

UCH-FC
Biotecnología
H 899e
C.L

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



Estudio de la interacción entre cdk5-p35 y cdk5-tau en células neuronales, y su implicancia en la enfermedad de Alzheimer

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Claudia Herminia Huichalaf Navarrete

**Enero, 2006
Santiago - Chile**

Director de Tesis: Prof. Dr. Ricardo B. Maccioni

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Portada	i
Informe de Aprobación	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	v
Abstract	vi
Abreviaturas	ix
Introducción	1
Hipótesis de trabajo y objetivos	7
Materiales y Métodos	8
Materiales: Material biológico	8
Reactivos	8
Reactivos y materiales para cultivo de células	8
Anticuerpos	9
Partidores	9
Vectores	9
Métodos: Cultivo celular	10
Plasmidios	10
Preparación de fibras de A β	11

Transfección de células Cos 7 y N2A	12
Ensayo de la actividad quinasa	12
Ensayos de Microscopía	13
Análisis de FRAP y FRET	14
Resultados	18
Discusión	39
Conclusiones	46
Bibliografía	49

INDICE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema configuración microscopio LSM Meta 510 Zeiss	14
Figura 2	Modelo utilizado para el cálculo del porcentaje de FRAP, y Fracción Móvil.	15
Figura 3	Gel Agarosa 1 %	19
Figura 4	Western Blot detectando proteínas de fusión.	20
Figura 5	Actividad cdk5-YFP y cdk5 Y15F YFP.	21
Figura 6	Distribución de proteínas de fusión	22
Figura 7	FRAP cdk5 en condiciones control y tratado con A β por 24 horas y H ₂ O ₂ 1 h.	23
Figura 8	FRAP p35-CFP en condiciones control y tratado por 1 hora con peróxido de hidrógeno 100 μ M.	24
Figura 9	FRAP de cdk5 mt YFP, control y tratado con 100 μ M de H ₂ O ₂ por 1 hora.	25
Figura 10	FRET entre cdk5-YFP y p35-CFP, sin tratamiento.	28
Figura 11	FRET entre cdk5-YFP y tau-CFP, sin tratamiento	29
Figura 12	FRET entre tau-CFP y tau-YFP y entre cdk5 mt-YFP y tau-CFP	30
Figura 13	Porcentaje de FRET de situaciones controles.	30
Figura 14	FRET cdk5-YFP p35-CFP tratado con 10 μ M A β por 24 horas.	34

Figura 15	FRET cdk5-YFP p35-CFP tratado con 100 μ M de H_2O_2 por 1 hora.	35
Figura 16	Porcentaje de FRET cdk5-YFP y p35-CFP tratados con $A\beta$ y H_2O_2 .	36
Figura 17	FRET entre cdk5-YFP y tau-CFP, tratado con 10 μ M de $A\beta$ por 24 horas.	37
Figura 18	FRET entre cdk5-YFP y tau-CFP, tratado con 100 μ M H_2O_2 por 1 hora y FRET entre tau-CFP y tau-YFP expuesto por 1 hora a 100 μ M peróxido de hidrógeno. Gráfico porcentaje FRET.	38



**“ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE cdk5-p35 y cdk-tau EN
CELULAS NEURONALES, Y SU IMPLICANCIA EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

**Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

CLAUDIA HUICHALAF NAVARRETE

Dr. Ricardo Maccioni Barahona
Director de Memoria de Título

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Christian González - Billault
Presidente Comisión

Dr. Andrew Quest
Profesor corrector

Santiago de Chile, _____ 2006

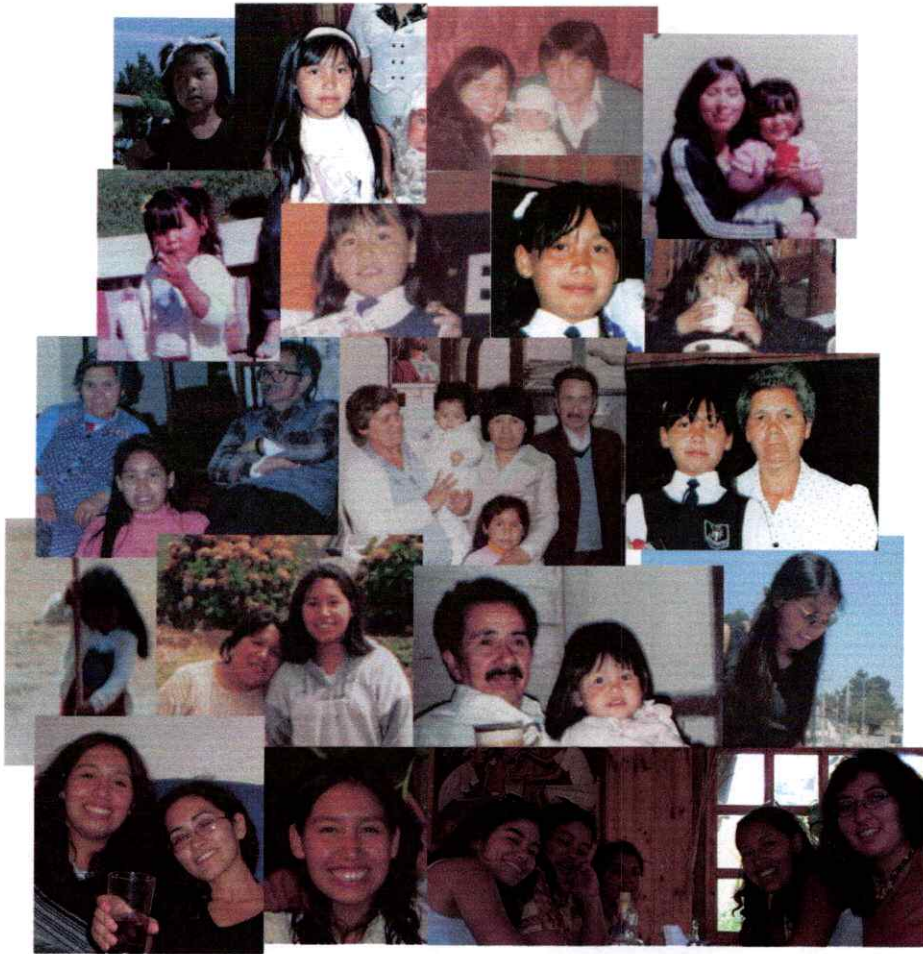
A mi madre y a mi abuela

donde quiera que estés.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mi familia, por apoyarme en todas las decisiones que tomé durante estos años, a mi madre, mi abuela y mi tía, muchas gracias por todo, aunque esté lejos siempre están en mi memoria y en mi corazón. También quisiera agradecer a mis compañeros y amigos, que hicieron de estos años de estudio, los más memorables que pudieran existir, muchas gracias por estar siempre ahí cuando los necesité, por todo lo que compartimos, por todo lo que soportamos, mucha gracias Paula, Karina, Carola, Pabla, Karen, Mario, Brenda. Por supuesto también muchas gracias a mi laboratorio por todo lo recorrido, aunque ya se ha ido mucha gente, siempre recordaremos aquellos carretes juntos, y nos encontraremos en algún lugar del mundo. También muchas gracias al laboratorio de membranas por toda su ayuda y buena onda.

Muchas gracias a todos, son muy importantes para mí, y quiero que sepan que sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.



*Los
interrogantes más sencillos
son los más profundos.
¿Dónde has nacido ? ¿Dónde esta tu hogar ?
¿A dónde vas ?
¿Qué haces ?*

*Plantéatelos
de tiempo en tiempo,
y observa como cambian
tus respuestas.
Richard Bach, Ilusiones*

RESUMEN

Se ha descrito que la proteína quinasa dependiente de ciclina cdk5, y su activador neuronal p35 están involucrados en el proceso de desarrollo axonal (Paglini y cols., 1998). Nuestro laboratorio descubrió que la desregulación de la actividad quinasa de cdk5 es determinante en los procesos neurodegenerativos (Maccioni y cols., 2001a,b; Alvarez y cols., 1999; 2001). Cdk5 es una proteína Ser-Thr quinasa con actividad post-mitótica que fosforila la secuencia de consenso KSPXK en la tau, proteína involucrada en la polaridad neuronal (Tsai y cols., 1996). La función crítica de cdk5 en la fosforilación de tau y su papel en el desarrollo neuronal, indican que en su regulación operan mecanismos de gran sensibilidad molecular. Además, evidencia experimental apoya el papel central del complejo cdk5/p35 en la migración neuronal y en la formación de procesos neuronales. También, cdk5 participa en el procesamiento y regulación del ensamble de los neurofilamentos, componentes de la arquitectura neuronal, a través de un control fino en las fosforilaciones de estas proteínas y en su transporte dentro de la neurona.

En el laboratorio se ha demostrado que la alteración de la función reguladora de las señales moleculares normales de cdk5 es determinante en los procesos degeneración y muerte neuronal. Además, otros estudios indican que cdk5 juega un importante papel en la vía neurodegenerativa desencadenada por la presencia de fibras amiloideas en cultivos primarios de neuronas hipocampales, relacionando estos descubrimientos a los cambios moleculares que llevan a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Alvarez y cols., 2001). El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la interacción entre los sistemas cdk5-p35 y cdk5-tau, y los cambios en la distribución de estas proteínas, en células de neuroblastoma tratadas con el péptido

beta-amiloide [$A\beta(1-42)$], por medio de microscopía confocal y en especial una técnica emergente de la biología celular, como es el FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Para estos estudios se obtuvieron proteínas de fusión de cdk5, p35 y de la proteína tau, cada una de éstas fusionadas con las proteínas fluorescentes amarilla y celeste (YFP y CFP). Estas construcciones moleculares fueron transfectadas en células de neuroblastoma, que fueron crecidas bajo condiciones normales de cultivo, y realizando distintos tratamientos tanto con el péptido $A\beta$ como con especies reactivas de oxígeno (ROS), en nuestro caso peróxido de hidrógeno. Estas construcciones, con sus respectivos activadores fueron capaces de producir un proceso de transferencia de energía reflejado en un cambio en la fluorescencia, detectado por un aumento en la intensidad de fluorescencia del dador en condiciones de toxicidad. Además, utilizando la técnica de recuperación de la fluorescencia después del foto-blanqueado (FRAP), fue posible observar la distribución y la movilidad de la quinasa cdk5, de su activador p35, y de una mutante generada en el laboratorio. Los estudios mostraron que existía una tendencia a disminuir el porcentaje de FRAP en presencia de tratamientos que simulan la enfermedad de Alzheimer. Creemos que este trabajo tiene gran relevancia en el estudio de las alteraciones en los procesos de interacción de proteína-proteína que ocurren en las enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, y que puede contribuir como modelo en la investigación de inhibidores de este complejo.

ABSTRACT

It has been described that the cyclin-dependent protein kinase cdk5, and its neuronal activator p35, are involved in the axonal development (Paglini et al., 1998). Our laboratory discovered that the deregulation of this kinase activity is a critical step in neurodegenerative processes (Maccioni et al., 2001a,b; Alvarez et al., 1999; 2001). Cdk5 is a Ser-Thr protein kinase with post-mitotic activity that phosphorylates the consensus sequence KSPXK in neuronal tau, protein involved in neuronal polarity (Tsai et al., 1996). The critical function of cdk5 in tau phosphorylation, and its role in the neuronal development, indicates that very sensitive mechanisms operate in their regulation. In addition, experimental evidence supports a central role for the cdk5/p35 complex in neuronal migration and the formation of neuronal processes. Also, cdk5 participates in the processing and regulation of neurofilaments assembly, by fine controls in the phosphorylation/ dephosphorylation of these proteins and their transport.

Our laboratory demonstrated that the alterations of the molecular functions modulating the normal signals of cdk5 are critical in the neuronal death process and neurodegeneration. In addition, other studies indicate that cdk5 plays an important role in the neurodegenerative route triggered by amyloid fibers in primary cultures of the rat hippocampus, relating these discoveries to the pathogenesis of the Alzheimer's disease (Alvarez et al., 2001). The primary target of this project was to study the interaction and changes in the distribution of the cdk5-p35 and cdk5-tau complexes in neuroblastoma cells, previously treated with beta-amyloid A β (1-42), by mean of confocal microscopy and FRET (Fluorescence resonance energy transfer). For these studies, fusion proteins of cdk5, p35 and tau were obtained with their respective fluorescent proteins yellow and cyan conjugates (YFP and CFP). These molecular constructions were

transfected in neuroblastoma cells, grown under normal culture conditions, and the different treatments with either A β peptide or reactive oxygen species (ROS) were performed. These constructions, with their respective activators, under A β cytotoxic conditions were able to produce an energy transfer reflected in a change in the fluorescence intensity of the donor. In addition, using the fluorescence recovery after photo-bleaching approach (FRAP), it was possible to observe the changes in the distribution and mobility of cdk5, its activator p35, and a mutant protein generated in our laboratory. Studies showed a tendency to diminish the percentage of FRAP in the presence of treatments that simulate Alzheimer's neurodegeneration. Considering the relevance of cdk5/p35 alterations in Alzheimer, these studies are of utmost importance to elucidate the changes in protein-protein interactions that occurs in neurodegenerative diseases such as Alzheimer, and can contribute to further studies on the search of inhibitors for this complex, of biomedical interest.

ABREVIATURAS

Enfermedad de Alzheimer	EA
Proteína precursora del amiloide	APP
Beta-amiloide	A β
Ovillos neurofibrilares	ON
Filamentos helicoidales pareados	PHF
Proteína fluorescente verde	GFP
Proteína fluorescente amarilla	YFP
Proteínas fluorescente celeste	CFP
Transferencia de energía por resonancia de Fluorescencia	FRET
Recuperación de la fluorescencia después del foto-quemado	FRAP
Especies Reactivas de Oxígeno	ROS

INTRODUCCIÓN

Los estudios de salud pública nos muestran que la distribución etaria de nuestra población, asemejándose a la de países desarrollados, se desplaza hacia los rangos de mayor edad. La mayor esperanza de vida en la población, trae consigo un incremento en la incidencia y prevalencia de enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, enfermedad de Alzheimer (EA) y ELA que se presentan en la tercera edad, especialmente los mayores de 65 años. Ello ha ido aparejado con un marcado incremento en los esfuerzos de investigación, y por supuesto el estudio de las bases moleculares que nos permitan dilucidar tanto las causas, como posibles tratamientos de estas patologías. Existen, además de la edad, otros factores de riesgo involucrados en estas enfermedades, en que además de una mayor o menor predisposición genética, los factores ambientales parecen jugar un papel clave. Distintas hipótesis como las del péptido β -amiloide, la de la proteína tau, la participación de procesos inflamatorios, los cambios en la interacción neurona-glia y el estrés oxidativo, han cobrado vigor a la luz de nuevas investigaciones.

