



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Análisis de la interacción de las proteínas Hsp90, REST y Tau

T E S I S

Que presenta

Q.B.P. JESÚS ISMAEL CALZADA FRÍAS

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Génética y Biología Molecular

Director de la tesis

Dr. José Tapia Ramírez

Ciudad de México

Agosto, 2016

Agradecimientos a CONACYT

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría, este proyecto se realizó en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) No. De becario: 338257 No. De CVU: 625910.

Este trabajo fue realizado en:

El laboratorio 2 del departamento de Genética y
Biología Molecular (GBM) del Centro de
Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la
dirección del Dr. José Tapia Ramírez

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCION.....	12
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	12
ANTECEDENTES GENERALES	13
PÉPTIDOS A β	13
PROTEÍNA TAU	14
REST/NRSF.....	16
PROTEÍNA HSP90	18
PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS	20
INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS (<i>PROTEIN-PROTEIN DOCKING</i>).....	22
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	23
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
MATERIAL Y METODOS.....	27
TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	27
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236).....	28
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441	28
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF	29
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)	29
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441	30
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF	30
INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) y TAU 441 MEDIANTE FAR WESTERN BLOT	31
INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236) CON TAU 441 Y CON REST/NRSF MEDIANTE ENSAYO DE OVERLAY	31
COMPETENCIA DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS TAU 441 Y CON REST/NRSF POR LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236) MEDIANTE ENSAYO DE OVERLAY	32

OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAU 441	32
OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)	33
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÉNDICE	57
DETALLE DE PROCEDIMIENTOS	57
PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	57
TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	58
EXTRACCIÓN DE DNA MEDIANTE MINIPREP	59
Gel SDS-PAGE (geles de agarosa a diferentes porcentajes)	60
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)	61
EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)	61
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)	62
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441	63
EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441	63
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441	64
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF	65
EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF	65
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF	66
WESTERN BLOT PROTEÍNA HSP90 N (9-236)	67
WESTERN BLOT PROTEÍNA TAU	67
WESTERN BLOT PROTEÍNA REST/NRSF	68
INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) y TAU 441 MEDIANTE FAR WESTERN BLOT	69
INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) y TAU 441 MEDIANTE OVERLAY	70
INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) y REST/NRSF MEDIANTE OVERLAY	71
COMPETENCIA DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS TAU 441 Y CON REST/NRSF POR LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236) MEDIANTE ENSAYO DE OVERLAY	72

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa en la que se presentan depósitos anormales de proteínas; β -amiloide y Tau, esta última se ha encontrado estar relacionada con la neurodegeneración por sí sola. Por otra parte REST/NRSF parece jugar un papel importante como neuroprotector en el envejecimiento. La principal proteína involucrada en la proteostasis es la chaperona Hsp90 que se encuentran sobrerreguladas en la enfermedad de Alzheimer y tiende a presentar mayor afinidad por proteínas aberrantes. Por todo lo anterior es posible que las modificaciones aberrantes de la proteína Tau, principalmente fosforilación, tengan influencia sobre la estabilidad de la proteína REST/NRSF, por lo que las afinidades de interacción podrían jugar un papel clave en esta enfermedad.

En el presente trabajo se utilizaron plásmidos vectores que sobreexpresan las proteínas de GST-Hsp90 N (9-236), Tau 441 y REST/NRSF. Se optimizaron las condiciones para sobreexpresar y purificar las proteínas mediante cromatografía de afinidad. Para la expresión de las proteínas se hicieron modificaciones en las variables de tiempo, concentración de inductor IPTG, tasa de crecimiento y temperatura. En el caso particular de REST/NRSF se adiciono $ZnSO_4$. Una vez purificadas las proteínas se realizaron ensayos de interacción y de competencia. Los resultados utilizando ensayos tipo overlay e inmunodetección identifican como necesaria la estructura del N-terminal de la chaperona para su interacción, y bajo las condiciones del ensayo los resultados muestran que REST/NRSF presenta mayor afinidad por la chaperona, que Tau.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease in which abnormal protein deposits are presented; β -amyloid and Tau, the latter has been found to be related to neurodegeneration in itself. Moreover REST / NRSF seems to play an important role as a neuroprotective in aging. The main protein involved in proteostasis is Hsp90 which has been found to be upregulated in Alzheimer's disease and tends to have greater affinity for aberrant proteins. Accordingly, for all these reasons it is possible that aberrant Tau protein modifications, mainly phosphorylation, have an influence on the stability of the REST / NRSF protein, so that the affinities of interaction could play a key role in development disease.

