ayudaron a formarme en el trabajo de laboratorio:

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Berta Zamorano y al Dr. Sergio Iturri, quienes dirigieron mis primeros pasos en la investigación científica.

Agradezco al Dr. Luis Izquierdo (QEPD), y al Dr. Roberto Mayor, del laboratorio de Biología del Desarrollo como también al Dr. Mario Roseblatt y Valeska Simon del laboratorio de Inmunología Celular en el INTA, por ayudarme en el inicio del trabajo de investigación científica en el postgrado.

Agradezco especialmente, por la enorme significación como experiencia formativa en lo personal, al Dr. José Minguell y su grupo, en su laboratorio de Biología Celular del INTA, con quienes inicié un trabajo de tesis doctoral en el área de la Matriz Extracelular y la Hematopoyesis.

A la Dra Margareta Wallin y al Dr. Mikael Rutberg por la inolvidable experiencia científica en el laboratorio de Biología Celular del Instituto de Zoofisiología en la Universidad de Gotemburgo, en Gotemburgo, Suecia.

Finalmente, mis mas profundos agradecimientos a mi Dios, quién me dió su fortaleza para pasar por un valle de huesos secos y levantarme de entre las cenizas.

Dedico esta tesis a:

Mis queridos Padres, Daniel y Norma  
y especialmente a Inés, Danielito y  
Paulita, con todo mi cariño.

## Indice de contenidos

Indice de figuras	<i>xi</i>
Abreviaturas	<i>xiii</i>
Publicaciones derivadas del trabajo de tesis	<i>xiv</i>
Resumen	<i>xv</i>
Abstract	<i>xvii</i>
1.- Introducción	1
1.1. El citoesqueleto	1
1.2. Una pregunta central	3
1.3. Tubulina	3
1.4. Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)	4
1.4.1. MAP-1	5
1.4.2. MAP-2	6
1.4.3. La proteína Tau	7
1.4.4. Otras MAPs	9
1.5. Interacción entre tubulina y MAPs	9
1.6. Drogas que interactúan con MAPs	14
1.7. Actina	17
1.8. Proteínas que unen actina (ABP)	18
1.9. Interacción entre microtúbulos y filamentos de actina	20
1.10. Objetivos de la tesis e Hipótesis de trabajo	21
2.- Materiales y Métodos	22
2.1. Materiales	22
2.2. Purificación de proteínas microtubulares	22
2.2.1. Proteína microtubular	22
2.2.2. Separación de tubulina de las MAPs	23
2.2.3. Purificación de MAPs mediante cromatografía en fosfocelulosa	24
2.2.4. Purificación de Tau	24
2.2.5. Purificación de MAP-2	25
2.3. Purificación de actina	25
2.4. Determinación de proteínas	25



2.5.	Electroforesis	26
2.6.	Péptidos sintéticos	26
2.7.	Ensayos de ensamblaje	28
2.7.1.	Ensayo de ensamblaje de microtúbulos	28
2.7.2.	Ensayo de ensamblaje de actina	28
2.8.	Carbamilación de proteína Tau y péptidos de Tau	29
2.9.	Estudios de unión con EM y EMP	30
2.9.1.	Método de ultracentrifugación	30
2.9.2.	Cromatografía en geles de agarosa de zona pequeña	30
2.10.	Unión directa de EMP a péptidos de Tau	31
2.11.	Ensayo de competencia en ELISA.	31
2.12.	Microscopía electrónica	32
3.-	Resultados	33
3.A.	Dominios funcionales en las MAPs. Estudios con inhibidores de la acción de MAPs.	33
3.A.1.	EMP inhibe la unión de péptidos de tubulina a MAP-2. Análisis por ultracentrifugación en la Airfuge.	33
3.A.2.	Análisis del efecto inhibitor de EMP sobre la unión del péptido [ <sup>3</sup> H]-β(422-434) de tubulina a MAP-2 mediante cromatografía zonal	36
3.A.3.	EMP inhibe el ensamblaje de tubulina inducido por péptidos de Tau	36
3.A.4.	EMP altera la estructura de los polímeros de tubulina inducidos por péptidos de Tau	40
3.A.5.	EMP se une directamente a los péptidos de Tau	40
3.A.6.	EM no se une directamente a los péptidos de Tau	42
3.A.7.	EM no inhibe la inducción de ensamblaje de tubulina por péptidos de Tau	42
3.A.8.	Unión de EMP y de anticuerpo específico contra el péptidos de Tau, a sitios comunes en proteína Tau	42

3.B.	La interacción de Tau con filamentos de actina.	46
	Estudios utilizando péptidos sitio específicos de Tau.	
3.B.1.	El péptido de Tau V187-G <sup>204</sup> induce un aumento de la turbidez en preparaciones de filamentos de actina en una forma dependiente de la dosis.	46
3.B.2.	Inducción de manojos compactos de filamentos de actina por el péptido de Tau V187-G <sup>204</sup>	48
3.B.3.	Los cambios en la turbidez de los filamentos de actina dependen de la concentración de actina	50
3.B.4.	EMP no inhibe la turbidez desarrollada por el ensamblaje de filamentos de actina inducido por la proteína Tau	50
3.B.5.	Cinética de ensamblaje de G-actina en microfilamentos analizada por mediciones a 232 nm. Efectos de Tau y de las drogas EM y EMP.	53
3.B.6.	La inducción de manojos de filamentos de actina es inhibida por carbamilación de los péptidos de Tau	55
3.B.7.	La carbamilación de la proteína Tau nativa también inhibe su capacidad inductora de manojos de filamentos de actina	57
3.B.8.	Un gradual aumento en la concentración de H <sup>+</sup> induce la formación de manojos de filamentos de actina en la ausencia de péptidos de Tau	57
3.B.9.	La turbidez debida a la agregación de filamentos de actina por péptidos de Tau depende de las diferentes condiciones de pH	58
3.B.10	Péptido de Tau V187-G <sup>204</sup> induce un aumento en los niveles de filamentos de actina a pH bajo 6,6	58
4.-	Discusión	60
4.1.	EMP se une a los dominios de unión de tubulina en MAP-2 y Tau	60

4.2.	Fragmentos de Tau que representan las secuencias repetidas de la proteína Tau, inducen la formación de manojos de filamentos de actina.	65
4.3.	Funciones de MAPs en la estructuración de la red del citoesqueleto.	70
5.-	Conclusiones	73
6.-	Bibliografía	74
7.-	Copias de las publicaciones derivadas de esta tesis	90

## Indice de figuras

**Figura 1.** Esquema que representa las posibles interacciones entre tubulina y MAPs. Página 13.

**Figura 2.** Estructura molecular de las drogas anti-neoplásicas que interactúan con MAPs. Página 15.

**Figura 3.** EMP inhibe la unión del péptido C-terminal de tubulina [ $^3\text{H}$ ]- $\beta\text{II}$ -(422-434) a MAP-2. Página 34.

**Figura 4.** Análisis de la unión del péptido C-terminal de tubulina [ $^3\text{H}$ ]- $\beta\text{II}$ -(422-434) a MAP-2 por cromatografía de zona pequeña. Página 35.

**Figura 5.** Inhibición por concentraciones crecientes de EMP del ensamblaje de tubulina inducido por péptido de Tau V187-G204. Página 37.

**Figura 6.** Microscopía electrónica de los polímeros de tubulina obtenidos en presencia de EMP. Página 39.

**Figura 7.** Interacción de [ $^3\text{H}$ ]-EMP con péptidos de Tau V187-G204 (A) y V218-G235 (B) analizada por cromatografía de zona pequeña en Biogel P-6. Página 41.

**Figura 8.** [ $^3\text{H}$ ]-EM no interactúa con péptido de Tau V187-G204, según análisis por cromatografía de zona pequeña en Biogel P-6. Página 43.

**Figura 9.** Efecto de EM en el ensamblaje de tubulina inducido por péptidos de Tau V187-G204. Página 44.

**Figura 10.** Efecto de EM y EMP sobre la interacción específica de la proteína Tau y anticuerpo anti-Tau sitio-dirigido. Página 45.

**Figura 11.** Dependencia del cambio de turbidez de polímeros de actina con la concentración del péptido de Tau V187-G204. Página 47

**Figura 12.** Inducción de manojos de filamentos de actina por péptido de Tau V187-G204. Página 49.

**Figura 13.** Dependencia del aumento de la turbidez con la concentración de actina. Página 51.

**Figura 14.** El aumento de turbidez debido a la formación de manojos de filamentos de actina dependiente de Tau no es inhibido por EMP. Página 52.

**Figura 15.** Cinética de ensamblaje de filamentos de actina medida a 232 nm. Página 54.

**Figura 16.** Inhibición de la inducción de manojos de filamentos de actina por modificación del péptido de Tau V187-G204 con KCNO. Página 56.

**Figura 17.** Dependencia de la turbidez de filamentos de actina bajo diferentes condiciones de pH. Página 59.

**Figura 18.** Representación esquemática de las interacciones entre microtúbulos y filamentos de actina mediadas por Tau. Página 72.

## Abreviaturas

<b>ABP</b>	:Proteínas que unen actina
<b>ATP</b>	:Adenosin trifosfato
<b>βII(422-434)</b>	:Secuencia aminoacídica YQQYQDATADEQG de la isoforma βII de tubulina
<b>BSA</b>	:Albúmina de suero de bovino
<b>DTT</b>	:Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	:Acido etilen-diamino metano-tetraacético
<b>EGTA</b>	:Acido 1,2 etanodiol-bis-(2-amino etil eter)-N,N'-tetraacético
<b>ELISA</b>	:Ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima
<b>EM</b>	:(Estramustina), estradiol-3-(-N,N-bis-(2-cloroetil) carbamato))
<b>EMBP</b>	:Proteína que une Estramustina
<b>EMP</b>	:(Estramustina-fosfato), estradiol-3-(-N,N-bis-(2-cloroetil) carbamato))-17β-fosfato
<b>F-actina</b>	:Actina en estado de filamento
<b>G-actina</b>	:Actina en estado monomérico
<b>GTP</b>	:Guanosin trifosfato
<b>MAPs</b>	:Proteínas asociadas a microtúbulos
<b>MES</b>	:Acido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
<b>Mips</b>	:proteínas que interactúan con microtúbulos
<b>MOC</b>	:Centro organizador de microtúbulos
<b>MTP</b>	:Proteína microtubular
<b>OPD</b>	:O-fenilendiamina
<b>PAGE</b>	:Electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>PBS</b>	:Tampón fosfato salino
<b>pI</b>	:Punto isoeléctrico
<b>PMSF</b>	:Fluoruro de fenil metil sulfónico
<b>SDS</b>	:Dodecil sulfato de sodio
<b>Tris</b>	:Tris-(hidroximetil)-amino metano
<b>Tubulina-PC</b>	:Tubulina purificada por fosfocelulosa
<b>V187-G<sup>204</sup></b>	:Secuencia aminoacídica VRSKIGSTENLKHQPGGG
<b>V218-G<sup>235</sup></b>	:Secuencia aminoacídica VTSKCGSLGNIHHKPGGG
<b>V250-G<sup>267</sup></b>	:Secuencia aminoacídica VQSKIGSLDNITHVPGGG

## Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

1) Moraga, D., Rivas-Berrios, A., Farías, G., Wallin, M. and Maccioni, R.B. (1992) Estramustine-phosphate binds to a tubulin binding domain on microtubule-associated proteins MAP-2 and Tau. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121:97-103.

2) Moraga, D., Nuñez, P., Garrido, J. and Maccioni, R.B. (1993) A Tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J. Neurochemistry* 61, 979-986.

**RESUMEN.** El citoesqueleto es una compleja y dinámica red intracelular de filamentos que incluye filamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermedios y sus proteínas asociadas. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) son un importante grupo de proteínas reguladoras del citoesqueleto, debido a que parecen controlar tanto las funciones microtubulares como de filamentos de actina. Con el objeto de estudiar en profundidad los dominios moleculares específicos de MAPs involucrados en funciones reguladoras tanto en el sistema de los microtúbulos como en el sistema de filamentos de actina, realizamos dos enfoques experimentales.

El primer enfoque se orientó hacia el estudio de la interacción de Estramustina-fosfato (EMP), un conjugado fosforilado de estradiol y mostaza nor-nitrogenada, con proteínas MAPs y sus efectos en el sistema de los microtúbulos. Se llevaron a cabo estudios de unión utilizando péptidos sitio-específicos que contienen secuencias de los dominios de interacción en estas proteínas. Se demostró que EMP inhibe la unión del péptido C-terminal de tubulina  $\beta$ -(422-434) tanto a MAP-2 como a Tau. Este segmento de tubulina representa su principal dominio de unión a estas MAPs. Una observación de interés fue que EMP interactuaba con los péptidos sintéticos de Tau V187-G204 y V218-G235, que representan las dos secuencias repetidas claves ubicadas dentro del dominio conservado de Tau (también en MAP-2) para la unión de tubulina. Esta observación fue corroborada por el efecto inhibitorio de EMP en la inducción del ensamblaje de tubulina en microtúbulos, dependiente de péptidos de Tau. Por otro lado, Estramustina (EM), la droga no-fosforilada, no produjo inhibición del ensamblaje de microtúbulos inducido por péptidos de Tau, indicando que el grupo fosfato negativamente cargado de EMP es de importancia para su efecto inhibitorio. Estos hallazgos sugieren que los sitios moleculares para la acción de EMP están localizados dentro de los dominios de unión a microtúbulo en Tau y MAP-2.



La segunda línea experimental estuvo orientada al estudio de la interacción de Tau con filamentos de actina. Estos experimentos fueron realizados con Tau, actina y péptidos sintéticos de Tau comunes con MAP-2. En esta investigación aportamos nuevas evidencias que apoyan la interacción *in vitro* de un dominio específico de unión a tubulina en Tau con actina. En ensayos de ensamblaje de actina, el péptido sintético V187-G204: VRSKIGSTENLKHQPGGG, correspondiente a la primera secuencia repetida de la proteína Tau produjo un aumento turbidimétrico a 320 nm en una forma dependiente de la dosis. Un rasgo notable del proceso de ensamblaje inducido por este péptido de Tau fue la formación de una gran cantidad de manojos de filamentos de actina, los cuales fueron revelados por microscopía electrónica de transmisión. Un aumento en la concentración del péptido de Tau produjo un aumento proporcional en la formación de manojos de filamentos de actina. Por otra parte se observó que una disminución gradual del pH en el intervalo de 7,6 a 4,7 produjo un mayor efecto inductor de manojos de filamentos de actina por parte del péptido de Tau. Un análisis de los mecanismos que operan en la formación de manojos de filamentos de actina inducidos por péptidos de Tau, sugiere la participación de componentes de tipo electrostático en la interacción, dado que la neutralización de residuos  $\epsilon$ -amino de lisina por la carbamilación selectiva de Tau o del péptido de Tau, implicaba una pérdida completa de su capacidad inductora de manojos de filamentos de actina.

Estos resultados, sugieren fuertemente que las secuencias repetidas de Tau (también encontradas en MAP-2 y MAP-4) que representan un sitio común de unión a tubulina, constituyen un dominio funcional en Tau para la dinámica de interconexiones entre filamentos de actina y microtúbulos.

**ABSTRACT.** The cytoskeleton is a complex and dynamic cellular network of filaments that includes actin filaments, microtubules, intermediate filaments and their associated proteins. The microtubule-associated proteins (MAPs) are an important subset of cytoskeleton regulators because they appear to control both microtubule and actin-filament functions. With the goal to study in depth the specific molecular domains on MAPs involved in regulatory function associated to both microtubule and actin filaments system, we carried out two experimental approaches.

The first experimental approach was oriented to study the interaction of Estramustine-phosphate (EMP), a phosphorylated conjugate of estradiol and nor-nitrogen mustard, with MAPs proteins and its effects on the microtubule systems. We developed binding studies using site-directed peptides representing sequences of interacting domains on these proteins. It was shown that EMP inhibits the binding of the C-terminal tubulin peptide  $\beta$ -II(422-434) to both MAP-2 and Tau. This segment constitutes a main tubulin binding domain for these microtubule-associated proteins. Interestingly, EMP interacted with the synthetic Tau peptides V187-G204 and V218-G235, representing two major repeats within the conserved microtubule-binding domain on Tau, and also on MAP-2. This observation was confirmed by the inhibitory effects of EMP on Tau peptide-induced tubulin assembly into microtubules. On the other hand, the non-phosphorylated drug Estramustine (EM) failed to block the MAP peptide-induced assembly, indicating that the negatively charged phosphate moiety of EMP is of importance for its inhibitory effect. These findings suggest that the molecular sites for the action of EMP are located within the microtubule-binding domains on Tau and MAP-2

The second experimental approach focused on the interaction of Tau with actin filaments. These studies were developed with purified Tau, actin and synthetic peptides of Tau protein. In these investigations we provide new data to support

the interaction of a specific tubulin binding domain on Tau with actin *in vitro*. In actin polymerization assays, the synthetic peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>: VRSKIGSTENLKHQPGGG corresponding to the first repetitive sequence of Tau protein increased turbidity at 320 nm in a dose-dependent fashion. A salient feature of the Tau peptide-induced assembly process is the formation of a large amount of actin filament bundles, as revealed by electron microscopic analysis. An increase in the Tau peptide concentration resulted in a proportional increase in bundling of actin filaments. Interestingly, a gradual decrease of pH within the range 7.6 to 4.7 resulted in a higher effect of Tau peptide in promoting bundles of actin filaments. An analysis of the mechanisms that operate in the peptide-induction of actin filament bundles suggests the involvement of electrostatic forces, since the neutralization of  $\epsilon$ -amino lysyl residues by selective carbamoylation of Tau or Tau peptides resulted in a complete loss of their effects to promote actin bundle formation.

The experimental data obtained in this thesis strongly suggests that the Tau repetitive sequences (also found in MAP-2 and MAP-4) containing a common tubulin binding motif, may constitute a functional domain on Tau for the dynamics of interconnections between actin filaments and the microtubule system.

## 1. INTRODUCCION

1.1. EL CITOESQUELETO: El citoplasma celular, lejos de ser un fluido homogéneo, tiene un alto grado de organización tanto estructural como funcional. El citoesqueleto que contribuye a la compartimentación intracelular está formado por polímeros filamentosos que le confieren a éste sus conocidas características elásticas y contráctiles. Se puede definir operacionalmente al citoesqueleto como una dinámica red de filamentos citosólicos con un alto grado de recambio y reorganización y que participa en muchas funciones celulares estructurales y de transporte entre las que se incluyen: transporte de vesículas y organelos (Kelly, 1990), modulación de la forma celular (Bershadsky and Vasiliev, 1988), migración celular (Vasiliev et. al., 1970), diferenciación celular (Maccioni and Arechaga, 1987, Nunez, 1988; Tucker, 1990) y la reorganización de la citoarquitectura (Danowski, 1989). Los constituyentes principales del citoesqueleto son los filamentos de actina que tienen un diámetro de 7 nm, filamentos intermedios con un diámetro de 8-10 nm y los microtúbulos con un diámetro de 24 nm (Maccioni, 1986; Bershadsky and Vasiliev, 1988; Schliwa, 1985). Existen evidencias morfológicas y bioquímicas que indican la existencia de conexiones estructurales y funcionales entre los distintos componentes del citoesqueleto (Ellisman and Porter, 1980; Schliwa, 1985; Danowski, 1989). Así, es probable que los diferentes roles que juega el citoesqueleto en el control celular sean el resultado de la coordinación de funciones entre estos tres grandes sistemas filamentosos.

Los microtúbulos constituyen el componente mayoritario del citoesqueleto y se caracterizan por ser estructuras cilíndricas formadas por trece protofilamentos que se disponen en forma paralela al eje longitudinal del microtúbulo. La estructura

microtubular se forma por el ensamblaje del heterodímero de tubulina (ver revisión en Dustin, 1984).

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) están directamente involucradas en el control y estabilización de la estructura microtubular (Maccioni, 1986). Las proteínas microtubulares (tubulina y MAPs) pueden, bajo condiciones controladas y en presencia de EGTA, retener su capacidad de realizar ciclos de ensamblaje-desensamblaje *in vitro* (Weisenberg, 1972). Este hallazgo ha sido clave en la investigación de los mecanismos de regulación biológica de los microtúbulos. La participación de magnesio es también necesaria, así como la del nucleótido GTP (Maccioni and Seeds, 1977, 1983; Carlier and Pantaloni, 1982). Así, en presencia de EGTA,  $Mg^{2+}$  y de GTP las proteínas microtubulares son inducidas a ensamblar a 37°C y a desensamblar cuando la temperatura desciende hasta 4°C. Se ha demostrado que tanto GTP como  $Mg^{2+}$  se unen al mismo locus en tubulina (Monasterio, 1987).

Otro componente mayoritario del citoesqueleto son los filamentos de actina, esenciales en la contracción muscular y en la estructura y motilidad de células no-musculares (Pollard and Craig, 1982). La actina puede mantenerse en su forma monomérica (G-actina) a una baja concentración proteica, a baja temperatura, pH alcalino y en ausencia de sales. Pero, en condiciones fisiológicas de  $K^+$  o  $Mg^{2+}$ , los monómeros de actina purificada se autoensamblan en filamentos de F-actina. La estructura helicoidal de F-actina se origina por el desplazamiento de una subunidad respecto a la otra. Así, un monómero tiene un desplazamiento de 167° del eje del filamento respecto de su vecino, y una distancia axial entre ellos de 2.73 nm (Bershadsky and Vasiliev, 1988). Aparentemente la célula soluciona el problema de mantener una integridad mecánica y su flexibilidad por el entrecruzamiento de filamentos individuales en grandes manojos paralelos de F-actina ("actin bundles") o en forma de geles ("networks") dominados por entrecruzamiento entre filamentos de actina ortogonales (Small, 1988). La formación de superestructuras de F-actina tiene enormes consecuencias para la

citoarquitectura y su ensamblaje parece ser regulado tanto por proteínas que unen actina (proteínas ABP) y por las MAPs.

1.2. UNA PREGUNTA CENTRAL: Una pregunta clave en el estudio de las funciones del citoesqueleto es: ¿Como pueden los componentes del citoesqueleto estar asociados a tan diversas funciones celulares, dado que actina (Rubinstein, 1990) y tubulina (Sullivan, 1988) son proteínas altamente conservadas en las diversas especies?. Una serie de evidencias indican que al menos dos familias de proteínas reguladoras del citoesqueleto serían las responsables de las múltiples funciones señaladas, tanto para microtúbulos como para filamentos de actina: las MAPs y las proteínas que interactúan en forma transiente con microtúbulos (Mips). MAPs co-purifican con tubulina y cumplen funciones en el ensamblaje y estabilización de microtúbulos (Olmsted, 1986; Maccioni, et al., 1986). Las Mips, recientemente descritas (González et al., 1992; 1993), se caracterizan por regular las funciones de transporte asociadas a microtúbulos interactuando transitoriamente con éstos y/o con filamentos de actina y no co-purifican con tubulina a través de sucesivos ciclos de ensamblaje-desensamblaje. Otras proteínas relacionadas a Mips incluyen las proteínas motoras kinesina y dineína que transducen la energía liberada en la hidrólisis del ATP en trabajo mecánico para el desplazamiento de organelos intracelulares (Vale, et al., 1985; Vallee, et al., 1989). Las funciones del citoesqueleto de actina estarían reguladas por las ABP y por algunas MAPs tales como MAP-2 (Pollard, et al., 1984) y Tau (Cross, et al., 1993). Este hecho es de suma importancia para la comprensión de los mecanismos regulatorios que acoplan y coordinan las funciones de microtúbulos y filamentos de actina.

1.3. TUBULINA: La tubulina es un heterodímero globular (Bryan and Wilson, 1971) compuesto por dos cadenas polipeptídicas relacionadas pero distintas, los monómeros  $\alpha$  y  $\beta$ . Ambos monómeros contienen alrededor de 450 aminoácidos y una masa molecular de 50 kDa cada uno (Ludueña and Woodward, 1973). Las  $\alpha$  y  $\beta$  tubulinas tienen un 40% de homología en su estructura

primaria (Maccioni, 1986). Se han caracterizado las isoformas de tubulina como proteínas altamente acídicas:  $\alpha$ -tubulina  $pI=5,3$  y  $\beta$ -tubulina  $pI=5,1$ . La familia de las tubulinas corresponde a un grupo de proteínas de secuencias altamente conservadas. Sin embargo el extremo C-terminal ácido constituye un dominio variable en las distintas isoformas de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Serrano, et al., 1984a). Estudios sobre la subestructura de la región C-terminal que incluye los últimos 36 aminoácidos han sido de gran importancia para la interacción con las MAPs (Serrano et al., 1984b; Maccioni et al., 1985b).

Al ser incorporado a los microtúbulos, el heterodímero de tubulina tiene una molécula de GTP estrechamente unida a su subunidad  $\alpha$ , mientras que el otra molécula de GTP está unida a una región cercana al N-terminal de la subunidad  $\beta$  (Maccioni and Seeds, 1983; Shivanna et al., 1993). Este último GTP es hidrolizado a GDP durante el proceso de ensamblaje y puede ser intercambiado por un nuevo GTP solo una vez que el heterodímero de tubulina se encuentre libre, no asociado al microtúbulo (Maccioni and Seeds, 1977; Carrier and Pantaloni, 1982; Mandelkow and Mandelkow, 1991). La hidrólisis del GTP unido a  $\beta$ -tubulina se presume que induce un cambio conformacional que tensa la estructura microtubular (Mandelkow and Mandelkow, 1991). La incorporación de tubulina-GTP al terminal de crecimiento del microtúbulo es clave para definir la existencia de subpoblaciones de microtúbulos que crecen o se disocian de acuerdo al modelo de inestabilidad dinámica (Kirschner and Mitchison, 1986).

1.4. PROTEINAS ASOCIADAS A MICROTUBULOS (MAPs). El contenido de tubulina en preparaciones de proteína microtubular obtenida a partir de cerebro de mamíferos por ciclos de ensamblaje y desensamblaje dependiente de temperatura, es frecuentemente cercano a 85% y el resto corresponde a las MAPs (Sloboda et al., 1976). Las MAPs se unen a la superficie microtubular y son importantes en la regulación del ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos (Weingarten et al., 1975; Murphy and Borisy, 1975; Murphy et al., 1977), para revisiones ver (Maccioni et al., 1986;

Olmsted, 1991; Wiche et al., 1991). Las MAPs mejor conocidas son la MAP-1, la MAP-2 con un masa molecular entre 200 y 300 kDa, la familia de proteínas Tau con una masa molecular entre 50 y 65 kDa, MAP-3 de 180 kDa encontrada en tejido nervioso de mamíferos, y la MAP-4 que agrupan una serie de proteínas aisladas de líneas celulares con un masa molecular cercana a los 200 kDa (Wiche, et al., 1991).

1.4.1. MAP-1: Tradicionalmente las MAPs fueron clasificadas de acuerdo a su masa molecular aparente, determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS). Así la MAP-1 es un grupo de proteínas que incluye las MAP-1A, MAP-1B y MAP-1C específicas de tejido nervioso, y con un masa molecular cercana a los 350 kDa (Herrmann et al., 1985). MAP-1A y MAP-1B son proteínas distintas codificadas por genes diferentes (Garner et al., 1990). MAP-1C también conocida como la dineína citoplasmática (Vallee et al., 1989), interactúa solo transitoriamente con los microtúbulos y por ello podría ser clasificada dentro de la familia de las Mips (González et al., 1993). La secuencia del gen que codifica para la MAP-1B es conocida (Noble et al., 1989), y su masa molecular deducida de su secuencia sería de 250 kDa, valor que discrepa con el valor estimado por PAGE-SDS por razones no bien establecidas. Experimentos de ensamblaje de microtúbulos han revelado que el dominio de unión a tubulina de MAP-1B está representado por un segmento que contiene múltiples copias de un motivo repetido KKEE o KKEI (Noble et al., 1989) que no estaría relacionado con los dominios de unión de las otras MAPs (Cross et al., 1991). Sin embargo, una característica común a todos los sitios de las MAPs puede ser visualizada como una proyección filamentosa flexible sobre la superficie microtubular (Sato-Toshikate et al., 1989), y se encuentra tanto en axones y dendritas. Se ha propuesto que MAP-1B jugaría un papel importante en el entrecruzamiento de los microtúbulos (Hirokawa et al., 1985).



1.4.2. MAP-2: La familia de las MAP-2 constituye un segundo grupo de MAPs de alta masa molecular que existe mayoritariamente en el sistema nervioso. Estas incluyen las isoformas denominadas MAP-2A, MAP-2B y MAP-2C, pero que a diferencia de la familia MAP-1 todos sus componentes son codificados por el mismo gen (Lewis et al., 1988). Las primeras estimaciones para la masa molecular de MAP-2A y MAP-2C fueron de alrededor de 270 kDa (Kim et al., 1979), sin embargo la masa estimada a partir de la secuencia genómica es sustancialmente menor (alrededor de 200 kDa) (Lewis et al., 1988). En MAP-2 el dominio de unión a tubulina está localizado en una región de 185 aminoácidos que incluye tres secuencias repetidas imperfectas de 18 aminoácidos a las que se le adjudica la función de ser los sitios de interacción productiva con tubulina (Lewis et al., 1988; Joly et al., 1989; Rivas-Berrios et al., 1990) Estas pequeñas secuencias repetidas de MAP-2 contienen aminoácidos básicos y se unen directamente a dominios ácidos en la región C-terminal de  $\beta$ -tubulina (Maccioni et al., 1989; Cross et al., 1991), y  $\alpha$ -tubulina (Rivas-Berrios et al., 1990). La MAP-2 retiene su capacidad estimuladora del ensamblaje de tubulina después de ser hervida 5-10 minutos, lo mismo que la proteína Tau, y esta termoestabilidad es usada para su purificación. La forma juvenil de MAP-2 encontrada en tejido nervioso embrionario, la MAP-2C, tiene los mismos dominios de unión a tubulina que las formas adultas MAP-2A y MAP-2B, pero durante el procesamiento del RNA mensajero de MAP-2C, una parte del mensajero que codifica para un segmento en el centro de la proteína es eliminada como intrón (Papandriopoulou et al., 1989), lo cual reduce el largo del brazo que se proyecta fuera de la superficie microtubular. La localización celular de MAP-2C no está restringida a las dendritas y el soma, lo cual es característico de MAP-2A y MAP-2B. Esto podría eventualmente permitir diferentes funciones para los microtúbulos que contienen estas MAPs (Fridén, 1991). La masa molecular de la MAP-2C es de 70 kDa.

1.4.3. LA PROTEINA TAU: La proteína Tau es una familia de proteínas de al menos cinco isoformas con masas moleculares entre 55 y 70 kDa, que son codificados por un solo gen. Algunas de estas isoformas podrían estar solo diferencialmente fosforiladas. Sin embargo, debido a que 5 de los 14 exones del gen de la proteína Tau pueden ser incluidos o excluidos durante el procesamiento del mRNA y que puede utilizar tres dominios C-terminal distintos (Himmler, 1989), pueden generarse al menos 64 polipéptidos potenciales de Tau. La proteína Tau tiene un dominio de unión a tubulina que es altamente homólogo al mismo dominio de MAP-2 (Lewis et al., 1988; Joly et al., 1989; Rivas-Berrios et al., 1990). Aún cuando la proteína Tau ha sido principalmente descrita en tejido nervioso (Lee, 1990) existen evidencias de su presencia en eritrocito de pollo, en células WEHI monomielocíticas de ratón (Martínez et al., 1992) y en fibroblastos de ratón NIH 3T3 (Cross et al., 1993). Se ha podido calcular una relación de una proteína Tau por cinco dímeros de tubulina para microtúbulos saturados con la proteína Tau (Lee et al., 1990). Estructuralmente la proteína Tau parece tener una forma elongada al microscopio electrónico y se ha determinado que la distancia entre microtúbulos (20 nm entre la superficie exterior de un microtúbulo con la de otro microtúbulo vecino) ensamblados con Tau es menor que la distancia entre microtúbulos ensamblados con MAP-2 (100 nm entre cada microtúbulo). Esta última distancia es similar al tamaño de los puentes que entrecruzan microtúbulos en dendritas (Goedert, et al., 1991).

La inmunolocalización de MAP-2 y de proteína Tau dió las primeras claves sobre sus funciones. Mientras que la distribución de la proteína Tau en tejido nervioso se restringe a axones, MAP-2 se encuentra principalmente en dendritas (Goedert et al., 1991). No se conoce como se establece esta distribución intracelular de MAP-2 y la proteína Tau. La microinyección de MAP-2 biotinilada en cultivos primarios de neuronas revelaron que MAP-2 puede ser transportada tanto en dendritas como en axones. Se ha planteado que solo una fracción de MAP-2 se puede unir a microtúbulos en axones y es rápidamente degradada (Okabe, S. and Hirokawa, 1990).

¿Cuáles són las funciones potenciales de MAP-2 y de la proteína Tau en las células? Las respuestas han sido dos: primero, la microinyección de la proteína Tau en fibroblastos L (que no expresan proteína Tau), demuestra que la proteína Tau induce ensamblaje adicional de microtúbulos y estabiliza los microtúbulos contra el desensamblaje sin cambios obvios en su organización (Dubrin et al., 1986). No obstante, en líneas de fibroblastos transfectados en forma transitoria (Kanai et al., 1989; Lewis et al., 1989) o estable (Kanai et al., 1989) con gen de Tau, se produce la acumulación de la proteína Tau la cual induce una dramática reorganización de microtúbulos en manojos y aumenta el contenido de tubulina citoplasmática total. El mismo fenómeno de inducción de manojos de microtúbulos se produjo con la transfección del gen de MAP-2 en células en cultivo (Lewis et al., 1989).

Estudios con proteína Tau y MAP-2 truncadas han revelado que sus dominios responsables de la formación de manojos de microtúbulos no se encuentran en el brazo que se proyecta fuera de superficie microtubular. Estos dominios están ubicados en extremo C-terminal cercano al dominio de unión a tubulina y están formados por un segmento hidrofóbico análogo al cierre de leucina del factor de transcripción de levadura GCN4 (Cleveland, 1990). El mecanismo de formación de manojos de microtúbulos podría ocurrir a través de la formación de dímeros de MAPs que entrecruzarían microtúbulos adyacentes a través del cierre ("zipper") de leucina C-terminal contenido en la secuencia de MAP-2 (Lewis et al., 1989; Matus, 1991).

El hecho que Tau sea un constituyente de los filamentos helicoidales apareados (PHF's), el mayor componente de ovillo neurofibrilar de la enfermedad de Alzheimer, indica que algunas MAPs están involucradas en procesos fisiopatológicos (Brion, 1990). Modificaciones postraduccionales de Tau parecen modificar su comportamiento en cuanto a inducir el ensamblaje de microtúbulos. La carbamilación selectiva de un residuo de lisina en Tau produce una proteína modificada con la capacidad anómala de auto-asociarse en filamentos del tipo PHF's (Farías et al., 1993)

1.4.4. OTRAS MAPs: Otro grupo de MAPs corresponde a un conjunto muy heterogéneo de proteínas con pesos moleculares cercanos a los 200 kDa. Estas son las MAPs de células no neuronales (Wiche et al., 1991). Se incluyen entre éstas: La MAP adrenal de 190 kDa (Aizawa et al., 1989); la MAP de 210 kDa de células HeLa (Bulinski and Borisy, 1980); la MAP-4 de ratón (Parysek, et al., 1984) y MAP de 205 kDa de *Drosophila* (Goldstein, et al., 1986). Entre otras MAPs descritas en tejido nervioso cabe mencionar la MAP-3 descubierta por Huber et al. (1985) que corresponde a una proteína que se expresa diferencialmente durante la fase neonatal del desarrollo del sistema nervioso central. Todas éstas MAPs tienen homología con isoformas de MAP-2 y de Tau especialmente al nivel de sus dominios de unión a tubulina.

1.5. INTERACCION ENTRE TUBULINA Y MAPs: Dentro de los múltiples enfoques experimentales para abordar el estudio de la biología celular y molecular del citoesqueleto, se han realizado estudios tendientes a disectar los dominios proteicos involucrados en las interacciones tubulina-MAPs responsables del ensamblaje y estabilización de microtúbulos. Estos estudios han permitido identificar los dominios de interacción tanto a nivel de tubulina como en las MAPs. Al respecto, investigaciones originadas en este laboratorio (Serrano et al, 1984a; 1984b; Maccioni et al., 1985b, Maccioni et al., 1988; Vera et al., 1988b; Maccioni et al., 1989; Rivas et al., 1988; Rivas-Berrios et al., 1990; Farías et al, 1992 ; Cross et al., 1991; Moraga et al., 1992) han permitido identificar dominios de unión para las diferentes MAPs en regiones del dominio C-terminal de tubulina. Inicialmente se demostró que la digestión controlada de tubulina con algunas enzimas proteolíticas (subtilisina y proteasa V-8 de *S. aureus*), liberaba fragmentos C-terminales de 4kD de las distintas isoformas de tubulina (Serrano et al., 1984a). Las diferentes isoformas de tubulina carentes de su dominio C-terminal (S-tubulina) mostraban una capacidad anómala de autoasociarse sin control y no requerían de MAPs para producir microtúbulos *in vitro* (Serrano et al., 1984b; Maccioni et al., 1985b). Posteriormente se encontró que las MAPs interactuaban con

péptidos sintéticos que contenían secuencias específicas de los dominios C-terminales de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Littauer et al., 1986; Maccioni et al., 1988). Se demostró que dos péptidos sintéticos, que representan secuencias dentro de la región más conservada del extremo C-terminal de tubulina  $\alpha$ (430-441): KDYEEVGVDSVE y  $\beta$  (422-424): YQQYQDATADEQG se unen selectivamente a MAP-2 y Tau. Estas secuencias del dominio C-terminal de tubulina serían, al menos, parte de los dominios de tubulina involucrados en la interacción de estas MAPs (Maccioni et al., 1988; 1989). Se demostró que anticuerpos preparados contra tales péptidos de tubulina desplazaban las MAPs de su unión a microtúbulos, produciendo tanto el desensamblaje de éstos como inhibiendo el autoensamblaje de tubulina en microtúbulos (Rivas et al., 1988; Vera et al., 1988b). Las evidencias apuntaban claramente hacia una función reguladora de MAPs en el ensamblaje de microtúbulos por interacciones con las secuencias del dominio C-terminal de tubulina (Cross et al., 1991).