El péptido $A\beta$ corresponde a un fragmento del procesamiento anormal de la proteína precursora del amiloide (APP), ampliamente distribuida en el cuerpo humano, pero con función desconocida hasta el momento. Este proceso genera la liberación de un fragmento denominado beta-amiloide ($A\beta$), que se agrega y produce las placas amiloideas, un evento morfológico y estructural distintivo de la EA. La hipótesis del amiloide, señala al $A\beta$ como el principal responsable de la pérdida de función neuronal y su posterior destrucción. Otra hipótesis que cuenta con un creciente cúmulo de evidencias a la luz de la biología celular y estructural actuales, es la hipótesis de tau. La proteína tau normalmente es clave para organizar y estabilizar el esqueleto interno

de la célula, o citoesqueleto, y regular la polaridad de las neuronas. En la EA, tau es modificada post-traduccionalmente y pierde su capacidad de estabilizar a las células neuronales, lo que eventualmente provoca en una etapa tardía su agregación en ovillos neurofibrilares (ON) que son conocidos, al igual que las placas amiloideas, como una característica histopatológica de la enfermedad. Estas dos son las principales hipótesis defendidas por los investigadores de esta área, pero actualmente se ha comenzado a hablar de otros factores de riesgos que pueden contribuir, no por si solos, pero en su conjunto a la EA. Estos factores son por ejemplo, los provocados por procesos inflamatorios, estrés oxidativo, factores vasculares, cambios en el metabolismo del colesterol, etc. Aunque todos estos factores de riesgo son de importancia en su patogénesis, la edad sigue siendo el que se relaciona de mejor manera con la incidencia de la EA.

La proteína tau participa en dos funciones principales, inducir el ensamblaje de los microtúbulos en condiciones normales, y auto-asociarse en condiciones patológicas, como en la EA y en otras demencias. Una de las modificaciones producidas en esta proteína son hiperfosforilaciones que llevan a formas patológicas de la tau en la EA, provocadas por los efectos de diferentes proteínas quinasas y fosfatasas que pueden ocasionar cambios conformacionales, y esto puede afectar su capacidad de ensamblaje e interacción con la tubulina. Se han identificado muchos sitios de fosforilación en la proteína tau. Fosforilaciones anómalas se han relacionado con su auto-agregación, y posterior formación de filamentos helicoidales pareados (PHF), llevándola a perder su función neuronal

Estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que en algunas patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, las quinasas $gsk3\beta$ y $cdk5$

hiperfosforilan a tau, causando el colapso del citoesqueleto y acúmulos característicos de tau hiperfosforilada (Maccioni y cols., 2001a).

La proteína cdk5 es una quinasa dirigida por prolina que fosforila residuos de serina y treonina, que se encuentren inmediatamente precedidos por un residuo de prolina. Cdk5 posee una marcada preferencia por residuos básicos que se encuentran en la posición +3 y fosforila la secuencia consenso (S/T)PX(K/H/R), donde S o T son serina o treonina, X es cualquier aminoácido y P corresponde a un residuo de prolina ubicado en la posición +1 (Dhavan & Tsai, 2001). Está presente en todos los tejidos, pero su actividad quinasa se ha encontrado mayoritariamente en el sistema nervioso. La función que se le atribuye a esta quinasa es principalmente en la regulación de la cito-arquitectura del sistema nervioso central, pero existe evidencia que relaciona la actividad de cdk5 en la regulación del citoesqueleto, como guía axonal, transporte de membrana, funciones sinápticas, señalización por dopamina, e incluso en adicción a las drogas (Benavides & Bibb, 2004). Aunque la gran mayoría de las proteínas quinasas dependientes de ciclina (cdk's) necesitan una fosforilación en su *loop* de activación, en el residuo Thr160, en el caso de cdk5, la cristalografía ha mostrado que la interacción de la quinasa con su unidad reguladora es suficiente para lograr la conformación activa. Esto ayuda a esclarecer datos obtenidos por estudios bioquímicos, donde se demostraba que la fosforilación en el *loop* no era requerida para obtener la máxima actividad de la quinasa.

Se ha demostrado que gsk3b fosforila específicamente los residuos Ser202, Thr205, Ser235 y Ser404 (Imahori & Uchida, 1997). En la EA se han encontrado algunas fosforilaciones características de la proteína tau, cuando está formando parte de los PHF, un paso previo al ovillo neurofibrilar. El complejo cdk5-p35 fosforila a tau en cuatro residuos que corresponden a este tipo de fosforilaciones, los residuos son:

Ser199, Thr231, Ser396 y Ser413. Se ha descrito que en enfermedades como el Alzheimer, la quinasa cdk5 se encuentra desregulada y esto contribuye a la hiperfosforilación de tau, especialmente en neuronas de hipocampo, corteza entorina y núcleos de Meynert (Alvarez y col.1999, 2001).

Todos estos estudios se han realizado en modelos *in-vitro*, donde es posible observar las interacciones, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, etc. En la actualidad el avance en las tecnologías le ha permitido al investigador tener a su alcance nuevos métodos de estudios, que sean más cercanos a lo que ocurre en el interior de la célula. Es así como el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde (GFP) nos ha proporcionado nuevas herramientas en el estudio de la distribución y el comportamiento de las proteínas en la célula. Estas nuevas herramientas se han acoplado a antiguas tecnologías existentes, que aunque muy útiles, eran difíciles de llevar a cabo, por dificultades técnicas.

La transferencia de energía FRET (también llamada Transferencia de Energía por el Radio de Förster), es una técnica propuesta hace alrededor de 50 años, pero no fue hasta la aparición de la proteína GFP que la biología comenzó a disfrutar de sus beneficios. FRET es la transferencia no-radiativa de energía de una molécula dador a una molécula aceptor, es una técnica que depende de la distancia a la cual se encuentren estas dos moléculas. La molécula dador es excitada por una luz incidente, y si el aceptor se encuentra a una distancia cercana, la forma del estado excitado de energía del dador puede ser transferida al aceptor, esto provoca una reducción en la intensidad de fluorescencia y la vida media del estado excitado del dador, y un aumento en la emisión de la intensidad del aceptor. Förster demostró que la eficiencia de este proceso dependía del inverso de la sexta razón entre la distancia entre el dador y el aceptor.

$$E = 1 / \{1 + (R / R_0)^6\}$$

Donde R_0 es la distancia a la cual la mitad de la energía es transferida, y depende las características espectrales de la moléculas, y su orientación. Mediciones de la transferencia de energía pueden entregar datos de distancias tanto intra como Inter. Moleculares, para proteínas y sus ligandos, con una rango de entre 10-100 Ångstrom. También es posible detectar cambios en la distancia (1-2 Ångstrom) entre ubicaciones de una proteína, lo que puede dar información acerca de cambios conformacionales. (Jares-Erijman & Jovin 2003, Kirsh y cols 1999, Siegel y cols 2000)

La necesidad de proximidad requerida por FRET, es a su vez la mayor utilidad que tiene la técnica, ya que fluoróforos que se encuentren unidos a determinadas proteínas y que se encuentren realizando transferencias de energía, deben encontrarse lo suficientemente cerca como para efectuar interacciones biológicas relevantes.

Por todas estas ventajas, es que decidimos realizar durante esta investigación una aproximación de este tipo para poder visualizar las interacciones que existen entre nuestra proteína de interés, la quinasa cdk5, y su activador p35.

Además, debido a la importante función que desempeña este complejo en la enfermedad de Alzheimer, se decidió realizar las mediciones en presencia de factores, como el péptido beta-amiloide, y en condiciones de estrés oxidativo, nuestra propuesta pretende desarrollar un acercamiento integrado implícito en las bases biológicas que envuelven al sistema cdk5/p35 en el desarrollo de procesos que ocurren normalmente en el cerebro, y compararlo con cambios celulares y moleculares que afectan este sistema, y que desencadenan la hiperfosforilación de tau con su posterior neurodegeneración. Así, el posible mecanismo molecular implícito en la desregulación y auto-segregación de tau constituye una importante parte en este análisis. Es por esto

que en el laboratorio tenemos la certeza que este proyecto contribuirá a adquirir valiosa información sobre los aspectos reguladores de cdk5, y proveerá de un discernimiento dentro de la bioquímica y aspectos celulares acerca del papel de cdk5 en el sistema nervioso central y en la patología neuronal.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

Hipótesis de Trabajo.

El tratamiento de células neuronales con el péptido beta-amiloide induce un incremento en la interacción de las proteínas cdk5-p35 y cdk5-tau..

Objetivo general.

El objetivo de este proyecto es estudiar a nivel celular, la interacción y los cambios en la distribución de los complejos de proteínas cdk5-p35 y cdk5-tau en células de neuroblastoma tratadas con $A\beta$.

Objetivos específicos de la tesis.

1.- Distribución subcelular de las proteínas cdk5, p35 fusionadas a proteínas fluorescentes en células de neuroblastoma N2A. Estudios de microscopía confocal utilizando la estrategia FRAP.

2.- Analizar la interacción de los sistemas cdk5-p35 y cdk5-tau por medio de FRET en células de neuroblastoma, en condiciones normales.

3.-Analizar los cambios de distribución subcelular y la interacción de cdk5-p35 y cdk5-tau por medio de FRET en células de neuroblastoma tratadas con $A\beta$ y con peróxido de hidrógeno, en condiciones que promueven degeneración neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES

Material biológico

Cepa *Escherichia coli* DH5 α de Promega. Células de neuroblastoma de ratón N2A (ATCC)

Reactivos

De MERCK Química Chilena se obtuvieron: Sales, reactivos analíticos, ácidos, bases y alcoholes. De Invitrogen-GIBCO BRL Life Technologies Inc.: Enzimas de restricción, Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l), dNTPs (100 mM), 100 pb DNA ladder (1 μ g/ μ l), lipofectamina, Optimem, Agarosa, DTT y trisona. De la Compañía Sigma Chemical CO: Bromuro de etidio, BSA, β -mercaptoetanol, SDS, EDTA, IPTG. PerkinElmer: [γ 32P] dATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) y histona H1 (Calbiochem).

Reactivos y materiales para cultivo de células

Las placas para cultivo celular fueron adquiridas en NUNC, los medios de cultivo: DMEM y MEM, suero fetal de bovino, suplemento B27, Tripsina, EDTA, y los antibióticos estreptomicina, penicilina y gentamicina fueron adquiridos de Gibco BRL.

Polilisina y dibutilil-cAMP se obtuvieron en Sigma Chemical CO (Saint Louis, Missouri, USA).

Anticuerpos

Los anticuerpos anti-cdk5 (C8), p35 (C19), p35 (N20), fueron todos adquiridos de Santa Cruz Biotechnology,(California, USA).

Partidores

TAU SNS: 5' AGATCTATGGCTGAGCCCCGCC 3' incluye sitio de restricción Bgl II

TAU AS : 5' GTCGACGTCGATCTCAAACCCT 3' incluye sitio de restricción Sal I

PECFP/PEYFP SNS : 5' GGATCACTCTCGGCATGGACGAGC 3'

PECFP/PEYFP AS : 5' GTGGTATGGCTGATTATGAT 3'

Diseñados para secuenciación de los vectores.

Vectores

pcDNA3.1 A p35-myc, pcDNA3.1 B cdk5-myc, TOPO-TA Cloning Kit, pRC/CMV tau, pECFP-C1, pEYFP-C1 (Clontech) fueron donados por el Dr. Thomas Jovin, Max Plank Institute, Gotingen, Germany.

METODOS

Cultivo celular

Cultivos de células de neuroblastoma N2a en la mayoría de los experimentos, y de Cos 7 en estudios puntuales, fueron utilizados para esta investigación. Estas células fueron crecidas en medio Dulbecco's Eagles's modificado (DMEM) (Gibco-BRL), suplementado con 10% suero fetal de bovino, 100 U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomycin. Las células fueron crecidas con 5% CO₂ a 37°C. El crecimiento de neuritas en células N2a fue promovido mediante el cultivo de estas células en DMEM más B27 y 2mM dibutilil cAMP (db-cAMP) (Sigma, St. Louis, MO). Después de 24 y 48 hrs. de tratamiento, las células mostraron una morfología diferenciada con largos procesos neuríticos (Muñoz y cols., 2000).

Plasmidios

Los plasmidios usados en esta tesis fueron diseñados de la siguiente manera: para la proteína quinasa dependiente de ciclina cdk5, ésta se encontraba clonada previamente en el vector pcDNA 3.1 myc-A entre los sitios de restricción Hind III y Apa I, por lo que se digirió con éstas enzimas, se purificó el fragmento por medio del kit GENE CLEAN, luego se subclonó en los plasmidios pECFP y pEYFP, ambos en el carboxilo terminal, en los mismos sitios de restricción. En el caso del activador p35, éste se encontraba clonado en el vector pcDNA 3.1 myc-B entre los sitios BamHI y Xho I, se procedió de la misma manera anterior a clonar en ambos vectores PECFP y PEYFP en los sitios antes mencionados y ambos en el carboxilo terminal.

Para la obtención de la proteína Tau fusionada con proteínas fluorescentes se extrajo por PCR desde un vector pRC/CMV tau con los siguientes primers: TAU-SNS 5'AGATCTATGGCTGAGCCCCGCC3' y TAU-AS 5'GTCGACGTCGATCTCAAACCCT3', a los cuales se les había agregado los sitios de restricción Bgl II y Sal I respectivamente. Luego se utilizó el sistema TOPO-TA para el subclonamiento del fragmento de PCR. Finalmente se clonó el fragmento de Tau en los plásmidos pECFP-C1, pEYFP-C1.

Preparación de fibras de A β

El péptido sintético A β incluyendo los residuos 1-42 de la secuencia Abeta humana fue obtenido desde Chiron Corporation (Emeryville, C.A., USA). El péptido A β 1-42 se incubó en un ensayo de agregación. Las soluciones *stock* se prepararon disolviendo alícuotas liofilizadas de péptido A β en dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mg/ml (220 μ M). Las alícuotas de la solución *stock* del péptido (70 nmol en 20 μ l DMSO) se añadieron a PBS, pH 7.2 para dar un volumen final de 0.725 ml. La solución se agitó continuamente durante 4-7 días a temperatura ambiente, la agregación se midió por turbidez y se observaron al microscopio electrónico. (Jeol XS100) Las fibras de A β se concentraron por centrifugación (14000 rpm por 30 min) y se resuspendieron a 1mg/ml en PBS estéril.

Transfección de células Cos 7 y N2a

Para comprobar que las proteínas de fusión funcionaban correctamente se procedió a transfectar células Cos 7 con las distintas variantes de plasmidios, utilizando el protocolo estándar de transfección dada por el fabricante (Invitrogen).

Para observar la interacción entre las proteínas cdk5-p35 y cdk5-tau se procedió a transfectar los plasmidios previamente obtenidos en células de neuroblastoma N2a, y se procedió de acuerdo a protocolo estándar para lipofectamina 2000. A las 6 horas de transfección se cambió el medio por DMEM con 1x de B27 y 2 mM de db-cAMP, a las 24 horas de diferenciación se agregaron los tratamientos, 24 h de péptido A β 10 μ M o 100 μ M de H₂O₂ por 1 hora.