In the present study, plasmid vectors overexpressing Hsp90 proteins GST-N (9-236), Tau 441 and REST / NRSF were used. The conditions were optimized to overexpress and purify proteins by affinity chromatography. For protein expression changes in variables of time, concentration of inducer IPTG, growth rate and temperature were made. In the particular case of REST/NRSF ZnSO₄ was added. Once purified proteins, interaction and competition assays were performed. Results using overlay and immunodetection assays, identified as necessary the structure of the N-terminal chaperone for their interaction, and under this conditions, the results show that REST / NRSF has greater affinity for the chaperone than Tau.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pasos iniciales en la hipótesis de la cascada amiloide

Figura 2. Procesamiento y corte de los péptidos A β

Figura 3. Representación esquemática del gen tau

Figura 4. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más larga de la proteína tau

Figura 5. Sitios de fosforilación de la isoforma más larga de la proteína tau

Figura 6. Incremento dependiente de la edad en los niveles de la proteína REST en los adultos mayores sanos y disminución de la misma en adultos mayores con enfermedad de Alzheimer

Figura 7. Modelo de trabajo del ciclo conformacional de la chaperona Hsp90

Figura 8. Ilustración de los dominios de Hsp90 y sus principales funciones

Figura 9. Diagrama de flujo del método I-TASSER para la predicción de estructuras

Figura 10. Equilibrio entre el “estado latente” y el “estado activado” de la proteína Hsp90

Figura 11. Esquema de los sitios de la proteína tau anormalmente

Figura 12. Microfotografía de células piramidales del hipocampo CA1 en la que se muestra la inducción de REST en el envejecimiento, pero la pérdida en el envejecimiento con enfermedad de Alzheimer

Figura 13. Diagrama de la estrategia experimental seguida

Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), expresión de las proteínas GST-Hsp90 N (9-236) en *E. coli* BL21, Tau 441 y REST en *E. coli* BL21 DE3

Figura 15. Interacción de las proteínas hsp90 n (9-236) y tau 441 mediante Far western blot

Figura 16. Interacción de la proteína GST-Hsp90 N (9-236) con Tau 441 y con REST/NRSF mediante ensayo de overlay.

Figura 17. Competencia de interacción entre las proteínas Tau 441 y con REST/NRSF por la proteína Hsp90 N (9-236) mediante ensayo de overlay.

Figura 18. Secuencia aminoacídica de la proteína Tau 441

Figura 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Tau 441 insertada en el plásmido tau/pET29b mediante el algoritmo pBLAST número de referencia en el NCBI NP_005901.2

Figura 20. Modelo obtenido de la proteína Tau 441 mediante el servidor I-TASSER C-score=-0.72 y refinada por el algoritmo ModRefiner, visualización (*software UCSF Chimera 1.10.2*)

Figura 21. Gráfico de Ramachandran obtenido de la estructura de la proteína Tau 441 refinada, mediante el servidor RAMPAGE

Figura 22. Secuencia aminoacídica de la proteína Hsp90 N (9-236)

Figura 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hsp90 N (9-236) insertada en el plásmido GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3 mediante el algoritmo pBLAST número de referencia en el NCBI PDB: 3K98_A

Figura 24. Modelo obtenido de la proteína Hsp90 N (9-236) mediante el servidor I-TASSER C-score= 1.14 y refinada por el algoritmo ModRefiner, visualización (*software UCSF Chimera 1.10.2*)

Figura 25. Gráfico de Ramachandran obtenido de la estructura de la proteína Hsp90 N (9-236) refinada, mediante el servidor RAMPAGE

Figura 26 .Cluster Scores de los modelos de las interacciones favorecidos hidrofobicamente (Hydrophobic-favored) de las proteínas Hsp90 N (9-236) y Tau 441.

Figura 27. Modelos obtenidos del cluster de interacciones favorecidas por hidrofobicidad de las proteínas Hsp90 N (9-236) y Tau 441 mediante el servidor *ClusPro 2.0*. Pesos de los coeficientes (Coefficient weights) $E=0.40E_{rep}+-0.40E_{att}+600E_{elec}+2.00E_{DARS}$. Visualización mediante el *software UCSF Chimera 1.10.2*