Por otra parte, los dominios de MAPs responsables de su unión a la tubulina han sido estudiados en detalle. Estudios moleculares de las secuencias de clones de cDNA de cerebro, han revelado la existencia de tres secuencias repetidas de 18 aminoácidos en la proteína Tau: secuencia I (V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>), VRSKIGSTENLKHQPGGG, altamente básica con pI=10,5, secuencia II (V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup>) VTSKCGSLGNIHHKPGGG, también altamente básica con pI=10,5 y secuencia III (V<sup>250</sup>-G<sup>267</sup>) VQSKIGSLDNITHVPGGG de naturaleza neutra con pI=7,0 (Ennulat, et al., 1989). A pesar que MAP-2 y Tau son proteínas con estructuras diferentes aunque con funciones similares, es notable el hecho que Tau juvenil (de origen embrionario) comparte tres secuencias repetidas de alta homología con las encontradas en MAP-2 ( Lewis et al., 1988; Lee, 1990).

Tau adulta presenta cuatro secuencias repetidas, dos de las cuales son comunes con MAP-2. Estudios en este laboratorio han demostrado que estas secuencias repetidas de MAPs constituyen dominios (o motivos) de unión comunes para la unión a tubulina (Maccioni et al., 1989; Rivas-Berríos et al., 1990; Cross et al., 1991). Por otro lado, estudios con anticuerpos idiotípicos y anti-idiotípicos

han revelado la naturaleza de los epitopes funcionales en las MAPs involucrados en las interacciones selectivas con microtúbulos y han permitido definir la existencia de dominios funcionales comunes en MAP-2 y Tau responsables de la interacción con el sistema microtubular (Rivas-Berríos et al., 1990, Cross et al., 1993). El hallazgo de anticuerpos anti-idiotípicos presentes en el antisuero de conejos inmunizados con los péptidos  $\alpha$ -(430-441) y  $\beta$ -(422-434) de tubulina, y la posterior producción de anticuerpos monoclonales de naturaleza anti-idiotípica han contribuido al análisis de los dominios de MAPs involucrados en su interacción con microtúbulos, y al estudio de su regulación (Rivas et al., 1988). De acuerdo con el modelo de Jerne et al. (1982) los anticuerpos anti-idiotípicos reconocen por definición la superficie molecular complementaria a los péptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de tubulina, es decir los dominios de MAPs que interactúan con los péptidos  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Se demostró que anticuerpos de naturaleza anti-idiotípica inhibían la unión de MAP-1, MAP-2 y Tau a tubulina en forma competitiva, además de su marcado efecto para desensamblar microtúbulos preformados (Rivas et al., 1988).

Para corroborar la función de las secuencias repetidas tanto de MAP-2 como de Tau, se produjeron los péptidos sintéticos conteniendo éstas secuencias. Así, se encontró que las primeras dos secuencias repetidas inducen el ensamble de tubulina de cerebro en una forma dependiente de la dosis, mientras que la tercera tiene un efecto significativamente menor (Maccioni et al., 1989; Farías et al., 1992). Dado que los dos primeros péptidos que promueven el ensamblaje de microtúbulos tienen un punto isoeléctrico básico ( $pI=10,5$ ) y el tercer fragmento que no induce el ensamblaje tiene un  $pI=7,0$ , se estudió también si los efectos de los péptidos de Tau eran explicables solamente por carga o había algún componente de reconocimiento altamente específico en la secuencia de éstos. Mediante estudios que utilizaron un péptido con los mismos residuos que la primera secuencia de Tau (i.e., con el mismo  $pI=10,5$ ) pero distribuidos aleatoriamente, se encontró que éste no promovía el ensamblaje de microtúbulos pero interfería con el efecto inductor del péptido de Tau con la primera secuencia

repetida (Ennulat et al., 1989). Estos experimentos sugieren que la unión a microtúbulos por parte de las secuencias repetidas estaría mediada por interacciones electrostáticas, pero se requiere de un "motivo" especial de esta secuencia para inducir el ensamblaje (Ennulat et al., 1989). Además del componente electrostático, factores conformacionales están también involucrados en la interacción (Maccioni et al., 1989). Otros estudios (Melki et al., 1991) han demostrado que el péptido V218-G235 de Tau se incorpora a tubulina con una razón de 2:1 (mol/mol) lo que está de acuerdo con el papel de los dos dominios en tubulina,  $\alpha$ -(430-441) y  $\beta$ -(422-434). El péptido de Tau no solo tiene toda la información necesaria para inducir el ensamblaje de microtúbulos (Farías et al., 1992) sino que además puede organizar los microtúbulos formados en grandes manojos filamentosos (Melki et al., 1991). Un esquema que representa las posibles interacciones entre secuencias del dominio C-terminal de tubulina (Maccioni et al., 1988; Cross et al., 1991) y secuencias repetidas de la región catiónica de MAP-2 y Tau se muestra en la Figura 1.

Estudios con anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen MAPs a nivel de los dominios de unión de tubulina, han demostrado que éstos interactúan con los péptidos de Tau e inhiben su capacidad inductora de ensamblaje de tubulina. También se ha demostrado por experimentos inmunológicos y de competencia, que las isoformas de MAP-2 y Tau tienen determinantes antigénicos comunes, los cuales corresponden a sus dominios de unión con tubulina (Rivas-Berríos et al., 1990).

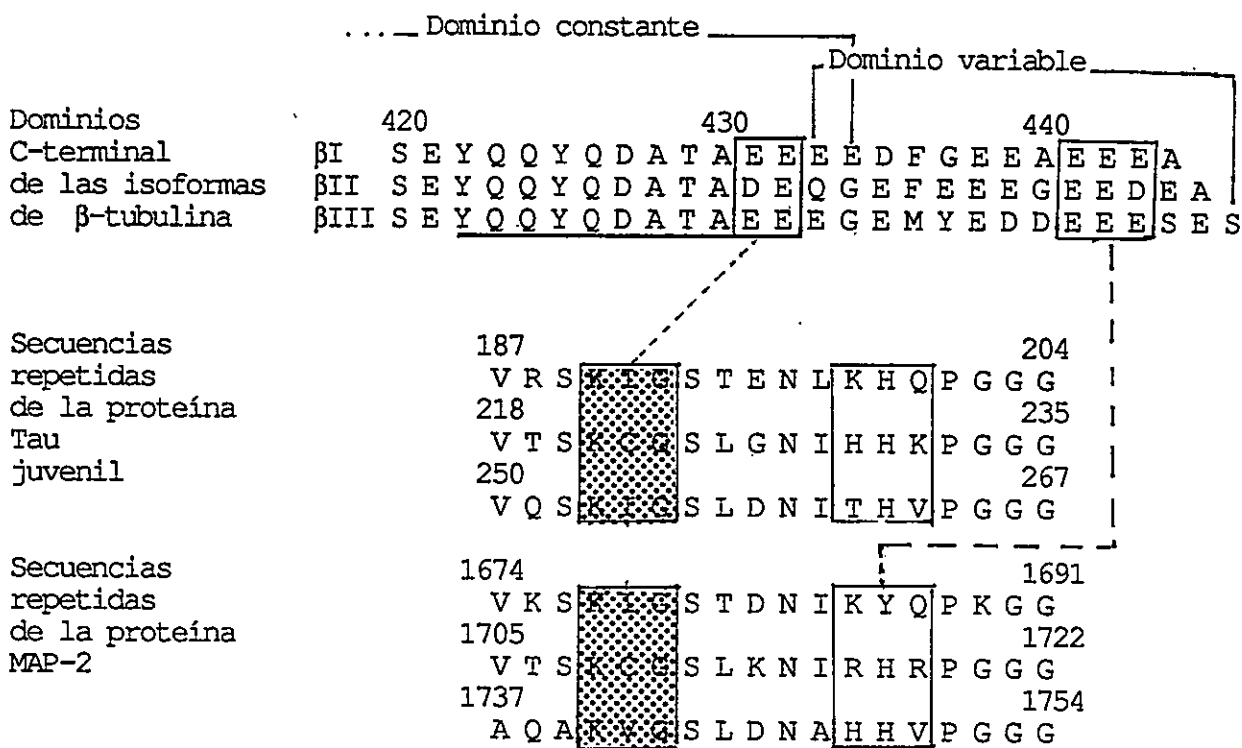


Figura 1. Esquema que representa las posibles interacciones entre tubulina y MAPs. Se muestra parte de las secuencias aminoacídicas de los dominios constante y variable de la región C-terminal de isoformas de  $\beta$ -tubulina. La línea continua delimita la secuencia reguladora Y<sup>422</sup>-E<sup>432</sup> del dominio C-terminal de isoformas de  $\beta$ -tubulina, que interactúa productivamente con secuencias repetidas de la región catiónica de MAP-2 y Tau durante el proceso de ensamblaje microtubular. Las líneas de trazos muestran las posibles vías de interacción entre secuencias reguladoras en tubulina y MAPs (cuadrados punteados ó vacíos) (Maccioni et al., 1988; Cross et al., 1991).



1.6. DROGAS QUE INTERACTUAN CON MAPs: Una aproximación experimental extremadamente valiosa para el estudio de la función microtubular tanto *in vivo* como *in vitro* ha sido el uso de drogas anti-microtúbulos. Existe una serie de drogas que interactúan con el heterodímero de tubulina, sin embargo la información sobre inhibidores de MAPs es muy escasa. Entre las drogas que se unen a tubulina, cabe mencionar la colchicina que se une con gran afinidad a tubulina (Maccioni, 1986), podofilotoxina, vinblastina (Bhattacharrya and Wolff, 1976) y taxol. Se ha descrito que estas drogas producen un marcado efecto bloqueador de la mitosis (Maccioni, 1986; Horwitz et al., 1982).

Existen pocas moléculas útiles para estudiar las funciones de microtúbulos dependientes de MAPs. Moléculas polianiónicas tales como heparina y ácido poliaspártico se unen en forma iónica a las MAPs inhibiendo el ensamblaje de microtúbulos (Deinum et al., 1984; Nakamura et al., 1989). Una nueva droga antineoplásica denominada Estramustina (EM) (Stearns and Tew, 1988), ha demostrado sus efectos inhibitorios sobre la formación de microtúbulos por su interacción directa con MAPs. Estramustina es un aducto formado por estradiol y mostaza nor-nitrogenada (Figura 2), y es clínicamente usada en el tratamiento del cáncer prostático avanzado (Jonsson et al., 1977). Esta droga fue sintetizada originalmente para realizar quimioterapia sitio-dirigida contra tumores malignos sensibles a estrógeno, como en el cáncer mamario, donde la idea era dirigir el componente citotóxico (mostaza nor-nitrogenada) hacia células-blancas específicas que contenían receptores para estrógeno. Se pensaba que la droga, luego de ser internalizada, se acumularía en el núcleo por su unión al receptor de estrógeno. Debido a la hidrólisis del éster carbamato de la droga por carbaminidasas y/o esterasas, la mostaza nor-nitrogenada liberada podría reaccionar con sitios nucleofílicos intracelulares, produciendo la alquilación de DNA o de proteínas, inhibiendo así el crecimiento tumoral. Sin embargo, las investigaciones preliminares indicaron que EM no se unía al receptor de estrógeno (Ohsawa and Yamazaki, 1988) ni se acumulaba en glándula mamaria. Por el

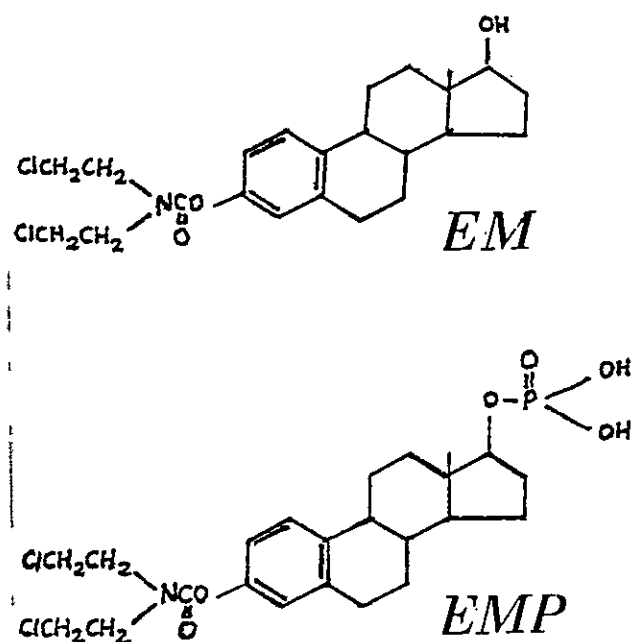


Figura 2. Estructura molecular de las drogas anti-neoplásicas que interactúan con MAPs: Estramustina (EM) y de su derivado fosforilado Estramustina fosfato (EMP).

contrario se demostró su distribución en células de la glándula prostática (Forsgren et al., 1979) gracias a la presencia de una proteína que funcionaba como receptor de EM (Bjork et al., 1982). En quimioterapia anti-tumoral se utiliza EMP, (Figura 2) análogo de EM, el cual es rápidamente desfosforilado hacia EM que se acumula en la glándula prostática (Hoisaeter, 1976). Se demostró posteriormente que el éster carbamato entre estradiol y mostaza nor-nitrogenada era muy estable y que la unidad citotóxica era el aducto completo (Tew et al., 1985). Estudios con células en cultivo prostáticas DU-145 demostraron que EM induce el bloqueo de la mitosis en metafase de una manera similar a colchicina (Hartley-Asp; 1984), lo cual sugirió que los microtúbulos eran los sitios más directos de acción de EM. Estudios *in vitro* demostraron que EMP inhibía rápida y reversiblemente el ensamblaje de microtúbulos (Kanje et al., 1985). Sin embargo, a diferencia de las drogas que se unen a tubulina, el desensamblaje de microtúbulos dependiente de EMP fue revertido por la adición de taxol, lo cual indicó por primera vez que la EMP no interactuaba con tubulina sino con MAPs (Kanje et al., 1985).

Otras células blanco para EM y EMP son: células de la glándula submaxilar (Pousette et al., 1987); células tumorales de glioma (Von Schoutlz et al., 1988) y líneas celulares tumorales de pulmón (Bergh et al., 1988). Todas éstas líneas celulares contienen también una proteína que une EM, que no es receptor de estrógeno.

Numerosos estudios utilizando EM y/o su derivado fosforilado EMP indican que estas drogas tienen efectos inhibitorios sobre los siguientes procesos: transporte intracelular (Stearns and Tew, 1985; Kanje et al., 1985); secreción de colagenasas (Wang and Stearns., 1988); secreción de interleuquina-III (Martínez et al., 1992); invasividad tumoral (Mareel et al., 1988); proliferación celular (Von Schultz et al., 1988); metástasis (Senoh et al., 1989); fagocitosis (Bjerner et al., 1988); ruptura de vesícula germinal (Rime et al., 1988). Estas observaciones son consistentes con el efecto inhibitorio de EM sobre los microtúbulos a nivel celular.

Por ello es posible que muchos de los efectos de inhibición por parte de EM y su derivado EMP sean consecuencia del bloqueo de procesos mediados por los microtúbulos. Sin embargo se ha descrito además que EM se une a proteínas de la matriz nuclear tanto en células HeLa como en células tumorales prostáticas DU-145, y que esta unión podría interferir con el procesamiento o transporte del RNA en el núcleo (Tew et al., 1985; Kruse et al., 1988; Kruse and Hartley-Asp, 1989). Así la acción de la droga tanto sobre la dinámica de los microtúbulos como a nivel de eventos post-transcripcionales puede explicar los múltiples efectos de EM a distintos niveles de la organización celular. En relación a los posibles efectos de EM vía proteínas de unión a esta droga (EMBP's), no hay mayores antecedentes que indiquen que la unión de EM a estas proteínas podría alterar algún proceso celular específico (Bergh et al., 1988). Es posible que la EMBP solo tenga un efecto concentrador de la droga en determinados tejidos o células que la expresen. Por otra parte, los efectos citotóxicos anti-microtúbulos de esta droga son independientes de sus componentes (i.e., mostaza nor-nitrogenada y estradiol). Los efectos de Estramustina sobre la síntesis de proteínas, de DNA y de RNA indican que el aducto tiene efectos diferentes que sus componentes por separado. Dado que la unión carbamato es un rasgo único de la droga (es decir no está en sus componentes por separados), se piensa que ella podría dar cuenta de las propiedades del aducto (Tew and Stearns 1989).

1.7. ACTINA: La actina muscular ha sido una de las proteínas de citoesqueleto mayormente estudiadas. Esto no es sorprendente, dado que es con frecuencia la proteína más abundante en células musculares y participa en los procesos de motilidad y en la estructuración de la matriz citoplasmática (Pollard, 1990). Tanto la actina muscular en vertebrados como la actina de hongos y protistas denominada  $\alpha$ -actina, son proteínas muy conservadas. Otro grupo es la  $\beta$ -actina citoplasmática, que también es extremadamente conservada en las diferentes especies.

La actina monomérica, o G-actina, es una proteína globular ácida (pI =5,4) con una masa molecular de 42 kDa. La G-actina

tiene capacidad de unir iones divalentes, especialmente  $Mg^{2+}$ , y nucleótidos ATP y ADP. Durante el proceso de ensamblaje de filamentos de actina, ocurre la incorporación de actina-ATP al filamento en crecimiento manteniendo siempre la misma orientación, situación análoga al caso de microtúbulos. Por ello los filamentos de actina son también de naturaleza polar. Una vez incorporada la actina ocurre la hidrólisis del ATP. Se ha postulado que la hidrólisis tendría funciones en el desensamblaje rápido de los filamentos de actina (Carlier and Pantaloni, 1989). Al respecto, se ha establecido que el desensamblaje de filamentos de actina-ADP es rápido en relación al desensamblaje de filamentos de actina-ATP, pero es mucho más lento que el desensamblaje de tubulina-GDP desde el microtúbulo formado. Por ello se cree que los filamentos de actina presentan poca inestabilidad dinámica como la descrita para microtúbulos (Mitchison, 1992). La G-actina intracelular puede estar distribuida heterogéneamente, dado que existen evidencias de una aparente compartimentación de G-actina en las células de *Listeria*. Se cree que los mecanismos de regulación de esta dinámica, podrían involucrar la participación de proteínas de unión a actina (ABP) como la profilina además de otros elementos regulatorios (Mitchison, 1992).

1.8. PROTEINAS QUE UNEN ACTINA (ABP). El estudio de los niveles intracelulares de G-actina ha sido clave para comprender la dinámica de los microfilamentos y su regulación *in vivo*. En estudios *in vitro* se ha determinado que cuando el nivel del monómero se reduce a  $0.1 \mu M$ , se detiene el ensamblaje de G-actina en filamentos de actina. En el citoplasma de células móviles existen niveles entre  $20-200 \mu M$  de G-actina dependiendo del tipo celular y del estado fisiológico (Korn, 1978; Heacock and Bamburgh, 1983). Se ha propuesto que proteínas reguladoras tales como profilina (Carlsson et al., 1977), tiona espermática (Tilney, 1976) y timosina (Safer et al., 1991) mantienen los niveles de G-actina elevados debido a que se unen a actina e impiden su incorporación a los filamentos. Los miembros de esta clase de proteínas que unen actina serían los responsables de la regulación de las funciones de los

microfilamentos, situación análoga al papel que juegan las MAPs en los microtúbulos.

Se ha determinado que el estado físico de la actina (G o F-actina) en las células está regulado por proteínas que unen actina en forma reversible. Existen al menos tres sistemas aparentes de regulación del estado físico de la actina en células eucarióticas:

(a) La G-actina se ensambla formando F-actina, y de acuerdo con este equilibrio F-actina formada se puede desensamblar para formar los monómeros de actina. Este ciclo está regulado por al menos seis clases de proteínas: (1) profilina que secuestra monómeros de actina ; (2) villina que controla la nucleación de los filamentos de actina; (3) fragmina que bloquea los extremos de estos filamentos; (4)  $\beta$ -actinina que bloquea el extremo del filamento; (5) gelsolina y (6) depactina que corta los microfilamentos.

(b) Los filamentos de actina pueden entrecruzarse para formar manojos y retículos de mayor complejidad. Este proceso está controlado por una serie de proteínas que se indican más abajo. Estas estructuras de mayor complejidad, dan fuerza tensional a los filopodios y lamelipodios ubicados en el frente celular y contribuyen a la estructura de la superficie celular. Este ciclo es regulado por al menos cuatro clases de proteínas entrecruzadoras de actina: (1) villina que organiza los filamentos en manojos fuertemente unidos ; (2)  $\alpha$ -actinina que organiza los filamentos en manojos sueltos; (3) proteínas que organizan los filamentos en retículos ortogonales; y (4) espectrina que entrecruza los oligómeros del microfilamento.

(c) Las estructuras de actina están reversiblemente ancladas a la membrana. Este ciclo es facilitado por proteínas que unen actina, entre las que incluyen la proteína MARCKS (sustrato de la proteína quinasa-C) y profilina (Aderem, 1992). De gran interés en este punto, ha sido la posibilidad de asociar grandes sistemas de transducción de señales extracelulares con cambios en la estructura del citoesqueleto de actina. MARCKS es una proteína filamentosa que permite entrecruzar filamentos de actina en manojos y que actúa como un integrador de las señales de la proteína quinasa-C y la

kinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina en la regulación de las interacciones actina-membrana plasmática. Profilina, por su parte, es activada por la acción coordinada de un receptor tirosina kinasa y fosfolipasa C, estimulando así la estabilización de los filamentos de actina (Aderem, 1992).

1.9. INTERACCION ENTRE MICROTUBULOS Y FILAMENTOS DE ACTINA: Diferentes estudios tanto a nivel estructural como morfológicos de la organización citoplasmática indican que los diferentes componentes del citoesqueleto interactúan de manera conjunta (Ellisman and Porter, 1980; Schliwa, 1985; Danowski, 1989). Una serie de evidencias utilizando estudios de viscosimetría, fotoblanqueado, co-sedimentación y microscopía electrónica sugieren que las uniones entre filamentos de actina y microtúbulos están mediadas por las MAPs (rev. Bershadsky and Vasiliev, 1988; Sattilaro, 1986). Al menos tres MAPs estarían involucradas en unir directamente la molécula de actina: MAP-1, de acuerdo a los estudios en células en cultivo (Asai et al., 1985); MAP-2 (Griffith and Pollard, 1978; Sattilaro et al., 1981) y la proteína Tau (Cross et al., 1993) de acuerdo a evidencias *in vitro* o *in vivo*. Se ha descrito también que MAP-2 y la proteína Tau podrían organizar los filamentos de actina en manojos *in vitro* (Griffith and Pollard, 1982), siendo esta actividad sensible al estado de fosforilación de las MAPs (Nishida et al., 1981; Selden and Pollard, 1983; 1986). Por otra parte se ha planteado también que los microtúbulos afectarían notablemente la organización del citoesqueleto de actina (Danowski, 1989) y de filamentos intermedios (Blöse et al., 1984). Se ha determinado la presencia de dos sitios de unión de actina en MAP-2 (Pollard et al., 1984). En otra línea experimental, Sattilaro (1986) demostró que actina se puede unir a un fragmento de MAP-2 que contenía el dominio de unión a tubulina. Estudios recientes sugieren fuertemente que los dominios que están involucrados en las conexiones moleculares entre MAPs y microfilamentos serían los dominios de MAPs de unión a tubulina (Cross et al., 1993). Se ha mostrado la interacción directa entre el péptido KVTSKCGSLGNIHHKPGGG correspondiente a la segunda

secuencia repetida de Tau con actina *in vitro*. Por lo tanto, péptidos de Tau no solo reconocen tubulina, sino también actina *in vitro* (Correas et al., 1990). Evidencias directas sobre el papel *in vivo* de Tau como proteína mediadora de las interacciones entre microtúbulos y filamentos de actina se han obtenido a través de estudios realizados en una amplia variedad de células en cultivo (Cross et al., 1993; Maccioni et al., 1992).

1.10. OBJETIVOS DE LA TESIS E HIPOTESIS DE TRABAJO: El objetivo de esta tesis ha sido el estudio en profundidad de los dominios repetidos de MAPs en relación a la organización y ensamblaje de microtúbulos y la dinámica del proceso de supra-ensamblaje de filamentos de actina. Para estos estudios se utilizaron dos nuevas drogas inhibitoras de microtúbulos EM y EMP las cuales actúan a nivel de las MAPs. Dentro del contexto de estos objetivos, se realizaron también estudios a nivel molecular de la interacción MAPs-tubulina y MAPs-actina utilizando sistemas reconstituidos con proteínas completas y péptidos sintéticos con las secuencias de los dominios reguladores en las MAPs.

La hipótesis planteada al comienzo de esta investigación (Proyecto de Tesis) postulaba que EMP se uniría a los dominios de MAPs responsables de sus interacciones con los sitios reguladores a nivel de la región C-terminal de tubulina. Postulamos que esta unión estaría mediada por interacciones preferentemente electrostáticas entre EMP y dominios catiónicos en las secuencias repetidas de MAP-2 y Tau. En relación a la interacción entre MAPs y actina, postulamos que secuencias repetidas de MAPs interactuarían con actina afectando así la organización y la capacidad de ensamblaje de los microfilamentos.



## 2. MATERIALES Y METODOS

2.1. **MATERIALES:** Los cerebros de bovino para la purificación de MAPs y de tubulina fueron obtenidos de animales recién sacrificados. Actina se preparó a partir de músculo esquelético pectoral de pollo obtenido de animales sacrificados en el laboratorio. Los reactivos químicos sacarosa, dimetilsulfóxido, GTP tipo II-S, ATP tipo II, EGTA, EDTA, Mes, Tris, Imidazol,  $MgCl_2$ ,  $NaHCO_3$ , inhibidores de proteasas: PMSF, aprotinina, inhibidor del poroto de soya, fueron obtenidos en SIGMA Chemical Co. KCl, acetona, metanol, etanol, HCl, NaOH fueron de MERCK. Acetato de uranilo, parlodión y las grillas para microscopía electrónica fueron obtenidas de Ted Pella Inc. Las placas para ELISA fueron obtenidas en Nunc. Las resinas Sephacryl S-200 y S-300 fueron obtenidos de Pharmacia. Bio-gel P-6 fue obtenida en Bio-Rad. Fosfocelulosa fue obtenida en Whatman. Las drogas Estramustina (EM), (estradiol-3-(-N,N-bis-(2-chloroethyl carbamato))), su derivado fosforilado Estramustina-fosfato (EMP) y sus derivados radioactivos (2,4,6,7)-tritiados fueron proporcionados generosamente por Kabi Pharmacia AB (Sweden). El anticuerpo policlonal contra el péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> utilizado en estos estudios, que reconoce específicamente proteína Tau a nivel de sus secuencias repetidas, fue preparado en el laboratorio según se ha descrito anteriormente (Rivas-Berríos et al., 1990; Cross et al., 1993). Otro anticuerpo policlonal anti-Tau no dirigido contra las secuencias de Tau de unión a tubulina fue obtenido de SIGMA Chemical Co. Todos los reactivos utilizados fueron de la más alta pureza analítica.

### 2.2. Purificación de proteínas microtubulares

2.2.1. **PROTEINA MICROTUBULAR:** Se preparó proteína microtubular (MTP) a partir de extractos de cerebros de bovino, por medio de ciclos de polimerización-despolimerización según el

método de Shelanski et al. (1973), con algunas modificaciones (Maccioni et al., 1981). Brevemente, cerebros de bovino adultos, se limpiaron de meninges, vasos sanguíneos y sangre superficial. Luego fueron pesados y homogenizados a 4°C con la mitad de volumen respecto a su peso, de una solución de MES 0,1 M (pH 6,8), glicerol 1 M e inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/mL, PMSF 0,2 mM, inhibidor del poroto de soya 5 µg/mL) preenfriada a 4°C. Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 20.000xg por 60 min a 4°C para eliminar restos celulares y extracelulares insolubles. El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación, se ajustó con GTP a una concentración final de 1 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y glicerol 2,5 M, y se incubó por 30 min a 37°C, para inducir la formación de microtúbulos. Los microtúbulos formados, se separaron de la fase acuosa por centrifugación a 45.000xg durante 60 min a 30°C. Las pellas de microtúbulos obtenidos se desensamblaron a 4°C con homogenización en dos volúmenes de amortiguador MES 0,1 M (pH 6,8), EGTA 0,5 mM, y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y el material no desensamblado fue descartado por centrifugación a 45.000xg durante 45 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue ajustado a concentraciones finales de GTP 1 mM y glicerol 4 M, y se realizó un nuevo ciclo de ensamblaje-desensamblaje. Para ello, el sistema fue incubado por 30 min a 37°C y los microtúbulos formados fueron sedimentados a 45.000xg por 45 min a 30°C. Las pellas de microtúbulos fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -70°C hasta su posterior uso. Las MTP así preparada contenían tubulina y alrededor de 12% de las proteínas asociadas a microtúbulos, esencialmente MAP-1, MAP-2 y Tau.

2.2.2. SEPARACION DE TUBULINA DE LAS MAPs: La tubulina se purificó a partir de MTP mediante cromatografía de intercambio catiónico en fosfocelulosa (tubulina-PC). Para ello, la proteína microtubular (MTP) se resuspendió en amortiguador PC: MES 20 mM (pH 6,8), EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, EDTA 0,1 mM y DTT 1 mM, y se aplicó a la columna de fosfocelulosa (1,5 x 10 cm), preequilibrada con el amortiguador PC. El eluido se colectó en fracciones de 1 mL, en cada una de las cuales la concentración de

proteínas fue determinada espectrofotométricamente (Hernández et al., 1986). La tubulina purificada (tubulina-PC) fue obtenida en el volumen vacío de la columna de fosfocelulosa, mientras que las MAPs quedaron retenidas en dicha columna debido a sus pI débilmente básicos. En todos los casos el grado de pureza (95-97%) de la tubulina-PC fue confirmado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970).

**2.2.3. PURIFICACION DE MAPs MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN FOSFOCELULOSA:** Se recuperaron las MAPs retenidas en la columna de fosfocelulosa después de una purificación de tubulina, tratando la columna de fosfocelulosa con NaCl 0,6 M . Las MAPs liberadas fueron dializadas contra Tris 2,5 mM, pH 7,5, concentradas por ultrafiltración en Amicon, alicuotadas y guardadas en nitrógeno líquido hasta su uso experimental.

**2.2.4. PURIFICACION DE TAU:** La proteína Tau fue purificada a partir de proteína microtubular, gracias a su termoestabilidad y solubilidad en ácido (Grundke-Iqbal et al., 1986). Las pellas de proteína microtubular obtenida en el segundo ciclo de ensamblaje-desensamblaje, fueron resuspendidas en tres volúmenes de amortiguador MES 0,1 M (pH 2,7) a 4°C e incubados a la misma temperatura por 15 min. La suspensión fue hervida por 5 min, con el propósito de desnaturar y precipitar la tubulina y otras proteínas contaminantes. Posteriormente la suspensión fue enfriada y centrifugada a 25.000xg por 20 min a 4°C. Se retiró la fracción sobrenadante que aun contenía MAP-2, Tau y otras proteínas termoestables menores. Con el objeto de separar la proteína Tau del resto de proteínas termoestables, a la solución sobrenadante se agregó ácido perclórico hasta alcanzar una concentración final de 2,5%, y se centrifugó a 25.000xg por 20 min a 4°C. La alta temperatura y el bajo pH, remueven por precipitación tubulina, MAPs de alto masa molecular y otros contaminantes proteicos, mientras que Tau permanece soluble (Grundke-Iqbal et al., 1986; Hirokawa et al., 1988). Finalmente se recuperó el sobrenadante de la precipitación con ácido perclórico, y se dializó contra

amortiguador Tris 2,5 mM (pH 7,6) a 4°C por 24 hrs. Transcurrido este tiempo, el dializado fue concentrado por ultrafiltración en Amicon, alicuotado y guardado congelado a -70°C. Tau se obtuvo con un 90-96% de pureza de acuerdo a determinaciones mediante electroforesis en el sistema PAGE-SDS.

**2.2.5. PURIFICACION DE MAP-2:** La proteína asociada a microtúbulos MAP-2, fue purificada de acuerdo con el método descrito por Vera et al. (1988a). Proteína microtubular proveniente del segundo ciclo de ensamblaje fue resuspendida en amortiguador MES 50 mM (pH 6,8), y hervida por 5 min, seguida por el fraccionamiento del sobrenadante con sulfato de amonio (50%) y posterior cromatografía en columna de Sefarosa CL- 4B (1,5 x 95 cm). Las proteínas fueron eluidas con amortiguador Mes 50 mM (pH 6,8) que contenía NaCl 0,5 M. MAP-2 se obtuvo con una pureza de alrededor de 90% de acuerdo a criterios de análisis electroforético.

**2.3. PURIFICACION DE ACTINA:** En resumen, actina fue purificada a partir de músculo estriado de pollo según el método descrito por Spudich and Watt (1971) con modificaciones según Pardee and Spudich (1982). G-actina fue guardada a 4°C en amortiguador Tri-HCl 2 mM (pH 8,0) que contenía ATP 0,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,2 mM, DTT 0,5 mM y azida de sodio 0,02 %. Los estudios con G-actina fueron realizados usualmente dentro de la semana siguiente a su purificación.

**2.4. DETERMINACION DE PROTEINAS:** La concentración de proteína microtubular y proteínas parcialmente purificadas fue cuantificada por el método turbidimétrico descrito por Vera et al. (1989). En algunos casos la concentración de proteína microtubular se determinó de acuerdo a Lowry et al. (1951) usando albúmina de suero de bovino como referencia. Las concentraciones de tubulina, MAP-2, Tau y actina purificadas fueron determinadas midiendo la absorbancia a 280 nm (o 290 nm para actina) y utilizando los coeficientes de absorción que se indican: tubulina  $E^{0.1\%}_{280nm}=1,15$  (Weisenberg, 1972); Tau  $E^{0.1\%}_{280nm}=0,28$  (Cleveland et al., 1977);

MAP-2  $E_{0.1\%}^{280\text{nm}}=0,32$  (Herzog and Weber, 1978) y actina  $E_{0.1\%}^{290\text{nm}}=0,65$  (Griffith and Pollard, 1978).

2.5. ELECTROFORESIS: Las proteínas purificadas, fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en placas (11x9x0,15 cm) en presencia de SDS, de acuerdo al método de Laemmli (1970). Luego de realizada la electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de azul brillante de Coomassie al 0,25%, disuelto en una mezcla de metanol 25% y ácido acético 10%. Finalmente los geles fueron desteñidos en una solución que contenía metanol 10% y ácido acético 10%.

2.6. PEPTIDOS SINTETICOS: El uso de péptidos sintéticos ha sido clave en el análisis de la estructura de dominios involucrados en las interacciones macromoleculares específicas entre la proteína Tau (o MAP-2) y la molécula de tubulina (Maccioni and Arechaga, 1987; Serrano et al., 1984a; Cross et al., 1991; Maccioni et al., 1989; Joly et al., 1989) (referencia Figura 1, Introducción). En esta tesis hemos utilizado péptidos sintéticos correspondientes a éstas secuencias repetidas de Tau para analizar los efectos de EMP en la interacción MAPs-tubulina, y a nivel del ensamblaje de los microtúbulos. Los péptidos derivados de la secuencia de la región conservada de Tau juvenil de mamíferos, V187-G204: VRSKIGSTENLKHQPGGG, V218 - G235: VTSKCGSLGNIHHKPGGG, V250 - G267: VQSKIGSLDNITHVPGGG; y el péptido de la subunidad  $\beta$ -(422-434): YQQYQDATADEQG de tubulina, fueron sintetizados para esta investigación con el sistema de fase sólida mediante un sintetizador automático tipo 430A, Applied Biosystems en el laboratorio de R. B. Maccioni en la Universidad de Colorado, USA en colaboración con J. Stewart (Stewart and Young, 1984) y purificados en un sistema de HPLC Waters de fase reversa en una columna C18 Novopack (Rivas-Berrios et al., 1990). Los péptidos purificados fueron sujetos a liofilización y guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Maccioni et al., 1989). El grado de pureza para todos los péptidos utilizados fue de un 99%. El péptido de bradicinina (RPPGFSPFR) fue donado por J. Stewart.