Ensayo de la actividad quinasa

Se incubaron las muestras en tampón-quinasa (50mM HEPES pH 7.5, 10mM MgCl₂, 2mM MnCl₂, 1mM DTT, 100 μ M ortovanadato, 1mM NaF), por 30 minutos en hielo, p25, ATP frío. Transcurrido este tiempo se agregó cdk5 y se incubó por otros 30 minutos en hielo, para agregar finalmente 2 μ g de histona H1 y 2 μ Ci por reacción de [γ -³²P] ATP. La reacción se llevó a cabo a 30°C por 30 minutos, se detuvo agregando buffer de carga Laemmli 4X y calentando a 100°C por 5-10 minutos. Luego se cargaron las muestras en un SDS-PAGE al 12%, se electrotransfirieron posteriormente a una membrana de nitrocelulosa. La histona- $[\gamma$ -³²P] se cuantificó por Molecular Image (BioRad).

Ensayos de Microscopía



Para observar la distribución e interacción de las proteínas cdk5-YFP/p35-CFP y cdk5-YFP/tau-CFP, se realizaron transfecciones de las construcciones fusionadas en células N2a, en cubreobjetos de 25mm de diámetro para el ensayo. A las 6 horas de transfección se cambió el medio por DMEM con 1X de B27 y 2 mM db-cAMP, a las 24 se procedió a agregar el tratamiento, A β 10 μ M o H₂O₂ 1mM por 24 y 1 h respectivamente, se realizaron 3 lavados con PBS y se montó la muestra en una cámara especialmente diseñada para observaciones in-vivo. Luego se agregó medio KRHG (7,95 g NaCl, 2,4 g Hapes, 0,36 g KCl, 0,31 g de MgSO₄, 0,19 g CaCl₂, 0,6g glucosa en 1 litro de H₂O a pH 7.4) y se observaron en el Microscopio Confocal (LSM Meta 510 Zeiss). Para observar YFP se utilizó la longitud de onda de 514 nm, disponible en el láser Argón, y se utilizó un band pass de 530-600 para su detección (canal 2). En el caso de CFP se utilizó la longitud de onda de 458nm, y se detectó con un band pass de 475-525 (canal 3). En cuanto al canal para la señal de FRET, se excitó el fluoróforo con la longitud de onda 458 del láser Argón, y se detectó con un band pass de 530-600. Además se utilizó la misma ganancia para el canal de YFP y FRET al momento de realizar los experimentos, para eliminar el ruido del medio. La configuración utilizada en el microscopio confocal se observa en la Figura 1.

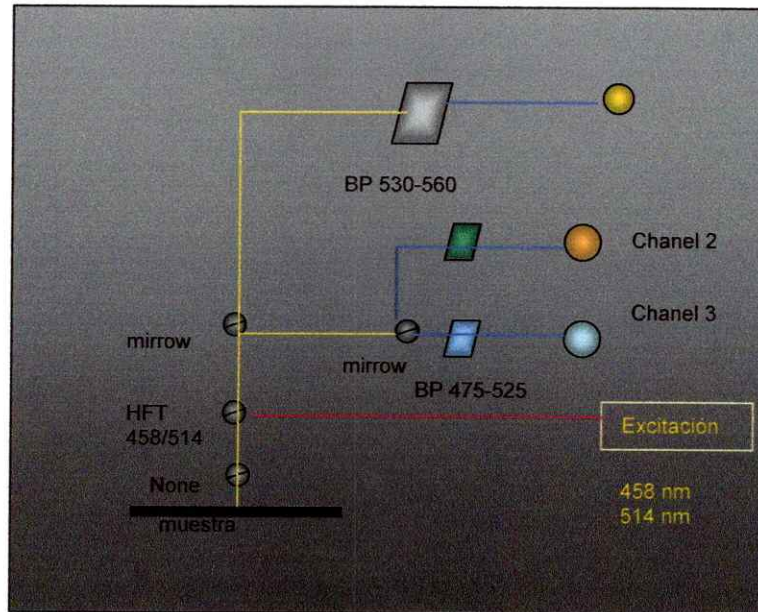
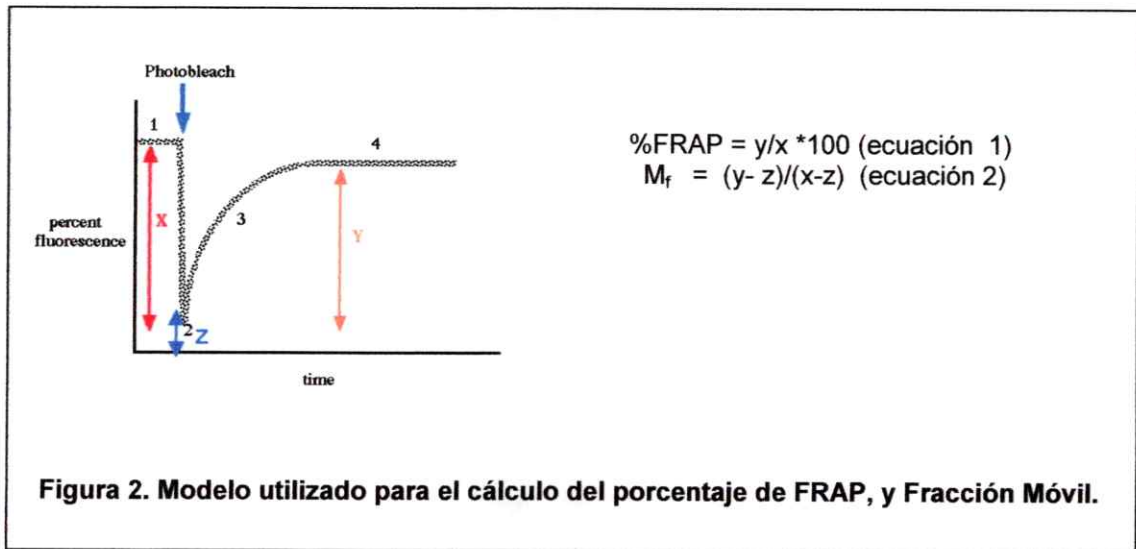


Figura 1. Esquema configuración utilizada en el microscopio LSM Meta 510 Zeiss.

Análisis FRAP y FRET

Al graficar la intensidad de fluorescencia versus el tiempo, es posible tener una medida de la fracción móvil de la proteína que existe dentro de la célula. Esta fracción se determina al calcular la razón entre la intensidad de fluorescencia inicial en la región quemada, corregida por la cantidad de fluorescencia removida durante el fotoblanqueado.

$$M_f = F_{\infty} - F_0 / F_i - F_0$$



Cuando la fracción móvil es menor al 100 %, se puede deber a la unión irreversible a algún substrato unido. Alternativamente, factores no-difusibles, como barreras de difusión o discontinuidades dentro de las estructuras donde se localizan las proteínas, pueden ser responsables de la disminución en la movilidad (Lippincott y cols 2001). También es posible obtener la constante de difusión (D), al graficar la recuperación de la intensidad de la fluorescencia dentro de la región quemada como función del tiempo, y obtener ecuaciones que den cuenta de la curva de recuperación. Por ejemplo, cuando se utilizan pequeños sectores de quemado, es posible utilizar la siguiente ecuación:

$$\tau_D = \omega^2 \gamma / 4D$$

Donde ω es el radio del láser, γ es el factor de corrección para la cantidad de quemado, y τ_D es el tiempo de difusión. Esta fórmula asume una difusión bidimensional

no restringida dentro de un área de quemado circular, sin recuperación desde los planos focales inferiores o superiores. (Lippincott y cols. 2001)

El valor teórico de D para una proteína está relacionado con el tamaño y su ambiente celular. Desviaciones de este valor pueden dar información sobre el ambiente de la proteína, por ejemplo un factor de difusión más pequeño que el valor esperado puede sugerir que la proteína fluorescente podría haberse agregado, o incorporado a un complejo de mayor tamaño, dado que D es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. Alternativamente, el ambiente que rodea a la proteína puede ser más viscoso de lo esperado, o incluso la proteína puede estar interactuando transitoriamente con moléculas más grandes o que se encuentran fijas en algún lugar de la célula.

Por el contrario si el factor de difusión es de mayor tamaño que el valor esperado, la proteína puede estar mostrando un comportamiento no difusivo, como un flujo, o un movimiento que involucre proteínas motoras, también puede darse un ambiente de viscosidad menor al esperado. La fracción móvil (M_f), nos puede indicar situaciones similares al factor de difusión. Una disminución en el M_f puede indicar que la proteína se está uniendo a factores que se encuentran fijos en la célula, que se está incorporando a agregados de proteína, o que se encuentra en distintos compartimientos.

Con lo que respecta a FRET, Karpova y colaboradores desarrollaron una metodología más simple para realizar los análisis de FRET. Ellos determinaron que realizando 10 capturas de imágenes, 5 antes del quemado y 5 después del quemado, era posible obtener un valor promedio de intensidad que no estuviera influenciado por el quemado, y que mostrara resultados erróneos. Propusieron la siguiente ecuación:

$$E_F = (I_6 - I_5) * 100 / I_5 \text{ (ecuación 3)}$$

Donde I_n corresponde a la intensidad de la fluorescencia de CFP en el tiempo n . Debido a que el quemado ocurre entre los puntos 5 y 6, esta fórmula da cuenta del incremento en la intensidad de fluorescencia de CFP después del quemado de YFP, normalizado por la fluorescencia de CFP antes del quemado. Además, el porcentaje de la potencia del láser utilizado se eligió para evitar un foto-quemado durante la captura de la imagen (0,15 % transmisión).

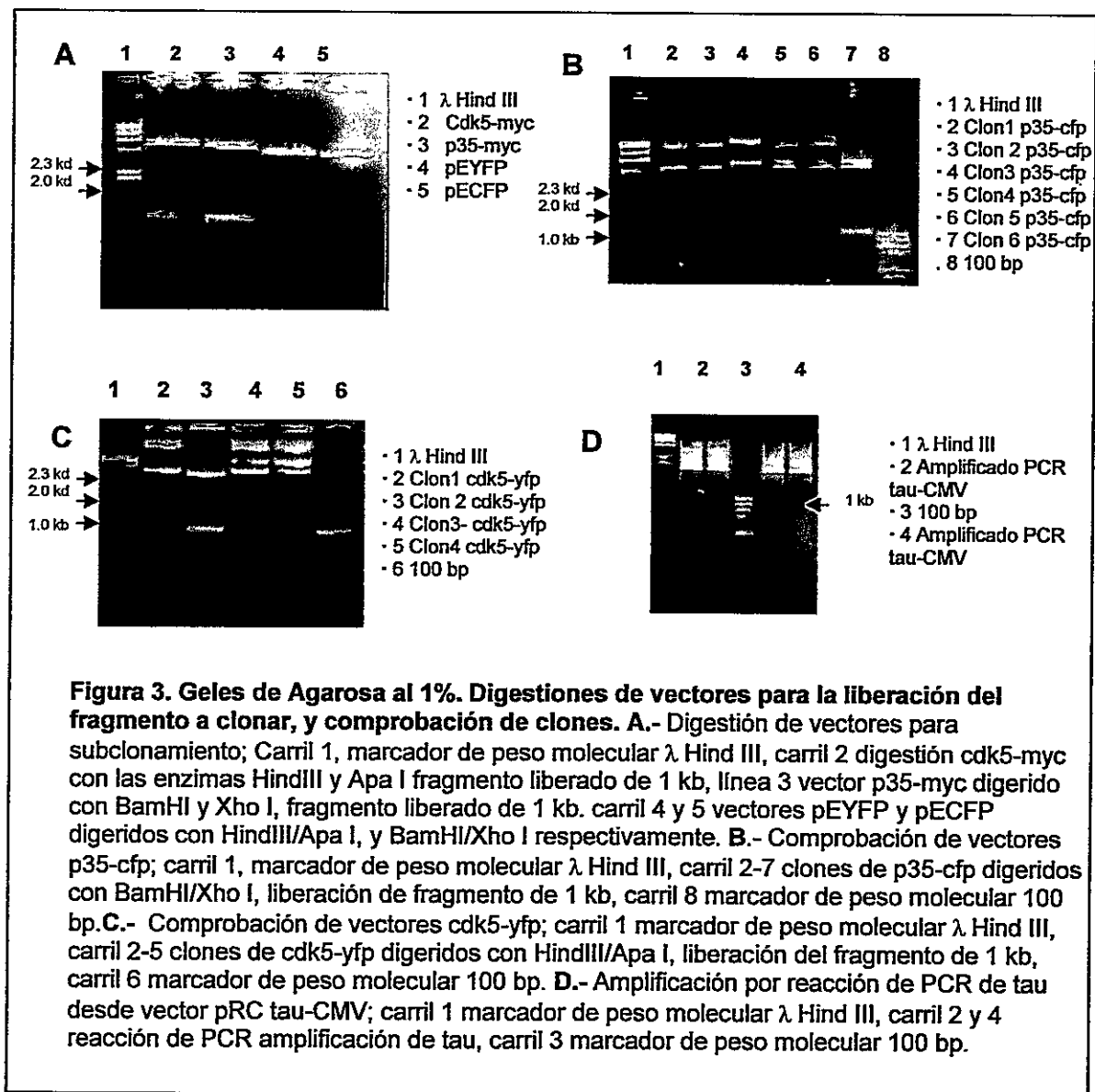
RESULTADOS

1.-Análisis de la distribución subcelular de las proteínas cdk5, p35 fusionadas a proteínas fluorescentes en células de neuroblastoma N2A por medio de microscopía confocal utilizando la estrategia de FRAP.

