

UCH-FC
DOC-B
C175
C.L



**ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA
PROTEINA MICROTUBULAR DMAP-85 DE *Drosophila*
*melanogaster***

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

Facultad de Ciencias

por

Verónica Cambiazo Ayala

Septiembre, 1998

Director de Tesis: Dr. Ricardo B. Maccioni



FACULTAD DE CIENCIAS

Las Palmeras 3425 - Cas. 653 - Santiago



ESCUELA DE POSTGRADO

Fono: 2712982 - Fax: 2712975

e-mail: epocas@pregrado.ciencias.uchile.cl

UNIVERSIDAD DE CHILE

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Hemos tomado el Examen de Grado que prescribe el Decreto N° 1945 del 26 de marzo de 1968 y analizado el conjunto de sus antecedentes durante su permanencia en el Programa de Doctorado en Ciencias, estimamos que la señorita **LILIANA VERÓNICA CAMBIAZO AYALA**, posee los requisitos para que se le otorgue el Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología.

LA COMISION

PRESIDE

Señor Dr. Octavio Monasterio,
Presidente Comité de Biología

Señor Profesor
Dr. Jorge Garrido

Señor Profesor
Dr. Roberto Mayor

Señor Profesor
Dr. Ariel Orellana

Señor Profesor
Dr. Ricardo Maccioni (Director de tesis)

Calificación del Examen:

SANTIAGO, 30 de septiembre de 1998
iss

Octavio Monasterio

Jorge Garrido

Roberto Mayor

Ariel Orellana

Ricardo Maccioni

APROBADO



AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Ricardo B. Maccioni, director de esta Tesis, el apoyo académico y profesional que me brindó durante la realización de este trabajo, En forma especial, quisiera agradecerle que me otorgara el espacio necesario para desarrollarme como científica. Me gustaría destacar su capacidad de estímulo, la cual se tradujo en las numerosas gestiones que realizó para permitirme realizar estadias de investigación y asistir a reuniones científicas en el extranjero.

A los miembros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, pasados y presentes, muy especialmente a Juan Pablo Henríquez por su constancia y amistad, a Gustavo Farías por su paciencia y colaboración y a Milton Alvarado por su increíble buen ánimo.

Quisiera agradecer al Dr. Jacques Nunez y a la Dra. Dominique Couchie por su apoyo y paciencia en los inicios de esta Tesis. Agradezco al Dr. Claudio Sunkel su generosidad e interés en el desarrollo de este trabajo. En forma especial quisiera agradecer a los miembros de su Laboratorio, en particular a Joana Perdigao y Elsa Logarinho, por su gran apoyo y desinteresada colaboración. Agradezco también al Dr. Ginés Morata y a los miembros de su Laboratorio por su excelente acogida y apoyo.

Agradezco a la Escuela de Post-grado de la Facultad y especialmente a los miembros del Subcomité de Biología Molecular y Celular, por su apoyo al permitirme realizar un inusual Programa de Doctorado. Agradezco muy especialmente al Dr. Pedro Labarca y a Ricardo Delgado la ayuda brindada durante la realización de esta Tesis.

Finalmente quisiera agradecer a mis amigos, especialmente a Victor Troncoso, Frances Calderón y Antonieta Labra por su estímulo y paciencia y a mi querido hermano por su experta ayuda y generosidad.

Esta tesis fue financiada por proyectos Fondecyt 1950696 y 1940367, además de la Beca Marie Curie de la Comunidad Europea, Beca Fundación Andes tipo B y proyectos de postgrado 026 y 031 de la Universidad de Chile al estudiante. La investigación de la tesis fue también financiada por Cátedra Presidencial en Ciencia al director de la tesis.

INDICE DE MATERIAS

MATERIAS	PAGINAS
INDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
I. El citoesqueleto microtubular.	6
II. Proteínas asociadas a microtúbulos.	10
III. El citoesqueleto en <i>D. melanogaster</i> .	15
III.1. Organización del citoesqueleto durante el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> .	16
IV. Proteínas asociadas al citoesqueleto en <i>D. melanogaster</i> .	25
IV.1. Proteínas asociadas a MFs.	26
IV.2. Proteínas asociadas a MTs.	28
V. Fundamentos de la investigación.	30
MATERIALES Y METODOS	33
I. Análisis de la interacción <i>in vitro</i> de DMAP-85 con MTs y MFs.	33
I.1. Obtención de extractos proteicos de embriones, larvas y adultos de <i>D. melanogaster</i> .	33

I.2. Obtención de fracciones enriquecidas en la proteína DMAP-85.	33
I.3. Interacción de DMAP-85 con el sistema microtubular.	33
I.4. Ensayos de ensamblaje de tubulina em presencia de DMAP-85.	33
I.5. Interacción de DMAP-85 con MFs.	33
I.6. Inmunoprecipitación de DMAP-85 en extractos de embriones.	34
I.7. Electroforesis y Western blots.	34
II. Clonamiento y secuenciación de DMAP-85.	35
II.1. Purificación y microsecuenciación de DMAP-85	35
II.2. Producción y purificación de un anticuerpo anti-DMAP-85 (DMAP.1).	35
II.3. Análisis de una genoteca de expresión.	36
II.4. Análisis de los clones positivos.	36
II.5. Clonamiento y secuenciación del extremo 5' del cDNA de DMAP-85.	38
II.6. Obtención del cDNA total de DMAP-85 y de la proteína recombinante.	39
II.7. Comparación de patrones peptídicos.	39
II.8. Análisis mediante Southern blots.	40
II.9. Hibridación <i>in situ</i> en cromosomas politénicos.	40
III. Identificación de los dominios de unión de DMAP-85 a MTs.	40
III.1. Obtención de proteínas recombinantes truncadas.	40
III.2. Ensayos de overlay.	41

IV. Análisis de la expresión temporal del mensajero y de la proteína DMAP-85 .	41
IV.1. Cultivo de <i>D. melanogaster</i> .	41
IV.2. Ensayos de Northern blots.	42
IV.3. Western blots de extractos proteicos obtenidos en diferentes estados del desarrollo.	42
V. Análisis del patrón de distribución de DMAP-85 y de su relación con otros componentes del citoesqueleto.	43
V.1. Ensayos mediante inmunofluorescencias simples en montajes completos de embriones.	43
V.2. Ensayos mediante inmunofluorescencias dobles.	44
RESULTADOS	45
I. Caracterización de la interacción de DMAP-85 con el sistema microtubular.	45
I.1. Identificación de MAPs en extractos de larvas de <i>D. melanogaster</i> .	45
I.2. Cromatografía de afinidad de extractos de <i>D. melanogaster</i> en una columna de MTs estabilizados con taxol.	48
I.3. Cromatografía de afinidad de extractos de <i>D. melanogaster</i> en una columna construida con péptidos del dominio C-terminal de tubulina.	50
I.4. Ensayos de cosedimentación de DMAP-85 con MTs estabilizados con taxol y con polímeros de S-tubulina.	52
I.5. Cromatografía de afinidad de DMAP-85 en una columna del péptido β II-(422-434) de tubulina.	54
I.6. Efecto de DMAP-85 sobre la cinética de ensamblaje de tubulina <i>in vitro</i> .	56

I.7. Ensayos de sedimentación de MTs en presencia de DMAP-85.	58
II. Caracterización molecular de DMAP-85.	59
II.1. Obtención de cDNAs con secuencias que codifican para DMAP-85.	59
II.2. Secuencia nucleotídica completa del cDNA que codifica para DMAP-85 y secuencia aminoacídica deducida.	69
II.3. Análisis de la secuencia aminoacídica de DMAP-85.	71
II.4. Análisis de Southern blots e hibridaciones <i>in situ</i> .	76
II.5. Identificación en DMAP-85 de los dominios responsables de su interacción con MTs.	78
III. Expresión y distribución subcelular de DMAP-85 durante el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i>.	83
III.1. Análisis de la expresión temporal de DMAP-85 y de su RNA mensajero durante el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .	83
III.2. Análisis de la distribución espacial de DMAP-85 durante el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> y su relación con MTs y MFs.	86
IV. Interacción <i>in vitro</i> de DMAP-85 con MFs.	104
IV.1. Ensayos de cosedimentación de DMAP-85 con MFs.	104
IV.2. Ensayos de inmunoprecipitación de DMAP-85 con MTs y MFs.	104
DISCUSION	107
I. Identificación y caracterización de la proteína DMAP-85 de <i>D. melanogaster</i> .	107
II. Secuenciación del cDNA de DMAP-85 y análisis de las	

propiedades estructurales de esta proteína.	116
III. Distribución de DMAP-85 durante el desarrollo embrionario y análisis de su relación con el citoesqueleto.	126
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFIA	136

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1: Modelo de la asociación de MAPs al sistema tubulina/MTs.	13
Figura 2: Distribución de dominios mitóticos en un embrión en estado de post-gástrula.	19
Figura 3: Organización del citoesqueleto en un blastodermo sincicial.	21
Figura 4: Organización del citoesqueleto en un blastodermo celular.	24
Figura 5: Análisis electroforético de MTs y MAPs presentes en extractos solubles de larvas.	47
Figura 6: Cromatografía de afinidad de extractos solubles de <i>D. melanogaster</i> en columna de MTs estabilizados con taxol.	49
Figura 7: Cromatografía de afinidad de extractos solubles de <i>D. melanogaster</i> en columnas construidas con el fragmento C-terminal de tubulina.	51
Figura 8: Controles de los experimentos de cosedimentación.	53
Figura 9: Cosedimentación de fracciones enriquecidas en DMAP-85 con polímeros de tubulina y S-tubulina.	53
Figura 10: Cromatografías de afinidad de extractos solubles de larvas de <i>D. melanogaster</i> en columnas de Sepharose-péptido β II-(422-434).	55
Figura 11: Análisis de la capacidad de DMAP-85 para promover el ensamblaje de tubulina.	57
Figura 12: Inmunodetección de DMAP-85 en extractos totales de embriones de <i>D. melanogaster</i> .	60

Figura 13: Análisis de hibridación cruzada entre los insertos de los clones aislados.	60
Figura 14: Inmunoreactividad del anticuerpo DMAP.1 con las proteínas recombinantes de los clones aislados.	62
Figura 15: Reconocimiento inmunológico de la proteína recombinante por el anticuerpo DMAP.1.	62
Figura 16: Reconocimiento inmunológico de DMAP-85 por anticuerpos inmunoabsorbidos con la proteína recombinante.	64
Figura 17: Clonamiento del extremo 5' del cDNA que codifica para DMAP-85.	66
Figura 18: Digestión parcial de DMAP-85 nativa y recombinante.	68
Figura 19: Secuencia nucleotídica completa de DMAP-85 y secuencia aminoacídica deducida.	69
Figura 20: Análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína DMAP-85.	72
Figura 21: Análisis de la estructura secundaria de DMAP-85.	73
Figura 22: Esquema de la organización de DMAP-85 y tau.	75
Figura 23: Comparación entre dominios de unión a actina.	75
Figura 24: Análisis mediante Southern blot genómico.	77
Figura 25: Hibridación <i>in situ</i> en cromosomas politénicos de <i>D. melanogaster</i> .	77
Figura 26: Esquema de las diferentes proteínas recombinantes expresadas en <i>E. coli</i> .	79
Figura 27: Inmunoreactividad del anticuerpo DMAP.1 con las proteínas recombinantes truncadas.	80
Figura 28: Ensayo de unión de MTs proteínas recombinantes	

truncadas.	82
Figura 29: Expresión del mRNA de DMAP-85 durante el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .	84
Figura 30: Análisis de la presencia de DMAP-85 durante el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> .	85
Figura 31: Localización de DMAP-85 y MTs en embriones sinciciales.	87
Figura 32: Localización de DMAP-85 y MFs en embriones sinciciales.	87
Figura 33: Inmunolocalización de DMAP-85 y MFs en embriones en celularización.	90
Figura 34: Inmunolocalización de DMAP-85 y MTs en embriones en celularización.	92
Figura 35: Comparación de los patrones de distribución de DMAP-85 y espectrina.	93
Figura 36: Inmunolocalización de DMAP-85 y MTs en el estado de gástrula temprana.	96
Figura 37: Localización de DMAP-85 y MTs en estados de post-gástrula.	97
Figura 38: Distribución de DMAP-85 en dominios mitóticos.	99
Figura 39: Colocalización de DMAP-85 con la red microtubular citoplasmática.	100
Figura 40: Colocalización de DMAP-85 y MTs en el sistema nervioso central.	103
Figura 41: Cosedimentación de DMAP-85 con MFs.	106
Figura 42: Interacción de DMAP-85 con actina y tubulina en extractos de embriones.	106
Figura 43: Representación esquemática de la interacción de DMAP-	

85 con el sistema tubulina/MTs. 112

Figura 44: Resumen de la distribución de DMAP-85 durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. 126

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPs	: proteínas asociadas a actina
ATP	: adenosín trifosfato
BCIP	: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol
cDNA	: DNA complementario
C-terminal	: carboxilo-terminal
cv	: cordón nervioso ventral
SDS	: dodecilsulfato de sodio
dm	: dominio mitótico
DMAP-85	: Proteína de 85 kDa asociada a microtúbulos en <i>D. melanogaster</i>
DNA	: ácido deoxiribonucleico
DTT	: ditioneitol
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	: ácido etilen-glicol-bis(2-aminoetil éter)N,N,N',N'-tetracético
F-actina	: actina en estado de filamentos
FITC	: isotiocianato de fluoresceína
G-actina	: actina en estado monomérico
GTP	: guanosín trifosfato
Hepes	: ácido N-[2-hidroxietil]piperazine-N'-[etanosulfónico]
IPTG	: isopropiltiogalactosido
Kb	: kilo-bases
kDa	: kilo-Daltons
LB	: medio Luria-Bertani
MAPs	: proteínas asociadas a microtúbulos
MFs	: microfilamentos de actina
MTs	: microtúbulos
Mes	: ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico

RESUMEN

Todas las células eucarióticas poseen un citoesqueleto microtubular el cual participa en una amplia variedad de funciones celulares. Los cambios de organización intracelular de los microtúbulos (MTs) son regulados por un conjunto de señales moleculares, entre las cuales se destacan las interacciones proteína-proteína entre la tubulina y las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). En la búsqueda de nuevas MAPs que regulen las actividades del citoesqueleto, logramos identificar una proteína en *D. melanogaster* a la cual denominamos DMAP-85 (Cambiazo y cols., 1995). En la presente Tesis se ha abordado la caracterización de las propiedades estructurales y funcionales de DMAP-85. Este estudio comprende un análisis de la estructura primaria de esta proteína y de los dominios de interacción entre DMAP-85 y los MTs. Además y con el propósito de evaluar funciones específicas de DMAP-85, realizamos un análisis de la distribución subcelular de esta proteína y de su relación con el citoesqueleto durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

DMAP-85, fue aislada de embriones, larvas y adultos de *D. melanogaster* como una proteína capaz de asociarse a MTs estabilizados con taxol. Los análisis bioquímicos de esta proteína indican que DMAP-85 inicia y promueve la polimerización de tubulina *in vitro*, a través de su interacción con dominios expuestos de los MTs, específicamente, con motivos de unión a MAPs presentes en el extremo C-terminal de la β -tubulina. Estas propiedades, sugieren que una de las funciones de DMAP-85 sería regular la dinámica del ensamblaje de los MTs *in vivo*. Con el propósito de caracterizar la estructura molecular de DMAP-85 se aislaron y secuenciaron clones de cDNA, de *D. melanogaster*, que codifican para esta proteína. La secuencia aminoacídica deducida para DMAP-85 corresponde a un polipéptido de 740 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 83,4 kDa. DMAP-85 es una proteína hidrofílica con un pI estimado de 10,1 y sobre la base de su distribución de cargas puede ser dividida en: un dominio N-terminal ácido y un dominio C-terminal básico. Si bien esta distribución de cargas es característica de la mayoría de las MAPs, DMAP-85 no presenta similitud con

otras MAPs de secuencia conocida. Utilizando proteínas recombinantes truncadas fue posible definir una región de 272 residuos, que es necesaria para la unión de DMAP-85 a MTs. La secuencia aminoacídica de esta región no comparte similitud con otros dominios de unión a MTs previamente descritos. La búsqueda de sitios y patrones biológicamente relevantes, en la estructura primaria de DMAP-85, indicó que ésta contiene secuencias de consenso de fosforilación para la actividad de proteínas quinasas del tipo serina/treonina y un dominio significativamente similar al dominio de unión a microfilamentos de actina (MFs), presente en α -espectrina y en α -actinina. Análisis de Northern blots, señalan la presencia de un único transcrito de 2,8 Kb en todos los estados del ciclo de vida de *D. melanogaster*, indicando que no existirían variantes de éste generadas por corte y empalme alternativo. Hibridaciones mediante Southern blots e hibridaciones *in situ* en cromosomas politénicos indican que DMAP-85 es codificada por un gen que se encuentra como una copia única en el genoma de *D. melanogaster* y definen su localización cromosómica en la región 63C.

El estudio de la localización subcelular de DMAP-85 señala que esta proteína experimenta cambios en sus patrones de interacción con los diferentes componentes del citoesqueleto (MTs y MFs). Durante los primeros estados de desarrollo embrionario, DMAP-85 no se relaciona espacialmente con MTs, sin embargo codistribuye con MFs en dominios corticales. Experimentos *in vitro* confirman la interacción entre DMAP-85 y filamentos de actina. Durante la gastrulación DMAP-85 cambia su distribución espacial, colocalizando con MTs de interfase, y en estados embrionarios posteriores, DMAP-85 se localiza en el cordón nervioso ventral donde codistribuye con MTs axonales.

En conjunto, los resultados obtenidos durante esta Tesis indican que DMAP-85 es una proteína que participa en la organización y dinámica del citoesqueleto microtubular. DMAP-85 es la primera MAP descrita en *D. melanogaster* que presenta un comportamiento funcional equivalente al propuesto para MAPs de mamíferos y por lo tanto constituye una excelente herramienta para evaluar *in vivo* el papel regulador de las proteínas asociadas a microtúbulos.

ABSTRACT

Microtubules (MTs) are essential cellular organelles that are involved in a wide variety of functions within the cytoplasm of eukaryotic cell. The integrity and intracellular organization of the microtubule network seem to be modulated by a set of fine molecular signals involving protein-to-protein interactions at the level of tubulin and microtubule-associated proteins (MAPs). In a search for new MAPs that regulate cytoskeletal activities, we identified a novel protein from *D. melanogaster*, which was named as DMAP-85 (Cambiazo y cols., 1995). In this Thesis, structural and functional properties of DMAP-85 have been addressed. We have studied the primary structure of this protein and the protein domains that are responsible of DMAP-85 interaction with MTs. With the aim to evaluate specific functions of DMAP-85, we have also analyzed its subcellular distribution and its relationships with other cytoskeletal components during embryonic development.

DMAP-85 has been isolated from embryos, larvae and adults of *D. melanogaster* based on its capacity to interact with taxol stabilized MTs. Biochemical analyses of the protein indicate that DMAP-85 initiates and promotes tubulin assembly in a concentration dependent manner. DMAP-85 interacts with domains that are exposed in the MTs lattice. Specifically, DMAP-85 binds to MAPs-binding motifs on β -tubulin. Based on DMAP-85 properties we proposed that it might function to regulate MTs assembly dynamics *in vivo*. To characterize the molecular structure of DMAP-85, we isolated and sequenced *D. melanogaster* cDNA clones coding for this protein. The predicted DMAP-85 amino acid sequence reveals a polypeptide of 740 residues with a calculated molecular weight of 83.4 kDa. DMAP-85 is a hydrophilic protein with a estimated pI of 10,1. On the basis of charge distribution, DMAP-85 can be divided into two distinctive domains: the N-terminal acidic region and the C-terminal basic domain. This charge distribution is typical of many MAPs, but no significant homology has been detected with any known MAPs. Using truncated forms of recombinant DMAP-85, a 272-amino acid region could be defined that is necessary for microtubule binding. The

amino acid sequence of this region shares no similarity with previously described MTs-binding domains. A search for biologically relevant motifs in DMAP-85 revealed several serine/threonine kinase target sequences, and an N-terminal motif homologous to sequences found in a number of actin-binding proteins. A single transcript of approximately 2,8 Kb was detected in all stages of *D. melanogaster* life cycle. In addition, Southern blot analysis of genomic DNA indicates that the sequence is likely to be a single copy gene in the *D. melanogaster* genome. In support of this, *in situ* hybridization of DMAP-85 cDNA to polytene chromosome reveals a single site in the genome, located at 63C.

The analyses of subcellular distribution of DMAP-85 suggest that the interaction patterns of this protein with cytoskeletal components can be modified during embryonic development. During early embryonic stages, DMAP-85 does not associate with MTs; instead it codistributes with MFs at cortical domains. In this context, *in vitro* assays have demonstrated an interaction between DMAP-85 and MFs. During gastrulation, DMAP-85 changes its spatial distribution to co-localize with interphase MTs. During later embryonic stages, DMAP-85 is localized to the ventral nerve cord where it codistributes with axonal MTs.

In summary, DMAP-85 is a new MAP that participates in the dynamic organization of microtubular cytoskeleton. DMAP-85 is the first *D. melanogaster* MAP functionally related to mammalian MAPs. Thus, DMAP-85 seems to be an excellent tool to evaluate the *in vivo* regulatory roles of MAPs.

INTRODUCCION

La estructura e integridad del citoplasma en las células de los eucariontes depende del ensamblaje y la organización de una red tridimensional de filamentos, la cual incluye: microtúbulos (MTs), microfilamentos de actina (MFs) y filamentos intermedios. Estos polímeros están entrelazados por interacciones macromoleculares dinámicas que determinan la formación de un citoesqueleto, el cual se encuentra directamente involucrado en una amplia variedad de funciones que son esenciales para la célula.

Las funciones de la célula, incluyendo las funciones del citoesqueleto, emergen como la suma de los efectos de múltiples interacciones entre proteínas o entre proteínas y pequeños ligandos. Cuando se considera la naturaleza de las asociaciones que ocurren entre las proteínas que conforman el citoesqueleto, surgen dos preguntas: ¿cómo contribuye el ensamblaje de los polímeros que forman el citoesqueleto a la estructuración del citoplasma? y, ¿cómo se regula esta estructura en respuesta a las diferentes necesidades funcionales de la célula?.

Las interacciones proteína-proteína, parecen ser un elemento clave en la regulación de los procesos de estructuración y organización del citoesqueleto. Estas interacciones entre proteínas incluyen: **Asociaciones homólogas**, por ejemplo aquellas que ocurren entre los dímeros de tubulina en el ensamblaje de los microtúbulos (MTs) y **asociaciones heterólogas**, como en el caso de las interacciones entre MTs y sus proteínas asociadas (MAPs). Este segundo tipo de interacciones es de fundamental importancia no sólo para la manutención de la estructura del citoesqueleto, sino también para la regulación de su ensamblaje y de los patrones de interacción que se establecen entre sus diferentes componentes. Estos procesos, en su conjunto, permiten una coordinación dinámica de los elementos del citoesqueleto, la cual define la adquisición de diferentes patrones de organización, en respuesta a las demandas funcionales de la célula (Maccioni y Cambiazo, 1995).

I. El citoesqueleto microtubular

Los MTs son componentes esenciales del citoesqueleto de las células eucarióticas y como tales participan en una gran diversidad de funciones biológicas, entre ellas: división celular, movilidad, transporte intracelular y manutención de la arquitectura celular. Los MTs son componentes mayoritarios de estructuras muy estables como los cilios y flagelos y también de estructuras transitorias, como los husos mitóticos. Los MTs son estructuras cilíndricas huecas de 25 nm de diámetro y largo variable, compuestas principalmente por heterodímeros de α, β -tubulina (Weisenberg y cols., 1968). Los heterodímeros, se ensamblan entre sí en una orientación cabeza-cola para formar trece protofilamentos lineales que se asocian lateralmente constituyendo la pared de estos polímeros (Evans y cols., 1985).

El heterodímero de tubulina está formado a su vez por la interacción no covalente de subunidades de α y β tubulinas de 55 kDa (Ludueña y Woodward, 1973). Ambos monómeros se encuentran codificados por familias multigénicas y el conocimiento de sus secuencias aminoacídicas, ha demostrado un alto grado de conservación de las subunidades α y β en especies filogenéticamente distantes (Burns, 1991). Si bien la conservación evolutiva es alta, existe evidencia de una notable heterogeneidad de las tubulinas, de manera que la mayoría de los tejidos contienen numerosas variantes de α y β tubulinas. Esta heterogeneidad surge de la existencia de múltiples genes que codifican para las subunidades α y β y de modificaciones post-traduccionales de éstas. La divergencia entre los diferentes isotipos de tubulinas de una especie varía entre 4 y 16% y la mayor parte de esta divergencia ocurre en el extremo C-terminal de la proteína (Burns, 1991). La significación funcional de la existencia de múltiples copias de genes para las tubulinas no es evidente. Raff (1984), discute dos posibilidades: (1) Si bien todos los isotipos de tubulinas son similares y pueden copolimerizar formando MTs funcionales, cada tubulina posee propiedades ligeramente diferentes que le confieren una cierta diversidad funcional; y (2) Las familias multigénicas surgen de la necesidad de una regulación diferencial, por ejemplo: el control temporal y espacial de los niveles de tubulina. Aun cuando existirían isotipos de

tubulinas que parecen ser funcionalmente especializados, por ejemplo el isotipo $\beta 2$ de *D. melanogaster* (Hoyle y Raff, 1990), la evidencia indica que tanto en invertebrados como en vertebrados, los isotipos de tubulinas son intercambiables entre sí y funcionalmente equivalentes (Lopata y Cleveland, 1987; Joshi y cols., 1987). Esto significa que los isotipos individuales no segregan en subpoblaciones de MTs con funciones específicas, y así mismo que no existe diferencias en la capacidad de los isotipos de tubulina para ensamblar MTs *in vitro* o *in vivo*. Estas observaciones han llevado a proponer la hipótesis de que la información que define la diversidad funcional de los MTs no reside en la tubulina, sino en componentes citoplasmáticos que se asocian a los MTs, particularmente en el grupo de proteínas denominadas MAPs.

Un grado adicional de heterogeneidad en las tubulinas es generado a través de modificaciones post-traduccionales, las cuales incluyen: acetilación de α -tubulina (Greer y cols., 1985), detirosinación y tirosinación de α -tubulina (Barra y cols., 1988), poliglutamilación (Edde y cols., 1990), fosforilación (Díaz-Nido y cols., 1990) y glicación (Redeker y cols., 1994) de α y β -tubulinas. Tanto la acetilación como la detirosinación de α -tubulinas ocurren concomitantemente con un aumento en la estabilidad de los MTs, lo cual se traduce en un aumento de la vida media de estos polímeros (Kreis, 1987; Webster y Borisy, 1989). De esta manera, las tubulinas acetiladas están ausentes del huso mitótico pero se encuentran enriquecidas en subpoblaciones de MTs de interfase, en MTs neuronales, en cuerpos basales y en el axonema del flagelo (Maruta y cols., 1987; Piperno y cols., 1987). *In vitro*, estas modificaciones post-traduccionales no afectan la cinética de ensamblaje-desensamblaje de los MTs o la velocidad de recambio de éstos, lo cual sugiere que otros mecanismos deben ser los responsables de este aumento en la estabilidad de los MTs (Maruta y cols., 1987; Schulze y cols., 1987). Un aumento en el contenido de tubulinas modificadas puede ser explicado por el hecho de que los MTs persisten el tiempo suficiente para permitir la acción de enzimas que modifican las tubulinas incorporadas en estos polímeros, pero no las tubulinas libres (Kumar y Flavin, 1981; Black y cols., 1989). Acetilaciones y detirosinaciones pueden ser marcadores bioquímicos de estabilidad y algunas de las MAPs pueden unirse específicamente a los MTs que presenten estas

modificaciones, haciendo posible que cumplan funciones específicas de MTs estables.

La tubulina es una proteína fuertemente polianionica, que contiene una proporción inusualmente alta de residuos acídicos en su extremo C-terminal (Burns, 1991). Estudios de proteólisis limitada, utilizando subtilisina han revelado que el extremo C-terminal regula la polimerización de los heterodímeros de tubulina y la unión de las MAPs (Serrano y cols., 1984; Bhattacharyya y cols., 1985; Vera y cols., 1989). Un análisis de la interacción selectiva de MAPs con tubulina ha permitido identificar dominios específicos, responsables de esta interacción (Maccioni y cols., 1986; Maccioni y cols., 1988; Vera y cols., 1988; Rivas y cols., 1988; Rivas-Berrios y cols., 1990; Farias y cols., 1991; Cross y cols., 1991). Dos péptidos sintéticos, que representan secuencias de la región más conservada del extremo C-terminal de tubulina: α (430-441): KDYEEVGVDSVE y β (422-424): YQQYQDATADEQG, se unen selectivamente a MAP-2 y tau. Estas secuencias del dominio C-terminal de tubulina serían parte de los dominios de esta proteína involucrados en la interacción con MAPs (Maccioni y cols., 1988; 1989). La interacción de los péptidos α (430-441) y β (422-424) con MAPs ha sido confirmada a través de criterios inmunológicos. En el suero de conejos inmunizados con estos péptidos, se encontró que éste contenía no sólo anticuerpos anti-tubulina, sino también anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen el sitio de unión de las MAPs a la tubulina (Rivas y cols., 1988; Rivas-Berrios y cols., 1990).

In vitro, los microtúbulos se ensamblan a partir de heterodímeros de tubulina, a 37°C, en presencia de GTP, iones Mg^{2+} , EGTA y MAPs u otros compuestos que promueven el ensamblaje, como por ejemplo, glicerol, DMSO, taxol, etc. (Weisenberg, 1972; De Brabander y cols., 1981; Maccioni y cols., 1987). El ensamblaje de microtúbulos requiere GTP (Weisenberg y cols., 1976; Maccioni y Seeds, 1977; Melki y cols., 1990) y se han descrito dos sitios de unión de GTP en la tubulina dimerica, el GTP unido a α -tubulina (sitio N) que parece tener un papel estructural y no puede ser intercambiado, mientras que el GTP unido a la β -tubulina (sitio E) es intercambiable con GTP en solución. El GTP debe estar unido al sitio E para que ocurra el ensamblaje y es hidrolizado después de la incorporación del heterodímero de tubulina al microtúbulo en crecimiento (Carlier y cols., 1989). El ensamblaje, no requiere de la

hidrólisis del GTP, sin embargo, ésta es requerida para la disociación de los dímeros de tubulina (Erickson y O'Brien, 1992; Hyman y cols., 1992).

El ensamblaje de los MTs consta de dos fases: nucleación y elongación (Dustin, 1984). El proceso de nucleación, *in vitro*, requiere de la formación de oligómeros de tubulina, suficientemente estables para permitir su subsecuente elongación. *In vivo*, la nucleación de los MTs ocurre en centros organizadores de MTs (MTOC). El MTOC mejor estudiado es el centrosoma, que es responsable de la formación del citoesqueleto microtubular en las células eucarióticas en interfase, y del huso mitótico durante la división celular (Kellogg, 1994, Stearns y Winey, 1997). Estudios recientes han revelado que en centrosomas de *D. melanogaster* y *Xenopus*, los MTs nuclean a partir de anillos conteniendo γ -tubulina, la cual a diferencia de las α y β -tubulinas no se incorpora en MTs, sino que se localiza principalmente en el centrosoma de todos los eucariotes estudiados hasta la fecha (Kellogg, 1994; Stearns and Kirschner, 1994). La evidencia indica que complejos proteicos, en forma de anillos, conteniendo γ -tubulina (γ TuRC), actuarían como templado para la nucleación de los MTs en el centrosoma (Zheng y cols., 1995; Moritz y cols., 1995a, b).

Una de las características más prominentes de los MTs, es que son polímeros dinámicos, es decir, existe un intercambio rápido de subunidades entre los polímeros y el conjunto de la tubulina soluble. Esta característica es especialmente importante para la reorganización del sistema microtubular durante las transiciones interfase-mitosis y durante el movimiento celular. Sin embargo, los MTs son estructuras dinámicas aún en ausencia de una reorganización del sistema, y la vida media de la mayoría de los MTs en células en cultivo es sólo de unos pocos minutos. Mitchinson y Kirschner (1984a, b), demostraron que los MTs existen en un equilibrio dinámico con las subunidades de tubulina, creciendo y acortándose por la adición o pérdida de dímeros de tubulina desde ambos extremos. Los MTs individuales presentan transiciones estocásticas entre fases de crecimiento lento y acortamiento rápido, una propiedad de los MTs denominada inestabilidad dinámica. El estado de equilibrio para una población de MTs se alcanza cuando el crecimiento de un grupo de MTs es compensado por la despolimerización de otro grupo, mientras que para cada MT individual el equilibrio parece que nunca se

obtiene. La dinámica microtubular puede ser definida por una serie de parámetros, entre ellos: velocidad de crecimiento, de acortamiento y frecuencias de transiciones (catástrofes o rescates), los cuales determinan la fracción de tubulina presente como polímero y la tasa de recambio polímero-dímero (Mitchinson y Kirschner, 1984a,b; Kirschner y Mitchinson, 1986; Walker y cols., 1988). Este comportamiento de los MTs, ha sido también observado *in vivo* (Sammack y cols., 1988; Cassimeris y cols., 1988; Shelden y Wadsworth, 1993). Sin embargo, en la célula, el comportamiento de los MTs parece corresponder a una superposición entre el proceso estocástico descrito por la teoría de la inestabilidad dinámica y la acción de factores reguladores, incluyendo MAPs y modificaciones post-traduccionales de las tubulinas (Schulze y Kirschner, 1988; Dreschel y cols., 1992).

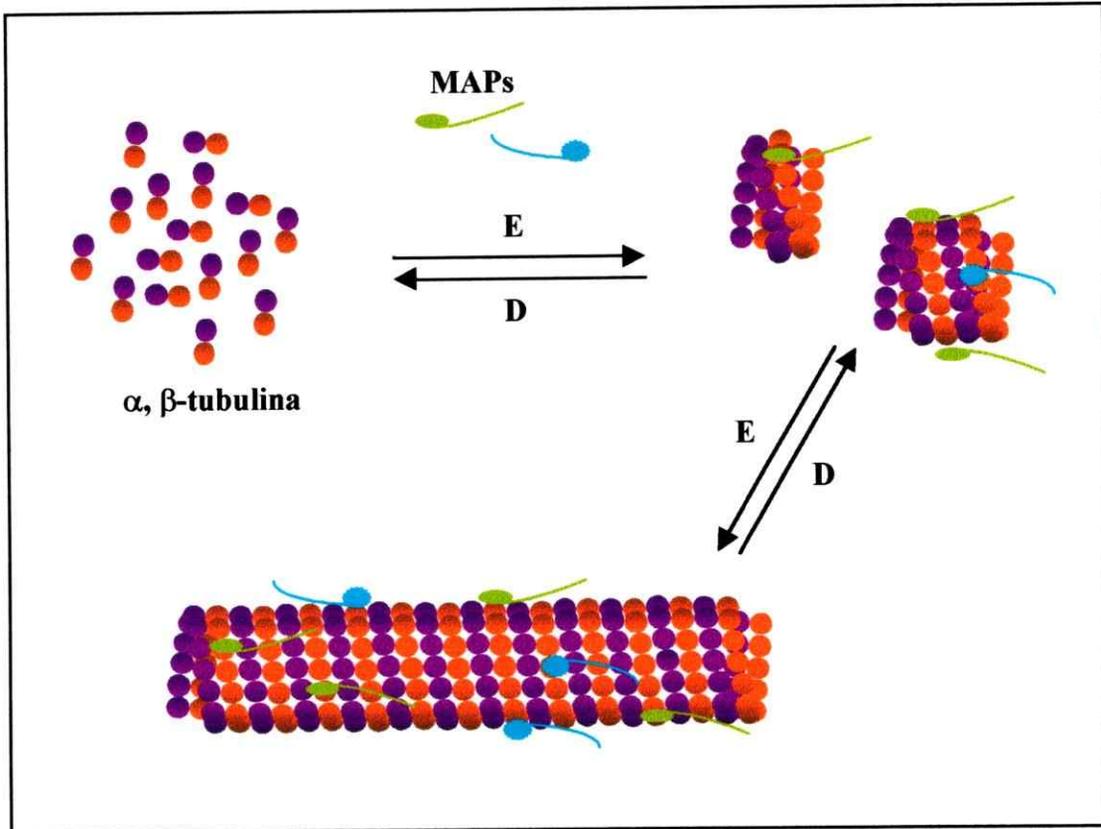
II. Proteínas asociadas a microtúbulos

El control apropiado de la dinámica microtubular es esencial para preservar la organización de los MTs en la célula y para su adecuado funcionamiento en diversos procesos celulares. Entre los elementos celulares que modularían la dinámica microtubular, los mejor caracterizados son las MAPs. Tradicionalmente, las MAPs han sido aisladas de sistema nervioso e identificadas por su capacidad de copurificar con tubulina y de promover el ensamblaje de tubulina *in vitro* (Lee, 1993). Las MAPs neuronales incluyen a la familia de proteínas de alto peso molecular, MAP-1A, MAP-1B, MAP-2 (Murphy y Borisy, 1975; Bloom y cols., 1985) y proteínas de peso molecular intermedio, denominadas tau (Weingarten y cols., 1975; Lee y cols., 1988). En general se ha observado que las MAPs se unen con gran afinidad a la tubulina e inducen su polimerización *in vitro*, reduciendo la concentración crítica de tubulina y aumentando su velocidad de polimerización (Sloboda y cols., 1976; Murphy y cols., 1977; Seeds y Maccioni, 1978) (Figura 1). Además de inducir la polimerización de MTs, las MAPs también participan en la formación de puentes moleculares que unen a los microtúbulos con otros componentes del citoesqueleto (Selden y Pollard, 1983;

Cross y cols., 1993; Pedrotti y cols., 1994). Estudios *in vitro* de inestabilidad dinámica, han demostrado que las MAPs estabilizan los MTs, al disminuir la frecuencia de catástrofes y aumentar la frecuencia de rescates, lo cual se traduce en un aumento neto del nivel de tubulina polimerizada (Hirokawa, 1994). Experimentos *in vivo*, de expresión de MAP-2 y tau (Kanai y cols., 1989; Knops y cols., 1991; Lee y Rook, 1992; Weisshaar y cols., 1992, Kaech y cols., 1996) o de eliminación de estas proteínas, mediante el uso de sondas anti-sentido (Cáceres y cols., 1990; 1992) en células en cultivo, indican que las MAPs funcionarían en la estabilización y en la organización microtubular durante la neuritogénesis. Recientemente, Kaech y cols. (1996), han propuesto que el efecto de MAPs neuronales, no radica en una supresión de la dinámica microtubular, sino en un cambio en la probabilidad relativa de crecimiento versus acortamiento de los MTs, lo cual proporciona una base molecular para la plasticidad morfológica observada durante la diferenciación neuronal.

Las MAPs son moléculas polares que presentan dominios ácidos y básicos en su estructura primaria. En el caso de MAP-2, MAP-4 y tau, el dominio C-terminal básico corresponde a la región responsable de su unión a tubulina. El análisis de las secuencias aminoácidas de estas MAPs ha revelado la existencia de tres secuencias repetitivas conservadas de 18 aminoácidos (Lewis y cols., 1988; Lee y cols., 1990), las cuales constituyen motivos comunes de unión a tubulina (Maccioni y cols., 1988; 1989). Estos resultados permiten postular la existencia de una familia de proteínas relacionadas que comparten secuencias comunes en el ámbito de sus dominios de interacción con tubulina. Un segundo dominio de unión a tubulina fue identificado en la región C-terminal de MAP-1B, el cual contiene las secuencias KKEE o KKE(I/V) repetidas 19 veces. Este dominio no presenta una relación estructural con la región de unión a tubulina de tau y MAP-2 si bien al igual que éstas presenta una carga neta positiva y elementos repetitivos (Noble y cols., 1989). Considerando, las demandas impuestas por un citoesqueleto microtubular altamente dinámico, la capacidad funcional de las MAPs puede ser incrementada mediante la existencia de isoformas y modificaciones post-traduccionales. Un número de estudios ha revelado que la expresión de las isoformas de MAPs es regulada durante el desarrollo y en algunos casos estas isoformas son el

Figura 1: MODELO DE LA ASOCIACION DE MAPS AL SISTEMA TUBULINA/MTs. Durante la etapa de nucleación, las MAPs interactúan a través de sus dominios de unión con los dímeros de α , β -tubulina para generar semillas de tubulina oligomérica. Luego de esta etapa, el polímero crece por la adición de subunidades a ambos extremos o se acorta por la pérdida de éstas, a través de un proceso denominado inestabilidad dinámica (Mitchinson y Kirschner, 1984). Las MAPs se unen a los MTs, aumentan su estabilidad y favorecen su ensamblaje, a través de una disminución de la dinámica microtubular. Durante este proceso, las MAPs disminuyen la frecuencia de las transiciones entre fases de crecimiento y acortamiento de los MTs, lo cual se traduce en un crecimiento neto de estos polímeros. E: ensamblaje, D: desensamblaje.



resultado de procesos de empalme diferencial (Doll y cols., 1993; Larcher y cols., 1992). Por otro lado, experimentos *in vitro*, han señalado que la fosforilación de las MAPs neuronales reduce su afinidad por los MTs y de esta manera interfiere en su capacidad estabilizadora (Murthy y Flavin, 1983; Dreschschel y cols., 1992; Drewes y cols., 1995; Illenberger, 1996; Drewes y cols., 1997).

Un segundo grupo de proteínas MAPs, denominadas genéricamente MAP-4, se encuentra presente en células de origen no neuronal y comparte con MAP-2 y tau características tanto estructurales como funcionales (Bulinski y Borisy, 1979; West y cols., 1991). Otras proteínas bien caracterizadas en sistemas no neuronales corresponden a proteínas que no comparten los criterios clásicos de MAPs y que interactúan en forma transitoria con el sistema de los MTs (Maccioni y Cambiazo, 1995). Ejemplos de estas proteínas son: CLIP-170, una proteína que se une a MTs de manera dependiente de nucleótidos y sirve como mediadora para la unión de vesículas de la vía endocítica a estos polímeros (Pierre y cols., 1992), E-MAP-115 que se expresa en varias líneas celulares epiteliales y se encuentra asociada con subdominios de MTs perinucleares (Masson y Kreis, 1993) y Mip-90 una proteína que interactúa tanto con MTs como con MFs en varias líneas celulares (González y cols., 1995; González y cols., 1998). Para el caso de MAP-4 y CLIP-170, se ha demostrado que su interacción con MTs es dependiente del estado de fosforilación de estas proteínas. Estudios *in vitro* indican que MAP-4 desfosforilada, estabiliza MTs, a través de un aumento en las frecuencias de rescate de estos polímeros y es capaz de formar complejos entre MTs y p34^{cdc2}/ciclina B, a través de su unión a la ciclina. MAP-4 es fosforilada, en el complejo y esta modificación afecta su actividad estabilizadora de MTs *in vitro* (Ookata y cols., 1995). Estos resultados sugieren que los MTs de interfase serían estabilizados por MAPs desfosforiladas, mientras que la fosforilación de estas proteínas al inicio de la mitosis disminuiría su afinidad por los MTs y por lo tanto afectaría su efecto estabilizador sobre estos polímeros.

Si bien existen numerosas evidencias de la distribución y la bioquímica de las MAPs, poco se conoce del papel regulador de estas proteínas durante el ensamblaje y el funcionamiento de los MTs en la célula. El comportamiento de los MTs en la célula, se

encuentra afectado por la actividad simultánea de numerosas proteínas, con funciones probablemente superpuestas, lo cual permitiría entender la ausencia de un efecto fenotípico en ratones portadores de un *knock-out* para el gen de la proteína tau (Harada y cols., 1994). Claramente, el conocimiento de las funciones de las MAPs es limitado, la comprensión de la actividad de las MAPs sobre la dinámica microtubular, requeriría examinar sus funciones *in vitro* y extrapolar los resultados a un análisis *in vivo*. Una alternativa experimental interesante, consiste en utilizar organismos de genética conocida para estudiar aspectos de la dinámica microtubular en la célula y de las funciones *in vivo* de las MAPs.

III. El citoesqueleto en *D. melanogaster*

En los últimos diez años, *D. melanogaster* ha emergido como un importante sistema experimental para el análisis de las funciones del citoesqueleto (Fyberg y Goldstein, 1990; Schejter y Wieschaus, 1993a). Entre las razones que han llevado a utilizar a este organismo para estudiar aspectos de la biología del citoesqueleto, se pueden destacar las siguientes: (1) *D. melanogaster*, es un modelo animal ampliamente estudiado en el cual es posible integrar observaciones, aparentemente no relacionadas, del citoesqueleto y de sus componentes, las que pueden conducir a teorías comprensibles de sus funciones *in vivo*, y (2) *D. melanogaster* es un excelente sistema para diseccionar la estructura y la función de complejos macromoleculares usando métodos de genética molecular. La genética molecular de *D. melanogaster* permite alterar componentes individuales del citoesqueleto para observar las consecuencias de esa perturbación y así definir su función *in vivo*.

En relación con los componentes del citoesqueleto de *D. melanogaster*, se han descrito seis isoformas de actina con diversos patrones de distribución temporal y espacial (Fyrberg y cols., 1981). Las isoformas de actina son codificadas por una familia multigénica (Fyrberg y cols., 1980), cada isoforma tiene una secuencia primaria única, pero son similares a las secuencias de actinas no-musculares de vertebrados (Fyrberg y

cols., 1981). La presencia de filamentos intermedios ha sido descrita en *D. melanogaster*, sin embargo la evidencia se limita a un análisis de reactividad cruzada con anticuerpos que reconocen estos filamentos en vertebrados (Cervera y cols., 1987; Marco y cols., 1987). La caracterización de las tubulinas de *D. melanogaster* ha revelado que α - y β -tubulinas son codificadas por familias multigénicas de cuatro miembros, siendo los productos de cada familia significativamente similares entre ellos y con tubulinas de otras especies (Rudolph y cols., 1987). La expresión de algunos de los genes que codifican para α y β -tubulinas está restringida a determinados tejidos o bien a estados específicos del desarrollo de *D. melanogaster*. Así por ejemplo, el gen que codifica para α 4-tubulina es transcrito y traducido exclusivamente durante la ovogénesis (Theurkauf, 1990), mientras que la β 2-tubulina es sintetizada y utilizada solamente en los testículos, durante la espermatogénesis (Rudolph y cols., 1987). A pesar de estas diferencias en la expresión temporal y espacial de algunas isoformas de tubulina, los isotipos de tubulinas no segregan en diferentes subpoblaciones de MTs. En *D. melanogaster*, a semejanza con lo que ocurre en los vertebrados (Maccioni y Cambiazo, 1995) se ha postulado que la diversidad de funciones que cumple el citoesqueleto microtubular dependen de la interacción moduladora de MAPs con los polímeros de tubulina (Rudolph y cols., 1987).

III.1. Organización del citoesqueleto embrionario de *D. melanogaster*

Los estudios acerca del citoesqueleto de *D. melanogaster*, no sólo se han centrado en la identificación y caracterización de los genes que codifican para sus principales componentes, sino que también se ha realizado un esfuerzo significativo para caracterizar la estructura y organización de éste, durante los primeros estados del desarrollo embrionario de este organismo. Considerando que procesos tales como: cambios de forma, formación de dominios celulares y división celular están íntimamente coordinados con cambios en la organización del citoesqueleto y que estos procesos son específicamente inhibidos por perturbaciones en la estructura de MTs y

MFs, es claro que el citoesqueleto juega un papel fundamental en la regulación y coordinación de una serie de procesos morfogénicos durante el desarrollo embrionario temprano de *D. melanogaster* (Fyberg y Goldstein, 1990; Schejter y Wieschaus, 1993a; Sullivan y Theurkauf, 1995; Miller y Kiehart, 1995).

En *D. melanogaster*, la fertilización y la fusión de los pronúcleos inician una serie de trece divisiones mitóticas rápidas, llamadas ciclos nucleares, ya que ocurren en ausencia de citocinesis. Los núcleos embrionarios llevan a cabo un programa de divisiones estereotipadas y de movimientos coordinados durante esta etapa sincicial. La mayoría de los núcleos, que inicialmente se ubican en el interior del embrión, migran a la superficie de éste durante los ciclos nucleares 7 al 10. Los primeros núcleos que alcanzan el cortex embrionario son los precursores de la línea germinal. El resto de los núcleos se dividen cuatro veces más, en forma sincronizada, poblando la superficie del embrión con más de 6000 núcleos antes de que ocurra la primera citocinesis. Estos cuatro últimos ciclos nucleares son progresivamente más lentos, desde 8 min. para el ciclo nuclear 10 hasta 21 min. para el ciclo nuclear 13. El estado de desarrollo comprendido entre los ciclos 10 al 13 es denominado blastodermo sincicial (Figura 3), para diferenciarlo del blastodermo celular que se forma durante la interfase del ciclo 14 (Figura 4). El periodo de desarrollo que lleva a la formación del blastodermo celular tiene una duración de 2 horas, un tiempo relativamente corto en relación con la duración total del desarrollo embrionario, que es de 24 horas. (Campos-Ortega y Harstenstein, 1985).

Las divisiones nucleares que inician la embriogénesis de *D. melanogaster* no requieren de la información codificada por el genoma cigótico, sino que dependen de mRNAs maternos. La invaginación de la membrana plasmática para formar el blastodermo celular, durante el ciclo 14, es el primer evento morfogénico que requiere de la transcripción del genoma embrionario (Merril y cols., 1988; Wieschaus y Sweeton, 1988). El ciclo 14, señala también una transición importante en el control del ciclo celular, el cual pierde su sincronización. Esta división mitótica presenta un patrón de distribución espacial y temporal bien definido y una sincronización local, que conduce a la formación de múltiples dominios mitóticos (Foe, 1989). Inmediatamente

después de la celularización del embrión, comienza la gastrulación, durante la cual ocurren los principales movimientos morfogénéticos, invaginación del mesoderma y del endoderma y extensión de la banda germinal (Campos-Ortega y Harstenstein, 1985). Durante la gastrulación y postgastrulación, tienen lugar otros dos ciclos de divisiones mitóticas (Campos-Ortega y Harstenstein, 1985; Edgard y O'Farrell, 1989) que originan también dominios mitóticos bien definidos (Figura 2).

Los sucesos morfogénéticos que tienen lugar durante el estado de blastodermo requieren de la interacción coordinada de los componentes del citoesqueleto, en particular, de una asociación funcional entre MTs y MFs (Schejter y Wieschaus, 1993a). En el estado de blastodermo sincicial, la distribución uniforme de núcleos en interfase y de husos mitóticos depende de estructuras citoesqueléticas, las que se forman en cada división nuclear. Durante la interfase de la división nuclear 10, los centrosomas se ubican cerca de cada núcleo en una orientación apical (hacia la superficie del embrión), mientras que los MFs corticales se enriquecen alrededor de los centrosomas, formando *caps* o casquetes, estrechamente asociados con la membrana plasmática y con los MTs que emanan desde los centrosomas (Figura 3). Durante la profase, los centrosomas dirigen la formación de los husos mitóticos, mientras que los *caps* de MFs se redistribuyen hacia la periferia de los núcleos. Durante la metafase, los MFs de actina, probablemente a través de la acción de sus proteínas asociadas (ABPs), median la formación de invaginaciones transientes de la membrana plasmática, llamadas pseudotabiques, las cuales delimitan el espacio de los husos mitóticos. Durante la anafase tardía y la telofase los pseudotabiques se retraen y los centrosomas se duplican, ubicándose nuevamente en la región apical. En forma simultánea, los MFs se reorganizan formando nuevos *caps*. Este ciclo se repite durante las cuatro divisiones nucleares que ocurren en la superficie del embrión (Karr y Alberts, 1986).

La transición desde un blastodermo sincicial a uno celular tiene lugar durante la interfase de la división 14. La membrana plasmática se invagina entre los núcleos, formando una estructura hexagonal de pliegues que subdivide el cortex del embrión, originando un epitelio de células columnares. Este proceso está asociado con una rápida reestructuración de los componentes del citoesqueleto (Warn y Robert-Nicoud, 1990;

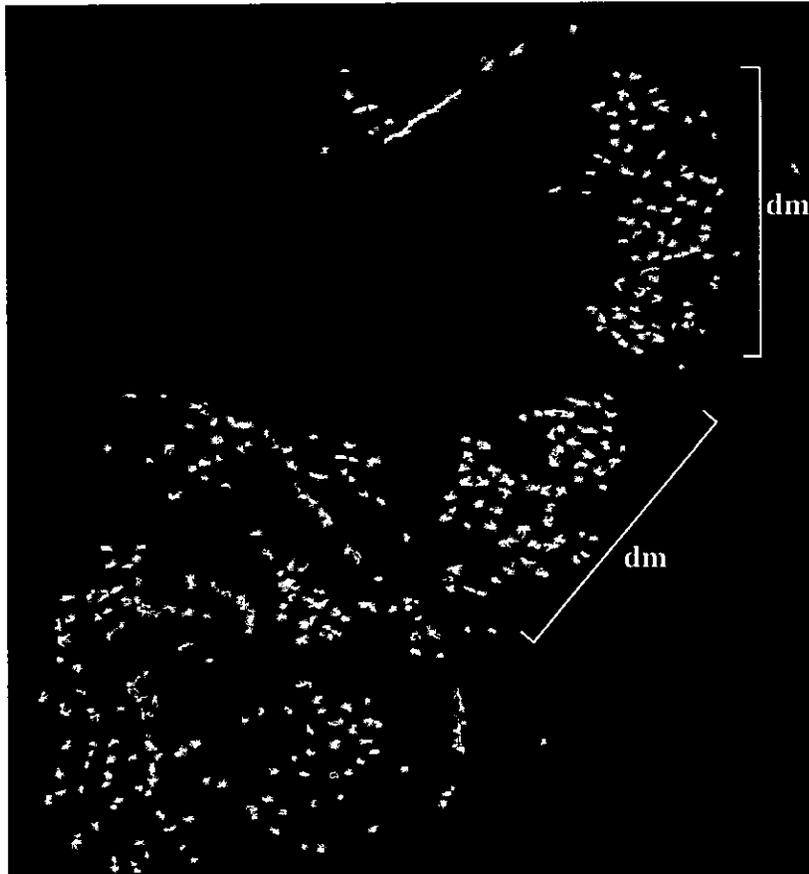
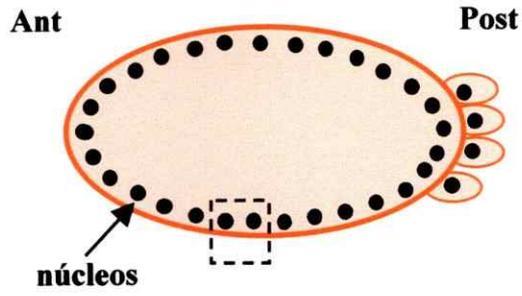


Figura 2: DISTRIBUCIÓN DE DOMINIOS MITÓTICOS EN UN EMBRIÓN EN ESTADO DE POST-GASTRULA. Este embrión de estado 7 ha sido teñido con un anticuerpo anti-tubulina para visualizar los husos mitóticos, que se concentran en dominios o parches de células que se dividen en forma sincronizada (dm).