Una representación esquemática de la secuencia del segmento C-terminal  $\beta$ -II(422-434) de  $\beta$ -tubulina y las tres secuencias repetidas de la región C-terminal de la proteína Tau inmadura se muestra abajo:

Estructura primaria de los péptidos de tubulina y Tau utilizados en esta tesis.

- 
- a) Secuencia del subdominio  $\beta$ -II(422-434) de la región C-terminal de  $\beta$ - tubulina (segmento parcialmente invariante)

$\beta$ (422-434)                      YQQYQDATADEQG (pI=3,8)

- b)                      Secuencias repetidas de Tau

V187-G204:                      VRSKIGSTENLKHQPGGG (pI=10,5)

V218-G235:                      VTSKCGSLGNIHHKPGGG (pI=10,5)

V250-G267:                      VQSKIGSLDNITHVPGGG (pI=7,0)

---

La secuencia C-terminal de las isoformas de  $\beta$ -tubulina contiene un dominio importante de tubulina para la unión a MAP-2 y a la proteína Tau (Maccioni et al., 1988). Por otra parte, las tres secuencias repetidas de la proteína Tau, que también están presentes en MAP-2 (Kosik et al., 1989; Lewis et al., 1988; Maccioni et al., 1989) constituyen parte de sus dominios de unión al microtúbulo. Algunas isoformas de la proteína Tau de cerebro adulto, contienen además una cuarta secuencia repetida adicional (Joly et al., 1989; Kosik et al., 1989; Lewis et al., 1988).

## 2.7. Ensayos de ensamblaje

2.7.1. ENSAYO DE ENSAMBLAJE DE MICROTUBULOS: Los ensayos de ensamblaje de microtúbulos fueron realizados de acuerdo al siguiente protocolo: se incubó tubulina-PC (1,8 mg/mL concentración final) en Mes 100 mM pH 6,8,  $MgCl_2$  0,5 mM, EGTA 2 mM y GTP 1 mM (amortiguador PC) y en presencia de fracciones de proteína Tau o de péptidos de Tau hasta alcanzar concentraciones finales de Tau de 5,6  $\mu$ M. Las mezclas en un volumen final de 0,4 mL fueron incubadas por 30 min a 37°C para producir el ensamblaje de tubulina en microtúbulos. El nivel de ensamblaje de tubulina con los péptidos de Tau V187-G204 y V218-G235 se determinó por turbidimetría analizando el cambio de absorbancia a 350nm. En experimentos separados se ensayó el efecto de diferentes concentraciones de EMP preparada en el amortiguador PC sobre la cinética de ensamblaje de tubulina inducida con los péptidos de Tau. Otra serie experimental incluyó el análisis de diferentes concentraciones de EM preparada en DMSO sobre la cinética de ensamblaje de tubulina inducida por los péptidos de Tau. Se realizó un control con DMSO en ausencia de EM para evaluar el efecto específico de EM sobre la cinética de polimerización de tubulina-PC inducida por péptidos de Tau.

2.7.2. ENSAYO DE ENSAMBLAJE DE ACTINA: Los ensayos de ensamblaje de actina fueron realizados incubando G-actina purificada a concentraciones finales entre 0,18 y 0,4 mg/mL, en amortiguador de polimerización (amortiguador A) que contenía: Mes 100 mM pH 6,6, KCl 50 mM,  $MgCl_2$  2 mM y ATP 1 mM. Las mezclas en un volumen final de 0,2 mL, fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente en tubos de microcentrífuga y los productos de ensamblaje de actina fueron analizados por microscopía electrónica. Se realizó el estudio de la cinética de ensamblaje de G-actina en filamentos de actina midiendo el cambio de absorbancia a 232 nm, según lo descrito por Higashi et al. (1963). Para estudiar la formación de manojos de filamentos de actina se realizaron mediciones a 320 nm (Kotani et al., 1985). En experimentos separados se estudió el efecto de EM, EMP o de proteína Tau y

péptidos de Tau en las cantidades finales de 100  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ g/mL y 90  $\mu$ M, respectivamente, sobre la cinética de ensamblaje de actina midiendo los polímeros formados a 232 nm o sobre el aumento de turbidez midiendo a 320 nm. En algunos experimentos se realizó la co-incubación de péptidos de Tau con EM o EMP previo al ensayo de polimerización, para analizar una posible competencia entre péptidos de Tau y EMP por sitios comunes en actina.

2.8. CARBAMILACION DE PROTEINA TAU Y PEPTIDOS DE TAU: La proteína Tau purificada y el péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> fueron modificados químicamente con KCNO que reacciona con los  $\epsilon$ -amino libres de los residuos lisina (Mellado et al., 1982). Para la modificación del péptido de Tau, se incubaron 3 mg de péptido con KCNO 0,2 M en Mes 100 mM pH 6,6 por 1 hora a temperatura ambiente, seguido por cromatografía en Sephadex G-25 fino (20x1 cm) para separar el péptido del cianato libre. La fracción de elución para el péptido modificado en la columna de Sephadex G-25 fue estimada a partir de la elución de péptido de Tau carbamylado con K-<sup>14</sup>CNO, o sobre la base de determinaciones con fluorescamina (Moraga et al., 1992) usando péptido no modificado, considerando que el péptido modificado y el no modificado tienen el mismo volumen de elución. Como control en los distintos ensayos, 3 mg de péptido de Tau fueron incubados con KCl 0,2 M. La proteína Tau fue modificada con KCNO utilizando el mismo protocolo (Mellado et al., 1982). La reacción de carbamilación de péptidos de Tau fue corroborada midiendo la incorporación de K<sup>14</sup>CNO al péptido. 3 mg del péptido de Tau fueron tratados con K<sup>14</sup>CNO 50-200 mM (0,6  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol), incubados por 30 min a temperatura ambiente, y el producto de la reacción fue sujeto a cromatografía en Bio-Gel P-6 para separar el péptido modificado del cianato radioactivo libre. Del mismo modo se analizó la incorporación de K<sup>14</sup>CNO a Tau.



## 2.9. Estudios de unión con EM y EMP

2.9.1. METODO DE ULTRACENTRIFUGACION: La unión del péptido [ $^3\text{H}$ ]-acetilado correspondiente al segmento de tubulina  $\beta$ (422-434) a la proteína MAP-2 fue cuantificada en una ultracentrífuga Airfuge Beckman usando sacarosa para proveer una densidad estabilizante (Maccioni et al., 1985b). Los ensayos de unión contenían 1,8 mg/mL de MAP-2 purificada y las concentraciones deseadas de péptido de  $\beta$ -tubulina (422-434) mezclado con trazas del mismo péptido marcado radioactivamente (péptido [ $^3\text{H}$ ]-acetilado de  $\beta$ -tubulina (422-434). Este sistema fue centrifugado a 140.000xg durante 3 horas a temperatura ambiente. En estas condiciones no se detectó MAP-2 en una fracción (10  $\mu\text{L}$ ) removida del menisco superior de la columna de sedimentación y se estima que más del 99% de MAP-2 sedimentó. Se determinó también que aproximadamente un 3% del péptido sedimentaba bajo estas condiciones en ausencia de MAP-2. Este valor fue utilizado para corregir los valores del péptido sedimentado por su unión a MAP-2 (Maccioni et al., 1985b). Una serie experimental en presencia de 10  $\mu\text{M}$  EMP fue realizada en las mismas condiciones descritas arriba, para estudiar la inhibición de la unión del péptido  $\beta$ -(422-434) a MAP-2.

2.9.2. CROMATOGRAFIA EN GELES DE AGAROSA DE ZONA PEQUEÑA: Las condiciones experimentales utilizadas para cromatografía en geles de agarosa de zona pequeña fueron descritas por Maccioni et al. (1988). Una mezcla de MAP-2 purificada (1,8 mg/mL) y cantidades estequiométricas del péptido de tubulina [ $^3\text{H}$ ]-acetilado  $\beta$ -(422-434) (actividad específica=1200 cpm/nmol) en un volumen final de 0,42 mL fue incubada a 30°C por 16 min seguido de separación cromatográfica en columna de Sephacryl S-200 (1,0x28 cm) equilibrada en Mes 50 mM pH 6,8 y  $\text{MgCl}_2$  1 mM. El flujo de la columna fue mantenido a  $5,8 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \times \text{s}^{-1}$  y se colectaron fracciones de 0,4 mL. Una serie experimental en presencia de EMP 24  $\mu\text{M}$  fue realizada en las mismas condiciones descritas arriba, para estudiar la inhibición de la unión del péptido  $\beta$ -(422-434) a MAP-2 por la droga anti-MAPs.

2.10. UNION DIRECTA DE EMP A PEPTIDOS DE TAU: Los péptidos de Tau V187-G204, V218-G235 y V250-G267 fueron incubados por 10 min a temperatura ambiente con 10-20  $\mu$ M EMP en la presencia de la droga tritiada usada como trazador. La mezcla fue sujeta a cromatografía en columna de Biogel P-6 y se colectaron fracciones de 0,35 mL (Moraga et al., 1992). El perfil de elución del péptido fue analizado por el método de la fluorescamina, y la radioactividad asociada a EMP fue determinada por centelleo líquido. También se realizó el análisis de la interacción directa entre los péptidos de Tau y EM (10-20  $\mu$ M) bajo las mismas condiciones descritas para EMP.

2.11. ENSAYO DE COMPETENCIA EN ELISA: Las placas de ELISA fueron activadas, manteniéndolas toda la noche con 100  $\mu$ L/pocillo de una solución 3,7 mg/mL de proteína Tau en 50 mM de amortiguador carbonato pH 9,5. Los pocillos fueron lavados en PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) para retirar la proteína no adsorbida y se saturaron los sitios inespecíficos incubando la placa con la solución de bloqueo PBS-Tween 20 0,5% (v/v) con BSA al 2% (w/v) por al menos 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar el exceso de BSA se agregó el anticuerpo policlonal (diluído 1:500 en PBS). El anticuerpo policlonal contra el péptido de Tau V187-G204 que reconoce los "motivos" de unión a tubulina en Tau fue preincubado con las drogas EM o EMP en un intervalo de concentraciones entre 1 y 50  $\mu$ M. La mezcla de reacción en los pocillos fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente y la cantidad no retenida fue lavada con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v). Posteriormente se agregó un segundo anticuerpo IgG anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (100  $\mu$ L/pocillo de una dilución 1:1000) y se incubó por una hora adicional a temperatura ambiente. Se realizó el último lavado con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) y se reveló por 20 min con para-nitrofenilfosfato (1 mg/mL) disuelto en amortiguador carbonato 50 mM pH 9,6. La reacción se detuvo con NaOH 1 M (100  $\mu$ L/pocillo) y se midió la absorción a 405 nm en un lector de ELISA. El mismo experimento se realizó utilizando un anticuerpo comercial anti-Tau de SIGMA (diluído 1:500 en PBS) que no reconoce las secuencias

repetidas de Tau, para controlar la especificidad del anticuerpo sitio-dirigido contra el dominio V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> de Tau.

2.12. MICROSCOPIA ELECTRONICA: Fracciones de 20  $\mu$ L de las diferentes muestras de filamentos de actina resultantes de los ensayos de ensamblaje de actina fueron colocadas directamente sobre grillas recubiertas con carbón/ parlodión, el líquido remanente fue removido después de 1,5 min con papel filtro, y el material adsorbido a las grillas fue teñido por 1,5 min con una solución acuosa de acetato de uranilo al 1%. Las muestras de microtúbulos resultantes de los diferentes experimentos de ensamblaje fueron procesadas de la misma forma que las muestras de actina, con la excepción que las muestras de microtúbulos fueron previamente fijadas con una solución que contenía: glutaraldehído 1 %, amortiguador MES 50 mM (pH 6,8), EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, GTP 1 mM y glicerol 10 %, preincubada a 30°C. Las diferentes grillas fueron analizadas en un microscopio electrónico Philips 300 a 60kV o en un microscopio electrónico Jeol 100SX como se ha descrito previamente (Vera et al., 1988b).

### 3. RESULTADOS

#### 3.A. DOMINIOS FUNCIONALES EN LAS MAPs. ESTUDIOS CON INHIBIDORES DE LA ACCION DE MAPs.

3.A.1. EMP INHIBE LA UNION DE PEPTIDOS DE TUBULINA A MAP-2. ANALISIS POR ULTRAFILTRACION EN LA AIRFUGE: Se realizó el estudio de unión del péptido  $\beta$ -II(422-434) de tubulina a MAP-2 utilizando ultracentrifugación en la Airfuge basado en una adaptación del método de Howlet et al. (1978) como se ha descrito previamente (Maccioni et al., 1985a). Para ello se utilizaron diferentes concentraciones del péptido  $\beta$ -II(422-434) de tubulina mezclado con una fracción del mismo péptido [ $^3$ -H]- $\beta$ -II(422-434) acetilado como trazador radioactivo y cantidades fijas (1,8 mg/mL) de MAP-2 (Maccioni et al., 1988). Posteriormente se realizaron los experimentos de unión del péptido de tubulina a MAP-2, pero en presencia de cantidades fijas (10  $\mu$ M) de EMP (Figura 3). Se analizó, mediante centelleo en muestras líquidas, la radioactividad asociada al péptido unido a la MAP-2 que sedimentaba en la Airfuge en las diferentes mezclas realizadas, y sobre la base de estas determinaciones (ver Métodos y ref. Maccioni et al., 1985a) se calculó  $v$  ( $v$ , moles de péptido de tubulina unida por mol de MAP-2). El gráfico de dobles. recíprocos de la unión a MAP-2 en función de la concentración efectiva del constituyente, péptido de tubulina, muestra que el aumento en la concentración del péptido [ $C_{\beta}(422-434)$ ] se correlacionaba linealmente con un aumento en su unión a MAP-2 (Figura 3). El cálculo de la concentración constituyente del péptido se realizó según se indica en Maccioni et al. (1985a). Se muestra que a la misma concentración del péptido de tubulina, su unión a MAP-2 disminuía en presencia de EMP, indicando una inhibición competitiva de la droga en la interacción entre el péptido [ $^3$ -H]-acetilado  $\beta$ -II(422-434) de tubulina con MAP-2. El valor de  $v$

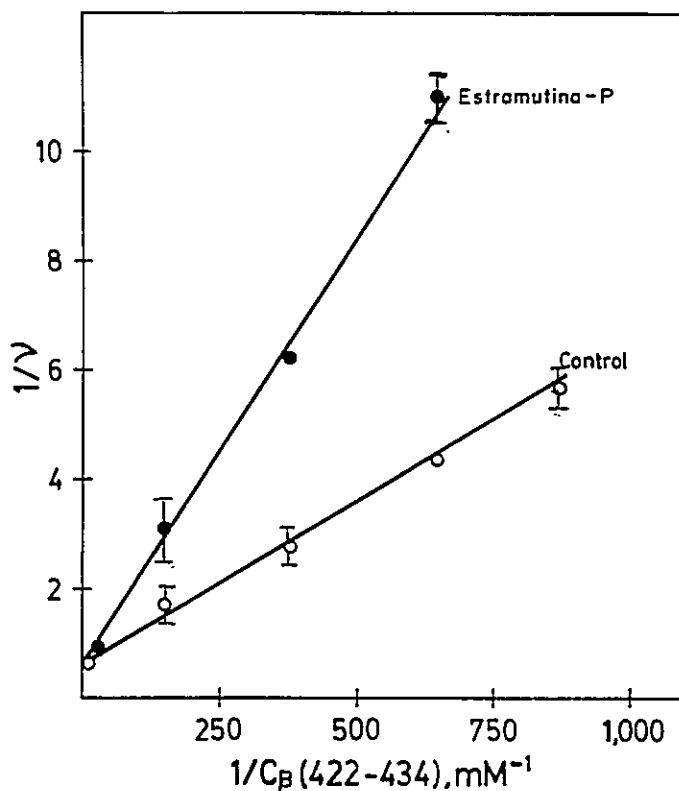


Figura 3. EMP inhibe la unión del péptido C-terminal de tubulina  $[^3\text{H}]\text{-}\beta\text{II-(422-434)}$  a MAP-2. El análisis de unión fue realizado con MAP-2 purificada de cerebro de bovino a una concentración final de 1,8 mg/mL y concentraciones variables del péptido C-terminal de tubulina  $[^3\text{H}]\text{-}\beta\text{II-(422-434)}$ , usando el método de ultracentrifugación en Airfuge como se describe en Maccioni et al. (1985). En el gráfico de dobles recíprocos se muestran las mediciones de unión en la ausencia (círculos vacíos) o en la presencia (círculos llenos) de 10  $\mu\text{M}$  EMP.  $v$  representa el número de moles del péptido C-terminal de tubulina  $[^3\text{H}]\text{-}\beta\text{II-(422-434)}$  unidos por mol de MAP-2.  $C_{\beta(422-434)}$  corresponde a la concentración del péptido de tubulina. Las barras indican desviación estándar de tres determinaciones independientes.

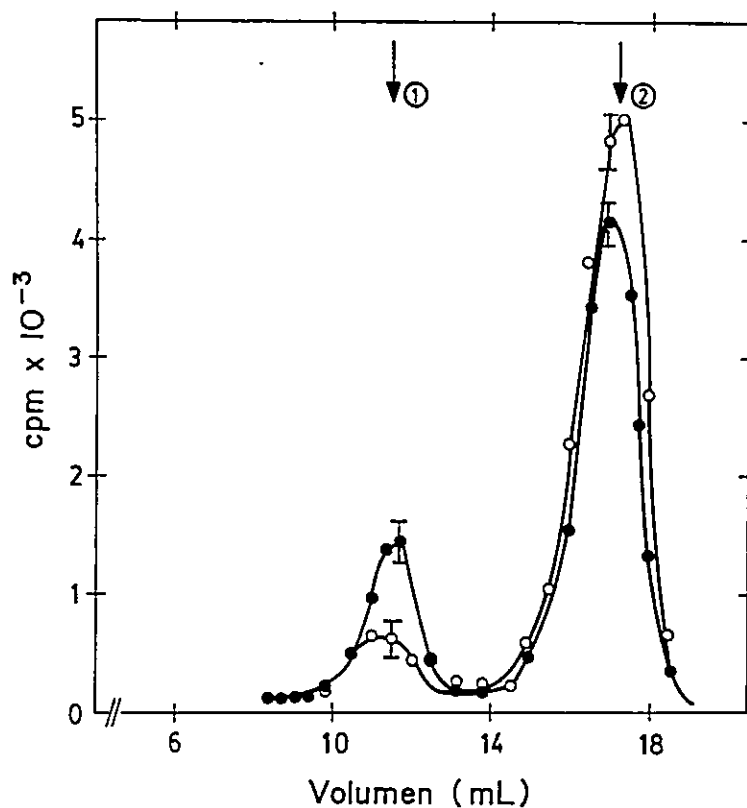


Figura 4. Análisis de la unión del péptido C-terminal de tubulina [<sup>3</sup>H]-βII-(422-434) a MAP-2 por cromatografía de zona pequeña. El análisis de unión fue realizado con MAP-2 purificada de cerebro de bovino a una concentración final de 1.8 mg/mL y cantidades estequiométricas del péptido C-terminal de tubulina [<sup>3</sup>H]-βII-(422-434) en un volumen final de 0,42 mL. La mezcla fue preincubada a 30°C y eluida en una columna de Sephacryl S-200 (Maccioni et al., 1988) en ausencia (círculos llenos) o en presencia (círculos vacíos) de 24 μM EMP. Se colectaron fracciones de 0,4 mL y la radioactividad fue medida en un contador de centelleo. Este experimento fue repetido tres veces con la desviación estándar que se indica. Las flechas indican la elución correspondiente al volumen vacío de la columna cromatográfica (1) y al volumen interno (2).

en el intercepto de la curva, que indica las moléculas del  $\beta$ -péptido que interactúan con MAP-2, está de acuerdo con datos previos sobre la interacción de péptidos de tubulina a MAPs (Maccioni et al., 1988)

**3.A.2. ANALISIS DEL EFECTO INHIBIDOR DE EMP SOBRE LA UNION DEL PEPTIDO [ $^3$ H]- $\beta$ (422-434) DE TUBULINA A MAP-2 MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA ZONAL:** La interacción entre péptidos de tubulina y MAP-2 fue también analizada por cromatografía de zona pequeña en resinas de Sephacryl S-200 (Cann et al., 1988). Los perfiles bimodales de elución mostraron la formación de complejos entre MAP-2 y el péptido [ $^3$ -H]-acetilado  $\beta$ -II(422-434) de tubulina, lo cual confirmó los resultados obtenidos con la ultracentrífuga. Cuando se realizó el experimento con 10  $\mu$ M EMP se observó una disminución significativa en el primer pico de elución correspondiente al complejo entre MAP-2 y el péptido [ $^3$ H]-acetilado  $\beta$ -II(422-434) de tubulina, y un aumento en el pico radioactivo del péptido libre en relación al control desarrollado en ausencia de la droga (Figura 4). Como un control adicional, no se observó radioactividad en el volumen de elución de MAP-2 cuando el péptido radioactivo fue sometido a cromatografía en ausencia de MAP-2. Por otra parte, no hubo formación de complejos detectable entre péptido radioactivo de tubulina y proteínas no-microtubulares tales como miosina y seroalbúmina de bovino (BSA) (datos no mostrados) lo que apoya también la especificidad de la unión del péptido a MAP-2 (Maccioni et al., 1988).

**3.A.3. EMP INHIBE EL ENSAMBLAJE DE TUBULINA INDUCIDO POR PEPTIDOS DE TAU:** Se ha demostrado que péptidos sintéticos de 18 residuos de aminoácidos, que contienen la secuencia de MAP-2 y Tau para la unión de tubulina, inducen el ensamblaje de tubulina en microtúbulos de una manera reversible (Farías et al., 1992; Ennulat et al., 1989). Este ensamblaje está mediado por las interacciones directas entre los péptidos sintéticos de MAPs con dominios específicos C-terminales de tubulina (Cross et al., 1991; Maccioni et

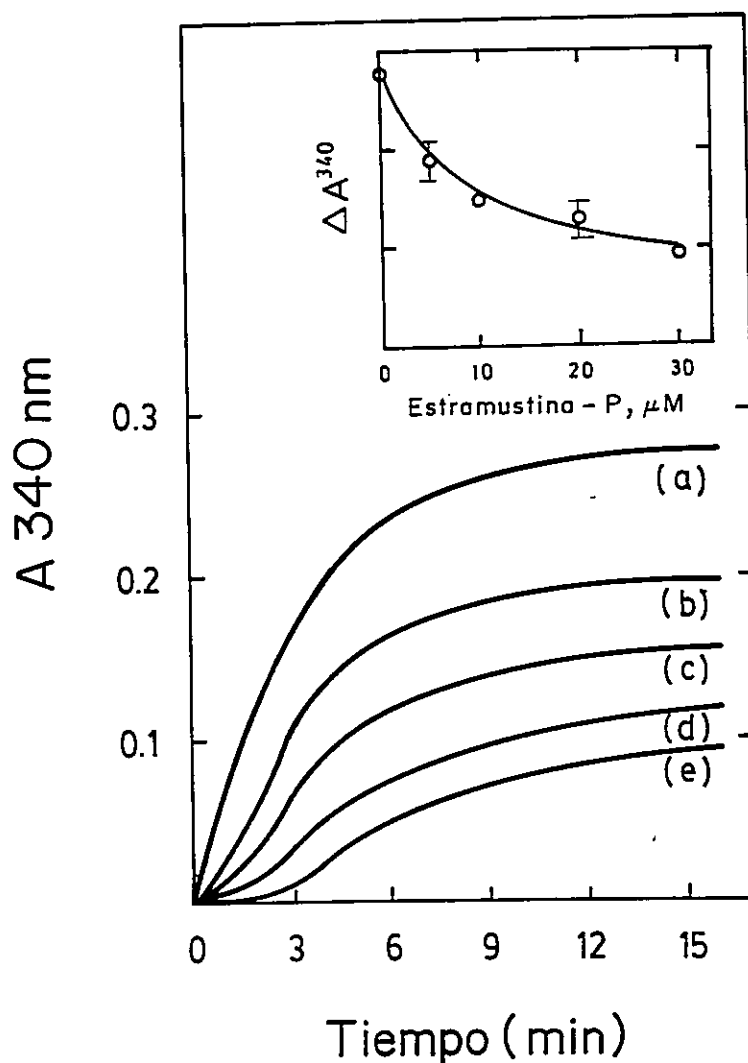


Figura 5. Inhibición por concentraciones crecientes de EMP del ensamblaje de tubulina inducido por péptido de Tau V187-G204. Tubulina (1,8 mg/mL) purificada de cerebro de bovino fue inducida a ensamblar con péptido de Tau V187-G204 a una concentración de 0,16 mM, en la ausencia (a), o en la presencia de 5  $\mu$ M (b), 10  $\mu$ M (c), 20  $\mu$ M (d), y 30  $\mu$ M (e) de EMP. El inserto muestra un gráfico del nivel máximo de polimerización ( $\Delta A_{340}$ ) en función de la concentración de EMP, inhibidor de microtúbulos a nivel de MAPs. Las barras indican la desviación estándar de tres determinaciones independientes realizadas a las concentraciones de EMP indicadas.



al., 1989). Así, para obtener mayor información sobre la acción de EMP a nivel de sitios en los "motivos" de unión en Tau y MAP-2, se estudió el efecto de EMP en el ensamblaje de tubulina inducido por los péptidos V187-G204 y V218-G235. La Figura 5 muestra la cinética de ensamblaje de tubulina inducida por el primer péptido de Tau, y la inhibición ejercida por concentraciones crecientes de EMP. Como una observación de interés, las dos primeras secuencias repetidas de Tau fueron capaces de inducir el ensamblaje de tubulina con una dependencia líneal de la concentración, y aun al ser utilizadas en razones molares péptido/tubulina de 12:1 (mol/mol) (Maccioni et al., 1989). Las concentraciones de péptidos usadas estaban dentro de la linealidad. La droga disminuye la velocidad de ensamblaje de tubulina inducida por el péptido, y fundamentalmente el nivel de ensamblaje máximo de tubulina como se muestra en el inserto de la Figura 5. Un aumento en la concentración de la droga EMP resultó en una gradual inhibición del nivel de ensamblaje alcanzado en el plateau. Se obtuvo una inhibición de cerca del 50% en el ensamblaje de tubulina dependiente del péptido a una concentración de EMP de 10  $\mu$ M. Llama la atención la baja concentración de la droga capaz de reducir a la mitad la unión del péptido regulatorio  $\beta$ -II(422-434) de tubulina a MAP-2 (Figura 5). Sin embargo, se ha descrito que en determinadas condiciones se requieren concentraciones más altas de EMP para inhibir el ensamblaje de proteína microtubular obtenida a partir de ciclos de ensamblaje y desensamblaje (Fridén et al., 1987). Como controles fueron utilizadas moléculas que no contienen el núcleo estradiol, derivadas del ester fosfato, similar a p-nitrofenilfosfato, las cuales no lograron bloquear la inducción del ensamblaje de tubulina por parte de los péptidos de Tau como lo hacía EMP (datos no mostrados), apoyando la especificidad de la interacción. Sin embargo, otros derivados de estradiol tales como Estramustina sulfato actuaron en forma similar a EMP como inhibidores del sistema microtubular vía interacción con MAPs (Fridén et al., 1991).

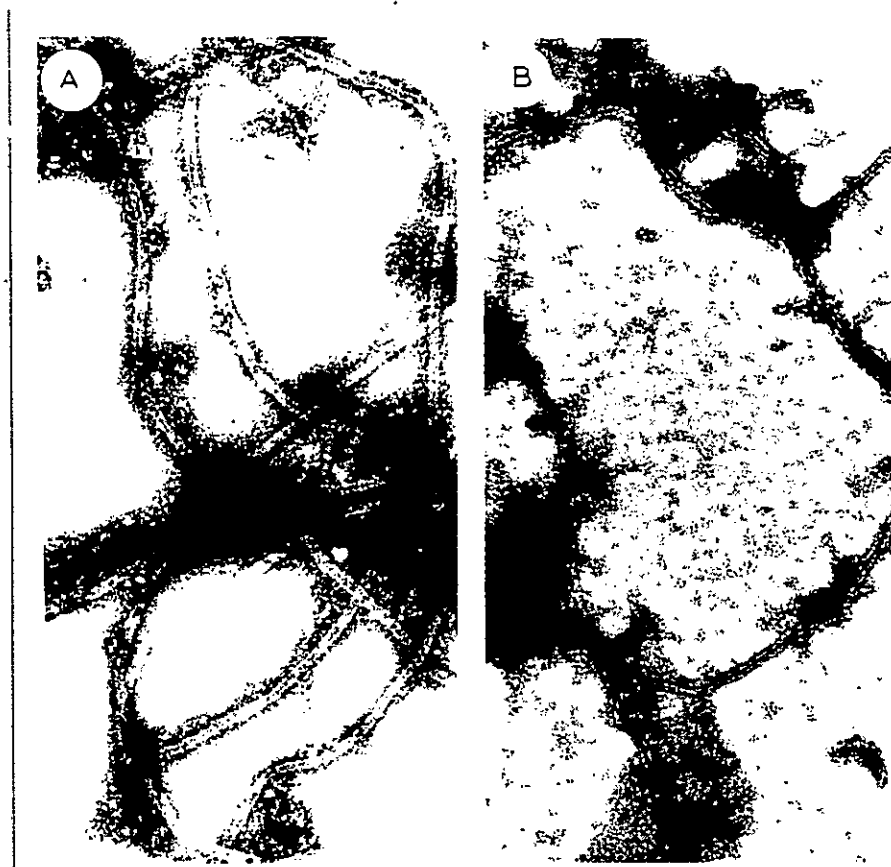


Figura 6. Microscopía electrónica de los polímeros de tubulina obtenidos en presencia de EMP. (A) Control, polímeros resultantes del ensamblaje de tubulina (1,8 mg/mL) inducido por péptido de Tau  $\nu^{187-G204}$  (0,16 mM). (B) Microfotografía al microscopio electrónico de polímeros inducidos por péptidos de Tau  $\nu^{187-G204}$  (0,16 mM) en la presencia de 15  $\mu$ M EMP. 30.000X.

**3.A.4. EMP ALTERA LA ESTRUCTURA DE POLIMEROS DE TUBULINA INDUCIDOS POR PEPTIDOS DE TAU:** La estructura de los polímeros fue analizada por microscopía electrónica, encontrándose que estructuras filamentosas y material amorfo fueron los mayores productos del ensamblaje en presencia de EMP (Figura 6B) en comparación con controles de microtúbulos normales obtenidos en ausencia de la droga (Figura 6A). Se encontró una inhibición similar por EMP cuando se realizó la inducción del ensamblaje de tubulina con el segundo péptido de Tau V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> (datos no mostrados).

**3.A.5. EMP SE UNE DIRECTAMENTE A PEPTIDOS DE TAU:** La unión directa de EMP a los péptidos de Tau fue analizada para aportar un mayor conocimiento de los mecanismos por los cuales EMP inhibe las interacciones MAP-tubulina. En esta serie experimental la droga tritiada fue preincubada con el péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> y esta mezcla fue sometida a cromatografía de filtración zonal en resina de Biogel P-6. Una fracción de EMP unida co-eluye formando complejo con el péptido de Tau, en el volumen de elución correspondiente al péptido, mientras que una fracción mayor de la droga no unida eluyó en el volumen total de la columna (Figura 7A) Estos resultados sugieren la formación de un complejo entre EMP y la primera secuencia repetida de Tau. En las mediciones de la elución del péptido, también se observó un pico adicional del péptido que eluyó en el volumen vacío de la columna como resultado de la preincubación con la droga. Este pico no se observaba cuando se cromatografiaba el péptido solo. Las fracciones del pico radioactivo que se inducía en presencia de EMP contenían formas agregadas del péptido de Tau, posiblemente oligómeros de mayor masa molecular que el péptido libre. Una fracción de droga marcada co-eluía con el componente aparentemente agregado de péptido de Tau (Figura 7A). (Moraga et al., 1992). Después de la cromatografía del segundo péptido de Tau V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> incubado con EMP tritiada se obtuvo un patrón similar de elución (Figura 7B). Los estudios con el tercer péptido de Tau V<sup>250</sup>-G<sup>267</sup> no mostraron interacción de EMP con este péptido. El tercer péptido de Tau tiene

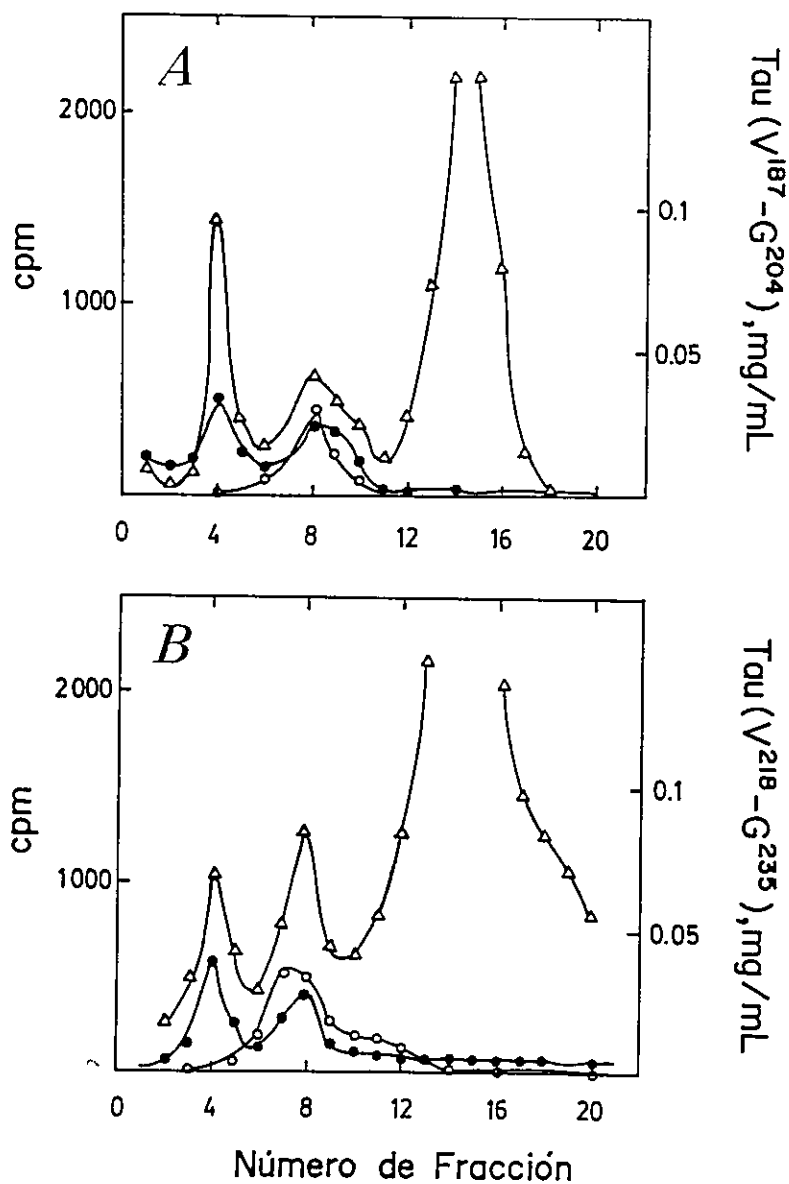


Figura 7. Interacción de  $[^3\text{H}]\text{-EMP}$  con péptidos de Tau V187-G204 (A) y V218-G235 (B) analizada por cromatografía de zona pequeña en Biogel P-6. Los triángulos vacíos en A y B muestran los perfiles de radioactividad de  $[^3\text{H}]\text{-EMP}$  después de la cromatografía en la presencia de ambos péptidos de Tau. Los círculos llenos en A y B representan los patrones de elución de los respectivos péptidos eluidos en la presencia de 20  $\mu\text{M}$  de EMP marcada como se indica arriba, pero analizados por el método de la fluorescamina. Por otro lado, los círculos vacíos en A y B representan los controles de los perfiles de elución de los respectivos péptidos analizados por fluorescamina. Los ensayos de unión fueron repetidos tres veces con resultados equivalentes. Otros detalles se describen en los Materiales y Métodos.

un pobre efecto en la inducción del ensamblaje de tubulina (Fariás et al., 1992; Ennulat et al., 1989).

**3.A.6. EM NO SE UNE DIRECTAMENTE A PEPTIDOS DE TAU:** Se probó la capacidad de EM tritiada, el derivado original no fosforilado, de unir directamente péptidos de Tau utilizando el mismo diseño experimental anterior. Se preincubó el péptido de Tau V187-G204 con la droga marcada seguido posteriormente por una cromatografía en Biogel P-6. No se detectó formación de complejo entre el péptido de Tau y EM ni la formación de agregados del péptido de Tau (Figura 8). Este resultado indicó que EM no se une directamente al péptido de Tau.