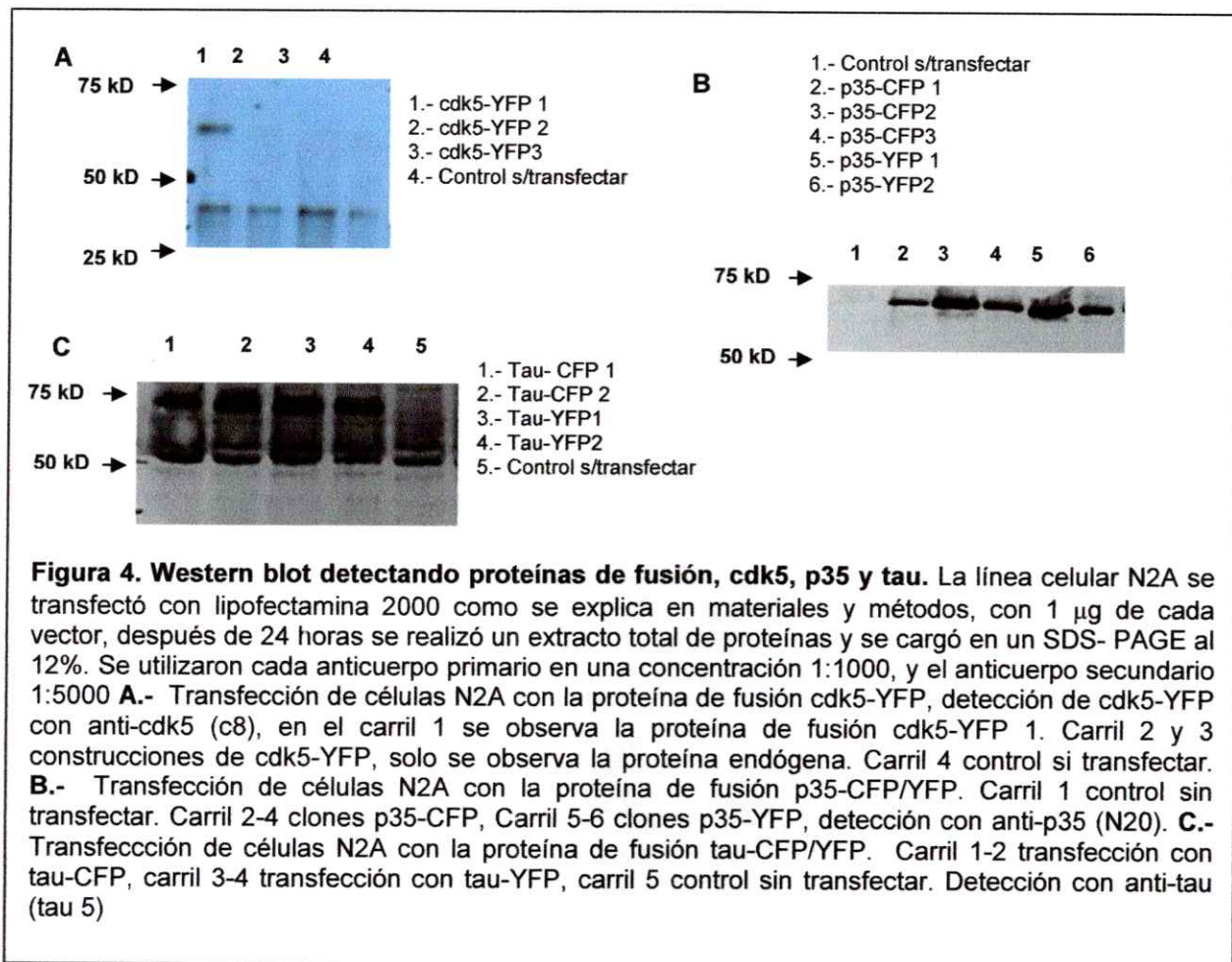
Para la realización de este primer objetivo se debieron obtener las proteínas de fusión correspondientes. Se utilizaron los cDNA que se encontraban clonados en nuestro laboratorio, en los siguientes vectores: proteína quinasa dependiente de ciclina cdk5 se encontraba clonada en pcDNA 3.1 myc-A entre los sitios de restricción Hind III y Apa I, se liberó el fragmento como se explica en Materiales y Métodos y se subclonó en pEYFP, de la misma manera se procedió con el activador p35, éste se encontraba clonado en el vector pcDNA 3.1 myc-B entre los sitios BamHI y Xho I (Figura 3).

En el caso de la proteína Tau, se disponía de un vector pRC-CMV, en donde se encontraba clonada la forma humana fetal de la proteína. Para extraer el fragmento, se procedió a amplificar por reacción de PCR con los siguientes partidores: TAU-SNS 5'AGATCTATGGCTGAGCCCCGCC3' y TAU-AS 5'GTCGACGTCGATCTCAAACCCT3'.

Una vez obtenido el fragmento de 1050 pares de bases, se clonó el fragmento en el kit Topo TA de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez clonado el fragmento se procedió a digerir el vector con las enzimas Bgl II y Sal I, sitios de restricción añadidos en los partidores.



Cada proteína de fusión obtenida fue revisada por una reacción de secuenciación realizada con partidores diseñados dentro del vector pECFP/pEYFP, que se pueden observar en Materiales y Métodos. Una vez obtenidas las secuencias de las construcciones se comparó con la base de datos disponibles en Internet, y se eligieron aquellos clones que presentaban la secuencia de interés. Además fue necesario expresar las construcciones en líneas celulares para posteriormente detectarlas por ensayos de Western Blot. Esto se observa en la Figura 4.



Otro análisis necesario de realizar con las proteínas de fusión, es detectar si la adición de la proteína fluorescente afecta o no su actividad. Una de nuestras proteínas es una proteína quinasa, por lo tanto se diseñó un ensayo de actividad quinasa in vitro con las quimeras, como se observa en la figura 5. No se desarrolló la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GFP por su poca especificidad para este ensayo. Se eligió las células Cos 7, debido a su menor expresión endógena de la proteína cdk5. Paralelamente en nuestro laboratorio se obtuvo una mutante de pérdida de función de la quinasa cdk5, la proteína cdk5Y15F descrita en la tesis de Biotecnología de Omar Ramirez, esta mutante se agregó a los estudios para posteriormente poder comparar su actividad con la proteína cdk5-YFP

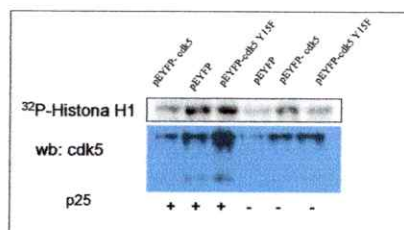
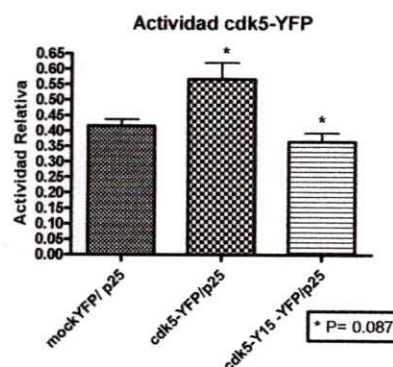
A**B**

Figura 5. Actividad cdk5-YFP y cdk5 Y15F YFP.

La línea celular Cos 7 se transfirió con lipofectamina 2000 con cada una de las construcciones, después de 24 horas se inmunoprecipitó con anti-cdk5(c8), y se realizó el ensayo de actividad de acuerdo se explica en Materiales y Métodos. **A.-** WB ensayos de actividad

Una vez obtenidas las proteínas de fusión se realizaron los experimentos para determinar la distribución y la movilidad de las proteínas, en células vivas. Para estos experimentos se procedió a transfectar células N2A en cubreobjetos de 25 mm de diámetro. La distribución de las proteínas de fusión se observa en la Figura 6.

Para observar la movilidad de las proteínas de fusión dentro de la célula se realizaron ensayos de Recuperación de la Fluorescencia después del foto-quemado (FRAP). (Misteli 2001)

Estas mediciones se realizaron para las proteínas cdk5, cdk5Y15F y p35 en condiciones control, y con tratamientos con A β o peróxido en el caso que se indique.

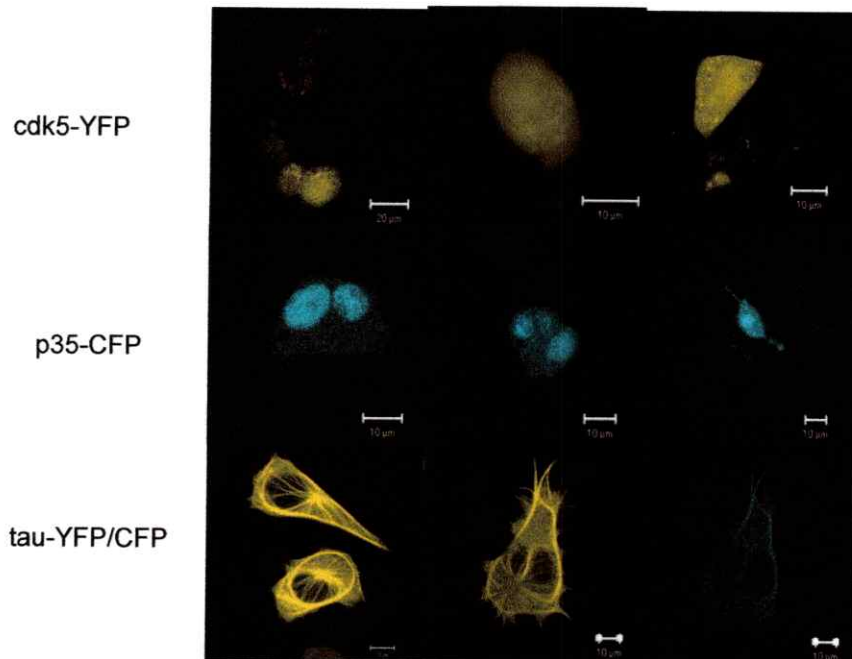
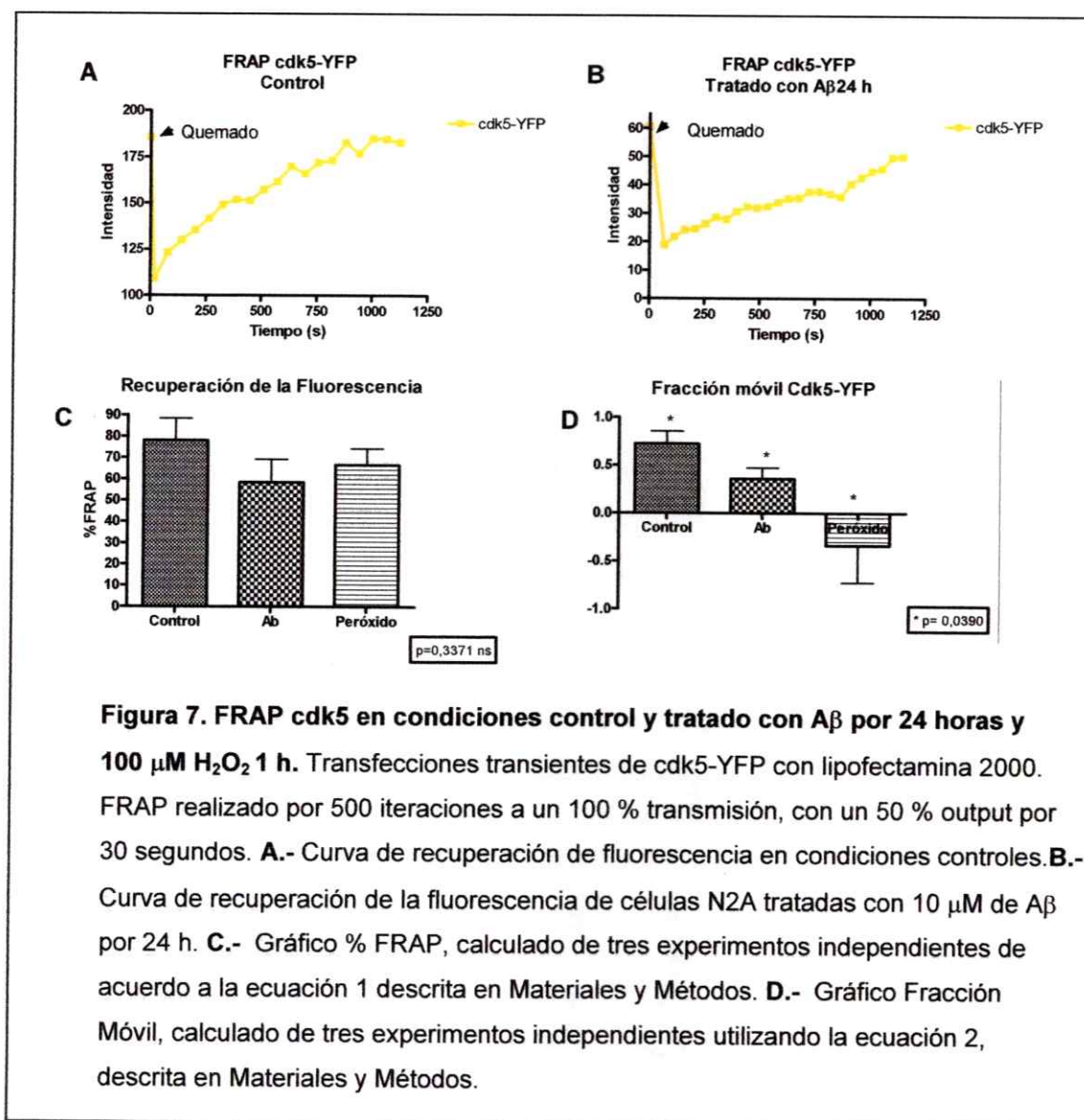


Figura 6. Distribución de proteínas de fusión en células de neuroblastoma de ratón.

Células de Neuroblastoma de ratón N2A crecidas en cubreobjetos redondos de 25mm de diámetro, transfectadas con lipofectamina 2000 por 24 horas con cdk5-YFP, p35-CFP y tau-CFP/YFP. A las 6 horas de transfección se inició la diferenciación con 2 mM de Dbt. A las 24 horas de diferenciación se cambió el medio y se montó el cubreobjeto en una cámara especialmente diseñada para el microscopio confocal. YFP se excitó con un láser de 514 nm, y CFP con un láser de 548 nm. En el panel superior se observan 3 diferentes transfecciones de cdk5-YFP con distribución citosólica. En el panel del medio se observan tres distintas transfecciones de p35-CFP con distribución nuclear y citoplasmática. En el panel inferior se observa tres distintas transfecciones de tau yfp/CFP y se puede apreciar su asociación con microtúbulos.

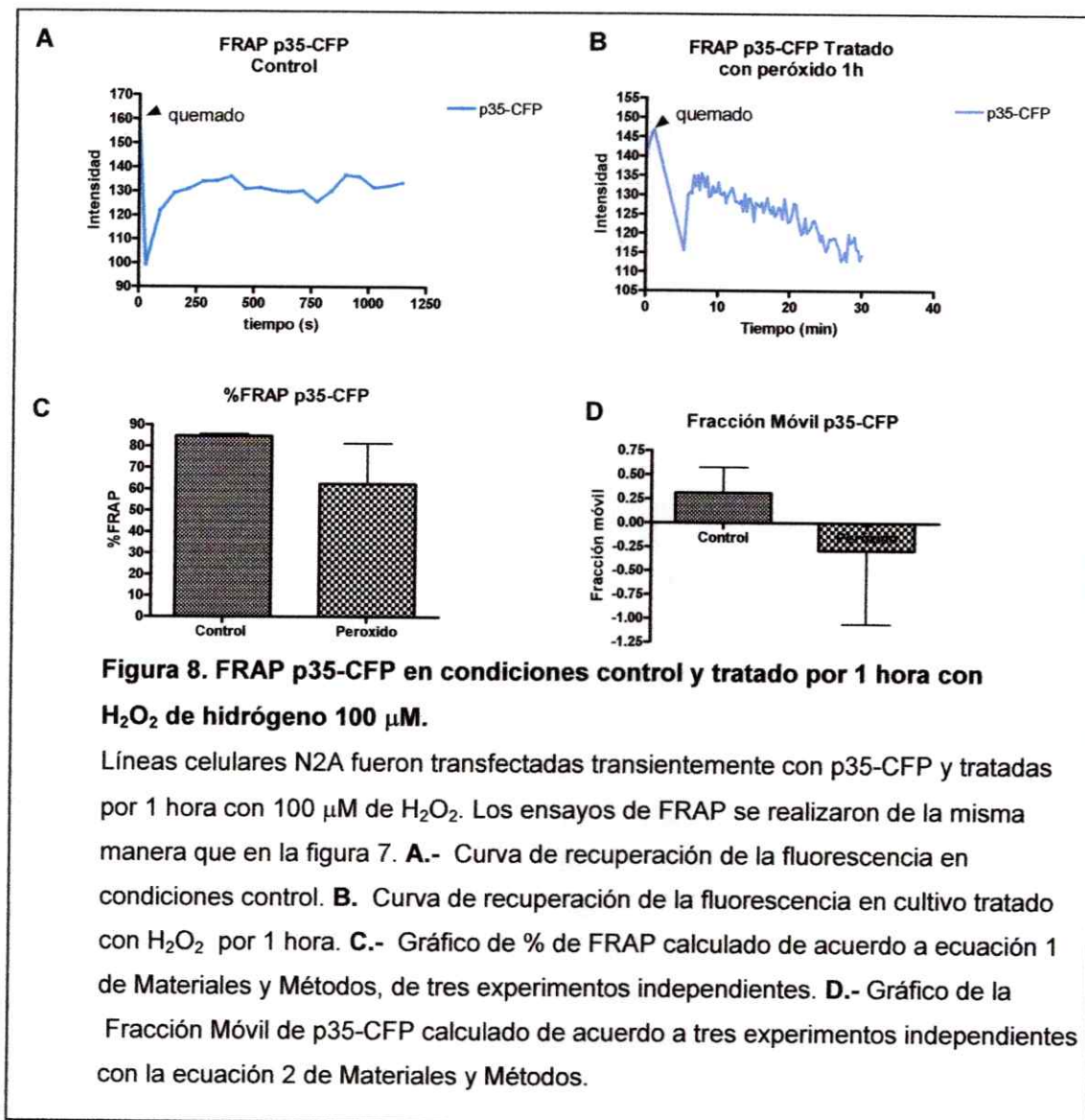
Los ensayos se realizaron de acuerdo aparece en Materiales y Métodos. En la figura 7 podemos comparar la recuperación de fluorescencia en condiciones control y $A\beta$, la gráfica correspondiente a la situación control corresponde a una curva típica de una molécula móvil con una recuperación completa de fluorescencia, por el contrario se observa que al agregar 10 μ M de $A\beta$ por 24 horas, la recuperación de la fluorescencia después del foto-quemado se ve reducida. Al calcular los valores de % de FRAP y fracción móvil éstos disminuyen al exponer las células al tratamiento. En el caso del

tratamiento con H_2O_2 , también produce un efecto de reducción en el % de FRAP, pero además observamos que la fracción móvil se ve aún más disminuida, con respecto al tratamiento con $A\beta$.