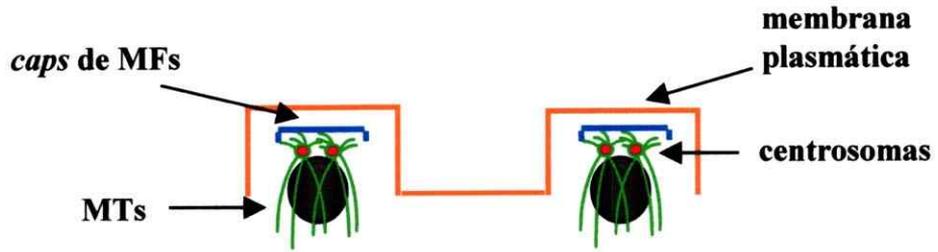
Figura 3: ORGANIZACION DEL CITOESQUELETO EN UN BLASTODERMO SINCICIAL. En (A), una representación esquemática de un embrión en estado de blastodermo sincicial, mostrando la distribución de los núcleos en su superficie. (B) y (C) corresponden a representaciones ampliadas e imágenes de microscopía confocal obtenidas en dos etapas de un ciclo nuclear. Se puede observar la organización del citoesqueleto en profase (B) y en metafase (C). En (B) los MFs corticales se distribuyen formando *caps* sobre los núcleos y los MTs emanan desde los centrosomas. En (C) se estructura la red de MFs asociada a los pseudotabiques y los MTs se organizan formando los husos mitóticos. Las imágenes corresponden a secciones ópticas de la superficie de embriones, los cuales fueron procesados para inmunofluorescencia y teñidos con un anticuerpo anti-actina (paneles izquierdos) o con un anticuerpo anti-tubulina (paneles derechos). Ant: anterior, Post: posterior, MFs: microfilamentos de actina, MTs: microtúbulos.

A

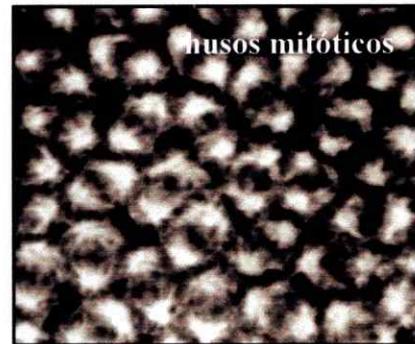
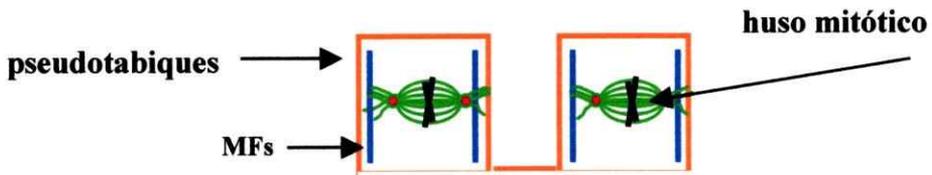
Blastoderma sincial
(ciclos nucleares 10-13)



B



C

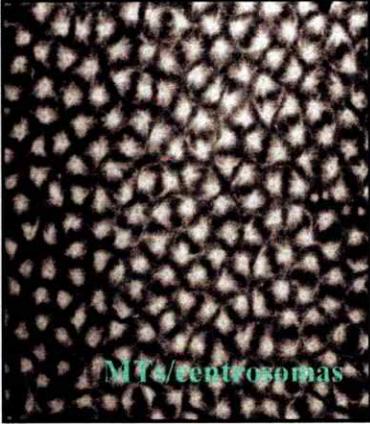
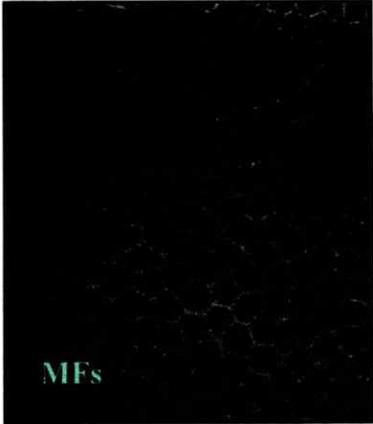
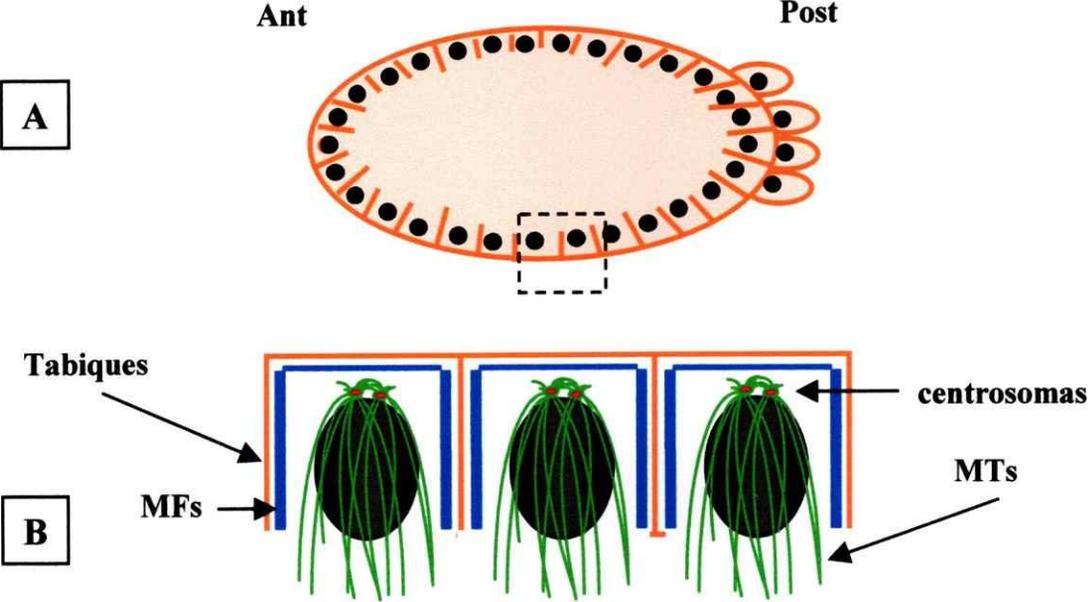


Young y cols., 1990). Al inicio de la celularización los *caps* de MFs se expanden lateralmente sobreponiéndose unos con otros. En la región de sobreposición los MFs se organizan en una red hexagonal de actina-miosina, que se mantiene estrechamente unida a los pliegues de membrana plasmática, proporcionando una base estructural y posiblemente la fuerza contráctil para la invaginación de las membranas (Foe y Alberts, 1983) (Figura 4). Durante la celularización, esta red evoluciona formando estructuras individuales en forma de anillos, en la base de los pliegues de división. Al término de la celularización, la contracción de estos anillos origina la formación de las membranas plasmáticas de la región basal de las células del blastodermo (Warn y cols., 1990a). Concomitante con estos cambios en el citoesqueleto de actina, los MTs experimentan una considerable reorganización. A medida que se invaginan los pliegues de membrana plasmática, los MTs crecen desde los centrosomas, hacia la base de las células, formando canastos cilíndricos que rodean los núcleos y que al parecer son responsables de su elongación (Fullilove y Jacobson, 1971; Warn, 1986) (Figura 3). Además, durante la etapa de celularización aparecen por primera vez MTs de interfase conteniendo tubulinas acetiladas (generalmente asociadas con MTs estables). Debido a que, durante este periodo, el ciclo celular se hace más lento, la aparición de esta forma modificada de tubulina puede indicar una transición hacia organizaciones microtubulares de mayor estabilidad (Foe y Alberts, 1983; Wolf y cols., 1988). Una vez que la celularización del embrión ha terminado, la mayoría de las células de interfase contienen MTs enriquecidos en tubulinas acetiladas (Wolf y cols., 1990b).

La información acerca de distribución de componentes del citoesqueleto en estados posteriores de desarrollo es bastante escasa y se ha centrado en el análisis de la distribución de miosina y espectrina durante la gastrulación. La principal conclusión de estos estudios es que ambas proteínas se acumulan en la región supra-apical de las células, donde colocalizan con los MFs. Esta acumulación parece estar relacionada con los movimientos de internalización de las capas germinales. De manera que se ha sugerido que tanto espectrina como miosina son responsables de la reorganización y del cambio de forma celular que acompañan a estos movimientos (Pesacreta y cols., 1989; Young y cols., 1990). En conjunto, estas observaciones apoyan la hipótesis de que el

Figura 4: ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN UN BLASTODERMO CELULAR. (A) corresponde a una representación esquemática de un embrión durante la interfase del ciclo 14. (B) es una representación ampliada, indicando los principales componentes del citoesqueleto y su organización en este estado. Los MFs forman una red que se mantiene asociada a los pliegues de membrana plasmática, mientras que los MTs emanan desde los centrosomas y se extienden hacia la región basal de las células, envolviendo a los núcleos. Las imágenes corresponden a secciones ópticas de la superficie de los embriones, los cuales fueron procesados para inmunofluorescencia y teñidos con un anticuerpo anti-actina (panel izquierdo) o con un anticuerpo anti-tubulina (panel derecho). Ant: anterior, Post: posterior, MFs: microfilamentos de actina, MTs: microtúbulos.

**Blastoderma celular
(interfase división 14)**



citoplasma del embrión de *D. melanogaster* se encuentra organizado e integrado por elementos del citoesqueleto y demuestran que los eventos definidos por la embriología clásica ocurren concomitantemente con alteraciones dinámicas del citoesqueleto.

IV. Proteínas asociadas al citoesqueleto en *D. melanogaster*

En general, los análisis de las proteínas asociadas al citoesqueleto embrionario se han limitado a los estados de blastodermo sincicial y celular, las razones para esto parecen residir en: (1) la distribución de MTs y MFs se encuentra morfológicamente bien caracterizada; y (2) durante estos estados de desarrollo es posible apreciar una clara interdependencia en la organización espacial de MFs y MTs (Karr y Alberts, 1986). En relación con esto último, se ha descrito que la formación de los *caps* y de la red de MFs asociada a los pseudotabiques, dependen de la posición de los centrosomas. Del mismo modo, la integridad de los husos mitóticos depende de la presencia de MFs en los pseudotabiques (Schejter y Wieschaus, 1993a; Miller, 1997). Por ejemplo, blastodermos sinciciales tratados con drogas despolimerizantes de microtúbulos (Warn y cols., 1987) o con bajas temperaturas (Callaini y cols., 1989; Calliani y Marchini, 1989), experimentan un colapso de los centrosomas y los *caps* de MFs dejan de formarse, sugiriendo la necesidad de una interacción continua entre MTs astrales/centrosomas y el citoesqueleto cortical de actina (Calliani y Riparbelli, 1993). No se conocen los mecanismos que median las interacciones entre los MTs y los MFs, sin embargo, se ha postulado la existencia de elementos que directa o indirectamente conecten estos dos componentes del citoesqueleto. Mediante estrategias bioquímicas y genéticas se han identificado diversos elementos que participan en la estructuración y/o en los cambios de organización que experimentan los MTs y los MFs, esto ha permitido sugerir que las proteínas asociadas a los componentes del citoesqueleto actúan al menos en dos niveles para regular la organización del citoesqueleto embrionario. El primero tiene relación con su presencia en la matriz centrosomal y el segundo involucra su interacción con la red de MFs y MTs.

IV.1 Proteínas asociadas a MFs

La presencia de varias proteínas que se asocian con los MFs (ABPs) ha sido descrita en blastodermos sinciciales de *D. melanogaster*, entre ellas miosina y α y β -espectrinas cuyas secuencias son similares a sus contrapartes identificadas en vertebrados. La miosina citoplasmática (tipo II) colocaliza con los pseudotabiques de MFs durante los estados de blastodermo sincicial y celular (Young y cols., 1991) y posteriormente se concentra en el borde apical de las células en el frente de migración de las capas germinales (Young y cols., 1993). En ambos casos, su función se encuentra relacionada con la contracción del margen apical de las células durante la citocinesis y la migración celular. α y β -espectrinas codistribuyen con MFs en los *caps* y en los pseudotabiques durante el estado de blastodermo. Durante la gastrulación α -espectrina se acumula específicamente en las células superficiales del embrión y posteriormente se distribuye uniformemente en todas las células, donde se encuentra asociada al citoesqueleto cortical de actina (Pesacreta y cols., 1989). Recientemente, se han identificado varias ABPs, mediante cromatografías de afinidad con MFs (Miller y Alberts, 1989; Miller y cols., 1991). Estas ABPs fueron agrupadas en clases, cuyos miembros se asocian diferencialmente con los MFs presentes en *caps* o en pseudotabiques (Miller y cols., 1991). Algunas de estas proteínas han sido caracterizadas, entre ellas: (1) 95F miosina es una miosina no convencional que se asocia a los MFs en metafase y que presenta una distribución dispersa durante la interfase (Mermall y cols., 1994; Mermall y Miller, 1995), y (2) la proteína 13D2 que codistribuye con MFs en los *caps*, durante la interfase, pero no se encuentra presente en los pseudotabiques durante la mitosis, sino que permanece asociada a la membrana plasmática (Miller y cols., 1991; Postner y cols., 1992), sugiriendo que su función es generar o estabilizar los *caps*. Interesantemente, en embriones portadores de la mutación *sponge*, en los cuales los *caps* de MFs no se forman, la proteína 13D2 se distribuye normalmente, formando *caps* muy similares a los silvestres, mientras que otras ABPs embrionarias muestran alteraciones en su distribución (Postner y cols., 1992). Esta observación sugiere que la proteína 13D2 precede a los MFs en su distribución y que su

función es necesaria para el reclutamiento de éstos en los *caps*. Además, se ha postulado que la proteína 13D2 detectaría la señal originada por MTs astrales/centrosomas, la cual define la posición de los *caps* de MFs, actuando como un posible intermediario entre los dos componentes del citoesqueleto embrionario (Postner y cols., 1992).

Estrategias de la genética molecular han sido aplicadas para descubrir genes cuyas mutaciones afecten: (1) La organización del citoesqueleto en el estado de blastodermo sincicial, dos de los genes identificados, *nuclear fallout (nuf)* y *scrambled (sced)* tienen efectos específicos sobre el citoesqueleto de actina (Sullivan y cols., 1993). Mutantes en estos genes presentan *caps* de MFs normales y pseudotabiques alterados, sugiriendo que las proteínas codificadas por estos genes participan en la formación o estabilización de los los MFs asociadas a pseudotabiques, y (2) El proceso de celularización, mutaciones en los genes *nullo*, *serendipity- α* y *bottleneck*, de expresión cigótica, conducen a alteraciones en la organización de la red hexagonal de actina-miosina y por lo tanto en la formación de los tabiques divisorios (Merril y cols., 1988; Schweisguth y cols., 1990; Schejter y Wieschaus, 1993b). Estos genes se expresan exclusivamente en el estado de blastodermo celular y codifican para proteínas básicas de bajo peso molecular, las cuales se localizan en el frente de migración de los tabiques divisorios. Se ha postulado que estas proteínas actúan en conjunto con ABPs de origen materno durante la celularización del embrión.

IV.2. Proteínas asociadas a MTs

La evidencia acerca de la identidad y características de las ABPs embrionarias es sugiere la existencia de una amplia variedad de proteínas con funciones específicas de acuerdo con las diferentes estructuras en las cuales se organizan los MFs y/o los diferentes estados del desarrollo embrionario. Por el contrario, la mayor parte de los estudios acerca de proteínas que interactúan con los MTs, han resultado en la caracterización de elementos que colocalizan con centrosomas embrionarios. Esto se debe principalmente a que los análisis se han centrado en la búsqueda de proteínas que

participan en la estructuración de husos mitóticos o de proteínas cuya función esta relacionada con los procesos de división celular. Se han identificado dos proteínas centrosomales en blastodermos sinciciales, CP-190 y CP-60 (Whitfield, 1988; Kellogg y cols. 1989), las cuales interactúan con microtúbulos en columnas de afinidad de tubulina (Kellogg y cols. 1989) y al parecer forman un complejo multiproteico con γ -tubulina y con otras proteínas centrosomales aun no identificadas (Kellogg y Alberts, 1992; Raff y cols., 1993). Recientemente, Oegema y cols. (1997) han demostrado que CP-190 y CP-60 se ubican de manera alternada en los núcleos y en los centrosomas durante el ciclo celular. Si bien estas proteínas interactúan *in vitro* con los MTs, ninguna de ellas colocaliza con los MTs del huso mitótico y su ubicación en centrosomas y en núcleos es independiente de la presencia de estos polímeros, sugiriendo que su función no está relacionada con la integridad u organización del citoesqueleto microtubular (Oegema y cols., 1997). Por su parte, Saunders y cols. (1997) caracterizaron a la proteína codificada por el gen *abnormal spindle*, el cual es necesario para la correcta formación de los husos mitóticos, la proteína Asp interactúa *in vitro* con MTs, en ensayos de unión, y presenta una secuencia de 25 residuos que es similar al dominio de unión a actina presente en varias ABPs. Asp se expresa únicamente durante el estado de blastodermo sincicial y se localiza en los polos del huso mitótico durante metafase y anafase, presentando una distribución citoplasmática dispersa durante la interfase. Aún cuando los autores proponen que Asp podría regular los cambios en la dinámica microtubular que ocurren durante el ciclo celular, no presentan evidencias de su asociación a MTs del huso mitótico o de su capacidad de regular el estado de ensamblaje de los MTs *in vitro*, de manera que la función de esta proteína estar relacionada con alteraciones en la organización del material pericentriolar, las cuales resultarían en la estructuración aberrante de husos mitóticos que se observa en los mutantes del gen *asp*.

Hasta la fecha se han descrito sólo dos proteínas que efectivamente colocalizan con MTs en *D. melanogaster* y que se encuentran presentes durante todo el ciclo de vida de este organismo. La primera corresponde a una MAP de 205 kDa, 205K MAP, aislada de líneas celulares en cultivo de *D. melanogaster*. Esta proteína colocaliza con

microtúbulos citoplasmáticos y con microtúbulos del huso mitótico en células en cultivo (Goldstein y cols., 1986), sin embargo, no se conoce su patrón de distribución durante el desarrollo embrionario y su descripción como una MAP es limitada, puesto que no hay evidencias de su capacidad de modular o inducir el ensamblaje de MTs *in vitro* o *in vivo*. El análisis de la secuencia aminoacídica de esta proteína indica que no presenta similitud de secuencia con otras MAPs y que 205K MAP contiene un nuevo dominio de unión a MTs en su extremo C-terminal (Irminger-Finger y cols., 1990). La segunda proteína corresponde a la MAP de 85 kDa, DMAP-85, que ha sido descrita en larvas y adultos de *D. melanogaster*, en el contexto de la investigación presentada en esta Tesis (Cambiazo y cols., 1995; Henríquez y cols., 1995). Esta proteína copolimeriza con tubulinas de *D. melanogaster* y de cerebro de bovino e interactúa específicamente con calmodulina y con el dominio de unión a MAPs presente en β II-tubulina. La evidencia inmunológica indica que DMAP-85 comparte epitopos con la proteína tau de mamíferos (Cambiazo y cols., 1995). Estudios de inmunofluorescencia sugieren que esta proteína colocaliza con microtúbulos en el cordón nervioso ventral embrionario y en el sistema nervioso central de larvas de tercer estado (Maccioni y cols., 1995; Maccioni y Cambiazo, 1995).

V. Fundamentos de la investigación

Los MTs son polímeros formados por el ensamblaje de α y β tubulinas, las cuales están consideradas entre las proteínas más conservadas durante la evolución. Con unas pocas excepciones, los MTs están compuestos de trece protofilamentos de heterodímeros de α , β -tubulina que constituyen las paredes de una estructura tubular cerrada. A pesar del alto grado de similitud que presentan las subunidades y la estructura de los MTs, estos polímeros muestran diferentes estados de organización, lo cual les permite participar en una gran diversidad de funciones celulares. Para ilustrar este punto podemos considerar dos ejemplos que reflejan aspectos extremos en la variedad de estructuras que comprometen a los MTs: (i) los MTs forman el huso mitótico, una de las estructuras más dinámicas del citoesqueleto, la cual es ensamblada y desensamblada en cada ciclo celular, y (ii) los MTs estructuran el axonema de cilios o flagelos, los cuales una vez formados son permanente en la célula.

Una hipótesis que explicaría esta diversidad en los estados de organización que pueden adoptar los polímeros de tubulina, sostiene que existen diferentes poblaciones de MTs cuya variabilidad reside en elementos extrínsecos, presentes en el citoplasma, que interactúan con el polímero de tubulina. Entre estos elementos, los mejor caracterizados hasta la fecha, son las MAPs. Tradicionalmente, las MAPs han sido aisladas por su capacidad de copurificar con tubulina y de asociarse a MTs tanto *in vitro* como *in vivo*. Sobre la base de experimentos *in vitro*, se ha propuesto que las interacciones no-covalentes que se establecen entre las MAPs y los polímeros de tubulina afectan al menos dos propiedades de la organización de estos polímeros: (i) Las MAPs modulan la dinámica de los MTs, permitiendo establecer poblaciones de MTs que se diferencian entre sí por sus vidas medias, y (ii) las MAPs sirven como mediadoras de la interacción de los MTs con otros componentes del citoesqueleto y con otras estructuras celulares. De esta manera, las MAPs contribuyen a la regulación del citoesqueleto, determinando funciones específicas de los MTs (Maccioni y Cambiazo, 1995). En la actualidad diferentes grupos de investigación analizan las consecuencias de esta hipótesis *in vivo*, utilizando para ello diversos modelos biológicos. Con este propósito, nosotros hemos

iniciado la caracterización de proteínas asociadas a MTs en *D. melanogaster* y hemos identificado una MAP de 85 kDa, a la cual hemos llamado DMAP-85.

El trabajo de investigación realizado en esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de DMAP-85, la cual es a la fecha, la única proteína microtubular descrita en *D. melanogaster* que presenta un comportamiento funcional equivalente al de las MAPs de mamíferos. Esta proteína fue identificada en nuestro laboratorio (Cambiazo y cols; 1995), como parte de un programa integrado de investigación que aborda el estudio de los aspectos funcionales y estructurales de las MAPs. DMAP-85 presenta una interacción no-covalente con dominios específicos del extremo C-terminal de la tubulina y estimula la polimerización de tubulina *in vitro*. Estas características, sugieren que DMAP-85 es un elemento regulador de la organización y del estado de ensamblaje de los MTs *in vivo*, contribuyendo de esta forma a la versatilidad estructural y funcional del citoesqueleto microtubular de *D. melanogaster*. Esta proteína fue clonada, secuenciada y expresada como proteína recombinante, lo cual permitió analizar en detalle sus propiedades estructurales y funcionales.

Diversos enfoques experimentales han permitido conocer la organización del citoesqueleto durante la embriogénesis de *D. melanogaster* y caracterizar las variaciones en sus patrones de distribución a lo largo de este período. Por otra parte, el alto grado de interdependencia en la organización espacial de MTs y MFs durante el desarrollo embrionario (Karr y Alberts, 1986; Warn y Warn, 1987), ha llevado a postular la participación de otros componentes, incluyendo MAPs y ABPs, que actuarían como reguladores de la dinámica microtubular y como mediadores de las interacciones entre MTs y MFs (Postner y cols., 1992; Sullivan y cols., 1993; Saunders y cols., 1997). Considerando estos antecedentes, quisimos evaluar: ¿cómo las funciones propuestas para las MAPs operan en el citoesqueleto de un organismo en desarrollo?. Para ello utilizamos como modelo de MAPs a DMAP-85. Los estudios acerca de la distribución espacial y temporal de DMAP-85, en embriones de *D. melanogaster*, así como los análisis de su interacción *in vitro* con MTs y MFs, indican que esta proteína presenta la capacidad de interactuar tanto con MTs como con MFs, y permiten situar a esta MAP en la compleja red de interacciones que se establecen entre los diferentes

componentes del citoesqueleto durante el desarrollo embrionario. Sobre la base de estos mismos resultados sugerimos la existencia de un mecanismo que regula los patrones de interacción de DMAP-85 con los diferentes componentes del citoesqueleto durante la embriogénesis de *D. melanogaster*.

MATERIALES Y METODOS

I. Análisis de la interacción *in vitro* de DMAP-85 con MTs y MFs

I.1. Obtención de extractos proteicos de embriones larvas y adultos de *D. melanogaster*:

Estos extractos fueron obtenidos de acuerdo con los procedimientos descritos por Cambiazo y cols. (1995).

I.2. Obtención de fracciones enriquecidas en la proteína DMAP-85

Estas fracciones fueron obtenidas a partir de extractos solubles de larvas o adultos, utilizando cromatografías de afinidad en columnas de calmodulina-agarosa (Cambiazo y cols., 1995; Henríquez y cols., 1996).

I.3. Interacción de DMAP-85 con el sistema microtubular:

Los ensayos de unión de DMAP-85 a MTs, a S-tubulina y al péptido β II-422-434 de la tubulina se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por Henríquez y cols. (1996) y Cambiazo y cols. (1995).

I.4. Ensayos de ensamblaje de tubulina en presencia de DMAP-85:

Estos ensayos fueron realizados de acuerdo con los protocolos descritos por Cambiazo y cols (1995).

I.5. Interacción de DMAP-85 con MFs:

La interacción *in vitro* de DMAP-85 con MFs se analizó mediante un ensayo de cosedimentación (Matsudaira, 1992). Cantidades crecientes de extractos totales de embriones (5, 10 y 15 μ g), fueron incubadas con 40 μ g de G-actina purificada según el procedimiento de Spudich y Watt (1971), en 200 μ L de un amortiguador conteniendo: Pipes 10 mM, pH 7,0, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 0,1 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina y leupeptina 2 μ g/mL. La polimerización fue inducida agregando $MgCl_2$ 2 mM y KCl 75

mM. Como control para el atrapamiento inespecífico, G-actina fue incubada con BSA (15 µg). Las mezclas fueron centrifugadas a 125,000xg por 30 min en una ultracentrífuga Beckman Airfuge. Volúmenes iguales de sobrenadantes y de pellas fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y ensayos de Western blots, utilizando el anticuerpo anti-DMAP-85.

I.6. Inmunoprecipitación de DMAP-85 en extractos de embriones

En estos ensayos, los embriones (1-2 horas) fueron lavados con PBS, NaCl 0,4%, Tritón X-100 0,1% y el corion fue removido por inmersión en 50% hipoclorito de Na. Los embriones (n=300) fueron homogenizados en 200 µL de amortiguador de lisis (BL): Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, EDTA 2 mM, EGTA 2mM, Tween-20 0,5%, conteniendo inhibidores de proteasas. Los extractos fueron centrifugados a 126.000 x g por 20 min a 4 °C, en una ultracentrífuga Beckman Airfuge. Alícuotas iguales de los sobrenadantes fueron incubadas por 2 horas a 4 °C, con los anticuerpos DMAP.1 (1:50), anti-tubulina (1:50), anti-actina (1:30), anti-PHF (1:50) y con suero preimmune de los conejos inmunizados con DMAP-85 (1:50). La proteína A-Sepharose, fue agregada a las mezclas y éstas fueron incubadas por 2 h a 4 °C. Las mezclas fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 3 min a 4 °C y los inmunoprecipitados fueron lavados al menos cinco veces con BL. Las fracciones de proteínas inmunoprecipitadas fueron fraccionadas en geles de SDS-poliacrilamida y electrotransferidas a membranas de PVDF. La presencia de DMAP-85, en estas fracciones y en el extracto inicial fue analizada mediante ensayos de Western blots con el anticuerpo DMAP.1.

I.7. Electroforesis y Western blots:

Las electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida fueron realizadas de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R250. Los extractos fueron electrotransferidos a membranas de PVDF, de acuerdo con protocolos estándares (Harlow y Lane, 1988). Para los ensayos de Western blots, las membranas fueron bloqueadas en TST (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) conteniendo 3% de BSA a temperatura ambiente (TA) por 2 horas, lavadas

con TST e incubadas 2 horas a TA ó 16 horas a 4 °C con los anticuerpos, previamente diluidos en TST/BSA. Las membranas fueron sometidas a tres lavados de 10 min en TST e incubadas 2 horas con los segundos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina o peroxidasa. Los anticuerpos unidos a las membranas fueron revelados usando BCIP/NBT como sustratos enzimáticos (Harlow y Lane, 1988) o reactivos de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

II. Clonamiento y secuenciación de DMAP-85

II.1. Purificación y microsecuenciación de DMAP-85:

DMAP-85 fue purificada a homogeneidad, utilizando cromatografías de afinidad en columnas construidas mediante el acoplamiento del péptido β II-(422-434) de la tubulina a matrices de Sepharose (Cambiaso y cols., 1995). Aproximadamente 30 μ g de la proteína fueron digeridos químicamente, utilizando el sistema Probe-Design Peptide Separation System (Promega). Los péptidos, inmovilizados en membranas de PDVF fueron cortados y analizados en la Unidad de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Univ. de Chile.

II.2. Producción y purificación de un anticuerpo policlonal anti-DMAP-85 (DMAP.1):

El anticuerpo fue generado en conejos de acuerdo con protocolos estándares (Harlow y Lane, 1988), como antígeno se utilizó DMAP-85 purificada en columnas de afinidad (Cambiaso y cols., 1995). Para purificar anticuerpos monoespecíficos, a partir del suero inmune, DMAP-85 purificada o su proteína recombinante fue fraccionada en geles de SDS-poliacrilamida y transferida a membranas de PVDF. Las proteínas fueron localizadas mediante tinción con Ponceau S 0,2% y cortadas. Los fragmentos de membranas fueron bloqueados, incubados por 12-18 horas a 4 °C con el suero total anti-DMAP-85 y lavados de acuerdo con los procedimientos utilizados en los ensayos de Western blot (ver I.6). Los anticuerpos unidos a las membranas fueron eluidos con glicina 100 mM, pH 3,0 y la solución fue inmediatamente neutralizada con 1/10 de volumen de Tris 1 M, pH 8,0.

II.3. Análisis de una genoteca de expresión:

Una genoteca de expresión de cDNA embrionario, en λ gt11 (Uni-ZapTM XR Library de Clontech), fue analizada, utilizando el anticuerpo policlonal DMAP.1 (dilución 1:1000). En esta genoteca los insertos de cDNA se encuentran clonados en el vector Uni-ZapTMXR, en los sitios de restricción de las enzimas Eco RI y Xho I. El anticuerpo anti-DMAP-85 fue previamente purificado por afinidad y adsorbido con lisados proteicos de *E.coli*/fago λ , de acuerdo con protocolos estándares (Sambrook y cols., 1989). La especificidad del anticuerpo purificado fue examinada mediante ensayos de Western blots con extractos totales de embriones de *D. melanogaster*. Aproximadamente, 5×10^4 pfs/placa, junto con 600 μ L de células XL1-Blue MRF' en 6,5 mL de *top agar* fueron sembrados sobre placas de 15 cm conteniendo medio LB/agar (10 placas= 5×10^5 pfu). Las placas fueron incubadas por 3 horas a 42 °C, luego transferidas a 37 °C y cubiertas con filtros de nitrocelulosa, previamente tratados con IPTG 10 mM. Las placas fueron incubadas por 3 horas a 37 °C, posteriormente, los filtros fueron removidos, lavados con TST y procesados para Western blots, como se describe en I.7. Los filtros fueron revelados utilizando reactivos de quimioluminiscencia. Las placas de lisis que dieron señal positiva fueron removidas y analizadas a densidades menores, hasta purificar a homogeneidad los clones recombinantes. Los insertos de cDNA de los clones purificados fueron "subclonados" en el plasmidio Bluescript SK(+), en células XL1-Blue, mediante una escisión *in vivo*. Este procedimiento permitió obtener los vectores: cDNAP-2.1, cDNAP-5.1, cDNAP-7.1, cDNAP-9.1 y cDNAP-10.3.

II.4. Análisis de los clones positivos

Los insertos de cDNA de los clones aislados fueron analizados de la siguiente manera:

II.4.1. Los vectores cDNAP-2.1, cDNAP-5.1, cDNAP-7.1, cDNAP-9.1 y cDNAP-10.3 fueron purificados, digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y Xho I y analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8%, según procedimientos estándares (Sambrook y cols., 1989). El tamaño de los insertos de cDNA fue determinado por

comparación con marcadores de peso molecular conocido (λ DNA/Hind III).

II.4.2. Alícuotas de 2 μ L del DNA plasmidial, de cada uno de los clones positivos, fueron adsorbidas a membranas de Nylon e hibridadas con sondas derivadas de los insertos de cDNA de los vectores cDNAp-2.1 y 7.1 (Sambrook et al, 1989), estas sondas fueron preparadas de la siguiente manera: Los vectores fueron digeridos con las enzimas EcoRI/Xho I y los productos separados en geles de *low melting point agarose* al 0.6%. La banda conteniendo el inserto fue extraída e incubada a 65 °C, una alícuota de esta mezcla, conteniendo una cantidad apropiada de cDNA fue marcada radioactivamente con 32 P, utilizando el *Megaprime DNA Labelling System* (Amersham). Las sondas fueron hibridadas por 16-18 h a 65 °C en: SSPE 3x, sulfato de dextrano 5%, SDS 0,5%, Denhardt 5x y ssDNA de espermios de salmón 100 μ g/mL. Las membranas fueron lavadas con dos cambios de SSPE 2x, SDS 0,1%, seguidos por dos lavados de 30 min con SSPE 2x, SDS 0,1%, Denhardt 5x y DNA de espermios de salmón 50 μ g/mL y finalmente dos lavados de 30 min con SSPE 1x, SDS 0,1% a 65°C.

II.4.3. El vector pBluescript SK (+/-) contiene el promotor del gen *lacZ*, el cual es inducible por IPTG y dirige la expresión de una proteína recombinante fusionada con 36 aminoácidos de la β -galactosidasa. Para obtener la expresión de las proteínas recombinantes codificadas por cada uno de los insertos contenidos en los vectores (cDNAp-2.1, cDNAp-5.1, cDNAp-7.1, cDNAp-9.1 y cDNAp-10.3), una colonia de cada recombinante fue crecida a 37°C en medio LB conteniendo 50 μ g/mL de ampicilina por 16-18 horas. Para inducir la expresión de las proteínas recombinantes, 5 mL de medio LB + ampicilina (50 μ g/mL) fue inoculado con 50 mL del cultivo inicial, las bacterias fueron crecidas hasta alcanzar una densidad óptica OD=0,6 y se agregó IPTG, en una concentración final de 1 mM. Las bacterias fueron incubadas con IPTG durante 3 horas y 1,5 mL del cultivo fue centrifugado a 15.000 rpm por 30 s en una microcentrífuga Sorvall. Los cultivos controles fueron crecidos por igual periodo de tiempo, pero en ausencia de IPTG. La lisis de la pella de bacterias se realizó por resuspensión en amortiguador de muestra (Laemmli, 1970). La identidad de las proteínas recombinantes fue analizada, en extractos bacterianos totales, mediante ensayos de Western blots con el anticuerpo DMAP.1.

II.4.4. El inserto de cDNA del vector cDNAp-5.1, que resultó ser el inserto de mayor tamaño, fue subclonado en el vector de expresión pTrcHis B (Invitrogen). El vector resultante fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* de la cepa JM(109). Este vector, a diferencia del pBluescript SK (+/-) contiene una copia del gen *lacI^f*, el cual codifica para la proteína represora del gen *lac*, de manera que la transcripción en ausencia de IPTG es prácticamente nula. Además, en este vector, los insertos de cDNA se ubican en fase con una secuencia que codifica para seis residuos de histidina, lo cual permite obtener una proteína recombinante fusionada a este péptido, la que puede ser purificada en columnas de Níquel-Sepharose. Todos los procedimientos de subclonamiento y transformación fueron realizados de acuerdo con protocolos estándares descritos en Sambrook y cols. (1989). Para inducir la expresión de la proteína recombinante se utilizó un procedimiento similar al descrito en II.2.3, excepto que: 50 mL de medio LB + ampicilina (50 µg/mL) fue inoculado con 0,3 mL del cultivo inicial y tanto la lisis bacteriana como la purificación de la proteína recombinante en columnas de Níquel-Sepharose se realizaron de acuerdo con las condiciones recomendadas por el proveedor (Invitrogen). Los extractos bacterianos fueron fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida, transferidos a membranas de PVDF y la identidad de la proteína recombinante fue analizada en ensayos de Western blot con el anticuerpo DMAP.1.

II.4.5. El inserto de mayor tamaño, obtenido en el *screening* (cDNA 5.1), fue secuenciado mediante el método de terminación de cadena por dideoxinucleótido (Sanger y cols., 1977), utilizando dATP-³⁵S y la enzima Sequenase 2.0. (United States Biochemical). Ambas hebras de DNA fueron secuenciadas independientemente.

II.5. Clonamiento y secuenciación del extremo 5' del cDNA de DMAP-85

Un fragmento residual de 0,6 Kb que no se detectó en el cDNA 5.1 fue obtenido a partir de una genoteca de cDNA larval en λZAPII, según la metodología de *nested PCR*, descrita por Gibbons y cols. (1991). Las reacciones de amplificación mediante PCR fueron realizadas en 30 ciclos, con un termociclador Perkin-Elmer, utilizando: un ciclo de desnaturación a 94 °C por 1 min, hibridación por 2 min a 58°C y extensión a 72

°C por 2 min. Las mezclas de reacción (100 µL) contenían 10 pmol de cada uno de los partidores, 1,5 unidades de *Pfu polymerase* (Stratagene) y 0,5-1 µg de DNA de las genotecas o bien 10 ng de DNA plasmidial. Los partidores utilizados correspondían a: (1) partidor T3 específico para el vector pBluescript de la genoteca λZAPII, y (2) partidores de 20 pb complementarios con regiones 5' del cDNA 5.1. Estos partidores permitieron amplificar insertos de cDNA conteniendo regiones 5' de mayor longitud que el cDNA 5.1, aislado en el primer *screening*. Los fragmentos amplificados fueron purificados a partir de geles de agarosa y subclonados en el vector pBluescript, utilizando el *kit* pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning kit (Stratagene), con lo cual se obtuvo el vector pCR-N1100. Los fragmentos subclonados fueron secuenciados mediante el método de terminación de cadena por dideoxinucleótido (Sanger y cols., 1977), utilizando dATP-³⁵S y la enzima Sequenase 2.0. (United States Biochemical).

II.6. Obtención del cDNA total de DMAP-85 y de la proteína recombinante

Un vector que contiene la totalidad del cDNA que codifica para DMAP-85 fue construido de la siguiente manera: Los vectores pCR-N1100 y cDNAp-5.1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Not I* y *Stu I*. El fragmento de 500 pb generado en la digestión del vector pCR-N1100 fue ligado al vector cDNAp-5.1 linearizado, obteniéndose el vector pDMt el cual contiene la totalidad del cDNA de DMAP-85 en el plasmidio pBluescript SK (+/-). El inserto fue secuenciado en la dirección 5' → 3' para confirmar su integridad. La proteína recombinante codificada en el vector pDMt fue obtenida utilizando el procedimiento descrito en II.4.3.

II.7. Comparación de patrones peptídicos

DMAP-85 nativa y recombinante fueron digeridas con la proteasa Endo-Lys, de acuerdo con el procedimiento descrito por Cleveland y cols. (1977), utilizando el *Protein Fingerprint Kit* (Promega). Los péptidos resultantes fueron separados en geles de poliacrilamida al 15% y teñidos con azul de Coomassie.

II.8. Análisis mediante Southern blots

El DNA genómico de *D. melanogaster* fue digerido con enzimas de restricción, fraccionado en geles de agarosa al 0,8% y transferido a membranas de Nylon (Sambrook y cols., 1989). La sonda utilizada en estos ensayos consistió en un fragmento de 200 pb, obtenido mediante la amplificación por PCR del cDNA 5.1, utilizando dos partidores de oligonucleótidos de 20 pb. Como control, una amplificación por PCR de DNA genómico, utilizando los mismos partidores, generó un único producto, señalando la ausencia de intrones en la región amplificada. El producto de amplificación fue aislado desde geles de agarosa y marcado radioactivamente con ^{32}P , utilizando el *Megaprime DNA Labelling System* (Amersham). Las condiciones de hibridación y lavado fueron idénticas a aquellas descritas en el punto II.4.2.

II.9. Hibridación *in situ* en cromosomas politénicos

La localización del gen *DMAP-85* en cromosomas politénicos fue determinada utilizando como sonda el cDNA 5.1, marcado con digoxigenina-dUTP, según protocolos descritos en de Frutos y cols. (1989).

III. Identificación de los dominios de unión de DMAP-85 a MTs

III.1. Obtención de proteínas recombinantes truncadas

Tres tipos de proteínas recombinantes fueron construidas, de la siguiente manera: (1) Un fragmento BamHI-KpnI del cDNA contenido en el vector cDNAp-2.1 fue subclonado en el vector de expresión pTrc-His (Invitrogen), generándose el vector pDM-2; (2) Un fragmento BamHI-SalI del cDNA 5.1 fue subclonado en el vector de expresión pQE31 (Quiagen), el vector resultante pDM-1, dirige la expresión de un polipéptido fusionado en su extremo N-terminal a seis residuos de histidina, y (3) Un fragmento que corresponde a los aminoácidos 1-642 de DMAP-85 fue generado mediante amplificación por PCR del cDNA 5.1, utilizando partidores derivados de su secuencia. Este fragmento fue subclonado en el vector pQE31 y el vector resultante, pDM-10, dirige la expresión de un polipéptido fusionado en su extremo N-terminal a

seis residuos de histidina. En cada caso, se determinó la orientación de los insertos mediante: (1) la secuenciación de sus extremos 5' y 3', y (2) el análisis de fragmentos de restricción. Estos vectores, conteniendo los diferentes fragmentos de cDNA fueron utilizados para transformar cepas de *E. coli* apropiadas (TOP-10 para el caso del vector pTRcHis y M15[pREP4] para el caso del vector pQE31). La expresión de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en II.4.4. Las proteínas recombinantes codificadas por estos fragmentos fueron parcialmente purificadas mediante cromatografías de afinidad en columnas de Níquel-Sepharose, según las especificaciones del proveedor (Quiagen) pDM-1 y pDM-10. La proteína codificada en el vector pDM-2 fue solubilizada a partir de cuerpos de inclusión, según el procedimiento descrito en Sambrook y cols. (1989). Las tres proteínas recombinantes fueron analizadas en ensayos de Western blots con el anticuerpo DMAP.1

III.2. Ensayos de overlay

Las proteínas recombinantes fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas durante 16 horas a 4°C en una solución de TST conteniendo 5% de BSA, lavadas por 20 min en TST conteniendo 1% de BSA y luego equilibradas en el amortiguador PEM (Pipes 100 mM, pH, 6,7, EGTA 1 mM y MgCl₂ 1 mM) conteniendo GTP 1 mM. Las membranas fueron incubadas por 18 horas a 4°C con tubulina 0,5 mg /mL (purificada como se describe en Cambiazo y col., 1995) en PEM suplementado con GTP 1 mM y taxol 10 µM. Los MTs unidos a la membrana fueron detectados mediante ensayos de Western blots con un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Sigma Chemical).

IV. Análisis de la expresión temporal del mensajero y de la proteína DMAP-85

IV.1. Cultivo de *D. melanogaster*

Las moscas fueron crecidas a 25°C en un medio que contiene azúcares, sémola, agar, levadura y sales minerales. Para coleccionar embriones en diferentes estados de desarrollo, las moscas fueron transferidas a los frascos de recolección e inducidas a

depositar los embriones retenidos sobre placas Petri conteniendo agar al 1% y una pasta de levadura en medio acuoso. Una hora mas tarde estas placas fueron reemplazadas por placas frescas, en las cuales se realizó la recolección. La tabulación temporal de desarrollo de las larvas fue determinada a partir de la eclosión de la larva de primer estado ($t=0$), las larvas de tercer estado fueron colectadas entre las 72 y 90 h a partir del tiempo cero (White and Kankel, 1978).

IV.2. Ensayos de Northern blots

Poli A⁺ RNA de embriones de 12 horas, larvas de tercer estado y adultos fue obtenido utilizando el *QuickPrep mRNA Purification kit* (Pharmacia). El mRNA (2 μ g) fue separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, conteniendo 6% de formaldehído y los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Sambrook y cols., 1989). Una sonda correspondiente al cDNA 5.1, fue marcada con ³²P utilizando el *Megaprime DNA Labelling System* (Amersham) e hibridada a la membrana, por 16-18 h a 42 °C, en una solución conteniendo: formamida 50%, sulfato de dextrano 10%, SDS 0,1%, NaCl 0.058 g/mL y 100 μ g/mL de DNA de espermios de salmón. Las membranas fueron lavadas a temperatura ambiente con cambios de 5 min de SSC 2x (NaCl 0,3M, Citrato de Na 30 mM, pH 7,0), luego con dos cambios de 30 min de SSC 2x, SDS 0,1% a 60 °C, y finalmente con dos cambios de 30 min de SSC 0,1x.

IV.3. Western blots de extractos proteicos obtenidos en diferentes estados del desarrollo

Los extractos totales de embriones, larvas y adultos de *D. melanogaster*, fueron obtenidos según los procedimientos descritos en I.1. Para obtener embriones en diferentes estados de desarrollo, las moscas (3 a 10 días de edad) fueron tratadas como se describe en IV.1. La recolección de los embriones a tiempos definidos, se realizó según el siguiente procedimiento: (1) Los embriones fueron colectados dos horas después de la postura y procesados inmediatamente (embriones de 0-2 horas) o mantenidos por seis horas a 20°C (embriones de 2-6 horas), (2) los embriones fueron colectados ocho horas después de la postura y mantenidos por cuatro horas a 20°C (embriones de 8-12 horas) y (3) los embriones fueron colectados 12 horas después de la

postura y mantenidos por ocho horas a 20°C (embriones de 12-20 horas). Los procedimientos de electroforesis y Western blots se realizaron como se describe en I.7. El anticuerpo anti-DMAP-85 fue utilizado en una dilución 1:1000.

V. Análisis del patrón de distribución de DMAP-85 y de su relación espacial con otros componentes del citoesqueleto

V.1. Ensayos mediante inmunofluorescencia simples en montajes completos de embriones

La distribución de DMAP-85 fue analizada mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo policlonal mono específico anti-DMAP-85. Estos experimentos fueron realizados en embriones enteros colectados a diferentes tiempos después de la fecundación (el estado de desarrollo embrionario fue determinado de acuerdo con Foe y Alberts, 1983 y Campos-Ortega y Harstenstein, 1985): (1) 0-2 horas para embriones de estados 1 a 5; (2) 3-6 horas para embriones de estados 6 a 10; y (3) 12-14 horas para embriones de estados 14 a 16. La obtención de embriones se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en IV.1.

Los embriones fueron lavados en una solución de PBS, conteniendo NaCl 0,4%, Tritón X-100 0,1% y el corion fue removido por inmersión en hipoclorito de sodio 50%. Los embriones fueron lavados exhaustivamente con la solución anterior y examinados en un microscopio invertido para verificar su estado de desarrollo. Los embriones fueron procesados para inmunofluorescencia de acuerdo con los protocolos descritos por Karr y Alberts (1986) o por Theurkauf (1992). Las modificaciones a estos protocolos fueron: (1) la solución de bloqueo fue PBS, conteniendo Tritón X-100 0,1% y suero normal de cabra al 10%; (2) los embriones fueron incubados con el anticuerpo DMAP.1 y luego de la incubación con el primer y segundo anticuerpo, los embriones fueron lavados al menos 2 horas con varios cambios de PBS, conteniendo Tritón X-100 0,1% y BSA 1%; y (3) los embriones fueron montados en Dabco/Mowiol y las preparaciones fueron analizadas en un microscopio convencional (Microscopio Zeiss Axioskop) y en uno confocal (Microscopio confocal Zeiss, CEM, Fac. de Ciencias,

Univ. de Chile).

V.2. Ensayos mediante inmunofluorescencias dobles

Los embriones fueron procesados y analizados como se describe en V.1, excepto que fueron incubados simultáneamente con el anticuerpo policlonal anti-DMAP-85 y anticuerpos monoclonales anti- α -tubulina, anti-actina, anti-espectrina o anti-tubulina acetilada y luego con los segundos anticuerpos correspondientes, acoplados a los fluorocromos FITC o TRICT.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DE LA INTERACCION DE DMAP-85 CON EL SISTEMA MICROTUBULAR.

I.1. Identificación de MAPs en extractos de larvas de *D. melanogaster*

Inicialmente, se investigó la presencia de proteínas que se asocian a MTs en *D. melanogaster*, utilizando una estrategia experimental descrita por Vallee (1982). Este procedimiento consiste en la adición de taxol a extractos citosólicos de células en cultivo, lo cual induce la formación de MTs que pueden ser colectados por centrifugación. En el trabajo de Vallee (1982), la pella de MTs está compuesta de tubulina y varias otras proteínas que son idénticas, en composición, a las MAPs presentes en preparaciones de MTs obtenidas por ciclos de ensamblaje-desensamblaje dependientes de temperatura (Shelanski y cols., 1973). Las MAPs fueron disociadas de los MTs estabilizados con taxol al incrementar la concentración de sal en el medio, lo que confirma que los enlaces iónicos son importantes en la interacción de las MAPs con los polímeros de tubulina. Este procedimiento de purificación, aplicado a extractos solubles de larvas, se muestra en la Figura 5. En el segundo carril de este gel de SDS-poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie, se observan las proteínas del extracto inicial. La droga taxol fue agregada en una concentración final de 20 μ M, la cual es suficiente para inducir un rápido ensamblaje de los MTs. Una centrifugación, en esta etapa, genera un sobrenadante carente de MTs (carril 3) y una primera pella microtubular (carril 4). La principal proteína de la pella fue tubulina, pero también se observaron otras proteínas, entre las cuales se destacaron: un par de polipéptidos de aproximadamente 205 kDa, un grupo de polipéptidos de masa molecular cercana a 85 kDa y algunos otros de masas moleculares inferiores. El tratamiento de esta pella con NaCl 0,4 M y su posterior centrifugación permitió la remoción selectiva de las proteínas

asociadas a los MTs estabilizados con taxol. El sobrenadante enriquecido en MAPs, representó aproximadamente el 0,43% de la proteína total del extracto y contenía principalmente dos proteínas de aproximadamente 205 kDa y un componente de 85 kDa (carril 5), los que se encontraban notablemente enriquecidos con relación a la primera pella microtubular (ver carril 4). La pella residual, que corresponde al 3,4% de la fracción de proteínas del extracto, contenía principalmente tubulina (carril 6).

En estos experimentos, la pella de MTs fue lavada con el amortiguador de ensamblaje y centrifugada. La pella resultante presentaba prácticamente los mismos polipéptidos, sin embargo, se observó un aumento en la abundancia relativa de las especies de 205 y 85 kDa, indicando que estos polipéptidos no eran removidos durante el lavado y sugiriendo que cosedimentaban en forma específica con los MTs. Como control, los extractos de larvas fueron incubados en ausencia de taxol y centrifugados, en estas condiciones, la mayoría de los polipéptidos previamente observados, incluyendo a los componentes de 205 y 85 kDa, no se encontraron en las pellas resultantes (resultados no mostrados). De esta manera, los resultados sugieren que la mayoría de las proteínas que cosedimentan con los MTs, en extractos de larvas de *D. melanogaster*, se encuentran específicamente asociados a éstos y pueden ser consideradas MAPs, de acuerdo con los criterios operacionales definidos para las MAPs de mamíferos (Vallee, 1982). Utilizando cromatografías de afinidad en columnas construidas con péptidos de los dominios funcionales de la tubulina (ver mas adelante), fue posible purificar uno de estos componentes, el cual corresponde a una proteína de 85 kDa. Una serie de ensayos tanto funcionales como estructurales, permitieron caracterizar esta proteína de 85 kDa e identificarla como una MAP de *D. melanogaster*. Debido a que esta proteína presenta las principales propiedades funcionales asignadas a las MAPs de mamíferos, la hemos denominado DMAP-85.

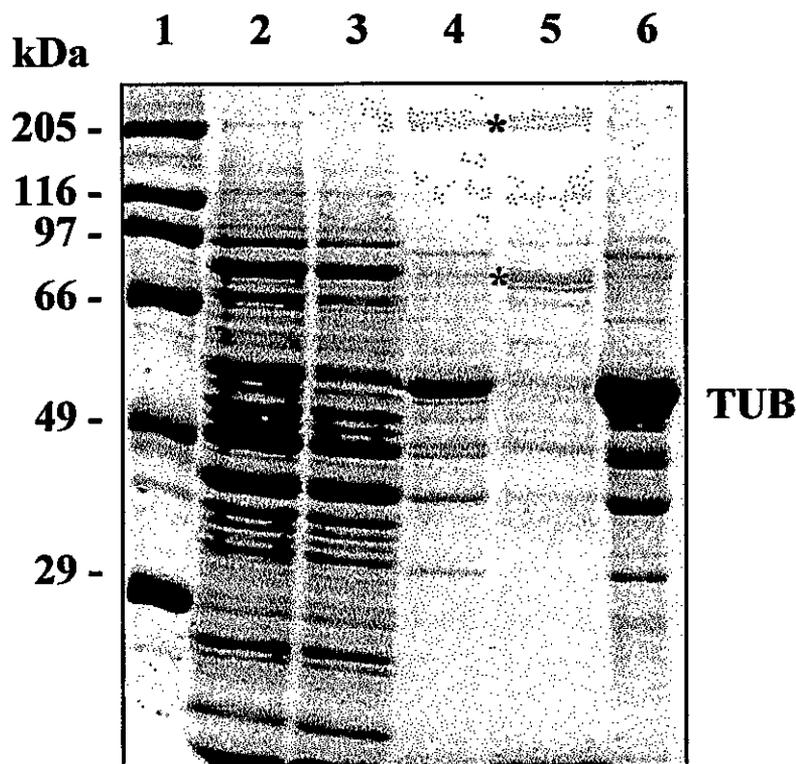


Figura 5: ANALISIS ELECTROFORETICO DE MTs Y MAPs PRESENTES EN EXTRACTOS SOLUBLES DE LARVAS. Los MTs fueron preparados de acuerdo con el procedimiento descrito por Vallee (1982). La preparación fue analizada mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, teñido con azul de Coomassie. La droga taxol fue agregada al extracto soluble (carril 2) para inducir el ensamblaje de los MTs. La centrifugación del extracto generó un sobrenadante (carril 3) y una pella microtubular (carril 4), la cual fue resuspendida en un amortiguador conteniendo taxol y 0,4 M NaCl y centrifugada nuevamente. Las MAPs permanecieron en el sobrenadante (carril 5), mientras que la pella final contenía tubulina y otras proteínas (carril 6). Las posiciones de tubulina (TUB), las proteínas de 85 kDa (85) y de 205 kDa (205) (asteriscos), se encuentran indicadas. El carril 1 corresponde a los estándares de peso molecular.

I.2. Cromatografía de afinidad de extractos de *D. melanogaster* en una columna de MTs estabilizados con taxol.