**3.A.7. EM NO INHIBE LA INDUCCION DE ENSAMBLAJE DE TUBULINA POR PEPTIDOS DE TAU:** Cuando se ensayó el efecto de EM sobre la inducción del ensamblaje de tubulina por péptidos de Tau, se encontró que EM no lograba inhibir la formación de microtúbulos. En la Figura 9A se muestra la inducción de ensamblaje de tubulina por el péptido de Tau V187-G204, tanto en la presencia como en la ausencia de 10  $\mu$ M EM, siendo ambas cinéticas de ensamblaje idénticas lo cual indica la ausencia de un efecto inhibitor. La droga EM no afectó la concentración crítica para el ensamblaje (Figura 9B). La extrapolación a las coordenadas del polímero en el gráfico de la Figura 9B indica que no ocurrieron cambios en la concentración crítica para el ensamblaje de tubulina inducido por péptido de Tau en la presencia de EM.

**3.A.8. UNION DE EMP Y DE ANTICUERPO ESPECIFICO CONTRA EL PEPTIDO DE TAU, A SITIOS COMUNES EN LA PROTEINA TAU:** Si EMP se une a la secuencia repetitiva en Tau, la cual es reconocida por anticuerpos sitio-dirigidos, se esperaría que hubiese competencia entre la droga y el anticuerpo contra este dominio. Para ello se ensayó el reconocimiento de un anticuerpo policlonal preparado contra el péptido V187-G204 de Tau por la proteína Tau en microplacas de ELISA en presencia y ausencia de diferentes

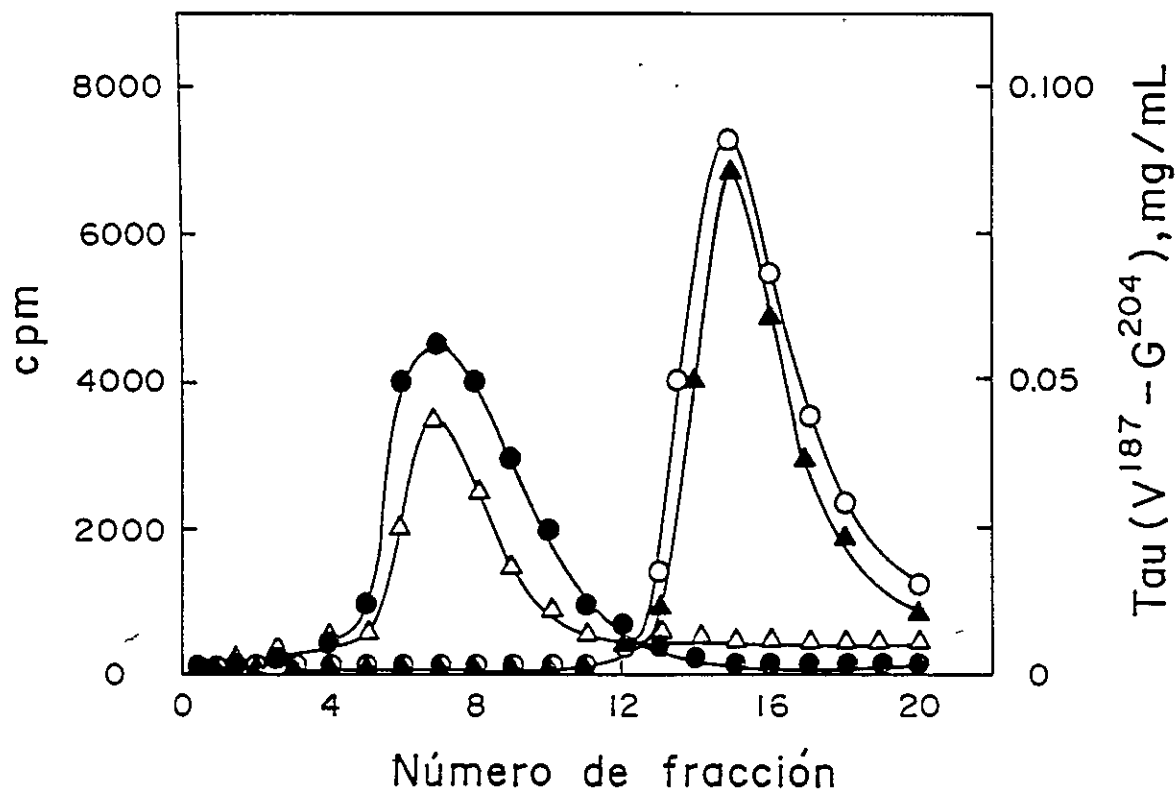


Figura 8. [<sup>3</sup>H]-EM no interactúa con péptido de Tau V187-G204, según análisis por cromatografía de zona pequeña en Biogel P-6. Los triángulos vacíos muestran los perfiles de Tau V187-G204 medidos por el método de la fluorescamina. Los círculos llenos representan los patrones de elución del péptido de Tau (V187-G204), medida por el método de la fluorescamina, en la presencia de 20 μM de EM. Por otro lado, los círculos vacíos representan la elución de estramustina radioactiva en presencia del péptido, medido por radioactividad de la droga. Los triángulos llenos muestran el control de EM radioactiva en ausencia del péptido de tau. Los ensayos de unión fueron repetidos tres veces con resultados idénticos. Otros detalles se describen en los Materiales y Métodos.

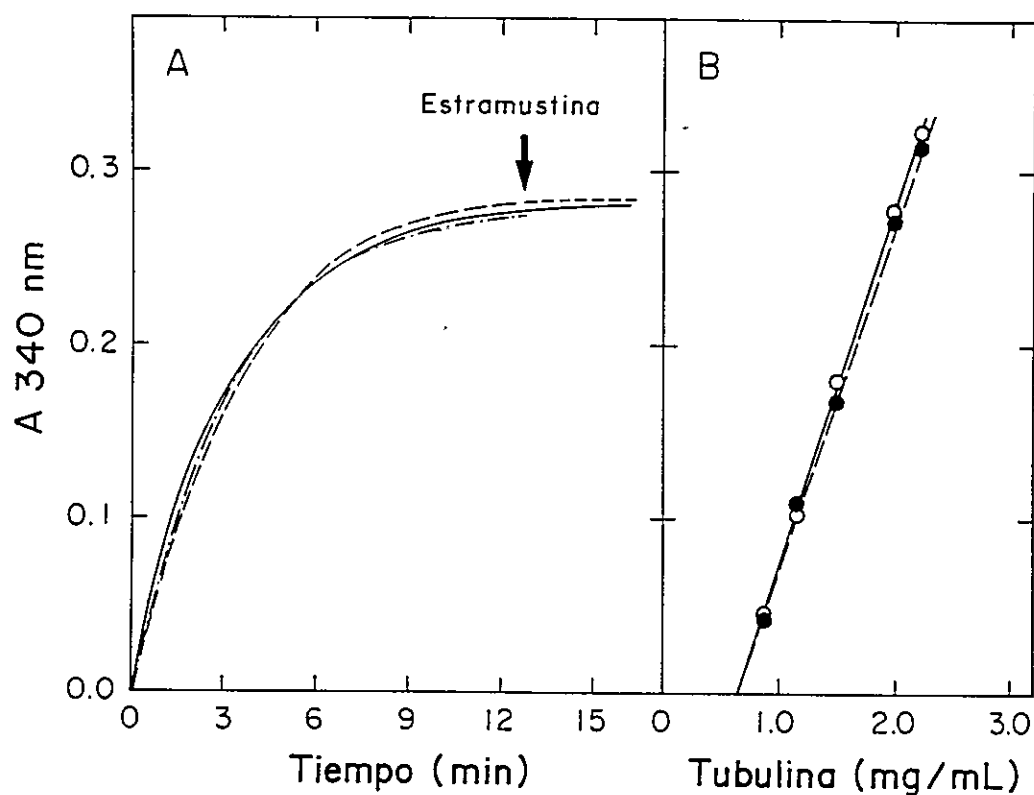


Figura 9. Efecto de EM en el ensamblaje de tubulina inducido por péptidos de Tau V187-G204. (A) Tubulina (1,8 mg/mL) fue inducida a ensamblar en presencia de 0,16 mM de péptido de Tau V187-G204 en la ausencia (línea continua), después de la adición de 10  $\mu$ M de EM (línea de trazos) o de 25  $\mu$ M EM (línea de puntos y trazos) a tiempo cero, y el aumento de turbidez fue registrado a 340 nm. Por otro lado, en muestras control se agregó 25  $\mu$ M EM en el plateau (después de 12 min de iniciado el ensayo de ensamblaje) y se registró el cambio turbidimétrico en función del tiempo. (B) Gráfico del grado máximo de ensamblaje de microtúbulos inducido por péptido de Tau V187-G204 en función de la concentración de tubulina. La línea continua representa la curva control obtenida después del ensamblaje en ausencia de EM. La línea de trazos representa la curva obtenida en presencia de 25  $\mu$ M EM. Las distintas curvas de ensamblaje fueron repetidas dos veces con idénticos resultados. Otros detalles se indican en Materiales y Métodos.

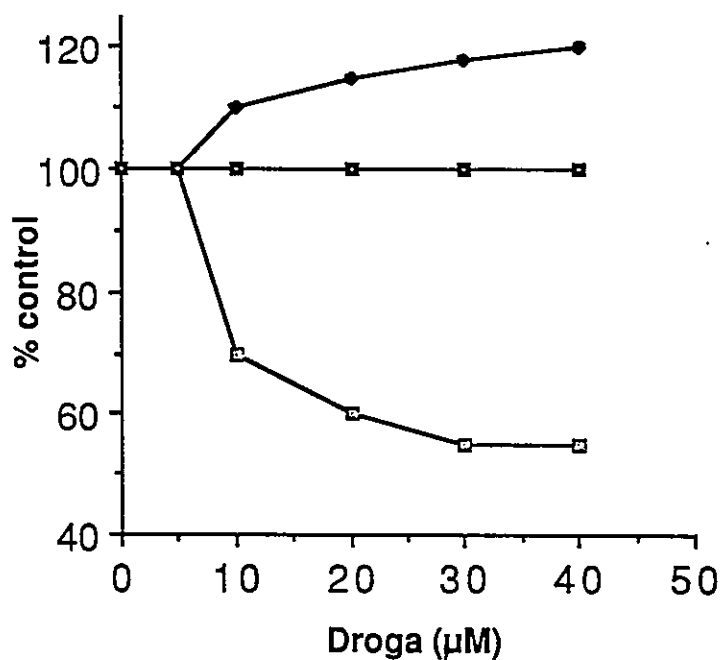


Figura 10. Efecto de EM y EMP sobre la interacción específica de la proteína Tau y anticuerpo anti-Tau sitio-dirigido. Proteína Tau purificada de cerebro de bovino fue adsorbida en microplacas para el ensayo de ELISA como se describe en Métodos. Se muestran los efectos de la preincubación del anticuerpo anti-Tau sitio-dirigido (preparado contra el péptido de Tau V187-G204) con EMP (cuadrados vacíos) o con EM (círculos llenos) en el intervalo de concentraciones indicado sobre la absorbancia a 405 nm. Los cuadrados llenos muestran los efectos de la preincubación de anticuerpo anti-Tau comercial (no sitio-dirigido) con concentraciones crecientes de EMP sobre la absorbancia a 405 nm. Las curvas mostradas fueron repetidas tres veces, obteniéndose resultados equivalentes.



concentraciones de EMP. Los resultados (Figura 10) muestran que EMP produce una disminución del reconocimiento de la proteína Tau por el anticuerpo anti-péptido de Tau. Esta disminución fue concomitante con el aumento de las concentraciones de EMP en los ensayos. Esto indica que tanto EMP como el anticuerpo antipéptido de Tau estarían interactuando con sitios comunes, probablemente a nivel de las secuencias repetidas de Tau, y corroboran los resultados previamente señalados más arriba sobre la interacción directa entre EMP y los péptidos de Tau. En apoyo de la especificidad de la interacción basada en estos hallazgos, cuando se realizó el ensayo de reconocimiento de la proteína Tau por un anticuerpo anti-Tau comercial dirigido contra epítomos diferentes de los sitios de unión al microtúbulo, EMP fue incapaz de inhibir el reconocimiento entre Tau con este anticuerpo comercial anti-Tau corroborando la especificidad de esta interacción (Figura 10). Por otra parte, como un control adicional la droga EM no inhibió el reconocimiento de Tau por parte del anticuerpo sitio-específico anti-péptido V187-G204 de Tau. Por el contrario se observó un leve aumento en la interacción, apoyando los resultados previos que indican que EM no reconoce las secuencias repetidas de la proteína Tau (Figura 10)

### **3.B. LA INTERACCION DE TAU CON FILAMENTOS DE ACTINA. ESTUDIOS UTILIZANDO PEPTIDOS SITIO-ESPECIFICOS DE TAU.**

**3.B.1. EL PEPTIDO DE TAU V187-G204 INDUCE UN AUMENTO DE LA TURBIDEZ EN PREPARACIONES DE FILAMENTOS DE ACTINA EN UNA FORMA DEPENDIENTE DE LA DOSIS:** Sobre la base de la información de los efectos de Tau en la regulación del ensamblaje de microtúbulos y de su interacción con filamentos de actina (Cross et al., 1991, 1993), fue de interés analizar la acción de péptidos de Tau sobre el ensamblaje de actina purificada. Cuando se realizaron ensayos de ensamblaje de actina en presencia del péptido sintético de Tau V187-G204, se encontró que el péptido inducía un aumento de

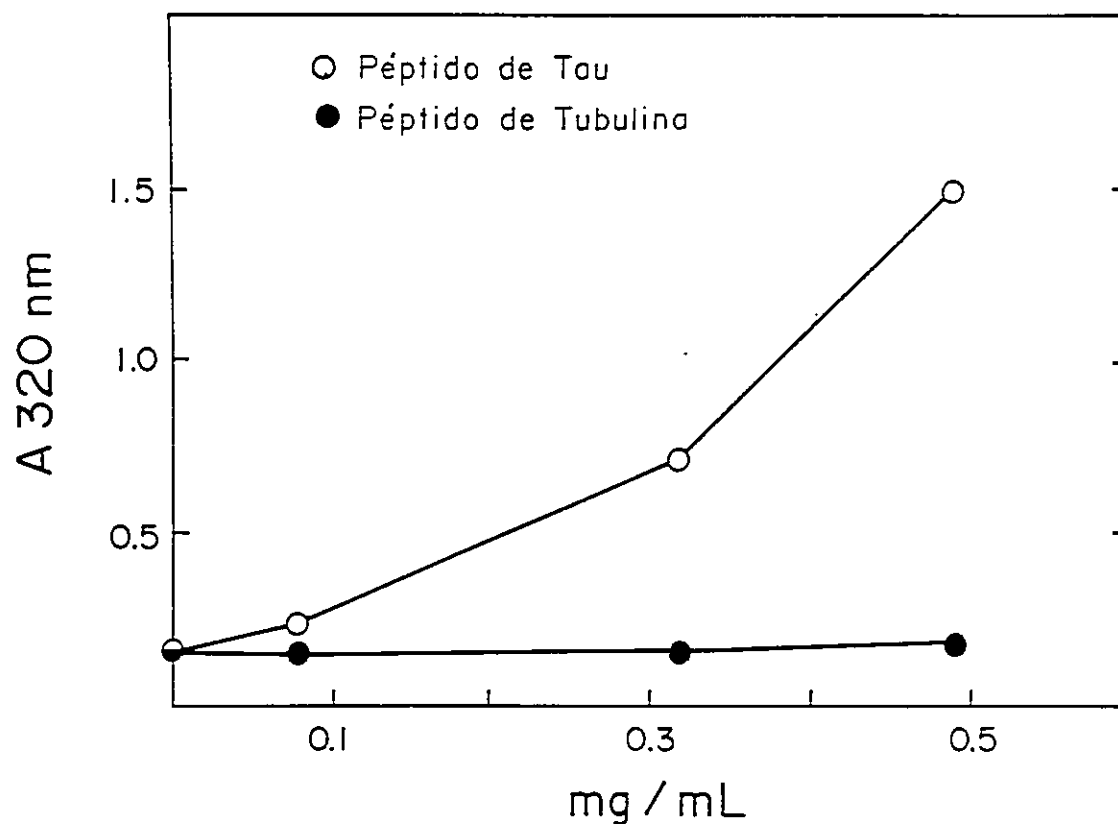


Figura 11. Dependencia del cambio de turbidez de polímeros de actina con la concentración del péptido de Tau V187-G204. Actina monomérica (0,18 mg/mL) fue polimerizada en 0,5 mL de amortiguador MES 0,1 M (pH 6,6) conteniendo  $MgCl_2$  2 mM, KCl 50 mM, y ATP 1 mM, en la presencia de concentraciones variables del péptido de Tau V187-G204 (círculos vacíos). Las mezclas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, seguido de registro continuo del cambio turbidimétrico a 320 nm. Como control se realizó la polimerización de actina en la presencia del péptido  $\beta$ II (Y422-G434) de tubulina (círculos llenos) y el aumento de la turbidez fue registrado como se describe arriba. El ensayo de inducción de turbidez fue repetido en tres ocasiones con resultados equivalentes.

la turbidez, medida a 320 nm, de las preparaciones de filamentos actina, en una forma dependiente de la concentración del péptido (Figura 11) asociada a la formación de manojos (Figura 12). Como una medida de la especificidad del efecto del péptido de Tau en las mediciones turbidimétricas asociadas a la formación de manojos de filamentos de actina (Kotani et al., 1985) se utilizó como control el péptido  $\beta$ -II(422-434) de tubulina, que representa el mayor sitio de tubulina para la interacción con MAP-2 y Tau (Maccioni et al., 1988; Cross et al., 1991). El aumento en la concentración del péptido de tubulina no produjo un incremento de la turbidez de los filamentos de actina (Figura 11).

**3.B.2. INDUCCION DE MANOJOS COMPACTOS DE FILAMENTOS DE ACTINA POR EL PEPTIDO DE TAU V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>:** Un análisis ultraestructural de los polímeros de actina formados en la presencia del péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> a intervalos de tiempo pre-establecidos (como en el ensayo de la Figura 11) mostró que las estructuras principalmente detectadas en los ensayos de turbidez correspondían a manojos de filamentos de actina (Figura 12B). En la Figura 12C se muestran dos manojos de filamentos de actina similares a los encontrados en la Figura 12B pero a mayor aumento. En las microfotografías obtenidas en el microscopio electrónico se pudo observar la co-existencia de dos subpoblaciones de filamentos de actina, los que están agregados formando manojos complejos y aquellos que se encuentran libres como F-actina (Fig 12B y 12C). Los controles con los filamentos de actina ensamblados a partir de G-actina, en ausencia del péptido de Tau, se muestran en la Figura 12A. El análisis de la microfotografías al microscopio electrónico también reveló que el aumento de las concentraciones del péptido de Tau producía un aumento proporcional en los manojos de filamentos de actina (datos no mostrados). Como control adicional, los ensayos con péptidos de la tubulina revelaron ausencia de manojos de filamentos de actina. En otro grupo de controles se analizó formación de posibles estructuras derivadas del péptido de Tau en condiciones de ensamblaje, pero en ausencia de G-actina

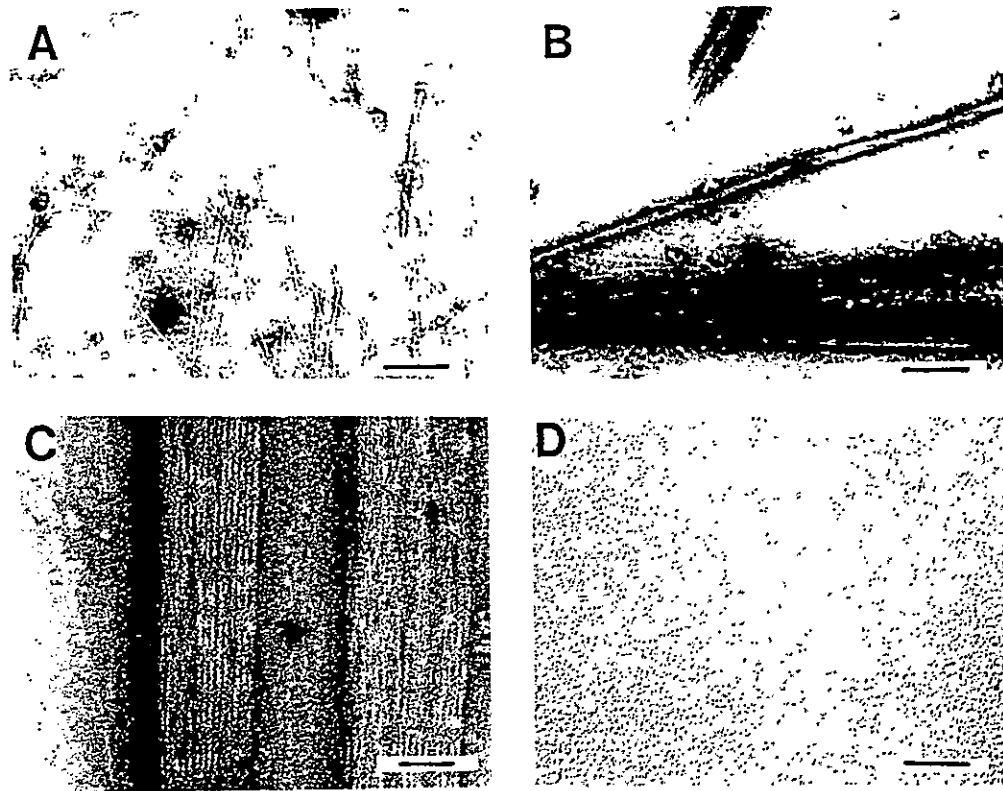


Figura 12. Inducción de manojos de filamentos de actina por péptido de Tau  $\nu$ 187- G<sup>204</sup>. Las micrografías electrónicas muestran el resultado de los ensayos de ensamblaje de filamentos de actina en la ausencia (A, 43.000X) o en la presencia (B, 43.000X) de péptido de Tau 90  $\mu$ M (0,18 mg/mL). Un mayor aumento de una área de B se muestra en C (150.000X). En la Figura D se muestra un control del péptido de Tau incubado en condiciones de ensamblaje pero en ausencia de actina (43.000X). Las muestras fueron procesadas como en la Figura 13, montadas en grillas y teñidas como se describe en Materiales y Métodos.

(Figura 12D). Resultados similares se encontraron con la segunda secuencia repetida de Tau V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup>. Los resultados del aumento de turbidez como consecuencia del ensamblaje de actina inducido por el péptido de Tau, en conjunto con el análisis estructural a nivel de microscopía electrónica de los polímeros ensamblados indican claramente un efecto de los péptidos de Tau sobre la inducción de manojos de filamentos de actina.

**3.B.3. LOS CAMBIOS DE LA TURBIDEZ DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA DEPENDEN DE LA CONCENTRACION DE ACTINA:** Se analizó el efecto del péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> sobre el cambio de turbidez generado por la agregación de filamentos de actina, en relación al aumento de la concentración de actina. Los resultados indicaron que el cambio de turbidez a 320nm dependía fuertemente de la concentración de la actina agregada al ensayo de ensamblaje (Figura 13). Se observó que los valores obtenidos en la presencia del péptido de Tau fueron siempre mayores en todo el intervalo de concentraciones que con actina sola en ausencia del péptido.

**3.B.4. EMP NO INHIBE LA TURBIDEZ DESARROLLADA POR EL ENSAMBLAJE DE FILAMENTOS DE ACTINA INDUCIDO POR LA PROTEINA TAU:** Sobre la base de los estudios que indican que EMP se une a sitios dentro del dominio de secuencias repetidas, fue de interés analizar la posibilidad que EMP inhibiese el efecto de Tau en promover la formación de manojos de actina. Se estudiaron los posibles efectos de EMP sobre la inducción por Tau nativa de la turbidez debida al ensamblaje de filamentos de actina. Para ello se realizaron ensayos de ensamblaje de actina en presencia de diferentes concentraciones de la proteína Tau. Se midió la turbidez de los filamentos de actina en los ensayos, luego de una hora de incubación, y se encontró que el nivel de turbidez aumentaba en forma correlativa con el aumento en las cantidades de proteína Tau agregada (Figura 14). Sin embargo, EMP (100  $\mu$ M) no inhibió este efecto inductor de turbidez de la proteína Tau (Figura 14). Una explicación posible de este resultado podría residir en una

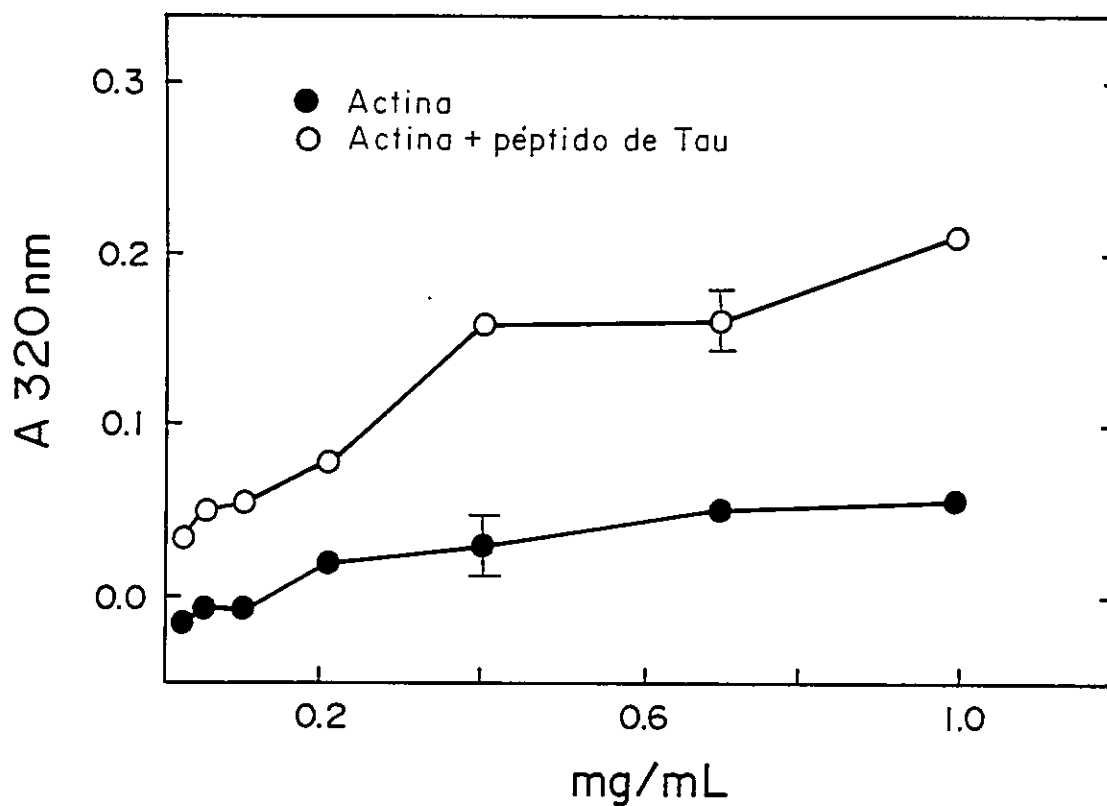


Figura 13. Dependencia del aumento de la turbidez con la concentración de actina. Actina monomérica a diferentes concentraciones fue polimerizada en amortiguador MES 0,1 M (pH 6,6) conteniendo ATP 1 mM, KCl 50 mM y  $MgCl_2$  2 mM tanto en la presencia (círculos vacíos) o en ausencia (círculos llenos) de péptido de Tau V187-G204, 90  $\mu$ M. Las mezclas de incubación fueron mantenidas 1 hora a temperatura ambiente y se registró el aumento de la turbidez a 320nm. Los ensayos fueron repetidos en tres ocasiones con resultados equivalentes (las barras indican la desviación estándar).

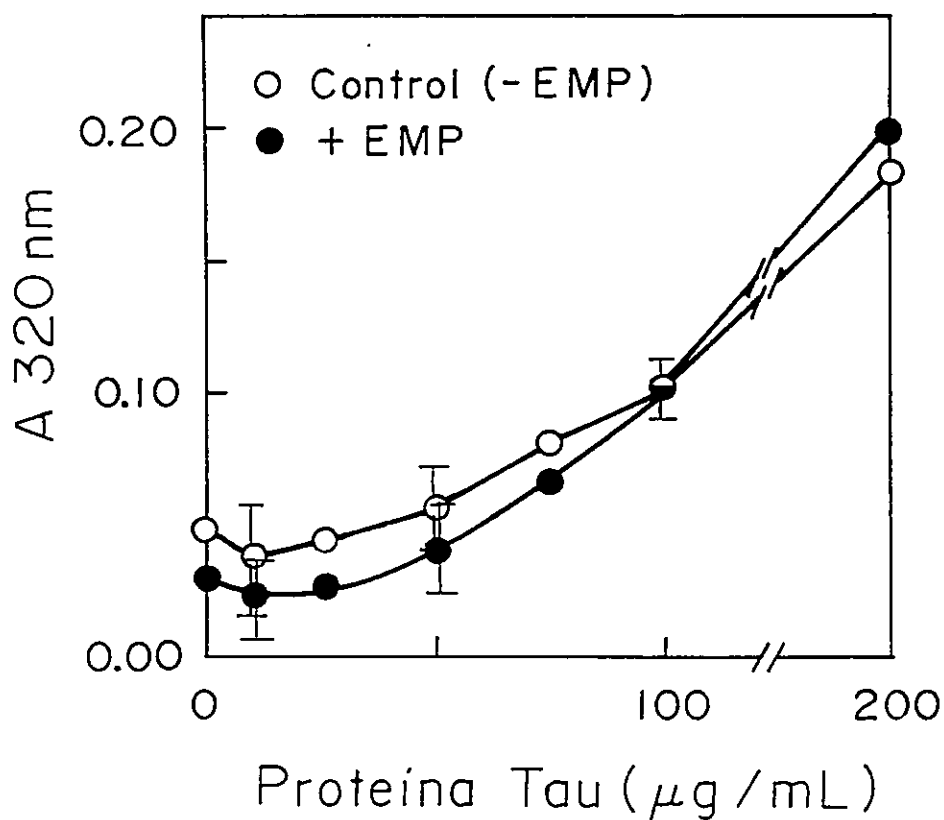


Figura 14. El aumento de turbidez debido a la formación de manojos de filamentos de actina dependiente de Tau no es inhibido por EMP. Actina (0,4 mg/mL) purificada de músculo de pollo fue inducida a polimerizar en presencia de concentraciones crecientes de proteína Tau como se describe en Métodos. Se registró el aumento de la turbidez a 320 nm luego de incubar por una hora a 37°C las mezclas de reacción en ausencia (círculos vacíos) o en presencia de EMP (100  $\mu\text{M}$  final). Las barras indican las respectivas desviaciones estándar de tres determinaciones independientes.

interacción con mayor afinidad del péptido por sitios en actina en relación a la unión de EMP al péptido de Tau, aunque componentes de tipo conformacional pudiesen estar también involucrados. Para conocer si la ausencia de un efecto de EMP se debía a una posible precipitación de EMP en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  existentes en el medio de polimerización de actina, se ensayó el efecto de EGTA. Se analizó el efecto de concentraciones crecientes de EGTA, desde 1 hasta 10 mM EGTA en ensayos separados. No se encontraron diferencias significativas en los ensayos realizados en estas condiciones, en comparación con los realizados sin agregar EGTA al ensayo de ensamblaje.

**3.B.5. CINÉTICAS DE ENSAMBLAJE DE G-ACTINA EN MICROFILAMENTOS ANALIZADA POR MEDICIONES A 232 nm. EFECTOS DE TAU Y DE LAS DROGAS EM Y EMP:** Los experimentos anteriores sugerían que tanto Tau como el péptido de Tau eran capaces de inducir agregación en posibles superestructuras de filamentos de actina. Nos interesó visualizar si era posible detectar los efectos de Tau y del péptido funcional de esta proteína sobre la formación de filamentos de F-actina a partir de G-actina de músculo de pollo, tal como se describe en Materiales y Métodos. Se midió la cinética de ensamblaje de filamentos de actina por el cambio de absorbancia a 232 nm (Higashi et al., 1963), en vez de analizar el cambio turbidimétrico a 320 nm. El cambio turbidimétrico no detecta la formación de F-actina sino de superestructuras o manojos de estos filamentos (Moraga et al., 1993). Se observó que en condiciones de pH neutro, el péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> (90  $\mu\text{M}$ ) (Figura 15, curva D) no afectaba la cinética normal de polimerización de actina libre en F-actina (Figura 15, curva C). En estas condiciones no se observó efecto de la proteína Tau (0,1 mg/mL) sobre la formación de F-actina (Figura 15, curva equivalente al control curva C). Solamente se lograba visualizar un efecto de Tau y del péptido funcional de Tau sobre la formación de filamentos de F-actina cuando el ensayo se realizaba en condiciones de pH bajo pH=6,6.



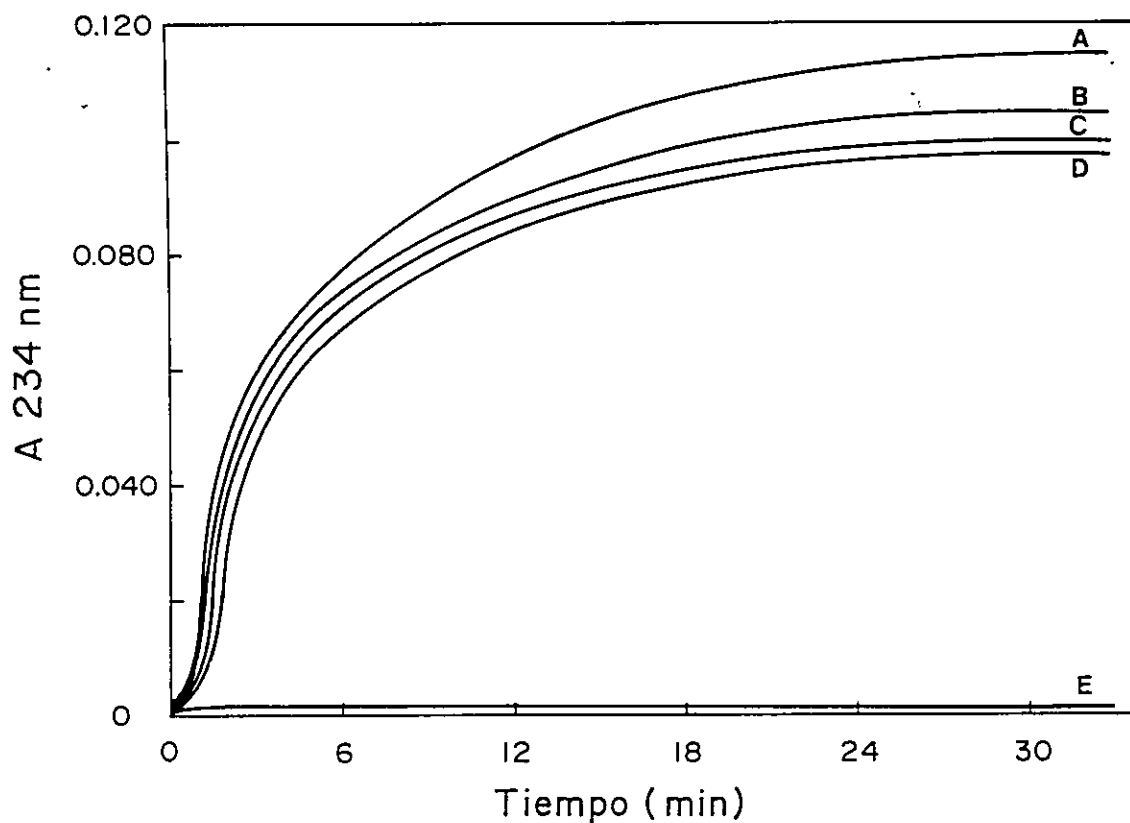


Figura 15. Cinética de ensamblaje de filamentos de actina medida a 232 nm. Se realizaron ensayos de polimerización de F-actina a partir de G-actina libre, midiéndose la cinética de ensamblaje por el cambio de absorbancia a 232 nm según Higashi et al. (1963). Los ensayos fueron realizados en presencia de EMP 100  $\mu$ M (curva A), EM 20  $\mu$ M (curva B), control en ausencia de droga o de proteína Tau (curva C), péptido de Tau V187-G204 90  $\mu$ M (curva D) y control del péptido tau en ausencia de actina (curva E). Un ensayo realizado en presencia de proteína Tau 100  $\mu$ g/mL mostró una curva coincidente con curva C. Diferencias en los niveles de polimerización en las curvas A, B, C y D no son significativas ( $p \geq 0.05$ ). Otros detalles se indican en Materiales y Métodos.

Se realizó otra serie de estudios para conocer los posibles efectos directos de la droga EM y EMP, en ausencia de Tau, sobre el ensamblaje de G-Actina en filamentos de F-actina *in vitro* analizando la reacción de ensamblaje a 232 nm. Se realizaron ensayos de ensamblaje de G-actina obtenida de músculo de pollo como se ha indicado anteriormente. No se observaron diferencias significativas entre la cinética de ensamblaje de actina en ausencia de los inhibidores de Tau o en presencia de 100  $\mu$ M EMP (Figura 15, curva A) o de 20  $\mu$ M EM (Figura 15, curva B). Por otra parte, cuando el ensayo se realizaba a pH neutral, la adición de EMP junto con el péptido de Tau (o la proteína Tau), no se logró detectar un cambio en la cinética normal de ensamblaje de G-actina en microfilamentos. Los resultados indican que no existirían efectos de EMP y EM sobre la cinética de ensamblaje de G-actina en filamentos de F-actina de acuerdo con las mediciones a 232 nm.