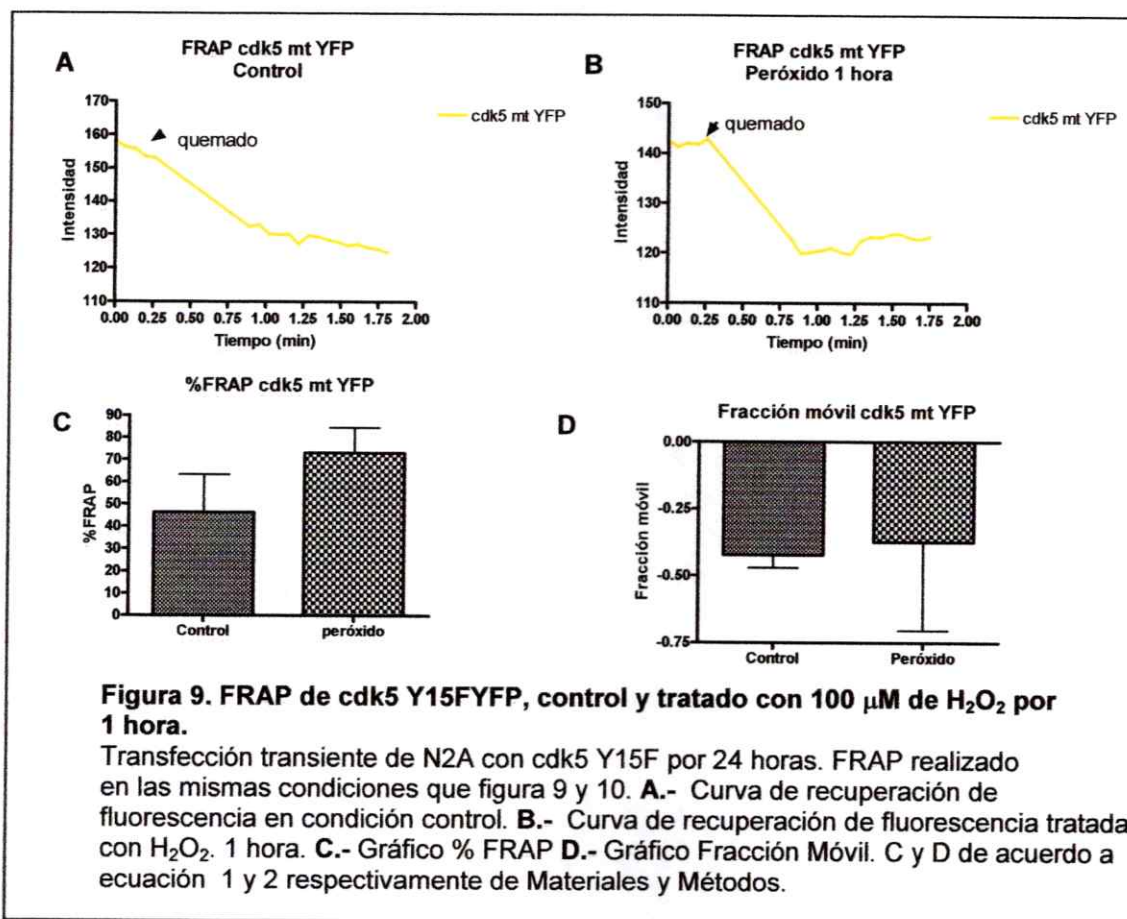
Con respecto a los ensayos realizados con la construcción de p35-CFP, se utilizó como tratamiento H_2O_2 $100 \mu M$ por 1 hora. En el caso de p35-CFP, la curva control de recuperación de fluorescencia es similar a un curva típica de molécula móvil, pero en ningún caso recupera totalmente la fluorescencia inicial. Además al realizar el tratamiento con

H₂O₂, observamos una situación similar a lo ocurrido con la construcción de cdk5-YFP, donde existe además de un retardo en la recuperación de la fluorescencia, una disminución de la fracción móvil, como se aprecia en la figura 8.



También se realizaron estudios con la proteína cdk5 mutante de pérdida de función Y15F, desarrollada durante la tesis de biotecnología de Omar Ramirez. Esta quinasa había mostrado una menor actividad, y decidimos realizar ensayos de FRAP en presencia de H₂O₂, para observar si existía algún cambio con respecto a la proteína *wild*

type. En la figura 8 podemos observar el gráfico correspondiente a un curso temporal de medición de la intensidad de fluorescencia en condiciones control y con H₂O₂. Al contrario de lo observado en el caso de cdk5-YFP, al realizar el foto-quemado se produce una disminución en la recuperación de la fluorescencia, tanto en condición control como en el tratamiento con H₂O₂. Al calcular el % de FRAP encontramos que al contrario de la situación anterior, al agregar tratamiento existe un incremento del porcentaje con respecto a la situación control. En cuanto a la fracción móvil ambas situaciones producen una disminución de la fracción móvil.



2.-Analizar la interacción normal de cdk5-p35 y cdk5-tau por medio de FRET en células de neuroblastoma, en condiciones normales.

Por estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, se conocía que la proteína cdk5, una quinasa que desempeña un papel muy importante en el cerebro, es activada por una ciclina denominada p35. Aquello se demostró por técnicas de inmunoprecipitación, así como también por ensayos de co-localización. (Alvarez y cols 1999, Tarricone y cols 2001). Nuestro principal objetivo durante esta memoria, fue demostrar que estas dos proteína interactuaban en un sistema celular "in vivo", mediante un nuevo acercamiento, utilizando la emergente técnica de las proteínas fluorescentes, y su gran utilidad en biología celular.

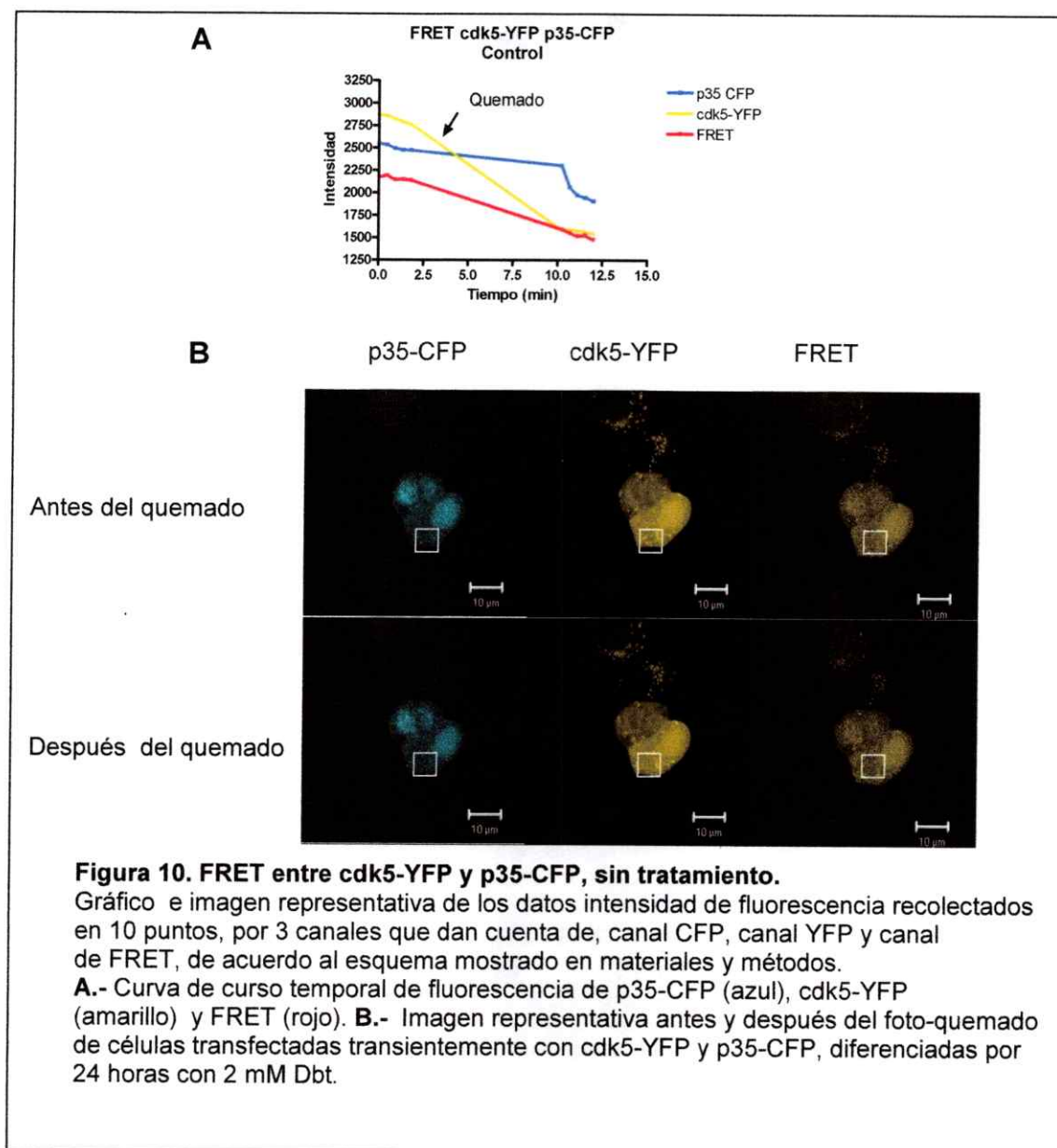
Para realizar este estudio debieron estandarizarse previamente las condiciones bajo las cuales se trabajaría. Dado que para el desarrollo de esta memoria se había clonada cdk5 en pEYFP, y este vector se caracteriza por una alta intensidad de fluorescencia in vivo, se decidió transfectar las células con una relación de 1:2 de cdk5-YFP y p35-CFP, para poder detectar la presencia de p35. Además, en el laboratorio se desarrolló una mutante de cdk5 en donde se cambió la tirosina en la ubicación número 15, por una fenilalanina (descrita en la tesis de Omar Ramirez), que se añadió a los estudios de FRET para comprobar su actividad.

Para graficar los datos obtenidos, se obtuvieron las intensidades de fluorescencia de las regiones de interés (ROI) de las 10 imágenes. (Karpova y cols 2002). El análisis de transferencia de energía puede ser determinado por varios métodos. Nosotros elegimos la aproximación del foto-quemado del aceptor. Debido a dificultades técnicas, no fue posible el foto-quemado completo de YFP completamente, así que se realizó un análisis con respecto al dador. El proceso de transferencia de energía entre CFP e YFP implica que la energía total de emisión de CFP no es detectada completamente cuando se encuentra a

una distancia menor al radio de Förster, ya que parte de esta energía es transmitida a YFP, utilizando esta característica, si se elimina por lo menos en parte al aceptor, es decir a YFP, la energía de emisión del dador, en este caso CFP se ve incrementada una vez realizada el foto-quemado del YFP. Al realizar un curso temporal de esta emisión de energía, si apreciamos un incremento de CFP después del foto-quemado, podemos decir que existía previamente transferencia de energía entre ambas moléculas estudiadas.