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosín trifosfato

CaCl₂: cloruro de calcio

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.O.: densidad óptica

h: horas

HCl: ácido clorhídrico

HRP: peroxidasa de rábano

Hsp: proteína de choque térmico

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

Kb: kilobase

kDa: kilodalton

LB: Luria Bertani

ml: mililitros

mAb: anticuerpo monoclonal

Min: minutos

mM: milimolar

mRNA: mensajero de ácido ribonucleico

NaCl: cloruro de sodio

NLS: señal de localización nuclear

NRSF: factor de silenciamiento restrictivo neuronal

PBS: buffer fosfato salino

REST: factor de transcripción silenciador del elemento represor RE-1

Ser: Serina

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TBST: tris buffer salino y tween 20

Thr: treonina

Tyr: tirosina

μg : microgramos

ZnSO_4 : sulfato de zinc

μl : microlitros

μm : micrómetros

μM : micromolar

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es considerada la causa más común e demencia en el mundo. Debido a que aún no está bien dilucidado el mecanismo preciso por el cual se lleve a cabo el desarrollo de la enfermedad, continua la búsqueda de nuevos genes particularmente aquellos que puedan participar en el desarrollo de la enfermedad y que resulten prometedores como blancos terapéuticos (Bertram, 2004).

La enfermedad se caracteriza principalmente por la formación de placas extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares (Hardy & Allsop, 1991).

Las placas se encuentran formadas principalmente por el péptido β -amiloide ($A\beta$), mientras que los ovillos se componen de proteína principalmente de la proteína Tau (Selkoe, 1996). La teoría actual de la patogénesis de la etiología y enfermedad es la "hipótesis de la cascada amiloide", en la que se sobreproduce y/o hay una pérdida en la eliminación de la proteína $A\beta$, lo que produce ovillos neurofibrilares, estas lesiones se asocian a muerte celular, que se refleja en daño a la memoria (Hardy, 1997). Implícitamente se considera que la formación de placas amiloides comienza la neurodegeneración (Figura 1) (Hardy et al., 1997). Sin embargo, se contraponen en los siguientes aspectos: a) el grado de demencia no se correlaciona con el número de placas (Terry, 1996) y b) la formación de ovillos neurofibrilares parece preceder a la formación de placas (Braak, Braak, Bohl, & Reintjes, 1996).

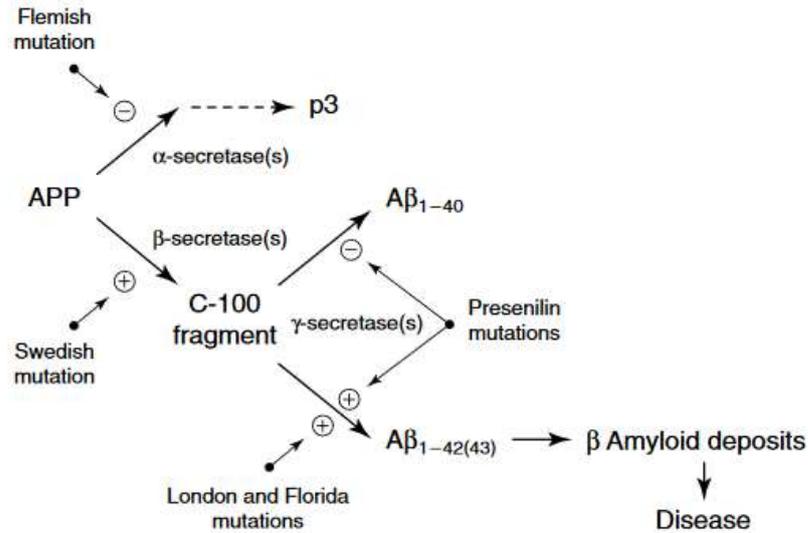


Figura 1. Pasos iniciales en la hipótesis de la cascada amiloide (Hardy et al., 1997).

ANTECEDENTES GENERALES

PÉPTIDOS AB

Los péptidos Aβ (péptidos de 39-43 aminoácidos), son los principales componentes de las placas amiloides, las cuales se han involucrado en la enfermedad de Alzheimer (Masters et al., 1985). Los péptidos se originan a partir del precursor de la proteína amiloide, la cual es procesada por ciertas enzimas para producir Aβ (Figura 2) (Golde, Estus, Younkin, Selkoe, & Younkin, 1992). Los péptidos bajo ciertas condiciones pueden agregarse para formar polímeros solubles, los cuales se ha descrito pueden existir en varias formas. Sin embargo ciertos oligómeros mal plegados pueden funcionar como “semillas” y producir placas amiloides insolubles que son tóxicas para las células nerviosas (Seilheimer et al., 1997). Se ha propuesto que el mal plegamiento de Aβ, puede inducir el mal plegamiento de Tau.