**3.B.6. LA INDUCCION DE MANOJOS DE FILAMENTOS DE ACTINA ES INHIBIDA POR CARBAMILACION DE LOS PEPTIDOS DE TAU:** Para realizar un análisis de la contribución de residuos aminoacídicos específicos del péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> en la actividad inductora de manojos de filamentos de actina, se realizaron experimentos de modificación química selectiva del péptido de Tau con KCNO. La carbamilación del fragmento de Tau mostró ser de naturaleza irreversible dado que siempre se recuperaba un péptido conteniendo la marca del cianato incorporado luego de cromatografías de filtración zonal en Sephadex G-25. Un producto probablemente carbamilado en uno o dos residuos de lisina resultaba de la incubación del péptido de Tau con 0,2 M de cianato, en base a la estequiometría de reacción de  $0,81 \pm 0,24$  moles KCNO por mol del péptido de Tau (Moraga et al., 1993). Los estudios de microscopía electrónica (Figura 16) mostraron que la carbamilación del péptido de Tau produjo un completo bloqueo de su capacidad inductora de manojos de filamentos de actina (Figura 16B) en comparación con la capacidad inductora del péptido no modificado (Figura 16A).

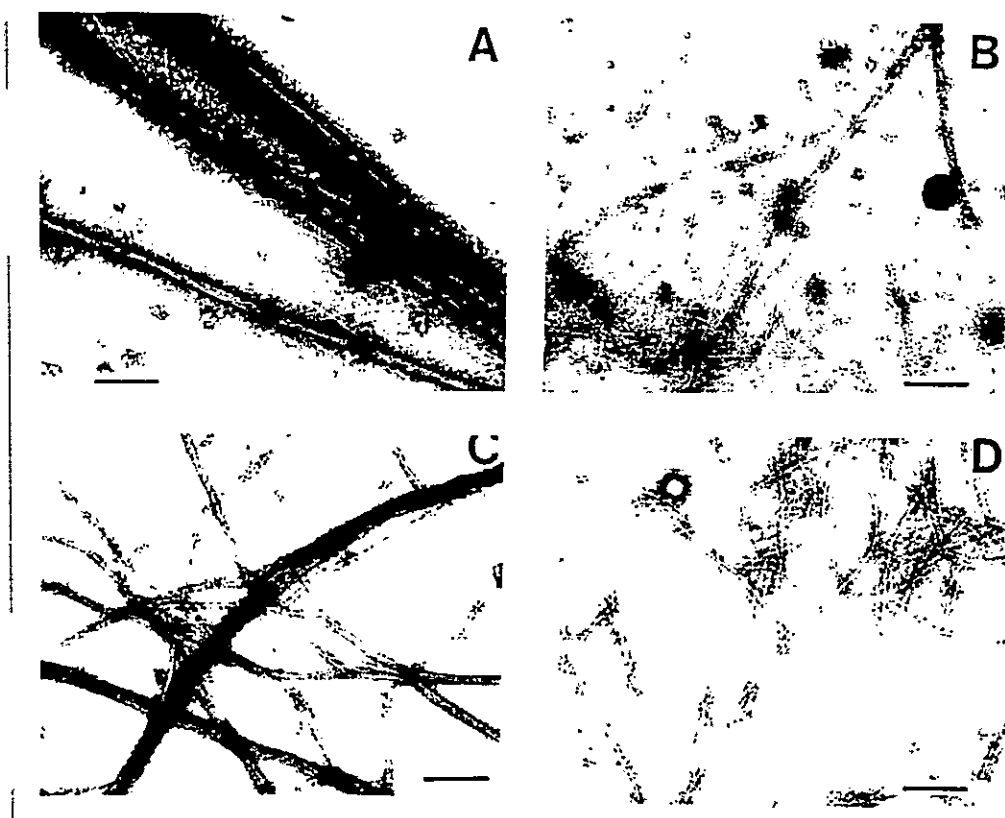


Figura 16. Inhibición de la inducción de manojos de filamentos de actina por modificación del péptido de Tau V187-G204 con KCN. Muestras de actina monomérica bajo las condiciones de ensayo descritas en la Figura 13, fueron inducidas a polimerizar en presencia de péptidos de Tau V187-G204 (A) o con péptido de Tau modificado después de la reacción con KCN 0,2 M (B). Como control se muestran los manojos de filamentos de actina inducidos por proteína Tau nativa 100 µg/mL (C) o después de ser modificada por KCN 0,2 M (D). La concentración de los péptidos de Tau utilizada en ambos ensayos fue de 180 µM. Los polímeros de las diferentes muestras fueron examinados bajo el microscopio electrónico 43.000X. Otros detalles se describen en Materiales y Métodos.

**3.B.7. LA CARBAMILACION DE PROTEINA TAU NATIVA TAMBIEN INHIBE SU CAPACIDAD INDUCTORA DE MANOJOS DE FILAMENTOS DE ACTINA:** Se ha descrito que la proteína Tau y MAP-2 purificadas tienen capacidades de inducir la formación de manojos en ensayos de ensamblaje de filamentos de actina *in vitro* (Sattilaro, 1986; Griffith and Pollard, 1982). Similar a lo que se analizó en el presente estudio con el péptido de Tau (Figura 16 A y B), la carbamilación de Tau nativa por KCNO produjo una marcada disminución del efecto inductor de manojos de filamentos de actina (Figura 16D) en comparación con el efecto de la proteína no modificada (Figura 16C). Considerando la irreversibilidad de la carbamilación de la proteína Tau con KCNO, los resultados implicarían que lisinas altamente reactivas tendrían roles en el proceso inductor de manojos de filamentos de actina (ver Discusión). Además esto sugiere la participación de un componente electrostático en el mecanismo de inducción de manojos de filamentos de actina mediado tanto por la proteína Tau completa o por sus péptidos.

**3.B.8. UN AUMENTO GRADUAL EN LA CONCENTRACION DE H<sup>+</sup> INDUCE LA FORMACION DE MANOJOS DE FILAMENTOS DE ACTINA EN LA AUSENCIA DE PEPTIDOS DE TAU:** Dada la posibilidad que elementos electrostáticos estuvieran involucrados en los mecanismos de inducción de manojos de filamentos de actina, se realizaron experimentos de ensamblaje de filamentos de actina a diferentes valores de pH en el ensayo. Se observó que en la ausencia del péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>, la disminución gradual en los valores de pH final en el ensayo de ensamblaje de filamentos de actina, desde 7,6 hasta 4,7, resultaba en un aumento de la turbidez a 320nm (Figura 17 A). Esto implicaría que hay inducción de manojos de filamentos de actina solo con el aumento de la concentración de H<sup>+</sup> libres en el ensayo de ensamblaje de actina. El aumento de la turbidez por H<sup>+</sup> ocurre gradualmente desde pH 6,6 hasta 4,7, pero dicho efecto no se detectó a pH superiores entre 7,6 y 6,6 (Figura 17A). De acuerdo al análisis de microscopía electrónica, el aumento en la turbidez inducida por variaciones de pH en ausencia del péptido de Tau parece deberse a la formación de

manojos más bien difusos de filamentos de actina, que no están presentes a valores de pH superiores a 6,12.

**3.B.9 LA TURBIDEZ DEBIDA A LA AGREGACION DE FILAMENTOS DE ACTINA POR PEPTIDOS DE TAU DEPENDE DE LAS DIFERENTES CONDICIONES DE pH:** Los efectos de una concentración fija de péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> en el aumento de la turbidez a diferentes pH fueron estudiados. Como se muestra en la Figura 17 A, cuando se agregó el péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> al ensayo de ensamblaje de actina, un aumento aun mayor en el grado de turbidez que el efecto de H<sup>+</sup> fue observado en todo el intervalo de pH entre 6,6 y 4,7. El análisis ultraestructural de los polímeros resultantes en estos ensayos de ensamblaje por microscopía electrónica reveló la formación de manojos de filamentos de actina similares a los de la Figura 14B. Sin embargo, el estudio de los manojos formados solo por la disminución del pH reveló que la estructura de tales manojos era comparativamente mas suelta y difusa que los manojos inducidos por péptidos de Tau (datos no mostrados).

**3.B.10. PEPTIDO DE TAU V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> INDUCE UN AUMENTO EN LOS NIVELES DE FILAMENTOS DE ACTINA A pH BAJO 6,6.** Los resultados de la Figura 17 B muestran un aumento en la absorbancia a 232nm como resultado del ensamblaje de filamentos de actina en presencia de péptido de Tau V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> a diferentes pH. En estos experimentos un aumento en la absorción ultravioleta como resultado de una disminución del valor del pH en la solución de ensamblaje revela una mayor cantidad de filamentos de actina formados (Figura 17 B). En estos ensayos no se detectó un aumento de absorbancia a 232 nm en la ausencia del péptido de Tau al disminuir el pH en el intervalo ácido, en el ensayo de ensamblaje. El ensamblaje de actina determinado por cambio de absorbancia a 232 nm, aun en la presencia del péptido de Tau no fue comparable al significativo aumento de la turbidez observado a 320 nm (Figura 17 A), cuando se bajó el pH en el ensayo de ensamblaje.

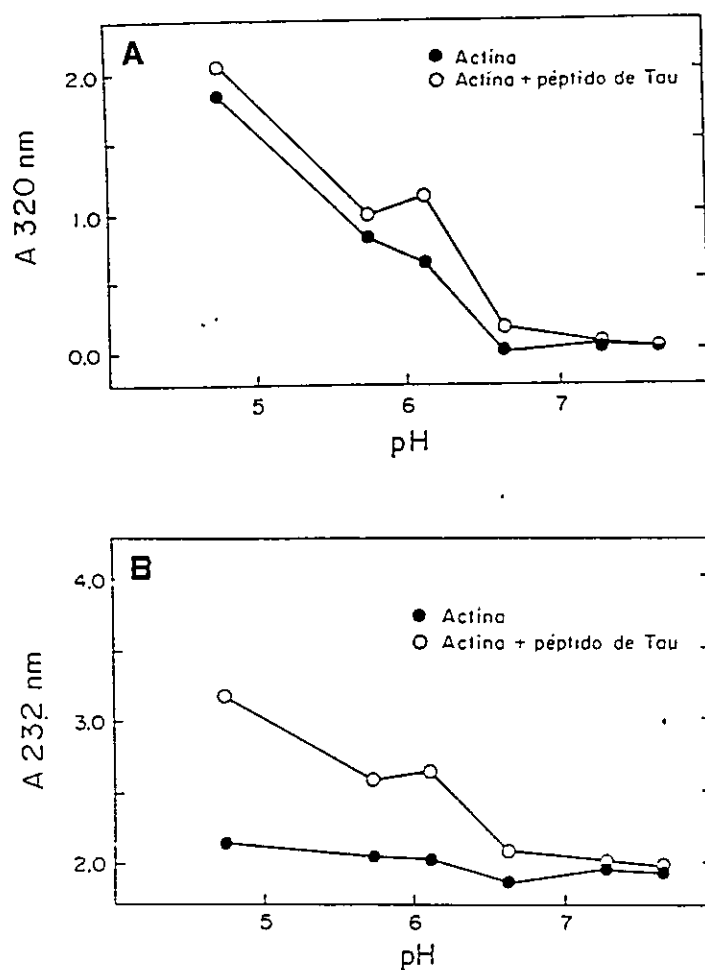


Figura 17. Dependencia de la turbidez de filamentos de actina bajo diferentes condiciones de pH. Muestras de actina monomérica fueron inducidas a polimerizar a diferentes pH bajo las condiciones de ensayo descritas en la leyenda de la Figura 13, tanto en la presencia (círculos vacíos) o ausencia (círculos llenos) del péptido de Tau 90  $\mu$ M. Las soluciones amortiguador utilizadas para estabilizar los diferentes pH de la solución de ensamblaje fueron: Tris 50 mM para los valores de pH desde 6,5 hasta 7,6; Imidazol 50 mM para los valores de pH desde 4,5 hasta 6,4. Las mezclas de incubación fueron mantenidas por 1 hora a temperatura ambiente y los cambios de turbidez a 320nm (A), o cambios de absorbancia a 232 nm (B) fueron medidos. Los ensayos fueron repetidos en tres ocasiones con resultados equivalentes.

## 4. DISCUSION

### 4.1. EMP se une a los dominios de unión de tubulina en MAP-2 y Tau.

Los estudios realizados se orientaron a analizar los dominios de unión de EMP en las proteínas MAP-2 y Tau. Sobre la base de la reciente información de los sitios funcionales involucrados en las interacciones específicas entre tubulina y MAPs, analizamos los efectos de la droga en la unión del péptido sintético de tubulina  $\beta$ -II(422-434) a MAP-2. Resulta evidente de los estudios de unión en la ultracentrífuga (Figura 3), y de la comparación de los perfiles de elución obtenidos después de la cromatografía zonal (Figura 4) en la ausencia y presencia de EM, que la droga interfiere con la interacción entre el péptido sitio-específico de tubulina y MAP-2. Se ha demostrado que la cromatografía en zona pequeña es también una aproximación útil para analizar cuantitativamente las interacciones de fragmentos de tubulina con MAPs (Maccioni et al., 1988; Cann et al., 1988). Mas aun, el gráfico de dobles recíprocos derivado de los experimentos en la ultracentrífuga (Maccioni et al., 1985a) sobre la unión del péptido  $\beta$ -II(422-434) a MAP-2 (Figura 3) indican que EMP inhibe competitivamente la unión del péptido de tubulina a MAP-2. Estos estudios sugieren la interacción de EMP con dominios de MAP-2 responsables de su unión a microtúbulos, probablemente a nivel de las secuencias repetidas en MAP-2 (Maccioni et al., 1989).

Otra línea de estudios indica que la interacción MAP-tubulina está mediada por componentes electrostáticos y elementos conformacionales, y que un subdominio catiónico presente en MAP-2 y en Tau interactúa con residuos aminoacídicos dentro del dominio C-terminal de las isoformas de tubulina (Cross et al., 1991; Maccioni et al., 1985b). Así, es probable que EMP pueda interactuar con residuos aminoacídicos básicos en el segmento catiónico del

dominio de unión a tubulina en MAP-2 y posiblemente en la proteína Tau.

Estudios previos han demostrado la interacción de EMP con MAP-2, con la proteína Tau nativa y con el fragmento quimiotróptico de MAP-2 (30-40 kDa) que contiene el dominio de unión a tubulina (Fridén et al., 1987). Para tener una prueba directa de la interacción entre EMP con los dominios repetidos de unión a tubulina de MAPs, se realizaron experimentos de los efectos de EMP en el ensamblaje de tubulina inducido por péptidos de Tau que contenían estas secuencias repetidas. Estos péptidos también definen los dominios de unión a tubulina en MAP-2 debido a que ambos tienen un alto grado de homología (Lewis et al., 1988; Kosik et al., 1989; Maccioni et al., 1989; Joly et al., 1989). Los resultados mostraron que la droga interfiere con el ensamblaje de tubulina inducido por péptidos de Tau (Figura 6). Este efecto de EMP indica una interferencia de la droga a nivel de las interacciones productivas entre los péptidos de Tau y tubulina, necesarias para generar el ensamblaje de microtúbulo. Se ha demostrado previamente que un mol de MAP-2 puede unir 5-6 moles de EMP con una constante de afinidad (Kd) de 20  $\mu$ M, y se ha propuesto que secuencias específicas en MAP-2 se unirían a dos moléculas de EMP (Burns, 1990). Esta unión produciría la neutralización de residuos de lisina altamente conservados en MAP-2, inhibiendo así su interacción con la tubulina. Por otro lado, se ha descrito también que la acción de péptidos de Tau en la inducción del ensamblaje de tubulina tiene una dependencia lineal con la concentración del péptido (Maccioni et al., 1989). Se ha planteado también que para alcanzar un nivel significativo de ensamblaje de microtúbulos se requieren concentraciones de péptidos de Tau estequiométricamente más altas en relación a tubulina. Es interesante notar que EMP logró inhibir el ensamblaje de microtúbulos a concentraciones micromolares de la droga. Considerando que la inducción del ensamblaje se produce a concentraciones milimolares del péptido de Tau, probablemente se estarían uniendo con un efecto inhibitorio, menos de un mol de EMP por mol de péptido. Una explicación sobre los efectos de EMP a



concentraciones mas bajas que las de los péptidos usados para inducir el ensamblaje de microtúbulo podrían reflejar la unión de EMP a varias moléculas de péptidos, posiblemente por inducción de agregados entre EMP y péptidos como se infiere de los resultados mostrados en la Figura 7 (ver más abajo). Los resultados del ensamblaje de tubulina inducido por péptidos de Tau (Figura 5) fueron confirmados por microscopía electrónica, donde se observaron estructuras filamentosas y microtúbulos incompletos después del ensamblaje en presencia de EMP (Figura 6). Dado que EMP no interactúa con tubulina (Fridén et al., 1987), los resultados a nivel de la inhibición del ensamblaje suministran un mayor apoyo a la conclusión derivada de los experimentos de unión y competencia mostrados más arriba, que EMP puede interactuar con MAPs a nivel de las secuencias repetidas responsables de su interacción con el microtúbulo. Una prueba directa de esta hipótesis fue obtenida luego de los experimentos de cromatografía zonal en Biogel P-6 (Figura 7), que muestran la interacción directa entre EMP y dos péptidos de Tau V187-G204 y V218-G235 que representan las dos primeras secuencia repetidas de la región conservada de MAP-2 y de la proteína Tau (Lewis et al., 1988; Kosik et al., 1989).

Por otro lado, EM no inhibe la inducción del ensamblaje microtubular por parte de péptidos de Tau (Figura 9). Además, EM no desensambla microtúbulos preformados. Esto está de acuerdo con resultados previos que indican un menor grado de unión de EM a proteína microtubular en comparación con EMP (Fridén et al., 1987). Se ha informado que EM interactúa preferentemente con las MAPs de alta masa molecular MAP-1 y MAP-2 y que actuaría como inhibidor de microtúbulos tanto *in vivo* en células de tumor prostático DU-145 en cultivo, como *in vitro* (Tew and Stearns, 1989). Sin embargo resultados (Tew and Stearns, 1989) sobre la inhibición del ensamblaje por EM no han podido ser reproducidos experimentalmente (Wallin et al., 1992). Nuestros resultados con experimentos de cromatografía zonal (Figura 8), muestran que no ocurre interacción directa entre EM y dos péptidos de Tau V187-G204 y V218-G235 que representan las dos primeras secuencias repetidas de la región conservada de MAP-2 y de la proteína Tau (Lewis

et al., 1988; Kosik et al., 1989). Estos resultados apoyan la idea que EM y EMP interactúan con distintos dominios a nivel de MAPs, y que EM no se comporta como inhibidor de microtúbulos *in vitro* dado que no reconoce las secuencias repetidas a nivel de las MAPs.

Una serie experimental en que se analizaron los efectos de EM sobre la organización del citoesqueleto de microtúbulos y de filamentos de actina en células en cultivo no logró corroborar los resultados de Tew and Stearns (1989) en relación al efecto inhibidor de microtúbulos por EM *in vivo* (datos no mostrados). Hemos encontrado mediante estudios de doble inmunofluorescencia, que tanto en fibroblastos aislados como en células DU-145 no se observan cambios detectables en los patrones de organización del citoesqueleto microtubular por efecto de EM. Se logró observar cambios cualitativos en la organización de filamentos de actina pero usando concentraciones sobre un orden de magnitud superiores (0,3-0,4 mM) a las utilizadas para los estudios *in vitro*, lo cual no parece tener una importancia clara para el análisis de los efectos de la droga (datos no mostrados). Estos resultados han sido corroborados por el grupo de Wallin y colaboradores, en los cuáles la droga EM (20  $\mu$ M) no alteró el patrón de organización de microtúbulos en células DU-145.

Así, dado que la principal diferencia entre EM y EMP es la presencia de un grupo fosfato en la posición 17 del anillo D del grupo estradiol de EM, es razonable plantear que el componente electrostático sería absolutamente necesario para la interacción productiva entre EMP con los dominios altamente catiónicos de unión a tubulina en MAP-2 y Tau. Por otro lado dada la naturaleza molecular de EM es también razonable suponer que las interacciones EM-MAPs estarían concentradas en regiones hidrofóbicas de las MAPs, más que en los dominios catiónicos de su unión a tubulina. Prueba directa de la participación de un componente electrostático en el reconocimiento entre EMP y MAPs ha sido aportada por Fridén et al. (1991), que han mostrado que solo derivados de EM negativamente cargados como EM-sulfato y EM-glucuronidato, pero no derivados positivamente cargados como EM-sarcosinato, tienen efectos similares a EMP (Fridén et al., 1991).

Estudios previos, realizados por el grupo de Wallin et al. (1985) habían demostrado que EMP inhibía el ensamblaje de microtúbulos y desensamblaba microtúbulos preformados, posiblemente a través de la interacción directa con MAPs. Estos investigadores encontraron que EMP marcada con tritio se unía predominantemente a las MAPs, y que aparentemente esta unión bloquearía la interacción de MAPs con los microtúbulos. El diseño experimental de estos investigadores se enfocó hacia el análisis de las proteínas que permanecían unidas al microtúbulo después de tal tratamiento, sin embargo no les permitió definir los dominios de interacción de tubulina en las MAPs (Wallin et al., 1985). Los estudios de esta Tesis abren nuevas vías hacia el conocimiento de la acción de EMP y EM, a través de su interacción con dominios funcionales en MAPs.

Diferentes estudios con péptidos sintéticos que contienen las secuencias repetidas de MAPs han demostrado que estos dominios contienen la información necesaria para inducir el ensamblaje de tubulina, estabilizar al microtúbulo formado (Farías et al., 1992) y producir el entrecruzamiento de microtúbulos en manojos de microtúbulos (Melki et al., 1991). Se podría agregar a lo anterior la capacidad de estos péptidos de unir G-actina (Correas et al., 1990) e inducir la formación de manojos de filamentos de actina (Moraga et al., 1993). También se ha indicado que la interacción entre MAPs y tubulina a nivel de sus dominios regulatorios tiene un importante componente electrostático. Las evidencias que apoyan esta noción pueden resumirse como sigue: (a) La estructura de dominios de MAPs muestra la existencia de sitios con secuencias que contienen regiones altamente catiónicas, en tanto que los dominios de tubulina para la unión de MAPs contienen segmentos con residuos ácidos. (b) La mayoritariamente conocida dependencia de sales para el ensamblaje de tubulina. (c) Efectos de los fosfoinosítidos (Yamauchi and Purich, 1987) y de otras moléculas polianiónicas que son inhibidores del ensamblaje de tubulina y producen una efectiva desestabilización de los microtúbulos. Entre otros polianiones que afectan los microtúbulos están: poliaminas y RNA (Bryan, 1976); heparina (Deinum et al., 1984; Nakamura et al., 1989) y la molécula

anfipática EMP (Wallin et al., 1992). (d) Se ha documentado que varias de estas moléculas polianiónicas inhibitoras de microtúbulos pueden interactuar con MAPs. Se ha mostrado que fosfoinosítidos son incorporados a MAP-2 *in vivo* (Murphy et al., 1985) y pueden liberar MAP-2 de microtúbulos *in vitro* (Yamauchi & Purich, 1987). (e) Se ha establecido que EMP se une a las MAPs (Wallin et al., 1992) y se ha demostrado en esta Tesis que el sitio molecular de acción de EMP en MAPs corresponde a sus secuencias repetidas. El conjunto de evidencias apoya la idea de un importante componente electrostático en las funciones de MAPs sobre microtúbulos, particularmente a nivel de sus dominios repetidos.

#### **4.2. Fragmentos de Tau que representan las secuencias repetidas de la proteína Tau, inducen la formación de manojos de filamentos de actina.**

Diferentes estudios realizados con actina purificada han mostrado que tanto proteínas que unen actina (villina y  $\alpha$ -actinina) (Matsudaira, 1991), MAPs (MAP-2 y Tau) (Satillaro, 1986; Griffith and Pollard, 1981) o la proteína MARCKS (Aderem, 1992) tienen la capacidad de inducir la formación de manojos de filamentos de actina *in vitro*. A pesar de que existe un número de proteínas que pueden inducir este proceso no se había logrado avanzar en el conocimiento de los dominios por los cuales Tau y MAP-2 inducirían la formación de manojos de actina. Al respecto, los resultados presentados aquí, muestran que péptidos sintéticos correspondientes a la primera y la segunda secuencia repetida de Tau embrionaria, tienen la capacidad de inducir un significativo auto-ensamblaje de los filamentos de F-actina para formar superestructuras de manojos de filamentos de actina (Figura 12), sugiriendo así que esta secuencia de Tau contiene la información estructural para promover el efecto inductor de manojos de actina. Estudios previos sugirieron que la proteína Tau interactuaba tanto con actina como con tubulina a través de su segunda secuencia repetida V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> VTSKCGSLGNIHHKPGGG (Correas et al., 1990). Sin embargo esos mismos estudios revelaron

también que, aun usando concentraciones del péptido de Tau de 6  $\mu\text{M}$ , dos veces más altas que aquellas de la proteína Tau requeridas para producir manojos de filamentos de actina, no lograban inducir su formación en ensayos de ensamblaje *in vitro*. En los estudios presentados en esta Tesis demostramos que concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  (razón molar 5:1 respecto a la actina en los ensayos de ensamblaje) eran necesarias para observar los efectos inductores de filamentos de actina. La mayor concentración de péptido de Tau necesaria para producir manojos de filamentos de actina no es sorprendente debido a que también se requieren concentraciones altas de este segmento de Tau para promover la formación de microtúbulos a partir de tubulina purificada (Joly et al., 1989; Maccioni et al., 1989). Los requerimientos de una concentración del péptido sitio-específico V187-G204 superior en un orden de magnitud a la concentración de proteína Tau necesaria para inducir la formación de manojos de filamentos de actina, podría ser explicable basándose en que el péptido de Tau contiene solamente una parte de la información estructural de la proteína Tau para inducir la formación de manojos. Es también posible que ciertos aspectos conformacionales (Cleveland, 1987; 1990) asociados a este dominio de Tau puedan ser importantes para alcanzar niveles máximos de inducción de manojos. Así es razonable pensar que las funciones del primer y segundo repetido de Tau en la inducción de manojos de filamentos de actina puedan estar condicionadas tanto por su orientación espacial, como por su acción concertada y posiblemente por la participación de otros dominios reguladores que co-existen funcionalmente debido a la configuración tridimensional de la proteína Tau nativa.

En la presente serie experimental fue notorio que los efectos de los péptidos de Tau dependían de su concentración, lo cual ya había sido observado en otro sistema por Maccioni et al. (1985a). Además este efecto era drásticamente bloqueado por la carbamilación selectiva de al menos un residuo aminoacídico del péptido de Tau, de acuerdo a los datos de estequiometría de  $0,81 \pm 0,24$  moles de KCNO incorporados por mol de péptido Tau. De hecho la carbamilación del péptido de Tau bloqueó completamente su

efecto para inducir la formación de manojos de filamentos de actina (Figura 16). Estos hallazgos fueron confirmados tanto por mediciones turbidimétricas como por análisis mediante microscopía electrónica. De acuerdo a los datos de secuencia, los residuos lisina 190 y 198 de la primera secuencia repetida (Burns, 1990) de la proteína Tau adulta serían candidatos potenciales para cumplir un papel como residuos críticos en relación al efecto inductor de manojos de filamentos de actina. Posiblemente alguno de estos residuos de lisina podría ser blanco de la reacción de carbamilación. La alta reactividad de los grupos amino de los péptidos de Tau con KCNO, en las condiciones de pH de la modificación, indica que los aminoácidos involucrados en la reacción tienen valores de pK anormalmente bajos (Stark, 1972). Un bajo valor de pK de los grupos amino reactivos para la proteína Tau y los péptidos de Tau sugiere la existencia de un microambiente hidrofóbico o bien levemente positivo alrededor de estos grupos amino. Grupos amino reactivos de bajo pK han sido descritos también en varios sistemas enzimáticos (Slebe and Martínez-Carrión, 1976); en el extremo N-terminal de mioglobina (Garner et al., 1973); y también en tubulina (Mellado et al., 1982). Otros residuos aminoacídicos presentes en el péptido de Tau con un pK neutro que pudiesen ser reactivos en la reacción de carbamilación serían las serinas 189 y 193, sin embargo su acción el proceso de formación de manojos de filamentos de actina es poco factible debido a que los manojos son inducidos por altas concentraciones de  $H^+$ , lo cual indica que dicho proceso tiene un componente electrostático, en el que probablemente no intervendrá un aminoácido neutro. Por otro lado, hay un cúmulo de evidencias que indican que residuos catiónicos estarían involucrados en la interacción de tau y péptidos de tau con elementos del citoesqueleto (Maccioni et al., 1989; Burns, 1990).

La interacción entre tau y actina parece seguir patrones moleculares similares a su interacción con tubulina, como se ha demostrado en estudios recientes (Padilla et al., 1990; Correas et al., 1990).

Tomando en consideración la naturaleza molecular de la reacción de carbamilación, y su componente electrostático es posible

que residuos lisina de los péptidos de Tau podrían ser críticos para la interacción con dominios ácidos en la superficie de actina. Así, la neutralización de subdominios cargados negativamente en las moléculas de actina por el péptido catiónico de Tau podría resultar en un aumento de las interacciones laterales entre los filamentos de actina, y la consiguiente formación de manojos de estos filamentos. La estricta dependencia de la formación de manojos de actina con la concentración del péptido apoya esta hipótesis, dado que el aumento de las especies catiónicas que interactúan con actina podrían inducir una gradual neutralización de carga en dominios ácidos de actina, facilitando así el proceso de formación de manojos de filamentos de actina. Un mayor apoyo con una base termodinámica podría obtenerse por determinaciones de la entalpía de la interacción entre tau y actina (Tanford, 1967; Lee et al., 1978; Lawson et al., 1984), pero al no haber información clara sobre las constantes de equilibrio de esta interacción no es posible obtener inferencias termodinámicas de esta naturaleza.

La hipótesis de la participación de interacciones electrostáticas entre el péptido de Tau y actina y el mecanismo de la neutralización de cargas en la superficie de actina, están directamente apoyados por los efectos de la disminución del pH sobre el proceso de formación de manojos de actina. Surge la posibilidad que después de disminuir los valores de pH, las variaciones de la carga neta del péptido de Tau puedan ser críticas tanto para la unión a la molécula de actina como para el proceso de inducción de manojos de filamentos de actina. La disminución de los valores de pH está asociada a una gradual protonación de los grupos carboxílicos de residuos aminoácidos en la superficie de la molécula de actina, junto con el aumento de grupos amino protonados a nivel del  $\epsilon$ -amino de residuos lisina, facilitando así la neutralización de residuos cargados negativamente en la superficie de la molécula de actina. La especificidad de la interacción del péptido de Tau con actina tanto como su efecto inductor de la formación de manojos fueron corroborados por estudios con el péptido bradicinina, el que tuvo un bajo efecto promotor de manojos de filamentos de actina (Moraga et al., 1993). Otro enfoque

que podría arrojar información sobre la especificidad de la interacción tau-actina podría ser el uso de péptidos sintéticos con secuencias modificadas de los dominios de unión de tau, en los que se reemplacen por ejemplo residuos de lisina por residuos aminoacídicos neutros. En este contexto conviene hacer notar que Ennulat et al. (1989) utilizando fragmentos con la composición aminoacídica de dominios de unión de tau a tubulina, pero con secuencias alteradas, encontró que éstos no inducían la formación de microtúbulos.

A un nivel estructural, la disminución del pH resulta en un aumento de la turbidez medida a 320 nm debido a la formación de manojos de filamentos de actina (Figura 17A). Un efecto mayor se encontró cuando el efecto de disminución del pH se acompañaba con el efecto producido por la presencia de péptido de Tau. Otro posible elemento en el aumento de la turbidez debida a los manojos podría ser la formación de una mayor cantidad de filamentos de F-actina en estas condiciones. Sin embargo no se registró un aumento de la absorbancia a 232 nm en la ausencia de péptido de Tau (Figura 17B), haciendo poco factible esta idea. Los efectos de la disminución del pH en el ensamblaje de filamentos de actina han sido previamente estudiados (Zimmerle & Frieden, 1988), pero estos efectos fueron analizados sobre la base de métodos que detectan cantidad de filamentos de F-actina pero no manojos de filamentos.

Dado que un gran aumento en la concentración de  $H^+$ , puede producir denaturación de la actina en los ensayos de polimerización, es posible que el mayor efecto turbidimétrico observado con péptido de tau a bajos pH (Figura 17A) pueda ser el reflejo de una mayor afinidad entre los péptidos de tau y actina denaturada.



#### 4.3. Funciones de MAPs en la estructuración de la red del citoesqueleto.

Hasta fines de los años cincuenta predominó la idea que en la célula eucariótica en estado de interfase, el citosol estaba formado por un fluido orgánico homogéneo, carente de organización supramolecular alguna, pero con diferentes capacidades enzimáticas. Sin embargo, durante la primera mitad del siglo XX, algunos biólogos plantearon en forma aislada la idea de una estructura reticular del citoplasma. Con el mejoramiento de las técnicas de microscopía de luz y las de la microscopía electrónica se encontró que el interior de las células eucarióticas estaba efectivamente conformado por estructuras de naturaleza fibrilar (Loewy, 1952; Porter, 1984). Hoy sabemos que estas estructuras fibrilares permanecen después de la extracción con detergentes en células en cultivo, en condiciones que producen la liberación de membranas, organelos y pequeñas moléculas solubles (Bell and Stark-Vancs, 1983; Schliwa, 1985; Porter, 1984). Dentro de este contexto, los estudios de esta Tesis y trabajos recientes en este laboratorio (Maccioni et al., 1992; Cross et al., 1993, Moraga et al., 1993) apuntan con mayores evidencias hacia el papel de proteínas MAPs como moduladores de las interacciones entre microtúbulos y filamentos de actina. Estas interacciones podrían definir determinados patrones de organización de la citoarquitectura en respuesta a demandas celulares por estructuras del citoesqueleto. Por otra parte, estos estudios también sugieren que subespecies moleculares de estas MAPs interactuarían con microtúbulos y filamentos de actina con afinidades diferenciales, definiendo la estabilización estructural entre la red de actina y de microtúbulos (Maccioni et al., 1992; González et al., 1993). Puesto que hay evidencias adicionales que sugieren el papel de MAPs en la interacción entre microtúbulos y redes de filamentos intermedios en células en cultivo (Heimann et al., 1985; Capote, comunicación personal), es posible que diferentes componentes MAPs puedan controlar las interacciones entre distintos elementos del citoesqueleto para definir los niveles de estabilización dentro de la citoarquitectura. Todas estas evidencias experimentales permiten

inferir un posible rol funcional de los dominios repetidos de MAPs a nivel del citoesqueleto de microtúbulos y de filamentos de actina (Figura 18).

A pesar que no existen estimaciones de las concentraciones locales de la proteína Tau en las regiones citoplasmáticas donde los manojos de filamentos de actina son ensamblados, es posible que los efectos aquí descritos puedan tener algún significado fisiológico. Podría ser razonable suponer que estos dominios repetidos de Tau (y consecuentemente los dominios repetidos de otras MAPs) son dominios reguladores de las interacciones entre microtúbulos y filamentos de actina, dado que aparecen operacionalmente conectados a sus funciones de ensamblaje y formación de manojos respectivamente. En este contexto, existe fuerte evidencia que indica que modificaciones postranscripcionales tales como fosforilación son procesos claves para modificar la afinidad entre Tau y tubulina y entre Tau y actina (Burns et al., 1984; Brugg and Matus, 1991). Así es probable que sistemas enzimáticos que modifican la carga neta de los dominios catiónicos repetidos de la MAPs puedan ser parte de los mecanismos que regulan la dinámica de ensamblaje del citoesqueleto en la célula.