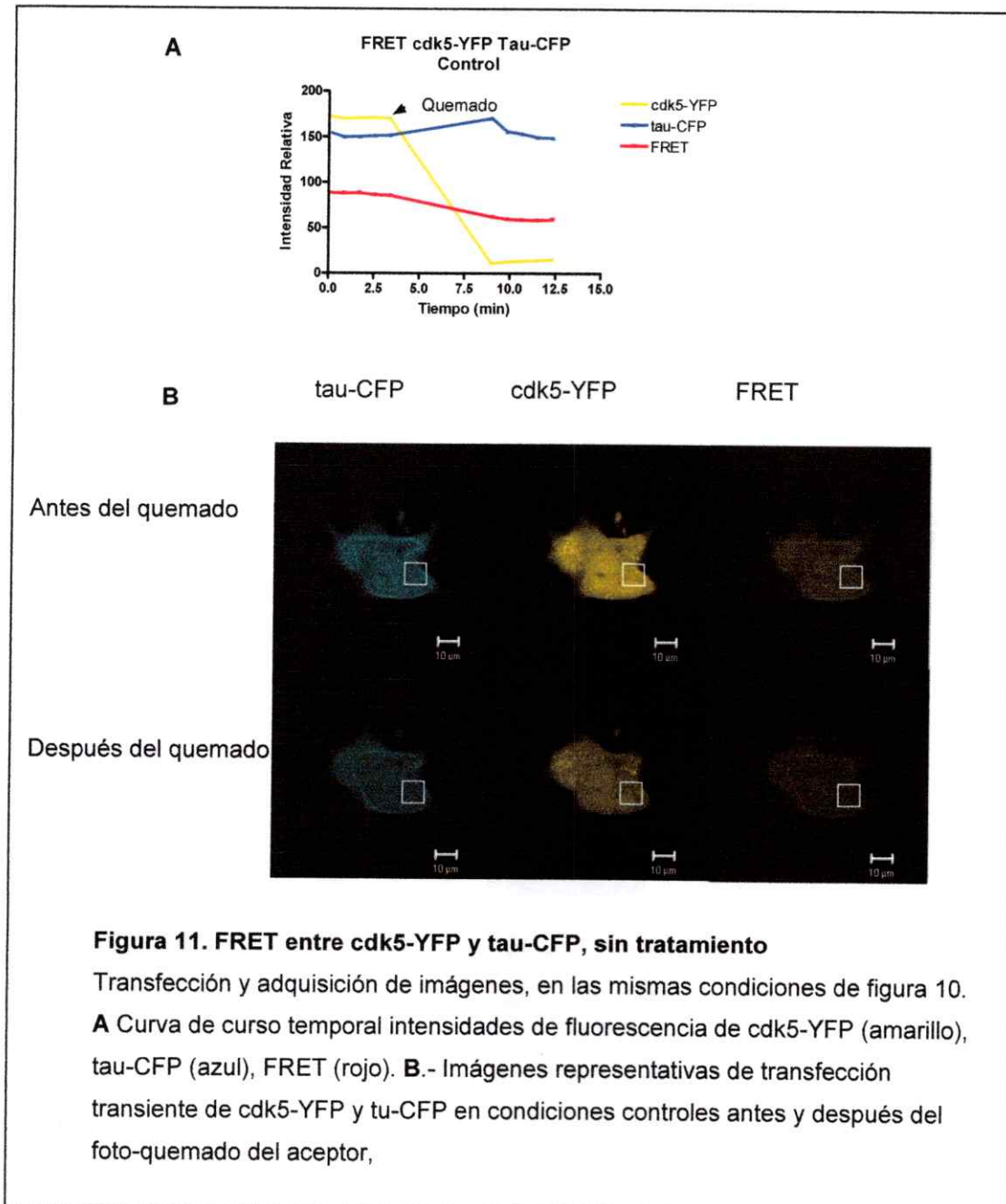
En la Figura 10 A podemos observar que no existe transferencia de energía entre las proteínas cdk5-YFP y p35-CFP en condiciones controles. Una vez realizado el foto-quemado del aceptor, en nuestro caso cdk5-YFP existe una disminución en la fluorescencia del dador. Esto implica que no existió una transferencia de energía previa. Al realizar el cálculo del porcentaje de FRET de acuerdo a la ecuación 3, nos encontramos que los valores de transferencia de energía son negativos, ya que al no incrementarse el valor de la intensidad de fluorescencia del dador después del foto-quemado, la relación entre la fluorescencia antes y después decrece. Esto se puede observar en el gráfico de la Figura 13.

Uno de los blancos naturales del complejo cdk5/p35 es la proteína de unión a microtúbulos tau. Por esta razón decidimos realizar estudios de transferencia de energía entre estas dos proteínas. En la Figura 13 A se muestra una curva temporal de las intensidades de fluorescencia de cdk5-YFP y tau-CFP. Después del foto-quemado del aceptor es posible apreciar un leve aumento en la intensidad de fluorescencia del aceptor, en este caso tau-CFP, por lo tanto no es posible determinar si existe transferencia de energía entre cdk5-YFP y tau-CFP en condiciones controles. En la Figura 11B se muestra la imagen antes y después del foto-quemado de los tres canales YFP, CFP y FRET. En cuanto al porcentaje de FRET al igual que en el caso anterior, el valor promedio es negativo, como se aprecia en el gráfico de la Figura 13.



Posteriormente decidimos observar si era posible detectar algún tipo de transferencia de energía entre dos construcciones de la proteína tau-CFP/YFP. La EA se caracteriza por las lesiones intracelulares denominadas ONF, que son acumulaciones de PHF, como consecuencia del agregado de la proteína tau hiperfosforilada. Como un posible modelo, intentamos detectar la transferencia de energía entre dos construcciones de la proteína tau con pEYFP o pECFP. En la Figura 12A es posible observar un curso temporal de la intensidad de fluorescencia en condiciones controles, de la proteína tau-

CFP y tau-YFP. Una vez realizado el foto-quemado del aceptor, que en este caso corresponde a tau-CFP, observamos que no existe transferencia de energía entre ambas moléculas. Al realizar el cálculo del porcentaje de FRET volvemos a encontrar un valor negativo, al no haber incremento en la intensidad de fluorescencia del dador, esto se aprecia en la Figura 13.



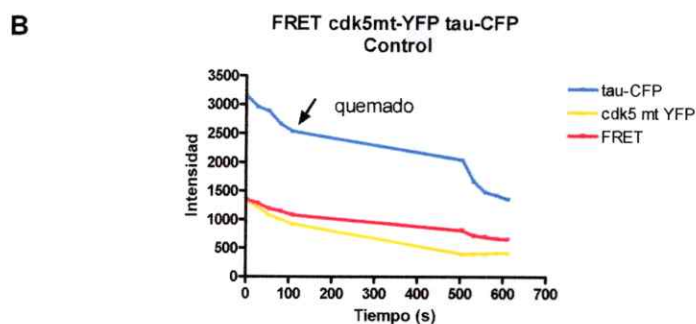
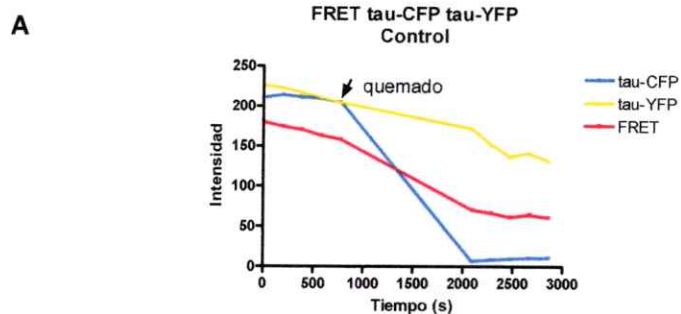


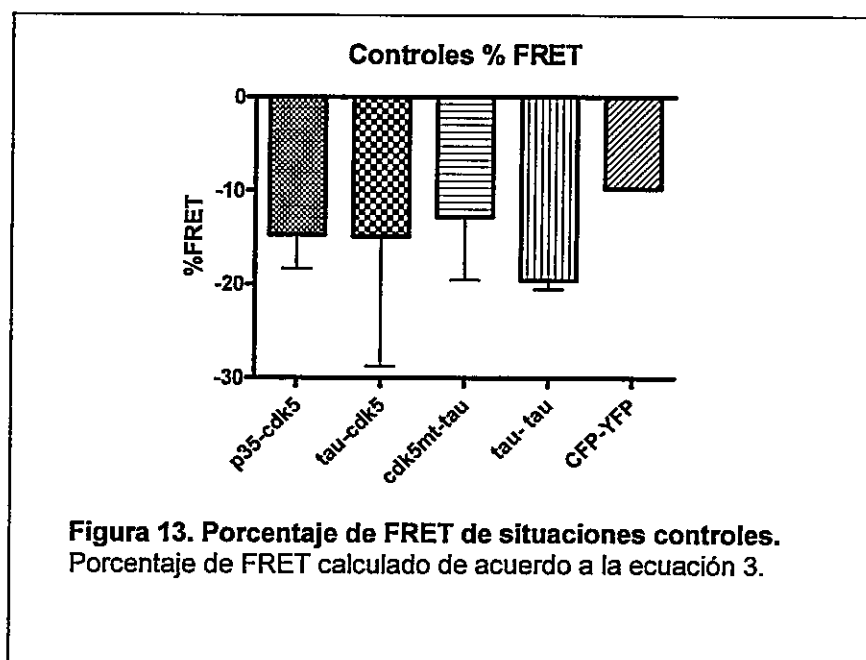
Figura 12. FRET entre tau-CFP y tau-YFP y entre cdk5 Y15F-YFP y tau-CFP. Transfección y captura de imágenes como se explica en la Figura 10. **A.-** Curva de curso temporal para cdk5 Y15F –YFP (amarillo), tau-CFP (azul) y FRET (rojo). **B.-** Curva de curso temporal de la intensidad de fluorescencia de tau-CFP (azul), tau-YFP (amarillo) y FRET (rojo).

Además realizamos ensayos entre la mutante de pérdida de función cdk5 Y15F y la proteína tau-CFP, como se observa en la Figura 12B no existe transferencia de energía entre estas dos proteínas en condiciones controles. Al realizar el foto-quemado del aceptor existe una disminución en la intensidad de fluorescencia del dador, lo que da cuenta a su vez del valor negativo del porcentaje de FRET observado en la Figura 15.

Para poder analizar los datos de FRET, y debido a que quemar completamente el aceptor no fue posible, se decidió expresar la cantidad de FRET de acuerdo al aumento en la fluorescencia del dador después del quemado. (Karpova y cols, 2002, Kim y cols 2005, Kretschmar y col 2004)

$$E_F = (I_6 - I_5) * 100 / I_6 \text{ (ecuación 3)}$$

Donde I_n corresponde a la intensidad de la fluorescencia de CFP en el tiempo n . Debido a que el quemado ocurre entre los puntos 5 y 6, esta fórmula da cuenta del incremento en la intensidad de fluorescencia de CFP después del quemado de YFP, normalizado por la fluorescencia de CFP antes del quemado. Además, el porcentaje de la potencia del láser utilizado se eligió para evitar un foto-quemado durante la captura de la imagen (0,15 % transmisión). En la Figura 13 podemos observar el porcentaje de FRET obtenido con los distintos pares de proteínas de fusión en condiciones controles. La interacción entre cdk5-YFP y su activador p35, entre tau-CFP y cdk5-YFP, entre la proteína tau fusionada a CFP y a YFP, entre la mutante sin actividad de cdk5-YFP y tau, y el control de FRET estocástico de los plasmidios solos.



3.-Analizar los cambios de distribución subcelular y la interacción de cdk5-p35 y cdk5-tau por medio de FRET en células de neuroblastoma tratadas con A β , y con peróxido de hidrógeno, en condiciones que promueven degeneración neuronal.

Para abordar este objetivo, se procedió de la misma manera que en el objetivo anterior, pero se realizaron distintos tratamientos a los distintos pares de proteínas de fusión.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la presencia del péptido beta-amiloide en cultivos de neuroblastoma de ratón y en cultivo primario producen un incremento en la actividad de la proteína quinasa cdk5, estos estudios fueron muy relevantes en contribuir en la dilucidación de la patología de la enfermedad de Alzheimer.

Otro factor de interés es el estudio del efecto del estrés oxidativo en el complejo cdk5/p35. En nuestro laboratorio se ha reportado que la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), en cultivos celulares se traduce en un incremento de la actividad del complejo cdk5-p35 (Zambrano y cols 2004). Todos estos estudios se han realizado de manera indirecta, al observar la actividad quinasa por inmunoprecipitación del complejo, en las distintas condiciones. Es por esto que deseábamos desarrollar un ensayo que nos demostrara la interacción del complejo en un célula viva. La actual tecnología nos permite desarrollar estos ensayos, y hacer un curso temporal de la actividad de la proteína, en un cultivo vivo. Como se observó en el objetivo anterior, no se detectó transferencia de energía en condiciones controles, pero no se puede descartar que las proteínas en realidad estén interactuando. La proteína de fusión que se introduce en la célula, no es de un tamaño menor, y esto puede dificultar la detección del FRET. Al introducir un tratamiento que intensifique la interacción de estas proteínas, pretendemos detectar una

transferencia de energía que nos indique que el sistema de proteínas se encuentra a una distancia lo suficientemente cerca, como para que se produzca una interacción.

El mecanismo usado para la detección de FRET fue igual al objetivo anterior, añadiendo un tratamiento, péptido A β 10 μ M por 24 horas, o 1 hora de exposición a H₂O₂ 100 μ M.

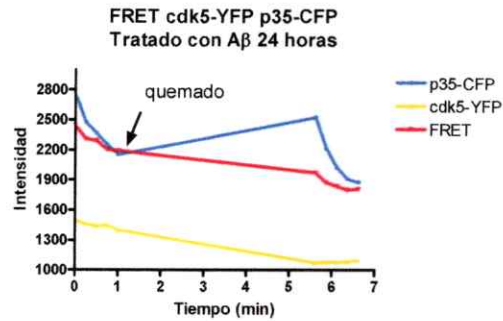
En la figura 14 A observamos que ante la presencia del péptido A β en el cultivo, la transferencia de energía entre cdk5-YFP y p35-CFP incrementa con respecto a lo observado en la Figura 10. Al realizar el fofo-quemado del aceptor, es decir cdk5-YFP, podemos notar un incremento por parte del dador, en este caso p35-CFP, como muestra la Figura 14A. Al realizar el cálculo del porcentaje de FRET de acuerdo a la ecuación 3, observamos un incremento con respecto a la situación control, como se muestra en la Figura 16.

Una vez realizados los experimentos en presencia del péptido A β , decidimos agregar en el sistema H₂O₂ 100 μ M por 1 hora de acuerdo a las condiciones establecidas por Zambrano y col. En la Figura 15 A se observa un curso temporal de una transfección transiente de cdk5-YFP y p35-CFP, al exponer el cultivo celular a la presencia de H₂O₂ 100 μ M se produce un aumento en la transferencia de energía, que es posible de detectar debido al aumento en la intensidad de fluorescencia que produce el dador después del foto-quemado. Al calcular el porcentaje de FRET producido por este tratamiento observamos que existe un incremento significativo con respecto a la situación control, como se observa en la Figura 16.

Resumiendo, con respecto al complejo cdk5/p35 se observa un incremento del porcentaje de FRET ante la presencia de ambos tratamientos, péptido A β y H₂O₂ con respecto a las situaciones controles observadas previamente. Es decir, la presencia del

tratamiento produce un incremento en la transferencia de energía entre estas dos proteínas.

A



B

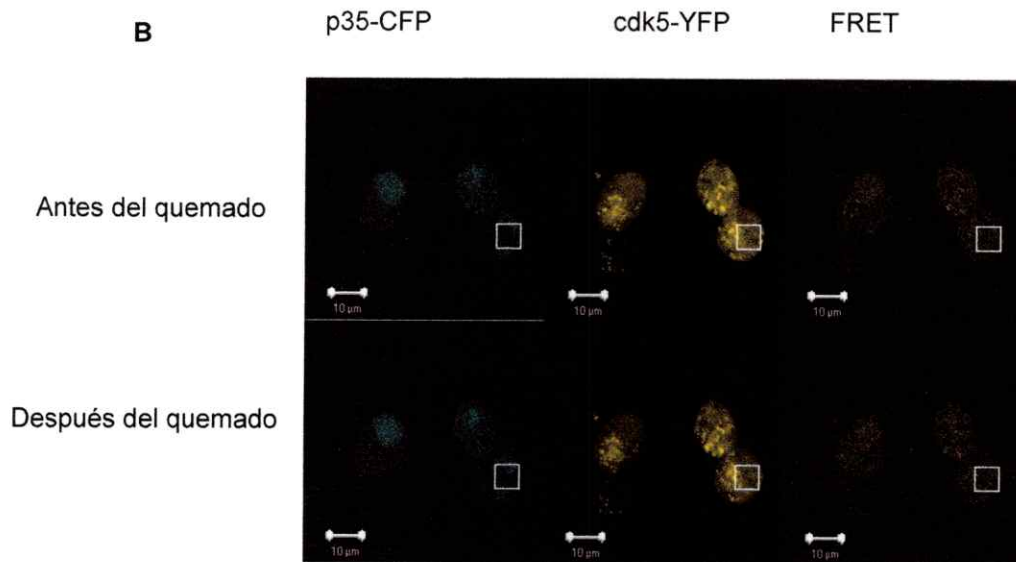


Figura 14. FRET cdk5-YFP p35-CFP tratado con 10 μ M A β por 24 horas.