La capacidad de DMAP-85 de interactuar con el sistema microtubular, así como los dominios topográficos de la tubulina que están involucrados en esta interacción fueron estudiados mediante un enfoque experimental basado en ensayos de cromatografía de afinidad y cosedimentaciones. En primer lugar se analizó la interacción de DMAP-85 con MTs estabilizados con taxol (MTs-taxol) en columnas de afinidad. Este es un método utilizado en la identificación y caracterización de proteínas que interactúan con distintos grados de afinidad con el sistema microtubular (Kellogg y cols., 1989). En un primer estudio, extractos de proteínas solubles, obtenidos por ultracentrifugación (126.000xg) de un homogeneizado de organismos adultos de *D. melanogaster*, fueron sometidos a este análisis. Las proteínas retenidas fueron eluidas con un aumento en la fuerza iónica del amortiguador de equilibrio (KCl 0,5 M) y fraccionadas en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% (Figura 6, carriles 1 a 4). Del total de proteínas solubles presentes en el extracto (carril 1) una fracción importante de éstas no fue retenida en la columna de afinidad (carril 2), y luego del lavado con el amortiguador de equilibrio no se observó elución de nuevas proteínas. Un conjunto significativamente menor de proteínas de masas moleculares aproximadas de: 205, 190, 110, 85 kDa y otras en un rango de 60 a 35 kDa, fueron eluidas desde la columna al incrementar la fuerza iónica (carril 3), indicando que ellas fueron preferentemente retenidas en la columna de MTs-taxol. Con el fin de determinar si la banda de 85 kDa, encontrada en la fracción eluida, correspondía a DMAP-85, se realizó un ensayo de Western blot, con el anticuerpo DMAP.1. Este ensayo permitió detectar una banda inmunorreactiva de 85 kDa (Figura 6, carril 4), lo cual demostró que DMAP-85 estaba presente en la fracción de proteínas que interactuaron y fueron eluidas con fuerza iónica desde la columna de MTs-taxol. Posteriormente, esta fracción fue desnaturalada mediante una incubación de 5 minutos a 100°C, en presencia de NaCl 0,75 M y β -mercaptoetanol 10 mM. Las proteínas que permanecieron solubles fueron analizadas mediante Western

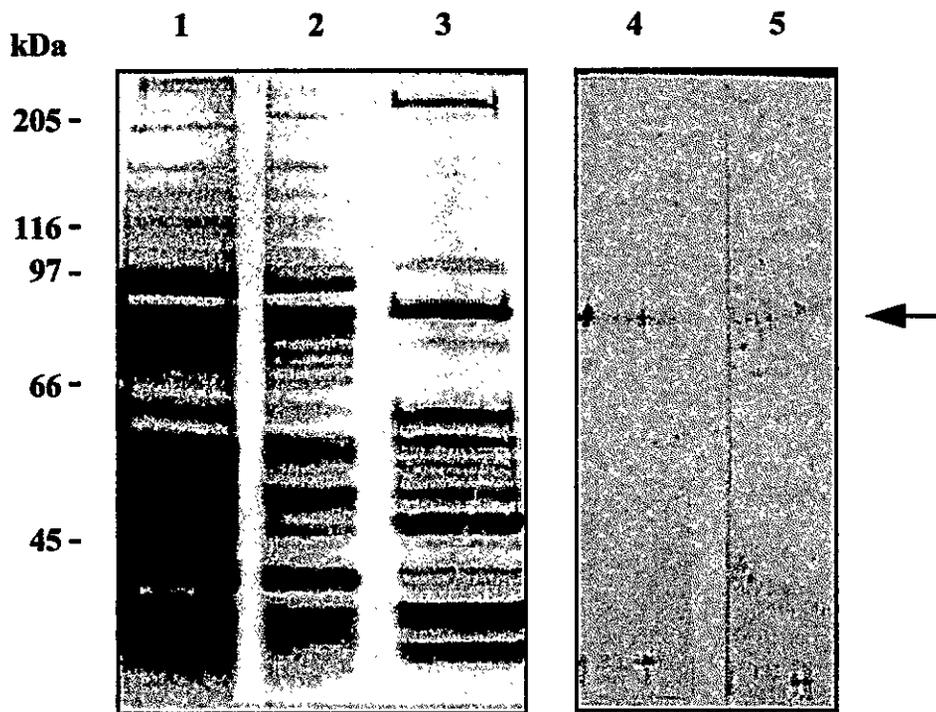


Figura 6: CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE EXTRACTOS SOLUBLES DE *D. melanogaster* EN COLUMNAS DE MICROTUBULOS ESTABILIZADOS CON TAXOL. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie (carriles 1 a 3) y Western blot en membranas de nitrocelulosa (carriles 4 y 5). Se observa el patrón electroforético correspondiente al extracto total de proteínas solubles de *D. melanogaster* (carril 1), la fracción de proteínas que no fueron retenidas en la columna (carril 2) y la fracción de proteínas eluidas utilizando KCl 0,5 M (carril 3). La fracción de proteínas eluidas fueron analizadas en ensayos de Western blot con el anticuerpo policlonal DMAP.1 (carril 4). Las proteínas termoestables de la fracción eluida con fuerza iónica desde la columna fueron inmunodetectadas con el anticuerpo DMAP.1 (carril 5). La flecha indica la posición de DMAP-85 en las distintas fracciones.

blots utilizando el anticuerpo DMAP.1. DMAP-85 se encontró en la fracción soluble y retuvo su capacidad de reaccionar con el anticuerpo (Figura 6, carril 5). Este resultado indica que DMAP-85 comparte con MAP-2 y tau la propiedad de termoestabilidad, señalando la existencia de posibles equivalencias estructurales entre ellas.

A fin de determinar la integridad y el grado de variabilidad que pueden presentar los MTs acoplados a la resina, se verificó repetidamente mediante microscopía electrónica la morfología de los MTs y se analizó el comportamiento, en dicha columna, de diferentes proteínas que establecen (o no lo hacen) interacciones con el sistema microtubular tanto *in vivo* como *in vitro* (resultados no mostrados). En conjunto, los resultados obtenidos, indican que la columna de MTs-taxol representa una herramienta adecuada para identificar y caracterizar MAPs en extractos solubles de *D. melanogaster*.

L3. Cromatografía de afinidad de extractos de *D. melanogaster* en una columna construida con péptidos del dominio C-terminal de tubulina.

La proteólisis del heterodímero de tubulina con subtilisina, en condiciones de proteólisis controlada, origina dos fragmentos: S-tubulina de unos 48 kDa desde el extremo N-terminal y una población de fragmentos que contienen el extremo C-terminal de aproximadamente 4 kDa (Serrano y cols., 1984a y b). Con el propósito de definir si DMAP-85 interactúa con la tubulina a nivel del dominio C-terminal de esta última, se construyeron columnas acoplando péptidos del dominio C-terminal de 4 kDa a una matriz de afinidad y se analizaron extractos solubles de *D. melanogaster*. En la Figura 7 se observa el patrón electroforético de las proteínas presentes en las fracciones obtenidas con este procedimiento. Del total de proteínas aplicadas a la columna de afinidad (carril 1) no se observó elución de proteínas al lavar con el amortiguador de equilibrio (carril 2). Un conjunto de proteínas de masas moleculares aparentes de 40-45, 50, 65-75, 85 y 100-120 kDa fueron eluidas desde la columna al incrementar la fuerza iónica (carril 3), sugiriendo que estas proteínas eran preferentemente retenidas en la

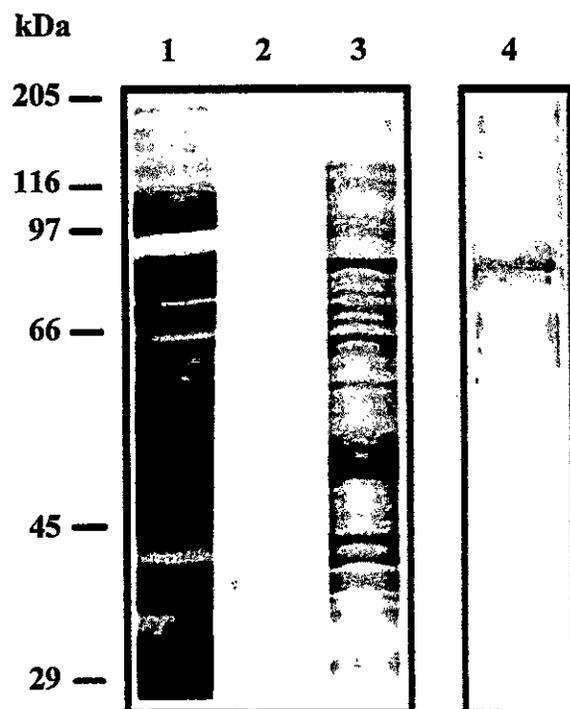


Figura 7: CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE EXTRACTOS SOLUBLES DE *D. melanogaster* EN COLUMNAS CONSTRUÍDAS CON EL FRAGMENTO C-TERMINAL DE TUBULINA. Gel de SDS-poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomasie (carriles 1 a 3) y Western blot en membranas de nitrocelulosa (carril 4). Se observa el patrón electroforético correspondiente al extracto soluble total de proteínas de *D. melanogaster* adultas (carril 1) y la fracción de proteínas eluidas después de lavar con el amortiguador de equilibrio (carril 2). Las proteínas eluidas utilizando KCl 0,5 M (carril 3) fueron analizadas en ensayos de Western blots con el anticuerpo policlonal DMAP.1 (carril 4).

matriz de afinidad. Para determinar si la banda de 85 kDa encontrada en la fracción eluída correspondía a DMAP-85, se realizó un Western blot, utilizando el anticuerpo policlonal DMAP.1 (carril 4). La presencia de una banda inmunorreactiva de 85 kDa demuestra que DMAP-85 está presente en la fracción de proteínas del extracto que interactuaron y fueron eluidas, con fuerza iónica, desde la columna de péptidos del dominio C-terminal de tubulina.

I.4. Ensayos de cosedimentación de DMAP-85 con MTs estabilizados con taxol y con polímeros de S-tubulina.

Considerando que existe evidencia de que algunas proteínas que interactúan con MTs, se unen tanto al fragmento C-terminal de 4 kDa, como al fragmento de S-tubulina, se analizó si DMAP-85 era también capaz de interactuar con un dominio presente en S-tubulina. En el panel A de la Figura 8 se puede observar una fotografía de una microscopía electrónica de los polímeros de S-tubulina, los que se presentan en una estructura típica de manojos de MTs (Maccioni, 1986). En el panel B se muestran los patrones de migración electroforética de tubulina (carril 1) y S-tubulina (carril 2), demostrando la eficiencia en la proteólisis controlada de ambas subunidades de tubulina con subtilisina.

Fracciones de microtúbulos estabilizados con taxol y de polímeros de S-tubulina fueron utilizadas en ensayos de cosedimentación junto con fracciones enriquecidas en DMAP-85. En la Figura 9 se observa que DMAP-85 cosedimenta con MTs-taxol (carriles 1 y 2), pero no lo hace con S-tubulina polimerizada (carriles 3 y 4). Un análisis densitométrico de las bandas de DMAP-85, evidenció que la banda de 85 kDa observada en el carril 3, (junto a la S-tubulina polimerizada), correspondía a una fracción de DMAP-85 que sedimentaba en ausencia de MTs o de polímeros de S-tubulina, como se observa en el carril 5 del gel. La presencia de DMAP-85 en la pella sedimentada en presencia de buffer podría sugerir que una fracción de esta proteína

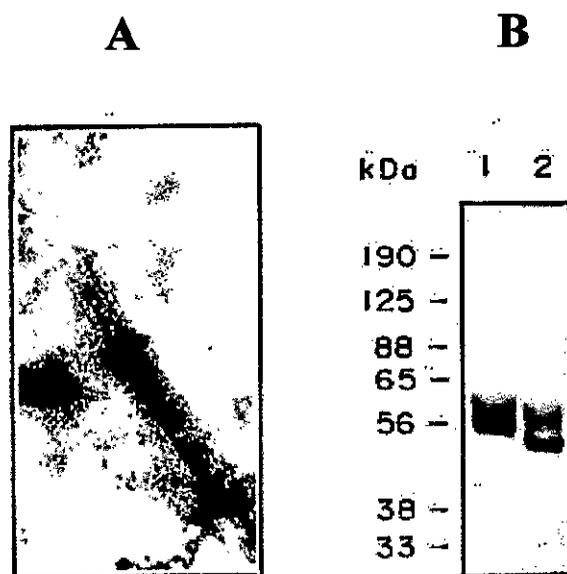


Figura 8: CONTROLES DE LOS EXPERIMENTOS DE COSEDIMENTACION. (A) Fotografía electrónica de los polímeros de S-tubulina (45000X) formados en presencia de GTP y taxol. (B) El gel de SDS-poliacrilamida teñido con azul de Coomassie muestra el patrón electroforético de tubulina (carril 1) y de S-tubulina (carril 2).

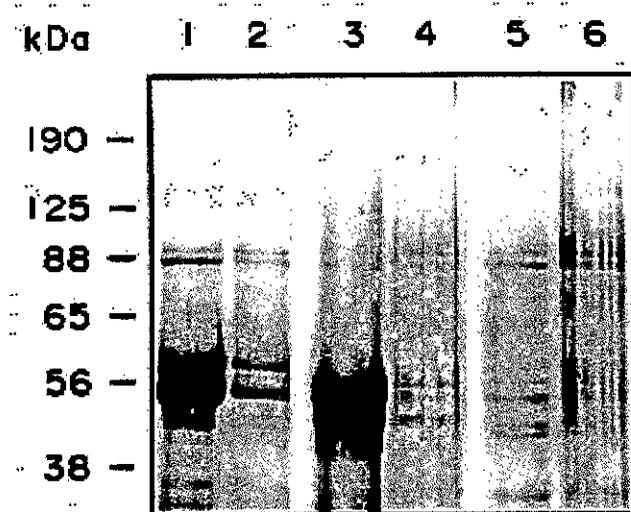


Figura 9: COSEDIMENTACION DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN DMAP-85 CON POLIMEROS DE TUBULINA Y S-TUBULINA. Gel de policrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a las proteínas presentes en las pellas y los carriles 2, 4 y 6 a los sobrenadantes. Fracciones enriquecidas en DMAP-85 fueron incubadas con polímeros de tubulina (carriles 1 y 2), polímeros de S-tubulina (carriles 3 y 4) o sólo con el amortiguador de ensamblaje (carriles 5 y 6) y posteriormente fueron ultracentrifugadas.

forma agregados. Sin embargo, todas las proteínas contenidas en la fracción enriquecida en DMAP-85 se encuentran presentes en esta fracción sedimentada, pudiendo explicarse más bien por un fenómeno de desnaturación de un porcentaje (~ 30%) de la muestra de proteínas, durante el ensayo.

I.5. Cromatografía de afinidad de DMAP-85 en una columna del péptido β II-(422-434) de la tubulina.

Continuando la caracterización de los dominios de unión de DMAP-85 a MTs, se realizó un análisis de la capacidad de DMAP-85 de interactuar con el péptido β II-(422-434) de la tubulina en columnas de afinidad. Estas columnas fueron construidas acoplado este péptido a una matriz de Sepharose-CL4B. Este sitio del extremo C-terminal de la tubulina tiene un papel esencial en la interacción selectiva con las MAPs de mamíferos (Serrano y cols., 1984a; Maccioni y cols., 1988; Vera y cols., 1989) y está relacionado estrechamente con el proceso de ensamblaje y desensamblaje de la tubulina (Serrano y cols., 1984b).

Extractos solubles de larvas de *D. melanogaster* fueron sometidos a esta cromatografía de afinidad. Las proteínas retenidas en la columna del péptido β II-(422-434), fueron eluidas con NaCl 0,5 M (Figura 10A) y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 10B). Del total de proteínas solubles presentes en el extracto (carril 1), la mayor parte de éstas no fue retenida en esta columna (carril 2), y luego del lavado con el amortiguador de equilibrio no se observó elución de nuevas proteínas (carril 3). Al incrementar la fuerza iónica, se observó que principalmente una proteína de 85 kDa fue eluida desde la columna (carril 4), y que ésta se encontraba altamente enriquecida en comparación con el extracto inicial (comparar carriles 1 y 4). Así, este procedimiento cromatográfico permitió la obtención de esta proteína con un alto grado de pureza. La DMAP-85 purificada mediante cromatografías de afinidad fue utilizada para generar anticuerpos policlonales en conejos (anticuerpo DMAP.1) y para

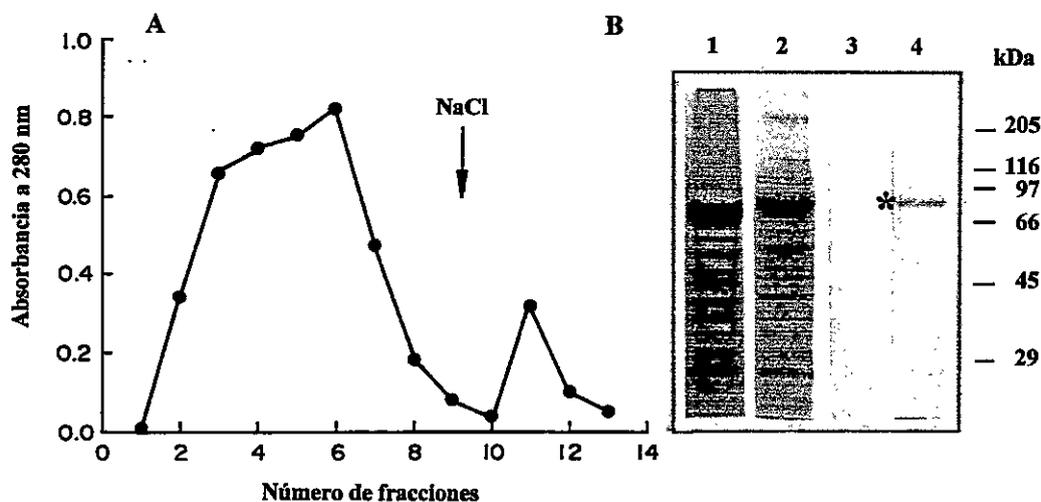


Figura 10: CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD DE EXTRACTOS SOLUBLES DE LARVAS DE *D. melanogaster* EN COLUMNAS DE SEPHAROSE-PEPTIDO β II-(422-434). (A) Alicuotas de 0,5 mL fueron colectadas desde la columna y las proteínas retenidas en ésta fueron eluidas con NaCl 0,5 M, en el amortiguador de equilibrio. (B) Gel de SDS-poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. Se observa el patrón electroforético correspondiente al extracto soluble total de proteínas de *D. melanogaster* (carril 1), la fracción de proteínas que no es retenida en la columna (carril 2) y la fracción de proteínas eluidas después de lavar con amortiguador de equilibrio (carril 3). Las proteínas eluidas al agregar NaCl 0,5 M al amortiguador de equilibrio (carril 4), corresponden principalmente a DMAP-85, indicada por un asterisco.

análisis funcionales de su interacción con MTs. El anticuerpo DMAP.1 fue utilizado para definir la identidad de DMAP-85 obtenida mediante los procedimientos cromatográficos descritos más arriba.

I.6. Efecto de DMAP-85 sobre la cinética de ensamblaje de tubulina *in vitro*.

Como se indicó anteriormente, la región C-terminal de la tubulina está directamente involucrada en la regulación de su ensamblaje (Serrano y cols., 1984a, 1986; Maccioni y cols., 1985). En este contexto, la interacción de DMAP-85 con dominios discretos de la región C-terminal de la tubulina sugirió fuertemente que puede existir una relación funcional entre DMAP-85 y el sistema de MTs, de manera similar a lo que ocurre con MAP-2, MAP-4 y tau. Con la intención de evaluar esta posibilidad, se realizó un análisis funcional de la interacción *in vitro* de DMAP-85 y tubulina, utilizando un procedimiento turbidimétrico, el cual permitió evaluar la capacidad de DMAP-85 de promover el ensamblaje de tubulina dimérica *in vitro*. Para ello, tubulina purificada de cerebro de bovino fue incubada con cantidades crecientes de DMAP-85 purificada por afinidad. La cinética de ensamblaje de tubulina, mostrada en la Figura 11, indica que DMAP-85 produce un aumento tanto de la velocidad del ensamblaje como de la cantidad de tubulina ensamblada, en este sistema *in vitro*. El nivel de tubulina polimerizada, medido por el aumento de la absorbancia de la solución a 350 nm, fue dependiente de la concentración de DMAP-85 (Figura 11, inserto). Los polímeros de tubulina formados en estas condiciones fueron sensibles a la despolimerización por frío (líneas discontinuas), indicando que el incremento turbidimétrico se debía a la polimerización reversible de MTs y no a la formación de agregados de tubulina o DMAP-85. En las condiciones del ensayo, el ensamblaje de tubulina en ausencia de MAPs no fue significativo (círculos llenos). Considerando que DMAP-85 parece interactuar preferentemente con el péptido β II-(422-434) de la tubulina, se examinó el efecto de este péptido sobre la actividad de DMAP-85 para inducir el ensamblaje de tubulina. Como se muestra en la Figura 11 (cuadrados llenos),

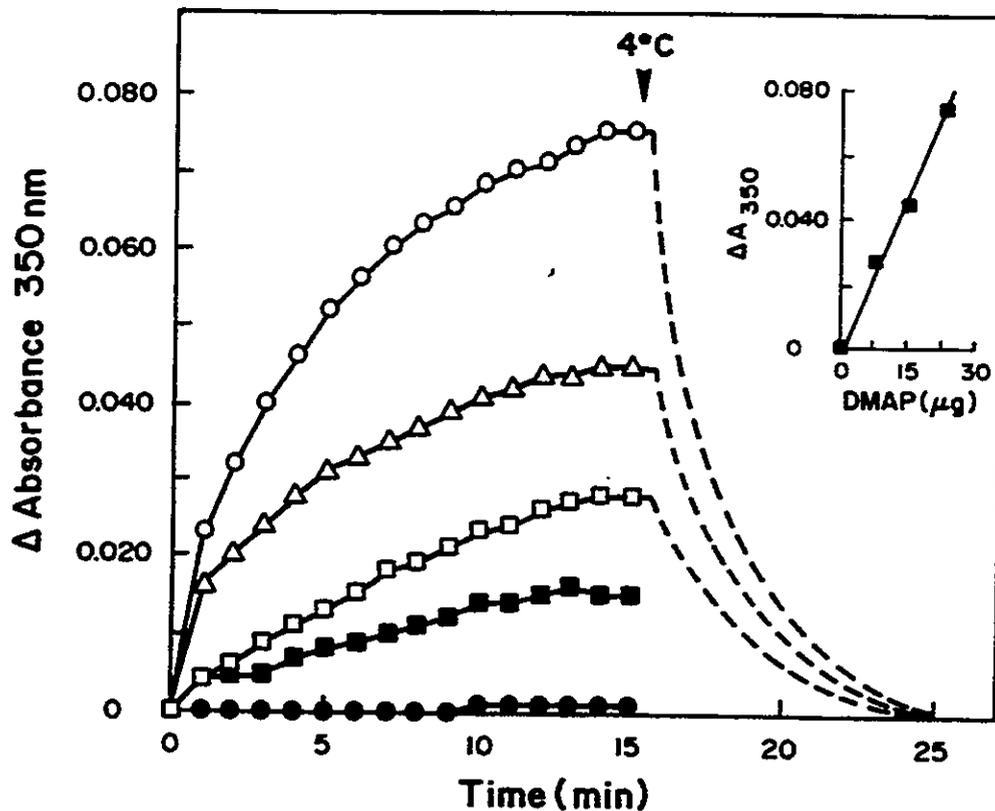


Figura 10: ANALISIS DE LA CAPACIDAD DE DMAP-85 PARA PROMOVER EL ENSAMBLAJE DE TUBULINA. C cantidades crecientes de DMAP-85, purificada por cromatografías de afinidad, fueron mezcladas con 1,2 mg/mL de tubulina purificada de cerebro de bovino. Se agregó GTP a las mezclas en una concentración final de 1mM y éstas fueron incubadas a 37° C. El ensamblaje de la tubulina fue medido mediante la variación en el valor de absorbancia a 350 nm en presencia de 25 (○), 15 (Δ), 10 (□) ó 0 μ g (●) de DMAP-85. Además, la tubulina fue preincubada por 2 min a 25° C en presencia de 15 μ g de DMAP-85 y 40 μ M del péptido β II-(422-434) y se registró la cinética de ensamblaje (■). En cada caso, para analizar la reversibilidad de la polimerización, cuando la cinética de ensamblaje se aproximaba a un plateau, las mezclas fueron enfriadas a 4° C, por 10 min, y el cambio en turbidez fue registrado como se describió previamente (líneas discontinuas). El inserto corresponde a un gráfico del nivel de tubulina polimerizada en función de la concentración de DMAP-85.

este péptido en una concentración final de 40 μM produce una inhibición del 70% en el nivel de ensamblaje de tubulina inducido por DMAP-85. Este resultado, sugiere fuertemente que DMAP-85 induce el ensamblaje de la tubulina, mediante su interacción con una secuencia específica del dominio C-terminal de la tubulina.

I.7. Ensayos de sedimentación de MTs en presencia de DMAP-85

El ensamblaje de tubulina inducido por la presencia de DMAP-85, fue también analizado mediante un ensayo de sedimentación de los polímeros de tubulina (Serrano y col., 1984b). Cantidades crecientes de DMAP-85 purificada por afinidad fueron mezcladas con 1,2 mg/mL de tubulina purificada de cerebro de bovino y el ensamblaje de la tubulina fue iniciado por la adición de GTP 1 mM a la mezcla. Los polímeros obtenidos luego de un período de incubación de 30 min a 37°C, fueron sedimentados por centrifugación y la proteína presente en las pellas fue cuantificada. El análisis electroforético de las pellas reveló que estaban compuestas principalmente por tubulina y DMAP-85 (resultado no mostrado). Bajo las condiciones experimentales, un análisis densitométrico de la banda de 85 kDa indicó que la cantidad de DMAP-85 incorporada en los polímeros fue dependiente de la concentración inicial de esta proteína, en el ensayo. En forma adicional y a partir de estos resultados se pudo determinar una razón peso/peso de tubulina versus DMAP-85 incorporada en los polímeros de 6:2,1 y una relación molar de tubulina:DMAP-85 de $5,3 \pm 0,2:1$ (moles/mol), considerando una masa molecular de 110 kDa para la tubulina. Basándose en un análisis de dobles recíprocos, a partir de los datos del ensamblaje de MTs dependiente de la concentración de DMAP-85 y considerando que la interacción de esta proteína con MTs ocurre en condiciones de equilibrio, se estimó una constante de asociación (K_a) de $7,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

II. CARACTERIZACION MOLECULAR DE DMAP-85

II.1. Obtención de cDNAs de *D. melanogaster* con secuencias que codifican para DMAP-85.

Con el propósito de establecer la identidad de DMAP-85 y de analizar con detenimiento sus características estructurales, se realizó el clonamiento y la secuenciación de esta proteína. Un aspecto decisivo para el desarrollo de este estudio fue la generación y purificación de un anticuerpo anti-DMAP-85 (DMAP.1), que permitiera el análisis de genotecas de expresión de *D. melanogaster*. La especificidad del anticuerpo, previamente inmuoadsorbido con DMAP-85, se muestra en la Figura 12. En ensayos de Western blots, el anticuerpo reaccionó con un único polipéptido de 85 kDa presente en extractos totales de embriones (carriles 3 y 4). En condiciones idénticas, el suero preinmune no presentó reacción significativa con proteínas embrionarias (carril 2).

Este anticuerpo fue utilizado en el *screening* de una genoteca de expresión de cDNAs embrionarios, en el vector UNI-ZAPTMXR (Stratagene). Esta análisis permitió identificar y aislar cinco clones inmunoreactivos (2.1, 5.1, 7.1, 9.1 y 10.3), los que retuvieron su reactividad frente al anticuerpo después de ser purificados. Los insertos de cDNA, contenidos en los vectores UNI-ZAPTMXR de cada uno de los clones, fueron "subclonados" en el plasmidio pBluescript SK(+) mediante un procedimiento de escisión *in vivo*, el cual generó los plasmidios: cDNAp-2.1, cDNAp-5.1, cDNAp-7.1, cDNAp-9.1 y cDNAp-10.3. Estos plasmidios fueron purificados y digeridos con las enzimas EcoRI y XhoI, para obtener los insertos de cDNA contenidos en ellos. El análisis de los productos de la digestión, mediante cromatografías en geles de agarosa, permitió determinar que el tamaño de los insertos de cDNA, variaba entre 1,8 y 2,3 Kb (resultados no mostrados).

Para iniciar la caracterización de los clones aislados y con la intención de definir si los insertos de cDNA, contenidos en ellos, presentaban secuencias comunes, se

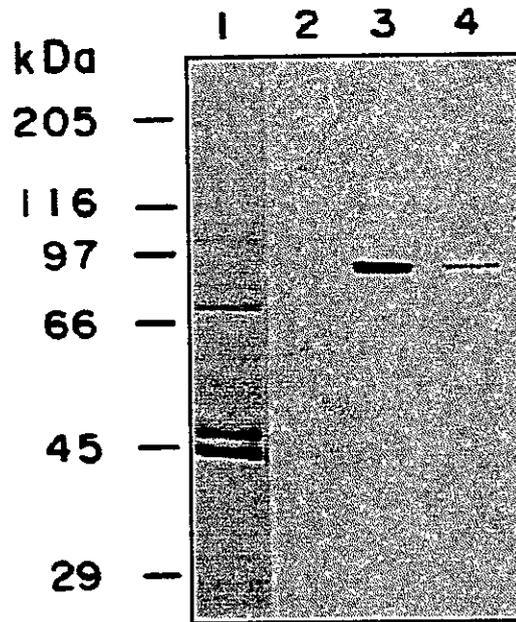


Figura 12: INMUNODETECCION DE DMAP-85 EN EXTRACTOS TOTALES DE EMBRIONES DE *D. melanogaster*. Las proteínas presentes en un extracto total de embriones de 4 horas fueron fraccionadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y teñidas con azul de Coomassie (carril 1) o sometidas a ensayos de Western blot con el anticuerpo DMAP.1 (carriles 3 y 4) o con el suero preinmune (carril 2). Carril 3, 15 µg del extracto; carril 4, 5 µg del extracto. Se indica la posición de estándares de peso molecular.

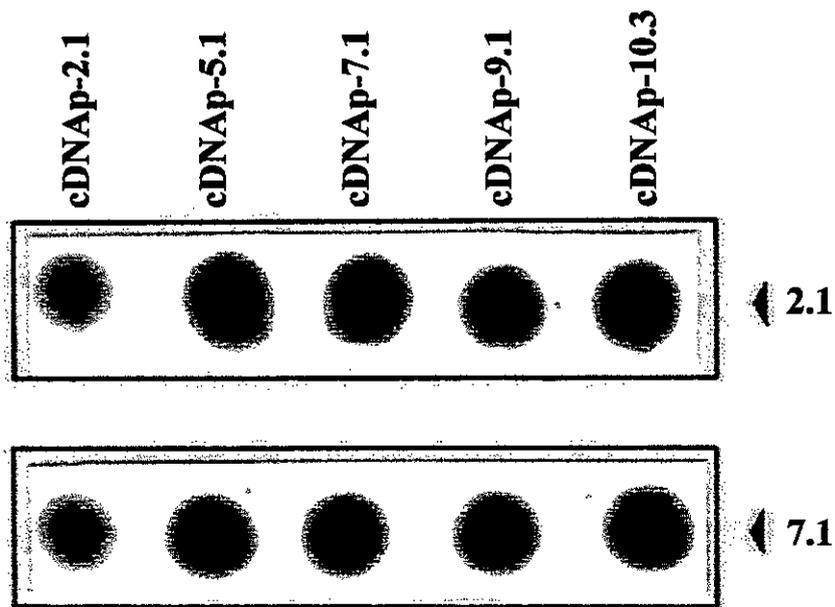


Figura 13: ANALISIS DE HIBRIDACION CRUZADA ENTRE LOS CLONES AISLADOS. El DNA plasmidial de los clones positivos (cDNAP-2.1, 5.1, 7.1 9.1 y 10.3) fue aislado, inmovilizado en membranas de nylon por la técnica de Dot blot y procesado de acuerdo con protocolos estándares (Sambrook, 1988). Los insertos contenidos en los vectores cDNAP-2.1 y cDNAP-7.1 fueron marcados con ^{32}P y utilizados para hibridar con el DNA plasmidial.

realizó un ensayo de hibridación cruzada. En este ensayo, los insertos contenidos en los plasmidios cDNAp-2.1 y cDNAp-7.1, fueron marcados radioactivamente y utilizados como sondas, en ensayos de *dot blot* con el DNA plasmidial de los clones recombinantes (Figura 13). El resultado de este análisis, junto con la secuenciación de los extremos 5' y 3', de cada uno de los insertos contenidos en los diferentes plasmidios, permitió confirmar que los cinco insertos de cDNA eran similares entre sí.

El plasmidio pBluescript SK(+/-), contiene un promotor inducible por IPTG, el cual dirige la expresión de una proteína recombinante. Esta propiedad del vector permitió expresar las proteínas recombinantes codificadas en cada uno de los insertos de los cinco clones aislados, y determinar su inmunoreactividad frente al anticuerpo DMAP.1. Para esto, extractos de bacterias crecidas en ausencia (Figura 14, carriles 1, 3, 5 y 7) y en presencia de IPTG 1mM (Figura 14, carriles 2, 4, 6 y 8) fueron analizados en ensayos de Western blots, utilizando el anticuerpo DMAP.1. Este experimento reveló que todas las proteínas recombinantes eran reconocidas por el anticuerpo DMAP.1, sugiriendo que los clones efectivamente contenían insertos que codifican para DMAP-85. La expresión basal de las proteínas recombinantes, en ausencia de IPTG, se debe a una ineficiente represión de la transcripción (ver Materiales y Métodos).

El siguiente paso en la caracterización de los clones positivos, consistió en subclonar uno de los insertos de cDNA en un vector que permitiera obtener mayores niveles de expresión de las proteínas recombinantes. Con este propósito, el inserto contenido en el vector cDNAp-5.1 fue subclonado en el vector de expresión pTrcHis, el cual presenta un promotor inducible por IPTG que dirige la expresión de una proteína recombinante fusionada con seis residuos extras de histidinas, en su extremo N-terminal. Este péptido de fusión permitió purificar la proteína recombinante en columnas de afinidad de Níquel-Sepharose. Una vez que las bacterias fueron transformadas con el vector pTrcHis y crecidas en presencia de IPTG, se procedió a lissarlas, obteniéndose un extracto proteico, el cual fue fraccionado (Figura 15, carril 1) y electrotransferido a membranas de PVDF. La incubación con el anticuerpo DMAP.1 reveló una única banda inmunoreactiva con un peso molecular estimado de 70 kDa

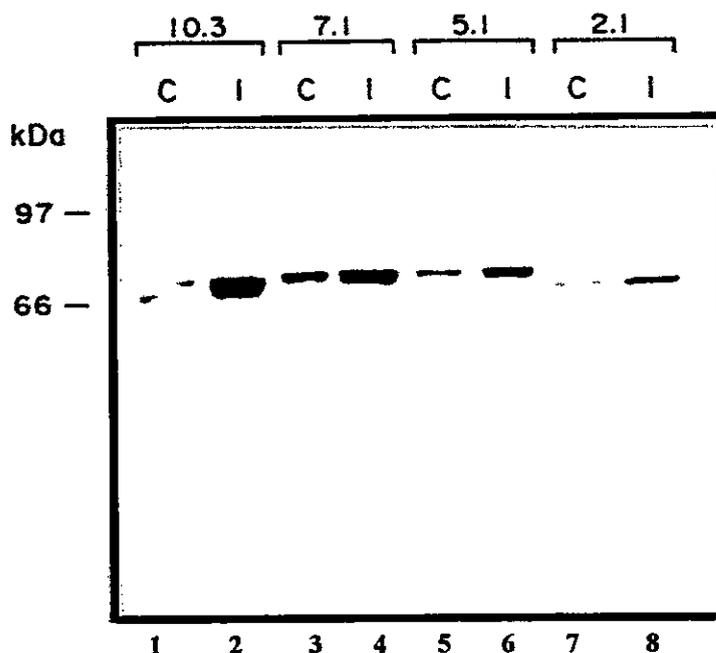


Figura 14: INMUNOREACTIVIDAD DEL ANTICUERPO DMAP.1 CON LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LOS CLONES AISLADOS. Las proteínas recombinantes codificadas en los insertos de los clones positivos (2.1, 5.1, 7.1 y 10.3) fueron inmunodetectadas, mediante ensayos de Western blots, con el anticuerpo DMAP.1 (dilución 1:500). Los carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a las proteínas presentes en extractos bacterianos provenientes de cultivos controles. Los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden a extractos provenientes de bacterias crecidas en presencia de IPTG. Se indica la posición de los estándares de peso molecular.

(carril 2), el cual corresponde al peso esperado para la proteína codificada en el inserto del vector cDNAp-5.1. Como control, extractos proteicos de bacterias transformadas con el vector, pero crecidas en ausencia de IPTG, fueron procesados de manera idéntica, y no se detectaron proteínas bacterianas inmunoreactivas con el anticuerpo DMAP.1 (carril 3). Los resultados mostrados en las Figuras 14 y 15, indican que las proteínas recombinantes, codificadas en los insertos de cDNA, son reconocidas por un anticuerpo específico para DMAP-85, el cual no presenta reacción cruzada con proteínas bacterianas.

En forma adicional se utilizó un segundo criterio para establecer la identidad de los insertos contenidos en los clones aislados. Para esto, el suero anti-DMAP-85 fue inmunoabsorbido con la proteína recombinante caracterizada en la Figura 15. En este experimento, la proteína recombinante, previamente purificada en columnas de Níquel-Sepharose, y un extracto de proteínas bacterianas fueron electrotransferidos a membranas de PVDF. Regiones de la membrana que contenían la proteína recombinante y regiones controles conteniendo proteínas bacterianas fueron incubadas con el suero de conejos inmunizados con DMAP-85. El fundamento de este experimento es que si anticuerpos diferentes a aquellos que reconocen a DMAP-85 fueran responsables del reconocimiento inmunológico de las proteínas recombinantes, entonces los anticuerpos purificados por afinidad con la proteína recombinante no deberían reconocer a DMAP-85. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 16, los anticuerpos inmunoabsorbidos con la proteína recombinante fueron utilizados en ensayos de Western blot con extractos de embriones (carril 1). Estos anticuerpos reconocieron sólo a DMAP-85 en los extractos (carril 2) y no se observó inmunoreactividad con aquellos anticuerpos purificados por afinidad con proteínas bacterianas (carril 3). De esta manera, se demuestra que los anticuerpos que reconocen a DMAP-85 son los mismos que reconocen a las proteínas recombinantes codificadas en los clones positivos del *screening* y sugieren fuertemente que estos clones contienen secuencias de cDNA que codifican para la proteína DMAP-85.

Una vez que la identidad de las proteínas recombinantes fue verificada

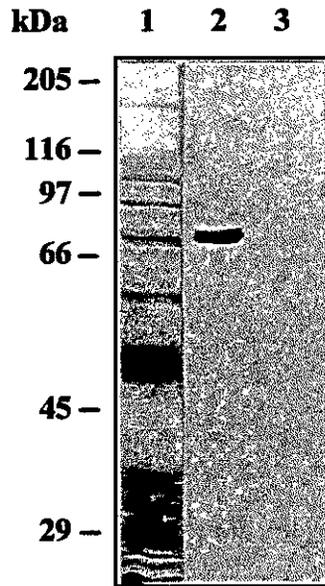


Figura 15: RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CODIFICADA EN EL INSERTO DEL VECTOR cDNAp-5.1. Extractos de bacterias crecidas en presencia de IPTG fueron fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de Coomassie (carril 1), o electrotransferidos a membranas de PVDF e inmunodetectados con el anticuerpo DMAP.1 (1:1000) (carril 2). Como control, extractos de bacterias crecidas en ausencia de IPTG fueron procesados de manera idéntica e incubados con el anticuerpo (carril 3). Se indica la posición de estándares de peso molecular.

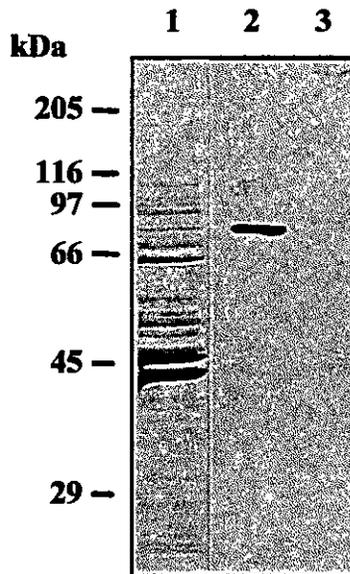


Figura 16: RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO DE DMAP-85 POR ANTICUERPOS INMUNOADSORBIDOS CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE. Extractos de embriones de 2 horas conteniendo DMAP-85 (carril 1) fueron electrotransferidos a membranas de PVDF e inmunodetectados con anticuerpos previamente purificados por afinidad con la proteína recombinante (dilución 1:750) (carril 2) o con proteínas bacterianas (dilución 1:750) (carril 3).

mediante criterios inmunológicos, se realizó la secuenciación del inserto contenido en el vector cDNAP-5.1 (cDNA 5.1). Este corresponde al inserto de mayor tamaño obtenido durante el *screening*. Al comparar el tamaño estimado para el mRNA de DMAP-85 (ver más adelante) con el tamaño del cDNA 5.1, se determinó que éste carecía de aproximadamente 0,5 Kb y que por lo tanto no contenía la totalidad de la región codificadora. Considerando que el cDNA 5.1 presenta una secuencia de consenso de poliadenilación en su extremo 3', se diseñó una estrategia, basada en el método de *nested* PCR (Gibbons y cols., 1991), para obtener el extremo 5' faltante. Con este propósito, se analizaron, mediante ensayos de amplificación por PCR, otras cuatro genotecas de cDNAs, las cuales correspondieron a: #1: genoteca expresión de cDNA de larvas de tercer estado en λ ZAPII; #2: genoteca expresión de cDNA de adultos en λ ZAPII; #3: genoteca de cDNA de adultos en λ gt10; y #4: genoteca de cDNA de larvas en λ gt10.

Inicialmente, se verificó que las cuatro genotecas contenían insertos del cDNA de DMAP-85. Para esto, se utilizaron partidores derivados de la secuencia del cDNA 5.1 en un ensayo de amplificación por PCR, y en tres de las genotecas analizadas (#1, #2 y #4) se obtuvo un producto del tamaño esperado. Utilizando la genoteca #1, como templado, se realizaron reacciones de amplificación con los siguientes partidores: (1) T3, derivado de una secuencia del vector pBluescript SK(+/-), utilizado en la construcción de la genoteca, y (2) PCR2, derivado una secuencia de la región 5' del cDNA 5.1 (Figura 17A). El objetivo era pesquisar en la genoteca, un inserto que presentara una región 5' de mayor longitud que la contenida en el cDNA 5.1. Como control, los mismos partidores fueron utilizados en la amplificación del cDNA 5.1, a partir del plasmidio cDNAP-5.1. El resultado obtenido se muestra en la Figura 17B, los partidores T3 y PCR2 amplificaron un único fragmento de 1100 pb utilizando como templado el cDNA de la genoteca #1 (carril 2) y un fragmento del tamaño esperado (500 pb) cuando el cDNAP-5.1 fue utilizado como templado (carril 3). Este resultado indicó que el fragmento de 1100 pb podría contener las 600 pb del extremo 5' faltante. El siguiente paso fue evaluar si existía una superposición de secuencias entre los

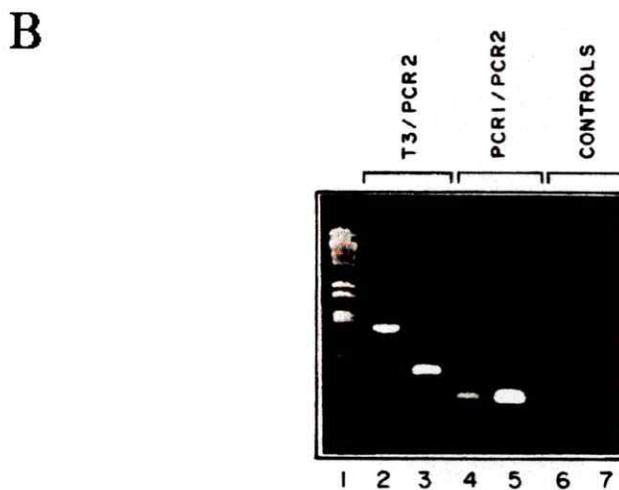
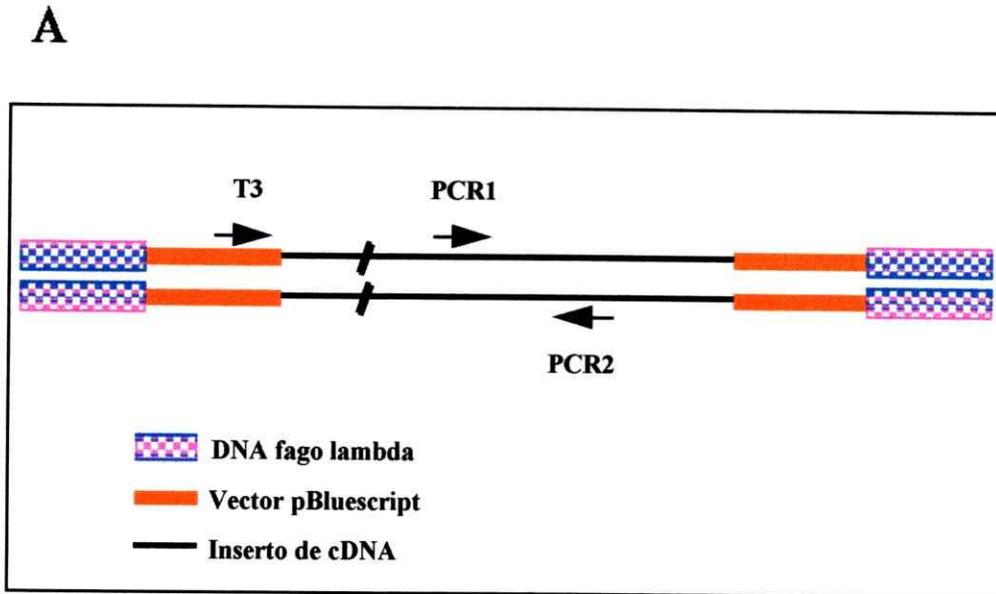


Figura 17: CLONAMIENTO DEL EXTREMO 5' DEL cDNA QUE CODIFICA PARA DMAP-85. **A:** Esquema de la estrategia utilizada para clonar el fragmento 5' de DMAP-85, a partir de una genoteca de cDNA en λ ZAPII. La secuencia previamente conocida del cDNA 5.1 fue utilizada para construir los partidores PCR1 y PCR2, mientras que T3 corresponde a un partidor derivado del vector utilizado en la construcción de la genoteca. **B:** Electroforesis en geles de agarosa al 1% mostrando los productos obtenidos en las reacciones de amplificación al utilizar como templado el DNA de la genoteca y los pares de partidores T3/PCR2 (carril 2) y PCR1/PCR2 (carril 4) y el cDNA 5.1 y los pares de partidores T3/PCR2 (carril 3) y PCR1/PCR2 (carril 5). Las reacciones controles realizadas en ausencia de templado y utilizando partidores no pareados, se muestran en los carriles 6 y 7, respectivamente. El estándar de peso molecular en el carril 1 corresponde a λ /HindIII.

fragmentos amplificados. Con este fin, se utilizó un partidor, PCR1, complementario con secuencias del extremo 5' del cDNA 5.1 y el partidor PCR2 (Figura 17A), los que amplificaron un fragmento único de 300 pb tanto en el cDNA 5.1 como en el cDNA de la genoteca #1 (Figura 17B, carriles 4 y 5), indicando que ambos cDNAs contenían secuencias comunes. El fragmento de 1100 pb fue purificado, a partir de geles de agarosa y subclonado en el sitio de restricción *Srf I* del vector pCR-ScriptTM SK(+) (Stratagene), generándose el vector pCR-N1100. Este fragmento fue secuenciado en ambas direcciones, lo que permitió confirmar que contenía regiones de superposición con la secuencia previamente determinada para el cDNA 5.1. Este resultado junto con la presencia de un codón de iniciación (ATG), en fase con un marco de lectura abierto, indicó que el fragmento de 1100 pb contenía el extremo 5' del cDNA que codifica para DMAP-85.

El inserto contenido en el vector pCR-N1100 fue aislado y subclonado en el vector cDNAp-5.1, para generar el vector pDMt (ver Materiales y Métodos), el cual contiene la totalidad del cDNA que codifica para DMAP-85. Una vez obtenido el vector pDMt, se compararon los patrones de digestión proteolítica de la proteína recombinante codificada en dicho vector y de la proteína nativa. En este experimento, fracciones conteniendo la proteína recombinante fueron obtenidas a partir de lisados de bacterias transformadas con el vector pDMt, y fracciones conteniendo la proteína nativa fueron obtenidas mediante cromatografía de afinidad, de extractos totales de embriones, en columnas de calmodulina-agarosa (Cambiazo y cols., 1995). Ambas fracciones fueron sometidas a una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y las bandas conteniendo las proteínas de interés fueron cortadas y aplicadas a un segundo gel de SDS-poliacrilamida al 15%, donde ocurre simultáneamente la digestión parcial con la endoproteinasa Lys-C y la separación electroforética de los péptidos (Cleveland, 1977). Los fragmentos proteolíticos fueron teñidos con azul de Coomassie para su visualización y comparación. En la Figura 18, se observa el alto grado de similitud de los patrones peptídicos generados por digestión parcial de la proteína recombinante (carril 1) y de la proteína nativa (carril 2). Este resultado indica que se trata de la misma



Figura 18: DIGESTION PARCIAL DE DMAP-85 NATIVA Y RECOMBINANTE. La proteína recombinante codificada en el vector pDMt (carril 1) y DMAP-85 nativa (carril 2) fueron digeridas parcialmente con la endoproteinasa Lys-C en una razón proteasa:proteína de 5%, según el protocolo descrito por Cleveland y cols. (1977). Los péptidos generados fueron fraccionados en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% y teñidos con azul de Coomassie. El carril 3 corresponde a un control que contiene únicamente la enzima.

proteína y confirma que el vector pDMt contiene la totalidad del cDNA de DMAP-85.

II.2. Secuencia nucleotídica completa del cDNA que codifica para DMAP-85 y secuencia aminoacídica deducida.

El cDNA de DMAP-85 (Figura 19) tiene 2.697 pares de bases de largo, un tamaño que coincide con aquel determinado, en ensayos de Northern blots, para el mRNA de DMAP-85 ($\cong 2.800$ pb). Cuando la primera metionina es utilizada como el sitio de inicio de la traducción, este cDNA codifica para un polipéptido de 740 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 83,4 kDa, la cual es similar al peso molecular de DMAP-85 obtenido en geles de SDS-poliacrilamida. La estrecha relación entre los valores deducidos a partir de la secuencia del cDNA y los valores observados tanto para el mensajero como para la proteína, confirman que el marco de lectura fue correctamente definido, en la secuencia nucleotídica del cDNA de DMAP-85.

El codón de iniciación se localiza en el nucleótido 133 y es precedido por la secuencia AAAA, la cual es semejante a la secuencia de consenso de iniciación de la traducción, presente en *D. melanogaster* (C/A, A, A, C/A; Cavener, 1987). El primer codón de terminación TGA se localiza en la posición 2.353 y es seguido por múltiples codones de terminación en los tres marcos de lectura. La región 3' no traducida consta de 352 nucleótidos y termina con un poli-A⁺ de 26 nucleótidos que es precedido por la secuencia AATAAA en posición 2.642, la cual es idéntica a la secuencia de consenso que define la señal de poliadenilación (Proudfoot y Brownlee, 1982).