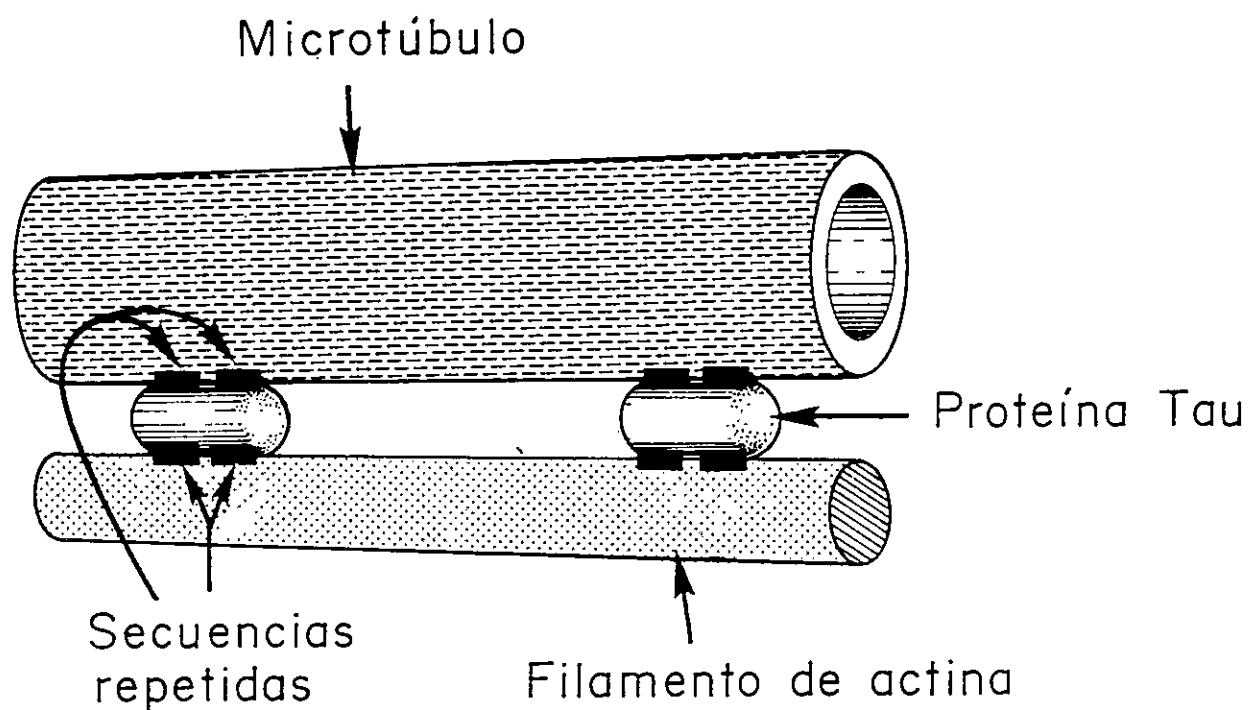


Figura 18. Representación esquemática de las interacciones entre microtúbulos y filamentos de actina mediadas por Tau. El modelo se basa en el papel de Tau (o MAP-2) de conectar microtúbulos con filamentos de actina a través de la interacción directa del dominio de secuencias repetidas de Tau, de acuerdo a antecedentes estructurales de estos dominios (Maccioni et al., 1989; Joly et al., 1989; Correas et al., 1990). y la información obtenida en esta Tesis.

## 5. CONCLUSIONES

-EMP interactúa a nivel de las secuencias repetidas catiónicas de Tau (y MAP-2) para inhibir el ensamblaje de tubulina dependiente de MAPs.

-EM reconoce sitios distintos que EMP a nivel de MAPs y no inhibe el ensamblaje de tubulina dependiente de Tau (o MAP-2) o de péptidos sintéticos de Tau que contienen las secuencias repetidas.

-Péptidos sintéticos conteniendo las dos primeras secuencias repetidas de Tau inducen la formación de manojos de filamentos de actina.

-La carbamilación selectiva de péptidos sitio-específicos de Tau o de proteína Tau inhiben su capacidad inductora de manojos de filamentos de actina.

-El proceso de formación de manojos de filamentos de actina estaría probablemente regulado por la neutralización de cargas a nivel de la superficie del polímero de F-actina.

-Los dominios repetidos de MAPs podrían ser dominios regulatorios comunes de los sistemas de microtúbulos y filamentos de actina.

## 6. BIBLIOGRAFIA.

- Aderem, A. (1992) Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and Profilin. *TIBS* 17, 438-443.
- Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Susuki, K. and Sakai, H. (1989) A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and Tau for the promotion of microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 264, 5885-5890.
- Asai, D. J., Thompson, W. C., Wilson, L., Dresden, C. F., Schulman, H. and Purich, D.L. (1985) Microtubule-associated proteins (MAPs): A monoclonal antibody to MAP-1 decorates microtubules *in vitro* but stains stress fibers and not microtubules *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1434-1438.
- Bell, P. B. and Stark-Vancs, V. (1983) Some factors affecting the preservation of the cytoskeleton of cells in culture for scanning electron microscopy. *Scan. Electron Microsc.* 1, 351-359.
- Bergh, J., Bjork, P., Westling, J. E. and Nilsson, S. (1988) Expression of an Estramustine-binding associated protein in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 48, 4615-4619.
- Bershadsky, A. and Vasiliev, J. (1988) Cytoskeleton. Plenum Press (eds.), New York. p.13-127.
- Bhattacharya, B. and Wolf, J. (1976) Tubulin aggregation and disaggregation-mediated by 2 distinct vinblastine-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2375-2378.
- Bjermer, L., von Schoultz, E., Norberg, B. and Henriksson, R. (1988) Estramustine inhibits monocyte phagocytosis. *The Prostate* 13, 49-55
- Bjork, P., Forsgren, B., Gustafsson, J. Pousette, A. and Hogberg, B. (1982) Partial characterization and quantitation of a human

- prostatic estramustine-binding protein. *Cancer Res.* **42**, 1935-1942.
- Blose, S. H., Meltzer, D. I. and Feramisco, J. R. (1984) 10nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal and polyclonal antibodies against tubulin. *J. Cell Biol.* **98**, 847-858.
- Biol.* **34**, 525-533.
- Brion, J., Guilleminot, J., Couchie, D., Flament Durant, J. and Nunez, J. (1988) Both adult and juvenile Tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neurosci.* **25**, 139-146.
- Brugg, B. and Matus, A. (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) to microtubules in living cells. *J. Cell Biol.* **114**, 735-743.
- Bryan, J. (1976) A quantitative analysis of microtubule elongation. *J. Cell Biol.* **71**, 749-767.
- Bryan, J. and Wilson, L. (1971) Are cytoplasmic microtubules heteropolymers?. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 1762-1766.
- Bulinski, J. C. and Borisy, G. G. (1980) Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 11570-11576
- Burns, R. G. (1990) Stoichiometry of Estramustine phosphate binding to MAP-2 measured by the disassembly of chick brain MAP-2: tubulin microtubules. *Cell Motil. Cytoskel.* **17**, 167-173.
- Burns, R. G., Islam, K. and Chapman, R. (1984) The multiple phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2: tubulin interaction. *Eur. J. Biochem.* **141**, 609-615.
- Cann, J., York, E., Stewart, J., M., Vera, J. and Maccioni, R. B. (1988) Small-zone gel chromatography of interacting systems: Theoretical and experimental evaluation of elution profiles for kinetically-controlled macromolecule-ligand reactions. *Analytical Biochem.* **175**, 462-473.

- Carlier, M. and Pantaloni, D. (1982) Assembly of microtubule proteins: role of guanosine di- and triphosphate nucleotides. *Biochemistry* **21**, 1215-1223.
- Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F. and Lindberg, U. (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* **115**, 465-483.
- Cleveland, D. (1987) The multitubulin hypothesis revisited: What have we learned? *J. Cell Biol.* **104**, 381-383.
- Cleveland, D. (1990) Microtubule Mapping. *Cell* **60**, 701-702.
- Cleveland, D., Hwo, S. and Kirschner, M. (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of Tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* **116**, 227-248
- Correas, I., Padilla, R. and Avila, J. (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, Tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem. J.* **269**, 61-64.
- Cross, D., Dominguez, J., Maccioni, R. B. and Avila, J. (1991) MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of beta tubulin. Studies with synthetic tubulin peptides. *Biochemistry* **30**, 4362-4366.
- Cross, D., Vial, C. and Maccioni, R.B.(1993) A Tau-like protein interacts with microtubules and stress fibers in human and rodent cell lines. *J. Cell Sci.* **105**: 51-56
- Danowski, B. (1989) Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J. Cell Sci.* **93**, 255-266.
- Deinum, J., Sorskog, L., Wallin, M. and Dahlback, J. (1984) Molecular weight dependency of heparin inhibition of microtubule assembly *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 41-48.
- Drubin, D., Kobayashi, S. and Kirschner, M. (1986) Association of Tau protein with microtubules in living cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **466**, 257-268.
- Dustin, P. (1984) Microtubules. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (Eds.), p.6-93.

- Ellisman, M. H. and Porter, K. R. (1980) Microtubule structure of the axoplasmic matrix: visualization of cross-linking structures and their distribution. *J. Cell Biol.* **87**, 467-479.
- Ennulat, D., Liem, R., Hashim, G. & Shelansky, M. (1989) Two separate 18-amino acid domains of Tau promote the polymerization of tubulin. *J. Biol. Chem.* **264**, 5327-5330.
- Farías, G., Vial, C. and Maccioni, R. B. (1992) Specific macromolecular interactions between Tau and the microtubule system *Mol. Cell. Biochem.* **112**, 81-88.
- Farías, G., Vial, C. and Maccioni, R. B. (1993) Functional domains on chemically modified Tau protein. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **13**, 173-182.
- Forsgren, B., Gustafsson, J., Pousette, A. and Hogberg, A., (1979) Binding characteristics of a major protein in rat ventral prostate cytosol that interacts with Estramustine, a nitrogen mustard derivative of 17 $\beta$ -estradiol. *Cancer res.* **39**, 5155-5164.
- Fridén, B. (1991) Functions of microtubule-associated proteins and their interaction with tubulin. Doctoral thesis, University of Goteborg, Sweden. p.8.
- Fridén, B., Rutberg, M., Deinun, J. and Wallin, M. (1991) The effect of Estramustine derivatives on microtubule assembly in vitro depends on the charge of the substituent. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 997-1006.
- Fridén, B., Wallin, M., Deinum, J., Prasad, V. and Ludueña, R. (1987) Effect of Estramustine phosphate on the assembly of trypsin-treated microtubules and microtubules reconstituted from purified tubulin with either Tau, MAP-2, or the tubulin-binding fragment of MAP-2. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 123-130.
- Garner, M., Garner, A., Huber, G., Kozak, C. and Matus, A. (1990) Molecular cloning of microtubule-associated proteins 1 (MAP-1A) and microtubule-associated proteins 5 (MAP-1B): Identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *J. Neurochem.* **55**, 146-154.



- Garner, M., Garner, W. and Gurd, F. (1973) Determination of alfa-amino group pK by cyanate reaction. *J. Biol. Chem.* **248**, 5451-5455.
- Goedert, M., Crowther, R. and Garner, C. (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins Tau and MAP2. *Trends Neurosci.* **14**, 193-199.
- Goldstein, L. S., Laymon, R. A. and McIntosh, J. R. (1986) A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*: identification, characterization, and isolation of coding sequences. *J. Cell Biol.* **102**, 2076-2087.
- González, M., Farías, G. y Maccioni, R.B. (1992) Presencia y función de isotipos de MAPs en células en cultivo. Resúmenes V Congreso Iberoamericano de Biología Celular, p.100.
- González, M., Farías, G. and Maccioni, R. B. (1993) Identification of a new microtubule interacting protein Mip-90. *J. Biol. Chem.* (submitted).
- Griffith, L. M. and Pollard, T. D. (1978) Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins. *J. Cell Biol.* **78**, 958-965.
- Griffith, L. M. and Pollard, T. D. (1982) The interaction of actin with microtubules and microtubules-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **257**, 9143-9151.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, P., Tung, Y., Quinlan, M., Wisniewski, H., Binder, L. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4913-4917.
- Hartley-Asp, B. (1984) in : Cancer chemotherapy and selective drug development (Harraps, K., Davis, W. and Calvert, A. eds.). Martinus Nijhoff, Netherland. pp425-429.
- Heacock, C. and Bamburgh, J. (1983) The quantitation of G- and F-actin in cultured cells. *Anal Biochem.* **135**, 22-36.
- Heimann, R., Shelanski, M. and Liem, R. (1985) Microtubule-associated proteins binds specifically to the 70 kDa neurofilament protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 12160-12166.

- Hernandez, M., Avila, J., and Abreu, J. (1986) Physicochemical characterization of the heat-stable microtubule-associated protein MAP2. *Eur. J. Biochem.* **154**, 41-48.
- Herrmann, H., Dalton, J., Wiche, G. (1985) Microheterogeneity of microtubule-associated proteins, MAP-1 and MAP-2, and differential phosphorylation of individual subcomponents. *J. Biol. Chem.* **260**, 5797-5803.
- Herzog, W., and 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.
- Higashi, S., Kasai, M., Oosawa, F. and Wada, A. (1963) Ultraviolet dichroism of F-actin oriented by flow. *J. Mol. Biol.* **7**, 421-430.
- Himmler, A. (1989) Structure of the bovine Tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Molec. Cell Biol.* **9**, 1389-1396.
- Hirokawa, K., Shiomura, Y. and Okabe, S. (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol.* **107**, 1449-1459
- Hirokawa, N., Bloom, G. and Vallee, R. (1985) Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins in regions of axons associated with rapid axonal transport: the b-aminodipropionitrile-intoxicated axon as a model system. *J. Cell Biol.* **101**, 227-239.
- Hoisater, P. (1976) Studies on the conversion of oestradiol linked to a cytostatic agent (estracyt) in various rat tissues. *Acta Endocrinologica* **82**, 661-672.
- Horwitz, S. B., Parnees, J., Schiff, P. B. and Manfredini, J. J. (1982) Taxol: a new probe for studying the structure and functions of microtubules. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol XLVI, 219-226.
- Howlett, G. T., Yeh, E. and Schachman (1978) Protein-ligand binding studies with a table-top, air-driven, high-speed centrifuge. *Arch Biochem. Biophys.* **190**, 809-819.

- Huber, G., Alaimo-Beuret, D. and Matus, A. (1985) MAP3: Characterization of a novel microtubule-associated protein. *J. Cell Biol.* **100**, 496-507.
- Jerne, N., Roland, J. and Casenave, P. (1982) Recurrent idiotypes and internal images. *EMBO J.* **1**, 243-247.
- Joly, J. C., Flynn, G. and Purich, D. L. (1989) The microtubule-binding fragment of microtubule-associated protein-2: location of the protease accessible site and identification of an assembly-promoting peptide. *J. Cell Biol.* **109**, 2289-2294.
- Jonsson, G., Hogberg, B. and Nilsson, T. (1977) Treatment of advanced prostatic carcinoma with Estramustine phosphate (Estracyt<sup>R</sup>). *J. Scand.Urol.Nephrol.* **11**, 231-238.
- Kanai, Y., Takemura, R., Oshima, T., Mori, H., Ihara, Y., Yanagisawa, M., Masaki, T. and Hirokawa, N. (1989) Expression of multiple Tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblast transfected with a single Tau cDNA. *J. Cell Biol.* **109**, 1173-1184.
- Kanje, M., Deinum, J., Wallin, M., Ekstrom, A., Edstrom, A. y Hartley-Asp, B. (1985) Effect of Estramustine phosphate on the assembly of isolated bovine brain microtubules and fast axonal transport in the frog sciatic nerve. *Cancer Res.* **45**, 2234-2239.
- Kelly, R., (1990) Microtubules, membrane traffic and cell organization. *Cell* **61**, 5-7.
- Kim, H., Binder, L. and Rosebaum, J. (1979) The periodic association of MAP-2 with brain microtubules *in vitro*. *J. Cell Biol.* **80**, 266-276.
- Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986) Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329-342.
- Korn, E. (1978) Biochemistry of actomyosin dependent cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 588-599.
- Kosik, K., Orecchio, L., Bakalis, S. and Neve, R. (1989) Developmentally regulated expression of specific Tau sequences. *Neuron* **2**, 1389-1397.
- Kotani, S., Nishida, E., Kumagai, H. and Sakai, H. (1985) Calmodulin Inhibits Interaction of Actin with MAP2 and Tau, Two Major Microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **260**,

10779-10783.

- Kruse, E. and Hartley-Asp, B. (1989) The effect of Estramustine, nor-nitrogen mustard and tauromustine on macromolecular labelling in the human prostatic tumor cell line 1013L. *Pharmacology and Toxicology* **64**, 9-13.
- Kruse, E., Johansson, S. A., Hartley-Asp, B. and Gunnarson, P. O. (1988) Distribution and metabolism of Estramustine in HeLa cell line 1013L. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3161-3167.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawson, E., Sadler, A., Harmatz, D., Brandau, D., Micanovic, R., MacElroy, R. and Middaugh, R. (1984) A simple experimental model for hydrophobic interactions in proteins. *J. Biol. Chem.* **259**, 2910-2912
- Lee, G. (1990) Tau protein, an update on structure and function. *Cell Motil Cytoskel.* **15**, 199-203.
- Lee, J. C., Tweedy, N. and Timasheff, S. N. (1978) In Vitro Reconstitution of Calf Brain Microtubules: Effects of Macromolecules. *Biochemistry* **17**, 2783-2790.
- Lewis, S. A., Ivanov, I. E., Lee, G. H. and Cowan, N. J. (1989) Organization of Microtubules in Dendrites and Axons is Determinated by a Short Hydrophobic Zipper in Microtubule-Associated Proteins MAP-2 and Tau. *Nature* **342**, 498-505.
- Lewis, S. A., Wang, D. and Cowan, N. (1988). Microtubule-associated protein MAP-2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. *Science* **242**, 936-939.
- Littauer, U., Givon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I. and Ponstingl, H. (1986) Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7162-7166.
- Loewy, A. G. (1952) An actomyosin-like substance from the plasmodium of a myxomycete. *J. Cell Comp. Physiol.* **40**, 127-156.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. S. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Ludueña, R. F. and 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 brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 3594-3598.
- Maccioni, R. B. (1986) *The Molecular Cytology of Microtubules*. RBC. Editions. Basque Country University Press, Leioa and Springer-Verlag Heidelberg. p.1-48.
- Maccioni, R. B. and Arechaga, J. (eds.)(1987) *The Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*. ICSU Press-IRL ( Oxford University Press ). p.25-73.
- Maccioni, R. B., Rivas, C. and Vera, J. C. (1988) Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins. *EMBO J.* **7**, 1957-1963.
- Maccioni, R.B. and Seeds, N. (1977) Stoichiometry of GTP hydrolysis and tubulin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 462-466.
- Maccioni, R.B. and Seeds, N. (1983) Affinity labeling of tubulin's GTP exchangeable site. *Biochemistry* **22**, 1572-1579.
- Maccioni, R. B., Serrano, L., Avila, J. & Cann, J. (1985b) Characterization and structural aspects of the enhanced assembling capacity of tubulin after removal of its carboxyl-terminal domain. *Eur. J. Biochem.* **154**, 427-435.
- Maccioni, R. B., Serrano, L. & Avila, J. (1986) Structural and functional domains of tubulin. *BioEssays* **2**, 165-169.
- Maccioni, R. B., Stewart, J. and Cann, J. (1985a) Interaction of substance P with tubulin. *Eur. J. Biochem.* **154**, 427-435.
- Maccioni, R. B., Vera, J. C., Dominguez, J. and Avila, J. (1989) A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein Tau. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 568-579.

- Maccioni, R. B., Vera, J. & Slebe, J. (1981) Arginyl residues involvement in the microtubule assembly. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**, 248-255.
- Maccioni, R.B., Vial, C., Cross, D. and González, M. (1992) Specific macromolecular interactions modulating the cytoskeleton organization". In : *Progresos en Biología Celular*. Serv. Editorial Universidad Malaga (J. Becerra, ed.). p.153-158.
- Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1991) Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* **114**, 977-991.
- Mareel, M. M., Storme, G. A., Dragonetti, C. H., de-Bruyne, G. K., Hartley-Asp, B., Segers, J. L. and Rabaey, M. L. (1988) Antiinvasive activity of Estramustine on malignant MO<sub>4</sub> mouse cell on DU-145 human prostate carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res.* **48**, 1842-1849.
- Martínez, J., Santibáñez, J., Vial, C. and Maccioni, R.B. (1992) The antineoplastic agent Estramustine and the derivative Estramustine-phosphate inhibit secretion of interleukin-3 in leukemic cells. Possible roles of MAPs. *Mol Cell Biochem.* **117**,165-173.
- Matsudaira, P. (1991) Modular organization of actin crosslinking proteins. *TIBS* **16**, 87-92.
- Matus, A. (1991) Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis. *J Cell Sci.* **15**, 61-67.
- Melki, R., Kerjan, P., Waller, J. P., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1991) Interaction of Microtubule -Associated Proteins with Microtubules :Yeast Lysyl- and Valyl-t-RNA Synthetases and t 218-235 Synthetic Peptide as model Systems. *Biochemistry* **30**, 11536-11545.
- Mellado, W., Slebe, J.C. and Maccioni, R.B. (1982) Tubulin carbamylation: role of amino residues in microtubule assembly. *Biochem. J.* **203**, 675-681.
- Mitchison, T. J. (1992) Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 1309-1315.

- Monasterio, O. (1987)  $^{19}\text{F}$  Nuclear magnetic resonance measurement of the distance between the E-site GTP and high affinity  $\text{Mg}^{2+}$  in tubulin. *Biochemistry* **26**, 6099-6106.
- Moraga, D., Nuñez, P., Garrido, J. and Maccioni, R.B. (1993) A Tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J. Neurochemistry* **61**, 979-986.
- Moraga, D., Rivas-Berrios, A., Farías, G., Wallin, M. and Maccioni, R. B. (1992) Estramustine-phosphate binds to a tubulin binding domain on microtubule associated proteins MAP-2 and Tau. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 97-103.
- Murphy, D. and Borisy, G. (1975) Association of high-molecular weigh proteins with microtubules and their role in microtubule assembly *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 2696-2700.
- Murphy, D., Johnson, K. and Borisy, G. (1977) Role of tubulin associated proteins in microtubule nucleation and elongation. *J. Mol. Biol.* **117**, 33-52.
- Nakamura, A., Arai, T., Kondo, Y. and Fujii, T. (1989) Inhibitory Effects of Poly(L-Aspartic Acid) on the Assembly of Brain Microtubules and the Interaction of Microtubule-Associated Protein 2 with F-Actin *In Vitro*. *J. Biochem.* **106**, 93-97.
- Nishida, E., Kuwaki, T. and Sakai, H. (1981) Phosphorylation of microtubule-associated proteins (MAPs) and pH of the medium control interaction between MAPs and actin filaments. *J. Biochem.* **90**, 575-578.
- Noble, M., Lewis, S. and Cowan, N. (1989) The microtubule-binding domain of microtubule-associated protein MAP-1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP-2 and Tau. *J. Cell Biol.* **109**, 3367-3376.
- Nunez, J. (1988) Immature and mature variants of MAP-2 and Tau proteins and neuronal plasticity. *Trends in NeuroSciences* **11**, 477-479.
- Ohsawa, W. and Yamazaki, Z. (1988) Tumor-oriented anti-cancer agent with estrogen as a carrier. *Gan To Kagaku Ryoho* **4**, 1065-1071.

- Okabe, S. and Hirokawa, N (1990) Turnover of fluorescently labelled tubulin and actin in the axon. *Nature* **343**, 479-482.
- Olmsted, J. B. (1986) Microtubule-associated proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* **2**, 421-457.
- Olmsted, J. B. and Lyon, H. D. (1991) A microtubule-associated protein specific to differentiated neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 3507-3511
- Padilla, R., Maccioni, R. B. and Avila, J. (1990) Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein Tau. *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 35-41.
- Papandrikopoulou, A., Doll, T., Tucker, R., Gardner, C. and Matus, A. (1989) Embryonic MAP2 lacks the cross-linking sidearm sequences and dendritic targeting signal of adult MAP2. *Nature* **340**, 650-652.
- Pardee, J. and Spudich, J. (1982) Purification of muscle actin. *Methods in Enzymology* **85**, 164-181.
- Parysek, L., Wolosewick, J. and Olmsted, J. (1984) MAP4: a microtubule-associated protein specific for a subset of tissue microtubules. *J. Cell Biol.* **99**, 2287-2296.
- Pollard, T. (1990) Actin. *Current Opinion in Cell Biology* **2**, 33-40.
- Pollard, T. and Craig, S. W. (1982) Mechanism of actin polymerization. *Trends in Biochem. Sci.* **7**, 55-58.
- Pollard, T., Selden, C. and Maupin, P. (1984) Interaction of actin filaments with microtubules. *J. Cell Biol.* **99**, 33-77.
- Porter, K. R. (1984) The cytomatrix: a short history of its study. *J. Cell Biol.* **99**, 3-12.
- Pousette, A., Bjork, P. and Carlstrom, K. (1987) Hormonal regulation of an Estramustine-binding protein in the submaxillary gland of the rat. *J. Steroid Biochem* **26**, 31-34.
- Rime, H., Jesus, C. and Ozon, R. (1988) Estramustine phosphate inhibits germinal vesicle breakdown and induces depolymerization of microtubules in mouse oocyte. *Reprod.Nutr. dev.* **28**, 319-334.
- Rivas-Berrios, A., Hernandez, M. A., Dominguez, J., Avila, J. and 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.
- Rivas, C., Vera, J. and Maccioni, R. B. (1988) Anti-idiotypic antibodies reacting with MAPs in the sera of rabbits immunized with synthetic peptides from tubulins regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6092-6096.
- Rubinstein, P. (1990) The functional importance of multiple actin isoforms. *BioEssays* **12**, 309-315.
- Safer, D., Elzinga, M. and Nachmias, V. (1991) Thymosin-beta-4 and Fx, and actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* **266**, 4029-4032.
- Sato-Toshitake, R., Shiomura, Y., Miyasaka, H. and Hirokawa, N. (1989) Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* **3**, 229-238.
- Sattilaro, R. F. (1986) Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry.* **25**, 2003-2009.
- Sattilaro, R. F., Dentler, W. L. and LeCluyse, E. L. (1981) Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments *in vitro*. *J. Cell Biol.* **90**, 467-473.
- Schliwa, M. (1985) The Cytoskeleton. Springer-Verlag. Vienna-New York (Eds.). p.5-56.
- Selden, C. S. and Pollard, T. D. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* **258**, 7064-7071.
- Selden, C. S. and Pollard, T. D. (1986) Interaction of Actin Filaments with Microtubules Is Mediated by Microtubule-Associated Proteins and Regulated by Phosphorylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **466**, 803-812
- Senoh, H., Ichikawa, Y., Matsuda, M., Iwatsumo, H., Kumahara, Y. and Sagawa, S. (1989) Remarkable effect of endocrine therapy on brain metastasis from prostatic carcinoma. *Urology* **33**, 243-246.
- Serrano, L., Avila, J., 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. B. and Avila, J. (1984b) Involvement of the carboxy-terminal domain of tubulin in microtubule assembly and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 5989-5993.
- Shelansky, L. M., Gaskin, F. and Cantor, C. (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 765-768.
- Shivanna, B., Mejillano, M., Williams, T. and Himes, R. (1993) Exchangeable GTP binding site of  $\beta$ -tubulin. *J. Biol. Chem.* **268**, 127-132.
- Slebe, J. and Martínez-Carrion, M. (1976) Carbamoylation of aspartate transaminase and the pK value of the active site Lysyl residue. *J. Biol. Chem.* **251**, 5663-5669.
- Sloboda, R., Dentler, W. Rosenbaum (1976) Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly *in vitro*. *Biochemistry*, **15**, 4497-4505.
- Small, J. V. (1988) The actin cytoskeleton. *Electron Microsc. Rev.* **1**, 155-174.
- Spudich, J. E. and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871.
- Stark, G. (1972) Modification of protein with cyanate. *Methods Enzymol.* **25**, 579-584.
- Stearns, M. and Tew, K. (1985). Antimicrotubule effects of Estramustine, an antiproststatic tumor drug. *Cancer Res.* **45**, 3891-3897.
- Stearns, M., and Tew, K. (1988) Estramustine binds MAP-2 to inhibit microtubule assembly *in vitro*. *J. Cell Sci* **89**, 331-342.
- Stewart, J. and Young, E. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2nd Ed. Pierce Chemical Co. Rockford, IL. 214pp.
- Sullivan, K.(1988) Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 687-716.
- Tanford, C. (1967) en Willey and Sons (Eds), *Physical Chemistry of Macromolecules*, p.365-396
- Tew, K., Erickson, L., White, G., Wang, A., Schein, P. and Hartley-Asp, B. (1985) Cytotoxicity of estramustine, a steroid-nitrogen

- mustard derivative, through non-DNA-targets. *Mol. Pharmacol.* **24**, 324-328.
- Tew, K. and Stearns, M (1989) Estramustine a nitrogen mustard/steroid with antimicrotubule activity. *Pharmac. Ther.* **43**, 299-319.
- Tilney, L. (1976) The polymerization of actin part 3. Aggregates of nonfilamentous actin and its associated proteins: a storage form of actin. *J. Cell Biol.* **69**, 73-89.
- Tilney, L., Bryan, J., Bush, D., Fujiwara, K., Mooseker, M. and Murphy, D. (1973) Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* **59**, 267-275.
- Tucker, R. P. (1990) The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Research Reviews* **15**, 101-120.
- Vale, R., Reese, T. S., and Scheetz, M. P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, Kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- Vallee, R., Shpetner, H. and Paschal, B. M. (1989) The role of dynein in retrograde axonal transport. *Trends in NeuroSciences* **12**, 66-70
- Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Komm, S. G. and Olshevskaja, L. V. (1970) *J. Embryol. exp. Morphol.* **24**, 625-640.
- Vera, J. C., Rivas, C. and Maccioni, R. B. (1988a) Heat stable microtubule protein MAP-1 binds to microtubules and induces microtubule assembly. *FEBS Lett.* **232**, 159-162.
- Vera, J.C., Rivas, C. and Maccioni, R.B. (1988b) Antibodies to synthetic peptides from the tubulin regulatory domain interact with tubulin and microtubules. *Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6763-6767.
- Vera, J. C., Rivas, C. & Maccioni, R. B. (1989) Biochemical dissection of the role of the 1kDa C-terminal domain of tubulin subunits in the assembly of microtubules. *Biochemistry* **28**, 333-339.
- Von Schoultz, E., Lundblad, D., Bergh, J., Grankvist, K. and Enriksson, R. (1988) Estramustine binding protein and anti-proliferative

- effect of Estramustine in human glioma cell lines. *Br. J. Cancer* **58**, 326-329.
- Wallin, M., Deinum, J. and Fridén, B. (1985) Interaction of Estramustine phosphate with microtubule-associated proteins. *FEBS Lett.* **179**, 289-293.
- Wallin, M., Fridén, B., Rutberg, M. and Deinum, J. (1992) Charge dependency of the effects of estramustine derivatives on microtubule assembly *in vitro*. *Acta Histochemica, Suppl.-Band XXI,s* 45-53.
- Wang, M. and Stearns, M.E. (1988) Blocking of collagenase secretion by Estramustine during *in vitro* tumor cell invasion. *Cancer Res*, **42**, 6262-6271
- Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S-Y. and Kirschner, M. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 1858-1862.
- Weisenberg, R. (1972) Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science* **177**, 1104-1105.
- Wiche, G., Oberkanins, Ch. and Himmler, A. (1991) Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* **124**, 2170-273.
- Yamauchi, P. and Purich, D. (1987) Modulation of microtubule assembly and stability by phosphatidylinositol action on microtubule-associated protein-2. *J. Biol. Chem.* **262**, 3369-3375.
- Zimmerle, C. and Frieden, C. (1988) Effects of pH on the mechanisms of actin polymerization *Biochemistry* **27**, 7766-7772.

**7. COPIA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS**

## A $\tau$ Fragment Containing a Repetitive Sequence Induces Bundling of Actin Filaments

\*†Daniel M. Moraga, ‡Patricio Nuñez, ‡Jorge Garrido, and \*†Ricardo B. Maccioni

\*International Center for Cancer and Developmental Biology; †Faculty of Sciences, Universidad de Chile; and ‡Faculty of Biological Sciences, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

**Abstract:** Much indirect evidence suggests that the interconnections of actin microfilaments with the microtubule system are mediated by microtubule-associated proteins (MAPs). In this study we provide new data to support the interaction of a specific tubulin-binding domain on  $\tau$  with actin in vitro. In actin polymerization assays, the synthetic peptide VRSKIGSTENLKHQPGGG, corresponding to the first repetitive sequence of  $\tau$  protein, increased turbidity at 320 nm in a dose-dependent fashion. A salient feature of the  $\tau$  peptide-induced assembly process is the formation of a large amount of actin filament bundles, as revealed by electron microscopic analysis. An increase in the  $\tau$  peptide concentration resulted in a proportional increase in the bundling of actin filaments. It is interesting that a gradual decrease of pH within the range 7.6–4.7 resulted in a higher effect of  $\tau$  peptide in promoting bundles of actin filaments. A similar pH-dependent effect was observed for  $\tau$  protein-induced bundling. An analysis of the mechanisms that operate in the peptide induction of actin filament bundles suggests the involvement of electrostatic forces, because the neutralization of  $\epsilon$ -aminolysyl residues by selective carbamylation resulted in a complete loss of the peptide induction of actin bundles. The data suggest that a  $\tau$  repetitive sequence (also found in MAP-2 and MAP-4) containing a common tubulin binding motif may constitute a functional domain on  $\tau$  for the dynamics of the interconnections between actin filaments and microtubules. **Key Words:** Actin filaments—Bundling— $\tau$  proteins—Repetitive sequences—Synthetic peptides. *J. Neurochem.* 61, 979–986 (1993).

The cytoskeleton is a complex and dynamic cellular network of filaments that include actin filaments, microtubules, intermediate filaments, and their associated proteins (Maccioni and Arechaga, 1987; Bershadsky and Vasiliev, 1988). Studies at both the structural and morphological levels on the cytoplasmic organization indicate that the different components of the cytoskeletal network should be linked together (Ellisman and Porter, 1980; Schliwa, 1985; Danowski, 1989) and that their functions are coordinated to control the changes in cell shape, polarity, and cell movement (Schliwa, 1985; Joshi et al., 1985; Vale et al., 1985; Maccioni and Arechaga, 1987). Indirect evi-

dence, obtained using viscometry, photobleaching, cosedimentation, and electron microscopic analysis, suggests that the linkages of actin microfilaments with the microtubule system are mediated by microtubule-associated proteins (MAPs) (Griffith and Pollard, 1982; Sattilaro, 1986; Bershadsky and Vasiliev, 1988). At least three MAP proteins appear to bind to the actin molecule: MAP-1, according to studies on cultured cells (Asai et al., 1985), and MAP-2 and  $\tau$ , according to in vitro evidence (Griffith and Pollard, 1978; Sattilaro et al., 1981). MAP-2 and  $\tau$  proteins have been found to contribute to organizing actin filaments into discrete bundles (Griffith and Pollard, 1982), and Nishida et al. (1981) demonstrated that the formation of actin filament bundles is inhibited by MAP phosphorylation. On the other hand, the recovery of an actin cross-linking activity following dephosphorylation of MAPs has been also shown (Selden and Pollard, 1983). MAPs also have the capacity to induce bundles of microtubules in cells (Kanai et al., 1989; Lewis et al., 1989). It has been also reported that microtubule bundling induced by the  $\tau$  peptide V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> is mediated by electrostatic effects of this  $\tau$  fragment, leading to an increase in the lateral interactions between microtubules (Melki et al., 1991).

Despite the increasing amount of experimental evidence on the roles of MAPs in linking actin filaments, the protein domains on MAP-2 and  $\tau$  that could be involved in binding actin and their structural roles in the bundling process are not known. Recent sequence data, along with structural-functional studies, indicate that the high-molecular-weight components MAP-2 and MAP-4 and the intermediate-size protein  $\tau$  contain a tandem of three or four microtubule binding repeats (Lee et al., 1988; Lewis et al., 1988; Maccioni et al., 1989). The three binding elements found

Resubmitted manuscript received January 8, 1993; accepted January 28, 1993.

Address correspondence and reprint requests to Dr. R. B. Maccioni at International Center for Cancer and Developmental Biology, Casilla 70111, Santiago 7, Chile.

Abbreviation used: MAP, microtubule-associated protein.



in the immature  $\tau$  components ( $V^{187}-G^{204}$ ,  $V^{218}-G^{235}$ , and  $V^{250}-G^{267}$ ) are equivalent to the first ( $V^{247}-G^{264}$ ), third ( $V^{309}-G^{326}$ ), and fourth ( $V^{341}-G^{358}$ )  $\tau$  repeats found in some isoforms of adult brain (Kosik et al., 1989). These repeats contain part of the tubulin binding sequence on  $\tau$  and MAP-2. The presence of two actin binding sites on MAP-2 has been described, and at least one of these appears to be located on or in proximity to the tubulin binding domain (Sattilaro et al., 1981; Pollard et al., 1984). Most recent reports indicate that actin binds to a 32-kDa fragment of MAP-2 that also contains the tubulin binding domain (Sattilaro, 1986). Furthermore, the direct interaction of the peptide KVTSKCGSLGNIHHKPGGG, corresponding to the second repeated sequence on the immature  $\tau$  (third repeat on adult  $\tau$ ) and MAP-2 with actin and tubulin has been demonstrated in vitro (Correas et al., 1990).

In this study, we report the effects of the peptide VRSKIGSTENLKHQPGGG, corresponding to the first common repeated sequence on the MAP proteins MAP-2, MAP-4, and  $\tau$ , in promoting the formation of bundles of actin filaments, thus suggesting that this peptide may enhance the lateral interactions between actin polymers. Biochemical and electron microscopic data indicate that it is likely that the effects of MAPs on the formation of actin filament bundles could be mediated by their repetitive sequences, and this opens the possibility that repetitive tandem sequences on MAPs may play a major role as functional domains involved in the dynamics of the interconnection between actin filaments and microtubules.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

ATP type II,  $MgCl_2$ , EGTA, EDTA,  $NaHCO_3$ , MES, Tris, and imidazole were from Sigma Chemical Co. KCl and acetone were from Merck. Uranyl acetate and Parlodion electron microscopic grids were obtained from Ted Pella, Inc. The  $\tau$  peptides  $V^{187}-G^{204}$  (VRSKIGSTENLKHQPGGG),  $V^{218}-G^{235}$  (VTSKCGSLGNIHHKPGGG), and  $V^{250}-G^{267}$  (VQSKIGSLDNITHVPGGG) and the  $\beta$ II-tubulin peptide  $Y^{422}-G^{434}$  (YQQYQDATADEQQ) were obtained by chemical synthesis using an automatic solid-phase synthesizer (model 430A; Applied Biosynthesis) (Stewart and Young, 1984). The peptides were further purified by reverse-phase HPLC using a Nova-Pak  $C_{18}$  column (Rivas-Berrios et al., 1990). The bradykinin peptide (RPPGFSPFR) was obtained from Sigma.