Transfección transiente de cdk5-YFP y p35-CFP como se explica en Figura 10, tratamiento con 10 μ M A β por 24 horas, se retira el medio, se realizan 3 lavados con PBS y se agrega medio KRHG. **A.-** Curva de curso temporal de cdk5-YFP (amarillo), p35-CFP (azul) y FRET (rojo). **B.-** Imagen representativa, antes y después del foto-quemado.

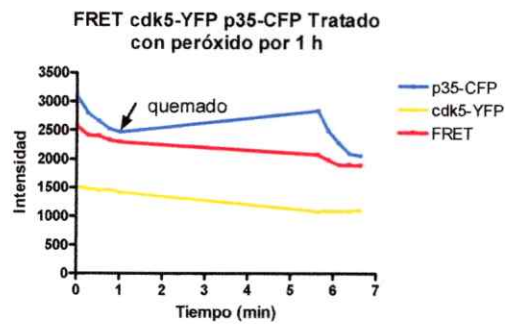
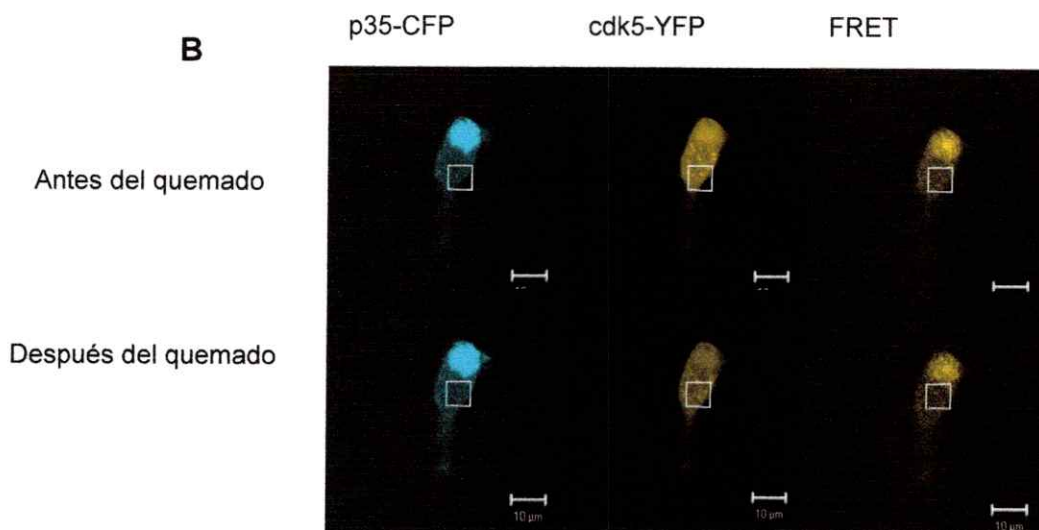
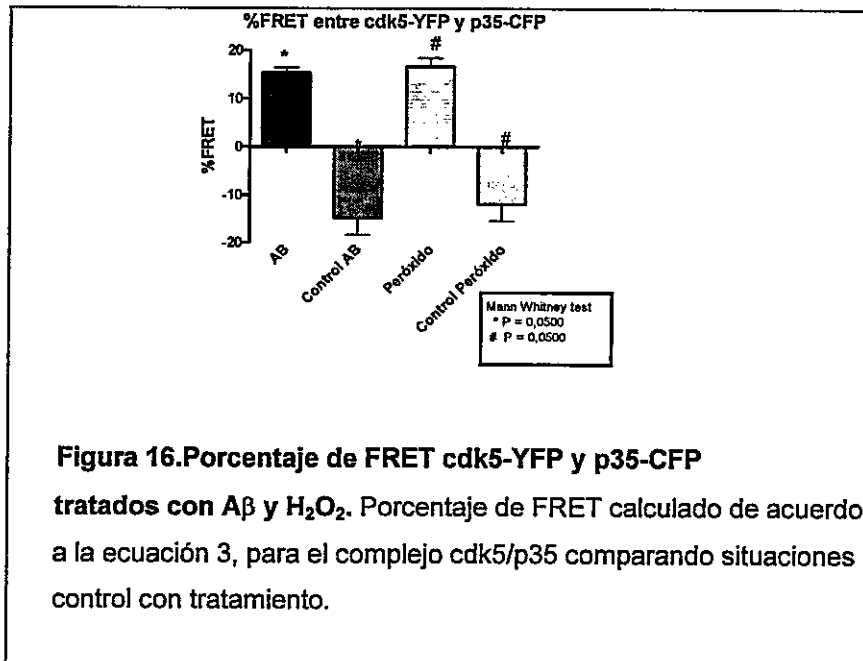
A**B**

Figura 15. FRET cdk5-YFP p35-CFP tratado con 100 μM de H₂O₂ por 1 hora. Transfección transiente de cdk5-YFP y p35-CFP como se explica en Materiales y Métodos y en la Figura 10. **A.-** Curva de curso temporal de cdk5-YFP (amarillo), p35-CFP (azul) y FRET (rojo). **B.-** Imagen representativa antes y después del foto-quemado.

Al igual que en el objetivo anterior, al ser la proteína tau un blanco natural de cdk5, decidimos agregar un ensayo para estas dos proteínas, pero agregando en el sistema la presencia del péptido Aβ. En la Figura 17A observamos un curso temporal de una transfección transiente de cdk5-YFP y tau-CFP expuesto al péptido Aβ. A pesar del tratamiento no observamos transferencia de energía entre estas dos proteínas, ya que no

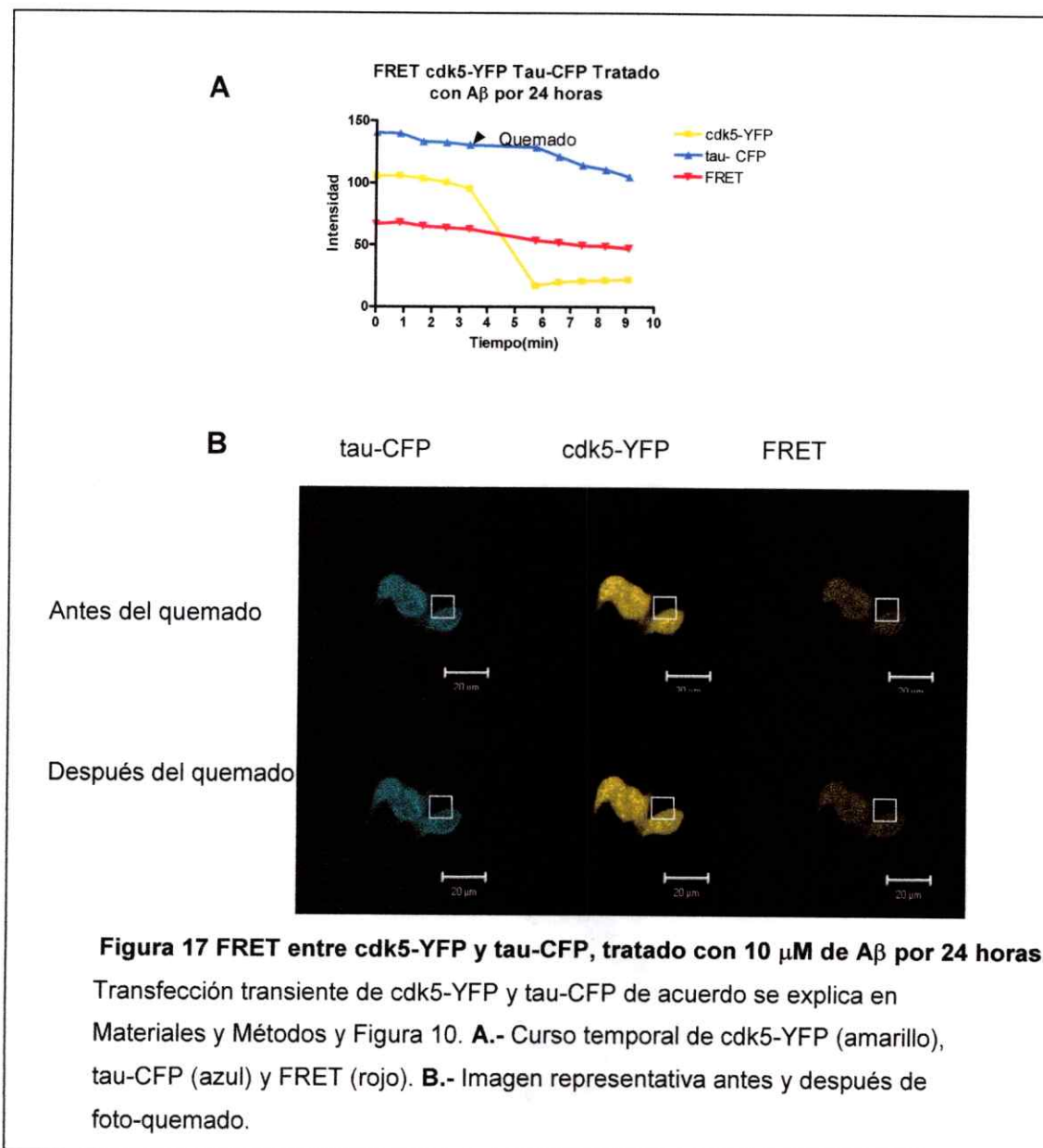
existe un incremento en la intensidad de fluorescencia del dador una vez realizado el fotoquemado de cdk5-YFP. Se produce la misma situación que se mostró en la condición control, por lo tanto al calcular el porcentaje de FRET, este valor es negativo, tal como se observa en la Figura 18 B.



Luego se realizó el mismo ensayo pero el tratamiento utilizado fue H $_2$ O $_2$, como se observa en la Figura 18 A, el curso temporal de la intensidad de fluorescencia nos indica que no existe transferencia de energía entre cdk5-YFP y tau-CFP, al realizar el cálculo del porcentaje de FRET, al igual que en el caso anterior es negativo como se observa en la Figura 18 B.

Debido a que existe evidencia de que la proteína tau al encontrarse hiperfosforilada produce una autoagregación, nos preguntamos si esta interacción era posible de detectar *in vivo*, por medio de FRET. En nuestro laboratorio se estaban realizando estudios con estrés oxidativo, y decidimos aplicar este tratamiento y observar

el comportamiento de las proteínas en neuroblastoma. En la Figura 18 C observamos un curso temporal de la intensidad de fluorescencia antes y después del foto-quemado. En el gráfico se aprecia que existe una disminución en la intensidad de fluorescencia de p35-CFP después del foto-quemado. Por lo tanto no existe transferencia de energía entre estas dos proteínas cuando se exponen a H_2O_2 .



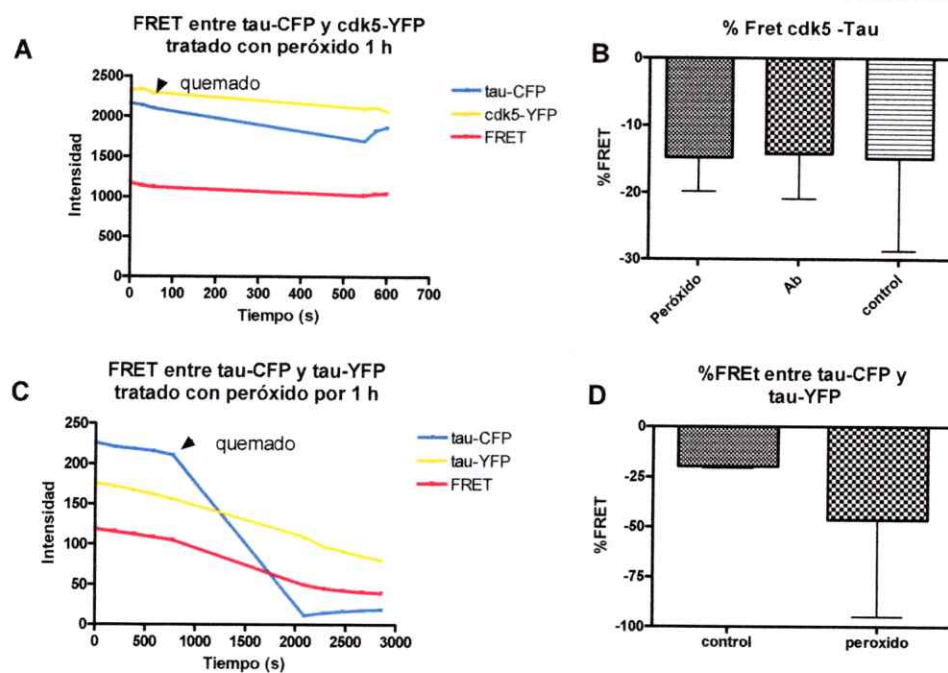


Figura 18 FRET entre tau-CFP/ckd5-YFP y entre tau-CFP/tau-YFP expuesto por 1 hora a 100 μM con H_2O_2 , y gráfico de porcentaje de FRET en cada caso.

Transfecciones transientes de acuerdo a se muestra en Materiales y Métodos, tratamiento de 1 hora con 100 μM de H_2O_2 , después del tratamiento, se retira el medio se lava tres veces con PBS y se agrega medio KRHG.

A.- Curso temporal de la intensidad de fluorescencia de cdk5-YFP (amarillo) tau-CFP (azul) y FRET (rojo). **B.-** Gráfico de porcentaje de FRET para cdk5/tau calculado de acuerdo a ecuación 3 descrita anteriormente. **C.-** Curva de curso temporal de tau-YFP (amarillo), tau-CFP (azul) y FRET (rojo). **D.-** Gráfico de porcentaje de FRET de tau/tau calculado de acuerdo a ecuación 3 de manera similar al gráfico anterior.

DISCUSIÓN

El avance en la tecnología nos ha permitido revivir antiguas técnicas, que aunque de gran utilidad, eran complejas de realizar con los materiales disponibles en ese momento. Especialmente el avance en el estudio de la proteína fluorescente verde, y la emergente ingeniería genética, que nos permitió obtener variantes de esta proteína, facilitaron el avance de la biología celular y en especial el estudio de las proteínas, pero ahora en el interior de una célula viva.

Al acoplar técnicas como el FRET y el FRAP a estas nuevas proteínas, ha permitido confirmar, refutar o proponer nuevas teorías tanto en la interacción de proteínas, como en su movilidad en el interior de la célula.

En nuestro laboratorio, el principal motivo de investigación se enfoca en el estudio de un complejo formado por la proteína quinasa cdk5 y su activador p35, y como este complejo es des-regulado durante el transcurso de la enfermedad de Alzheimer. Aunque previamente se había propuesto que estas dos proteínas interactuaban, sólo se había realizado de la manera convencional, y fue de gran interés para nosotros determinar si esta interacción podría ser visualizada por FRET.