ATT	CGG	CAC	GAG	GTC	GTA	ACA	ACA	AGC	AGC	GTC	TGA	AAA	GTT	TTG	TGA	ATT	TCC	AAT	TCT	60
ATA	CAA	AGC	AAA	GTG	AAA	ATA	TCT	GTA	TTT	TTA	CCT	TTA	ITC	TGT	GAA	TAG	AAC	GAA	AAA	120
CAT	ACA	TAC	AAG	ATG	CCA	GAA	GAA	GCA	GAG	ACC	TTT	GCA	ITC	CAG	GCT	GAG	ATT	GCT	CAG	180
M P E E A E T F A F Q A E I A Q																				
CTG	ATG	TCC	CTG	ATC	ATC	AAC	ACA	TTC	TAC	TCG	AAC	AAG	GAG	ATT	TTC	CTG	CGC	GAG	TTG	240
L	M	S	L	I	I	N	T	F	Y	S	N	K	E	I	F	L	R	E	L	36
ATC	TCG	AAC	GCT	TCC	GAT	GCC	CTG	GAC	AAG	ATC	CGC	TAT	CAG	TCC	CIT	ACT	GAC	CCC	AGC	300
I	S	N	A	S	D	A	L	D	K	I	R	Y	Q	S	L	T	D	F	S	56
AAG	CTG	AAC	TCT	GCC	AAG	AAG	CTG	TAC	ATC	AAG	CTG	ATC	CCT	AAC	AAG	ACG	GCT	GGT	TAC	360
K	L	N	S	G	K	K	L	Y	I	K	L	I	P	N	K	T	A	G	Y	76
GTG	ACC	GTG	AAC	GTG	ACC	GGT	ATC	ACC	ACC	TGG	TCC	GAC	GGT	GTG	GCT	TTC	GGA	ACC	420	
V	T	V	N	V	T	G	I	T	T	T	W	S	D	G	V	A	F	G	T	96
ATC	GCC	AAG	TCC	GCA	CCC	GAC	CTG	GTC	GCC	ITC	ATG	GAG	GCT	CTG	CAG	GCT	GGT	GCC	ACA	480
I	A	K	S	A	P	D	L	V	A	F	M	E	A	L	Q	A	G	A	T	116
TTT	CCA	CGA	TCG	ATC	AGT	TCG	GGT	TTC	IAC	TCC	GCC	TAC	CTG	GTC	GCC	GAC	AAG	GTG	540	
F	P	R	S	V	S	S	V	G	F	Y	S	A	Y	L	V	A	D	K	V	136
ACT	GTG	ACC	TCC	AAG	AAC	AAC	GAT	GAC	GAG	CAG	TAC	GTT	GTG	GAG	TCC	TCT	GCC	GGA	GCT	600
T	V	T	S	K	N	N	D	D	E	Q	Y	V	V	E	S	S	A	G	A	156
ITC	ACA	GTG	CGT	GCC	GAC	AAC	TCT	GAG	CCC	CTG	GGC	GTG	GCA	CCA	AGA	TCT	GTC	TGT	ACA	660
F	T	V	R	A	D	N	S	E	P	L	G	V	A	P	R	S	V	C	T	176
TCA	AGG	AGG	ACC	AGA	CCG	ACT	ATC	TGG	AGG	AGA	GCA	AGA	TCA	AGG	ACA	TTG	TTA	ACA	AGC	720
S	R	R	T	R	P	T	I	W	R	R	A	R	S	R	T	L	L	T	S	196
ACT	CCC	AGT	TCA	TTG	GCT	ACC	CCA	CTA	AGC	TGC	TCG	AAG	AGA	AGG	AGC	GCG	AGA	AGG	AGG	780
T	P	S	L	A	T	P	L	S	C	S	K	R	R	S	A	R	R	R	R	216
TCA	GCG	ACG	ATG	AGG	CTG	ATG	ATG	AGA	AGA	AGG	AAG	GTG	ATG	AGA	AGA	AGG	AGA	TTG	AGA	840
S	A	T	M	R	L	M	M	R	R	K	V	M	R	R	R	R	R	R	V	236
CTG	ATG	AGC	CCA	AAA	TCG	AGG	ATG	TTT	GCA	GGA	CGA	GGA	ITC	CGA	CAA	GAA	GGA	CAA	GGA	900
L	M	S	P	K	S	R	M	F	A	G	R	G	F	R	Q	E	G	Q	G	256
ITC	CAA	GAA	GAA	GAA	GAC	CAT	CAA	GGA	GAA	GTA	CAC	CGA	GAA	CGA	GGA	GCT	GCA	CAA	GAC	960
F	Q	E	E	E	D	H	Q	G	E	V	H	R	E	R	G	A	A	Q	D	276
CAA	GCC	CAT	CTG	GAC	CCG	CAA	TCC	GAT	GAT	ATC	TTC	CAG	GAG	GAG	TAC	TGC	CAG	ITC	TAC	1020
Q	A	H	L	D	P	Q	D	D	I	F	Q	E	Y	C	Q	F	Y			296
AAA	ITC	CTG	ACC	AAC	GAC	TGG	GAG	GAT	CAT	CTG	GCC	GTG	AAG	CAC	ITC	TCC	GTG	GAG	GTG	1080
K	F	L	T	N	D	W	E	D	H	L	A	V	K	H	F	S	V	E	V	316
AGC	TGG	AGT	TCC	GTG	ATA	TGC	TCT	TCA	ITC	CCC	GTG	GCA	CGC	CCT	TCG	ATC	TCT	TTG	AGA	1140
S	W	S	S	V	I	C	S	S	F	P	V	A	R	P	S	I	S	L	R	336
ACC	AGA	AGA	AGC	GCA	ACA	ACA	TCA	AGC	TGT	ACG	TGC	GTG	TCT	TCA	TCA	TGG	ACA	ACT		1200
T	R	R	S	A	T	T	S	S	C	T	C	V	V	S	S	S	W	T	T	356
GCG	AGG	ACC	TCA	TTT	CAG	AGT	ACT	CGA	ACT	TCA	CGA	AGG	GTG	TGG	TCG	ACT	CCG	AGG	ATC	1260
A	R	T	S	F	Q	S	T	R	T	S	R	R	V	W	S	T	P	R	I	376
ITG	CCC	TCT	ACA	TCT	CAC	GTG	AGA	TGC	TGC	AGC	AGA	ACA	AGG	TCC	TAT	AGC	CGA	TCC	GCA	1320
C	P	S	T	S	H	V	R	C	C	S	R	T	R	S	Y	S	R	S	A	396
AGA	ACC	TGG	TCA	AGA	AGA	CCA	TGG	AGC	CGA	TTG	ACG	AGC	TCA	CCG	AGG	ACA	AGG	AGA	ACT	1380
R	T	W	S	R	R	P	W	S	R	L	T	S	S	P	R	T	R	R	T	416
ACA	AGA	AGT	TCT	ATG	ACC	AGT	TCA	GCA	AGA	ACC	CGA	AGC	TGG	GTG	TGC	ACG	AGG	ACA	GCA	1440
T	R	S	S	N	T	S	S	A	R	T	R	S	W	V	C	T	R	T	A	436
ACA	ACC	GTG	CCA	AGT	TGG	CCG	ACT	TCC	ITC	GTT	CCA	CAC	CTT	CTG	CCT	CCG	CGA	CGA	TTT	1500
T	T	V	P	S	W	P	I	S	F	V	P	H	L	L	P	P	R	R	F	456
CTG	CTC	CCT	GGA	CCG	ACT	ACG	TGT	CGC	GCA	TGG	AGG	ATA	ACC	AGA	AGC	ACG	TGT	ACT	TCA	1560
L	L	P	G	P	T	T	C	R	A	W	R	I	T	R	S	T	C	T	S	476
TCA	CTG	GCG	AGT	CCA	AGG	ACC	AGG	TCA	GCA	ACT	CTG	CCT	TCG	TGG	AGC	GCG	TCA	AGG	CCC	1620
S	L	A	S	P	R	T	R	S	A	T	L	P	S	W	S	A	S	R	P	496
GTG	GTT	CGA	GGT	GGT	CTA	CAT	GAC	CGA	GCC	CAT	CGA	CGA	GTA	TGT	CAT	CCA	GCA	CTT	GAA	1680
V	R	G	G	L	H	D	R	A	H	R	R	V	C	H	P	A	L	E		516
GGA	GTA	CAA	GGG	CAA	GCA	GCT	GGT	CTC	TGT	CAC	CAA	GGA	GGG	TCT	GGA	GCT	GCC	CGA	GGA	1740
G	V	Q	G	Q	A	A	G	L	C	H	Q	G	G	S	G	A	A	R	G	536
CGA	GAG	CGA	GAA	GAA	GAA	GCG	GCG	GGA	GGA	CAA	GGC	CRA	GTT	CGA	GAG	CCT	GTG	CAA	GCT	1800
R	E	R	E	E	A	R	G	G	Q	G	Q	V	R	E	P	V	Q	A		556
GAT	GAA	GTC	CAT	CCT	GGA	CAA	CAA	GGT	CGA	GAA	GGT	GGT	GGT	GTG	CAA	CCG	CCT	GGA	ITC	1860
D	E	V	H	F	G	Q	Q	G	R	E	G	G	G	V	Q	P	P	G	F	576
GCC	CTG	CTG	CAT	TGT	CAC	ITC	GCA	GTT	CGG	CTG	GTC	CGC	TAT	CAT	GGA	GCG	CAT	CAT	GAA	1920
A	L	L	H	C	H	F	A	V	R	L	V	R	Y	H	G	A	H	H	E	596
GGC	CCA	GGC	TCT	GCG	GCA	TAC	CGC	CAC	AAT	GGG	CTA	CAT	GGC	CGG	CAA	GAA	GCA	GCT	GGA	1980
G	P	G	S	A	R	Y	R	H	N	G	L	H	G	R	Q	E	A	A	G	616
GAT	CAA	CCC	CGA	TCA	CCC	AAT	TGT	GGA	GAC	TCT	CCG	CCA	GAA	GGC	CGA	TGC	GAC	AAG	AAC	2040
D	Q	P	R	S	P	N	C	G	D	S	P	P	E	G	R	C	D	K	N	636
GAT	AAG	GCC	GTG	AAG	ATC	TGG	TCA	TCC	TGC	TGT	TCG	AGA	CCT	CTC	TGT	TGT	CCT	CTG	GAT	2180
D	K	A	V	K	I	W	S	S	C	C	S	R	P	L	C	C	P	L	D	656
TCT	CGC	TGG	ACA	CCC	AGG	TGC	AGC	CCA	GCC	GCA	TGT	ACC	GCA	CGA	TCA	AGC	TGG	GCT		2160
S	R	W	T	A	P	R	C	T	P	A	A	C	T	A	R	S	W	A		676
TGG	AAT	CGA	CGA	GGA	GCA	GCC	TAT	GAC	TAC	CGA	CGA	TGC	CCA	GAG	CCC	CGG	AGA	TGC	CCC	2220
W	N	R	R	G	R	A	Y	D	Y	R	R	C	P	E	P	R	R	C	P	696
CCT	CGC	TGG	TTG	AGG	ACA	CCG	AGG	ACG	CIT	CCA	CAT	GAG	GAG	GTG	GAT	CAG	CAC	AGT	CGA	2280
P	R	W	L	R	T	P	R	T	L	P	H	E	E	V	D	Q	H	S	R	716
AAC	AAA	CAA	CCA	AAA	TTT	ATT	CTA	TCA	CTC	GCA	ITC	ACA	TAC	ACA	ATT	TAC	TTG	CGT	TTG	2340
N	K	Q	P	K	F	I	L	S	L	A	F	T	Y	T	I	Y	L	R	L	736
CAA	CIT	TIA	TAC	TGA	GTT	TAC	TAC	GCC	CGA	GTT	AAA	TTT	TGT	ATT	CAT	TAA	CAT	TTT	GCC	2400
Q	L	L	Y	*																740
GCG	TIA	TAA	GCG	ACA	GAC	ATA	CGC	TIA	ACT	CAT	AAA	AAA	GCA	GGA	ATA	ACT	CGT	TAA	ATG	2460
GTT	AGG	TTT	TCA	CAG	AAC	ATT	CAA	GAG	CAG	TTG	TCG	TTT	TAA	GAA	CIT	ATA	ATT	TAG	AAT	2520
CCA	AGT	AAT	TIA	TGT	AAA	AAA	CTA	AAG	ACT	ACA	TAC	CCG	CCC	TAG	TTG	GTA	GAG	CTA	TAT	2580
AAA	GAA	TCG	AAG	TAT	ATA	TAT	AAT	TAA	GGT	GAT	GAC	CCG	ATC	GAT	GAT	AAA	CAT	AAA	ACC	2640
AAA	TAA	ACA	ACA	AGC	AAA	TGT	GTT	TIA	AAA	TCT	AAA	AA	2697							

Figura 19: SECUENCIA NUCLEOTÍDICA COMPLETA Y SECUENCIA AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE DMAP-85. La numeración de la secuencia nucleotídica (1-2.762) y de la aminoacídica (1-740), se indican a la derecha. Las nucleotidos coloreados corresponden a: sitio de consenso de iniciación de la traducción (azul) y señal de adición de poliadenilación (verde). El asterisco señala el primer codón de término.

II.3. Análisis de la secuencia aminoacídica de DMAP-85.

Con el propósito de establecer una posible similitud, en el ámbito de la secuencia primaria, entre DMAP-85 y otras proteínas de secuencia conocida, se realizó una búsqueda en bancos de datos (GenBank y SWISS-PROT), utilizando los algoritmos FASTA y BLASTP. El análisis indica que DMAP-85 no presenta una similitud significativa tanto con MAPs como con otras proteínas de secuencias conocidas. Por otra parte, para detectar posibles sitios de modificaciones post-traduccionales, la secuencia aminoacídica de DMAP-85 fue analizada utilizando el banco de datos PROSITE. Este análisis reveló que DMAP-85 posee numerosos sitios de consenso de fosforilación para la actividad de diferentes proteínas quinasas: (1) proteína quinasa dependiente de cAMP (en 3 posiciones), (2) proteína quinasa C (en 20 posiciones), (3) caseína quinasa (en 3 posiciones), y (4) tirosina quinasa (en una posición) (Figura 20). En forma complementaria, se realizó una predicción de la estructura secundaria de DMAP-85, utilizando el sistema de redes neurales descrito por Rost y Sanders. (1993; 1994) y Rost y cols. (1994), a través de un servidor automático. Estos análisis revelaron que la estructura primaria de DMAP-85 da lugar a una proteína principalmente hidrofílica, con regiones dispersas y poco extensas de α -hélices (L) y β -plegadas (E) (Figura 21). A excepción de la región N-terminal de la proteína la cual presente una alta probabilidad de adoptar una conformación de α -hélice, esto se encuentra indicada por los altos valores del índice de confiabilidad de la predicción (Rel sec). Una predicción de todos los residuos de la proteína (SUB sec) señala que regiones importantes de ésta, especialmente en el extremo C-terminal, carecen de una conformación definida (L).

Si bien DMAP-85 no presenta similitud de secuencia global o similitud en dominios funcionales con otras MAPs, comparte con éstas su organización estructural en cuanto a la presencia de dominios ácidos y básicos. La proteína DMAP-85 es fuertemente básica, con un pI calculado de 10,1. Sobre la base de su distribución de cargas, la proteína puede ser dividida en: un dominio ácido N-terminal (aminoácidos

MPEEAETFAFQAEIAQLMSLIINTFY SNKE IFLRELISNASDALDKIRYQ	50
SLTDPSKLN SGK KLYIKLIPN KTAGYVTVNVTGITTTWSDGVAFGTIAKS	100
APDLVA MEALQAGATFPRSVSSVGFYSAYLVADKVTVT SKNNDDEQYV	150
ESSAGAFTVRADNSEPLGVAPRSVCT SR TRPTIWRRARSRLLTSTPSS	200
LATPLSC SKRRSARRRS ATMRLMMRRRKVMRRRRWRLM PKSRMFAGRGF	250
RQEGQGFQEEEDHQGEVHRERGA AQDQAHLDPQSDDI FQEEYCQFYKFLT	300
NDWEDHLAVKHFSVEVSWSSVICSSFPVARPSI SLRTRRSATTSSCTCVV	350
SSSWT TARTSFQ STRTSRRVWS TPRICPSTSHVRCCSRTRSYSR SARTWS	400
RFPWSRLTSSPRTRRTT RSMTSSARTWS WVCTRTATTVPSPWPTSFVPHL	450
LPPRRFLLPGPTTCRAWRITRSTCTSSLASPRTRSATLPSWSASRPVVRG	500
GLHDRAHRRVCHPALEGVQQAAGLCHQGGSGAARGREREREARGGQGV	550
REPVQADEVHPGQGGREGGGVQPPGFALLHCHFAVRLVRYHGAAHEGPG S	600
AFYRHNGLHGRQEAAGDQPRSPNCGD SPPE GRCDKNDKAVKIWSSCCSRP	650
LCCPLDSRWTAPRCTPAACT AR SSWAWNRRGRAYDYRRCPEPRRCPPRWL	700
RTPRTLPH EEVDQHSRNKQPKFILSLAFTYTYLRLQLLY	740

- proteína quinasa dependiente de cAMP
- proteína quinasa C
- caseína quinasa II
- tirosina quinasa
- posible sitio de unión a actina
- secuencias repetidas

Figura 20: SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA PROTEÍNA DMAP-85.

Se indican los sitios de consenso de fosforilación para: proteína quinasa dependiente de cAMP, proteína quinasa C, caseína quinasa II y tirosina quinasa, así como la secuencia que representa un posible sitio de unión a actina. Los pares de secuencias repetidas, localizadas entre los aminoácidos 215-484, se encuentran subrayados.

1-160) el cual presenta un pI estimado de 5,3, una corta región básica (aminoácidos 161-240) con un pI de 12,5, un segmento ácido de 80 residuos (aminoácidos 241-320, pI 4,8) y un dominio C-terminal básico (aminoácidos 321-740) con un pI estimado de 10.8. Esta organización de DMAP-85 en dominios ácidos y básicos se ha esquematizado en la Figura 22, en la cual también se muestra una comparación con la proteína tau. Cabe destacar que en la mayoría de las MAPs descritas a la fecha, el dominio de unión a MTs se encuentra en una región básica y consiste de secuencias aminoacídicas repetidas. En el caso de DMAP-85 existen tres pares de repeticiones de 5, 6 y 10 aminoácidos, ubicados exclusivamente en las regiones básicas de la proteína. Estos pares de secuencias repetidas se localizan, de manera alternada, a lo largo de 269 residuos de esta proteína (Figuras 20 y 22),

Finalmente, la secuencia aminoacídica de DMAP-85 fue también analizada utilizando el banco de datos Blocks Database Version 9.3 (Henikoff y Henikoff , 1991), el cual permite detectar segmentos de regiones funcionales, que caracterizan a familias de proteínas. Esta búsqueda reveló que DMAP-85 presenta un dominio comprendido entre los residuos 73 y 107, el cual posee un 59% de identidad y un 76% de similitud con el dominio de unión a actina presente en varias ABPs (Figura 23). La presencia de este dominio de unión a actina es particularmente interesante, considerando que experimentos de localización subcelular y ensayos de unión a actina *in vitro*, han revelado que DMAP-85 es capaz de asociarse con el citoesqueleto de actina (ver más adelante).

II.4. Análisis del gen *dmap-85* mediante Southern blots e hibridaciones *in situ*.

Con el fin de generar una sonda apropiada para realizar los ensayos de Southern blot, se construyeron dos partidores derivados de secuencias del extremo 5' del cDNA 5.1. Estos partidores fueron utilizados para amplificar, mediante PCR, el DNA genómico de *D. melanogaster* y el inserto del plasmidio cDNAp-5.1. En ambos casos, se detectó un único producto de amplificación de 300 pb, lo cual indica que el DNA genómico no presenta intrones en la región amplificada. El fragmento amplificado, fue purificado a partir de geles de agarosa, marcado radioactivamente y utilizado en ensayos Southern blots. En estos ensayos, el DNA genómico fue digerido con diferentes enzimas de restricción, que no presentan sitios de corte en el fragmento utilizado como sonda (Figura 24). Claramente, una única banda de hibridación fue detectada en cada caso (carriles A, B, C, D), sugiriendo fuertemente que sólo una copia del gen que codifica para DMAP-85 se encuentra presente en el genoma de *D. melanogaster*.

Utilizando una sonda derivada del cDNA 5.1, se realizó un ensayo de hibridación *in situ* en cromosomas politénicos, el cual permitió definir la localización cromosómica del gen *dmap-85*, en el intervalo citogenético 63C (03-04) (Figura 25). Este resultado, además, permitió confirmar que DMAP-85 es codificada por un gen de copia única.

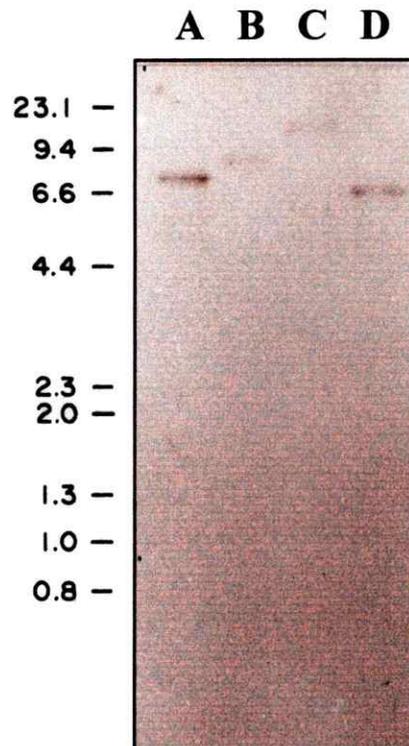


Figura 24: ANALISIS DE SOUTHERN BLOT GENOMICO. Un fragmento del cDNA 5.1 fue marcado radioactivamente y utilizado como sonda para hibridar con 20 µg de DNA genómico digerido con las enzimas de restricción: EcoRI (carril A), Hind III (carril B), Bam HI (carril C) y Bgl II (carril D). El tamaño de los estándares está indicado en kilobases.

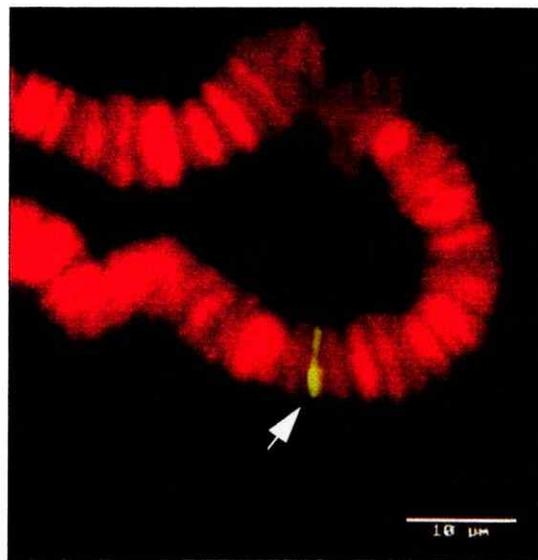


Figura 25: HIBRIDACION *in situ* EN CROMOSOMAS POLITENICOS DE *D. melanogaster*. La flecha indica el único sitio de hibridación del cDNA 5.1, en la región 63C del cromosoma 3. Barra = 10 µm.

II.7. Identificación en DMAP-85 de los dominios responsables de su interacción con MTs

Con el propósito de definir la(s) región(es) de DMAP-85 que participa(n) en su asociación con MTs, se generaron proteínas recombinantes truncadas, mediante la expresión, en bacterias, de fragmentos del cDNA de DMAP-85. Para cada una de las proteínas recombinantes, se analizó su capacidad de unión a MTs en ensayos de *overlay*. En este experimento, se construyeron tres vectores: (1) pDM-2, que dirige la expresión de un polipéptido que carece del extremo N-terminal de la proteína, con un peso molecular estimado de 71,0 kDa; (2) pDM-1, que dirige la expresión de un polipéptido de 45,5 kDa, el cual carece de 369 aminoácidos del extremo C-terminal de DMAP-85 y (3) pDM-10, que dirige la expresión de un polipéptido de 75,8 kDa, que carece de 97 residuos del extremo C-terminal de la proteína (Figura 26). Estos vectores fueron utilizados para transformar cepas de *E. coli*, las cuales fueron crecidas en presencia de IPTG, para inducir la expresión de las diferentes proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes codificadas en los vectores pDM-1 y pDM-10 fueron parcialmente purificadas mediante cromatografía de afinidad en columnas de Níquel-Sepharose y la proteína codificada en el vector pDM-2 fue solubilizada a partir de cuerpos de inclusión. Las tres proteínas recombinantes fueron reconocidas por el anticuerpo DMAP.1 (Figura 27, carriles 1, 2 y 3), en ensayos de Western blots, indicando que corresponden a diferentes fragmentos de la proteína DMAP-85. Por el contrario, no se detectó reacción del anticuerpo con proteínas presentes en un extracto de bacterias crecidas en ausencia de IPTG, como se observa en el carril 4, el cual corresponde a un extracto de bacterias transformadas con el vector pDM-1. Las proteínas recombinantes codificadas en los vectores pDM-1 y pDM-10 migran más lento de lo esperado, de acuerdo con sus pesos moleculares estimados, posiblemente debido a la presencia de seis residuos de histidina en su extremo N-terminal. En cambio, la proteína codificada en el vector pDM-2, al carecer de la secuencia de histidinas presenta el patrón esperado de migración.

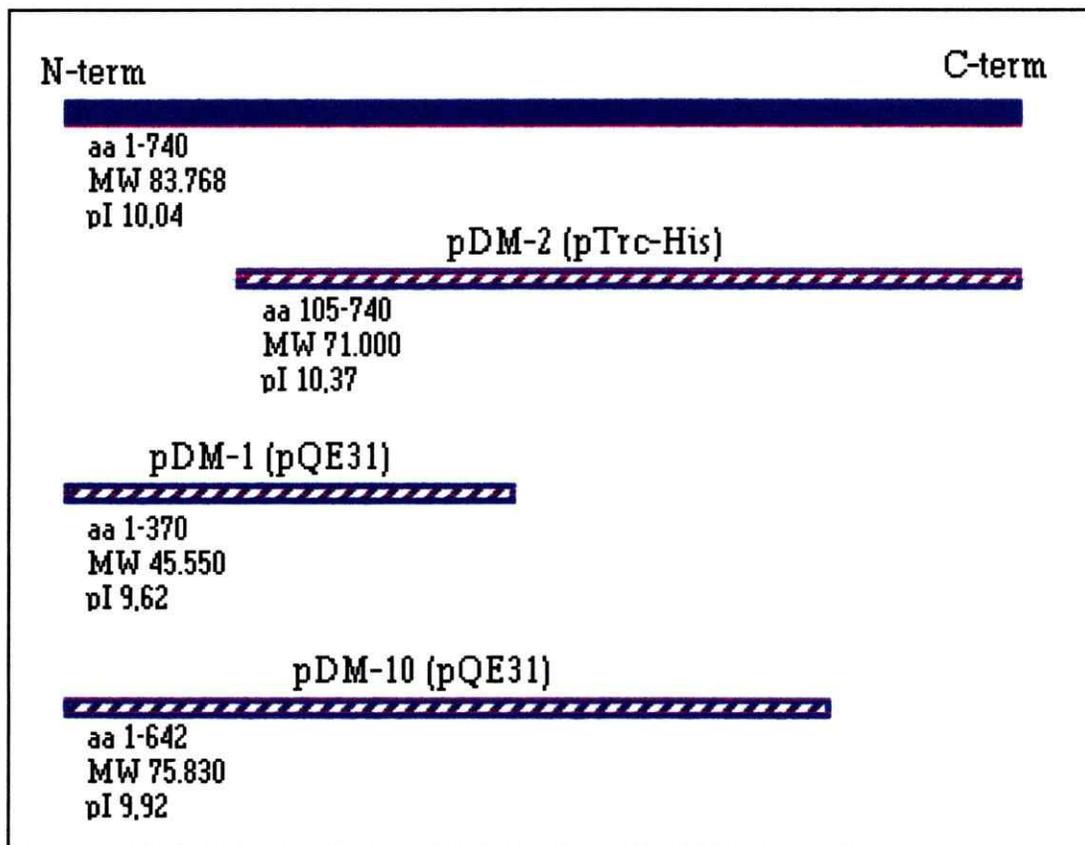


Figura 26: ESQUEMA DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN *E. coli*. Se indican los residuos de DMAP-85 (aa) contenidos en las diferentes proteínas recombinantes, el peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y el vector que dirige su expresión.

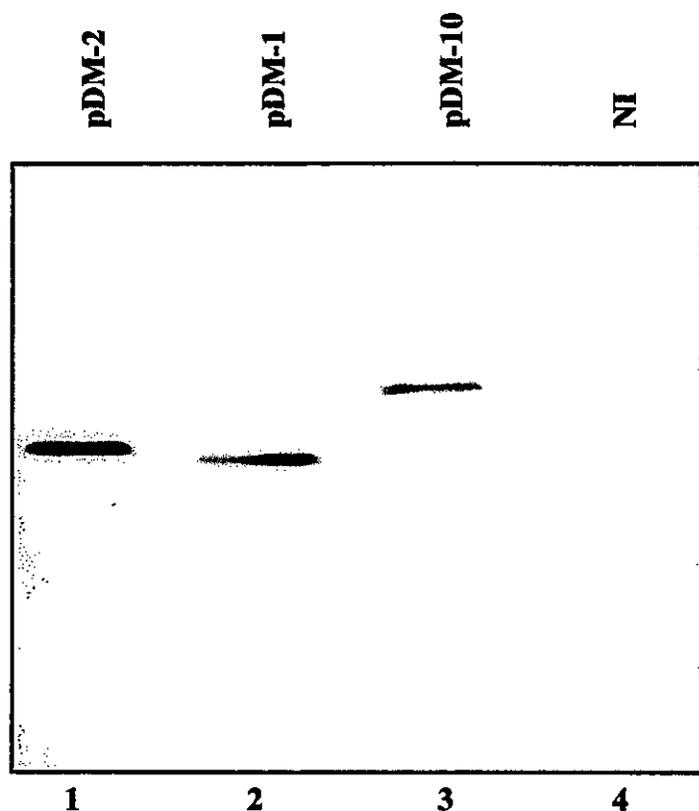


Figura 27: INMUNOREACTIVIDAD DEL ANTICUERPO DMAP.1 CON LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES TRUNCADAS. Las proteínas recombinantes fueron parcialmente purificadas, fraccionadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 7,5% y analizadas en ensayos de Western blot con el anticuerpo DMAP.1. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a las proteínas recombinantes codificadas en los vectores pDM-2, pDM-1 y pDM-10, respectivamente. Como control de la especificidad en el reconocimiento inmunológico, extractos de bacterias crecidas en ausencia de IPTG fueron incubados con el anticuerpo (carril 4).

Con el interés de identificar en DMAP-85 una región responsable de su unión a MTs, se realizaron ensayos de overlay. En estos, las proteínas recombinantes truncadas (1,2 μ g) fueron fraccionadas en geles de SDS-poliacrilamida y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas con MTs estabilizados con taxol, y la unión de estos MTs a proteínas adsorbidas en las membranas fue detectada mediante ensayos de Western blots, utilizando un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina. Como se observa en la Figura 28, los MTs se unen a las proteínas recombinantes codificadas en los vectores pDM-10 (carril 1) y pDM-2 (carril 2). Estas proteínas recombinantes carecen, respectivamente, de 100 residuos de los extremos C-terminal y N-terminal de DMAP-85. En estas condiciones, no se observó unión de los MTs a la proteína codificada por el vector pDM-1, la cual carece de 369 aminoácidos del extremo C-terminal de DMAP-85 (carril 3). Este resultado permitió definir una región de 272 aminoácidos necesaria para la unión de DMAP-85 a los MTs (ver Figura 26). Como un control de la especificidad de la unión de los MTs a las proteínas recombinantes, las bacterias transformadas con el vector pDM-2, fueron crecidas en ausencia de IPTG y procesadas de manera idéntica a la descrita anteriormente. En este caso no se detectó unión de los MTs a proteínas presentes en este extracto bacteriano (carril 4), indicando que esta unión depende de la presencia de las proteína recombinantes.

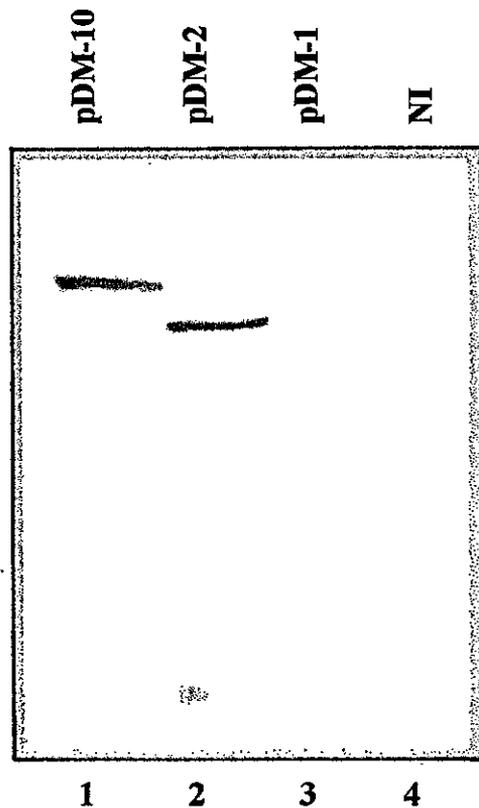


Figura 28: ENSAYO DE UNIÓN DE MTs A PROTEÍNAS RECOMBINANTES TRUNCADAS. Las proteínas recombinantes codificadas en los vectores pDM-10 (carril 1), pDM-2 (carril 2) y pDM-1 (carril 3), y extractos de bacterias crecidas en ausencia de IPTG (carril 4), fueron fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y electrotransferidos a membranas de PDVF, donde fueron incubados con tubulina polimerizada. Los MTs que se unieron a las proteínas inmovilizadas fueron detectados mediante Western blots con un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (dilución 1:1000).

III. EXPRESION Y DISTRIBUCION SUBCELULAR DE DMAP-85 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

III.1. Análisis de la expresión temporal de DMAP-85 y de su RNA mensajero durante el desarrollo de *D. melanogaster*.

El patrón de expresión temporal del mRNA' que codifica para DMAP-85, fue analizado en ensayos de Northern blots. Para esto, el cDNA 5.1 fue marcado radioactivamente y utilizado como sonda para hibridar con poli A⁺ RNAs, obtenidos a partir de embriones de 12 horas, larvas de tercer estado y adultos de *D. melanogaster*. Los resultados indicaron la presencia de un único transcrito de aproximadamente 2,8 Kb, en todos los estados de desarrollo (Figura 29), sugiriendo que no existen variantes de este mensajero, generados por corte y empalme alternativo. Además, la similitud en la intensidad relativa de las bandas positivas, indica que no existirían variaciones en el nivel de expresión del mensajero, en los estados analizados. En forma complementaria, se examinó la expresión de la proteína DMAP-85, en las diferentes etapas del desarrollo de *D. melanogaster*, mediante ensayos de Western blot con el anticuerpo DMAP.1. Estos ensayos revelaron que la proteína se encuentra presente desde los primeros estados del desarrollo embrionario, en larvas de tercer estado y en adultos de *D. melanogaster*. Un análisis densitométrico de las bandas de DMAP-85, indicó que la abundancia de esta proteína es ligeramente superior en embriones de 12 a 20 horas y en adultos (Figura 30).

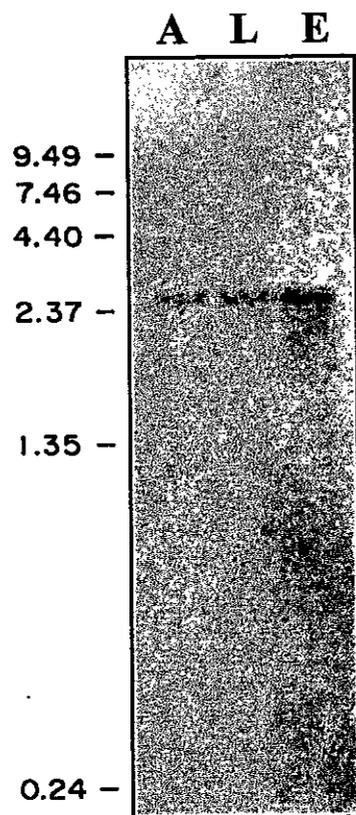


Figura 29: EXPRESIÓN DEL mRNA DE DMAP-85 DURANTE EL DESARROLLO DE *D. melanogaster*. El cDNA 5.1 fue marcado radioactivamente con [32 P] e hibridado, en ensayos de Northern blots, con 2 μ g de poli A⁺ RNA de adultos (A), larvas de tercer estado (L) y embriones de 12 h (E).

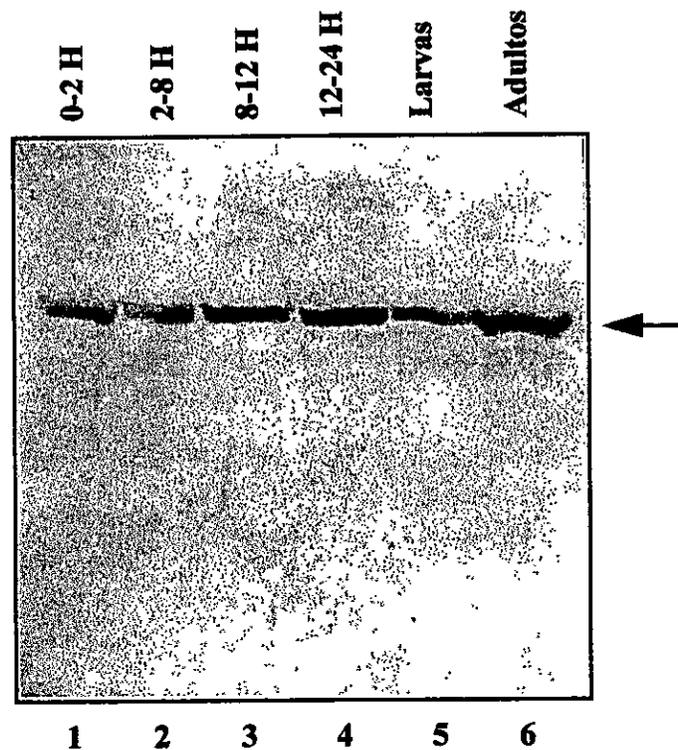


Figura 30: ANALISIS DE LA PRESENCIA DE DMAP-85 DURANTE EL DESARROLLO DE *D. melanogaster*. Extractos totales de: Embriones de 0-2 (carril 1), 2-8 (carril 2), 8-12 (carril 3) y 12-20 horas (carril 4), larvas de tercer estado (carril 5) y adultos (carril 6) fueron obtenidos como se describe en Materiales y Métodos. Los extractos fueron sometidos a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, electrotransferidos a membranas de PVDF y analizados mediante Western blots, utilizando el anticuerpo DMAP.1 (dilución 1:1000). La flecha indica la posición de la proteína DMAP-85.

III.2. Análisis de la distribución espacial de DMAP-85 durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* y su relación con MTs y MFs.

Los resultados de la distribución espacial de DMAP-85, se han ordenado según los siguientes estados del desarrollo embrionario: 1) blastodermo sincicial, 2) blastodermo celular, 3) gástrula, 4) postgástrula (estados 8 y 10) y 5) embriones de estado 15. Esta clasificación se basa en el hecho de que durante estos estados se observaron las mayores variaciones en el patrón de distribución de DMAP-85. Los análisis de inmunocitoquímica realizados en estos estudios se basaron en el uso del anticuerpo DMAP.1 y/o anticuerpos dirigidos contra otras proteínas del citoesqueleto.

Como se mencionó en la Introducción, durante los primeros estados del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, los núcleos experimentan 13 divisiones sincronizadas y rápidas, que conducen a la formación de un blastodermo sincicial. Durante estas 13 divisiones nucleares el citoesqueleto experimenta una serie de reorganizaciones cíclicas, en ausencia de citocinesis (esquemático en Figura 3 y revisado en: Schejter y Wieschaus, 1993a). Mediante ensayos de inmunofluorescencia simple y doble, examinamos tanto la distribución de DMAP-85, como la de MTs y MFs en el estado de blastodermo sincicial. Durante la profase de los ciclos nucleares 10-13, DMAP-85 presenta una distribución uniforme de tipo punteada que se extiende a lo largo del citoplasma que rodea a los núcleos. Esta distribución es diferente tanto de la observada para los MTs, los cuales emanan desde los centrosomas, como de la distribución de los MFs, los que se organizan formando *caps* sobre los núcleos (esquemático en Figura 3). Por otra parte, durante la mitosis, DMAP-85 permanece localizada en la región que rodea a cada uno de los husos mitóticos (Figura 31B) y no presenta una relación obvia con los MTs, los cuales se encuentran, principalmente, formando los husos (Figura 31A). La ausencia de colocalización entre DMAP-85 y MTs se observó claramente en los análisis de inmunofluorescencia doble de la Figura 31A y B. La distribución de DMAP-85 difiere también de la distribución de los MFs, como se puede apreciar en la imagen de inmunofluorescencia doble de la Figura 32A y B. En

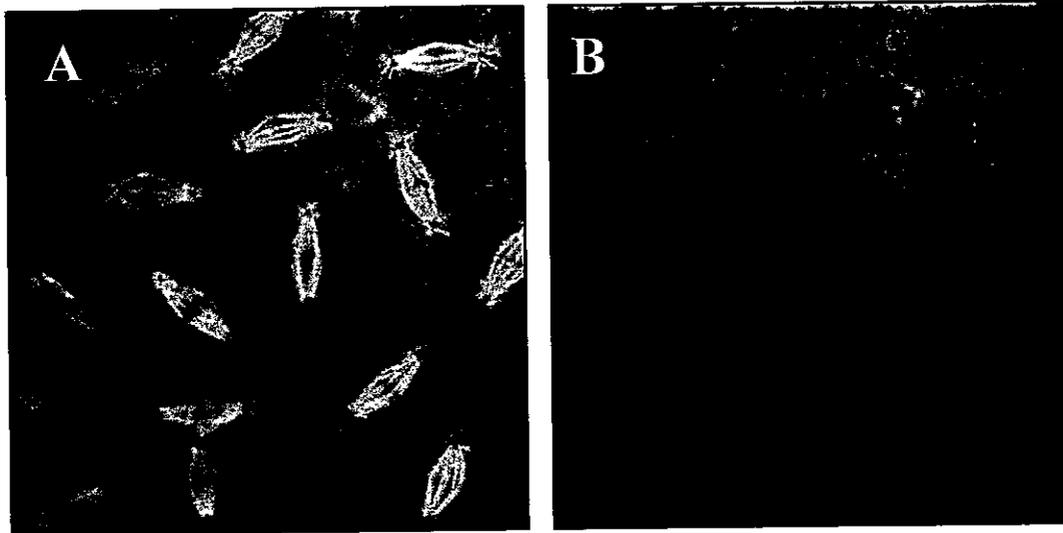


Figura 31: LOCALIZACION DE DMAP-85 Y MTs EN EMBRIONES SINCICIALES. Secciones ópticas ($2\mu\text{m}$) de montajes completos de embriones de *D. melanogaster* durante la anafase del ciclo nuclear 10. Los embriones fueron teñidos simultáneamente con los anticuerpos monoclonal anti- α -tubulina (A) y DMAP.1 (B). En (A) los MTs se encuentran, principalmente, formando los husos mitóticos y en (B) DMAP-85 se distribuye uniformemente en el citoplasma que rodea a los husos. Los embriones fueron procesados para inmunofluorescencia según el protocolo descrito por Theurkauf (1992). (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti- α -tubulina, 1:1000).

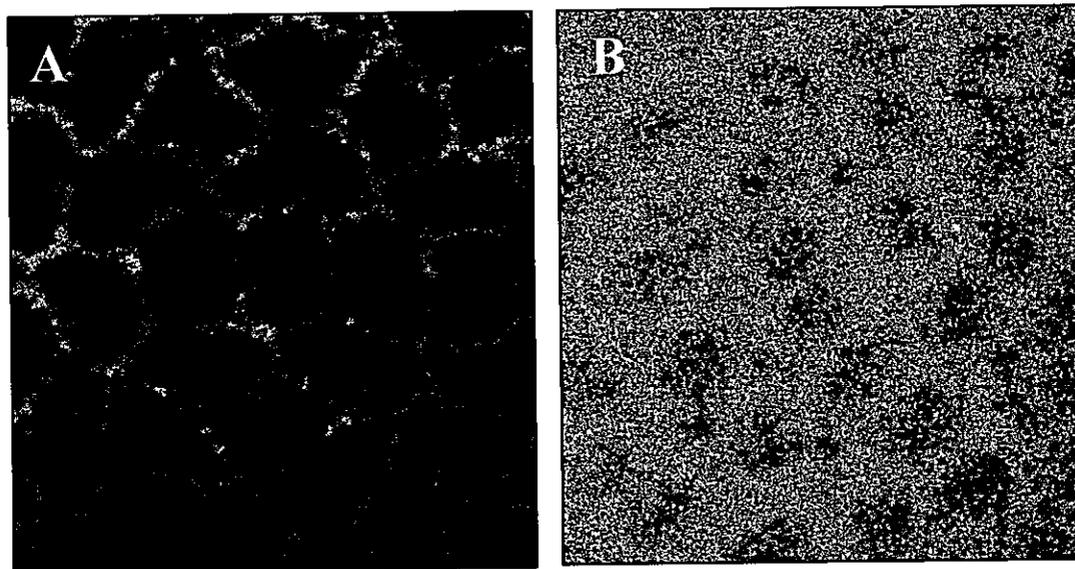


Figura 32: LOCALIZACION DE DMAP-85 Y MFs EN EMBRIONES SINCICIALES. Secciones ópticas ($2\mu\text{m}$) de montajes completos de embriones durante la metafase del ciclo nuclear 12. Los embriones fueron teñidos simultáneamente con los anticuerpos monoclonal anti-actina (A) y DMAP.1 (B). En (A), los MFs se organizan formando pseudotables y en (B), DMAP-85 presenta una distribución citoplasmática uniforme. Los embriones fueron procesados para inmunofluorescencia según el protocolo descrito por Theurkauf (1992). (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti-actina, 1:500).

esta imagen, los MFs se encuentran estructurando los pseudotabiques que delimitan dominios corticales y separan a los husos durante la mitosis. En las Figuras 31B y 32B, se puede observar que la distribución de DMAP-85, en el citoplasma que rodea a los núcleos, no permite descartar que una fracción de esta proteína colocalice con MFs en los dominios corticales.

Durante la interfase entre los ciclos nucleares 13 y 14, los MFs se organizan en una red hexagonal que estructura los pliegues divisorios de membrana, durante la celularización del embrión. Los MTs, en cambio, crecen desde los centrosomas hacia la base de las células envolviendo a los núcleos (esquemático en Figura 4). En esta etapa, a diferencia de la anterior, DMAP-85 se concentra en los dominios corticales (Figura 33B y b), donde claramente codistribuye con los MFs (Figura 33A y a). Nuevamente se aprecian diferencias en los patrones de distribución de DMAP-85 y MTs (Figura 34A y B), sin embargo, cuando se analiza su distribución con un mayor aumento y en una sección óptica 4 μm por debajo de la superficie del embrión (la altura de las células embrionarias es aproximadamente 5 μm), se pueden observar haces de MTs en estrecho contacto con la estructura de los tabiques divisorios (Figura 34a, flechas). Esto sugiere que DMAP-85 y los MTs pueden presentar un cierto grado de codistribución en la región cortical de las células (Figura 34a y b, flechas) y por otra parte señala la colocalización de MTs y MFs en este dominio celular. Considerando la notable similitud entre los patrones de distribución de DMAP-85 y MFs, se comparó la distribución de DMAP-85 con el patrón de β -espectrina, una ABP, que se asocia con los MFs en los pliegues divisorios, durante la celularización (Pesacreta y cols., 1989). Como se observa en la imagen de inmunofluorescencia doble (Figura 35A y B), ambas proteínas presentan un alto grado de colocalización en los dominios corticales de las células.

Posteriormente, al iniciarse la gastrulación (embrión de estado 6, en la Figura 36), se puede apreciar que, en general los patrones de distribución de DMAP-85 (Figura 36B y b) y MTs (Figura 36A y a) son semejantes a los observados durante la etapa celularización. Sin embargo, con un mayor aumento (Figura 36 a y b) es posible

Figura 33: INMUNOLOCALIZACION DE DMAP-85 Y MFs EN EMBRIONES EN CELULARIZACION. Secciones ópticas paralelas a la superficie (2 μ m) de un embrión teñido simultáneamente con un anticuerpo monoclonal anti-actina (A, a) y el anticuerpo DMAP.1 (B, b). Los paneles a y b corresponden a una ampliación de las imágenes A y B (aumento 600x). Se observa la distribución preferente de DMAP-85 en el dominio cortical de las células (B y b), donde colocaliza con la red de MFs que forma los tabiques divisorios durante la celularización del embrión (A y a). (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti-actina 1:500).

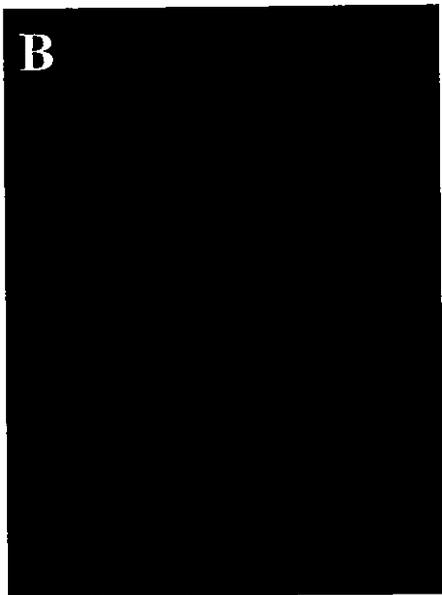
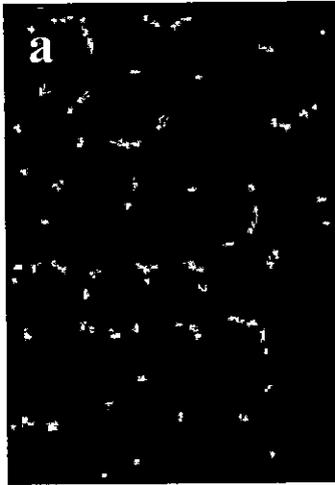
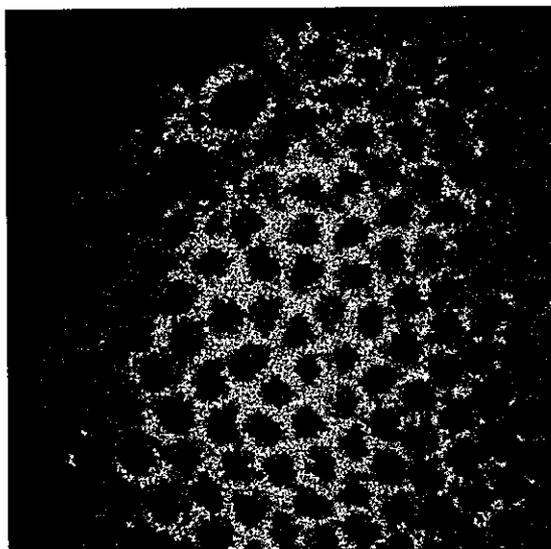
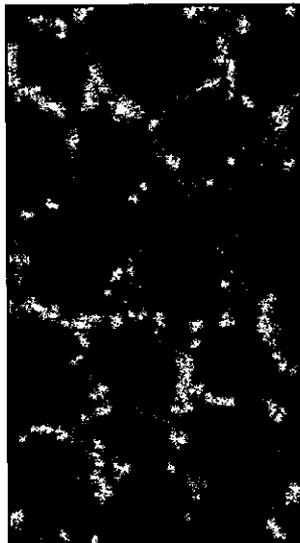
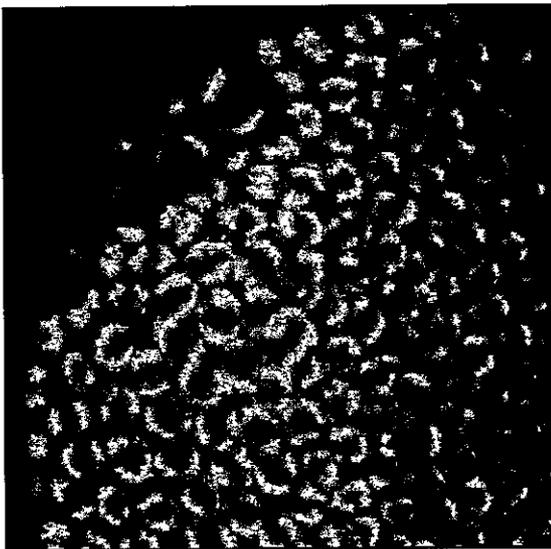


Figura 34: INMUNOLocalIZACION DE DMAP-85 Y MTs EN EMBRIONES EN CELULARIZACION. Los embriones fueron teñidos simultáneamente con los anticuerpos anti- α -tubulina (A y a) y DMAP.1 (B y b). A y B corresponden a secciones ópticas de 2 μ m de profundidad desde la superficie del embrión (aumento 600x), mientras que a y b son secciones tomadas a 4 μ m de profundidad, con mayor aumento (1000x). Los MTs emanan desde centrosomas ubicados en la región apical de las células y se extienden hacia la base, envolviendo a los núcleos (A y a). Las flechas indican regiones de codistribución de DMAP-85 y MTs, en dominios celulares corticales (a y b). (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500, anti- α -tubulina, 1:300).



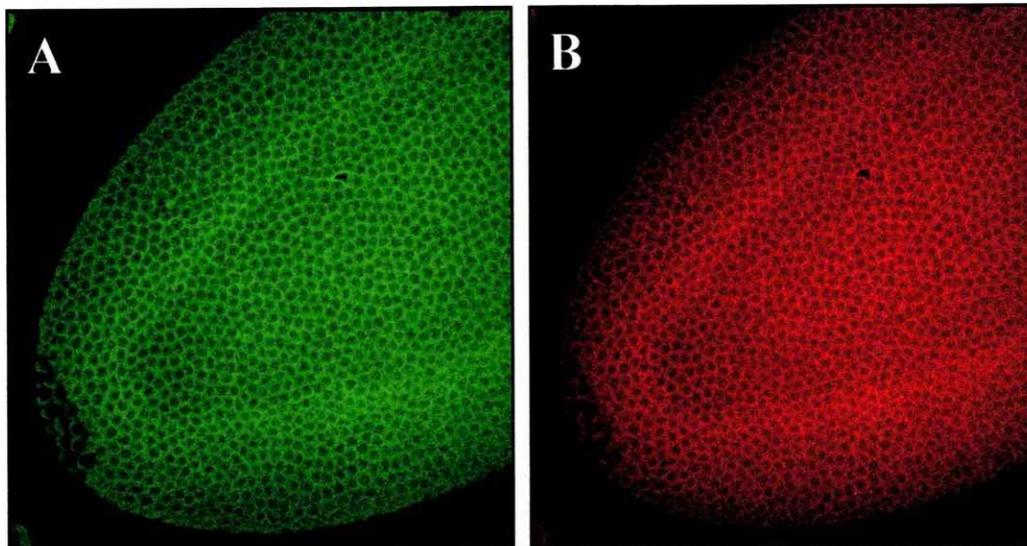


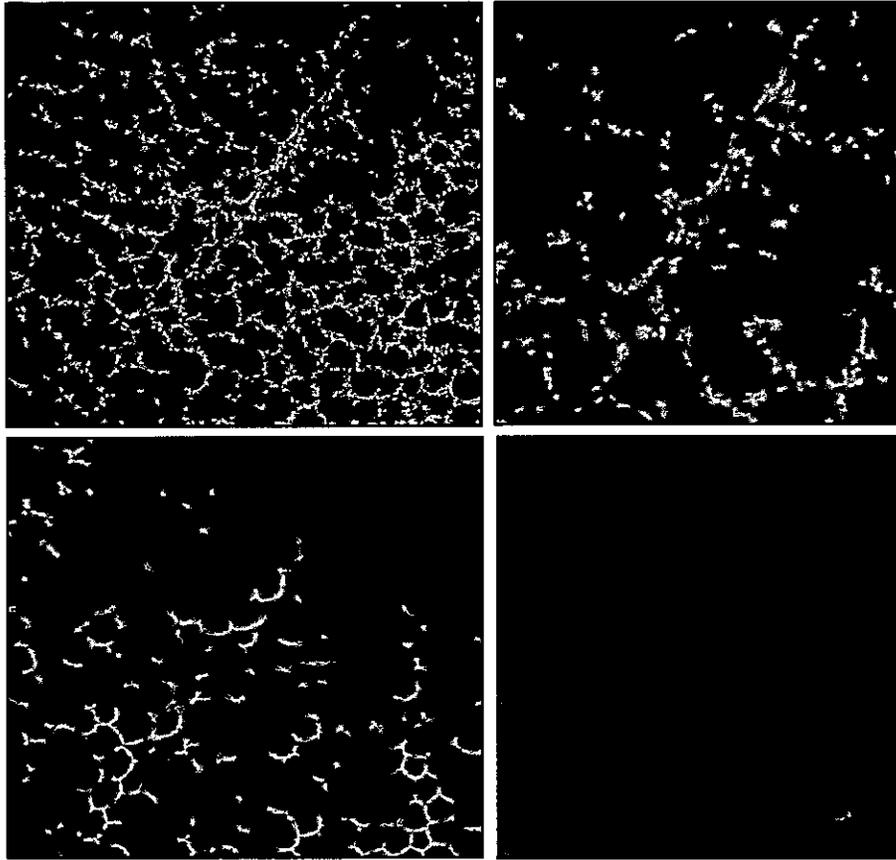
Figura 35: COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE DMAP-85 Y ESPECTRINA. La imagen corresponde a una sección óptica de un montaje completo de un embrión en estado de celularización, el cual fue teñido simultáneamente con los anticuerpos DMAP.1 (A) (1:500) y anti-espectrina (B) (1:200) y visualizado usando un microscopio confocal (aumento 600x). Los embriones fueron procesados para inmunofluorescencia según el protocolo descrito por Karr & Alberts (1986).

observar que una fracción de DMAP-85 se localiza en regiones citoplasmáticas, colocalizando con haces de MTs (Figura 36a y b, flechas). En los siguientes estados del desarrollo, DMAP-85, consolida una localización preferentemente citoplasmática, la cual es radicalmente distinta de la ubicación cortical observada durante la celularización.