### Purification of proteins

Actin was isolated from chicken skeletal breast muscle by the method of Spudich and Watt (1971). G-actin was stored at 4°C in 2 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM ATP, 0.2 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM dithiothreitol, and 0.02% sodium azide (as a preservative). Purified G-actin preparations were used fresh, usually during the week after purification.  $\tau$  protein was isolated from extracts of bovine brain as indicated by Herzog and Weber (1978), with modifications as indicated by Vera et al. (1988a).

### Protein and peptide carbamoylations

$\tau$  protein and the  $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$  were subjected to chemical modification with KCNO, which reacts with free  $\epsilon$ -aminolysine residues (Mellado et al., 1982). For peptide modification, 3 mg of the  $\tau$  peptide was incubated with 0.2 M KCNO or using variable KCNO concentrations, as indicated, in 0.1 M MES buffer (pH 6.6) for 1 h at room temperature, followed by chromatography in a column of Sephadex G-25 fine ( $20 \times 1$  cm) to separate the modified peptide from unreactive cyanate. The fraction number in which  $\tau$  peptide eluted in the Sephadex G-25 column was determined by radioactivity measurements using as a tracer a small fraction of  $^{14}C$ -carbamoylated  $\tau$  peptide or on the basis of fluorescamine determinations (Moraga et al., 1992), using the unmodified  $\tau$  peptide as a tracer, considering that the carbamoylated fragment and the unmodified peptide have the same elution volume. As a control for the peptide modification, 3 mg of  $\tau$  peptide was incubated with 0.2 M KCl. The fragment treated under these conditions was used as a control in the different assays. The native  $\tau$  protein was also subjected to chemical modification with KCNO on the basis of the same protocol (Mellado et al., 1982), using native  $\tau$  protein in MES buffer (pH 6.6) as a control. For experiments involving incorporation of  $K^{14}CNO$  into  $\tau$  peptide, 3 mg of the peptide was treated with 50–200 mM labeled cyanate (0.6  $\mu Ci/\mu mol$ ) by incubation for 30 min at 25°C, and a sample of the reacting solution was passed through a Biogel P-6 column to separate the modified  $\tau$  fragment from the unreactive cyanate. Similarly, for incorporation of labeled cyanate into  $\tau$  protein, 0.7 mg of purified  $\tau$  was allowed to react with 50–200 mM  $K^{14}CNO$ , and the modified protein was separated from free reagent using Sephadex G-25 (type medium) columns. Samples of the labeled carbamoylated  $\tau$  were also subjected to electrophoresis and analyzed as indicated by Mellado et al. (1982).

### Actin polymerization assay

The actin polymerization assay was carried out by incubation at room temperature of 0.4 mg/ml of purified G-actin, 50 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , and 1 mM ATP in 0.1 M MES buffer, pH 6.6. The mixtures (final volume, 0.2 ml) were maintained for 1 h at room temperature in Eppendorf tubes, and the actin polymerization products were analyzed by electron microscopy. For the analysis of the bundling process, turbidimetric measurements were performed at 320 nm. However, the analysis of polymerization of G-actin into actin filaments was followed by measurements of UV absorption change at 232 nm (Higashi et al., 1963).

### Electron microscopy

The different samples containing actin filaments resulting from in vitro assembly experiments, or other actin assembly products obtained immediately after polymerization in the presence or absence of  $\tau$  or tubulin peptides, were placed on carbon/Parlodion-coated grids for 1.5 min followed by staining with 1% aqueous uranyl acetate and examined in a Phillips model 300 electron microscope at 60 kV (Vera et al., 1988b).

## RESULTS

Monomeric actin obtained from chicken breast skeletal muscle was induced to polymerize in the presence of site-specific peptides from either  $\tau$  or the tubulin molecule at various concentrations. The synthetic



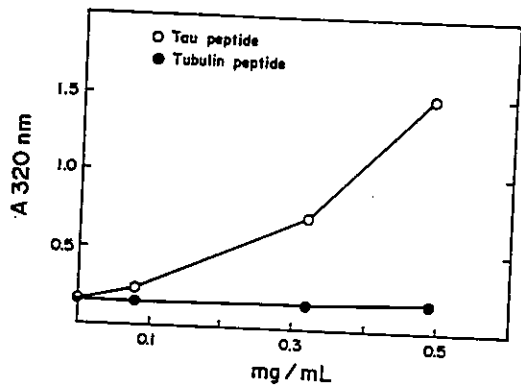


FIG. 1. Dependence of the turbidity change of actin polymers on the concentration of the  $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$ . Monomeric actin at a final concentration of 0.18 mg/ml was polymerized in 0.5 ml of a 0.1 M MES buffer containing 2 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl, and 1 mM ATP (pH 6.6) in the presence of variable concentrations of the  $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$  (O). The incubation mixtures were maintained for 1 h at room temperature, and the turbidity increase at 320 nm was recorded. Similarly, monomeric actin was allowed to assemble in the presence of the  $\beta$ II-tubulin peptide  $Y^{422}-G^{434}$  (●), and the turbidity increase was recorded as described above.

basis of the absorbance changes in the UV (232 nm), a condition that allows recording of polymerization of G-actin into actin filaments and not the bundling effects, a gradual increase in the UV absorbance in the presence of the  $\tau$  peptide was also observed, as compared with controls assayed in absence of  $\tau$  peptide (data not shown).

An ultrastructural analysis of the actin polymers formed in the presence of the site-specific  $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$  at selected intervals (as in the assay for Fig. 1) shows that the main structures detected by turbidity assays were bundles of actin filaments (Fig. 3B). Figure 3C shows the bundles of actin filaments of Fig. 3B at a higher magnification. Controls with actin filaments assembled from G-actin in the absence of  $\tau$  peptide are shown in Fig. 3A. Another set of controls with  $\tau$  peptide under the assembly conditions but in the absence of G-actin are shown in Fig. 3D.

The analysis of electron micrographs also revealed that the increase of the  $\tau$  peptide concentrations resulted in a quite proportional increase in the bundling of actin filaments. Bundles with morphometric characteristics identical to those with peptide  $V^{187}-G^{204}$  were observed in the presence of peptide  $V^{218}-G^{235}$ . However, no effects were produced by either the  $\beta$ II-tubulin peptide (422-434) or by  $\tau$  peptide  $V^{250}-G^{267}$ , corresponding to the third repeated sequence.

The data on the turbidity increase as a result of the  $\tau$  peptide-induced actin assembly, along with the electron microscopy of the assembled polymers, point to an effect of the  $\tau$  peptide in promoting bundling of actin filaments.

To examine the possible contribution of specific amino acid residues of  $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$  in the bundling activity, selective chemical modification of the peptide using KCNO was carried out. The modification reaction of the  $\tau$  fragment showed an irreversible

peptide corresponding to the first repetitive sequence of  $\tau$  protein ( $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$ , VRSKIGSTEN-KHQPGGG), which contains part of the tubulin binding site on  $\tau$ , increased turbidity at 320 nm in a dose-dependent fashion using the in vitro actin polymerization assays (Fig. 1). Similar results of the dose-dependent increase in turbidity of actin filaments with native  $\tau$  protein were obtained (data not shown), in agreement with results of Kotani et al. (1985). Similar effects were also obtained with  $\tau$  peptide corresponding to the second repeat  $V^{218}-G^{235}$ , even though concentrations of this peptide 1.24 times higher than that of peptide  $V^{187}-G^{204}$  were required to attain the same level of bundling effects. To test the specificity of the effects of  $\tau$  peptide on turbidity measurements associated with the formation of actin filaments, a control in which the effects of the acidic  $\beta$ II-tubulin peptide (YQQYQDATADEQG), which represents the main tubulin site for MAP-2 and  $\tau$  interaction (Maccioni et al., 1988; Cross et al., 1991), was assessed. Figure 1 shows that the increase in the turbidity developed by formation of the actin polymers. As an additional control, the cationic tensoactive peptide bradykinin, used as an in vitro model to test for charge contribution to actin bundling, produced ~50% of the bundles formed with the  $\tau$  peptide.

It was of interest to analyze the effects of  $\tau$  peptides on the relationships between the turbidity increase and actin concentration. The data of  $\Delta A_{320}$  as a function of actin concentration showed that turbidity values in the presence of  $\tau$  peptide were significantly higher than those of controls in the absence of peptide, over the entire range of actin concentrations (Fig. 2). When actin assembly was measured on the

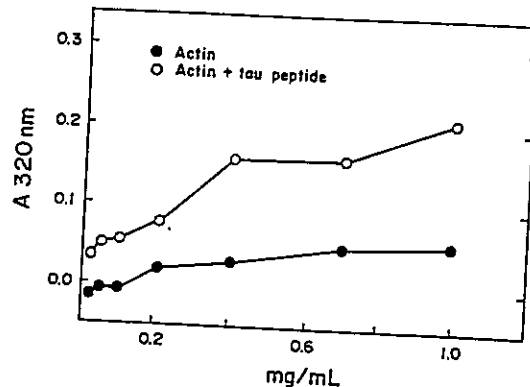


FIG. 2. Dependence of turbidity increase on actin concentration. Monomeric actin at different concentrations was allowed to polymerize in 0.1 M MES buffer containing 1 mM ATP, 50 mM KCl, and 2 mM  $MgCl_2$  (pH 6.6) either in the presence (O) or in the absence (●) of 0.09 mM  $\tau$  peptide. The incubation mixtures were maintained 1 h at room temperature, and the turbidity increase at 320 nm was measured.



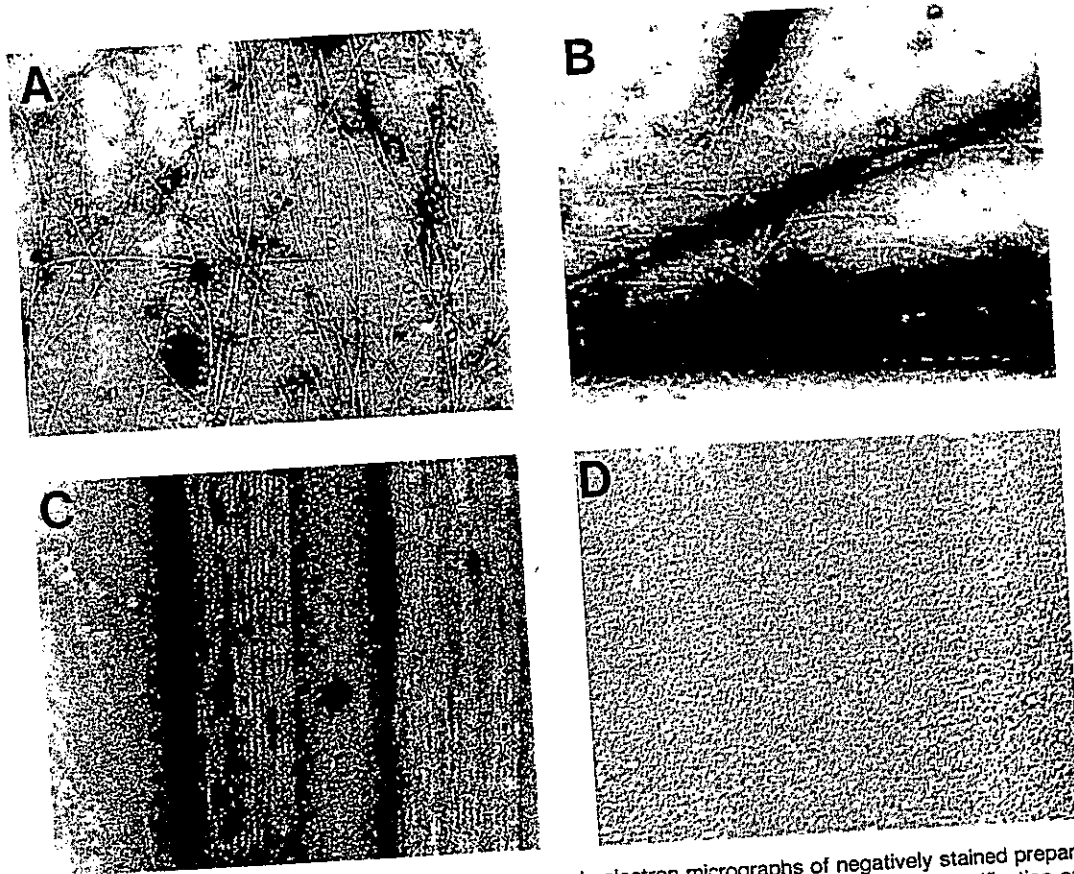


FIG. 3. Induction of bundles of actin filaments by  $\tau$  peptide, shown in electron micrographs of negatively stained preparations of actin filaments in the absence (A;  $\times 43,000$ ) or the presence (B;  $\times 43,000$ ) of  $0.09 \text{ mM}$   $\tau$  peptide. C: A higher magnification of an area of B.  $\times 150,000$ . D: A control of  $\tau$  peptide incubated under assembly conditions but in the absence of actin.  $\times 43,000$ . Samples assayed as described in the legend of Fig. 1 were mounted on a grid and stained as described in Materials and Methods.

nature as assessed by standard zonal chromatographic separation on Sephadex G-25 gels. A product with one carbamoylated amino acid residue resulted from the  $\tau$  peptide modification using a cyanate concentration of  $0.2 \text{ M}$ , on the basis of a reaction stoichiometry of  $0.81 \pm 0.24 \text{ mol}$  of KCNO/mol of  $\tau$  peptide. The electron microscopic studies (Fig. 4) showed that carbamoylation of  $\tau$  peptide resulted in a complete inhibition of bundling of actin polymers (Fig. 4A and B). It has been described that  $\tau$  protein has the capacity to promote actin bundling (Griffith and Pollard, 1982; Sattilaro, 1986). It is interesting that carbamoylation of native  $\tau$  protein also resulted in a significantly diminished capacity of  $\tau$  to induce bundles of actin polymers (Fig. 4C and D). Considering the irreversibility of  $\tau$  carbamoylation with KCNO, the data point to a possible role of a highly reactive lysine residue in the bundling activity of  $\tau$  fragment, suggesting the role of electrostatic components in the bundling effect of the  $\tau$  peptide. Thus, an experiment was performed in which the effects of pH variations on the bundling capacity of  $\tau$  peptide were tested.

The bundling effects on actin polymerization resulting after variations of pH were studied both in the presence and in the absence of  $\tau$  peptide. The turbid-

ity increase at  $320 \text{ nm}$  was determined at each pH value. It was interesting that in the *in vitro* experiments in the absence of  $\tau$  peptide, a gradual decrease of pH in the assembling solutions, from 6.6 to 4.7, resulted in an increased actin bundling (Fig. 5A). The effects of a fixed concentration ( $90 \text{ }\mu\text{M}$ ) of  $\tau$  peptide  $V^{187}\text{-G}^{204}$  on the turbidity increase resulting from the actin assembly at different pH values were analyzed. In this *in vitro* system, the assembly of actin polymers based on turbidity measurements (Fig. 5A) increased gradually when the pH decreased below 6.6. In the presence of the  $\tau$  peptide, an effect was also observed between pH 7.6 and 6.6, whereas no effect at all was observed in the absence of  $\tau$  fragment. This effect (0.07 absorbance units) at pH 7.3 was significantly lower than that observed (1.1 absorbance units) at pH 6.2. However, the bundling effects with the  $\tau$  peptide at pH 7.3 were almost the same as those obtained with the native  $\tau$  protein. Figure 5B shows the increase in absorbance at  $232 \text{ nm}$  resulting from actin filament assembly in the presence of  $\tau$  peptide at different pH values. In these experiments, the increase in UV absorption as a result of lowering pH value of the assembling solutions (Fig. 5B) revealed a higher extent of actin filaments formed. However, no increase in ab-

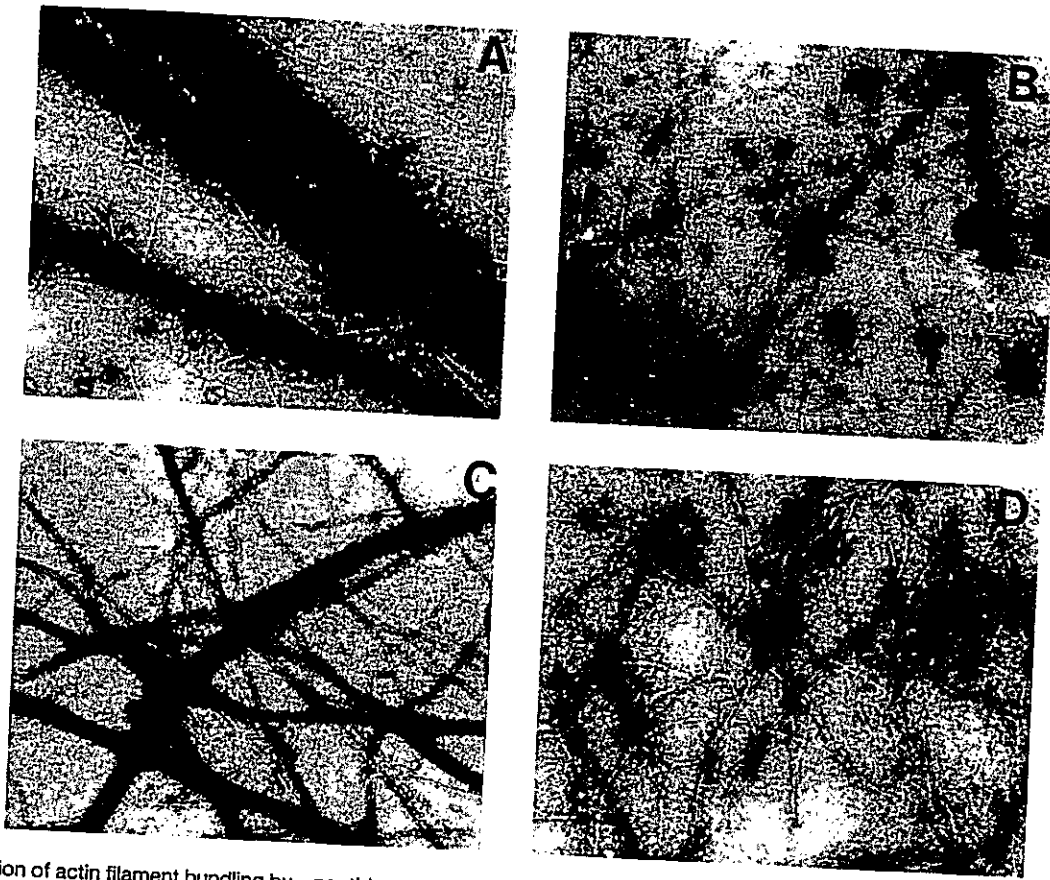


FIG. 4. Inhibition of actin filament bundling by  $\tau$  peptide modification with KCNO. Samples of monomeric actin under the assay conditions described in the legend of Fig. 1 were admixed with the  $\tau$  peptide  $V^{187}-G^{204}$  (A) or with the modified  $\tau$  peptide after reaction with 0.2 M KCNO (B) and allowed to polymerize. A control of actin bundles induced by addition of 100  $\mu$ g/ml of native  $\tau$  protein (C) and the assembly product after incubation with KCNO-modified  $\tau$  protein (D) are also shown. The peptide concentrations used in both assays were 180 nM. Polymers from the different samples were examined under the electron microscope.  $\times 43,000$ . Other details are described in Materials and Methods.

sorbance was detected in the absence of  $\tau$  peptide, as a result of just lowering the pH of the assembling solutions. The actin assembly as monitored by the UV absorbance change at 232 nm, even in the presence of

$\tau$  peptide, was not comparable to the significant turbidity increments observed at 320 nm on decreasing the pH in the assembly solution.

Actin samples polymerized at different pH values,

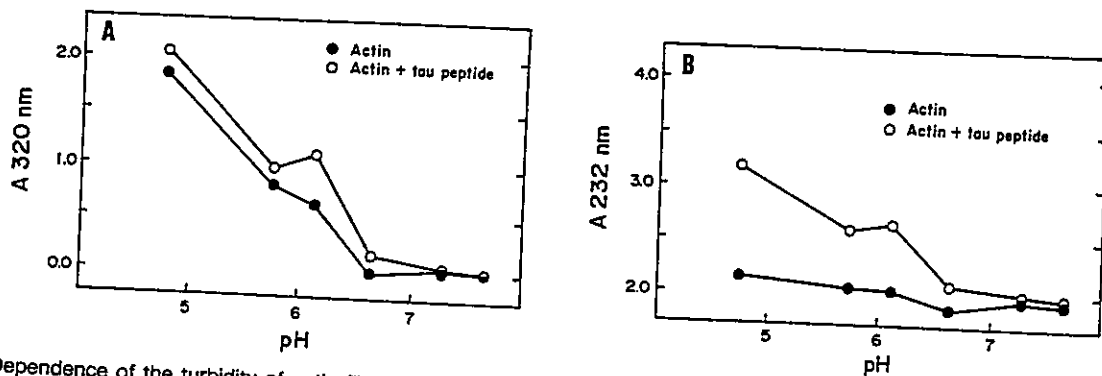


FIG. 5. Dependence of the turbidity of actin filaments on  $\tau$  peptide under different pH conditions. Samples of monomeric actin were induced to polymerize at different pH values under the assay conditions described in the legend of Fig. 1, either in the presence (○) or in the absence (●) of 90  $\mu$ M  $\tau$  peptide. The buffers used to stabilize the different pH values of the assembling solutions were 0.05 M Tris for pH values from 6.5 to 7.6 or 0.05 M imidazole for pH values from 4.5 to 6.4. The incubation mixtures were maintained for 1 h, at room temperature, and the changes in turbidity at 320 nm (A) or in the absorbance at 232 nm (B) were measured.



in the presence of  $\tau$  peptide, were negatively stained and examined by electron microscopy, demonstrating the induction of tight bundles of actin microfilaments by  $\tau$  peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>, like those seen in Fig. 3B, displaying a correlation between the amount of bundles with the increment in turbidity. According to the electron microscopic analysis, the increase in turbidity induced by pH variations in the absence of  $\tau$  peptide appears to be due to the formation of rather diffuse bundles of actin microfilaments that are not present at pH values exceeding 6.12 (data not shown). However, in the presence of  $\tau$  peptide compact bundles were the main assembly product.

## DISCUSSION

The repetitive tandem sequences on  $\tau$ , which are common to repeats on MAP-2 and MAP-4, were identified as microtubule binding motifs in these proteins (Lewis et al., 1988; Maccioni et al., 1989). These MAP repeats are inserted in highly conserved cationic moieties on these proteins, which are functional in regard to tubulin binding and its assembly into microtubules (Joly et al., 1989; Farías et al., 1992). It has been shown that MAP-2 and  $\tau$  have the capacity to induce formation of bundles of actin filaments *in vitro* (Griffith and Pollard, 1982; Sattilaro, 1986) and microtubule bundles in cultured cells (Lewis et al., 1989). Despite this information and the data on  $\tau$  sequences implicated in microtubule bundling (Melki et al., 1991), the precise domains on  $\tau$  involved in the actin bundling phenomenon are not known. The data presented here show that the first repeated sequence on  $\tau$  and also the second embryonic  $\tau$  repeat have the capacity to promote significant self-assembly of actin filaments into bundles of microfilaments (Figs. 1-3), thus suggesting that these  $\tau$  sequences contain the structural information to promote the bundling effect. The third immature  $\tau$  repeat (corresponding to the fourth repeat in adult  $\tau$ ) apparently failed to induce actin bundling, suggesting the specificity of  $\tau$  peptide interactions with actin filaments. Although there is no clear explanation for this particular observation, it is important to point out that this third  $\tau$  repeat is less cationic than the other two  $\tau$  sequences, with a lower isoelectric point (Ennulat et al., 1989). Furthermore, Farías et al. (1992) demonstrated that this  $\tau$  sequence did not exhibit an effect on microtubule assembly like that observed for the first and second repeats on  $\tau$ .

Previous studies have shown that  $\tau$  interacts with both actin and tubulin through its second repeated sequence V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> (VTSKCGSLGNIHHKPGGG) (Correas et al., 1990). However, these studies (Correas et al., 1990) revealed that even using  $\tau$  peptide concentrations twofold higher than those of  $\tau$  protein (3  $\mu$ M) required for bundling effects failed to induce formation of bundles. In the present studies, concentrations of  $\tau$  peptide of >50  $\mu$ M (molar ratio of 5:1 with

respect to actin) were necessary to observe a major bundling effect, values that are higher than molar  $\tau$  concentrations used to form the 26-nm bundles observed by Sattilaro et al. (1981). The requirement of  $\tau$  peptide concentrations over one order of magnitude higher than those of  $\tau$  required for actin bundling can be explained on the basis that the 18-mer  $\tau$  segment may contain only part of the sequence information contained on  $\tau$  protein to induce actin bundling. It is also possible that certain conformational aspects (Cleveland, 1987, 1990) associated with this domain on the native  $\tau$  molecule may be important to reach maximal levels of actin bundling. It is noteworthy that conformational aspects appear to be involved in  $\tau$  peptide-induced microtubule assembly (Maccioni et al., 1989) and in formation of microtubule bundles (Melki et al., 1991). Thus, it is reasonable to think that the role of  $\tau$  repeats to induce formation of actin bundles may strictly depend on the orientation and spatial disposition that is conferred on them by the three-dimensional configuration of the entire  $\tau$  molecule.

The electrostatic nature of the interaction of  $\tau$  peptides with actin filaments also appeared to be of major relevance. In the present series of experiments the effects of  $\tau$  peptide in inducing actin bundles depend on the constituent concentration (Maccioni et al., 1985) of the peptide, and this effect was drastically blocked after selective carbamylation of at least one lysine residue on the  $\tau$  peptide. Actually, when one lysine residue was carbamoylated, a complete loss of actin bundling was corroborated both by turbidity measurements and by electron microscopy. According to sequence data, the potential lysyl groups that could be involved in determining the bundling effects of  $\tau$  peptide are those at positions 190 and 198 on the first imperfect  $\tau$  repeated sequence, even though it has been difficult to define the precise contributions of each of those lysines to the total bundling effect. The high reactivity of  $\tau$  peptide NH<sub>2</sub> groups to KCNO modification at pH values close to the neutral pH indicates that the amino acid residues involved in the reaction should have an abnormally low pK value (Stark, 1972). A low pK value of reactive amino groups on  $\tau$  (and on  $\tau$  peptide) suggests a hydrophobic or slightly positively charged microenvironment around that amino group. Low pK reactive amino groups have been reported for several enzymes (Slebe and Martínez-Carrion, 1976), for the N-terminus of myoglobins (Garner et al., 1973), and for tubulin (Mellado et al., 1982). Clearly, these results point to electrostatic effects on the productive interaction of the first two  $\tau$  peptides with actin molecules leading to bundle formation. On the basis of the nature of this carbamylation reaction, it is likely that a lysyl residue on  $\tau$  peptide could be critical for peptide interaction with an acidic domain on the actin surface. Thus, neutralization of negatively charged subdomains on actin molecules by the cationic peptide fragment may result in a significant increase in actin interactions with



each other, preferably lateral interactions between microfilaments leading to formation of actin bundles. The strict dependence of bundling on the peptide concentration supports this interpretation, because an increase in the number of cationic species interacting with actin should result in a gradual charge neutralization on the actin acidic moiety, facilitating the bundling process.

The hypothesis on the involvement of electrostatic interactions between the  $\tau$  peptide and actin is also supported by data on the effect of a pH decrease on the actin bundling process. It appears possible that variations in the net charge of the first  $\tau$  peptide after decreasing pH values may be critical for peptide binding to actin molecule and the bundling process. The decrease in pH values is associated to a gradual protonation of carboxyl groups of acidic amino acid residues on the molecular surface of actin, together with an increase in the number of protonated  $\text{NH}_3^+$  groups from  $\epsilon$ -aminolysines, thus facilitating neutralization of negatively charged residues on the acidic moiety of the actin molecule. It is interesting to note that a turbidity change comparable to that obtained in the presence of native  $\tau$  was observed in the presence of  $\tau$  peptide, within a physiological pH range around 7.3. However, in the absence of  $\tau$  peptide, a decrease of pH between 7.6 and 6.6 has no effect on the net turbidity change. These studies are essentially based on an in vitro system of actin bundling mediated by  $\tau$  peptides, and the data on the turbidity increase below pH 6.6 have only implications on the mechanisms of bundling, based on the electrostatic effects. At the structural level of actin polymers, the decrease in pH resulted in a turbidity increase associated with actin bundle formation, and an even higher effect was observed in the presence of  $\tau$  peptide. Another possible turbidity-inducing element would be the formation of a larger number of actin filaments as the pH decreases. However, no increase in absorbance at 232 nm in the absence of  $\tau$  peptide was observed, indicating that this possibility is unlikely. The effects of decreasing pH on polymerization of actin filaments in the absence of any assembly-promoting factors has been also reported (Zimmerle and Frieden, 1988), but the effects are analyzed on the basis of methods to detect actin microfilaments rather than a bundling process. The effects of bradykinin on this in vitro actin bundling effect provide additional support for an electrostatic component in the interaction; however, it is important to point out that bradykinin-induced bundling did not reach optimal levels of bundling as those observed with peptides from the first two  $\tau$  repeats. Thus, it is likely that the bundling effects of  $\tau$  fragments may result from the fact that those sequences are integral parts of a molecular microenvironment on  $\tau$  protein, which could be specifically involved in the molecular recognition of actin leading to subsequent bundle formation.

Although there are no estimations of local concen-

trations of  $\tau$  in the cytoplasmic regions where actin bundles are assembled, it is possible that the effects reported here may be physiologically significant (Drubin et al., 1986). It would be reasonable to envisage this domain of  $\tau$  (and consequently the other MAP repetitive sequences) as a regulatory domain (Maccioni et al., 1989) of the microtubule-actin filament cytoskeleton, as it appears operationally connected to their functions of polymerization and aggregation, respectively. In this context, strong evidence exists indicating that posttranslational modifications such as phosphorylation are key processes in the modification of the affinity between  $\tau$  and tubulin, as well as between  $\tau$  and actin (Burns et al., 1984; Brugg and Matus, 1991). Thus, it is likely that enzymatic systems that modify the net charge of the repeated cationic domains on  $\tau$  may be part of the mechanisms that regulate the assembly dynamics of the cytoskeleton in the cell.

**Acknowledgment:** We are indebted to Mrs. Isabel A. Maccioni for help in the preparation of the manuscript. This research has been supported by grants from The Council for Tobacco Research, U.S.A., from Conicyt-Chile, and from the Directorate-General XII, European Community (to R.B.M.). D.M.M. was partially supported by fellowships from Conicyt and from the Graduate Department, University of Chile.

## REFERENCES

- Asai D. J., Thompson W. C., Wilson L., Dresden C. F., Schulman H., and Purich D. L. (1985) Microtubule-associated proteins (MAPs): a monoclonal antibody to MAP-1 decorates microtubules *in vitro* but stains stress fibers and not microtubules *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1434-1438.
- Bershadsky A. and Vasiliev J. (1988) *Cytoskeleton*. Plenum Press, New York.
- Brugg B. and Matus A. (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J. Cell Biol.* **114**, 735-743.
- Burns R. G., Islam K., and Chapman R. (1984) The multiple phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2: tubulin interaction. *Eur. J. Biochem.* **141**, 609-615.
- Cleveland D. (1987) The multitubulin hypothesis revisited: what have we learned? *J. Cell Biol.* **104**, 381-383.
- Cleveland D. (1990) Microtubule MAPPING. *Cell* **60**, 701-702.
- Correas I., Padilla R., and Avila J. (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem. J.* **269**, 61-64.
- Cross D., Dominguez J., Maccioni R. B., and Avila J. (1991) MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of beta tubulin. Studies with synthetic tubulin peptides. *Biochemistry* **30**, 4362-4366.
- Danowski B. (1989) Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J. Cell Sci.* **93**, 255-266.
- Drubin D., Kobayashi S., and Kirschner M. (1986) Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **466**, 257-268.
- Ellisman M. H. and Porter K. R. (1980) Microtubule structure of the axoplasmic matrix: visualization of cross-linking structures and their distribution. *J. Cell Biol.* **87**, 467-479.
- Ennulat D., Liem R., Hashim G., and Shelanski M. L. (1989) Two



- separate 18-amino acid domains of tau promote polymerization of tubulin. *J. Biol. Chem.* **264**, 5327-5330.
- Fariás G., Vial C., and Maccioni R. B. (1992) Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. *Mol. Cell. Biochem.* **112**, 81-88.
- Garner M., Garner W., and Gurd F. (1973) Determination of alpha-amino group pK by cyanate reaction. *J. Biol. Chem.* **248**, 5451-5455.
- Griffith L. M. and Pollard T. D. (1978) Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins. *J. Cell Biol.* **78**, 958-965.
- Griffith L. M. and Pollard T. D. (1982) The interaction of actin with microtubules and microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **257**, 9143-9151.
- Herzog W. and 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.
- Higashi S., Kasai M., Oosawa F., and Wada A. (1963) Ultraviolet dichroism of F-actin oriented by flow. *J. Mol. Biol.* **7**, 421-430.
- Joly J. C., Flynn G., and Purich D. L. (1989) The microtubule-binding fragment of microtubule-associated protein-2: location of the protease accessible site and identification of an assembly-promoting peptide. *J. Cell Biol.* **109**, 2289-2294.
- Joshi H. C., Chu D., Buxbaum R. E., and Heidemann S. R. (1985) Tension and compression in the cytoskeleton of PC12 neurites. *J. Cell Biol.* **101**, 697-705.
- Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Mori H., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T., and Hirokawa N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblast transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.* **109**, 1173-1184.
- Kosik K., Orecchio L., Bakalis S., and Neve R. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* **2**, 1389-1397.
- Kotani S., Nishida E., Kumagai H., and Sakai H. (1985) Calmodulin inhibits interaction of actin with MAP2 and tau, two major microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **260**, 10779-10783.
- Lee J. C., Tweedy N., and Timasheff S. N. (1978) *In vitro* reconstitution of calf brain microtubules: effects of macromolecules. *Biochemistry* **17**, 2783-2790.
- Lee M. G., Cowan N. J., and Kirschner M. W. (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* **239**, 285-288.
- Lewis S., Wang D., and Cowan N. (1988) Microtubule-associated protein MAP-2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* **242**, 936-939.
- Lewis S. A., Ivanov I. E., Lee G. H., and Cowan N. J. (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP-2 and tau. *Nature* **342**, 498-505.
- Maccioni R. B. and Arechaga J. (1987) *The Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*, p. 397. ICSU Press-IRL, Oxford.
- Maccioni R. B., Stewart J., and Cann J. (1985) Interaction of substance P with tubulin. *Eur. J. Biochem.* **154**, 427-435.
- Maccioni R. B., Rivas C., and Vera J. C. (1988) Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins. *EMBO J.* **7**, 1957-1963.
- Maccioni R. B., Vera J. C., Dominguez J., and Avila J. (1989) A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 568-579.
- Melki R., Kerjan P., Waller J.-P., Carlier M.-F., and Pantaloni D. (1991) Interaction of microtubule-associated proteins with microtubules: yeast lysyl- and valyl-t-RNA synthetases and t 218-235 synthetic peptide as model systems. *Biochemistry* **30**, 11536-11545.
- Mellado W., Slebe J. C., and Maccioni R. B. (1982) Tubulin carbamoylation: role of amino residues in microtubule assembly. *Biochem. J.* **203**, 675-681.
- Moraga D., Rivas-Berrios A., Fariás G., Wallin M., and Maccioni R. B. (1992) Estramustine-phosphate binds to a tubulin binding domain on microtubule associated proteins MAP-2 and tau. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 97-103.
- Nishida E., Kuwaki T., and Sakai H. (1981) Phosphorylation of microtubule-associated proteins (MAPs) and pH of the medium control interaction between MAPs and actin filaments. *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 575-578.
- Padilla R., Maccioni R. B., and Avila J. (1990) Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein tau. *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 35-41.
- Pollard T., Selden C., and Maupin P. (1984) Interaction of actin filaments with microtubules. *J. Cell Biol.* **99** (Suppl.), 33s-77s.
- Rivas-Berrios A., Hernandez M. A., Dominguez J., Avila J., and 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.
- Sattilaro R. F. (1986) Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry* **25**, 2003-2009.
- Sattilaro R. F., Dentler W. L., and LeCluyse E. L. (1981) Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments *in vitro*. *J. Cell Biol.* **90**, 467-473.
- Schliwa M. (1985) *The Cytoskeleton*. Springer-Verlag, Vienna.
- Selden C. S. and Pollard T. D. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* **258**, 7064-7071.
- Slebe J. and Martinez-Carrion M. (1976) Carbamoylation of aspartate transaminase and the pK value of the active site lysyl residue. *J. Biol. Chem.* **251**, 5663-5669.
- Spudich J. E. and Watt S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871.
- Stark G. (1972) Modification of protein with cyanate. *Methods Enzymol.* **25**, 579-584.
- Stewart J. and Young E. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd edit. Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois.
- Vale R., Reese T. S., and Scheetz M. P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- Vera J. C., Rivas C., and Maccioni R. B. (1988a) Heat stable microtubule protein MAP-1 binds to microtubules and induces microtubule assembly. *FEBS Lett.* **232**, 159-162.
- Vera J. C., Rivas C., and Maccioni R. B. (1988b) Antibodies to synthetic peptides from the tubulin regulatory domain interact with tubulin and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6763-6767.
- Zimmerle C. and Frieden C. (1988) Effects of pH on the mechanisms of actin polymerization. *Biochemistry* **27**, 7766-7772.