Gracias a la gentil donación del Dr. Jovin, del Max Plank Institute for Biophysical-Chemistry en Alemania, que nos proporcionó los vectores pECFP y pEYFP, logramos construir proteínas de fusión de nuestro complejo. Además agregamos algunas proteínas de interés en nuestro laboratorio, como uno de los blancos del complejo cdk5/p35, como lo es la proteína del unión al citoesqueleto, tau, y una proteína cdk5 Y15F que no posee actividad quinasa, desarrollada en la tesis de Omar Ramirez.

El primer paso fue desarrollar las proteínas de fusión y demostrar que la adición de esta variante de la proteína fluorescente verde (yellow fluorescence protein YFP o cyan fluorescence protein CFP), no afectaba su actividad, y que era correctamente expresada en la célula. La secuenciación de los vectores obtenidos mostró la correcta clonación de los fragmentos obtenidos, y la bioquímica indicó que las proteínas se estaban expresando y eran detectables por anticuerpos.

En cuanto a la actividad de la quinasa, como se observa en la figura 6, no se vio afectada por la proteína de fusión.

Para los ensayos de recuperación de la fluorescencia o FRAP, se expresaron los datos en porcentaje de la recuperación de la fluorescencia. Como se aprecia en la figura 9, que representa las mediciones para la proteína cdk5-YFP en presencia y ausencia del péptido A β , además también se muestra el efecto de peróxido. No nos fue posible obtener el valor teórico de la recuperación de fluorescencia, pero decidimos realizar una comparación con respecto a la situación control. Aunque los datos obtenidos no son significativos, nos muestran una tendencia, en donde la presencia del tratamiento produce una disminución del porcentaje de recuperación. Si analizamos la situación con detenimiento, es un proceso esperado, ya que al agregar el tratamiento, esto se traduce en una activación del complejo cdk5/p35. Esta interacción puede provocar la disminución en la recuperación de la fluorescencia, ya que al activarse el complejo, la unión de p35, podría provocar este desfase, al capturar la proteína cdk5, y comenzar a producir las reacciones de fosforilación. Esto también se observa en la disminución de la fracción móvil de las proteínas, ambos datos nos dan indicios de un desfase en la recuperación, y una disminución de la fracción móvil que dan cuenta de la activación.

En el caso de p35, realizamos solo el ensayo en presencia de peróxido de hidrógeno, y esto nos mostró la misma tendencia que la proteína cdk5. Existe una tendencia de disminución, pero no resulta significativa, por lo tanto solo nos podría indicar una cantidad de proteína que está reteniéndose en algún lugar, posiblemente interactuando con cdk5.(Lippincott y cols 2001)

Al realizar ensayos con cdk5 Y15F YFP, nos encontramos con un dato contrario, al observar el porcentaje de recuperación de fluorescencia en el control, el valor es mucho menor en promedio que al exponer el cultivo a peróxido de hidrógeno, quizás la mutación efectuada está provocando un secuestro del complejo, ya sea en algún compartimiento, o unión a alguna proteína. No sabemos que está ocurriendo con el complejo, ya que no está activo, tal como lo muestra el ensayo de actividad, o en realidad es la propia cdk5 mutada la que al unir el activador autosecuestra el complejo, esto podría ser una posibilidad.

En cuanto al segundo objetivo, nos interesaba estudiar si era posible detectar la interacción entre cdk5/p35 y cdk5/tau, aunque también se agregaron estudios con la proteína cdk5 mutante Y15F. Debido a la naturaleza de la técnica, deseábamos estudiar por FRET en condiciones normales estas interacciones. Además en un principio nos habíamos planteado realizar estos estudios en cultivo primario de hipocampo de rata, un modelo mucho más cercano de estudio, pero la dificultad de la transfección de este tipo de células, y el hecho de necesitar una co-transfección, nos llevó abandonar ese acercamiento y solo enfocarnos en la factibilidad de la técnica en un modelo de línea celular. Aún así fue de gran dificultad estandarizar la técnica, debido al poco conocimiento que existía en nuestro medio, es así que fuimos realizando modificaciones en el camino de nuestros experimentos.

El microscopio utilizado, LSM Meta 510, permitía utilizar un output de láser de un 50 %, esto se realizaba para poder efectuar el foto-quemado de YFP, que debido a su gran energía era difícil de conseguir, pero en el caso de la captura de imágenes solo se utilizaba un 0,15 % del output, para disminuir el ruido de la imagen. En cuanto a la captura de las imágenes, los canales YFP y FRET se obtuvieron con la misma ganancia, para no observar el ruido, y en la excitación se utilizó la misma configuración para CFP y FRET.

Establecidas estas consideraciones, nos preocupamos de las cantidades de DNA utilizadas. Inicialmente habíamos diseñado el estudio trabajando con líneas estables de N2A que expresaran alguna de las dos construcciones, y luego transfectar el otro plasmidio. Lamentablemente nos encontramos con la sorpresa que en el caso del vector CFP, independiente cual fuera la proteína acoplada, se perdía a medida que se iba seleccionando la célula. La proteína es detectable durante la selección, pero por microscopía la fluorescencia obtenida no es suficiente para la realización de los ensayos. Por estas razones decidimos trabajar con transfecciones transitorias de proteínas, pero el vector CFP siempre fue añadido en el doble de concentración que YFP. Las células en las cuales se realizaron los ensayos, expresaban ambas construcciones en aproximadamente una misma intensidad. Al realizar los ensayos tal como se muestra en la Figura 10, no encontramos un FRET real, aunque observamos señal en el canal de FRET, al realizar el análisis matemático del porcentaje, nos encontramos que después del foto-quemado se produce una disminución en el canal del dador, esto explica el valor negativo que nos muestran los gráficos, Figura 13. Inicialmente pensábamos que encontraríamos un FRET basal, pero en ninguno de los casos lo encontramos. Esto no quiere decir que las proteínas no estén interactuando, puede deberse a que la adición de la proteína fluorescente amarilla o celeste, no

permita una distancia suficiente para la transferencia de energía. Realizamos ensayos entre las proteínas cdk5/p35, cdk5/tau, cdk5 mut/tau, tau/tau, y en ninguno de los casos los valores obtenidos correspondían a un FRET real, incluso al realizar un ensayo entre los vectores no fusionados, como un control, también nos encontramos con valores negativos.

Aunque esto no era lo que esperábamos, decidimos realizar los mismos estudios en presencia A β , para observar si existía algún cambio en la interacción detectable por FRET. Además también agregamos un tratamiento extra que correspondía a la exposición a H₂O₂ 100 μ M, que previamente en nuestro laboratorio (Zambrano y cols 2004), había demostrado activar este complejo.

En la Figura 14, podemos observar un experimento representativo, en donde se muestra el FRET entre cdk5/p35 en presencia de 10 μ M de A β . En el gráfico que muestra el curso temporal de la intensidad de fluorescencia, antes y después del quemado del aceptor, podemos apreciar un aumento de la intensidad de la fluorescencia del dador, que nos muestra un porcentaje de FRET de 14,79 (\pm S.E.M), que si lo comparamos con el valor negativo obtenido en el objetivo 2, es significativamente mayor. Esto posiblemente se puede deber a que, como propone Alvarez y cols, al producirse la activación del complejo, esto puede producir modificaciones post-transcripcionales que estén contribuyendo a una disminución de las distancias a la cual se encuentran ambas proteínas. Lo cierto es que al exponer el cultivo al péptido, esto provoca un aumento de la interacción que es posible detectar por medio de la técnica de FRET.

Este mismo complejo se analizó, pero ahora expuestos a H₂O₂, por 1 hora. La Figura 15 nos muestra que al igual que en el caso anterior, la presencia del peróxido

provocó un aumento en la cantidad de FRET, y este análisis se realizó de la misma manera que en el caso anterior. En este caso el porcentaje de FRET obtenido fue 18,39 (\pm S.E.M). Al igual que en el caso anterior, probablemente la posible detección de FRET sólo durante la exposición al peróxido, puede deberse a cambios en cdk5, favorecidos por estos tratamiento ($A\beta$ y H_2O_2), que permitan la detección de su interacción con p35. Pero es importante recalcar, que en el caso anterior donde no se observa FRET real, no es posible descartar su interacción, la cual ha sido probada previamente, pero que la presencia de estos factores pueden estar provocando cambios estructurales que hagan posible la detección de la interacción por FRET.

Como se ha discutido previamente en nuestro laboratorio, no se sabe a ciencia cierta como los cambio en cdk5 provocados por el $A\beta$ pueden contribuir a la muerte neuronal, (Alvarez y cols 1999) sólo sabemos que existe un aumento en la actividad del complejo, que altera el citoesqueleto de la célula, o bien podría estar activando alguna vía apoptótica, incluso podrían ser ambos factores. Nosotros no fuimos capaces de detectar cambios en la interacción entre cdk5-tau o tau-tau por medio de FRET. Posiblemente estos cambios ocurrieran en tiempos posteriores de incubación, pero la imposibilidad técnica de mantener la intensidad de fluorescencia después de un par de días de la transfección, así como también el efecto tóxico de la presencia del $A\beta$ en el cultivo, pueden ser una posible causa de no poder detectar este fenómeno por técnicas de microscopía.

En el caso de la incubación con H_2O_2 , estudios de nuestro laboratorio han encontrado que aunque existe un incremento en la actividad del complejo antes la presencia de ROS, algo que pudimos observar en nuestros estudios en la Figura 14 y en los análisis de FRAP desarrollados en el primer objetivo, al momento de intentar

determinar la interacción de este complejo con la proteína tau, no se detectó un aumento en la transferencia de energía. Esto se puede explicar ya que estudios con ROS en el efecto sobre tau, se encontró que inicialmente se produce una desfosforilación, (Zambrano y cols 2004), y la activación del complejo probablemente esté dando cuenta de la actividad sobre otras proteínas que se encuentren en el sistema, por ejemplo la fosfatasa PP1, que podría apoyar los datos de desfosforilación que se observan inicialmente. Como se discutió anteriormente, estos efectos no se pudieron repetir con el péptido A β , ya que no se observó efecto a las 24 horas, aumentar el tiempo de tratamiento no era viable para las células.

Otro factor importante de destacar son los estudios de la proteína mutante de pérdida de función cdk5 Y15F YFP, que nos muestran que aún ante la presencia de A β , este complejo no es capaz de ser detectado por FRET para determinar su interacción. Al igual que en el caso de la detección de FRAP, creemos que el complejo puede estar siendo secuestrado, o auto-secuestrado por la proteína mutante, impidiendo así su distribución normal, y por supuesto su actividad, debido a que es un mutante sin actividad.

CONCLUSIONES

Nuestro deseo era probar si era posible utilizar un nuevo acercamiento en el estudio de interacción de proteínas, especialmente el complejo cdk5/p35 estudiado en nuestro laboratorio dentro del contexto de la enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque los primeros estudios no nos dieron resultados positivos, logramos demostrar que la exposición del complejo a factores tóxicos presentes en la EA, como el péptido beta-amiloide y especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno eran capaces de producir un aumento en la interacción entre cdk5 y p35, detectable por la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia. Además observamos por el la recuperación de la fluorescencia después del foto-quemado que existía cierta tendencia a disminuir el porcentaje de fluorescencia recuperado, lo que sugeriría un retraso por la captura de la proteína en el complejo activo.

En cuanto a la proteína tau, creemos que más estudios deben realizarse, para observar su interacción o sus cambios en la distribución ante la presencia de A β . Observamos ciertos cambios en la distribución, pero no fue posible realizar mediciones de FRET debido a la extremada baja intensidad de fluorescencia que se observaba en aquellas muestras, pero creemos que es posible realizar estos estudios, quizás utilizando el fragmento 25-35 del péptido A β , que se sabe posee un mayor actividad tóxica, y pueden realizarse estudios a un tiempo menor.

En nuestro laboratorio se han desarrollado algunos péptidos inhibidores del complejo cdk5/p35, pensando a futuro como una terapia contra la EA. La complementación de estudios de estos inhibidores en nuestro sistema de FRET,

pueden contribuir a la caracterización de estos péptidos, como un paso previo de la investigación a futuro.

BIBLIOGRAFÍA



Alvarez A., Toro R., Cáceres A., Maccioni R. B. (1999). Inhibition of tau phosphorylating protein kinase Cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* **459**: 421-426.

Alvarez A., Muñoz J. P., Maccioni, R. B. (2001). A Cdk5-p35 stable complex is involved in the β -amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Experimental Cell Research* **264**: 266-274.

Benavides D. R. and Bibb J. A.. (2004) Role of Cdk5 in Drug Abuse and Plasticity *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1025**: 335-344.

Dhavan R. and Tsai L-H. (2001) A decade of cdk5. *Nature Reviews Mol Cell Biol* **2**: 749-759

Imahori, K. and Uchida, T. (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease *J. Biochem.* **121**: 179-188.

Jares-Erijman E. And Jovin T.M. (2002) FRET imaging. *Nature Biotech.* **21** (11):1387-1395

Karpova T.S, Baumann C.T, He L., Wu X., Grammer A., Lipsky P, Hager G.L., & M^oNally J.G (2002) Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow

fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J. of Microscopy*, **209**: 56–70

Kim K., Barhoumi R., Burghardt R. and Safe S. (2005). Analysis of estrogen receptor α -Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer. *Molecular Endocrinology*. **19** (4): 843

Kirsch A.K., Subramanian V., Jenei A., Jovin, T.M. (1999) Fluorescent energy transfer detected by scanning near-field optical microscopy. *Journal of Microscopy* **194**: 448-454.

Kretschmar A., Dinger M.C., Henze C., Brocke-Heidrich K. and Horn F. (2004) Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochem. J.* (2004) **377**: 289–297

Lippincott-Schwartz J., Snapp E. and Kenworthy A. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Moll Cell Biol* **2**: 444-456.

Maccioni R.B., Otth C. , Concha I.I., and Muñoz J.P., (2001) "The protein kinase cdk5: structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology". *European J. Biochemistry* **268**:1518-1527

Maccioni R. B., Muñoz, J. P. and Barbeito L., (2001b). The molecular bases of Alzheimer's disease and others neurodegenerative disorders. *Arch. Medical Research* **32**, 367-381.

Mistelli T. (2001) Protein Dynamics: Implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* **291**: 843-847

Paglini, G. Pigino, G. Morfini, R.B. Maccioni, S. Quiroga, A. Ferreira and A. Cáceres (1998) Evidence for the participation of the neuron-specific cdk5 activator, P35, during laminin-enhanced axonal growth. *Journal of Neuroscience* **18**: 9858- 9869.

Tarricone C., Dhavan R., Peng J., Areces L., Tsai L-H, and Musacchio A. (2001) Structure and regulation of the cdk5-p25^{nck5a} complex. *Mol Cell* **8**: 657-669.

Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S. Jr, Chae, T., Harlow, E. (1996) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**:419-23

Zambrano C.A, Egaña J.T., Núñez M.T., Maccioni R.B. and González-Billault. (2004) Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP. *Free Radical Biology & Medicine* **36** (11): 1393 – 1402