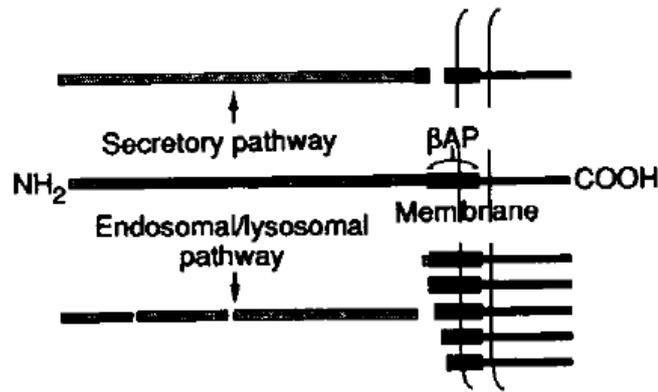


Figura 2. Procesamiento y corte de los péptidos A β (Golde, Estus, Younkin, Selkoe, & Younkin, 1992)

PROTEÍNA TAU

Es una proteína asociada a microtúbulos que ha sido relacionada con enfermedades denominadas tautopatías (Spillantini & Goedert, 1998). La enfermedad de Alzheimer, es la tautopatía más común en la que se forman ovillos neurofibrilares y filamentos helicoidales apareados compuestos de agregados hiperfosforilados de proteína tau implicados en muerte neuronal y degeneración neurológica (Grundke-Iqbal et al., 1986). En el cerebro humano se generan 6 isoformas de la proteína tau del gen MAPT que codifica para la misma, a través de splicing alternativo de mRNA. El splicing alternativo del exón 10 da lugar a la formación de 3 isoformas con 3 repetidos de unión a microtúbulos cada uno y 3 isoformas con 4 repetidos de unión a microtúbulos cada uno. Los repetidos tienen una longitud de 31 o 32 aminoácidos que se localizan hacia el carboxilo terminal (Figura 3) (Goedert, Spillantini, Jakes, Rutherford, & Crowther, 1989).

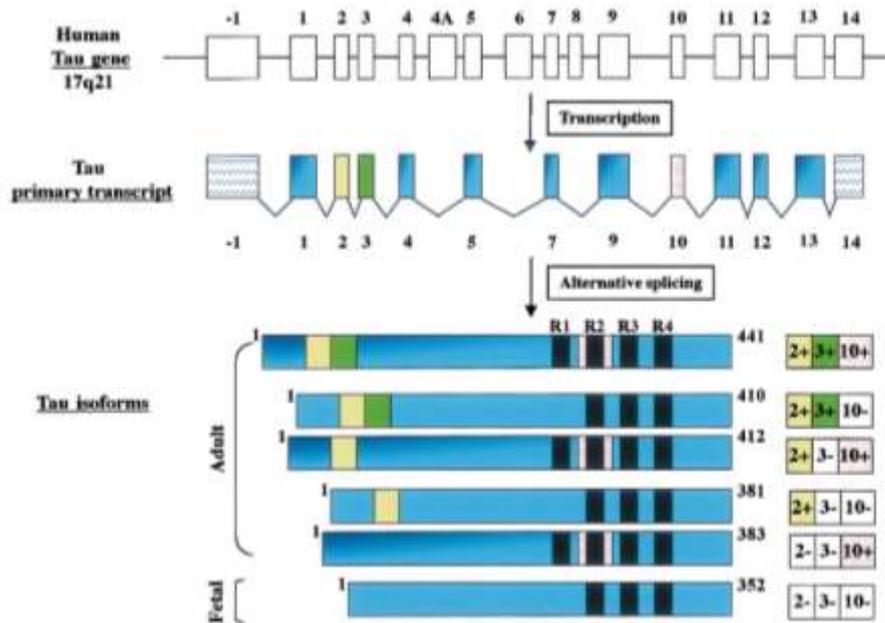


Figura 3. Representación esquemática del gen tau (L. Bue'e et al., 2000)

La forma completa de Tau se ensambla a partir de los repetidos que forman el núcleo del filamento, con la parte media del amino-terminal y el carboxi-terminal se forma la capa difusa del filamento (Figura 4) (Wischik et al., 1988). La isoforma que compone los filamentos de Tau puede variar entre enfermedades. En la enfermedad de Alzheimer las lesiones fibrilares se encuentran formadas de tau 3R y 4R (Schmidt et al., 2001).