BBAPRO 34199

## Estramustine-phosphate binds to a tubulin binding domain on microtubule-associated proteins MAP-2 and TAU

Daniel Moraga <sup>a,b</sup>, Antonio Rivas-Berrios <sup>a</sup>, Gustavo Farías <sup>a</sup>, Margareta Wallin <sup>c</sup>  
and Ricardo B. Maccioni <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> International Center for Cancer and Developmental Biology (ICC), Santiago (Chile), <sup>b</sup> Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Santiago (Chile) and <sup>c</sup> Department of Zoophysiology, University of Göteborg, Göteborg (Sweden)

(Received 28 October 1991)

(Revised manuscript received 24 December 1991)

**Key words:** Estramustine; Estramustine-phosphate; MAP; Repetitive sequence; Microtubule-binding domain

Estramustine-phosphate (EMP), a phosphorylated conjugate of estradiol and nor-nitrogen mustard binds to microtubule-associated proteins MAP-2 and tau. It was shown that this estramustine derivative inhibits the binding of the C-terminal tubulin peptide  $\beta$ -(422-434) to both MAP-2 and tau. This tubulin segment constitutes a main binding domain for these microtubule-associated proteins. Interestingly, estramustine-phosphate interacted with the synthetic tau peptides V<sup>187</sup>-G<sup>212</sup> and V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup>, representing two major repeats within the conserved microtubule-binding domain on tau and also on MAP-2. This observation was corroborated by the inhibitory effects of estramustine-phosphate on the tau peptide-induced tubulin assembly into microtubules. On the other hand, the nonphosphorylated drug estramustine failed to block the MAP peptide-induced assembly, indicating that the negatively charged phosphate moiety of estramustine-phosphate is of importance for its inhibitory effect. These findings suggest that the molecular sites for the action of estramustine-phosphate are located within the microtubule binding domains on tau and MAP-2.

### Introduction

The multiple functions of microtubules, namely modulation of cell shape, organelle transport, protein secretion and mitosis appear to be mediated by at least two main protein systems: the cytosolic motors involved in many transport processes and the microtubule-associated proteins (MAPs) [1]. MAPs play essential cellular roles regulating the assembly of microtubules and stabilizing its structure [2-4]. Current evidence point to the involvement of these proteins in modulating the interactions between microtubules with other filamentous components of the cytoskeleton [5,6]. MAPs are proteins with a low level of molecular conformation [7] that contain a microtubule-binding domain which interacts with the C-terminal moieties in tubulin subunits [8-10] and a side domain which appears to be involved in their interactions with other cellular protein or with the microtubular surface [11,12].

Sequence data derived from cDNA clones revealed the existence of a tandem of common repeats located in the conserved region within the C-terminal one-third moiety of MAP-2 and tau [13,14]. Recent studies point to the involvement of these repetitive sequences in the productive interaction of MAP-2 and tau with the microtubule system [15-17]. Common antigenic determinants at the level of these repeats in MAP-2 and tau have been demonstrated using site-directed antibodies [18]. On the other hand, MAPs interact with specific binding sites within both the constant and variable C-terminal subdomains of tubulin isoforms [10,19]. The interaction of MAP-2 and tau with tubulin appears to be mediated by the binding of some of these repetitive sequences with the segment  $\beta$ -(422-434) within the conserved region of  $\beta$ -tubulin isotypes [20-22]. However, the high-molecular-weight components of MAP-1 appear to interact with an acidic moiety within the variable domains of the distinct isoforms of  $\beta$ -tubulin [10,19,23].

Estramustine (EM) is an adduct of estradiol and nor-nitrogen mustard, which has been shown to arrest mitosis [24], and it has proven to be effective in the treatment of prostatic carcinoma [25]. The drug appears to interact with MAPs [26,27]. On the other hand, previous studies have shown that the phospho-

Abbreviations: EM, estramustine; EMP, estramustine-phosphate; MAP, microtubule-associated protein.

Correspondence: R.B. Maccioni, ICC, Casilla 70111, Santiago 7, Chile.



rylated derivative estramustine-phosphate (EMP) blocks microtubule assembly and that this effect is mediated by the drug interaction with MAP-2 and tau [28,29]. Despite information that has been gained on the mechanisms of action of the drug on protein secretions mediated by MAPs, and its anti-neoplastic action [30-33], there is no information on the structural aspects of the EM and EMP binding domains on MAPs. It has previously been shown that EMP interacts with the tubulin binding fragment of MAP-2 [29]. We have therefore focused our studies on MAP-2 and tau domains for the interaction of EMP, using assembly analysis combined with studies on the binding of the drug to synthetic MAP peptides, and the effects of the EMP derivative on the interaction of C-terminal tubulin fragments with MAPs. Our studies demonstrate that EMP interacts specifically with the microtubule-binding domains, represented by the repetitive segments on MAP-2 and tau.

## Material and Methods

### Materials

Sucrose, dimethylsulfoxide, GTP type II-S, EGTA and the proteinase inhibitors PMSF, aprotinin and soybean trypsin inhibitor were from Sigma. Sephacryl types S-200 and S-300 were obtained from Pharmacia, and Biogel P-6 was from Bio-Rad. Phosphocellulose was obtained from Whatman. The drugs, EM and EMP and their tritiated radiolabeled derivatives were generously provided by Kabi Pharmacia AB (Sweden).

### Protein purification

Tubulin was purified by cycles of assembly-disassembly [34] followed by phosphocellulose chromatography [9]. For that purpose, microtubule protein was isolated from bovine brain by three temperature-dependent cycles of assembly and disassembly [9,34] and the microtubule pellets were resuspended in 0.02 M Mes (pH 6.5), 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA and 0.1 mM dithiothreitol (buffer PC) prior to the chromatographic step. Tubulin was separated from MAPs components by phosphocellulose chromatography [9]. This tubulin preparation (PC-tubulin) was used in all the experiments where purified tubulin was required. MAP-2 and tau were isolated as described by Vera et al. [35].

### Peptide synthesis

The tau peptides V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>: VRSKIGSTENLKHQ-PGGG, V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup>: VTSKCGSLGNIHHKPGGG, and V<sup>250</sup>-G<sup>267</sup>: VQSKIGSLDNITHVPGGG were synthesized on an automatic solid-phase peptide synthesizer (Type 430A, Applied Biosystems) and purified by reverse-phase HPLC on a Novopack C-18 column, with a Waters 501 apparatus. The purified peptides were sub-

jected to lyophilization and dissolved in buffer PC for the different experiments described below.

### Polymerization assay

Phosphocellulose-purified bovine brain tubulin (1.8 mg/ml) was adjusted to 0.1 M Mes (pH 6.8), 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 mM EGTA (buffer A) in the presence of the 0.16 mM of either tau peptides, and in the presence or absence of increasing concentrations of EMP. Aliquots of a fresh stock solution of EMP prepared in buffer A were added to 0.4 ml of assembly mixture in order to give the final concentrations indicated in Fig. 3. In the experiments using the non-phosphorylated derivative EM, the drug was dissolved in dimethylsulfoxide, and 4-10  $\mu$ l aliquots were added to 0.4 ml assembly mixture to give the final concentrations indicated in Fig. 6. Equivalent amounts of pure dimethylsulfoxide were added to controls assayed in the absence of the drug. After 3 min preincubation of the assembly mixture at 30°C either in the absence or the presence of the respective drugs, 1 mM GTP was added to the assembly system and tubulin assembly was assayed turbidimetrically [36], or using the sedimentation procedure as described by Cross et al. [10].

### Electron microscopy

Samples were obtained from the assembly mixture (both before and after the assembly mixture was subjected to cold reversibility of the assembly products), fixed in warm buffer A containing 1 mM GTP, stained with uranyl acetate and observed in a Philips 300 electron microscope [22].

### Binding studies

(A) *Ultracentrifugation method.* Binding of the <sup>3</sup>H-acetylated tubulin peptide  $\beta$ -II(422-434) to MAP-2 under non-assembly conditions was quantitated by ultracentrifugation in a Beckman Airfuge, using sucrose to provide density stabilization [37]. Centrifugation was carried out for 3 h. at room temperature at 140 000  $\times$  g on solutions containing 1.8 mg/ml MAP-2 and the desired concentration of tubulin peptide admixed with tracer amounts of <sup>3</sup>H-acetylated  $\beta$ -II(422-434) peptide. Under these conditions more than 99% of MAP-2 sedimented out of the 10  $\mu$ l aliquot removed from the top of the sedimentation column, while blanks containing no MAP-2 were allowed to introduce corrections for the small amount (around 3%) of unbound peptide sedimented during ultracentrifugation.

(B) *Small zone gel chromatography.* The experimental conditions were those of Maccioni et al. [20]. A mixture of purified MAP-2 (1.8 mg/ml) and stoichiometric amounts of the <sup>3</sup>H-acetylated  $\beta$ -tubulin peptide (sp. act = 1200 cpm/nmol) in a final vol. of 0.42 ml was incubated at 30°C for 16 min followed by chromatographic separation in a Sephacryl S-200 column (1.0  $\times$

28 cm) equilibrated in 0.05 M Mes (pH 6.8), 1 mM  $MgCl_2$ . The column flow was maintained at  $5.8 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  and fractions of 0.4 ml were collected. Other experimental details are indicated in the respective figure legend.

#### Direct interaction of [ $^3H$ ]estramustine-P with tau peptides

Tau peptides V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>, V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> or V<sup>250</sup>-G<sup>267</sup> were incubated for 10 min at 27°C either in the absence of EMP (control) or with 10–20  $\mu\text{M}$  EMP in the presence of tracer amounts of the  $^3\text{H}$ -labeled drug, and the mixtures subjected to zonal chromatography in a column of Biogel P-6. Fractions of 0.35 ml were collected. The peptide concentrations in each separated fraction were determined by the fluorescamine method and the radioactivity associated to the tritiated EMP was determined by scintillation counting.

#### Results

Current information points to the roles of protein binding domains involved in the specific macromolecular interactions between tau (or MAP-2) and the tubulin molecule [2,8–10,15,16]. A schematic representation of the main sequences of the  $\beta$ -II(422–434) segment within the C-terminal moiety of  $\beta$ -tubulin and three repetitive sequences derived from the immature tau are shown below.

The C-terminal  $\beta$ -tubulin sequence constitutes part of the tubulin domain for the binding of MAP-2 and tau [20]. On the other hand, it has been shown that the repetitive tau sequences, which are also present in MAP-2 [13,14] constitute microtubule binding domains. Certain isoforms of the adult brain tau contain these repeats while other isoforms contain an additional fourth repetitive sequence [13–16]. We used synthetic peptides corresponding to those sequences [15] to analyze the effects of EMP in interfering with the tubulin-MAP interactions, and at the level of the assembly system. Thus, we focused on the functional domains on MAP-2 and tau; e.g., MAP domains that recognize tubulin and their possible role in the interactions of EMP. Binding studies in the Airfuge, using variable

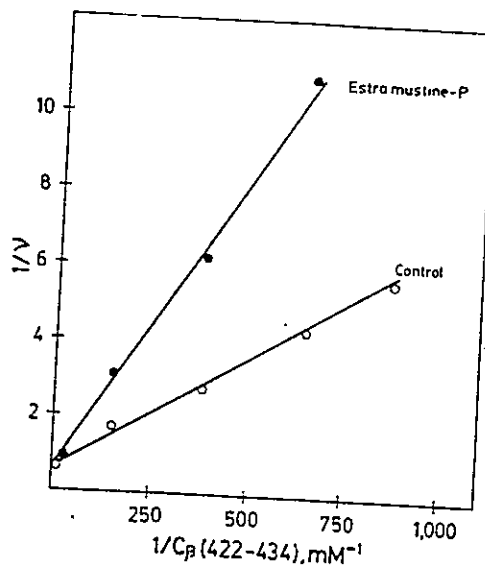


Fig. 1. Inhibition by EMP of the binding of labeled C-terminal tubulin peptide [ $^3\text{H}$ ]- $\beta$ -II(422–434) to purified brain MAP-2 at a final concentration of 1.8 mg/ml. Binding analysis was performed using the Airfuge ultracentrifugation method according to conditions described elsewhere [37]. Double reciprocal plots represent binding measurements of controls in the absence (○) or samples in the presence (●) of 10  $\mu\text{M}$  EMP.  $v$  represents the number of moles of the labeled  $\beta$ -II(422–434) tubulin peptide bound per mole of MAP-2.

concentrations of the  $\beta$ -II(422–434) tubulin peptide admixed with tracer amounts of the  $^3\text{H}$ -acetylated peptide and a fixed concentration of MAP-2 [20,38], were performed both in the absence and presence of EMP. Double reciprocal plots of Fig. 1 showed that the increase in tubulin peptide concentration [ $C_{\beta}(422-434)$ ] correlates with an increase in its binding to MAP-2 ( $v$ , moles of tubulin peptide bound per mole of MAP-2). However, at the same concentration of tubulin peptide, binding decreased in the presence of EMP, indicating a competitive inhibition by the drug on the interaction between the  $^3\text{H}$ -acetylated  $\beta$ -II(422–434) tubulin peptide and MAP-2. The interaction was also analyzed by small zone gel filtration on Sephacryl S-200. Complex formation between MAP-2 and the [ $^3\text{H}$ ]- $\beta$ -II(422–434) was demonstrated, in agreement with preliminary observations, as evidenced by the bimodal elution profiles of total labeled peptide displayed in Fig. 2. A significant decrease in the first peak corresponding to the [ $^3\text{H}$ ]tubulin peptide-MAP-2 complex, and an increase in the free labeled peptide peak were observed when the experiment was carried out in the presence of 10  $\mu\text{M}$  EMP. As controls, no radioactivity was observed at the elution volume of MAP-2 when the labeled peptide was chromatographed alone in the absence of MAP-2, and no complex formation was observed between the tubulin peptide and non-microtubular proteins such as myosin and bovine serum albumin.

a) C-terminal  $\beta$ -II-tubulin isoform (Conserved domain)

$\beta$  (422–434): YQQYQDATADEGG

b) Tau repetitive sequences

V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>: VRSKIGSTENLKHQPGGG

V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup>: VTSKCGSLGNIHKKPGGG

V<sup>250</sup>-G<sup>267</sup>: VQSKIGSLDNITHVPGGG

Scheme 1



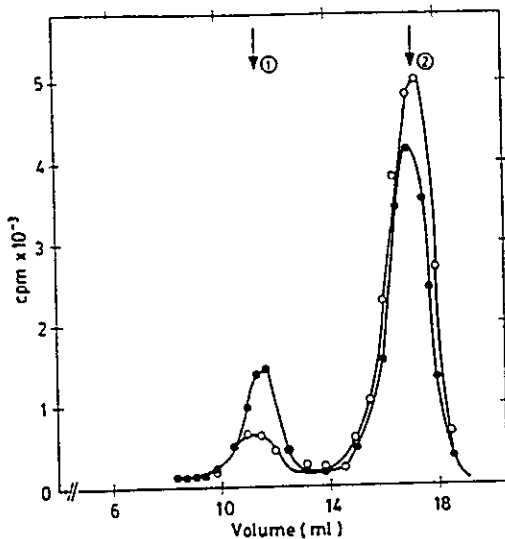


Fig. 2. Binding of the [<sup>3</sup>H]-β(422-434) tubulin peptide to MAP-2 as analyzed by zonal filtration chromatography. In the control experiment, the labeled peptide was admixed with MAP-2 in a final vol. of 0.42 ml, preincubated at 30°C and the mixture eluted in a 28×1 cm Sephacryl S-200 column [20,38] (●). The binding was also analyzed as indicated above, but in the presence of 24 μM EMP (○). Fractions of 0.4 ml were collected and the radioactivity measured by scintillation counting.

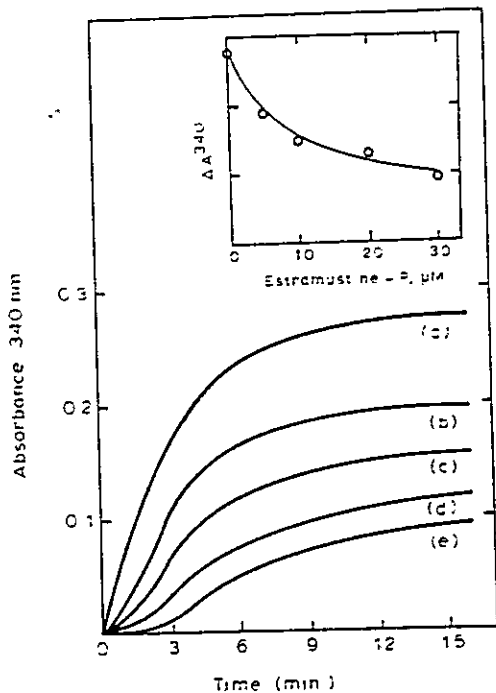


Fig. 3. Inhibition of tau peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>-induced tubulin assembly by increasing concentrations of EMP. Tubulin samples (1.8 mg/ml) were allowed to assemble with the tau peptide at a final concentration of 0.16 mM, in the absence (a) or in the presence of 5 μM (b), 10 μM (c), 20 μM (d) and 30 μM (e) of cold EMP. The inset shows a plot of the extent of polymerization ( $\Delta A_{340}$ ) as a function of the constituent concentration of EMP.

It has been reported that 18 amino acid synthetic peptides containing the microtubule-binding repeat sequences on MAP-2 and tau induce tubulin assembly in a cold-reversible fashion [15,17]. This assembly is mediated by the direct interaction of the synthetic MAP peptides with specific C-terminal domains of tubulin [10,15]. Thus, in order to shed light into the effects of the drug on tubulin assembly induced by peptides V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> and V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> were analyzed. Fig. 2 shows the assembly kinetics of tubulin induced by the first tau peptide, and the inhibition exerted by increasing concentrations of EMP. It is worth pointing out that the first two tau peptides induce tubulin assembly with a linear concentration-dependence fashion even at peptide/tubulin molar ratios of 12:1 [15], and that tau peptide concentrations used in these experiments were within linearity. The drug decreased the rate of peptide-induced assembly and the extent of microtubule polymerization as shown in the insert of Fig. 3. An increase in the constituent concentration of EMP resulted in a gradual inhibition of the level of assembly reached at plateau. Interestingly, an inhibition of around 50% in tau peptide-induced assembly was attained at 10 μM EMP, a level of drug concentration which produced a blockage in the binding of the βII(422-434) regulatory tubulin peptide to MAP-2. However, higher EMP concentrations have been reported to be needed for EMP inhibition of the assem-

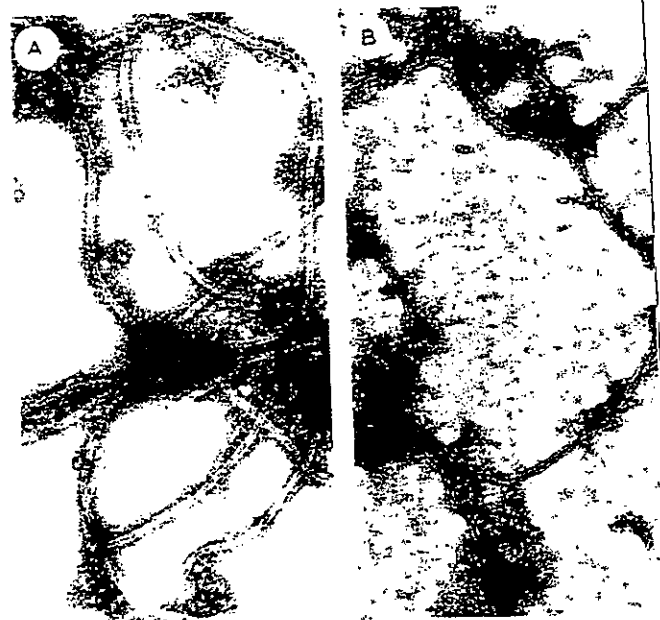


Fig. 4. Electron microscopy of polymers obtained in the presence of EMP. (A) Control, polymers assembled with tubulin (1.8 mg/ml) in the presence of the tau peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> (0.16 mM). (B) Electron micrograph of polymers induced to assemble by the tau peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> (0.16 mM) in the presence of 15 μM EMP. Magnification, 30000×.

bly of cycled microtubular protein preparations [29]. Non-estradiol phosphate ester derivatives like *p*-nitrophenylphosphate failed to block PC-tubulin assembly induced by tau peptide (data not shown), providing support to the specificity of the interaction. However, other negatively charged estradiol derivatives, such as estramustine-sulphate, were previously shown to act similarly to EMP as a MAP dependent microtubule inhibitor [39].

The structure of the tau peptide-induced polymers was analyzed by electron microscopy, showing that filamentous structures and amorphous material were the main assembly products in the presence of EMP (Fig. 4B), as compared with microtubule controls (Fig. 4A). Similar EMP inhibitions were observed when tubulin was induced to assemble with the second tau peptide V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> (data not shown).

The direct binding of EMP to the tau peptides corresponding to the repeated tau segments was analyzed in order to provide further information on the mechanisms by which EMP inhibits tubulin-MAP in-

Moraga et al, 1992

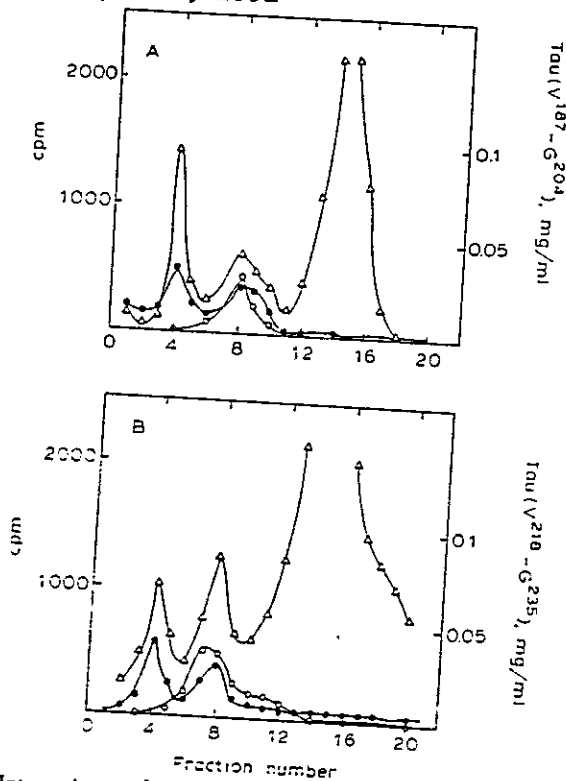


Fig. 5. Interaction of [<sup>3</sup>H]EMP with tau peptides V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> (A) and peptide V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup> (B) analyzed by zonal filtration chromatography in Biogel P-6 (50 mesh). The open triangles in A and B show the radioactivity profiles of [<sup>3</sup>H]EMP after chromatography in the presence of either tau peptide. The filled circles in A and B represent the elution patterns of the respective tau peptide eluted in the presence of 20  $\mu$ M labeled EMP as indicated above, as analyzed by the fluorescamine method. On the other hand, the open circles in A and B represent the control of the elution profile of the respective tau peptide, analyzed by fluorescamine. Other details as described in Materials and Methods.

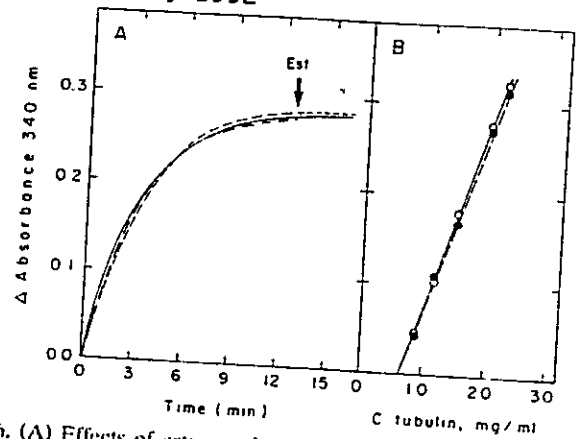


Fig. 6. (A) Effects of estramustine on tubulin assembly induced by the MAP-peptide corresponding to the repetitive sequence V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup>. Tubulin samples (1.8 mg/ml) were allowed to assemble with 0.16 mM MAP-peptide in the absence (continuous line) or after the addition at zero time of 10  $\mu$ M EM (dashed line) or 25  $\mu$ M EM (dashed and dotted line), and the turbidity increase recorded at 340 nm. On the other hand, 25  $\mu$ M EM was added to the control sample at plateau (after 12 min assembly assay) and the turbidity recorded over that time. (B) Plots of total extent of MAP-peptide induced tubulin assembly as a function of tubulin concentration. The continuous line represents the control plot obtained after assembly in the absence of EM. The dashed line is the plot obtained after assembly in the presence of 25  $\mu$ M EM. Other details as indicated in Materials and Methods.

teractions. In this experiment the tritiated drug was preincubated with tau peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> and subjected to zonal filtration chromatography on a Biogel P-6 column. A fraction of bound EMP co-eluted with the tau peptide at the elution volume corresponding to the peptide, and a large fraction of the unbound labeled drug eluted with a  $V_e$  corresponding to the internal volume of the column (Fig. 5A). These data suggest the formation of a complex between EMP and the first tau fragment. Interestingly, an additional peptide peak eluting at  $V_0$  resulted after preincubation of the tau fragment with EMP, since this peak was not observed when the free peptide was subjected to chromatography. The fractions of this peak contained aggregate forms of the tau peptide, possibly oligomers of higher size than the free synthetic peptide. The labeled drug also co-eluted with the apparently aggregated fraction of tau peptide (Fig. 5A). A similar elution pattern was obtained after chromatography of the second tau peptide V<sup>218</sup>-G<sup>235</sup>, incubated with tritiated EMP (Fig. 5B). Studies with the tau peptide V<sup>250</sup>-G<sup>267</sup> did not show interaction of EMP with this third tau repeat, peptide which has been also shown to have a poor effect on inducing tubulin assembly [15,17].

It is worth pointing out that several experiments using the original non-phosphorylated drug EM revealed that free [<sup>3</sup>H]estramustine does not interact at all with either tau peptide (data not shown). This observation was corroborated by experiments on the

effect of EM on MAP-induced microtubule assembly. Actually, when EM was assayed on the system in which tubulin assembly is induced by the tau peptide it failed to produce inhibition of polymerization and to disassemble preformed microtubules. This drug has been shown to interact with MAP-1 and MAP-2 [26,27], and did not inhibit formation of microtubules induced by the peptide V<sup>187</sup>-G<sup>204</sup> (Fig. 6A). Furthermore, EM did not affect at all the minimal concentration for the assembly (Fig. 6B). Furthermore, extrapolation to the polymer coordinate in the plot of Fig. 6B [40] indicate that there is no significant change in the critical concentration ( $C_c$ ) for tau-peptide-induced assembly in the presence of EM.

### Discussion

The studies were oriented to elucidate the estramustine-phosphate binding domains on MAP-2 and tau. On the basis of recent information on the functional sites involved in the protein interactions between tubulin and MAPs, we analyzed the effects of the drug on the binding of the synthetic tubulin peptide  $\beta$ -II(422-434) to MAP-2. It is evident from the Airfuge binding experiment of Fig. 1, and the comparison of the elution profiles obtained after zonal chromatography in the absence and the presence of EMP, that the drug interferes with the interaction between the site-specific tubulin peptide and MAP-2. Small zone chromatography has proven to be a useful approach to analyze the interaction of tubulin fragments with different MAPs [20,38]. Furthermore, the double reciprocal plot derived from the statistical binding of  $\beta$ -II(422-434), indicates that EMP competes with the tubulin fragment for the binding to the microtubule-associated-protein MAP-2. These studies suggest the interaction of EMP with a domain on MAP-2 responsible for its binding to tubulin.

Another line of studies indicated that MAP-tubulin interaction is mediated by both electrostatic and conformational effects, and that a cationic moiety present in MAP-2 and tau interacts with amino acid residues within the C-terminal domain of tubulin isoforms [10,41]. Thus, it is likely that EMP may interact with basic amino acid residues in the cationic segment of the tubulin binding domain on MAP-2, and possibly on tau. In addition, previous studies demonstrated the interaction of EMP with the native tau protein and the tubulin binding fragment on MAP-2 [29,42].

Therefore, the effect of EMP on tubulin assembly driven by tau peptides containing the repetitive sequences was analyzed. These peptides define sequences that also exist on MAP-2 binding domains [13-16,43]. The data shows that the drug interferes with peptide-induced microtubule assembly, an effect which may be mediated by EMP interference with the

productive interaction between tau peptides and tubulin leading to polymer assembly. It has been shown that the action of tau peptides in inducing tubulin assembly follows a linear dependence with the peptide concentration [15], and that stoichiometrically higher amounts of tau peptide in respect to tubulin were required to reach a significant level of polymerization. The effect of EMP at concentrations below those used for peptide to induce assembly may reflect the binding of EMP to several molecules of the same tau peptide sequence, possibly by inducing aggregation as deduced from Fig. 5. The results on the assembly experiments were thus confirmed at the level of electron microscopy, where filamentous structures and incomplete microtubules were observed after assembly in the presence of EMP. Since EMP does not interact with tubulin [29], the results strongly suggest that EMP could interact with MAP domains at the level of the repetitive sequences. Further demonstration of this hypothesis was obtained from the Bio-Gel P-6 zonal chromatographic experiments of Fig. 6 which indicate direct interaction between EMP and the peptides containing the first two sequences found in the repeat tandem within the conserved regions in both tau and MAP-2 [13-15].

On the other hand, estramustine, the non-phosphorylated conjugate of estradiol and nor-nitrogen mustard, failed to inhibit tau peptide-induced tubulin assembly. In addition, EM did not affect preassembled microtubules. These findings agree with previous observations on a lesser specificity of the interaction of EMP with microtubular components as compared with EMP [29]. The phosphorylated drug EMP interacts with at least two sites on tau [39] and with 5-6 sites on MAP-2 with a dissociation constant of 20  $\mu$ M [40]. However, it has been reported that the non-phosphorylated drug EM binds mainly to the high-molecular weight components MAP-1 and MAP-2 [26]. The observations taken together with the findings on the interaction of the EMP derivative with the repetitive domain on MAP-2, suggest that EM and EMP may bind to different domains on MAPs. The present data also suggest that the negatively charged phosphate moiety could be critical for the selective interaction of EMP with the functional domain on MAPs. This information however, does not allow predictions on the possible sites on MAPs for EM interaction. The molecular nature of this drug suggests that a hydrophobic domain on MAPs rather than the cationic microtubule-binding moiety might be involved in the interaction of EM with MAPs. Thus, the phosphate moiety of EMP seems to be of importance for its MAPs-dependent effect, since only negatively charged estradiol-mustard derivatives have such an effect, suggesting the functional role of a negatively charged substituent at positions 17 on the estrogen moiety [39].

On the contrary, both the non-charged EM and a positively charged derivative do not affect the tubulin-MAPs interactions [39].

### Acknowledgements

This research has been supported by grants from The Council for Tobacco Research USA, the Directorate General XII of the European Community and from Conicyt-Chile (to RBM), an advanced graduate student Conicyt grant and a Conicyt Fellowship to DM, and from the Swedish Research Council and Pharmacia Leo (to M.W.). We would like to thank Kabi Pharmacia AS for the generous gifts of estramustine and the labeled derivative. We also thank the laboratory assistance of Clarisa Vial.

### References

- 1 Bershadsky, A. and Vasiliev, J. (1988) Cytoskeleton, Plenum Press, New York.
- 2 Maccioni, R.B. and Arechaga, J. (1987) The Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development, ICSU Press-IRL, Oxford University Press, 397 pp.
- 3 Drubin, D., Kobayashi, S. and Kirschner, M.W. (1986) *Ann. New York Acad. Sci.* 466, 257-268.
- 4 Kanai, Y., Takemura, R., Oshinima, T., Mori, H., Ihara, Y., Masashi, Y., Masaki, T. and Hirokawa, N. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 1173-1184.
- 5 Danowski, B. (1989) *J. Cell Sci.* 93, 255-266.
- 6 Griffith, L.M. and Pollard, T.D. (1978) *J. Cell Biol.* 76, 958-965.
- 7 Cleveland, D. (1990) *Cell* 60, 701-702.
- 8 Serrano, L., Avila, J. and Maccioni, R.B. (1984) *Biochemistry* 23, 4675-4678.
- 9 Vera, J.C., Rivas, C. and Maccioni, R.B. (1989) *Biochemistry* 28, 333-339.
- 10 Cross, D., Dominguez, J., Maccioni, R.B. and Avila, J. (1991) *Biochemistry* 30, 4362-4366.
- 11 Vallee, R. and Shpetner, H. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59, 909-932.
- 12 Voter, W.A. and Erickson, H.P. (1982) *J. Ultrastruct. Res.* 80, 374-382.
- 13 Lewis, S., Wang, D. and Cowan, N. (1988) *Science* 242, 936-939.
- 14 Kosik, K., Orecchio, L., Bakalis, S. and Neve, R. (1989) *Neuron* 2, 1389-1397.
- 15 Maccioni, R.B., Vera, J.C., Dominguez, J. and Avila, J. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 568-579.
- 16 Joly, J.C., Flynn, G. and Purich, D.L. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 2289-2294.
- 17 Ennulat, D., Liem, R., Hashim, G. and Shelanski, M.L. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 5327-5330.
- 18 Rivas-Berrios, A., Hernández, M.A., Dominguez, J., Avila, J. and Maccioni, R.B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1040, 382-390.
- 19 Paschal, B.M., Obar, R.A. and Vallee, R.B. (1989) *Nature* 342, 569-572.
- 20 Maccioni, R.B., Rivas, C. and Vera, J.C. (1988) *EMBO J.* 7, 1957-1963.
- 21 Rivas, C., Vera, J.C. and Maccioni, R.B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6092-6096.
- 22 Vera, J.C., Rivas, C. and Maccioni, R.B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6763-6767.
- 23 Rodionov, V.I., Gyoeva, F.K., Kashina, A.S., Kuznetsov, S.A. and Gelfand, V.Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5702-5707.
- 24 Hartley-Asp, B. (1984) in *Cancer Chemotherapy and Selective Drug Development* (Harraps, K., Davis, W. and Calvert, A., eds.), pp. 425-429, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- 25 Jonsson, G., Hogberg, B. and Nilsson, T. (1977) *J. Scand. Urol. Nephrol.* 11, 231-238.
- 26 Stearns, M. and Tew, K. (1988) *J. Cell Sci.* 89, 331-342.
- 27 Stearns, M., Wang, M., Tew, K. and Binder, L. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 2647-2656.
- 28 Wallin, M., Deinum, J. and Friden, B. (1985) *FEBS Lett.* 179, 289-293.
- 29 Friden, B., Wallin, M., Deinum, J., Prasad, V. and Ludueña, R. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 257, 123-130.
- 30 Wang, M. and Stearns, M. (1988) *Cancer Res.* 48, 6262-6267.
- 31 Stearns, M., Wang, M. and Sousa, O. (1991) *J. Cell Sci.* 98, 55-63.
- 32 Sheridan, V.R., Speicher, L.A. and Tew, K.D. (1991) *Eur. J. Cell Biol.* 54, 268-276.
- 33 Marrel, M., Storme, G.A., Dragonetti, C., de-Bruyne, G., Hartley-Asp, B., Segers, J. and Rabaey, M. (1988) *Cancer Res.* 48, 1842-1846.
- 34 Shelanski, M.L., Gaskin, F. and Cantor, C.R. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 765-768.
- 35 Vera, J.C., Rivas, C. and Maccioni, R.B. (1988) *FEBS Lett.* 232, 159-162.
- 36 Gaskin, F., Cantor, C.R. and Shelanski, M.L. (1974) *J. Mol. Biol.* 89, 737-758.
- 37 Maccioni, R.B., Cann, J.R. and Stewart, J.M. (1985) *Eur. J. Biochem.* 154, 427-435.
- 38 Cann, J.R., York, E., Stewart, J.M., Vera, J.C. and Maccioni, R.B. (1988) *Anal. Biochem.* 175, 462-473.
- 39 Friden, B., Rutberg, M., Deinum, J. and Wallin, M. (1991) *Biochem. Pharmacol.* 42, 997-1006.
- 40 Weisenberg, R.C. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 466, 543-551.
- 41 Maccioni, R.B., Serrano, L., Avila, J. and Cann, J.R. (1985) *Eur. J. Biochem.* 156, 375-381.
- 42 Burns, R.G. (1990) *Cell Motil. Cytoskeleton* 17, 167-173.
- 43 Goedert, M. and Jakes, R. (1990) *EMBO J.* 9, 4225-4230.