En una doble inmunofluorescencia de un embrión de estado 8, se observa la colocalización de DMAP-85 con MTs, principalmente en el citoplasma extendido de las células que constituyen la amnioserosa (ams, en Figura 37A y B). En la Figura 37a y b, se muestra un detalle de la amnioserosa, el cual ilustra con mayor precisión el grado de codistribución de DMAP-85 con la red microtubular citoplasmática. En este estado del desarrollo, se pueden observar parches de células en división, que forman los dominios mitóticos del embrión (Figura 38, recuadros en líneas discontinuas). Esto permite analizar simultáneamente, en la superficie del embrión, el citoesqueleto de células en interfase y el de células en mitosis. Un análisis en detalle de la distribución de DMAP-85, en un embrión de estado 8, indicó que esta proteína codistribuye exclusivamente con los MTs de células en interfase (Figura 38A y B). La ausencia de relación espacial entre DMAP-85 y los MTs del huso mitótico, se observa claramente en las células de los dominios mitóticos, en las cuales DMAP-85 presenta un patrón de inmunofluorescencia homogéneo que abarca todo el citoplasma (Figura 38a y b). En etapas posteriores (embrión de estado 11), DMAP-85 codistribuye con MTs en la totalidad de las células del embrión (Figura 39 A y B). En estas células, se observa una red prominente de MTs citoplasmáticos (Figura 39a), junto con un patrón de distribución de DMAP-85 que coincide con la red en toda su extensión (Figura 39b). Este patrón de codistribución se mantiene en estados posteriores de desarrollo.

Con el propósito de caracterizar la relación espacial entre DMAP-85 y el citoesqueleto microtubular, en estados finales del desarrollo embrionario (estados 14-16), se analizaron estos dos componentes, mediante inmunofluorescencias dobles, utilizando los anticuerpos DMAP.1 y anti-tubulina acetilada. Este último anticuerpo, permite reconocer poblaciones de MTs estables, las cuales se concentran en los axones

Figura 36: INMUNOLocalización de DMAP-85 y MTs en estado de GASTRULA TEMPRANA. Secciones ópticas de 4 μm de profundidad de embriones de estado 6, teñidos simultáneamente con los anticuerpos anti- α -tubulina (A y a) y DMAP.1 (B y b). Los paneles a y b corresponden a una ampliación de las imágenes A y B (aumento 1000x). Las flechas señalan la colocación de DMAP-85 y MTs en dominios citoplasmáticos. (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500, anti- α -tubulina, 1:300).



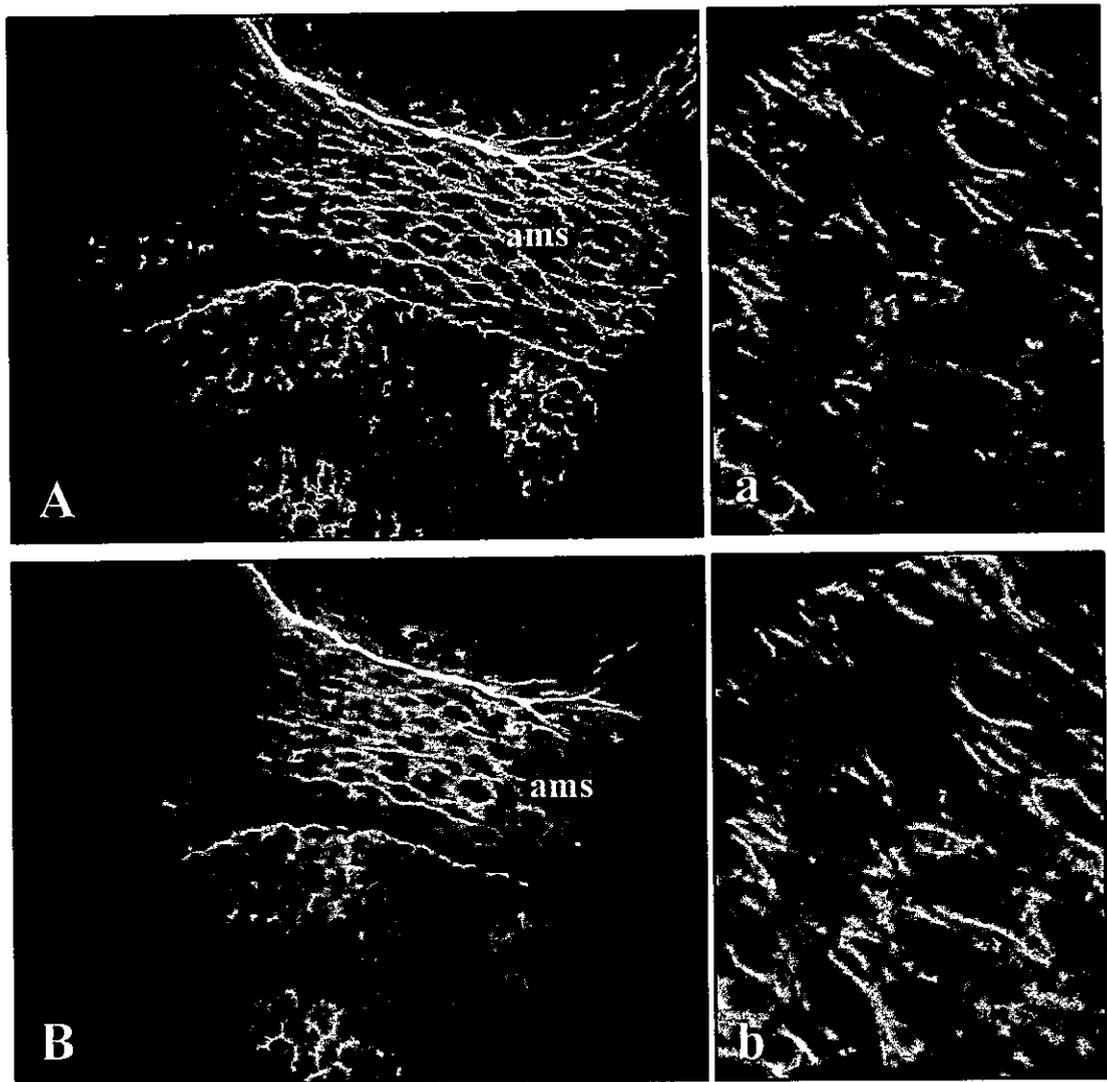
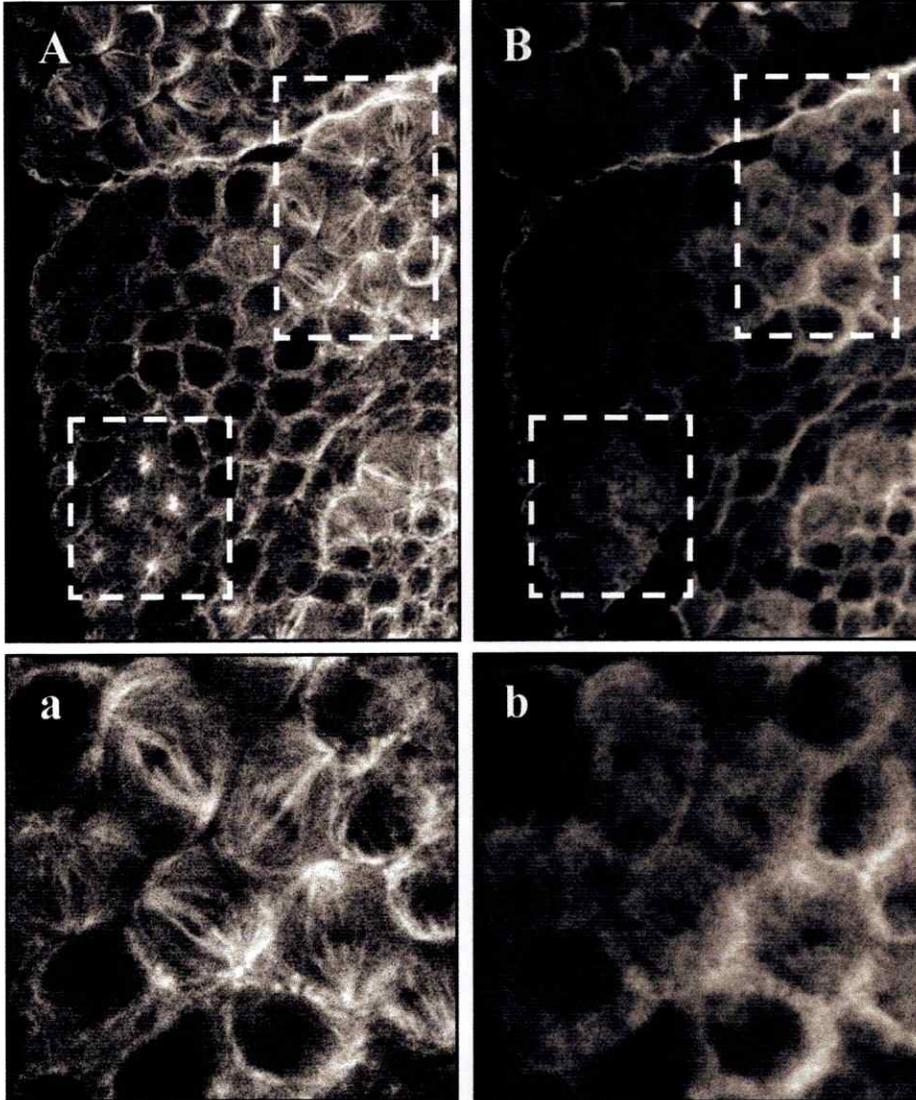


Figura 37: LOCALIZACIÓN DE DMAP-85 Y MTs EN ESTADOS DE POST-GASTRULA. Secciones ópticas de montajes completos de embriones de estado ocho, procesados para inmunofluorescencia y teñidos simultáneamente con los anticuerpos anti- α -tubulina (A y a) y DMAP.1 (B y b). Los paneles a y b corresponden a una ampliación de la amnioserosa (ams) para mostrar la colocalización de DMAP-85 y la red microtubular citoplasmática (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti- α -tubulina, 1:200).

Figura 38: DISTRIBUCION DE DMAP-85 EN DOMINIOS MITOTICOS. Secciones ópticas de montajes completos de embriones de estado 7, procesados para inmunofluorescencia y teñidos simultáneamente con los anticuerpos anti- α -tubulina (A y a) y DMAP.1 (B y b). En A y B, los recuadros de líneas discontinuas señalan parches de células en división que forman dominios mitóticos. En a y b, se muestra un aumento de uno de estos dominios (1000x). (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti- α -tubulina, 1:300).



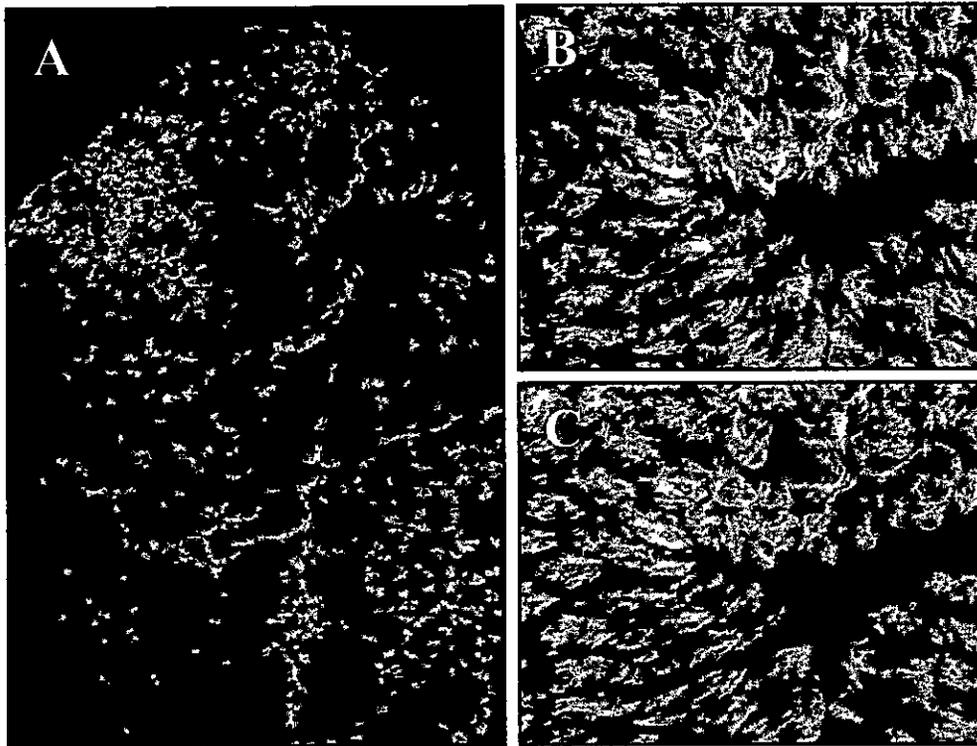
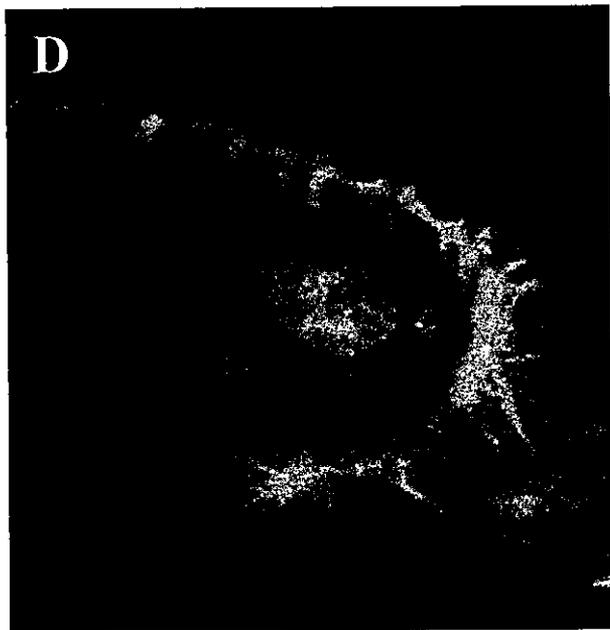
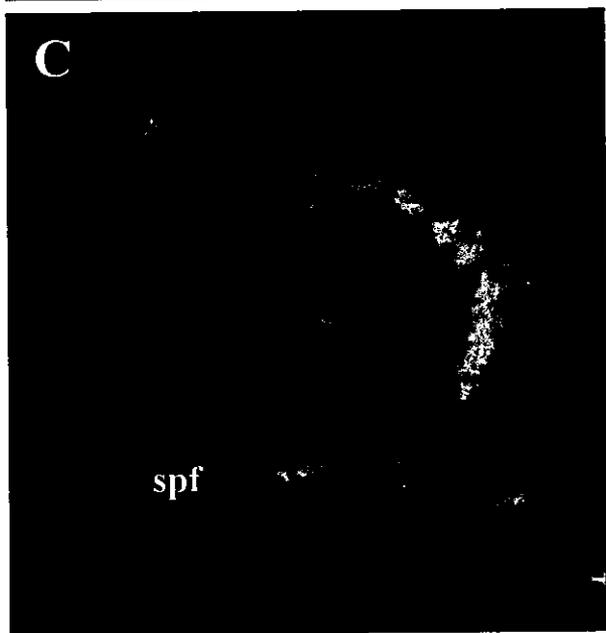
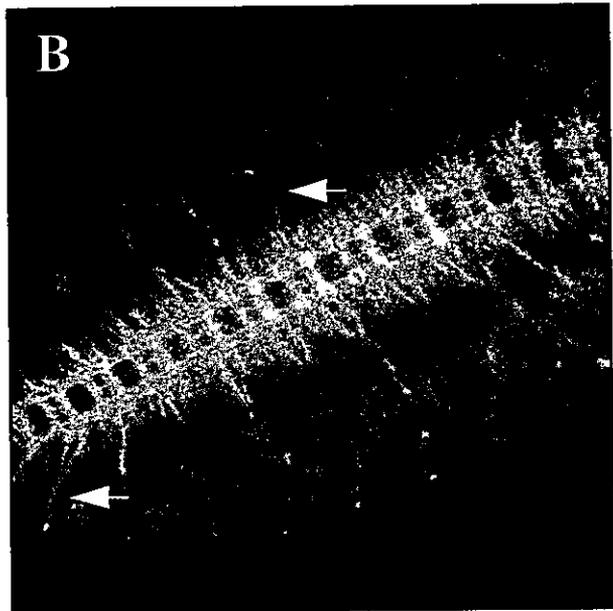
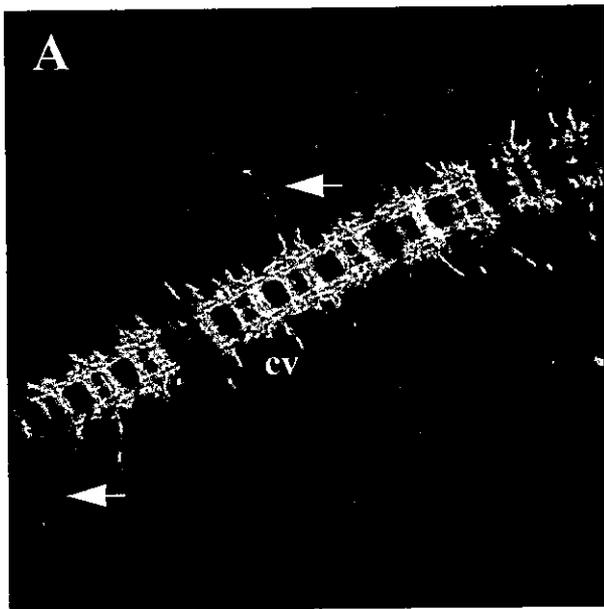


Figura 39: COLOCALIZACIÓN DE DMAP-85 CON LA RED MICROTUBULAR CITOPLASMÁTICA. Secciones ópticas de embriones de estado 11 teñidos simultáneamente con los anticuerpos anti- α -tubulina (A y B) y DMAP.1 (C). En A, se observa con una amplificación de 600x la distribución general de los MTs en este embrión. En B y C, se muestra una amplificación de una región del embrión, en la que se aprecia el alto grado de codistribución que presentan DMAP-85 y la red de MTs citoplasmáticos. (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti- α -tubulina, 1:300).

de neuronas del sistema nervioso central y periférico del embrión (Wolff y cols., 1988). Como se observa en la figura 40B y D, DMAP-85 codistribuye con MTs conteniendo tubulinas acetiladas en el sistema nervioso central (SNC) del embrión. La estructura en forma de escalera, corresponde al cordón nervioso ventral (cv, en Figura 40), constituido por conectivos (proyecciones longitudinales) y comisuras (proyecciones transversales) los que se encuentran a su vez formados por los axones de las numerosas neuronas que los rodean. Estos axones abandonan el SNC a intervalos regulares en cada segmento. DMAP-85 se encuentra claramente enriquecida en los procesos axonales que forman conectivos y comisuras, en relación con los niveles de fluorescencia observados en otras regiones del embrión (Figura 40A y B), este enriquecimiento es también aparente en los procesos que abandonan el SNC (Figura 40A-D, flechas) y en el ganglio supraesofágico (spf en Figura 40C y D).

Figura 40: COLOCALIZACION DE DMAP-85 Y MTs EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. Imágenes de microscopía confocal de embriones de estado 15, teñidos simultáneamente con los anticuerpos anti-tubulina acetilada (A y C) y DMAP.1 (B y D). A-B, corresponde una vista ventral del embrión, en la cual se puede observar el cordón nervioso ventral (cv), así como grupos de axones que abandonan el cordón nervioso en cada segmento (flechas). C-D corresponde a una vista lateral del embrión, en la cual se observa el ganglio supraesofágico (spf) y el cordón nervioso ventral. En ambos casos el aumento es 600x. (Dilución de los anticuerpos: DMAP.1, 1:500 y anti-tubulina acetilada, 1:300).



IV. INTERACCION *in vitro* DE DMAP-85 CON MFs

IV.1. Ensayos de cosedimentación de DMAP-85 con MFs

La asociación *in vitro* de DMAP-85 con actina se analizó mediante ensayos de cosedimentación de esta proteína con G-actina purificada a partir de músculo de pollo (Spudich y Watt, 1971). En este experimento, cantidades crecientes de proteínas del extracto embrionario (5, 10 y 15 µg) fueron incubadas con 40 µg de G-actina en 200 µl de amortiguador a TA, en presencia de 2 mM MgCl₂ y 75 mM KCl para inducir la polimerización de G-actina. Luego de 1 hora, los MFs fueron sedimentados por centrifugación a 126.000xg por 60 min a temperatura ambiente. Las proteínas presentes tanto en las pellas como en los sobrenadantes, fueron analizadas en geles de SDS-poliacrilamida. En presencia de actina, una fracción significativa de DMAP-85 fue detectada en las pellas (Figura 41A, carriles 1, 2 y 3), lo cual fue confirmado mediante ensayos de Western blots con el anticuerpo DMAP.1 (Figura 41B). En el mismo experimento, BSA (15 µg) fue incubada con actina para determinar el grado de atrapamiento inespecífico, observándose que una cantidad mínima de BSA cosedimentaba con actina (resultados no mostrados).

IV.2. Ensayos de inmunoprecipitación de DMAP-85 con MTs y MFs

La asociación de DMAP-85 con actina y tubulina, en extractos de embriones en celularización, fue analizada mediante un ensayo de inmunoprecipitación. Para esto, las proteínas del extracto fueron incubadas con anticuerpos dirigidos contra tubulina, actina, y DMAP-85. Como controles, los extractos fueron incubados con el suero preinmune, de los conejos inmunizados con DMAP-85 y con un anticuerpo contra la proteína tau de PHF. Las fracciones de proteínas inmunoprecipitadas, luego de agregar proteína A-Sepharose a las mezclas, fueron analizadas en geles de SDS-poliacrilamida y electrotransferidas a membranas de PVDF. La presencia de DMAP-85 en estas

fracciones fue detectada, mediante ensayos de Western blot con el anticuerpo DMAP.1 (Figura 42). Este análisis indicó que DMAP-85 se asocia tanto con tubulina como con actina, en los extractos de embriones (Figura 42 carriles 2 y 3). Sin embargo, al comparar la cantidad de proteína inmunoreactiva presente en el extracto inicial (Figura 42, carril 1) con aquella presente en los inmunoprecipitados (Figura 42, carriles 2 y 3) se observó que solo una fracción de DMAP-85 coimmunoprecipita con tubulina o actina. Por otra parte, DMAP-85 no fue detectada en los inmunoprecipitados controles, preparados con el suero pre-inmune y el anticuerpo anti-PHF y (Figura 42, carriles 4 y 5).

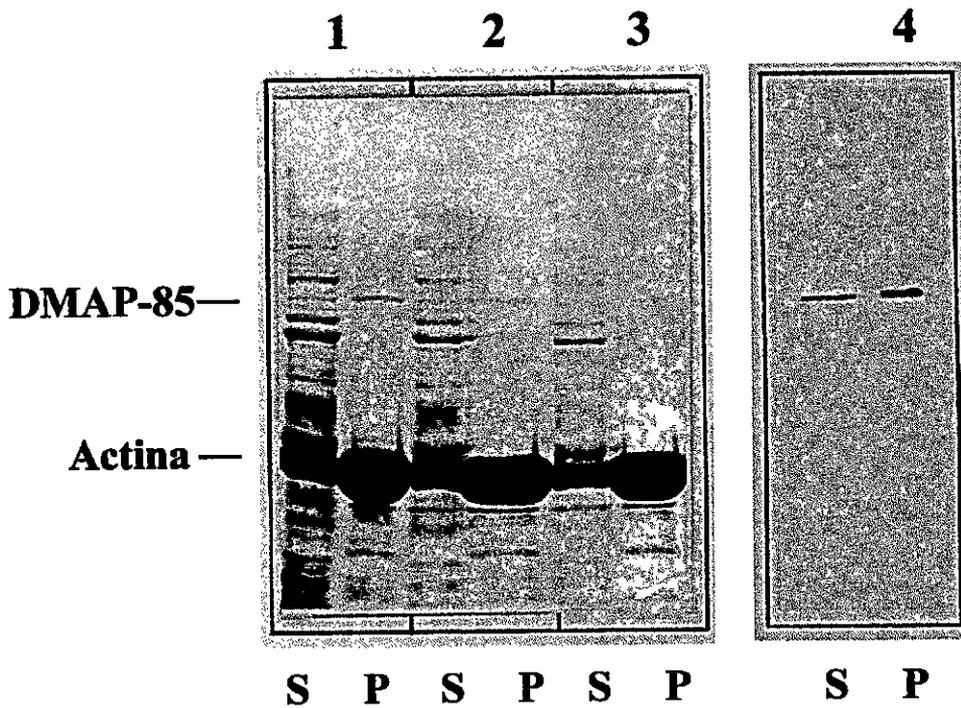


Figura 41: COSEDIMENTACION DE DMAP-85 CON MICROFILAMENTOS. Cantidades crecientes de extractos totales de embriones: 15 µg (carril 1); 10 µg (carril 2) y 5 µg (carril 3), fueron incubados a 37 °C, en presencia de MgCl₂ y KCl con 40 µg de G-actina purificada. Cada una de las mezclas fue centrifugada y los sobrenadantes (S) y pellas (P) fueron fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de Coomassie. El sobrenadante (carril 1) y la pella (carril 2) de la mezcla de incubación que contenía 15 µg de DMAP-85 fueron analizadas mediante un ensayo de Western blot con el anticuerpo DMAP.1. (Dilución 1:1000).

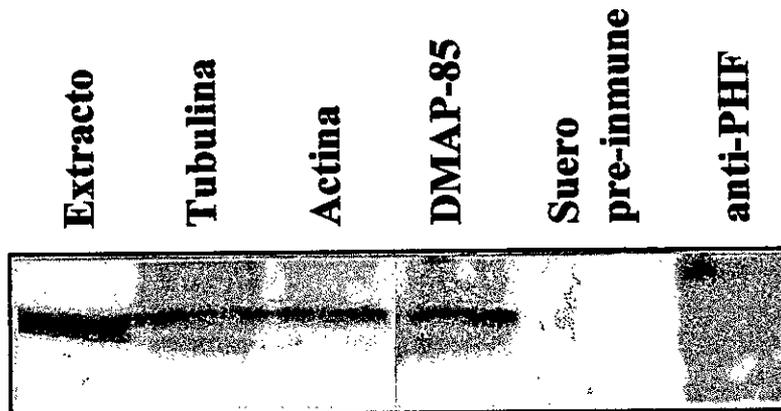


Figura 42: INTERACCION DE DMAP-85 CON ACTINA Y TUBULINA EN EXTRACTOS DE EMBRIONES. Alicuotas de 20 µg de extractos embrionarios fueron inmunoprecipitadas utilizando anticuerpos: anti-tubulina, anti-actina anti-DMAP-85 y anticuerpos controles (suero preinmune y anti-PHF). Las fracciones inmunoprecipitadas (carriles 2-6) y 20 µg del extracto (carril 1) fueron fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida y analizados mediante Western blots, usando el anticuerpo DMAP.1. (Dilución 1:1000).

DISCUSION

El citoesqueleto participa en una gran diversidad de procesos esenciales para la célula, entre ellos: regulación de la forma y de la polaridad celular, segregación de cromosomas y transporte intracelular. La multifuncionalidad del citoesqueleto depende en gran medida de los mecanismos moleculares que regulan su organización y su dinámica. Esta regulación puede ocurrir en dos niveles, en la asociación homóloga de las subunidades estructurales que conforman cada uno de los diferentes tipos de filamentos y en la asociación heteróloga de estos filamentos con proteínas asociadas a ellos, tales como las ABPs y MAPs. En particular, se sabe que las MAPs juegan un papel clave en la modulación del ensamblaje y desensamblaje de los MTs y en su estabilidad, así como en la interconexión del citoesqueleto microtubular con otros componentes de la célula (Maccioni y Cambiazo, 1995). En esta tesis doctoral, hemos logrado identificar y caracterizar una nueva proteína de 85 kDa (DMAP-85), presente en *D. melanogaster* y hemos evaluado su participación en la organización del citoesqueleto microtubular.

I. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA DMAP-85 DE *D. melanogaster*.

La presencia de proteínas capaces de interactuar con MTs, en *D. melanogaster* ha sido descrita con anterioridad por otros grupos (Wandosell y Avila, 1987; Goldstein y cols., 1986; Kellogg y cols., 1989). Estos estudios han revelado la existencia de dos proteínas, CP-190 y CP-60 (Whitfield, 1988; Kellogg y cols. 1989), las cuales se localizan en los centrosomas embrionarios e interactúan con MTs en columnas de afinidad (Kellogg y cols. 1989). Por otra parte, se ha aislado una proteína de 205 kDa, a partir de líneas celulares en cultivo de *D. melanogaster*, la cual es capaz de cosedimentar con MTs estabilizados con taxol (Goldstein y cols., 1986). Sin embargo, a la fecha no se han identificado, en *D.*

melanogaster, componentes que presenten la capacidad funcional de modular o promover el ensamblaje de la tubulina, de la forma como ha sido descrito para tau, MAP-2 y MAP-4 (Olmsted, 1986). Con el propósito de investigar la presencia de este tipo de componentes, iniciamos el estudio de fracciones de proteína microtubular obtenidas a partir de extractos solubles de larvas de *D. melanogaster*.

Utilizando un procedimiento experimental descrito por Vallee (1982), el cual combina el uso de taxol para purificar MTs y MAPs, logramos identificar una proteína, que denominamos DMAP-85. DMAP-85 cosedimenta con los MTs y puede ser disociada de éstos luego de exponer la preparación a soluciones conteniendo altas concentraciones de sal. De esta manera, utilizando este criterio bioquímico, anteriormente empleado en la identificación de MAPs de mamíferos, logramos detectar la presencia de una nueva proteína de tipo MAP en larvas de *D. melanogaster*. Si bien, la identificación inicial de DMAP-85 se realizó en larvas de tercer estado, estudios posteriores indican que tanto DMAP-85, como su mensajero están presentes a lo largo de todo el desarrollo embrionario y en adultos de *D. melanogaster*. Este patrón de expresión temporal, sugiere que la actividad de DMAP-85 es requerida durante todo el ciclo de vida de este organismo.

Estudios en nuestro laboratorio y por otros autores indican que la región C-terminal de la tubulina representa un sitio común de unión para las diferentes proteínas que interactúan en forma productiva con los MTs. En este contexto, nos pareció relevante identificar los dominios de interacción de tubulina con DMAP-85. Con este propósito, utilizamos una metodología que combina el uso de diferentes columnas de afinidad, construidas a partir de: MTs enteros, la región C-terminal de 4 kDa de la tubulina y péptidos correspondientes a dominios funcionales discretos del extremo C-terminal. Este sistema de columnas de afinidad presenta algunas características interesantes, como son: 1) el sustrato inmovilizado en la resina representa dominios funcionales y/o estructurales del sistema tubulina/MTs y 2) este método permite seleccionar, en condiciones nativas, aquellas proteínas que interactúan con las estructuras del citoesqueleto que nos interesa analizar. En nuestro laboratorio, esta metodología ha permitido identificar y caracterizar nuevas

MAPs que participan en la regulación de la organización e integridad del citoesqueleto microtubular (Vial y cols., 1994; González y cols., 1995; Cambiazo y cols., 1995; Henríquez y cols., 1996).

En una primera etapa, el estudio de la interacción de DMAP-85 con el sistema microtubular, se realizó mediante el uso de columnas de afinidad de MTs estabilizados con taxol (Kellogg y cols., 1989). Al aplicar un extracto soluble de adultos de *D. melanogaster* a la columna de MTs, se recuperó una fracción de proteínas que presentaba un patrón electroforético muy similar al obtenido por Kellogg y cols. (1989), en sus experimentos con extractos de embriones de *D. melanogaster*. En esta fracción proteica se observó un enriquecimiento relativo de una proteína de 200 kDa, la cual puede corresponder a la proteína de 205 kDa identificada por Goldstein y cols. (1986), y de un componente de 85 kDa, el cual mostró inmunoreactividad con el anticuerpo que reconoce en forma específica a DMAP-85. En contraposición, se observaron proteínas muy abundantes en el extracto de origen, las que no fueron retenidas en esta columna, dando cuenta de una asociación preferente de DMAP-85 a los MTs, en la columna de afinidad. Este resultado se correlaciona con la evidencia de que DMAP-85 cosedimenta con MTs en extractos de larvas de *D. melanogaster* y sugiere que esta proteína, al igual que otras MAPs, interactúa con dominios expuestos en la superficie de los MTs (Maccioni y cols., 1988; Rivas-Berrios y cols., 1990) (Figura 43).

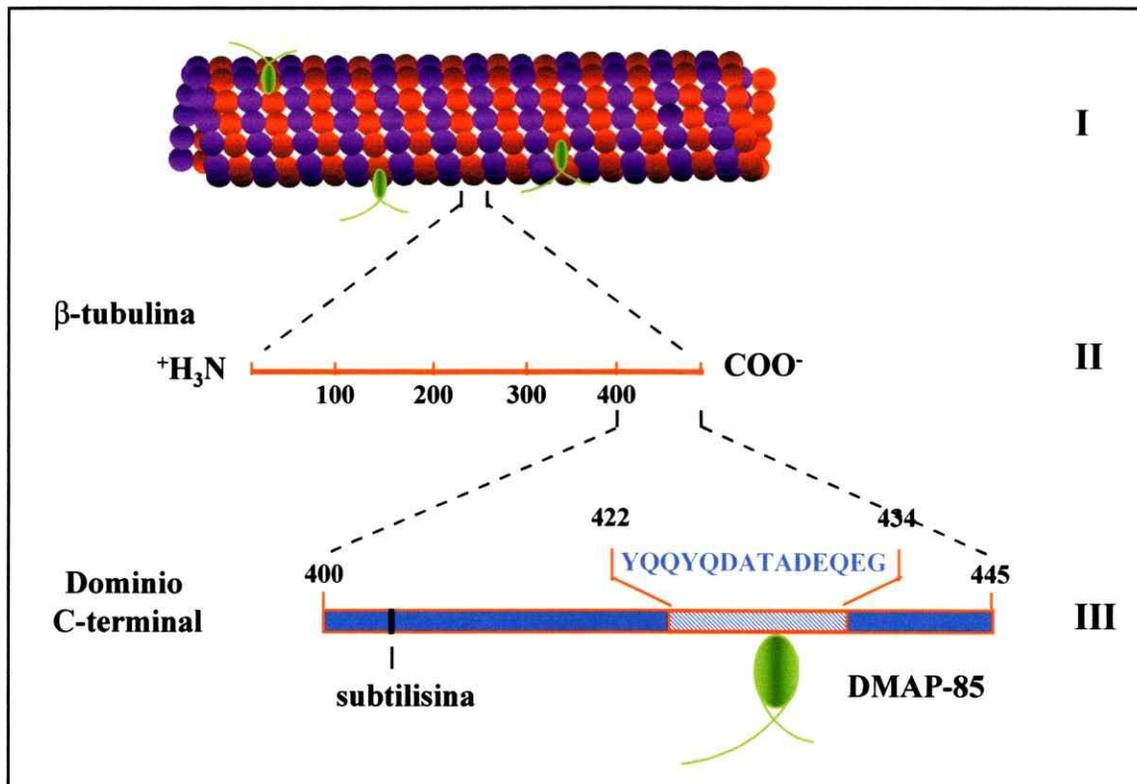
En esta misma línea experimental, se estableció que DMAP-85 interactúa con el fragmento proteolítico de 4 kDa del extremo C-terminal de tubulina, el cual contiene los sitios de unión de MAPs de mamíferos y corresponde a un dominio ácido de fácil acceso, tanto en el heterodímero de tubulina como en el MT. Si bien esta matriz de afinidad se construyó con fragmentos proteolíticos de tubulina, tratada con subtilisina, hay evidencias que sugieren que esta columna debe contener más bien una mezcla de péptidos correspondientes al extremo C-terminal de tubulina. Por una parte, se sabe que subtilisina puede producir más de un sitio de corte en el C-terminal de α y β tubulina (Sackett *et al.*, 1985; de la Viña *et al.*,

1988) siendo mayoritario, bajo las condiciones de proteólisis descritas, el componente de 4 kDa (Serrano *et al.*, 1984a). Esto otorga un cierto grado de heterogeneidad con respecto al tamaño de los fragmentos contenidos en la resina.

Tomando en consideración que la unión a MTs de proteínas, tales como: MARP-1 (Hemphill y cols., 1992), una MAP de *Trypanosoma brucei* y de las proteínas motoras kinesina y dineína citoplasmática (Radionov y cols., 1990; López y Sheetz, 1993; Marya y cols., 1994) involucra, además de la región C-terminal, otros dominios de la tubulina, quisimos evaluar una posible interacción de DMAP-85 con regiones del segmento N-terminal de la tubulina. Con este propósito, se realizaron ensayos de cosedimentación con S-tubulina, este derivado corresponde al fragmento mayor de las subunidades α y β , el cual es producido por la proteólisis con subtilisina y contiene los dominios de unión de GTP y los dominios de interacción entre heterodímeros de tubulina, pero no contiene el dominio C-terminal de 4 kDa. El análisis de los resultados obtenidos indica que la interacción de DMAP-85 con los MTs involucra únicamente al dominio C-terminal de la tubulina (Figura 43), y es consistente con el hecho de haber identificado, en DMAP-85, una región de carácter básico necesaria para la unión de esta proteína a MTs (ver más adelante).

Como se mencionó en la Introducción, las MAPs mejor estudiadas han sido aisladas desde el sistema nervioso central de mamíferos. Estas proteínas se unen a sitios acídicos bien definidos en el dominio C-terminal de la tubulina y en todas ellas se ha podido identificar un dominio de unión a tubulina que, en general, corresponde a secuencias repetitivas de naturaleza básica (Maccioni y cols., 1988). En los últimos años, se ha caracterizado un grupo creciente de nuevas proteínas no-neuronales, que interactúan con los MTs a través del dominio C-terminal y que presentan regiones de unión a tubulina con propiedades comunes a las descritas para las MAPs neuronales. La gran variabilidad del dominio C-terminal de tubulina, otorgada por la presencia de modificaciones post-traduccionales, así como la evidencia que demuestra que esta región no tiene una estructura secundaria rígida (Nogales y cols., 1998) refuerzan la sugerencia de que este dominio representa un

Figura 43: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA INTERACCION DE DMAP-85 CON EL SISTEMA TUBULINA/MTs. En la parte superior (I), se muestra un esquema simplificado de la asociación reversible de DMAP-85 a los MTs. (II), corresponde a una representación lineal de β -tubulina y (III) a una representación extendida del dominio C-terminal de esta molécula, en la cual se destaca la región $\beta(422-434)$, que está directamente involucrada en la interacción con DMAP-85. Los números indican la posición de los residuos en la secuencia de la tubulina. La flecha indica el sitio de corte de la enzima subtilisina.



sitio común de interacción para las diferentes proteínas que se asocian con los microtúbulos. Del mismo modo, nuestros resultados con DMAP-85 sustentan un modelo de la unión de los polímeros de tubulina con sus proteínas asociadas, basado en interacciones de tipo electrostático entre el dominio C-terminal de la molécula de tubulina y regiones bien definidas de las proteínas interactuantes. Esto nos permite sugerir que este mecanismo de interacción es conservado en todos los sistemas analizados hasta la fecha (Maccioni y Cambiazo, 1995).

La asociación de DMAP-85 al dominio C-terminal de la tubulina, sugiere también la existencia de mecanismos que regularían su interacción. En este contexto, se ha determinado que la mayoría de las modificaciones post-traduccionales de las tubulinas ocurren a nivel del C-terminal de las subunidades α y β (Greer y cols., 1985; Barra y cols., 1988; Edde y cols., 1990). Estos elementos de heterogeneidad del C-terminal de la tubulina afectan la interacción con sus proteínas asociadas y contribuyen a la regulación funcional del citoesqueleto microtubular. Un ejemplo de esto es la poliglutamilación del C-terminal de las cadenas α y β de la tubulina, una modificación que favorece las interacciones entre la proteína tau y los MTs, al aumentar la estabilidad de subpoblaciones de MTs que contienen las tubulinas modificadas (Boucher y cols., 1994). Para el caso de DMAP-85, la evidencia indica que esta proteína colocaliza exclusivamente con MTs de células en interfase, y que al parecer existiría una asociación preferente de DMAP-85 con MTs conteniendo tubulinas acetiladas. En ambos casos, la presencia de MAPs y modificaciones post-traduccionales en la tubulina parecen actuar en forma concertada para establecer poblaciones de MTs con mayor estabilidad.

La estructura primaria del dominio C-terminal de la β -tubulina se compone de dos subdominios: uno con una secuencia que es constante entre las isoformas (residuos 406-430) y una segunda región con variabilidad entre las isoformas de β -tubulina (residuos 431-445). La construcción de péptidos sintéticos, tanto de la región constante como de la región variable, ha sido una herramienta útil para el estudio del papel funcional de regiones bien definidas dentro del dominio C-terminal (Maccioni y cols., 1988; Cleveland y cols., 1990; Cross y cols., 1991).

Como parte de nuestro análisis de los sitios de unión de DMAP-85 a tubulina, pudimos determinar que esta proteína interactúa con el péptido β II-(422-434), y no lo hace con el péptido β II-(434-440) de la tubulina. Considerando que el primer péptido es menos ácido que el segundo, este resultado indica que la naturaleza de la interacción entre DMAP-85 y la tubulina requiere, además del componente electrostático, elementos de información contenidos en la estructura primaria del C-terminal. Requerimientos similares han sido observados en la unión de MAP-2, tau y MAP-3 a la tubulina (Maccioni y cols., 1988; Guzmán y cols., 1994) (Figura 43).

El análisis *in vitro* de las consecuencias funcionales de la interacción de DMAP-85 con dominios discretos de la región C-terminal de la tubulina, reveló que esta proteína era capaz de promover el ensamblaje de MTs, a partir de una solución de dímeros de tubulina. Efectivamente, los resultados de los análisis turbidimétricos indicaron que DMAP-85 presenta una característica propia y exclusiva de las MAPs, como es aumentar la velocidad y la cantidad de tubulina ensamblada, de una manera dependiente de su concentración en el ensayo. El hecho de que los polímeros formados, en presencia de DMAP-85, fueran sensibles a la despolimerización por frío, junto con el análisis de su estructura, mediante microscopía electrónica, permitió concluir que el producto ensamblado correspondía a MTs normales (Herzog y Weber, 1977). Los resultados obtenidos señalan claramente que DMAP-85 cumple funciones equivalentes a las propuestas para las MAPs de mamíferos (Olmsted, 1986; Maccioni y Cambiasso, 1996), sugiriendo una convergencia funcional con esta MAP de invertebrados y apoyando la hipótesis que DMAP-85 participa en la organización del citoesqueleto microtubular.

Al comparar el cambio de absorbancia producido por una MAP neuronal, tal como la proteína tau, con el producido por DMAP-85, se observó que el efecto relativo de DMAP-85 en la estimulación del ensamblaje es menor que el producido por tau. Es posible que junto con DMAP-85, la MAP de 205 kDa y otras MAPs aún no descritas en este sistema, contribuyan en forma cooperativa al ensamblaje de los MTs (Maccioni y cols., 1988), quedando abierta la posibilidad de que DMAP-85

requiera de la presencia de otros factores o de modificaciones en su estructura (por ejemplo, diferentes estados de fosforilación) para inducir un mayor nivel de ensamblaje *in vitro*. En este contexto, los estudios realizados con las diferentes columnas de afinidad indican que junto a DMAP-85, varias proteínas de diferentes pesos moleculares podrían también interactuar con regiones expuestas de la superficie del polímero de tubulina. Sin duda, la complejidad de la red microtubular requiere de la existencia de numerosas proteínas asociadas que contribuyen a modular sus funciones. A pesar de esta complejidad, los resultados presentados en esta tesis indican que el uso de columnas de afinidad sitio-específicas, nos permitió aislar un componente único, DMAP-85, que hasta la fecha, es la única proteína MAP de *D. melanogaster* para la cual se ha descrito una actividad promotora del ensamblaje de MTs.

Una evidencia adicional de la especificidad de la interacción de DMAP-85 con el péptido β II-(422-434), proviene de estudios de competencia, en los cuales la presencia de este péptido en los ensayos turbidimétricos produjo una disminución significativa en la capacidad de DMAP-85 de promover el ensamblaje de tubulina en MTs. Los ensayos de inducción del ensamblaje de tubulina fueron complementados con ensayos de sedimentación en presencia de DMAP-85. De manera consistente, con el efecto de DMAP-85 sobre el ensamblaje de la tubulina, la sedimentación de los polímeros de tubulina fue dependiente de la concentración de DMAP-85 en el ensayo. Los datos generados en estos ensayos permitieron estimar una $K_a = 7,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para la interacción de DMAP-85 con tubulina, la cual es menor que los valores calculados para MAP-2 y tau (Cann y cols., 1988; Maccioni y cols., 1988). Una manera de cuantificar en forma directa la interacción entre DMAP-85 y tubulina, en solución, sería a través del análisis fenomenológico derivado de estudios hidrodinámicos de cromatografía zonal, como se ha indicado en los estudios de Cann y cols. (1988). DMAP-85 se incorporó en los polímeros de tubulina con una estequiometría de 1:5,3 moles/mol, la cual es ligeramente inferior a la razón molar de 1:6 moles/mol, calculada para la interacción de tau con tubulina (Hirokawa y cols., 1988). Estos resultados indican que DMAP-85 junto

con promover la polimerización de heterodímeros de α , β -tubulina, sería capaz de integrarse estequiométricamente en la estructura de los MTs y copurificar con ellos en ciclos sucesivos de ensamblaje y desensamblaje, dependientes de temperatura.

II. SECUENCIACIÓN Y ANALISIS DE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE DMAP-85

El estudio de la asociación de DMAP-85 con el sistema tubulina/MTs, demostró que esta proteína comparte con las MAPs de mamíferos la propiedad de establecer interacciones productivas con el citoesqueleto microtubular. En este contexto, consideramos que tanto la caracterización estructural de DMAP-85, como la identificación de los dominios responsables de su interacción con MTs, nos permitiría analizar con detenimiento la participación de esta proteína en la dinámica del citoesqueleto microtubular. Un análisis de la secuencia primaria de DMAP-85, permitiría predecir, dentro de un marco de probabilidad, la estructura de la proteína completa y de las regiones involucradas en su unión a MTs. Por otra parte, el estudio comparativo de su secuencia aportaría información acerca de la relación estructural entre DMAP-85 y las MAPs de vertebrados, lo cual permitiría reconocer en esta proteína la existencia de características estructurales comunes y de equivalencias funcionales asociadas a su interacción con el citoesqueleto microtubular. Debido a que la mayoría de las MAPs, en las cuales ha sido posible determinar su secuencia aminoacídica, provienen de vertebrados, los resultados de secuencia y análisis comparativo con una MAP de *D. melanogaster* serían, sin duda, de gran utilidad para establecer el grado de divergencia o de conservación filogenética que presenta esta familia de proteínas. Sobre la base de lo anteriormente planteado, quisimos establecer la identidad de DMAP-85 y analizar sus características estructurales, para lo cual realizamos el clonamiento y la secuenciación de esta proteína.

Como punto de partida para estos experimentos, se generó y purificó un

anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína DMAP-85 purificada mediante las columnas de afinidad del péptido β II-(422-434), además se realizó una microsecuenciación de fragmentos proteolíticos de la proteína. La obtención de una secuencia de 11 aminoácidos permitió producir sondas degeneradas de oligonucleotidos, con las cuales se realizaron ensayos de amplificación mediante PCR, utilizando como templado los cDNAs sintetizados a partir de mRNAs de larvas. En paralelo, se analizó una genoteca de cDNA embrionario de *D. melanogaster*, en el vector de expresión Uni-ZAPTMXR, siendo esta estrategia la que dio los mejores resultados. En el vector Uni-ZAPTMXR, los polipéptidos codificados en los insertos de cDNA se expresan como una proteína recombinante que se encuentra fusionada con 36 aminoácidos de la enzima β -galactosidasa. De esta manera, los clones recombinantes que contenían fragmentos de la secuencia de DMAP-85 pudieron ser identificados con el anticuerpo DMAP.1. Cabe destacar, que este anticuerpo fue altamente específico en su reconocimiento de la proteína DMAP-85. En todos los casos analizados y al utilizar diferentes diluciones del anticuerpo, no se detectaron reacciones cruzadas con otras proteínas presentes en extractos embrionarios o con proteínas presentes en extractos de *E. coli*. El análisis de genotecas de expresión, mediante sondas inmunológicas, que utilizamos en estos estudios, ha sido ampliamente empleado como estrategia de clonamiento (Young y Davis, 1983). En particular, esta metodología ha sido utilizada en el clonamiento de componentes del citoesqueleto de *D. melanogaster*, tales como: 205K MAP (Goldstein y cols., 1986), CP-190 (Whitfield y cols., 1988), CP-60 (Kellogg y cols., 1995) y CLIP-170 (Lantz y Miller, 1998).

Como resultado del análisis de la genoteca de expresión, se obtuvieron cinco clones recombinantes los cuales fueron caracterizados en detalle. Los insertos de cDNA contenidos en estos clones presentaron hibridización cruzada, señalando que la relación inmunológica que se estableció durante el análisis de la genoteca, se corresponde con aquella detectada a nivel de la secuencia nucleotídica de los insertos. Sobre la base de cinco criterios diferentes, fue posible concluir que los insertos de los clones aislados efectivamente contenían regiones de la secuencia

codificadora de DMAP-85: i) Las proteínas recombinantes codificadas por los insertos de cDNA fueron reconocidas por los anticuerpos purificados por afinidad con DMAP-85; ii) los anticuerpos purificados por afinidad con las proteínas recombinantes reconocían sólo a DMAP-85 en extractos totales de embriones; iii) ensayos de Northern blots, con una sonda derivada de uno de los insertos de cDNA, permitieron detectar un mensajero con un tamaño apropiado para codificar una proteína de 85 kDa, iv) la secuencia peptídica obtenida por microsecuenciación de DMAP-85, se encontraba presente en la secuencia aminoácidica deducida para los insertos de cDNA y v) los patrones de digestión enzimática de DMAP-85 nativa y recombinante, en un estudio de mapas peptídicos, mostraron, prácticamente, un 100% de identidad.

Análisis de hibridación mediante Southern blots y de hibridación *in situ*, en cromosomas politénicos revelaron que el gen que codifica para DMAP-85 está presente una vez en el genoma de *D. melanogaster* y que se encuentra localizado en la región 63C (03-04) del cromosoma tres. Hasta la fecha, se han descrito varios genes mutantes que se localizan en esta región, lo cual constituye un punto de partida apropiado para un análisis genético que tenga como propósito dilucidar la función *in vivo* de DMAP-85.

Debido a que todos los clones obtenidos durante el análisis de la genoteca de expresión carecían del extremo 5' de la secuencia nucleotídica de DMAP-85, se utilizó una estrategia basada en el procedimiento de *nested* PCR descrito por Gibbons y cols., (1991), para amplificar, a partir de otras genotecas de cDNA, un clon que contuviera el extremo faltante (este procedimiento está esquematizado en la Figura 18). Las principales ventajas de este procedimiento radican en que permite amplificar selectivamente segmentos de cDNA, de tal manera que es posible extender una secuencia conocida en una dirección definida, además la cantidad de DNA amplificado puede ser estimada directamente a partir del tamaño de los productos obtenidos. Estos productos pueden ser subclonados con relativa facilidad y secuenciados. Por otra parte, los procedimientos estándares para análisis de genotecas, están basados en el uso de sondas radioactivas, derivadas de

segmentos terminales de secuencia conocida. Estos procedimientos conducen a la obtención de insertos completos que deben ser secuenciados antes de poder definir si contienen o no las regiones de interés. Utilizando este procedimiento de *nested* PCR, fue posible obtener el extremo 5' del cDNA de DMAP-85 y construir un vector que contenía la totalidad de la región codificadora.

El resultado de los análisis de la secuencia nucleotídica de DMAP-85 señala que: el cDNA que codifica para esta proteína contiene 2.697 pb y presenta un único marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de 740 aminoácidos, el cual presenta un peso molecular estimado es de 83,4 kDa, muy similar al calculado para DMAP-85, a partir de geles de poliacrilamida. El hecho de que los patrones de digestión peptídica de la proteína nativa y de la proteína recombinante codificada en el cDNA sean idénticos, así como la presencia de regiones de consenso de iniciación y de término de la traducción, confirma que el marco de lectura está correctamente definido en la secuencia nucleotídica del cDNA obtenido. Un análisis comparativo, en bancos de datos, de la secuencia primaria de DMAP-85 indica que ésta es una nueva proteína que no presenta similitud con MAPs previamente caracterizadas o con otras proteínas de secuencia conocida.

La secuencia aminoacídica inferida de la secuencia del cDNA de DMAP-85, es consistente con los resultados obtenidos previamente acerca de las propiedades fisico-químicas de esta proteína. Un análisis global de hidrofiliidad muestra que DMAP-85 es una molécula hidrofílica con una distribución de centros aniónicos y catiónicos restringida a dominios específicos de la molécula. Sobre la base de su distribución de residuos cargados, DMAP-85 puede ser dividida en cuatro regiones principales: i) un dominio ácido N-terminal de 160 aminoácidos ($pI=5,3$), ii) una región muy básica ($pI=12,5$) de 80 aminoácidos que contiene una alta proporción de residuos cargados, principalmente argininas, iii) una región ácida corta ($pI=4,8$), que también presenta una gran concentración de residuos cargados, principalmente glutámico y iv) un dominio básico C-terminal ($pI=10,8$) que comprende mas del 50% de la molécula. Debido a que el 67% de la proteína presenta un carácter marcadamente básico, el pI global estimado es de 10,1. Este

tipo de organización en dominios ácidos y básicos se encuentra también presente en la estructura primaria de otras MAPs. Así por ejemplo: la secuencia aminoacídica de tau esta compuesta de una región N-terminal ácida, con un $pI=3,7$, una región central básica, con un $pI=10,8$ y una corta región C-terminal ácida (Lee y cols., 1988) (esquemático en Figura 22). Del mismo modo, MAP-2, MAP-4 y 205K MAP son moléculas polares que presentan una región central muy básica ($pI\cong 12,9$) y segmentos ácidos cortos en los extremos N y C-terminal (Lewis y cols., 1988; Irmingier-Finger y cols., 1990; Aizawa y cols., 1989). Debido a que las evidencias indican que la unión a MTs es mediada por interacciones electrostáticas entre el dominio C-terminal ácido de la β -tubulina y dominios básicos de las MAPs (Maccioni y cols., 1988), el dominio N-terminal de estas MAPs correspondería a un dominio de proyección de la molécula, mientras que el dominio C-terminal básico contiene el sitio de unión a MTs.

La mayoría de los dominios de unión a MTs descritos hasta la fecha son básicos, sin embargo difieren en sus secuencias primarias y en sus localizaciones con respecto a los extremos N- y C-terminal de las proteínas que los contienen (Maccioni y Cambiazo, 1995). El dominio de unión a MTs, compartido por MAP2, tau y MAP4, consiste de tres a cuatro repeticiones imperfectas de 18 aminoácidos, caracterizadas por la secuencia PGGG. En cambio, el dominio de unión de CLIP-170, una proteína que media la interacción de vesículas endocíticas con los MTs, presenta repeticiones de la secuencia GKN(D/S)G, la cual se encuentra también presente en las proteínas DP-50 de rata y BIK 1 de levadura (Maccioni y Cambiazo, 1995), este dominio de unión se localiza en el extremo N-terminal de las proteínas mencionadas. Al igual que en la mayoría de las MAPs, el dominio de unión a MTs de DMAP-85 se encuentra en una región básica de la proteína. En este caso, ensayos *in vitro* de unión de proteínas recombinantes truncadas a MTs permitieron identificar una secuencia de 272 aminoácidos, ubicada en la región central de la proteína (residuos 370-642), que es necesaria para que ocurra esta unión. Debido a que las proteínas expresadas en *E. coli* no presentan modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones, se asume que éstas no son necesarias

para la interacción de DMAP-85 con los MTs. Considerando que en la mayoría de las MAPs descritas hasta la fecha el dominio de unión a MTs contiene secuencias aminoacídicas repetidas, es interesante notar que la región de unión de DMAP-85 contiene dos de los tres pares de repeticiones de aminoácidos básicos presentes en la secuencia primaria de esta proteína (esquemático en Figura 22). Cabe destacar que la proteína recombinante codificada por el vector pDM1, la cual no se une a los MTs, contiene regiones muy básicas de la proteína (residuos 161-240 y 328-370), y el primer par de repeticiones. Esta observación sugiere que la naturaleza básica de una región no es por sí misma suficiente para mediar la unión a MTs, sino que, a semejanza con otras MAPs, la unión a MTs de DMAP-85 requiere de secuencias aminoacídicas específicas (Maccioni y cols., 1989; Ennulat y cols., 1989). El dominio de unión a MTs de DMAP-85 no presenta similitud de secuencia con otros dominios caracterizados con anterioridad, incluyendo el de otras proteínas de *D. melanogaster* que interactúan con MTs, tales como: 205K MAP, CP-60, CP-190, Asp y CLIP-190 (Whitfield y cols., 1988; Irminger-Finger y cols., 1990; Kellogg y cols., 1995; Saunders y cols., 1997; Lantz y Miller, 1998). De manera que es muy probable que el dominio de unión a MTs de DMAP-85, corresponda a un dominio aún no descrito. Así mismo, los pares de secuencias repetidas de DMAP-85 no se asemejan a las secuencias repetitivas de otras MAPs, pero son similares entre sí debido a su alto contenido de residuos de serina y arginina.

Por otra parte, la región definida como el dominio de unión de DMAP-85 a MTs es extensa (272 residuos), de manera que al no contar con proteínas recombinantes más pequeñas, que permitan disecar dicha región, no podemos evaluar por separado la participación de las secuencias repetidas o de regiones vecinas en la interacción de DMAP-85 con los MTs. Estudios realizados con MAPs de mamíferos, han demostrado que cada una de sus secuencias repetitivas puede funcionar como un dominio individual de unión a MTs (Gustke y cols., 1994), sin embargo regiones vecinas a éstas aumentan significativamente la capacidad de inducir el ensamblaje de tubulina *in vitro* (Aizawa y cols., 1989; Brandt y Lee, 1993) y la afinidad por MTs *in vivo* (Lewis y cols., 1989), indicando que las

interacciones productivas de las MAPs con los MTs tienen requerimientos estructurales mayores que aquellos contenidos en la estructura primaria de las secuencias repetitivas. En el caso de DMAP-85, este punto no ha sido abordado y sin duda un análisis del efecto de proteínas recombinantes mutadas sobre las cinéticas de ensamblaje de tubulina o parámetros de inestabilidad dinámica de los MTs *in vitro* o *in vivo* permitiría definir, en detalle, las propiedades estructurales de DMAP-85, que dan cuenta de su capacidad de establecer interacciones productivas con el sistema tubulina/MTs.

Una información de interés resulta del análisis de la estructura secundaria de DMAP-85. En términos generales, DMAP-85 contiene poca estructura secundaria, aún cuando presenta una mayor estructuración que algunas MAPs de mamíferos, tales como tau o MAP-2 (Lee y cols., 1988; Kindler y cols., 1990). El dominio de unión a MTs (residuos 370-642) presenta numerosos *loops*, lo cual es consistente con el alto contenido de residuos de arginina en esta región y sugiere que ésta adoptaría una estructura desplegada. De manera similar, el dominio común de unión a MTs de tau, MAP-2 y MAP-4 carece, esencialmente, de estructura secundaria (Lee y cols., 1988; Kindler y cols., 1990; West y cols., 1991). Las dos regiones ácidas de DMAP-85 (residuos 1-160 y 241-320) presentan una mayor probabilidad de formar estructuras de α -hélice y β -plegada, cambiando la conformación espacial de la proteína, en esa región y separando el primer par de secuencias básicas repetidas del dominio C-terminal de la proteína. Si bien, este primer par de repeticiones y las regiones básicas que lo contienen no parecen ser necesarios para la unión *in vitro* de DMAP-85 a MTs, esta región podría formar parte de un dominio de proyección de la molécula o bien contribuir en la interacción de la proteína nativa con los MTs. En este contexto, es interesante mencionar el trabajo de Fellous y cols. (1994), quienes realizaron la digestión de MAP-2 con quimi tripsina, para remover el dominio de proyección, recuperando sólo el dominio de unión. Ellos observaron que el ensamblaje de MTs en presencia del dominio de unión de MAP-2 generó manojos de estos polímeros, los cuales fueron más resistentes a drogas despolimerizantes que los MTs ensamblados en

presencia de la proteína nativa. De esta manera, el dominio de proyección parece modular la interacción de las MAPs con los MTs y su actividad como promotoras del ensamblaje de estos polímeros.

La presencia de múltiples sitios de consenso de fosforilación en la secuencia primaria de DMAP-85, sugiere que la actividad de esta proteína puede estar regulada por fosforilaciones, una posibilidad que se ve reforzada por la observación de que DMAP-85 es fosforilada por proteínas quinasas presentes en extractos embrionarios y larvales. Así, fosforilaciones en distintos sitios de DMAP-85 pueden modular su interacción con MTs u otros componentes del citoesqueleto. Un número importante de estudios ha demostrado que la fosforilación de MAP2 y tau reduce su afinidad por los MTs e interfiere con su capacidad para estabilizarlos (Murthy y Flavin, 1983; Drecshel y cols., 1992; Drewes y cols., 1995; Illenberger, 1996; Drewes y cols., 1997). Estos resultados sugieren que a través de ciclos de fosforilaciones y desfosforilaciones de MAPs se puede regular los patrones de interacciones entre MAPs y MTs, que en definitiva contribuyen a modular la dinámica microtubular *in vivo* (Lee, 1993; Maccioni y Cambiasso, 1995). La mayor parte de las evidencias que sustentan la existencia de este mecanismo provienen de estudios con MAPs neuronales. Sin embargo, en los últimos años, un análisis detallado del efecto de fosforilaciones de MAPs sobre la dinámica y organización de los MTs durante el ciclo celular, sugiere que este mecanismo también opera cuando los MTs de interfase son rápidamente desensamblados y reemplazados por MTs altamente dinámicos que estructuran el huso mitótico (Salmon y cols., 1984; Saxton y cols., 1984). En células no neuronales se han identificado y caracterizado, principalmente dos MAPs, MAP-4, en mamíferos y XMAP en *Xenopus laevis*. Ambas son fosforiladas al inicio de la mitosis por el complejo p34^{cdc2}/ciclina B y experimentos *in vitro* demuestran que esta modificación disminuye su capacidad de unirse a MTs y de inducir el ensamblaje de tubulina (Vandre y cols., 1991; Andersen y cols., 1994; Ookata y cols., 1995). Estos resultados han llevado a plantear un modelo común, en el cual los MTs de interfase serían estabilizados por MAPs desfosforiladas, mientras que la fosforilación de estas proteínas en mitosis

inactivaría su efecto estabilizante. DMAP-85, presenta numerosos sitios de consenso para la actividad de proteína quinasa C (PKC) y algunos sitios de consenso para proteína quinasa dependiente de cAMP y caseína quinasa II. Estas tres quinasas tienen como sustratos comunes a MAPs de mamíferos, y su actividad tiene como consecuencia una reducción en la capacidad de las MAPs de inducir el ensamblaje de MTs y de interactuar con MFs (Hoshi y cols., 1987; Steiner y cols., 1990; Ainsztein y Purich, 1994). En este sentido, no es sorprendente que PKC se encuentre involucrada en el paso de información de señales extracelulares que inducen una rápida reorganización del citoesqueleto (Nishizuka, 1984; Minana y cols., 1990; Couratier y cols., 1996). Notablemente, DMAP-85 contiene 20 sitios de fosforilación para PKC, el 50% de ellos se encuentran concentrados en una región que comprende el 30% de la proteína y que hemos definido como el dominio responsable de su unión a MTs. Esta concentración de probables sitios de fosforilación en una región discreta de DMAP-85, la cual carece, esencialmente, de estructura secundaria, nos permite sugerir que fosforilaciones de DMAP-85 mediadas por PKC serían importantes para definir el patrón de interacción de esta proteína con MTs.

Nuestra evidencia acerca de la distribución subcelular de DMAP-85, indica que esta proteína se asocia exclusivamente con MTs de interfase (ver más adelante), sugiriendo la existencia de un mecanismo que regula la interacción de DMAP-85 con los MTs, durante el ciclo celular. En este mismo contexto se ha descrito que uno de los sustratos de la quinasa mitótica polo de *D. melanogaster* (Tavares y cols., 1996), sería una MAP de 85 kDa. Esta quinasa pertenece a una familia conservada de serina/treonina quinasas, que presentan una actividad máxima durante metafase y anafase del ciclo mitótico (Fenton y Glover, 1993). La proteína de 85 kDa, descrita por Tavares y cols. (1996) copolimeriza con MTs estabilizados con taxol e inmunoprecipita con β -tubulina, en extractos de embriones, revelando un comportamiento similar al descrito para DMAP-85 y sugiriendo que podría tratarse de la misma proteína (Tavares y cols., 1996). Si efectivamente DMAP-85 es uno de los sustratos de la quinasa polo, es posible

suponer que, durante la mitosis, fosforilaciones mediadas por esta quinasa afectarían la interacción de DMAP-85 con MTs comprometidos en la formación del huso mitótico.

Otra característica interesante, derivada del análisis de la estructura primaria de DMAP-85, es la presencia de una secuencia N-terminal que posee una similitud significativa con parte del dominio de unión a actina presente en varias ABPs, de *D. melanogaster* y de otras especies. Estas ABPs comparten una secuencia común de aproximadamente 250 residuos, localizada en su extremo N-terminal. Cada una de ellas interactúa con F-actina a través de este dominio de unión y su capacidad de formar homodímeros les permite inducir la formación de haces o el entrecruzamiento de los microfilamentos. DMAP-85 comparte con estas proteínas, 36 residuos de su extremo N-terminal. Esta observación junto con la evidencia que DMAP-85 es capaz de asociarse a MFs *in vitro* (ver mas adelante), sugiere que la similitud estructural del dominio de 36 residuos puede ser el responsable de la interacción de DMAP-85 con los MFs. De manera similar, Saunders y cols. (1997), han descrito a la proteína Asp de *D. melanogaster*, la cual interactúa con MTs y comparte con varias ABPs una secuencia de 25 residuos, que es parte de su sitio de unión a actina. Este es un aspecto interesante de analizar, considerando que, a diferencia de otras MAPs o de otras proteínas capaces de interactuar con MTs, DMAP-85 y Asp presentan un dominio de unión a actina que es conservado entre las ABPs. Estas observaciones sugieren que tanto DMAP-85 como Asp son capaces de establecer una relación funcional con MFs que es divergente de la relación que establecen las MAPs de mamíferos. La significación de la interacción entre DMAP-85 y MFs será discutida en el contexto de la distribución subcelular de esta proteína durante el desarrollo embrionario.

A partir de los análisis de secuencia aminoacídica de tubulinas y MAPs identificadas en diferentes grupos filogenéticos (Burns, 1991; Maccioni y Cambiazo, 1995) las proteínas que componen el citoesqueleto microtubular pueden ser divididas en dos grandes categorías, de acuerdo con el grado de conservación en su estructura primaria. La primera, reúne a las subunidades estructurales de los MTs

(α y β tubulinas) y γ -tubulina que presentan un alto grado de conservación filogenética y el segundo contiene a las MAPs con una estructura primaria divergente. De tal manera que, desde un punto de vista evolutivo, el citoesqueleto microtubular parece ser una estructura sometida a fuertes restricciones en el grado de variabilidad de sus componentes básicos, mientras que las proteínas que regulan la organización de esta estructura y sus respuestas a las demandas funcionales de la célula, las MAPs, han acumulado un mayor grado de variación estructural. En este proceso, sin embargo, se han mantenido aquellas propiedades de su estructura que les confieren convergencia funcional. Probablemente esta diversificación estructural de las MAPs responde a variaciones del contexto (por ejemplo: invertebrados v/s vertebrados) en el cual han evolucionando y pueden reflejar diferencias en los mecanismos de regulación que operan sobre ellas.

III. DISTRIBUCION DE DMAP-85 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y ANALISIS DE SU RELACION CON EL CITOESQUELETO

El análisis de los estudios *in vitro* de la interacción de DMAP-85 con el sistema tubulina/MTs sugiere que esta proteína funciona como una MAP en *D. melanogaster*. El análisis de las propiedades estructurales de DMAP-85 refuerza esta posibilidad y señala, además, una posible relación de esta proteína con el sistema de actina/MFs. Sobre la base de estos antecedentes, se abordó en esta Tesis el estudio de la distribución de DMAP-85, a lo largo del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, como una forma de evaluar *in vivo* las funciones inferidas para esta proteína. Con este propósito, examinamos la posición relativa de DMAP-85 en relación con los demás componentes del citoesqueleto embrionario y evaluamos cómo esta distribución se ve afectada en las diferentes situaciones que modulan la organización del citoesqueleto a lo largo del desarrollo.

Nuestras observaciones acerca de la distribución de DMAP-85, en el estado

de blastodermo sincicial, no señalan una relación espacial aparente entre esta proteína y el citoesqueleto de actina o de MTs. En esta etapa inicial del desarrollo, los MTs se encuentran formando parte del huso mitótico mientras que los MFs forman *caps* sobre el núcleo o una red asociada con los pseudotabiques. La localización uniforme de DMAP-85 en el citoplasma que rodea a los núcleos (Figura 44) señala que esta proteína no segrega con MTs o MFs, aún cuando las condiciones de permeabilización, utilizadas en estas preparaciones, exigen que DMAP-85 se encuentre asociada a elementos estructurados del citoplasma, cuya naturaleza no ha sido determinada en el presente estudio, quedando también abierta la posibilidad de un autoensamblaje de esta proteína. Considerando que tanto las evidencias generadas en los estudios bioquímicos y estructurales de DMAP-85 como el análisis de su distribución en etapas posteriores del desarrollo, indican claramente que esta proteína interactúa con los componentes del citoesqueleto, es posible plantear que la interacción de DMAP-85 con MTs y/o MFs se encuentra bloqueada por otras proteínas presentes en este estado, o bien que DMAP-85 requiere de una modificación estructural para que ocurra esta interacción.

Inmediatamente después de la formación del blastodermo sincicial tiene lugar la primera citocinesis que conduce a la formación de un blastodermo celular. En esta etapa (ciclo nuclear 14) DMAP-85 se concentra en dominios corticales donde colocaliza con la red de MFs que contribuye a la estructuración de los tabiques divisorios (Figura 44). En estos embriones, DMAP-85 presenta un patrón de distribución prácticamente indistinguible del observado para β -espectrina. Por otra parte, esta proteína no presenta una relación espacial definida con las estructuras microtubulares dominantes en este estado. De esta forma y en contraposición a lo esperado para una MAP, la primera asociación de DMAP-85 con los componentes del citoesqueleto embrionario, tiene lugar con los MFs. En este contexto, los estudios *in vitro* de la asociación de DMAP-85 con actina ponen de manifiesto la capacidad de esta proteína de interactuar con MFs, posiblemente a través de un sitio conservado de unión a actina que se encuentra presente en su dominio N-terminal. Cabe destacar que en esta etapa del desarrollo embrionario

comienza la transcripción de los genes del cigoto, las mitosis se hacen más lentas y pierden sincronización, al mismo tiempo se expresan proteínas con funciones esenciales para la formación de los tabiques celulares permanentes. Es posible suponer que DMAP-85 participa en el proceso de celularización, en virtud de su capacidad de asociarse a MFs en los tabiques divisorios.

Sin embargo, nuestras observaciones no nos permiten descartar que una fracción de DMAP-85 se asocie con la población de MTs presente en los dominios corticales de las células en formación. En este contexto, la coimmunoprecipitación de DMAP-85 con actina y tubulina, en extractos de embriones en celularización, refuerza la posibilidad de que esta proteína interactúe con ambos grupos de filamentos. Se ha descrito que durante el proceso de celularización los MFs y los MTs se encuentran en estrecho contacto y experimentan una serie concertada de reorganizaciones estructurales. Si bien, poco se conoce acerca del mecanismo de esta interacción, se ha sugerido la existencia de componentes que interconectan estos dos grupos de filamentos (revisado en: Schejter y Wieschaus, 1993a). De esta manera, la presencia de DMAP-85 en el dominio cortical de las células sugiere una función de esta proteína como mediadora de las interacciones entre MTs y MFs. Este tipo de interacciones entre los componentes del citoesqueleto no es exclusivo de los embriones de *D. melanogaster*. Todas las células deben coordinar la distribución y la morfología de las estructuras de MTs y MFs, y el ejemplo más directo de esto es la reorganización orquestada de los componentes del citoesqueleto durante la adquisición de una forma celular específica. Por otra parte, la propiedad de asociarse tanto a MTs como a MFs, ha sido descrita previamente para MAPs neuronales, tales como: tau, MAP-2 y MAP-1B (Satillaro y cols., 1981; Griffith y Pollard, 1982; Cross y cols., 1992; Pedrotti y cols., 1994) y para otros componentes del citoesqueleto, tales como Mip-90 (González y cols., 1998), espectrina, p150^{Glu} y caldesmon (Langford, 1995; González y cols., 1998). Sin embargo, el embrión de *D. melanogaster* presenta la ventaja de poseer una organización uniforme, regularmente espaciada y altamente repetitiva de las estructuras formadas por MTs y MFs, lo cual simplifica la detección de alteraciones

en la organización del citoesqueleto. Más aún, alteraciones en la función de éste pueden tener consecuencias significativas durante el desarrollo. Esto convierte al embrión de *D. melanogaster* en un excelente sistema para definir, mediante la generación de embriones portadores de mutaciones en el gen *dmap-85*, la función de esta proteína en la regulación de la organización del citoesqueleto embrionario.

Al finalizar el proceso de celularización, comienzan los cambios de forma y los movimientos celulares que caracterizan a la etapa de gastrulación. Debido a que existen escasas publicaciones acerca de la organización del citoesqueleto microtubular en la fase inicial de la gastrulación, se realizó un estudio en detalle de la distribución de los MTs. Los resultados de estos análisis indicaron que, de manera similar a lo observado durante la celularización, una fracción de los MTs se proyecta desde la zona cortical hacia el citoplasma manteniéndose, el resto de ellos asociados a los dominios corticales. Es interesante destacar que en este estado se detecta la presencia de haces de MTs, conteniendo tubulinas acetiladas, tanto en el citoplasma como en la región cortical. Esto señala el establecimiento de poblaciones de MTs estables, las cuales se encontraban ausentes en los estados anteriores. Nuestros estudios y los realizados por otros grupos de investigación (Wolf y cols., 1988; Warn y cols., 1990b) señalan que, durante el estado de blastodermo, los ciclos de divisiones nucleares son extremadamente rápidos, y la gran mayoría de los MTs corresponden a polímeros altamente dinámicos comprometidos en la formación de husos mitóticos. Una vez ocurrida la celularización y al iniciarse la gastrulación, se pierde la sincronización de las divisiones mitóticas y se encuentran los primeros MTs de interfase, los que permanecen ensamblados el tiempo suficiente para acumular niveles detectables de tubulinas modificadas.

Al iniciarse la gastrulación, se detecta también un cambio en el comportamiento de DMAP-85. Si bien esta proteína se distribuye en forma preferente en el dominio cortical de las células, estudios de doble inmunofluorescencia, permitieron observar un cambio en su patrón de distribución, revelando una colocalización de DMAP-85 en haces de MTs citoplasmáticos. Por

otra parte, la presencia de MTs conteniendo tubulinas acetiladas en el dominio cortical permiten sugerir una asociación de DMAP-85 con estos MTs, la cual se hace evidente en etapas posteriores del desarrollo. Durante los estados de post-gástrula (embriones de estado 8-11), se observa una reorganización notable de DMAP-85, la cual se distribuye exclusivamente en el citoplasma donde colocaliza con los MTs de células en interfase. De esta forma vemos que DMAP-85 cambia su distribución desde una posición preferentemente cortical, en la etapa de celularización, a una distribución exclusivamente citoplasmática en la etapa de post-gástrula (Figura 44). Este cambio de distribución coincide con la formación de un citoesqueleto microtubular citoplasmático. Durante este proceso se observa un incremento en el grado de colocalización entre DMAP-85 y los MTs y una pérdida concomitante de su relación espacial con MFs. Así, nuestras observaciones acerca de la relación espacial entre DMAP-85 y MTs de células en interfase, sugieren que esta proteína participa en la formación y/o estabilización de estos MTs *in vivo*. Esta posibilidad es consistente con las evidencias obtenidas en los estudios *in vitro*, las cuales apuntan a una función de DMAP-85 en la inducción del ensamblaje de los MTs y en su estabilización. Estos resultados sugieren también la existencia de mecanismos que regulan la asociación diferencial de DMAP-85 a MTs y a MFs en las diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Considerando que la redistribución de DMAP-85 tiene lugar en un breve periodo de tiempo (10 a 40 min) es probable que, modificaciones estructurales de DMAP-85 (por ejemplo, fosforilaciones/desfosforilaciones, interacciones con otras proteínas) determinen cambios en su afinidad relativa por MTs y/o MFs. La existencia de numerosos sitios de consenso para la actividad de proteínas quinasas en la estructura primaria de DMAP-85, sugiere un posible mecanismo de regulación del patrón de interacción observado para esta proteína. En este sentido, estudios en progreso han demostrado que DMAP-85 es fosforilada por quinasas presentes en extractos embrionarios.

La última fase del desarrollo, analizada en este estudio, corresponde a embriones de estado 15. En esta etapa el sistema nervioso se condensa haciendo

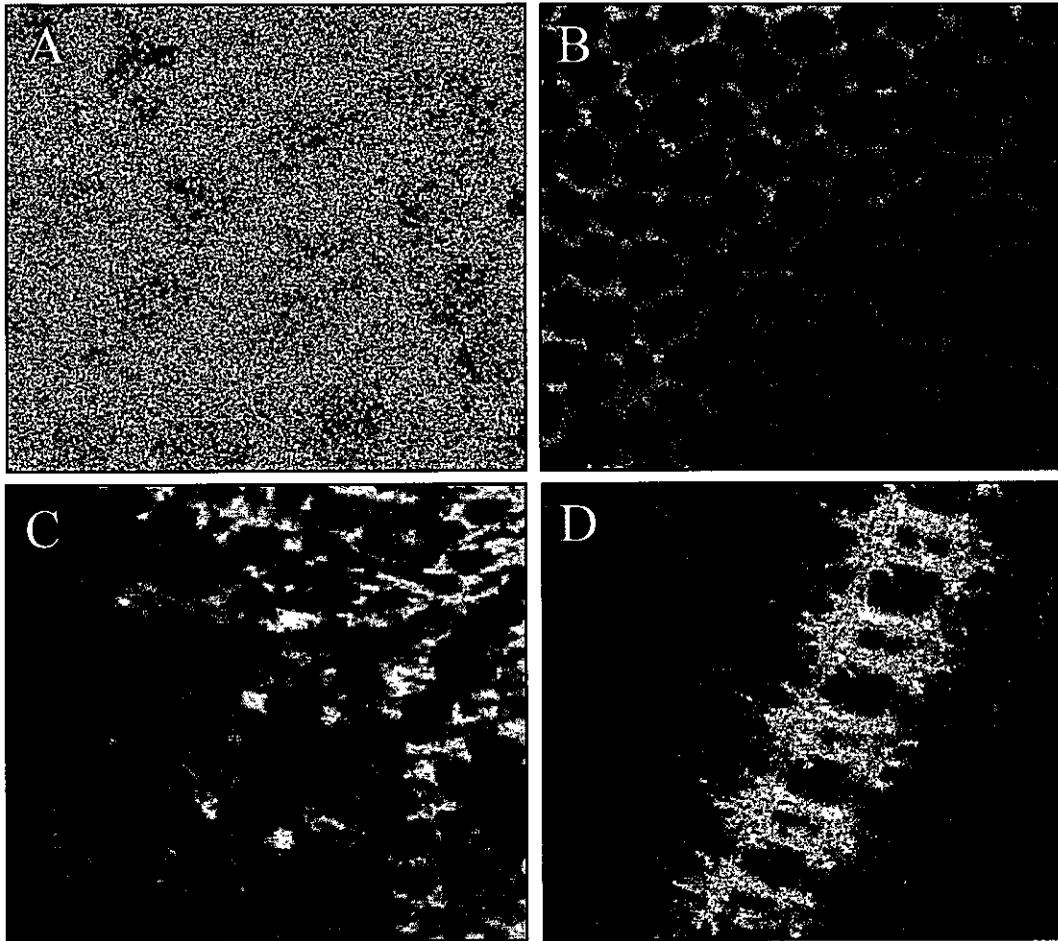


Figura 44: RESUMEN DE LA DISTRIBUCION DE DMAP-85 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *D. melanogaster*. Todas las imágenes corresponde a secciones ópticas de montajes completos de embriones en diferentes estados de desarrollo. **A:** blastoderma sincicial, DMAP-85 presenta una distribución citoplasmática punteada y uniforme; **B:** blastoderma celular, DMAP-85 se localiza en los dominios corticales de las células; **C:** estado 8, DMAP-85 se distribuye a lo largo de todo el citoplasma de las células en interfase y **D:** estado 15, DMAP-85 se encuentra principalmente en las proyecciones axonales que forman el cordón nervioso ventral. Estos embriones fueron procesados para inmunofluorescencia, teñidos con el anticuerpo DMAP.1 y analizados por microscopía confocal.

evidente la estructura del cordón ventral, formado por numerosas proyecciones axonales que emanan desde los cuerpos celulares que lo rodean. Nuestros estudios de inmunofluorescencia permitieron visualizar a DMAP-85, principalmente, en el sistema nervioso central del embrión (Figura 44). Esta distribución nuevamente indica una asociación de DMAP-85 con MTs, los cuales se encuentran altamente enriquecidos en las células neuronales. Mas aún, DMAP-85 colocaliza con MTs conteniendo tubulinas acetiladas, los cuales son muy abundantes en este estado del desarrollo y se concentran en las proyecciones axonales. Análisis realizados en células disgregadas del sistema nerviosos central de larvas, permitieron observar que DMAP-85 se encuentra también presente en los cuerpos neuronales, sin embargo, esta proteína, se concentra en las proyecciones. Sobre la base de estas observaciones, es posible sugerir una asociación preferente de DMAP-85 con poblaciones de MTs conteniendo tubulinas acetiladas. Esta estrecha relación entre DMAP-85 y MTs estables sugiere, al igual que en la etapa de gastrulación, una participación de esta proteína en la formación y estabilización de subpoblaciones de estos polímeros.

¿Qué funciones estaría cumpliendo DMAP-85 durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*?. La propiedad de DMAP-85 de interactuar con un dominio funcional de la tubulina y su capacidad para inducir el ensamblaje de tubulina, nos llevan a plantear que una de las funciones de DMAP-85 sería la regulación del estado de ensamblaje de los MTs. De manera consistente con esta proposición, tanto el patrón de distribución de DMAP-85 durante el desarrollo embrionario, como su relación con el citoesqueleto, indican que esta proteína cumpliría funciones equivalentes a aquellas propuestas para MAPs de mamíferos. DMAP-85 no se asocia con MTs altamente dinámicos, comprometidos en la formación de husos mitóticos. En cambio, esta proteína codistribuye con MTs de interfase y con subpoblaciones de MTs estables, sugiriendo, que DMAP-85 favorecería el establecimiento de MTs de interfase durante la transición blastodermo-sincicial→blastodermo-celular/gastrula, y participaría en la organización del citoesqueleto de MTs, a través de una modulación de la dinámica

microtubular, la cual se traduciría en un aumento de la vida media de estos polímeros.

Por otra parte, tanto las características estructurales de DMAP-85, como su comportamiento *in vitro* y su patrón de distribución en determinados estados del desarrollo sugieren que esta proteína es un buen candidato para mediar las interacciones entre MTs y MFs y de esta manera participar en la coordinación de estos componentes del citoesqueleto. La presencia de un dominio de unión a actina en el extremo N-terminal de DMAP-85 sugiere que la localización de esta proteína en las regiones corticales, durante la celularización del embrión, sería importante para mediar interacciones entre los MTs y los MFs. Durante la etapa de celularización, existe una asociación estrecha entre MTs y MFs. En estos embriones el inicio de la celularización depende de la integridad del citoesqueleto microtubular, lo cual ha sido demostrado mediante la inyección de colchicina o anticuerpos anti-tubulina durante la interfase del ciclo nuclear 14 (Foe y Alberts, 1983; Warn y cols., 1987). En relación con esto, se ha descrito que una población de MTs, que se extiende en forma simétrica desde cada polo del huso mitótico y se asocia a la membrana plasmática que forma los tabiques celulares. Si bien no se conoce la naturaleza de la(s) señal(es) que coordina la organización de MTs y MFs durante la celularización, es posible que una molécula con las características de DMAP-85 pueda cumplir este papel.

DMAP-85 experimenta un notable cambio de distribución durante la embriogénesis, lo cual sugiere que la afinidad de esta proteína por MTs y por MFs se encuentra regulada durante el desarrollo. Sobre la base de trabajos realizados por numerosos grupos de investigación y de los resultados de esta tesis, es posible plantear que afinidad relativa de DMAP-85 por MTs y MFs sería la resultante de la actividad quinasas/ fosfatasas y/o de la presencia de otras proteínas capaces de interactuar con DMAP-85 y de afectar su asociación con estos polímeros. Así por ejemplo, un aumento en el número de residuos fosforilados o la fosforilación de sitios específicos de esta molécula, inhibirían su asociación con MTs y MFs, en etapas tempranas de la embriogénesis. La posibilidad de que la interacción de

DMAP-85 con MTs y MFs sea dependiente de la presencia de otros componentes podría explicar, por ejemplo, que DMAP-85 se encuentre asociada con MFs sólo durante el estado de celularización. En este caso es posible suponer una interacción de DMAP-85 con ABPs tales como serendipity- α , nullo o bottleneck, las cuales se expresan exclusivamente en el estado de blastodermo celular y participan en la estructuración y /o organización de la red de MFs asociada a los tabiques divisorios. Sin duda un análisis *in vitro* de modificaciones post-traduccionales, específicamente fosforilaciones, de DMAP-85, permitiría analizar el efecto de éstas sobre la interacción productiva de DMAP-85 con el sistema tubulina/MTs y establecer un paralelo con los resultados de su distribución subcelular durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, utilizando las herramientas de la genética molecular sería posible evaluar la función *in vivo* de DMAP-85, mediante la identificación de mutaciones en el gen que codifica para esta proteína y analizar el efecto estas mutaciones sobre la organización del citoesqueleto embrionario.

CONCLUSIONES

1. Durante el desarrollo de esta Tesis logré identificar una nueva proteína asociada a microtúbulos, en diferentes estados del desarrollo de *D. melanogaster*. Esta proteína, DMAP-85, es hasta ahora la única proteína del citoesqueleto de este organismo que se comporta funcionalmente como las MAPs de mamíferos.
2. DMAP-85 interactúa con regiones expuestas en la superficie microtubular, específicamente, con la secuencia β II(422-434) contenida en el dominio C-terminal de la tubulina e induce el ensamblaje de ésta en microtúbulos.
3. DMAP-85 cosedimenta con polímeros de tubulina y con microfilamentos de actina, siendo capaz de co-inmunoprecipitar con ambos componentes, lo cual sugiere que DMAP-85 es capaz de asociarse a ambos tipos de filamentos.
4. Esta MAP de *D. melanogaster* fue clonada a partir de una genoteca de expresión y secuenciada. La secuencia aminoacídica inferida de la secuencia nucleotídica,

señala como características relevantes que DMAP-85 es una proteína hidrofílica con un pI estimado de 10,1 y una distribución de cargas que divide a la proteína en dominios ácidos y básicos.

5. En la secuencia primaria de DMAP-85 se encuentran numerosos sitios de consenso de fosforilación para serina/treonina quinasas y una región que comparte similitud con el dominio de unión a actina presente en varias proteínas que interactúan con microfilamentos.

6. Utilizando proteínas recombinantes truncadas, se analizó el dominio de unión a microtúbulos, encontrándose una región básica de 272 aminoácidos que es necesaria para que ocurra esta interacción.

7. DMAP-85 se encuentra presente a lo largo de todo el desarrollo embrionario. Esta proteína codistribuye con microfilamentos de actina, en dominios corticales, durante el estado de blastodermo celular. Su capacidad de interactuar tanto con MTs como con MFs, sugieren que DMAP-85 podría mediar las interacciones entre ambos tipos de filamentos. Esto es consistente con la presencia de una región de unión a MTs en la porción central de la proteína y de una posible región de unión a actina en su extremo N-terminal.

8. Posteriormente en el desarrollo, cuando se establece una red microtubular citoplasmática, propia de células en interfase, DMAP-85 colocaliza con los MTs en toda la extensión de esta red, sugiriendo que esta proteína cumpliría funciones equivalentes a aquellas propuestas para MAPs de mamíferos, en cuanto a su capacidad de estabilizar MTs. Consistente con una función estabilizadora de DMAP-85, es su distribución preferente en las prolongaciones neuronales del sistema nervioso del embrión, donde colocaliza con MTs conteniendo tubulinas acetiladas.

BIBLIOGRAFIA

- Ainsztein, A.M. and Purich, D.L. 1994. Stimulation of tubulin polymerization by MAP-2. Control by protein kinase C-mediated phosphorylation at specific sites in the microtubule-binding region. *J. Biol. Chem.* 269: 28465-28471.
- Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Susuki, K. & Sakai, H. 1989. A common aminoacid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 264: 5885 - 5890.
- Andersen, S.S., Buendia, B., Dominguez, J.E., Sawyer, A. and Karsenti, E. 1994. Effect on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in *Xenopus laevis* eggs and dividing cells. *J. Cell Biol.* 127:1289-1299.
- Barra, H.S., Arce, C.A. and Argarana, C.E. 1988. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol. Neurobiol.* 2:133-153.
- Bhattacharayya, B., Sackett, D.L. and Wolff, J. 1985. Tubulin hybrid dimers, and tubulin S. Stepwise charge reduction and polymerization. *J. Biol. Chem.* 260:10208-10216.
- Black, M.M., Baas, P.W. and Humphries, S. 1989. Dynamic of alpha-tubulin deacetylation in intact neurons. *J. Neurosci.* 9:358-368.
- Bloom, G., Luca, F.C. and Vallee, R.B. 1985. Identification of high molecular weight microtubule-associated proteins in anterior pituitary tissue and cells using taxol-dependent purification combined with microtubule-associated protein specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5404-08.

- Boucher, D., Larcher, J.C., Gros, F. and Denoulet, P. 1994. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of *in vitro* interactions between the microtubule-associated protein Tau and tubulin. *Biochemistry*. 1994 **33**: 12471-12477.
- Brandt, R. and Lee, G. 1993. Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**: 3414-3419.
- Bulinsky, J. and Borisy, G.G. 1979. Self-assembly of microtubules in extracts of cultured HeLa cells and the identification of HeLa microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 293-297.
- Burns, R.G. 1991. α -, β -, and γ -tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil. Cytoskel.* **20**:181-189.
- Cáceres, A. and Kosik, K.S. 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**: 461-63.
- Cáceres, A., Mauttino, J. and Kosik, K. 1992. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* **9**:607-618.
- Callaini, G. and Marchini, D. 1989. Abnormal centrosomes in cold-treated *Drosophila* embryos. *Exp Cell Res.* **184**: 367-374.
- Callaini, G., Riparbelli, M.G. 1992. Involvement of microtubules and microfilaments in centrosome dynamics during the syncytial mitoses of the early *Drosophila* embryo. *Exp. Cell. Res.* **201**: 241-244.
- Cambiazio, V., González, M. and Maccioni, R.B. 1995. DMAP-85: A Tau-like Protein from *Drosophila melanogaster* Larvae. *J. Neurochem.* **64**: 1288-1297.

- Cambiazio, V. Couchie, D., Nunez, J., González, M. and Maccioni, R.B. 1996a. Cloning of a gene encoding a *Drosophila* microtubule associated protein. *Mol. Biol. Cell* 7:570a.
- Cann, J., York, E., Stewart, J., Vera, J.C. 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. *Anal. Biochem.* 175: 462-473.
- Carrier, M.F. 1989. Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* 115:139-170.
- Cassimeris, L., Pryer, N.K. and salmon, E.D. 1988. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 107:2223-2231.
- Cavener, D.R. 1987. Comparison of the consensus sequences flanking translational start sites in *Drosophila* and in vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 15:1353-1361.
- Cervera, M., Domingo, A., Vinos, J. and Marco, R. 1987. *Drosophila melanogaster* contains a set of polypeptides capable of polymerizing into intermediate-like filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144:1043-48.
- Cleveland, D.W., Fisher, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252:1102-1106.
- Cleveland, D.W. 1990. Microtubule MAPping. *Cell.* 60: 701-702.
- Correas, I., Diaz-Nido, J. and Avila, J. 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 267:

15721-15728.

Couratier, P., Lesort, M., Condamines, O., Mourton-Gilles, C., Delacourte, A. and Hugon, J. 1996. Phorbol ester enhances phosphorylated tau protein immunoreactivity in neuronal cultures. *Neurosci. Lett.* **203**: 155-158.

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

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

Cross, D., Tapia, L., Garrido, J. and Maccioni R.B. 1996. Tau-like proteins associated with centrosomes in cultured cells. *Exp. Cell Res.* **229**:378-387.

De Brabander, M.; Bulinski, J., Geuens, G., De Mey, J. and Borisy, G. 1981. Microtubule assembly in living cells after release from nocodazole block: the effects of metabolic inhibitors, taxol and pH. *J. Cell Biol.* **91**:438 - 45.

de Frutos, R., Kimura, K. and peterson, K.R. 1989. In situ hybridation of *Drosophila* polytene chromosomes with digoxigenin-dUTP labelled probes. *Trends Genet.* **5**:366-368.

de la Viña, S., Andreu, D., Medrano, F.J., Nieto, J.M. y Andreu, J.M. 1988. Tubulin structure probed with antibodies to synthetic peptides. Mapping of three major types of limited proteolysis fragments. *Biochemistry* **27**:5352-5365.

Diaz-Nido, J., Serrano, L., López-Otín, C., Vandekerckhove, J. and Avila, J. 1990. Phosphorylation of a neuronal-specific β -tubulin isotype. *J. Biol. Chem.* **265**:13949-

13954.

Doll, T., Meichsner, M., Riederer, B.M., Honegger, P. and Matus, A. 1993. an isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin binding domain. *J. Cell Sci.* **106**:633-640.

Dreschel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule associated protein tau. *Mol. Biol. Cell.* **3**:1141-1154.

Drewes, G., Trinczek, B., Illenberg, S., Biernart, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E. Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. 1996. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110^{mark}). *J. Biol. Chem.* **270**:7679-7688.

Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**:297-308.

Dustin, P. 1984. *Microtubules*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

Edde, B., Rosier, J., Le Caer, J-P., Desbruyeres, E., Gros, F. and Denoulet, P. 1990. Postranslational glutamylation of α -tubulin. *Science* **247**:83-83.

Edgard, B.A. and O'Farrell, P.H. 1989. Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**:177-187.

Erickson, H.P. and O'Brien, E.T. 1992. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**:145-166.

- Evans, L., Mitchinson, T. and Kirschner, M. 1985. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* **100**:1185-1191.
- Fellous, A., Prasad, V., Ohayon, R., Jordan, M.A. and Ludueña, R.F. 1994. Removal of the projection domain of microtubule-associated protein 2 alters its interaction with tubulin. *J. Protein Chem.* **13**:381-391.
- Foe, V.E. and Alberts, B.M. 1983. Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Sci.* **61**:31-70.
- Foe, V.E. 1989. Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* **107**:1-22.
- Fullilove, S.L. and Jacobson, A.G. 1971. Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila montana*. *Dev. Biol.* **26**: 560-577.
- Fyrberg, E.A., Bond, B.J., Hershey, N.D., Mixter, K.S. and Davidson, N. 1981. The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. *Cell* **24**:107-16.
- Fyrberg, E.A., Kindle, K.L., Davodson, N. and Sodja, A. 1980. The actin genes of *Drosophila*: a dispersed multigene family. *Cell* **19**:365-78.
- Fyrberg, E.A. and Goldstein, L. The *Drosophila* cytoskeleton. 1990. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**:559-96
- Gard, D.L. and Kirschner, M.W. 1987. A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* **105**:2203-2215.

- Gibbons, I.R., Asai, D.J., Ching, N.S., Dolecki, G.J., Mocz, G., Phillipson, Ch.A., Ren, H., Tang, W-J. and Gibbons, B.H. 1991. A PCR procedure to determine the sequence of large polypeptides by rapid walking through a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:8563-8567.
- Glover, D.M., Ohkura, H. and Tavares, A. 1996. Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage?. *J Cell Biol.* **135**:1681-1684.
- Goldstein, L.S.B., Laymon, R.A., McIntosh, J.R. 1986. A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*: identification, characterization and isolation of coding sequences. *J. Cell Biol.* **102**:2076-87.
- Gonzalez, M., Cambiazo, V. and Maccioni, R.B. 1995. Identification of a new microtubule-interacting protein Mip-90. *Eur. J. Cell. Biol.* **67**: 158-169.
- Gonzalez, M., Cambiazo, V. and Maccioni, R.B. 1998. The interaction of Mip-90 with microtubules and actin filaments in human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* **239**: 243-253.
- Greer, K., Maruta, H., L'Hernault, S.W. and Rosenbaum, J.L. 1985. Alpha-tubulin acetylase activity in isolated *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell. Biol.* **101**:2081-2084.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. 1994. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry.* **33**: 9511-9522.
- Guzmán, L., Bustos, R. y Maccioni, R.B. 1994. Purification and characterization of the high molecular weight microtubule associated proteins from neonatal rat brain. *Molec. Cell. Biochem.* **131**: 105-113.
- Henikoff, S. and Henikoff, J.G. 1991. Automated assembly of protein blocks for

database searching. *Nucleic Acids Res.* **19**:6565-6572.

Henríquez, J.P., Cambiazo, V. and Maccioni, R.B. 1996. Tubulin Domains for the Interaction of Microtubule-Associated Protein DMAP-85 from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biochem.* **158**:149-159.

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., Hirokawa, N. 1994. Altered microtubule organization in small calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**:488-491.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Hemphill, A., Affolter, M. y Seebeck, T. 1992. A novel microtubule-binding motif identified in a high molecular weight microtubule-associated protein from *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* **117**:95-103.

Herzog, W. and Weber, K. 1977. *In vitro* assembly of pure tubulin into microtubules in absence of microtubule-associated proteins and glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1860-1864.

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. 1994. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* **6**:74-81.

Horio, T. and Hotani, H. 1986. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**:605-607.

- Hoshi, M., Nishida, E., Miyata, Y., Sakai, H., Miyoshi, T., Ogawara, H. and Akiyama, T. 1987. Protein kinase C phosphorylates tau and induces its functional alterations. *FEBS Lett.* 1987 Jun 15; 217(2): 237-241.
- Hoyle, H.D. and Raff, E.C. 1990. Two *Drosophila* β -tubulin isoforms are not functional equivalent. *J. Cell. Biol.* 111:1009-1026.
- Hyman, A.A., Salser, A.S., Drechsel, D.N., Unwin, U. and Mitchinson, T.J. 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analog GMPCPP. *Mol. Biol. Cell* 3:1155-1167.
- Hyman, A.A. and Karsenti, E. 1996. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 84:401-410.
- Illenberg, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernart, Meyer, H.E. Olmsted, J.B., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. 1996. Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110^{mark}. *J. Biol. Chem.* 271:10834-10843.
- Irminger-Finger, I., Laymon, R.A. y Goldstein, L.S.B. 1990. Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the *Drosophila* 205K MAP. *J. Cell. Biol.* 11: 2563-2572.
- Joshi, H.C. and Cleveland, D.W. 1989. Differential utilization of β -tubulin isotypes in differentiating neurites. *J. Cell Biol.* 109:663-673.
- Kaech, S., Ludin, B. and Matus, A. 1996. Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins. *Neuron* 17:1189-1199.
- Kanai, Y., Takemura, T., Oshima, T., Mori, H., Ihara, Y., Yanagisawa, M., Masaki, T.

- and Hirokawa, N. 1989. Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau gen. *J. Cell. Biol.* **109**:1173-84.
- Karr, T.L. and Alberts, B.M. 1986. Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos. *J. Cell. Biol.* **102**:1494-1409.
- Kellog, D.R., Field, C.M., Alberts, B.M. 1989. Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J. Cell. Biol.* **109**:2977-91.
- Kellogg, D.R. and Alberts, B.M. 1992. Purification of a multiprotein containing centrosomal proteins from the *Drosophila* embryo by chromatography with low affinity polyclonal antibodies. *Mol. Biol. Cell.* **3**:1-11.
- Kellogg, D.R., Moritz, M. and Alberts, B.M. 1994. The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:639-674.
- Kellogg, D.R., Oegama, K., Raff, J., Schneider, K. and Alberts, B.M. 1995. CP60: A microtubule-associated protein that is localized to the centrosome in a cell-specific manner. *Mol. Biol. Cell* **6**:1673-1684.
- Kirschner, M. W. and Mitchinson, T. 1986. Beyond self assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**:329-342.
- Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen Gould, L. and McConlogue, L. 1991. Overexpression of tau in nonneuronal cells induces long cellular processes. *J. Cell. Biol.* **114**:725-73.
- Kowalski, R.J. and Williams, R.C. 1993. Microtubule-associated protein 2 alter the dynamics properties of microtubule assembly and disassembly. *J. Biol. Chem.*

268:9847-9855.

Kreis, T.E. 1987. Microtubules containing detyrosinated tubulins are less dynamic. *EMBO J.* 6:2597-2606.

Kumar, N. and Flavin, M. 1981. Preferential action of a brain detyrosinating carboxipeptidase on polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* 256:7678-7686.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-85.

Langford, G.M. 1995. Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7: 82-88.

Lantz V.A. and Miller K.G. 1998. A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *J. Cell. Biol.* 140: 897-910.

Larcher, J.C., Boucher, D., Ginzberg, Y. and Denoulet, P. 1992. Heterogeneity of tau proteins during mouse brain development and differentiation of cultured neurons. *Dev. Biol.* 154:195-204.

Lee, G., Cowan, N. and Kirschner, M. 1988. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239:285-88.

Lee, G., Neve, R and Kosik, K. 1989. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2: 1616-1624.

Lee, G. and Rook, S.L. 1992. Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J. Cell. Sci.* 102:227-237.

- Lee, G. 1993. Non-motor microtubule-associated proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 5:88-94.
- Lewis, S.A., Wang, D. and Cowan, N.J. 1988. Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule-binding motif with tau protein. *Science* 242: 936-939.
- Lopata, M.A. y Cleveland, D.W. 1987. *In vivo* microtubules are copolymers of available β -tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate β -tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigens. *J. Cell. Biol.* 105:1707-1720.
- Ludueña, R.F. and Woodward, D.O. 1972. Isolation and partial characterization of α - and β -tubulin from outer doublets of sea-urchin sperm and microtubules of chick embryo brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3594-3598.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M. and Sunkel, C.E. 1991. *polo* encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes & Dev.* 5:2153-2165.
- Maccioni, R.B. y Seeds, N. 1977. Stoichiometry of GTP hydrolysis and tubulin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 462-468.
- Maccioni, R.B. 1986. *Molecular Cytology of Microtubules*. RBC Editions. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco, Leioa, and Springer-Verlag, Heidelberg.
- Maccioni, R.B., Serrano, L., Ávila, J. y Cann, J.R. 1986. Characterization and structural aspects of the enhanced assembly of tubulin after removal of its carboxyl-terminal domain. *Eur. J. Biochem.* 156, 375-381.

- Maccioni, R. B., Rivas, C. & Vera, J. 1987. Biochemical aspects of the regulation of microtubule assembly. In: *The Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*, pp 39-48. R.B. Maccioni and J. Arechaga, eds. ICSU, IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Maccioni, R.B., Rivas, C.I. y 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., Domínguez, J. y Ávila, J. 1989. A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 568-579.
- Maccioni, R.B., Tapia L. and Cambiazo, V. 1995. Functional Organization of Tau During neuronal Differentiation and Development. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 28:827-841.
- Maccioni, R.B. and Cambiazo, V. 1995. Roles of Microtubule-Associated Proteins in the Control of Microtubule Assembly. *Physiol. Rev.* 75: 835-864.
- Marco R., Domingo, A., Vinós, J., Cervera, M. 1987. *The Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*. R.B. Maccioni and J. Arechaga, eds. ICSU, IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Marya, P.K., Syed, Z., Fraylich, P.E. y Eagles, P.A.M. 1994. Kinesin and tau bind to distinct sites on microtubules. *J. Cell. Sci.* 107, 339-344.
- Marklund, U., Larsson, N., Melander Gradin, H., Brattsand, G. and Gulberg, M. 1996. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J.* 15:5290-5298.

- Maruta, H., Greer, K. and Rosenbaum, J.L. 1986. The acetylation of α -tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell. Biol.* **103**:571-579.
- Masson, D. y Kreis, T.E. 1993. Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **123**: 357-371.
- McNally, F.J. 1996. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. *Curr. Op. Cell. Biol.* **8**:23-29.
- Melki, R., Carrier, M.F. and Pantaloni, D. 1990. Direct evidence for GTP and GDP-Pi intermediates in microtubule assembly. *Biochemistry* **29**, 8921-8932.
- Mermall V., McNally J.G. and Miller K.G. 1994. Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. *Nature.* **369**: 560-562.
- Mermall V. and Miller K.G. 1995. The 95F unconventional myosin is required for proper organization of the *Drosophila* syncytial blastoderm. *J Cell. Biol.* **129**: 1575-1588.
- Merrill P. T., Sweeton D. and Wieschaus E. 1988. Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*. *Development.* **1988** **104**: 495-509.
- Miller, K.G. y Alberts, B.M. 1989. F-actin affinity chromatography: Technique for isolating previously unidentified actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:4808-4812.

Miller K.G., Field C.M. and Alberts B.M. 1991. Actin-binding proteins from *Drosophila* embryos: a complex network of interacting proteins detected by F-actin affinity chromatography. *J. Cell. Biol.* **109**: 2963-2975.

Miller, K.G., Field, C.M., Alberts, B.M. y Kellogg, D.R. 1991. Use of actin filament and microtubule affinity chromatography to identify proteins that bind to the cytoskeleton. *Meth. Enzymol.* **196**:303-319.

Miller K.G. and Kiehart D.P. 1995. Fly division. *J. Cell.Biol.* **131**: 1-5.

Miller, K.G. 1995. Role of the actin cytoskeleton in early *Drosophila* development. In: *Current Topics in Developmental Biology*. D.G. Capco ed., vol 31, pp:167-196. academic Press.

Minana, M.D., Felipo, V. and Grisolia, S. 1990. Inhibition of protein kinase C induces differentiation in Neuro-2a cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 4335-4339.

Mitchinson, T. and Kirschner, M. 1984a. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **312**:232-236.

Mitchinson, T. and Kirschner, M. 1984b. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**:237-242.

Moritz, M., Braunfeld, M.B., Fung, J.C., Sedat, J.W., Alberts, B.M. and Agard, D.A. 1995a. Three-dimensional structural characterization of centrosome from early *Drosophila* embryo. *J. Cell. Biol.* **130**:1149-1159.

Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B.M. and Agard, D.A. 1995b.

- Microtubule nucleation by γ -tubulin containing rings in the centrosome. *Nature* **378**:638-640.
- Murphy, D.B. and Borisy, G.G. 1975. Association of high molecular weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**:2696-2700.
- Murphy, D.B., Johnson, K. and Borisy, G.G. 1977. Role of tubulin associated proteins in microtubule nucleation and elongation. *J. Mol. Biol.* **117**:33-52.
- Murthy, A.S.N. and Flavin, M. 1983. Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP-2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase. *Eur. J. Biochem.* **137**:37-46.
- Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*. **308**: 693-698.
- Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K.H. 1998. Structure of the alpha/beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. **391**:199-203.
- Noble, M., Lewis, S.A., and Cowan, J. 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.
- Oegema K., Marshall W.F., Sedat J.W. and Alberts B.M. 1997. Two proteins that cycle asynchronously between centrosomes and nuclear structures: *Drosophila* CP60 and CP190. *J. Cell. Sci.* **110**: 1573-1583.
- Olmsted, J.B. 1986. Microtubule-associated proteins. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **2**:421-457.

- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J.C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T.J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K. and Kishimoto, T. 1995. Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34^{cdc2} kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J. Cell. Biol.* **128**:949-862.
- Pedrotti, B., Colombo, R. and Islam, K. 1994: Microtubule-associated protein MAP1A is an actin-binding and crosslinking protein. *Cell. Motil. Cytoskel.* **29**: 110-116.
- Pesacreta T.C., Byers T.J., Dubreuil R., Kiehart D.P. and Branton D. 1989. *Drosophila* spectrin: the membrane skeleton during embryogenesis. *J. Cell. Biol.* **108**: 1697-1709.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. y Kreis, T.E. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**:887-900.
- Piperno, G., LeDizet, M. and Chang, X. 1987. Microtubules containing acetylated α -tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell. Biol.* **104**:289-302.
- Postner, M.A., Miller, K.G. & Wieschaus, E.F. 1992. Maternal-effect mutations of the sponge locus affect cytoskeletal rearrangements in *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Cell. Biol.* **119**: 1205-1218.
- Proudfoot, N.J. and Brownlee, G.G. 1982. 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**:211-214.
- Radionov, V.I., Gyoeva, F.K., Kashina, A.S., Kuznetsov, S.A. y Gelfand, V.I. 1990. Microtubule-associated proteins and microtubule-based translocators have different binding sites on tubulin molecule. *J. Biol. Chem.* **265**:5702-5707.
- Raff, E.C. 1984. Genetics of microtubule systems. *J. Cell. Biol.* **99**:1-10.

Raff, J.W., Kellogg, D.R. and Alberts, B.M. 1993. *Drosophila* gamma-tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *J. Cell. Biol.* **121**:823-35.

Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A. and Bre, M.H. 1994. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* **266**:1688-1691.

Rivas, C., Vera, J. C. and Maccioni, R. B. 1988. Anti-idiotypic antibodies reacting with MAPs in the sera of rabbits immunized with synthetic peptides from tubulin regulatory domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6092-96.

Rivas-Berrios, A., Hernández, M., Domínguez, J., Ávila, J. y Maccioni, R.B. 1990. Common antigenic determinants of the tubulin binding domains of the microtubule-associated proteins MAP-2 and tau. *Biochim. Biophys. Acta.* **1040**:382-390.

Rost, B. and Sander, C. 1993. Prediction of protein structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**:584-599.

Rost, B., Sander, C. and Schneider, R. 1994. PHD - an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *CABIOS* **10**:53-60.

Rost, B. and Sander, C. 1994. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins.* **19**:55-72.

Rudolph, J.E., Kimble, M., Hoyle, H.D., Subler, M.A. and Raff, E.C. 1987. Three *Drosophila* beta-tubulin sequences: a developmentally regulated isoform (beta 3), the testis-specific isoform (beta 2), and an assembly-defective mutation of the testis-specific isoform (B2t8) reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for beta-tubulin function. *Mol. Cell. Biol.* **7**:2231-2242.

Sackett, D.L., Bhattacharyya, B. y Wolff, J. 1985. Tubulin subunit carboxyl termini determine polymerization efficiency. *J. Biol.Chem.* 260:43-45.

Salmon, E.D., Leslie, R.J., Karow, W.M., McIntosh, J.R. and Saxton, W.M. 1984. Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: analysis using fluorescence-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J. Cell. Biol.* 99:2165-2186.

Sambroock, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sammack, P.J. and Borisy, G.G. 1988. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* 332:724-726.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-67.

Saunders, R.D.C., Avides, M., Howard, T., González, C. and Glover, D.M. 1997. The *Drosophila* gene *abnormal spindle* encodes a novel microtubule-associated protein that associates with the polar regions of the mitotic spindle. *J. Cell. Biol.* 137:881-890.

Saxton, W.M., Stemple, D.L., Leslie, R.J., Salmon, E.D., Savortink, M. and McIntosh, J.R. 1984. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 99:2175-2186.

Schejter, E.D. and Wieschaus, E. 1993^a. Functional elements of the cytoskeleton in the early *Drosophila* embryo. 1993. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:67-99.

Schejter, E.D. and Wieschaus, E. 1993^b. *bottleneck* acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the *Drosophila* embryo. *Cell.* 75:

373-385.

Schulze, E. and Kirschner, M. 1987. Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *J. Cell. Biol.* **104**:277-288.

Schweisguth F., Lepesant J.A. and Vincent A. 1990. The *serendipity alpha* gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo. *Genes & Dev.* **4**: 922-931.

Seeds, N.W. and Maccioni, R.B. 1978. Proteins from morphologically differentiated neuroblastoma cells promote tubulin polymerization. *J. Cell. Biol.* **78**: 547-555.

Selden, S.C. and Pollard, T.D. 1983. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* **258**:7064-71.

Serrano, L., Avila, J. y Maccioni, R. (1984a) Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: Localization of the site for MAP2 interaction. *Biochemistry* **23**, 4675-4681.

Serrano, L., de la Torre, J., Maccioni, R. y Avila, J. (1984b) Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 5989-5993.

Shelanski, M.L., Gaskin, F. and Cantor, C.R. 1973. Assembly of microtubules in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**:765-768.

Shelden, E. and Wadsworth, P. 1993. Observation and quantification of individual microtubules behavior *in vivo*: microtubule dynamics are cell type specific. *J. Cell. Biol.* **120**:935-945.

Sloboda, R.D., Dentler, W.L. and Rosenbaum, J.L. 1976. Microtubule-associated

proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry* **15**: 4497-4505.

Spudich, J.A. and Watt, S. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4870.

Stearns, T. and Winey, M. 1997. The cell center at 100. *Cell.* **91**:303-309.

Sullivan W., Fogarty P. and Theurkauf W. 1993. Mutations affecting the cytoskeletal organization of syncytial *Drosophila* embryos. *Development.* **118**: 1245-1254.

Sullivan W. and Theurkauf W.E. 1995. The cytoskeleton and morphogenesis of the early *Drosophila* embryo. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**: 18-22.

Sunkel, C.E. and Glover, D.M. 1988. *polo*, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindles. *J. Cell. Sci.* **89**:25-38.

Tavares, A.A.M, Glover, D.M. and Sunkel, C.E. 1996. The conserved mitotic kinase polo is regulated by phosphorylation and has preferred microtubule-associated substrates in *Drosophila* embryos extracts. *EMBO J.* **15**:4873-4883.

Theurkauf, W.E. 1991. Behavior of structurally divergent α -tubulin isotypes during *Drosophila* embryogenesis: Evidence for post-translational regulation of isotype abundance. *Dev. Biol.* **154**:205-217.

Vallee, R.B. 1982. A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs). *J. Cell. Biol.* **92**:435-442.

Vandre, D.D., Centonze, V.E., Peloquin, J., Tombes, R.M. and Borisy, G.G. 1991. Proteins of the mammalian mitotic spindle: phosphorylation/dephosphorylation of

MAP-4 during mitosis. *J. Cell. Sci.* **98**:577-588.

Vera, J.C., Rivas, C. and Maccioni, R.B. 1988. antibodies to synthetic peptides from the tubulin regulatory domain interact with tubulin and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6763-67.

Vera, J.C., Rivas, C. y Maccioni, R.B. 1989. Biochemical dissection of the role of the one-kilodalton carboxyl-terminal moiety of tubulin in its assembly into microtubules. *Biochemistry* **28**:333-339.

Vial C., Armas-Portela R., Avila J., González M. and Maccioni R.B. 1995. A 205 kDa protein from non-neuronal cells in culture contains tubulin binding epitopes. *Mol. Cell. Biochem.* **144**: 109-116.

Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P. and Salmon, E.D. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell. Biol.* **107**:1437-1448.

Wandosell F. and Avila J. 1987. Microtubule-associated proteins present in different developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biochem.* **35**: 83-92.

Warn R.M. 1986. The cytoskeleton of the early *Drosophila* embryo. *J. Cell. Sci. Suppl.* **5**: 311-328.

Warn, R.M. & Warn, A. 1987. An investigation of microtubule organization and functions in living *Drosophila* embryos by injection of a fluorescently labeled antibody against tyrosinated α -tubulin. *J. Cell. Biol.* **105**: 1721-1730.

Warn R.M. and Robert-Nicoud M. 1990a. F-actin organization during the cellularization

of the *Drosophila* embryo as revealed with a confocal laser scanning microscope. *J. Cell. Sci.* **96**: 35-42.

Warn, R.M., Harrison, A., Planques, V., Robert-Nicoud, N. and Wehland, J. 1990b. Distribution of microtubules containing modified α -tubulin during *Drosophila* embryogenesis. *Cell. Motil. Cytoskel.* **17**:34-45.

Webster, D.R., Borisy, G.G. 1989. Microtubules are acetylated in domains that turns over slowly. *J. Cell. Sci.* **92**:57-65.

Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S. and Kirschner, M. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1858-62.

Weisenberg, R.C., Borisy, G.G. and Taylor, E.W. 1968. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* **7**:4466-4479.

Weisenberg, R.C. 1972. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* **177**:1104-1105.

Weisenberg, R.C. and Deery, W.J. 1976. Role of nucleotide hydrolysis in microtubule assembly. *Nature.* **263**:792-793.

Weissbar, B., Doll, T. and Matus, A. 1992. Reorganisation of the microtubular cytoskeleton by embryonic microtubule-associated protein 2 (MAP2c). *Development.* **116**:1151-161.

West, R.R., Tenbarge, K.M. and Olmsted, J.B. 1991. A model for microtubule-associated protein 4 structure. *J. Biol. Chem.* **266**:21886-21896.

Whitfield, W.G.F., Miller, S.E., Saumweber, H., Frasch, M. and Glover, D.M. 1988.

Cloning of a gene encoding an antigen associated with the centrosome in *Drosophila*. J. Cell. Sci. 89:222-32.

Wieschaus E. and Sweeton D. 1988. Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularization of early *Drosophila* embryos. Development. 104: 483-493.

Wolf N, Regan CL, Fuller MT. 1988. Temporal and spatial pattern of differences in microtubule behaviour during *Drosophila* embryogenesis revealed by distribution of a tubulin isoform. Development. 102: 311-324.

Young P.E., Pesacreta T.C. and Kiehart D.P. 1991. Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during *Drosophila* embryogenesis. Development. 111: 1-14.

Young P.E., Richman A.M., Ketchum A.S. and Kiehart D.P. 1993. Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. Genes & Dev. 7: 29-41.

Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. and Mitchinson, T. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a α -tubulin-containing ring complex. Nature. 378:579-583.

DMAP-85: A τ -Like Protein from *Drosophila melanogaster* Larvae

*Verónica Cambiazo, *Mauricio González, and *†Ricardo B. Maccioni

*Laboratory of Cellular and Molecular Biology, and International Center for Cancer and Developmental Biology; and †Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Abstract: Microtubule-associated proteins (MAPs) play major regulatory roles in the organization and integrity of the cytoskeletal network. Our main interest in this study was the identification and the analysis of structural and functional aspects of *Drosophila melanogaster* MAPs. A novel MAP with a relative molecular mass of 85 kDa from *Drosophila* larvae was found associated with taxol-polymerized microtubules. In addition, this protein bound to mammalian tubulin in an overlay assay and coassembled with purified bovine brain tubulin in microtubule sedimentation experiments. The estimated stoichiometry of 85-kDa protein versus tubulin in the polymers was $1:5.3 \pm 0.2$ mol/mol. It was shown that the 85-kDa protein bound specifically to an affinity column of Sepharose- β II-(422–434) tubulin peptide, which contains the sequence of the MAP binding domain on β II-tubulin. Affinity-purified 85-kDa protein enhanced microtubule assembly in a concentration-dependent manner. This effect was significantly decreased by the presence of the β II-(422–434) peptide in the assembly assays, thus confirming the specificity of the 85-kDa protein interaction with the C-terminal domain on tubulin. Furthermore, this protein also exhibited a strong affinity for calmodulin, based on affinity chromatographic assays. Monoclonal and polyclonal anti- τ antibodies, including sequence-specific probes that recognize repeated microtubule-binding motifs on τ , MAP-2, and MAP-4 and specific N-terminal sequences of τ , cross-reacted with the 85-kDa protein from *Drosophila* larvae. These results suggest that τ and *Drosophila* 85-kDa protein share common functional and structural epitopes. We have named this protein as DMAP-85 for *Drosophila* MAP. The finding on a *Drosophila* protein with functional homology and structural similarities to mammalian τ opens new perspectives to understand the cellular roles of MAPs. **Key Words:** Microtubule-interacting proteins—*Drosophila melanogaster*—Microtubules—*Drosophila* microtubule-associated protein. *J. Neurochem.* 64, 1288–1297 (1995).

Microtubules are essential cellular organelles that are involved in a wide variety of functions within the cytoplasm of eukaryotic cells, including mitosis, intracellular transport, modulation of surface receptors, secretion, and cellular motility processes (Maccioni and

Arechaga, 1987; Bershinsky and Vasiliev, 1988). The structure of microtubules is formed by the dynamic assembly of two highly conserved proteins, the α - and β -tubulins. Biochemical evidence indicates that the diverse functions of microtubules depend on the proteins associated with them, which have been collectively known as microtubule-associated proteins (MAPs) (for reviews, see Vallee et al., 1984; Olmsted, 1986; Wiche et al., 1991). These proteins modulate the assembly and the stability of microtubules and mediate their interactions with other cellular components. MAPs, originally isolated from mammalian brain tissue, include the high-molecular-weight components MAP-1 (Bloom et al., 1984, 1985), MAP-2 (Herrmann et al., 1985; Lewis et al., 1986), and MAP-3 (Huber et al., 1985) and the family of τ protein (Cleveland et al., 1977; Goedert et al., 1988, 1989; Hirokawa et al., 1988; Nunez, 1988; Kosik et al., 1989). τ has been found preferentially distributed in axons in the CNS (Binder et al., 1985; Brion et al., 1988), and recently a novel 120-kDa τ protein has been described, which appears to be distributed preferentially in the PNS (Georgieff et al., 1991; Couchie et al., 1992). Several other MAPs from nonneuronal origin have been already described, including MAP-4 (Paryzek et al., 1984), the 210-kDa proteins found in transformed cell lines in culture (Bulinsky and Borisy, 1979, 1980; González et al., 1992), and τ -like proteins described in cultured somatic cells (Pallas and Solomon, 1982; Cross et al., 1993).

Sequence studies of MAP-2 isoforms (Lewis et al., 1988; Kindler et al., 1990), the different isospecies of τ (Goedert et al., 1989; Himmler, 1989; Himmler et

Received March 28, 1994; revised manuscript received July 19, 1994; accepted July 26, 1994.

Address correspondence and reprint requests to Dr. R. B. Maccioni at Laboratory of Cellular and Molecular Biology, International Center for Cancer and Developmental Biology (ICC), Casilla 70111, Santiago 7, Chile.

Abbreviations used: DMAP, *Drosophila* microtubule-associated protein; MAP, microtubule-associated protein; MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate.

al., 1989; Kosik et al., 1989), and MAP-4 (Aizawa et al., 1990; West et al., 1991) indicate that these proteins share at least three repetitive sequences that correspond to tubulin binding motifs on these MAPs (Ennulat et al., 1989; Lee et al., 1989; Maccioni et al., 1989). All MAPs already analyzed have in common the fact that they interact with the acidic C-terminal regulatory domain on tubulin subunits (Serrano et al., 1984a; Maccioni et al., 1988). There is increasing evidence that MAPs sharing the repetitive binding motifs interact with common epitopes on this tubulin domain as revealed by studies using site-specific antibodies together with binding analysis of synthetic peptides (Rivas-Berrios et al., 1990; Farías et al., 1992).

Most of our current knowledge on functions of MAPs is based on in vitro analysis of their behavior and immunocytochemical studies. Recently, in vivo studies have also shed light on their functions. Experiments on cultured cells have contributed to understanding the roles of MAPs in modulating cytoskeletal interactions (Maccioni et al., 1992; Cross et al., 1993). On the other hand, transfection experiments have revealed that neuronal MAPs may be critical for in vivo assembly and stabilization of microtubules (Lewis et al., 1989; Kanai et al., 1989). Furthermore, antisense studies in primary neuronal cultures have demonstrated that reduced levels of MAP-2 and τ expression alter the morphology of developing neurons (Cáceres et al., 1991, 1992; Dinsmore and Solomon, 1991). From this perspective, *Drosophila melanogaster* constitutes an attractive animal model to contribute to the in vivo analysis of functions of MAPs within a developmental context and provides the advantage of applying genetic tools to dissect the roles of MAPs. Previous work on this organism has demonstrated that this is a useful system to address questions concerning microtubule organization and functions of MAPs (Goldstein et al., 1986; Irminger-Finger et al., 1990; Raff et al., 1993). In fact, a 205-kDa MAP has been localized in a *Drosophila* cell culture line (Goldstein et al., 1986), where this protein is part of both mitotic spindle and cytoplasmic microtubules. The 205-kDa protein was found to be immunologically related to mouse and HeLa MAP-4; however, the amino acid sequence of the microtubule-binding motifs of this protein shares no homology with mammalian MAPs (Irminger-Finger et al., 1990). Genetic analysis showed that homozygous deficiencies for the 205-kDa MAP gene are viable and have no obvious phenotype, suggesting that other proteins may overlap the function of the 205-kDa MAP. Microtubule-interacting proteins have been also described by Kellogg et al. (1989). These authors have identified in early *Drosophila* embryos a complex of proteins that contains many centrosomal *Drosophila* MAPs (DMAPs). In particular, 60-kDa DMAP seems to be tightly associated with γ -tubulin, forming with 190-kDa DMAP a centrosomal complex that interacts with tubulin (Raff et al., 1993).

Here we have identified a novel 85-kDa DMAP

(DMAP-85) that is expressed in larvae of *Drosophila*. This protein exhibits the following properties: (a) copolymerizes with *Drosophila* and with bovine brain tubulins, (b) binds to dimeric brain tubulin in an overlay assay, (c) is able to initiate and promote tubulin assembly, and (d) specifically interacts with MAP binding motifs on β II-tubulin and with calmodulin. All these properties are shared with well-characterized mammalian MAPs. It is interesting that immunological evidence suggests that DMAP-85 shares common epitopes with the mammalian τ . These results with DMAP-85 appear to be relevant within the context of previous reports on the conservation of the tubulin binding domains of MAP-2, MAP-4, and τ (Cleveland, 1990).

MATERIALS AND METHODS

Stocks

Wild-type Canton-S *D. melanogaster* stocks were raised at 22°C in standard *Drosophila* food. Larval developmental stages were determined as described by White and Kankel (1978). Third instar larvae were transferred from the culture medium to a Petri dish, washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature, and frozen in liquid nitrogen.

Preparation of high-speed supernatants

Approximately 200 *Drosophila* larvae were resuspended in 2 ml of 50 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES; pH 6.8), 4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 0.05% Nonidet P-40 buffer solution containing the following protease inhibitors: 2 μ g/ml of aprotinin, 2 μ g/ml of leupeptin, 1 μ g/ml of pepstatin, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Larvae were homogenized at 4°C in the resuspension buffer by several passes of a Teflon Dounce homogenizer and incubated on ice for 15 min to allow microtubule depolymerization. The homogenates were clarified by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min in a Sorvall Microspin 24S centrifuge, and the supernatants were centrifuged at 126,000 g for 20 min in a Beckman Airfuge. The resulting high-speed supernatants were analyzed by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Laemmli, 1970).

Taxol polymerization procedure

Microtubules and MAPs were isolated by a modification of the procedure of Goldstein et al. (1986). Larvae were homogenized and centrifuged under the conditions described above, except that buffer A [50 mM MES (pH 6.8), 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 2 μ g/ml of aprotinin, 1 μ g/ml of pepstatin, 2 μ g/ml of leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] was used. The high-speed supernatant was adjusted to final concentrations of 20 μ M taxol and 1 mM GTP, and the solution was incubated at 22°C for 30 min to allow microtubule polymerization. The material was then centrifuged for 20 min at 126,000 g through a 15% sucrose cushion in a Beckman Airfuge. The microtubule pellet obtained at this stage was washed with 50 μ l of buffer A containing 20 μ M taxol and 1 mM GTP and centrifuged for 10 min at 126,000 g. To release components of MAPs from the microtubule pellets, they were resuspended in 200 μ l of buffer A plus 20 μ M taxol, 1 mM GTP, and 0.4 M NaCl. The solution was centrifuged for 20 min

at 126,000 g. Pellets and supernatants were analyzed by SDS-PAGE.

Tubulin assembly assays

The kinetics of tubulin assembly were analyzed by a turbidimetric procedure (Gaskin et al., 1974). The protocol was as follows: Purified bovine brain tubulin (1.2 mg/ml) in assembly buffer was admixed with either high-speed supernatants of third instar larvae or with protein fractions eluted from the β II-(422–434) affinity columns, at the concentrations indicated in the figure legends. The assay mixture was incubated for 30 s in a thermostatted cuvette at 37°C; GTP was added to a final concentration of 1 mM to initiate the assembly. The time course of the turbidity increase was recorded at 340 nm in a UV-visible Shimadzu spectrophotometer over a period of 25 min. As a control, tubulin alone was processed in a similar way. Competition assays were performed in the assembly system containing tubulin, affinity-purified *Drosophila* proteins, and the β II-(422–434)-tubulin peptide at 40 μ M. The mixture was preincubated for 2 min at 25°C and then brought to 37°C for the turbidimetric measurements. Cold reversibility was tested by cooling the assembly mixture at 4°C for 10 min and remeasuring the turbidity increase.

Tubulin sedimentation assays

The maximal extent of tubulin assembly induced by affinity-purified DMAP-85 was analyzed by the sedimentation assay of the polymers (Serrano et al., 1984b). In this assay, tubulin was purified from bovine brains by three cycles of temperature-dependent assembly–disassembly followed by P-11 phosphocellulose (Whatman) chromatography (Weingarten et al., 1975). Tubulin (1.2 mg/ml) in 200 μ l of assembly buffer [50 mM MES (pH 6.8), 1.0 mM MgCl₂, and 0.5 mM EGTA] was admixed with protein fractions eluted from the calmodulin-agarose column (0, 25, 50, and 100 μ g), freed of Ca²⁺. Assembly was initiated by addition of GTP at a final concentration of 1 mM, to the assay mixture. After an incubation period of 30 min at 37°C, the polymers were sedimented in a Beckman Airfuge for 20 min at 126,000 g (Serrano et al., 1984b). The pellets were washed twice with the assembly buffer and immediately resuspended in electrophoresis sample buffer. Aliquots from resuspended pellets were analyzed on 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. Densitometric analysis of the electrophoretic profiles was performed in a Gelscan model CS-4500 scanner using the Scannedit Computer Program Gray 256 (Logitech, U.S.A.).

Electron microscopy

Samples were obtained (before and after the assembly mixture was cooled to 0°C), fixed in warm (32°C) 0.1 M MES (pH 6.8), 2% glutaraldehyde, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1 mM GTP, stained with 1% uranyl acetate, and observed in a JEOL model X-100 electron microscope.

Anti- τ antibodies

The following antibodies were used: (a) mouse monoclonal anti- τ (clone Tau-2, purchased from Sigma); (b) rabbit polyclonal antibody raised to perchloric acid-purified τ (Georgieff et al., 1991); (c) rabbit polyclonal antibody TRS1.2, raised in our laboratory against the synthetic peptide containing the first of the 18-amino-acid repeats in τ (residues Val¹⁸⁷–Gly²⁰⁴), conjugated to hemocyanin from the molluscan *Concholepa concholepa* (Biosonda), and injected into rabbits; and (d) rabbit polyclonal antibody (B19-

1), raised against a synthetic peptide corresponding to amino acids 29–48 in mouse τ (Gache et al., 1992).

Electrophoresis and immunoblotting

SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli (1970), using either 7.5 or 10% in the separating gel. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. For western blots, aliquots of high-speed supernatants or aliquots of fractions eluted from the affinity columns were electroblotted from slab gels to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in buffer B (PBS containing 0.05% Tween-20 and 3% bovine serum albumin) at room temperature for 2 h, washed three times in PBS, and incubated overnight with the respective antibodies diluted in buffer B. The membranes were washed three times for 10 min each in PBS containing 0.2% Tween-20 and incubated for 2 h with the respective second antibody conjugated with alkaline phosphatase and diluted in buffer B. Bound antibodies were revealed using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium as the enzyme substrates (Harlow and Lane, 1988).

Peptide synthesis

The β -tubulin peptide β II-(422–434) and τ peptide Val¹⁸⁷–Gly²⁰⁴ were synthesized by the solid-phase system, purified by HPLC using a reverse-phase column, and analyzed with respect to amino acid composition. Purity of all peptides was 99% (Maccioni et al., 1988).

Affinity chromatography

Five milligrams of the β -tubulin peptide β II-(422–434) was covalently coupled to 1 ml of cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (Sigma) in 0.1 M buffer borate (pH 8.3) for 4 h at room temperature. The remaining free active sites were blocked with 0.1 M ethanolamine for 4 h at room temperature. The calmodulin-agarose affinity resin was purchased from Sigma. For the β II-tubulin peptide chromatography, the columns were equilibrated and washed with buffer C [50 mM MES (pH 6.8), 50 mM NaCl, and 1 mM MgCl₂], and the bound material was eluted by addition of 0.5 M NaCl to the same buffer. For the calmodulin-agarose chromatography the equilibration and washing buffers were 50 mM MES, 1 mM MgCl₂, and 2 mM CaCl₂, and the bound protein was eluted by addition of 4 mM EGTA in buffer C.

One milliliter of the high-speed supernatants (0.7–0.9 mg/ml) from third instar *Drosophila* larvae was loaded over a 0.5-ml affinity column, and the chromatographic procedures were carried out as indicated above.

Tubulin overlay

Tubulin binding proteins were detected using a procedure described by Rozdzial et al. (1990). After calmodulin-agarose chromatography of larval high-speed supernatants, the eluted fractions were separated in 10% SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nitrocellulose strips were blocked in Ca²⁺-free PBS containing 0.05% Tween-20 and 3% bovine serum albumin for 2 h at room temperature. The strips were incubated overnight at 4°C with 200 μ l of buffer D [50 mM MES (pH 6.8), 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, and 1 mM dithiothreitol], containing 1.0 mg/ml of phosphocellulose-purified bovine brain tubulin. Control strips were incubated in the same buffer without tubulin. Unbound tubulin was removed by washing the strips in buffer C. Subsequently, the strips were washed in PBS containing 0.05% Tween-20, and tubulin bound to the strips was detected with a monoclonal anti- β -tubulin

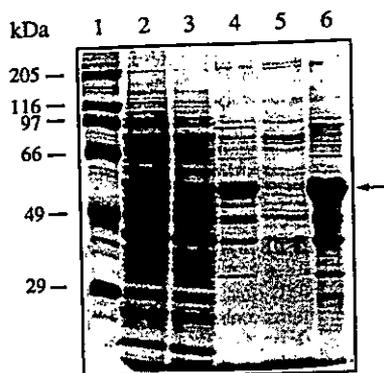


FIG. 1. Stages in a preparation of *Drosophila* larvae MAPs. Microtubules were prepared by a modification of the taxol procedure (Vallee, 1982). Microtubule pellets were resuspended in buffer B containing 0.5 M NaCl and centrifuged. The preparations were analyzed by electrophoresis on 10% polyacrylamide gels and stained with Coomassie Brilliant Blue: lane 1, high-molecular-weight standards; lane 2, total larval extract after high-speed centrifugation; lane 3, tubulin-depleted supernatant after centrifugation of taxol-promoted microtubules; lane 4, microtubule pellet obtained after taxol-induced polymerization; lane 5, supernatant containing MAPs released after NaCl treatment of taxol-induced-microtubules; and lane 6, final microtubule pellet after treatment with NaCl. Tubulin is seen in lanes 4 and 6 (arrow).

antibody (Sigma). The antibody was diluted 1:200 with buffer B and incubated overnight at 4°C with the overlaid strips.

RESULTS

We have isolated a putative DMAP using taxol-mediated polymerization of microtubules from larval extracts (Goldstein et al., 1986). Addition of taxol to the larval extracts (Fig. 1, lane 2) induced the formation of microtubules, which were collected by centrifugation. As illustrated in Fig. 1, lane 4, the microtubule pellet was composed of tubulin (arrow) and other proteins. Subsequent washing of the pellets with buffer B plus 0.4 M NaCl followed by centrifugation resulted in the selective removal of associated proteins from the tubulin polymers. The supernatant, which was considered the MAP-enriched fraction, contained two polypeptides of 205 kDa, a major fraction of polypeptides with apparent electrophoretic mobilities around an apparent molecular mass of 85 kDa, and minor amounts of polypeptides of lower molecular mass (Fig. 1, lane 5). As shown in Fig. 1, lane 6, the final pellet was mainly composed of tubulin and variable amounts of other proteins. The final pellet represented ~3.5% of the total amount of proteins contained in the initial larval extracts, and the MAP-enriched supernatant represented ~0.43% of total protein from the extract. As a control, pellets containing amorphous material obtained after centrifugation in the absence of both taxol and GTP did not contain tubulin. However, a polypeptide of 45 kDa and some other polypeptides of lower

molecular mass were sedimented under these control conditions (data not shown).

In an attempt to identify *Drosophila* proteins that may interact with functional domains in tubulin, we subjected the larval high-speed supernatants to affinity chromatography using a column filled with β II-(422–434)-tubulin peptide covalently coupled to Sepharose. Previous studies have demonstrated the capacity of this β II-tubulin fragment from the C-terminal regulatory domain to interact with MAP-2, MAP-4, and τ (Maccioni et al., 1988; Fariás et al., 1992). The proteins adsorbed on the affinity column were selectively eluted with 0.5 M NaCl (Fig. 2A) and analyzed by gel electrophoresis. These results indicated that an 85-kDa component of the larval high-speed supernatants was the main protein retained by the affinity column (Fig. 2B, lane 4, asterisk). This protein, DMAP-85, was selectively bound to the β II-(422–434)-Sepharose column, and it was highly enriched as compared with its initial amount in the high-speed supernatant (Fig. 2B, lanes 1 and 4). Moreover, this chromatographic procedure allowed us to obtain DMAP-85 (Fig. 2B, lane 4, asterisk) with a high degree of purity. A control for the specificity of the interactions of DMAP-85 with tubulin domains was provided by the fact that this protein failed to be retained in similar affinity columns bearing synthetic peptides with equivalent amino acid composition but different sequences than β II-(422–434)-tubulin peptide. Furthermore, DMAP-85 did not interact with the peptide β -(391–400), corresponding to a fragment from the highly constant tubulin domain (data not shown).

On the basis of the interaction of DMAP-85 with the β II-tubulin peptide, we used a turbidimetric procedure to assay in vitro the tubulin assembly-promoting activity of this protein. Phosphocellulose-purified bovine brain tubulin was admixed with increasing amounts of DMAP-85. The assembly kinetics shown in Fig. 3 reveal that both the rate and the extent of tubulin assembly were enhanced in the presence of affinity-purified DMAP-85. The extent of the assembly was dependent on the concentration of this protein (Fig. 3 and inset), and the assembly was reversed by cooling (Fig. 3, dashed line). Under these conditions, self-assembly of purified tubulin in the absence of DMAP-85 was not significant (Fig. 3, filled circles). Tubulin assembled into microtubules with structural features comparable with those obtained from τ -induced brain tubulin assembly (Maccioni et al., 1989), and no microtubule bundle formation was observed as revealed by electron microscopy (data not shown). The effect of the β II-(422–434) peptide on DMAP-85-induced tubulin assembly was assessed to examine whether DMAP-85 binds preferentially to the domain on β II-tubulin interacting with MAPs. As shown in Fig. 3 (filled squares), at 40 μ M the peptide produced 70% of inhibition of the DMAP-85-induced tubulin assembly, indicating that β II-(422–434) peptide inhibited significantly the effects of the *Drosophila* pro-

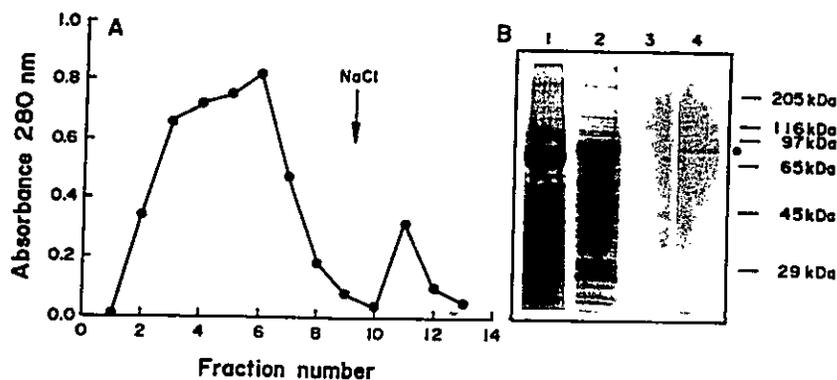


FIG. 2. Affinity chromatography of a high-speed supernatant of third instar *Drosophila* larvae using a Sepharose- β II-(422-434)-tubulin peptide column. A: Aliquots of 0.5 ml were collected, and bound proteins were eluted with 0.5 M NaCl in buffer C. B: Electrophoretic analysis in 10% SDS-PAGE gels after Coomassie Brilliant Blue staining of total larval extract (lane 1), unretained protein fraction (lane 2), eluate after washing with buffer 50 mM MES (pH 6.8) and 1 mM $MgCl_2$ (lane 3), and proteins selectively eluted with 0.5 M NaCl (lane 4). DMAP-85 is indicated by the asterisk.

tein in inducing brain tubulin assembly. Protein from larval high-speed supernatants had significantly lower effects on tubulin assembly (data not shown). These results on the characterization of DMAP-85 strongly suggested that this protein functions as an MAP by inducing tubulin assembly.

To analyze further the presence of MAPs in larval high-speed supernatants, we applied a second affinity chromatography criterion, based on the capacity of mammalian MAPs, namely, MAP-2 and τ , to interact with calmodulin (Lee and Wolff, 1984; Padilla et al., 1990). High-speed supernatants were loaded on cal-

modulin affinity columns in the presence of 2 mM $CaCl_2$. After the elution of a major peak of unretained protein, a small peak of calmodulin-binding components was selectively eluted from the columns with 4 mM EGTA (Fig. 4A), and the column fractions were analyzed by gel electrophoresis. The chromatographic procedure allowed us to recover a group of polypeptides of ~ 85 kDa together with a polypeptide of 205 kDa and other components of lower molecular mass (Fig. 4B, lane 4). These polypeptides were significantly enriched relative to the initial supernatant (Fig. 4B, lanes 1 and 4). To confirm the presence of DMAP-85 in the fraction bound to calmodulin (Fig. 4B, lane 4), we subjected the protein pool eluted with EGTA to a second chromatography on the β II-(422-434)-Sepharose affinity column. DMAP-85 was retained by the peptide column, and again one single polypeptide was found after electrophoretic analysis (Fig. 4B, lane 5). The results allowed us to rule out the possibility that more than one type of protein with the same migration pattern was present in the high-speed supernatants and also showed that DMAP-85 shares with other MAPs the ability to interact with tubulin and with calmodulin.

Sedimentation analysis showed that DMAP-85 promotes tubulin assembly in a concentration-dependent manner. Increasing amounts of the proteins eluted from calmodulin columns were mixed with 1.2 mg/ml of purified bovine brain tubulin. After warm incubation the assembled polymers were centrifuged, and the protein in the pellets was quantified. Electrophoretic analysis of the pellets revealed that they were mainly composed of the *Drosophila* DMAP-85 and tubulin (data not shown). The curve of polymer versus protein concentration reached a plateau after 40 μ g of the affinity-purified material. The amount of DMAP-85 incorporated into the polymers according to electrophoretic analysis was also dependent on the initial concentration of affinity-purified proteins. Under these conditions, densitometric analysis from gels showing linear relationships between absorbance and protein concentration allowed us to determine a weight-to-weight ratio of tubulin versus DMAP-85 of 6.2:1. Thus, we calcu-

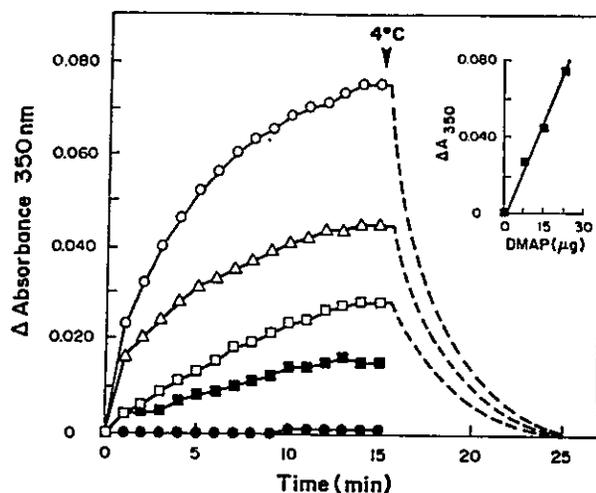
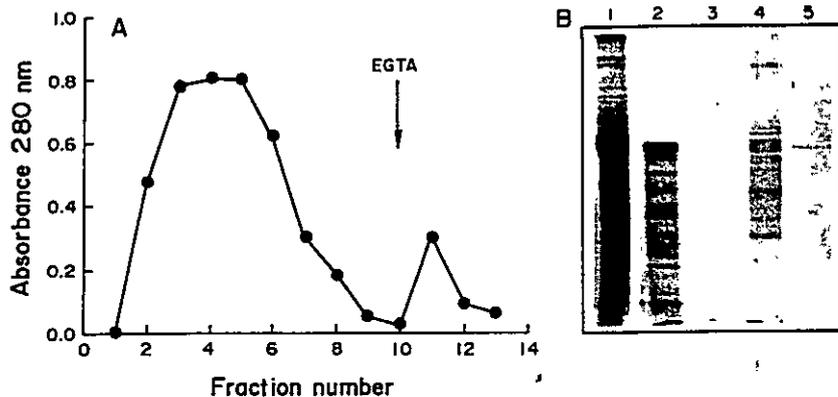


FIG. 3. Assembly-promoting activity of DMAP-85 on mammalian tubulin. Affinity-purified DMAP-85 was admixed with 1.2 mg/ml of pure bovine brain tubulin in buffer comprising 20 mM MES (pH 6.8), 1 mM EGTA, and 1 mM $MgCl_2$. GTP was added to the mixture, and it was brought to 37°C. Tubulin assembly was assayed turbidimetrically in the presence of 25 (O), 15 (Δ), or 10 μ g (\square) of affinity-purified DMAP-85 or no addition (\bullet). Tubulin was also preincubated for 2 min at 25°C in the presence of 15 μ g of affinity-purified DMAP-85 and 40 μ M β II-(422-434) (\blacksquare), and the assembly was recorded as above. In each case the mixture was cooled at 4°C for 10 min when the assembly kinetics (at 37°C) approached a plateau, and the turbidity change was monitored as indicated (dashed line). Inset: A plot of the extent of tubulin assembly as a function of DMAP-85 concentration.

FIG. 4. Affinity chromatography of a high-speed supernatant of *Drosophila* larvae in calmodulin-agarose columns. **A:** Aliquots of 0.5 ml containing the unretained proteins were collected. Bound proteins were eluted with 4 mM EGTA in buffer C. **B:** Electrophoretic analysis in 10% SDS-PAGE gel of high-speed larval supernatant (lane 1), unretained proteins (lane 2), eluate after washing with buffer comprising 50 mM MES (pH 6.8), 1 mM $MgCl_2$, and 2 mM $CaCl_2$ (lane 3), selectively eluted material with EGTA (lane 4), and selectively eluted proteins after aliquots of the calmodulin-eluted material were applied to Sepharose- β II-(422-432) columns and eluted with 0.5 M NaCl (lane 5). The asterisk indicates DMAP-85.



lated a stoichiometry of tubulin to DMAP-85 of $5.3 \pm 0.2:1$ (mol/mol), based on the molecular mass for tubulin of 100 kDa. Under the equilibrium conditions, an association constant (K_a) of $7.4 \times 10^5 M^{-1}$ was estimated for the DMAP-85 interaction with microtubules on the basis of double reciprocal analysis from data of DMAP-85 concentration dependence on the microtubule assembly (Maccioni et al., 1988).

An overlay procedure allowed us to assay the tubulin binding capacity of protein fractions eluted from the calmodulin column (Fig. 5, lane 1). Here we showed that dimeric tubulin was able to bind to a single 85-kDa polypeptide immobilized in the nitrocellulose strip, as revealed by a polyclonal antitubulin antibody (Fig. 5, lane 2). As a control, a second nitrocellulose strip incubated in the same buffer but in the absence of tubulin showed no reaction with the antitubulin anti-

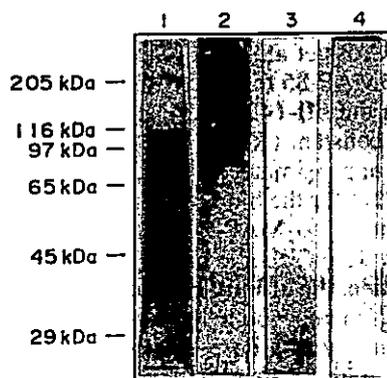


FIG. 5. Binding of tubulin to DMAP-85. Nitrocellulose strips containing electrophoretically separated and transferred calmodulin-eluted proteins (10 μ g) were overlaid with a solution of purified tubulin (1 mg/ml). Tubulin bound to the nitrocellulose was revealed using a specific monoclonal anti- β -tubulin antibody. Coomassie Brilliant Blue staining is shown of calmodulin-eluted proteins (lane 1), tubulin overlay (lane 2), the control without tubulin in the overlay buffer (lane 3), and 30 μ g of bovine serum albumin that was electroblotted, overlaid with tubulin, and analyzed with the antitubulin antibody (lane 4).

body (Fig. 5, lane 3). Under the same overlay conditions, tubulin did not bind to pure nitrocellulose-immobilized bovine serum albumin, even though bovine serum albumin was overloaded on the nitrocellulose strip (Fig. 5, lane 4). The results indicated a specific binding of DMAP-85 to the tubulin dimer.

At this stage, the data strongly suggest that DMAP-85 shares structural and functional features with components of mammalian MAPs. To analyze these similarities further, we studied the immunoreactivity of DMAP-85 obtained from calmodulin affinity columns toward antibodies that specifically tag mammalian MAPs. Figure 6A shows the results of a western blot analysis using the following anti- τ antibodies: a monoclonal antibody (Tau-2) (lane 2), a polyclonal antibody raised against perchloric acid-purified τ (Georgieff et al., 1991) (lane 3), a polyclonal site-specific antibody (TRS1.2) that recognizes microtubule-binding epitopes on MAP-2, MAP-4, and τ (lane 4), and a polyclonal antibody raised against an N-terminal peptide of τ (Gache et al., 1992) (lane 5). It was noteworthy to find that each of these antibodies reacted with DMAP-85 present in larval high-speed supernatant and in calmodulin affinity-purified fractions. In addition, the two sequence-specific antibodies also recognized DMAP-85 present in MAP-enriched supernatants after salt extraction from the microtubule polymers and in fractions eluted from a microtubule affinity column (authors' unpublished data). It is interesting that we have also examined the presence of τ -like proteins in high-speed supernatants from isolated larval nervous tissue, and we have also found immunoreactivity of a *Drosophila* 85-kDa component with anti- τ antibodies (data not shown). The polyclonal antibody against purified τ protein and the monoclonal Tau-2 also recognized a protein band at ~ 205 kDa (Fig. 6A, lanes 2 and 3). A positive control of brain τ revealed with the polyclonal anti- τ antibody is also shown (Fig. 6B). The results based on data using both antibodies to structural epitopes and to binding domains on τ indicate that DMAP-85 shares structural and functional

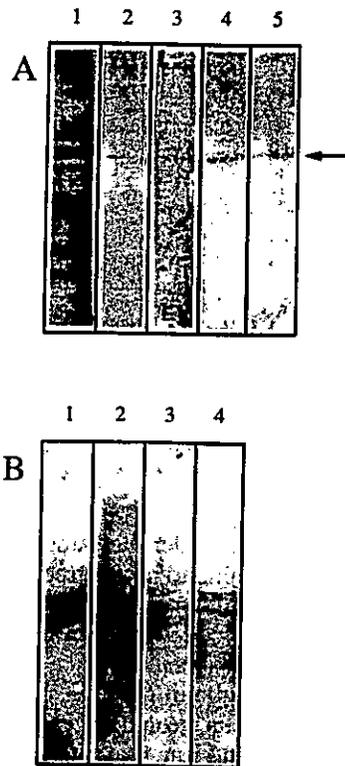


FIG. 6. DMAP-85 and τ share antigenic epitopes as assessed by antibody probes. A: Coomassie Brilliant Blue staining of a 10% SDS gel prepared with a protein fraction obtained from a calmodulin affinity column (lane 1). The cross-reactivity of DMAP-85 (arrow) was analyzed by using the following antibodies: Tau-2, a commercial monoclonal anti- τ antibody, diluted 1:500 (lane 2); a polyclonal antibody against perchloric acid-purified τ , diluted 1:100 (Georgieff et al., 1991) (lane 3); a site-specific polyclonal antibody directed against the first τ repeat V¹⁸⁷-G²⁰⁴ (TRS1.2), diluted 1:200 (lane 4); and a polyclonal sequence-specific antibody (B19-1) raised against a synthetic peptide corresponding to amino acids 29-48 in mouse τ (Gache et al., 1992), diluted 1:500. B: Positive controls of Coomassie Brilliant Blue-stained purified brain τ (lane 1) and western blots using the site-directed polyclonal antibody TRS1.2, diluted 1:200 (lane 2); the sequence-specific antibody B19-1, diluted 1:500 (lane 3); and a polyclonal antibody against perchloric acid-purified τ , diluted 1:100 (lane 4). Dilutions of alkaline phosphatase-conjugated second antibodies (anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG) were 1:1,000.

determinants with mammalian τ proteins and probably with other MAPs that contain the repeated binding sequences (Lewis et al., 1988).

DISCUSSION

In this report we have identified an 85-kDa protein (DMAP-85) from *D. melanogaster* larvae that shares common features with mammalian MAPs. The presence of a set of proteins functionally similar to MAPs in *Drosophila* embryos has been previously described (Wandosell and Avila, 1987; Kellogg et al., 1989). Furthermore, Goldstein et al. (1986), using the taxol-dependent assembly procedure (Vallee, 1982), were

able to identify a 205-kDa protein in a *Drosophila* cultured cell line. Previous studies (Vallee, 1982; Vallee and Bloom, 1983) have shown that MAPs can be recovered from taxol-stabilized microtubules by exposure to high salt concentrations and demonstrated that MAPs obtained by this procedure were identical to those recovered by assembly-disassembly cycles. Within this context, it is worth pointing out that DMAP-85 and a minor fraction of other proteins cosedimented with microtubules isolated from *Drosophila* larvae using the taxol-dependent procedure, and they were recovered after exposure of microtubules to a high ionic strength solution. This result permitted us to consider DMAP-85 as a putative larval MAP, according to criteria defined for neuronal MAPs (Vallee, 1982).

It was noteworthy that DMAP-85 exhibited the capacity to interact with a discrete functional domain on tubulin, β II-(422-434), immobilized on an affinity column, indicating that binding of this protein to tubulin involves the region encompassing residues 422-434 within the C-terminal regulatory domain of β II-tubulin. This region plays an essential role in the selective interactions with MAPs (Serrano et al., 1984a; Maccioni et al., 1988; Vera et al., 1989), and it is involved in regulation of the tubulin assembly-disassembly process (Serrano et al., 1984b). Within this context, competition experiments showing that the β II peptide decreased the effects of DMAP-85 on tubulin assembly provide further evidence of this interaction. In these experiments, a noncomplete inhibition was observed after an excess of β II-(422-434) peptide was added to the assembly mixture. A possible explanation is that DMAP-85 might also interact with a second domain on tubulin and that such an interaction may contribute to its assembly-promoting effect. In this regard, we know that MAP-2 exhibits at least two binding subdomains within the C-terminal region of β -tubulin (Cross et al., 1991). On the other hand, the affinity of DMAP-85 for native tubulin might be higher than that for the β II-(422-434) peptide. Similarly, the association constant (K_a) of this β -tubulin peptide for MAP-2 is approximately two orders of magnitude lower than that for the binding of the 4-kDa C-terminal tubulin segment to MAP-2 (Maccioni et al., 1988). Consistent with its specific binding to β II-(422-434)-tubulin peptide, the affinity-purified DMAP-85 had the capacity to enhance both the rate and the extent of tubulin assembly in a dose-dependent fashion, a relevant feature found in mammalian MAPs. The reversion of assembly products by cooling (Herzog and Weber, 1977) combined with the electron microscopy observations of DMAP-85-induced polymers indicates that the assembly products were normal microtubules. The results clearly indicate that DMAP-85 functions as a MAP by inducing tubulin assembly and support a role of this protein in the dynamic organization of the microtubule cytoskeleton.

It is important to analyze the nature of DMAP-85

interaction in the light of information on *Drosophila* tubulin. The predicted amino acid sequences of each family of *Drosophila* α - and β -tubulins, with the exception of the stage-specific β 3-tubulin and the sex-specific α 4-tubulin genes, are very similar to one another and to known sequences of α - and β -tubulin from other species (Theurkauf et al., 1986; Rudolph et al., 1987). Comparison of the C-terminal domains of *Drosophila* β -tubulin isotypes with mammalian β -tubulins reveals a high degree of homology in the region including residues from 400 to 434, whereas most of nonconservative substitution appeared within the extreme C-terminal moiety. This analysis, along with the conserved acidic nature of *Drosophila* β -tubulin C-terminal domain, suggests that DMAP-85 interaction with tubulin from *Drosophila* may involve molecular mechanisms similar to those described for τ and MAP-2 binding to brain tubulin (Fariás et al., 1992).

The affinity chromatographic behavior of DMAP-85 with the tubulin peptide β II-(422-434) and with calmodulin showed similarities with τ and MAP-2 (Sobue et al., 1981; Lee and Wolff, 1984; Maccioni et al., 1988). In agreement with the experiments showing DMAP-85 binding to the C-terminal tubulin domain, a direct interaction between affinity-purified DMAP-85 and tubulin was observed in the overlay experiments, indicating that the site for tubulin interaction on this protein is reactive under the overlay conditions. Furthermore, DMAP-85 incorporated into tubulin polymers with a stoichiometry of 1:5.3 mol/mol, which is only slightly smaller than the molar ratio of 1:6 calculated for τ interaction (Hirokawa et al., 1988).

Several microtubule-interacting proteins have been identified in extracts of early *Drosophila* embryos based on their capacity to interact with microtubule affinity columns (Kellogg et al., 1989). These proteins may function as part of a broad microtubule-interacting protein complex and may establish transient links with microtubules. The remarkable complexity of the microtubule network may account for several larval microtubule-interacting proteins. Despite this complexity, the use of site-specific affinity columns allowed us to isolate a single protein component, DMAP-85, which appears to be an important assembly-promoting protein in *Drosophila* larvae.

Cross-reactivity between DMAP-85 and antibodies that specifically tag mammalian τ suggested the presence of common epitopes between these proteins. It is interesting that a site-specific antibody raised against the first repeated sequence on τ recognized DMAP-85. The sequence repeats found in τ , MAP-2, and MAP-4 constitute the microtubule-binding motifs on MAPs involved in promoting tubulin assembly (Ennulat et al., 1989; Himmler et al., 1989; Maccioni et al., 1989). Furthermore, DMAP-85 was also recognized by a sequence-specific antibody that was raised against an N-terminal peptide of τ (Gache et al., 1992). The fact that the DMAP-85 possesses structural and functional epitopes with an extended homology with τ supports

the evidence that this protein functions as a *Drosophila* τ -like protein. The site-specific probe as well as the N-terminal-directed antibody did not react with the 205-kDa protein identified after calmodulin-affinity chromatography. This result suggests that the larval 205-kDa component may be related to the high-molecular-weight protein described in a *Drosophila* cell culture line, which apparently does not present a sequence homology with other known MAPs (Irminger-Finger et al., 1990). On the other hand, our findings on the recognition of larval 205-kDa protein by antibodies produced against the entire τ suggest that this protein might share similarities with τ , possibly at the level of structural domains not involved in τ interaction with microtubules.

In summary, we have identified a novel DMAP-85 that seems to share many of the functional properties of mammalian MAPs. The protein was purified by its interaction with a peptide corresponding to a MAP binding domain on β -tubulin, and it promoted assembly of tubulin. DMAP-85 appeared to establish strong interactions with tubulin, and it was stoichiometrically integrated into the microtubule structure. In addition, DMAP and τ protein seem to share immunological homology, which suggests structural similarities at the level of their tubulin binding domains and the N-terminal region of these proteins.

Acknowledgment: This research has been supported by grants from the Council for Tobacco Research, U.S.A., the European Community, DTI, and Fondecyt (to R.B.M.). We thank Dr. Pedro Labarca (Centro de Estudios Científicos de Santiago) for valuable discussions and for providing the facilities and supply of the *Drosophila melanogaster* used in this research and the Program Human Frontier in Science from Centro de Estudios Científicos de Santiago. We also thank Luisa Soto for excellent technical assistance. We are grateful to Dr. Jacques Nunez (INSERM, France) for his generous gift of the B19-1 antibody and for criticism and valuable discussions of the manuscript. We also thank Dr. Wilfredo Mellado for his generous gift of an anti- τ antibody.

REFERENCES

- Aizawa H., Emori Y., Mori A., Murofoshi H., Sakai H., and Suzuki K. (1990) Functional analyses of the domain structure of microtubule-associated protein-4 (MAP-U). *J. Biol. Chem.* 266, 9841-9846.
- Bershadsky A. and Vasiliev I. (1988) *Cytoskeleton*. Plenum Press, New York.
- Binder L. I., Frankfurter A., and Rebhun L. I. (1985) The distribution of tau in the mammalian nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371-1378.
- Bloom G. S., Schoenfel T. A., and Vallee R. B. (1984) Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (microtubule-associated protein 1) in the nervous system. *J. Cell Biol.* 98, 320-330.
- Bloom G. S., Luca F. C., and Vallee R. B. (1985) Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5404-5408.
- Brion J. P., Guilleminot J., Couchie D., Flament-Durand J., and Nunez J. (1988) Both adult (50-70 kDa) and juvenile (48

- kDa) tau microtubule associated proteins are axon-specific in the developing adult cerebellum. *Neuroscience* 25, 139-144.
- Bulinsky J. and Borisy G. G. (1979) Self-assembly of microtubules in extracts of cultured HeLa cells and the identification of HeLa microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 293-297.
- Bulinsky J. and Borisy G. G. (1980) Immunofluorescence localization of HeLa cell microtubule-associated proteins on microtubules *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Biol.* 87, 792-801.
- Cáceres A., Potrebic S., and Kosik K. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* 11, 1515-1523.
- Cáceres A., Mautino J., and Kosik K. (1992) Suppression of MAP-2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9, 607-618.
- Cleveland D. W. (1990) Microtubule MAPping. *Cell* 60, 701-702.
- Cleveland D. W., Hwo S. Y., and Kirschner M. W. (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116, 227-248.
- Couchie D., Mavilia C., Georgieff I. S., Liem R. K. H., Shelanski M. L., and Nunez J. (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4378-4381.
- 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 peptides. *Biochemistry* 30, 4362-4366.
- Cross D., Vial C., and Maccioni R. B. (1993) A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cell lines. *J. Cell Sci.* 105, 51-60.
- Dinsmore J. H. and Solomon F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* 64, 817-826.
- Ennulat D., Liem R., Hashim G., and Shelanski M. (1989) Two separate 18-amino-acid domains of tau promote polymerization of tubulin. *J. Biol. Chem.* 264, 5327-5330.
- Farias G., Vial C., and Maccioni R. B. (1992) Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. *Mol. Cell. Biochem.* 112, 81-88.
- Gache Y., Guilleminot J., Ricolfi F., Theiss G., and Nunez J. (1992) A τ -related protein of 130 kDa is present in Alzheimer brain. *J. Neurochem.* 58, 2005-2010.
- Gaskin F., Cantor C. R., and Shelanski N. C. (1974) Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of microtubules. *J. Mol. Biol.* 89, 736-773.
- Georgieff I. S., Liem R. K. H., Mellado W., Nunez J., and Shelanski M. L. (1991) High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J. Cell Sci.* 100, 55-60.
- Goedert M., Wischik C. M., Crowther R. A., Walker J. E., and Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease. Identification as microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4051-4055.
- Goedert M., Spillantini M., Potter M., Ulrich J., and Crowther R. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393-399.
- Goldstein L. S. B., Laymon R. A., and McIntosh J. R. (1986) A microtubule-associated protein from *Drosophila melanogaster*. Identification, characterization, and isolation of coding sequences. *J. Cell Biol.* 102, 2076-2087.
- González M., Vial C., and Maccioni R. B. (1992) Identification and roles of MAPs isoforms in cultured cells. (Abstr.) *Mol. Biol. Cell* 3, 259a.
- Harlow E. and Lane D. (1988) Immunoblotting, in *Antibodies. A Laboratory Manual* (Harlow E. and Lane D., eds), pp. 471-510. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Herrmann H., Dalton J. M., and Wiche G. (1985) Microheterogeneity of microtubule-associated proteins MAP 1 and MAP 2. *J. Biol. Chem.* 269, 5797-5803.
- Herzog W. and Weber K. (1977) *In vitro* assembly of pure tubulin into microtubules in absence of microtubule-associated proteins and glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1860-1864.
- Himmler A. (1989) Structure of bovine tau gene: alternative spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1389-1396.
- Himmler A., Drechsel D., Kirschner M., and Martin D. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1381-1388.
- Hirokawa K., Shiomura Y., and Okabe S. (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J. Cell Biol.* 107, 1449-1459.
- Huber G., Alaimo-Beuret D., and Matus A. (1985) MAP 3: characterization of a novel microtubule-associated protein. *J. Cell Biol.* 100, 1009-1026.
- Irminger-Finger I., Laymon R. A., and Goldstein L. S. B. (1990) Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the *Drosophila* 205K MAP. *J. Cell Biol.* 111, 2563-2572.
- Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T., and Hirokawa N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundling formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J. Cell Biol.* 109, 1173-1184.
- Kellogg D. R., Field C. M., and Alberts B. M. (1989) Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J. Cell Biol.* 109, 2977-2991.
- Kindler S. B., Schultz B., Goedert M., and Garner C. C. (1990) Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265, 19679-19684.
- Kosik K. S., Orecchio L. D., Bakalis S., and Neve R. L. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee G., Neve R., and Kosik K. (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2, 1616-1624.
- Lee Y. C. and Wolff J. (1984) Calmodulin binds to both MAP 2 and tau proteins. *J. Biol. Chem.* 259, 8041-8044.
- Lewis S. A., Villasante A., Sherline P., and Cowan N. (1986) Brain specific expression of MAP 2 detected using a cloned cDNA probe. *J. Cell Biol.* 102, 2098-2105.
- Lewis S. A., Wang D., and Cowan N. J. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 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) Microtubule organization 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*. ICSU Press-IRL, Oxford.
- Maccioni R. B., Rivas C., and Vera J. (1988) Differential interaction of synthetic peptides from carboxyl-terminal regulatory domain on tubulin with microtubule associated proteins (MAPs). *EMBO J.* 7, 1957-1963.
- Maccioni R. B., Vera J., Dominguez J., and Avila J. (1989) A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 568-579.
- Maccioni R. B., Vial C., Cross D., and González M. (1992) Specific macromolecular interactions that modulate cytoskeleton organization, in *Progresos en Biología Celular* (Becerra J., Pérez-Figares J. M., and Fernández-Llebrez P., eds), pp. 153-159. University of Malaga, Malaga, Spain.
- Nunez J. (1988) Immature and mature variants of MAP-2 and tau proteins and neuronal plasticity. *Trends Neurosci.* 11, 477-479.
- Olmsted J. B. (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 421-458.
- Padilla R., Maccioni R. B., and Avila J. (1990) Calmodulin binds

- to a tubulin binding site on the microtubule-associated protein tau. *Mol. Cell. Biochem.* **97**, 35–41.
- Pallas D. and Solomon F. (1982) Cytoplasmic microtubule-associated proteins: phosphorylation at novel sites is correlated with their incorporation into assembled microtubules. *Cell* **30**, 407–414.
- Paryzek L. M., Asnes C. F., and Olmsted J. B. (1984) MAP 4: occurrence in mouse tissues. *J. Cell Biol.* **99**, 1309–1315.
- Raff J. W., Kellogg D. R., and Alberts B. M. (1993) *Drosophila* γ -tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs. *Cell Biol.* **121**, 823–835.
- Rivas-Berrios A., Hernández M., Domínguez 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.
- Rozdzial M. M., Neighbors B. W., and McIntosh J. R. (1990) Blot overlay identification of microtubule-binding peptides from bovine brain. *Eur. J. Cell Biol.* **52**, 27–35.
- Rudolph J. E., Kimble M., Hoyle H. D., Subler M. A., and Raff E. C. (1987) Three *Drosophila* β -tubulin sequences: a developmentally-regulated isoform β 3, the testis-specific isoform β 2, and an assembly defective mutation of the testis-specific isoform reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for β -tubulin function. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2231–2242.
- Serrano L., Avila J., and 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.
- Sobue K., Fujita M., Muramoto Y., and Kakiuchi S. (1981) The calmodulin-binding protein in microtubules is tau factor. *FEBS Lett.* **132**, 137–140.
- Theurkauf W. E., Baum H., Bo J., and Wensik P. C. (1986) Tissue-specific and constitutive α -tubulin genes of *Drosophila melanogaster* code for structurally distinct proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8477–8481.
- Vallee R. (1982) A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs). *J. Cell Biol.* **92**, 435–442.
- Vallee R. B. and Bloom G. S. (1983) Isolation of sea urchin egg microtubules with taxol and identification of mitotic spindle microtubule-associated proteins with monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6259–6263.
- Vallee R. B., Bloom G. S., and Theurkauf W. E. (1984) Microtubule-associated proteins: subunits of the cytomatrix. *J. Cell Biol.* **99** (Suppl.), 38s–44s.
- Vera J. C., Rivas C., and Maccioni R. B. (1989) Biochemical dissection of the role of the 1 kDa C-terminal domain of tubulin subunits in the assembly of microtubules. *Biochemistry* **28**, 333–339.
- Wandosell F. and Avila J. (1987) Microtubule-associated proteins present in different developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biochem.* **35**, 83–92.
- Weingarten M., Lockwood A., Hwo S., and Kirschner M. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1858–1862.
- West R. R., Tenbarge K. M., and Olmsted J. B. (1991) A model for microtubule-associated protein 4 structure. *J. Biol. Chem.* **266**, 21886–21896.
- White K. and Kankel D. R. (1978) Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **65**, 296–321.
- Wiche G., Oberkanins C., and Himmler A. (1991) Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* **124**, 217–273.

Tubulin domains for the interaction of microtubule associated protein DMAP-85 from *Drosophila melanogaster*

Juan P. Henríquez, Verónica Cambiazo and Ricardo B. Maccioni

Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Chile and International Center for Cancer and Developmental Biology (ICC), Casilla 653, Santiago, Chile

Received 10 July 1995; accepted 16 January 1996

Abstract

The interaction of microtubule associated proteins (MAPs) with the microtubule system has been characterized in depth in neuronal cells from various mammalian species. These proteins interact with well-defined domains within the acidic tubulin carboxyl-terminal regulatory region. However, there is little information on the mechanisms of MAPs-tubulin interactions in nonmammalian systems. Recently, a novel tau-like protein designated as DMAP-85 has been identified in *Drosophila melanogaster*, and the regulation of its interactions with cytoskeletal elements was analyzed throughout different developmental stages of this organism. In this report, the topographic domains involved in the binding of DMAP-85 with tubulin heterodimer were investigated. Affinity chromatography of DMAP-85 in matrixes of taxol-stabilized microtubules showed the reversible interaction of DMAP-85 with domains on the microtubular surface. Co-sedimentation studies using the subtilisin-treated tubulin (S-tubulin) indicated the lack of association of DMAP-85 to this tubulin moiety. Moreover, studies on affinity chromatography of the purified 4 kDa C-terminal tubulin peptide bound to an affinity column, confirmed that DMAP-85 interacts directly with this regulatory domain on tubulin subunits. Further studies on sequential affinity chromatography using a calmodulin affinity column followed by the microtubule column confirmed the similarities in the interaction behavior of DMAP-85 with that of tau. DMAP-85 associated to both calmodulin and the microtubular polymer. These studies support the idea that the carboxyl-terminal region on tubulin constitutes a common binding domain for most microtubule-interacting proteins. (Mol Cell Biochem 158: 149–159, 1996)

Key words: tubulin, C-terminal regulatory domain, DMAP-85, *Drosophila melanogaster*, microtubule affinity columns

Abbreviations: MAPs – microtubule-associated proteins; C-terminal – carboxyl-terminal; SDS-PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS; DTT – dithiothreitol; BSA – bovine serum albumin

Introduction

Microtubules are ubiquitous cellular organelles formed by the assembly of tubulin heterodimer and microtubule-associated proteins (MAPs). Tubulin retains the capacity to self-associate *in vitro* into microtubules, bind nucleotides and interact with proteins of the MAPs family [1–3]. Cumulative evidence during the past decade has indicated that MAPs play major regulatory roles in microtubule assembly both *in vitro*

and *in vivo* [4, 5]. Limited proteolysis along with studies using synthetic peptides have proven to be useful in the identification of functional domains on the tubulin molecule [6, 7]. Different experimental approaches led to demonstration that the C-terminal moiety of both tubulin subunits constitutes an essential site for the interaction of the different MAPs, thus modulating tubulin assembly process [6–9]. Additional studies on the substructure of this regulatory moiety showed that the tubulin sequence $\beta(422-434)$ is directly involved in the

interaction of tau and MAP-2 [10], while the variable domain within the acidic extreme C-terminal region appears to participate in the binding of the different molecular variants of MAP-1 and the cytosolic dynein MAP-1C [11]. On the other hand, molecular studies on the MAPs family have revealed that the high molecular weight MAP-2, MAP-3 and MAP-4 along with the intermediate size proteins tau and MAP-2C share a tandem of 18-aminoacid repeated sequences, which constitute common microtubule binding motifs [12–14]. Moreover, the first two repeats on this basic domain on tau and MAP-2 appears to be implicated in their interactions with actin filaments, and a role in bridging microtubules and actin filaments has been postulated for these MAPs [15, 16].

Recently, it has been described the existence of a group of proteins from different animal species capable to interact with the microtubular system through domains with similar characteristics of those of neuronal MAPs [17]. The use of microtubule affinity columns has proven to be a useful approach to identify new MAPs in non-mammalian systems [18, 19]. Among novel MAPs found on the basis of these criteria, a protein designated as DMAP-85 has been identified in *Drosophila melanogaster* as a tau-like component. This protein shares common functional and structural epitopes with brain tau [20]. DMAP-85 interacts with microtubules, and a stoichiometry of around 1 mole DMAP-85 per 6 moles of tubulin in the polymer, has been determined. Furthermore, DMAP-85 has the capacity to promote microtubule assembly in a concentration-dependent fashion. Another feature of DMAP-85 is its ability to interact with calmodulin in a Ca^{2+} dependent fashion [20]. A detailed study of tubulin binding domains for DMAP-85 was carried out as a critical step to analyze its interactions with the microtubule system. This study showed that DMAP-85 interacted with taxol-stabilized microtubules, specifically with domains exposed in the surface of these polymers. Furthermore, a C-terminal tubulin peptide affinity column was developed, providing a demonstration of DMAP-85 interaction with this regulatory domain on tubulin heterodimer. Co-sedimentation studies with S-tubulin polymers indicated the lack of association of DMAP-85 to this large proteolytic fragment of tubulin.

Material and methods

Materials

Nitrocellulose membranes, acrylamide, bisacrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), cyanogen bromide-activated Sepharose 4B, calmodulin-agarose, the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin A, aprotinin, leupeptin, soybean trypsin inhibitor, N-p-tosyl-arginine methyl ester (TAME), dithiothreitol and the buffers N-morpholino ethanesulfonic acid (Mes), piperazin-

N,N'-bis-[2-ethanesulfonic acid] (Pipes) and Tris-(hydroxymethyl) aminomethane were from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Affigel-10 and Affigel-15 were from BioL (Richmond, CA). Glutaraldehyde and uranyl acetate were from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). Taxol was a gift from the Drug Synthesis and Chemistry Branch, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, U.S.A. All reagents were of the highest analytical quality.

The fly *Drosophila melanogaster* used in this study was from wildtype Canton-S stocks. They were raised at 22°C on standard *Drosophila* food in the Laboratory of Cellular Physiology, Faculty of Sciences, University of Chile.

Protein purification

Microtubular proteins were prepared from bovine brains through three temperature-dependent cycles of assembly and disassembly [21]. Microtubule pellets were frozen in liquid nitrogen after the second cycle and stored at $-70^{\circ}C$. Immediately prior to use the microtubular pellets were resuspended in Assembly buffer (0.1 M Mes, pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$ and 2 mM EGTA), and a third cycle of assembly was performed. Tubulin depleted of MAPs was obtained by phosphocellulose chromatography as described by Weingarten *et al.* [22]. Purification of the largest fragment resulting from subtilisin digestion of tubulin (S-tubulin) was performed by the procedure of Serrano *et al.* [23], with some minor modifications as follows: A tubulin sample at a final concentration of 1 mg/ml was digested with 1.2% w/w subtilisin for 30 min at $37^{\circ}C$. The reaction was terminated by adding 2 mM PMSF and bringing the samples to $4^{\circ}C$. The S-tubulin product was permitted to assemble by the addition of 1 mM GTP and 1 μ M taxol followed by incubation for 30 min at $37^{\circ}C$. The polymer was pelleted by centrifugation at $45,000 \times g$ for 30 min at $4^{\circ}C$ in a Sorvall ultracentrifuge. The S-tubulin pellet was resuspended in a minimum volume of 20 mM Mes, pH 6.8, containing 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 20 μ M taxol and 1 mM DTT and the solubilized protein was filtered through microcentrifuge filters (30,000 nominal molecular weight limit, NMWL). Preparations of the 4 kDa peptide were obtained from the filtered supernatants, and contained both the α and β -peptides from tubulin's C-terminal region [7] using electrophoretic conditions that allowed separation of tubulin subunits [24]. The 4 kDa peptide preparations do not contain other peptide materials as indicated by a single migrating zone on sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% acrylamide electrophoresis.

In order to obtain enriched fractions of DMAP-85, around 100 *Drosophila* flies were homogenized by several passages through a teflon Dounce homogenizer in 50 mM Mes, pH 6.8, containing 1 mM $MgCl_2$, 0.05 Nonidet P-40, 4 mM CaCl₂, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin and

0.2 mM PMSF. After 15 min incubation on ice, the homogenates were clarified by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min in a Sorvall microspin 24S centrifuge, and the high-speed supernatants were centrifuged at 126,000 \times g for 20 min in a Beckman Airfuge. For calmodulin agarose chromatography, the columns were equilibrated and washed with 50 mM Mes, 1 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂ (Buffer C). Approximately 1 ml of the high speed supernatant (2 mg/ml) was loaded over a one-milliliter calmodulin-agarose affinity column, and the bound protein was eluted by the addition of 4 mM EGTA in buffer C. The eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE system using 10% acrylamide [25].

Microtubule affinity chromatography

Purified tubulin (2–3 mg/ml) was assembled by the addition of 1 mM GTP, followed by the gradual addition of taxol, as described by Kellogg *et al.* [18, 19]. The affinity matrix was constructed according to described protocols [18, 27]. The affinity column was equilibrated with buffer M (40 mM Hepes, pH 7.6, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 25 mM KCl, 0.5 mM DTT, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin and 0.2 mM PMSF). Extracts of *Drosophila* adults were loaded on 1 ml of affinity resin, the column was washed with 20 column volumes of buffer M and then eluted by the addition of 0.5 M KCl in buffer M. The protein concentration of the eluted fractions was determined [18], the fractions with a higher content of protein were pooled, concentrated and the protein was precipitated with 10% TCA [8]. The protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, using 10% acrylamide [25]. The identity of the eluted proteins was determined by Western blot analysis using specific antibodies [28]. As controls, 0.5 mg/ml of purified bovine tau protein or other five proteins that do not interact with microtubules (β -galactosidase, fosforilase b, ovalbumin, serum albumin and carbonic anhydrase) were subjected to the microtubule affinity column.

In some experiments, *Drosophila* extracts were subjected to a double chromatography with two different columns connected in series. Samples were loaded onto the first column made with a calmodulin-agarose affinity matrix, equilibrated as described above and the retained protein eluted from calmodulin column with EGTA. The material eluted from calmodulin was subsequently adsorbed into the microtubule-affinity column, and then the retained protein was directly eluted from this column with 0.5 M KCl. This last column was washed, and the proteins eluted as previously described [18].

Thermostability experiments

The DMAP-85 property of thermal stability was analyzed by incubating a fraction eluted from the microtubule-affinity

column at 100°C for 5 min in the presence of 0.75 M NaCl and 10 mM β -mercaptoethanol [26]. The sample was centrifuged at 30,000 \times g for 30 min at 4°C, and the protein fraction containing DMAP-85 remained soluble and it was recovered in the supernatant. This fraction was then subjected to chromatography in the microtubule affinity column, under the conditions described above, in order to ascertain whether boiled DMAP-85 retains its microtubule binding capacity. Both the retained and unretained protein fractions were analyzed by Western blots using the polyclonal monospecific anti-DMAP-85 antibody.

Chromatography on the 4 kDa C-terminal tubulin peptide affinity matrix

The affinity matrix was made by covalent binding of the 4kDa C-terminal peptide of α and β -tubulins to a mixture of Affigel 15/Sepharose 4B. *Drosophila* extracts were loaded onto 1 ml of affinity resin equilibrated in buffer M, washed with 20 column volumes of the same buffer and the retained protein eluted with 0.5 M KCl in buffer M. Fractions with the highest content of protein were pooled, concentrated and the protein precipitated with 10% TCA [8]. The fractions were analyzed by electrophoresis [25], and the identity of the eluted protein was determined by Western blot analysis using specific antibodies [28].

Cosedimentation assays with S-tubulin

Samples of 100 μ l of the partially purified DMAP-85 (0.15 mg/ml) obtained after the calmodulin-agarose chromatography were mixed with 100 μ l of highly purified S-tubulin (2 mg/ml) in buffer S (20 mM Mes, pH 6.8, 1 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA), the sample was allowed to assemble and the resulting polymers were ultracentrifuged through a 4 M glycerol cushion at 126,000 \times g for 20 min at 25°C in an Airfuge (Beckman). Proteins contained in the pellets and supernatants were analyzed by electrophoresis. Controls of sedimentation of taxol-stabilized microtubules and S-tubulin polymers were also performed in the absence of DMAP-85.

Electrophoresis

Electrophoretic experiments were carried out according to the SDS-PAGE system [25] using slab gels of 10% acrylamide. In cosedimentation studies, the electrophoretic assays were performed with some modifications [24] for an optimal resolution of the α and β -tubulin subunits.

Western blots

Protein fractions obtained in affinity columns were separated by electrophoresis as indicated above, and transferred to nitrocellulose membranes in buffer 25 mM Tris-HCl, 0.375 M glycine, 20% methanol, pH 8.3 at 60 V for 2 h, using a BioRad transfer system [28]. Nitrocellulose strips were blocked with PBS containing 0.2% Tween-20 and 3% bovine serum albumin at room temperature for 2 h. The strips were incubated with an antibody anti-DMAP-85 or an anti-tau antibody TRS.1.2 [20] diluted in PBS containing 0.2% Tween-20 and 2% bovine serum albumin. After washing three times for 5 min with PBS-0.05% Tween-20, the strips were incubated with an anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase at a dilution of 1:1000. The immunoreactive bands were detected using alkaline phosphatase substrates bromo-chloro indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT).

Electron microscopy

The morphological aspects of the taxol-stabilized microtubules, as well as the S-tubulin polymers, were analyzed after fixation in 1% glutaraldehyde in a microtubule-stabilizing buffer (0.1 M Mes, pH 6.8, 1 mM Mg²⁺, 0.5 mM EGTA and 1 M glycerol) followed by staining with 1% uranyl acetate in carbon/collodion covered grids. The samples were observed in a Jeol X100 electron microscope.

Results

Binding of DMAP-85 to microtubule-affinity columns

We have constructed microtubule-affinity columns in order to analyze the interactions of DMAP-85, obtained from *Drosophila* extracts, with taxol-stabilized microtubules [19]. This procedure has proven to be useful for the isolation of novel MAPs having weaker affinities for microtubules, rather than for purification of the best known neuronal MAPs that exhibit a stronger binding. Figure 1A shows electron micrographs of the taxol-stabilized microtubule product that was bound to an Affigel affinity matrix. Despite that taxol polymers and those obtained with MAPs present some differences, mainly formation of frayed ends and lack of decoration along the structure, taxol assembled polymers retain the ability to bind MAPs [9]. Figure 1B shows a positive control in which purified bovine tau (lane 1) was retained in the microtubule affinity column, and it was eluted with 0.5 M KCl from the column (lane 4). As a negative control, Fig. 1C shows that the five proteins non-related to the microtubule system passed

unretained through the microtubule affinity column (lane 2). These results indicate that proteins do not adsorb unspecifically to the microtubule-affinity column, or at least no significant unspecific adsorption was detected.

The *Drosophila* protein was retained in the microtubule affinity column as evidenced in the experiment of Fig. 2 using polyacrylamide gel electrophoresis. The protein material in *Drosophila* extracts (Fig. 2, lane 1) was loaded onto the microtubule affinity column, and a large number of proteins were not bound to the column (Fig. 2, lane 2). However, a small set of proteins was adsorbed in the column and were eluted with a high ionic strength buffer (Fig. 2, lane 3), suggesting that these protein components have the capacity to interact with taxol-stabilized microtubules. The identity of the 85 kDa protein contained in the retained fraction with DMAP-85 was confirmed by Western blot analysis using a polyclonal antibody that specifically recognizes this *Drosophila* protein. Only one immunoreactive 85 kDa band was identified, demonstrating the presence of DMAP-85 in the affinity column retained fraction (Fig. 2, lane 4). According to densitometric profiles, DMAP-85 accounted for around 55% of total protein bound to microtubule affinity column.

The thermostability of DMAP-85 contained in the microtubule bound protein fraction was also assessed. The protein isolated from the microtubule affinity column (Fig. 2, lane 3) was boiled for 5 min and the fraction that remained soluble in the supernatant was analyzed by Western blots, indicating that the boiled protein retained its solubility and interaction with the TRS1.2 antibody. However, when a functional study was carried out by examining the capacity of the boiled protein to interact with the microtubule affinity column, DMAP-85 failed to associate to the affinity column (Figure 2, lane 7). However, the boiled *Drosophila* protein was present in the fraction that passed unretained through the column (Fig. 2, lane 6).

Sequential affinity chromatography

Since DMAP-85 is a tau-like protein it was of interest to examine its interaction with the tubulin/microtubule system and with calmodulin. An experiment was performed in which a *Drosophila* extract was subjected to a sequential affinity chromatography in two columns connected in series, calmodulin-agarose affinity column equilibrated in the presence of Ca²⁺ followed by the microtubule column. A fraction of proteins contained in the DMAP-85 preparation passed unretained through the calmodulin system after washing the column with the equilibration buffer (Fig. 3, lane 2). The fraction eluted from the calmodulin column was also analyzed (Fig. 3, lane 3). However, a highly purified DMAP-85 fraction was obtained after elution with 1 mM EGTA from the calmodulin column, followed by adsorption into the microtubule affinity column (Fig. 3, lane 4).

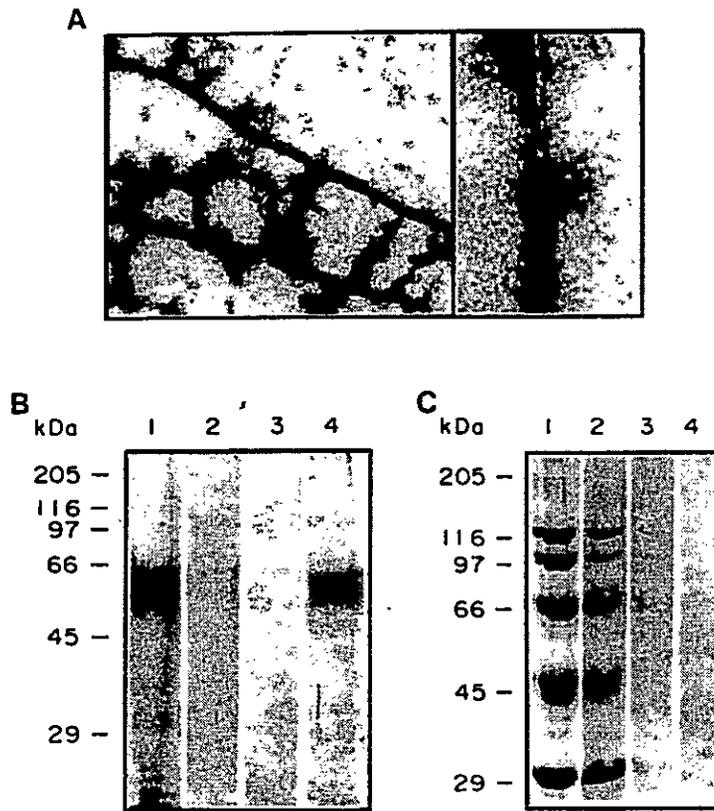


Fig. 1. Relevant features of taxol-stabilized microtubules and the microtubule affinity column. (A) Electron micrographs of microtubules assembled in the presence of 5 μ M taxol. Magnifications are: *left panel*: 55,400x; *right panel*: 111,500x. (B) Tau positive control: Coomassie blue-stained gel in the SDS-PAGE system with 10% acrylamide, showing brain tau prior to passage through the microtubule column (lane 1), protein that passed unretained through the column (lane 2), material eluted after washing with equilibrium buffer (lane 3), and the tau fraction eluted with 0.5 M KCl (lane 4). (C) Electrophoretic pattern controls of a mixture of proteins containing β -galactosidase, phosphorylase b, BSA, ovalbumin and carbonic anhydrase (lane 1), the protein that passed unretained through the microtubule column (lane 2), the fraction recovered after elution with the washing buffer (lane 3), and the fraction eluted with 0.5 M KCl (lane 4). None of these five proteins bound to the affinity resin.

tubule column and further removal with 0.5 M KCl. The identity of the 85 kDa MAP component, contained in the fraction eluted from the coupled column system (Fig. 3, lane 4), with DMAP-85 protein was corroborated by a Western blot analysis using the anti-DMAP-85 antibody (Fig. 3, lane 5). The presence of only one immunoreactive 85 kDa band indicates that DMAP-85, initially recovered from the calmodulin column, was also capable to interact with the microtubule affinity matrix. As described above, a calmodulin chromatography developed separately, resulted in a fraction enriched in DMAP-85 [20], as in Fig. 3 lane 3.

Chromatography in the 4kDa C-terminal tubulin peptide affinity matrix

It has been demonstrated that neuronal MAPs interact with well-defined regions located in the C-terminal regulatory

domain [10]. Moreover, previous studies have indicated the association of the β II(422–434) C-terminal tubulin peptide to DMAP-85 [20]. Within this context, it was very important to examine DMAP-85 interaction behavior with the isolated C-terminal regulatory moiety on tubulin subunits. In order to further analyze the interaction of DMAP-85 with the C-terminal tubulin domain, a *Drosophila* extract (Fig. 4, lane 1) was loaded onto an affinity column of the Affigel derivatized 4kDa C-terminal tubulin fragment. This fragment was obtained after subtilisin limited proteolysis of purified tubulin [6, 7]. Although the majority of proteins from the *Drosophila* extract passed unretained through the column, a set of polypeptides were specifically adsorbed in the column and were eluted with 0.5 M KCl (Fig. 4, lane 3). Western blot analysis with the anti-DMAP-85 specific antibody permitted to confirm that DMAP-85 bound to the tubulin peptide affinity column (Fig. 4, lane 4). The results suggest that DMAP-85 interacts with a domain contained in the C-terminal region of α and β -tubulin subunits.

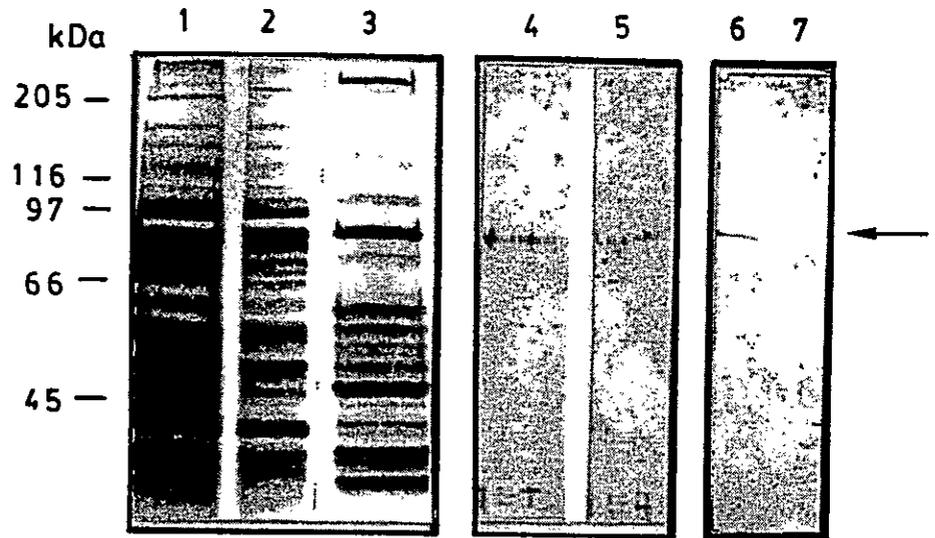


Fig. 2. Affinity chromatography of *Drosophila* extracts in the taxol-stabilized microtubules affinity matrix. Coomassie-stained polyacrylamide 10% showing the total soluble extracts subjected to chromatography (lane 1), the unretained protein material (lane 2) and protein eluted with 0.5 M KCl (lane 3). The protein eluted with 0.5 M KCl was concentrated, electrotransferred to a nitrocellulose membrane and stained with the polyclonal TRS.1.2 antibody directed to first tau repeat (lane 4). The thermosoluble protein that remained in the supernatant after subjecting the 0.5 M KCl eluate to a 5 min boiling also analyzed by Western blot with the TRS.1.2. antibody (lane 5). In a functional assay, DMAP-85 was boiled and then subjected to chromatography in microtubule column. The unretained protein fraction (lane 6) and the fraction retained in the column (lane 7) were analyzed by Western blot assays using anti-DMAP-85 monospecific antibody. Arrow denotes migration of DMAP-85.

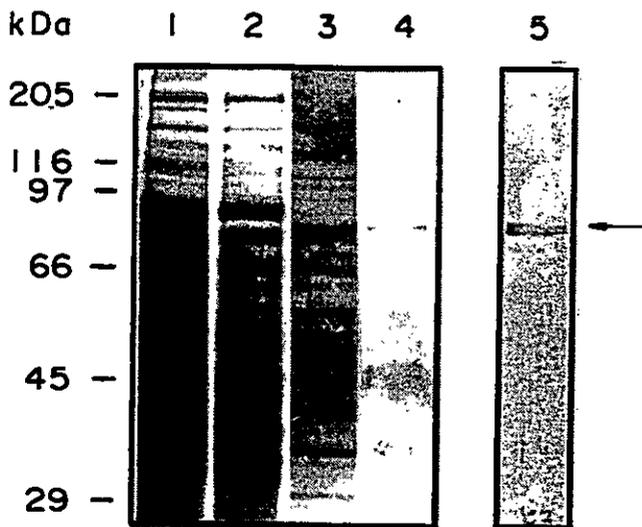


Fig. 3. Sequential affinity chromatography of *Drosophila* extracts using a calmodulin affinity resin coupled to the microtubule column. Stained polyacrylamide gels in the SDS-PAGE system shows the protein pattern of soluble *Drosophila* extract (lane 1), the fraction of protein non-retained in the column system (lane 2), the fraction of protein eluted with EGTA from the calmodulin column that was adsorbed directly into the taxol-microtubule column (lane 3), and protein eluted with 0.5 M KCl directly from the microtubule column (lane 4). The fraction eluted from the microtubule-affinity column was electrotransferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by Western blots using the polyclonal antibody to DMAP-85 (lane 5). The arrow indicate the migration of DMAP-85. A DMAP-85-enriched fraction was obtained after the coupled chromatographic system.

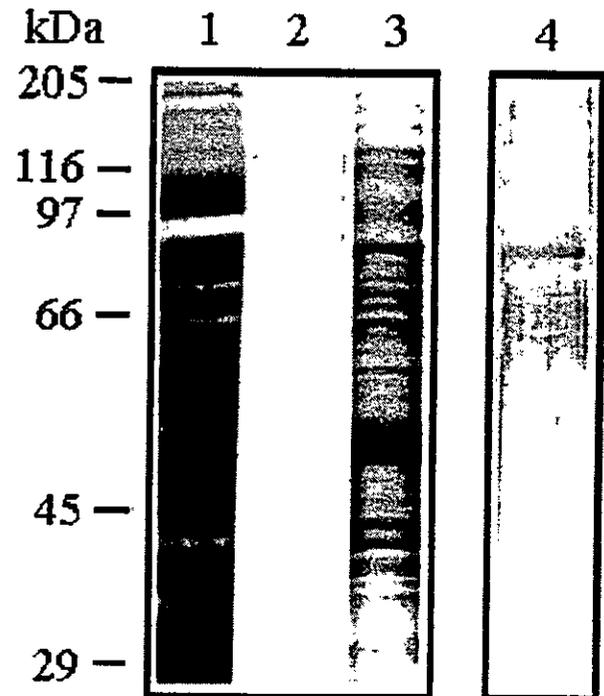


Fig. 4. Affinity chromatography of *Drosophila* extracts in 4kDa Cterru tubulin peptide columns. Electrophoresis in polyacrylamide 10% gels showing the proteins from the *Drosophila* extract (lane 1), the fraction washing with the equilibration buffer (lane 2), and the protein eluted with this column with 0.5 M KCl (lane 3). The proteins eluted with the ionic strength buffer were subjected to a Western blot analysis using antibody to DMAP-85 (lane 4). The arrow indicate the position of DMAP-85 revealed with this antibody. Immunodetection with a site-directed tau antibody TRS.1.2 revealed a major band corresponding to DMAP-85.

Cosedimentation of DMAP-85 with S-tubulin polymers

There is evidence that proteins that interact with microtubules bind also to polymers of the large S-tubulin protein fragment, remaining after subtilisin controlled digestion [7]. It was of interest to analyze if, besides DMAP-85 interaction with the C-terminal domain, this protein also interacts with regions contained in S-tubulin. S-tubulin α - and β -subunits were recognized by their faster electrophoretic migration as compared with the native tubulin subunits (Fig. 5C), and the S-tubulin polymers used in this study showed a typical organization in microtubule bundles as revealed by electron microscopy analysis (Fig. 5B). Taxol-stabilized microtubules and S-tubulin polymers generated in the presence of DMAP-85 were subjected to ultracentrifugation. The data from the electrophoretic analysis of cosedimentation products (Fig. 5A) revealed that DMAP-85 cosedimented with microtubules stabilized with taxol (Fig. 5A, lanes 1 and 2) since it was found in pellets in a significantly larger ratio DMAP-85/tubulin than the fraction of DMAP-85 remaining in the supernatant as determined by densitometric analysis. In this case, the ratio was 2.7 times higher in pellets as compared with the supernatant. However, only a minor fraction of DMAP-85 was recovered in pellets after sedimentation of S-tubulin polymers, and most of the protein remained in the supernatant (Fig. 5A, lanes 3 and 4). Controls in which sedimentation was performed with DMAP-85 in the absence of the polymers showed that a minor fraction of this protein precipitated (Fig. 5A, lanes 5 and 6). These data suggest that

the basal self-aggregation of DMAP-85 may account for protein cosedimentation with S-tubulin. Since the amount of aggregated protein in controls was equivalent to that found in pellets containing S-tubulin polymer as revealed by a densitometric analysis, these results indicate that the detected DMAP-85 binding to S-tubulin was unspecific.

Discussion

Cumulative evidence indicate that MAPs play a major role in modulating the assembly and stability of microtubules, as well as in mediating the linkage of microtubules with other components of the cytoskeletal network [3, 15]. It is known that the different MAPs interact with specific domains within the C-terminal regulatory region in both tubulin subunits [6-9]. On the other hand, molecular biological and immunological approaches have permitted the identification of a set of proteins that interact with microtubules, and that may exhibit a similar binding behavior to that described for the best known MAPs [3, 17]. In this context we analyzed the interaction of DMAP-85, recently identified as a *Drosophila* tau-like protein [20], with microtubules. The strategy based on the use of affinity chromatography with site-specific peptides bound to an affinity matrix, along with studies using site-directed monoclonal antibodies, have proven to be valuable in the search of new MAP-like proteins of regulatory importance [17]. The experiments described here (Figs 2-4), us-

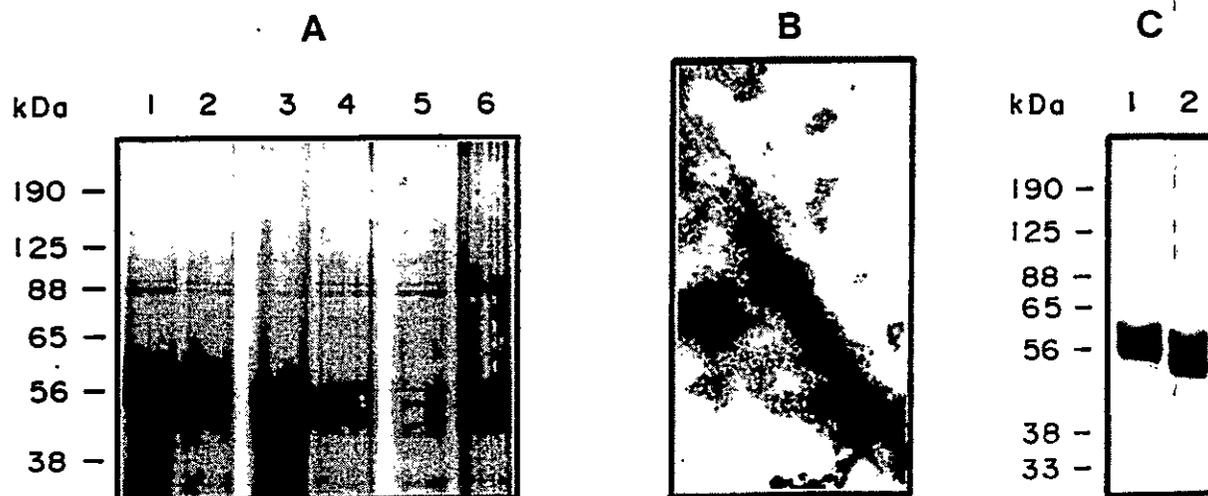


Fig. 5. Cosedimentation of the protein fraction enriched in DMAP85 with microtubules and S-tubulin polymers. (A) Polyacrylamide gel of proteins obtained after sedimentation of microtubules (1 and 2) and S-tubulin polymers (3 and 4) preincubated in the presence of DMAP-85. As a control DMAP-85 was also incubated in the absence of tubulin and S-tubulin and subjected to ultracentrifugation (lanes 5 and 6). Lanes 1, 3 and 5 correspond to material obtained in the pellets, while lanes 2, 4 and 6 correspond to the material recovered in the supernatants after ultracentrifugation. (B) Electron micrograph of S-tubulin polymers (45000x) formed in the presence of 1 mM GTP and in the absence of MAPs. (C) Electrophoresis in polyacrylamide slab gels showing the protein pattern of 15 mg purified tubulin (lane 1) and 15 mg of the subtilisin-cleaved large tubulin fragment, S-tubulin (lane 2). Molecular weight standards are shown at the left of panels A and C.

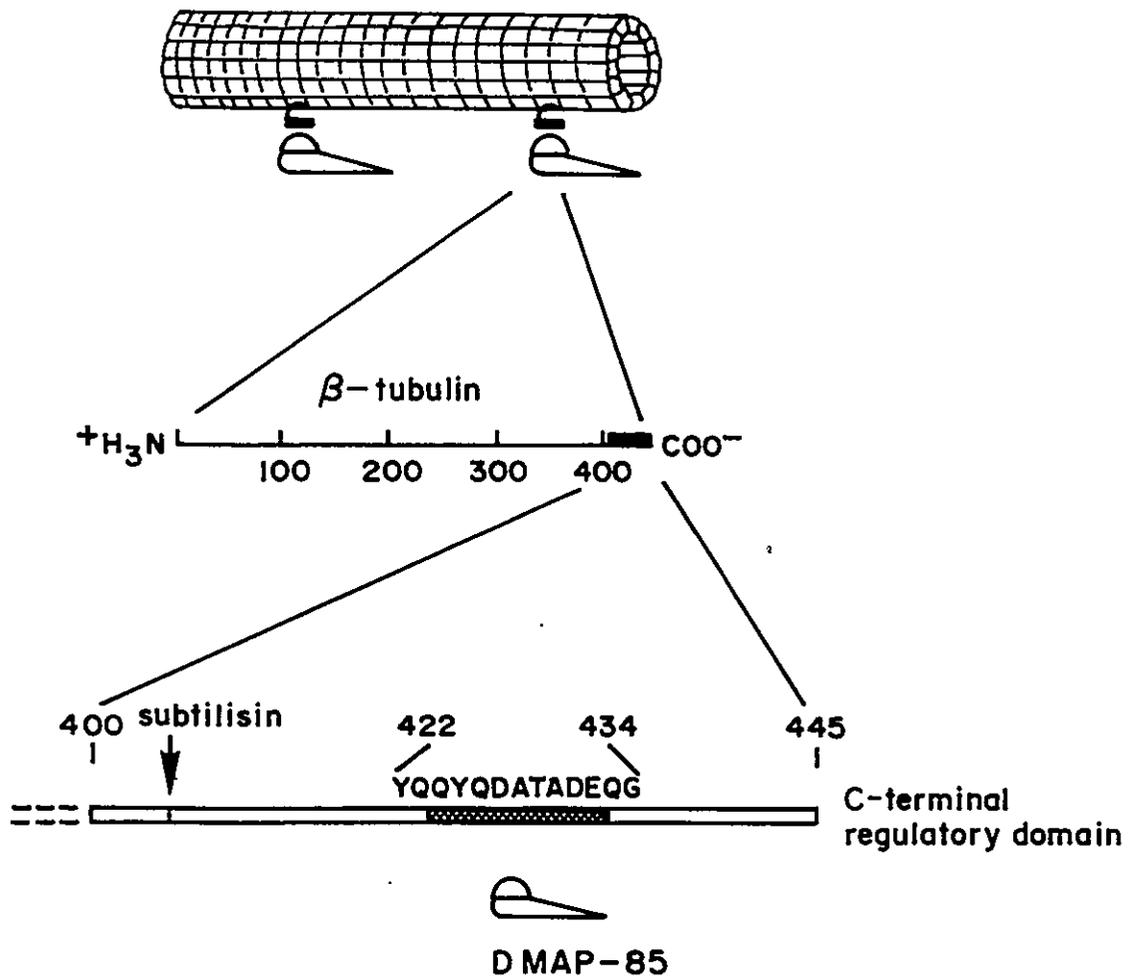


Fig. 6. Schematic representation of the interaction of DMAP-85 with the tubulin/microtubule system. A simplified scheme of the reversible association of DMAP-85 to the C-terminal tubulin moiety (filled rectangle) in the microtubule surface is shown in the upper portion of figure. A diagram projecting a representation of the S-tubulin molecule indicating the location of the C-terminal regulatory domain (filled rectangle) is also shown. Below this diagram an extended representation of the C-terminal β -tubulin region involved in the interaction of DMAP-85. This schematic representation highlights the domain β (422-434) directly involved in binding of the *Drosophila* protein DMAP-85. Numbers indicate the amino acid positioning in the tubulin sequence. An arrow at the left indicates the site for subtilisin cleavage.

ing tubulin-peptide affinity chromatography combined with microtubule-affinity columns provided useful information for the analysis of DMAP-85 binding to tubulin molecule. Studies on DMAP-85 behavior in microtubule affinity columns clearly demonstrated the interaction of this *Drosophila* protein with the microtubular polymers. This type of chromatography using taxol-stabilized microtubules bound to an affinity matrix, has been used as a tool to identify microtubule-interacting components associated to centrosomes in *Drosophila* embryos [18]. The efficiency of this chromatographic approach was corroborated in the positive control experiment, in which brain tau was selectively retained in the column (Fig. 1).

These columns have the advantage that the substrate immobilized in the affinity resin corresponds to a highly structured cytoskeletal component [19], instead of its isolated

protein units, thus permitting a direct analysis of microtubule-interacting proteins, in an experimental situation close to what it may occur in cells. From the purification point of view, these columns could provide a potential tool for isolating microtubule-interacting proteins that are more difficult to isolate on the basis of standard procedures [20]. It is worth to point out that another advantage of microtubule columns is their resistance to various chromatographic conditions, as a result of the stability of taxol-assembled microtubules [29]. In this context, it was found that the use of dimeric tubulin immobilized in Sepharose did not provide a reliable tool to analyze microtubule-interacting proteins, probably due to the instability of the free tubulin heterodimer [22]. The advantage of controlling the elution conditions in the microtubule chromatography, opens new perspectives for the study of new proteins that interact with the microtubule system.

Under the chromatographic conditions, it has been estimated that microtubule column could retain proteins with association constants K_a of at least 10^5 M^{-1} [19], which is low the value ($K_a = 7.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) for DMAP-85 binding microtubules [20]. As shown in Fig. 2 it was interesting to observe that DMAP-85 was significantly enriched in the fraction of proteins eluted from the microtubule column. Furthermore, this 85 kDa protein was the only component immunologically recognized by the specific anti-DMAP85 antibody. These results are also in agreement with data showing that DMAP-85 interacts with free tubulin immobilized in microcellulose, according to overlay experiments and cosedimentation with tubulin forming microtubules [20]. On the other hand, it was also of interest to visualize a protein of ~200 kDa which was detected in the fraction eluted from the microtubule column. This component could correspond to the 205K MAP previously identified in a *Drosophila* cell line [30].

It has been shown that DMAP-85 immunoreacts with different antibodies that recognize tau: (a) antibody against the first tau binding repeat [15]; (b) with an antibody directed to the N-terminal tau domain [31]; and (c) polyclonal and monoclonal antibodies that recognize native tau [20]. Besides immunological features, the question on whether DMAP-85 shares with tau the property of thermostability was also analyzed. DMAP-85 remained soluble in the supernatants after a 5 min boiling step, and the recovered protein maintained its immunoreactivity with the site-specific antibody S.1.2 directed to tau binding domain [20]. However, in a functional assay boiled DMAP-85 did not retain its capacity to bind to the microtubule affinity column, thus suggesting that DMAP85 is not a thermostable protein. This behavior of boiled DMAP-85 points to a difference with respect to mammalian tau and other MAPs, indicating that structural differences may also exist, since MAPs have been described to be thermostable [17].

Recent studies have shown that, by analogy with tau and MAP-2, DMAP-85 interacts with calmodulin in a Ca^{2+} dependent fashion. The experiment on the coupled chromatographic system, calmodulin affinity column followed by microtubule affinity chromatography, permitted to discard other proteins that coeluted with DMAP-85 when the single microtubule column was used. This was useful to further analyze the direct interaction of the 85 kDa protein with microtubule columns, since a fraction highly enriched in DMAP-85 was recovered (Fig. 3).

In the context of these results, it was also shown that DMAP-85 establish high affinity interactions with the 4kDa C-terminal tubulin fragment that contains the MAPs binding domains (Fig. 4, and scheme on Fig. 6). These studies are consistent with previous information indicating the binding of DMAP-85 to the synthetic β II(422-434) tubulin peptide, containing the sequence involved in tau and MAP-2 interactions [10, 14]. There is evidence that the fragment re-

sulting from limited subtilisin proteolysis contains a mixture of α and β 4kDa-C-terminal peptides [7]. On the other hand, it has been shown that α and β -tubulin isotypes exhibit the main differences in sequence within the extreme C-terminal moiety, and that these isotypes may have differential distribution within tissues [32, 33]. The fact that the most post-translational modifications of tubulin occurs at the level of the C-terminal domain, together with the isotype heterogeneity, suggest that this domain may act as a modulatory element for the interaction of microtubule-interacting proteins like DMAP-85. In turn, these interactions could contribute to control cytoskeletal organization and functions. As a matter of fact, polyglutamylation of C-terminal moieties in α and β -tubulin chains appears to regulate tau interaction with microtubules [34], and recent studies point to a role of tau in stabilizing microtubules in relation to post-translational modifications of tubulin in neuronal cells [35].

On the basis of structural properties of microtubules, the data in this report suggest that DMAP-85, and possibly other microtubule-interacting proteins, bind to domains exposed in the microtubular surface (Fig. 6). It is likely that DMAP-85 interaction with the immobilized microtubule polymer be mediated by binding to the C-terminal tubulin regulatory moiety. Studies have indicated that this domain is normally exposed in the microtubule surface serving as the binding site for the different MAPs already described [8]. Even though, information on the tertiary structure of tubulins is scarce, peptide maps revealed with site-directed antibodies confirm that the conserved region as well as the variable C-terminal region are exposed in the microtubule surface [36]. It is known that tubulin interactions with MAPs involve an accessible domain in this protein [10, 14]. However, there is evidence that other proteins that interact with microtubules bind to domains on tubulin which are apparently different than those for MAPs interactions, as in the case of MARP-1 [37] and motor proteins like kinesin [38-40].

In order to analyze the interaction of DMAP-85 with other domain on tubulin, cosedimentation assays with S-tubulin polymers were carried out [38]. This large tubulin segment appears to be related to the assembling activity of tubulin and the contact domains between dimers in the microtubular lattice, rather than the association of MAPs [41]. It was found that DMAP-85 cosedimented with microtubules, but no sedimentation with S-tubulin polymers was found. In fact, densitometric scans of DMAP-85 in electrophoretic gels showed that the DMAP-85/tubulin ratio increased with a saturation function in the microtubule pellets, but it was not affected in S-tubulin polymers. Control was equivalent to the amount of DMAP-85 aggregates unspecifically associated to the later polymers.

Conclusions

The data of this report confirm that the *Drosophila* DMAP-85, described as a tau-like protein, is a component of MAPs, since DMAP-85 interact specifically with the C-terminal regulatory domain of tubulin, without evidence of interaction with the larger S-tubulin segment. However, a difference with respect to tau is suggested in the thermostability experiments. Boiled DMAP-85 does not retain the functional capacity to bind to microtubule affinity columns. The data also indicate that DMAP-85 interacts with stabilized microtubules, and support its binding to the tubulin domain exposed in the microtubule surface. Affinity chromatography in taxol-assembled microtubules bound to an affinity matrix resulted to be a useful tool for studies on the interaction of DMAP-85, and as a possible way for purification of microtubule-interacting proteins like this *Drosophila* MAPs.

These studies, along with the evidence on the variability of the C-terminal tubulin domain, led to suggest that the C-terminal tubulin domain represents a common site for the interaction of several microtubule-interacting proteins of regulatory significance.

References

- Maccioni RB, Seeds N: Affinity labeling of tubulin's GTP exchangeable site. *Biochemistry* 22: 1572-1579, 1983
- Bershadsky A, Vasiliev J: 'Cytoskeleton'. Plenum Press, New York, 298 pp, 1988
- Olmsted JB: Microtubule associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* 2: 421-458, 1986
- Dinsmore JH, Solomon F: Inhibition of MAP-2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* 64: 817-826, 1991
- Kanai Y, Takemura R, Oshima T, Mori H, Ihara Y, Yanagisawa M, Masaki T, Hirokawa N: Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single cDNA. *J Cell Biol* 109: 1173-1184, 1989
- Serrano L, de la Torre J, Maccioni RB, Avila J: Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5989-5993, 1984
- Maccioni RB, Serrano L, Avila J, Cann JR: Characterization and structural aspects of the enhanced assembly of tubulin after removal of its carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem* 156: 375-381, 1986
- Vera JC, Rivas C, Maccioni RB: Antibodies to synthetic peptides from the tubulin's regulatory domain interact with tubulin and microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6763-6767, 1988
- Cross D, Domínguez J, Maccioni RB, Avila J: MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of β -tubulin. Studies with synthetic peptides. *Biochemistry* 30, 4362-4366, 1991
- Maccioni RB, Rivas C, Vera JC: Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins. *EMBO J* 7: 1957-1963, 1988
- Paschal B, Obar R, Vallee RB: Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP-2 with a common sequence at the C-terminus of tubulin. *Nature* 342: 569-572, 1989
- Lee G, Cowan N, Kirschner M: The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239: 285-288, 1992
- Lewis SA, Wang D, Cowan NJ: Microtubule-associated protein MAP-2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 243: 936-939, 1988
- Rivas-Berrios A, Hernández M, Domínguez J, Avila J, Maccioni RB: Common antigenic determinants of the tubulin binding domain of the microtubule-associated proteins MAP-2 and tau. *Biochim Biophys Acta* 1040: 382-390, 1990
- Cross D, Vial C, Maccioni RB: A tau-like protein interacts with microtubule fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J Cell Sci* 105: 51-59, 1993
- Henríquez JP, Cross D, Vial C, Maccioni RB: Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in different cell types. *Cell Biochem and Function* 13: 239-250, 1995
- Maccioni RB, Cambiazo V: The roles of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Reviews* 75: 853-864, 1995
- Kellogg DR, Field CM, Alberts BM: Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle, and kinetochore of an early *Drosophila* embryo. *J Cell Biol* 109: 2977-2991, 1989
- Miller KG, Field CM, Alberts BM, Kellogg DR: Use of actin filament and microtubule affinity chromatography to identify proteins that interact with the cytoskeleton. *Meth Enzymol* 196: 303-319, 1991
- Cambiazo V, González M, y Maccioni RB: DMAP-85: a tau like protein from *Drosophila melanogaster* larvae. *J Neurochem* 64: 1297-1301, 1995
- Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR: Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 765-769, 1973
- Weingarten MD, Suter MM, Littman DR, Kirschner MW: Properties of the depolymerization products of microtubules from mammalian brain. *Biochemistry* 13: 5529-5537, 1974
- Serrano L, Avila J, Maccioni RB: Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: Localization of the site for MAP2 interaction. *Biochemistry* 23: 4675-4681, 1984
- Maccioni RB, Seeds NW: Limited proteolysis of tubulin: Nucleation stabilizes an active conformation. *Biochemistry* 22, 1567-1572, 1983
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Vallee, R.B.: On the use of heat stability as a criterion for the identification of microtubule-associated proteins. *Biochem Biophys Commun* 133: 128-133, 1985
- Miller KG, Alberts BM: F-actin affinity chromatography: Technique for isolating previously unidentified actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4808-4812, 1989
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4354-4356, 1979
- Schiff PB, Horwitz SB: Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine-5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 20: 3247-3252, 1981
- Goldstein LSB, Laymon RA, y McIntosh JR: A microtubule-associated protein in *Drosophila melanogaster*. Identification, characterization, and isolation of coding sequences. *J Cell Biol* 102: 2076-2086, 1986
- Gache Y, Guilleminot J, Ricolfi F, Theiss G, Nunez J: A tau related protein of 130 kDa is present in Alzheimer brain. *J Neurochem* 64: 2005-2010, 1992
- Villasante A, Wang D, Dobner P, Dolph P, Lewis SA, Cowan NJ: Mouse α -tubulin mRNAs encode five distinct tubulin isotypes: tissue-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol* 6: 2409-2416, 1986

33. Lopata MA, Cleveland DW: *In vivo* microtubules are copolymers of available β -tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate β -tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigen. *J Cell Biol* 105: 1707-1720, 1987
34. Boucher D, Larcher JC, Gros F, Denoulet P: Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of *in vitro* interactions between the microtubule-associated tau and tubulin. *Biochemistry* 33: 12471-12477, 1994
35. Maccioni RB, Tapia L, Cambiazo V: Functional organization of tau proteins during neuronal differentiation and development. *Bras J Med Biol Res* 28: 827-841, 1995
36. Burns RG: α , β and γ -tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil Cytoskel* 20: 181-189, 1991
37. Hemphill A, Affolter M, y Seebeck T: A novel microtubule-binding motif identified in a high molecular weight microtubule-associated protein from *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 117: 95-103, 1992
38. Radionov VI, Gyoeva FK, Kashina AS, Kuznetsov SA, Gelfand VI: Microtubule-associated proteins and microtubule-based translocators have different binding sites on tubulin molecule. *J Biol Chem* 265: 5702-5707, 1990
39. Lopez LA, Scheetz MP: Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP-2. *Cell Motil Cytoskel* 24: 1-16, 1993
40. Marya PK, Syed Z, Fraylich P, Eagles PA: Kinesin and tau bind to distinct sites on microtubules. *J Cell Science* 107: 339-344, 1994
41. Maccioni RB, Serrano L, Avila J: Structural and functional domains of tubulin. *Bioessays* 2: 165-169, 1986