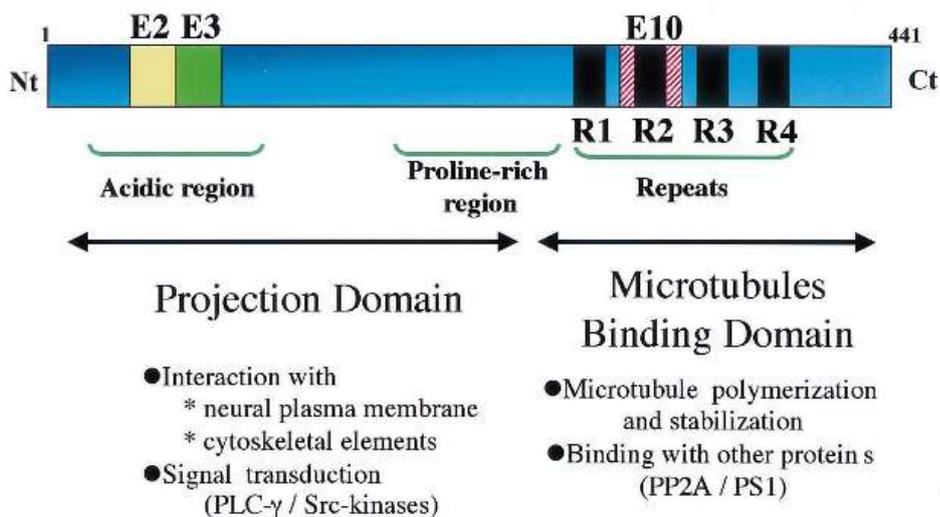


Figura 4. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más larga de la proteína tau (L. Bue'e et al., 2000)

A pesar de que las cinasas se encuentran involucradas en la función y el crecimiento normal celular (Sebolt-Leopold & English, 2006), la transferencia de grupos γ -fosfato del ATP a los residuos de aminoácidos Ser/Thr/Tyr (Figura 5) juegan un papel clave en la formación de ovillos de proteína en la enfermedad de Alzheimer (Iqbal et al., 1989). En el tejido cerebral sano, Tau estabiliza a los microtúbulos del axón neuronal pero la hiperfosforilación lleva primordialmente a la agregación (Morishima-Kawashima et al., 1995).

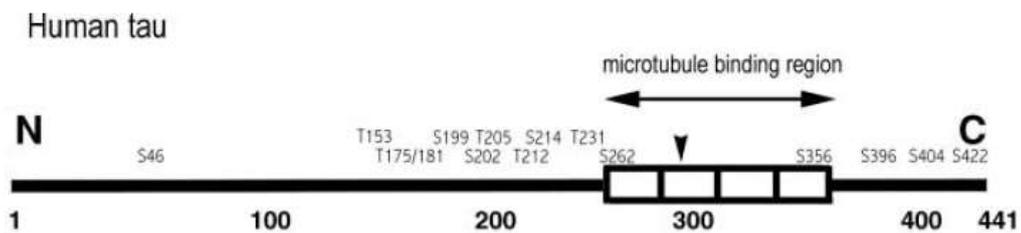


Figura 5. Sitios de fosforilación de la isoforma más larga de la proteína tau (Augustinack, Schneider, Mandelkow, & Hyman, 2001)

REST/NRSF

El factor de transcripción silenciador del elemento represor RE-1 (REST; también conocido como factor de silenciamiento restrictivo neuronal (Chong et al., 1995) (NRSF), es un represor de genes neuronales en células no neuronales (Schoenherr & Anderson, 1995). El gen REST abarca 24 kb del DNA genómico, se encuentra compuesto de 3 exones 5' alternativos no codificantes asociados con diferentes promotores de genes, 3 exones codificantes y un exón alternativo interno que se asocia a algunas enfermedades neuronales. La proteína REST/NRSF está involucrada en la represión de genes neuronales en células no neuronales y muchos desordenes genéticos han sido asociados a alternaciones en los patrones de expresión de REST, incluyendo carcinoma de cáncer de pulmón de células pequeñas, neuroblastomas, adicionalmente se ha involucrado su participación en la enfermedad de Huntington y fallas epilépticas e isquemias además de localizarse en el citoplasma se puede encontrar en

el compartimiento nuclear que es dependiente de señales de localización nuclear (NLS) (Shimojo, 2008) .

Es interesante mencionar que recientemente se ha descrito que la actividad de REST se asocia a un incremento en la longevidad; los niveles de REST se incrementan en los cerebros de personas que han vivido entre 90-100 años y sus capacidades cognitivas permanecen intactas. En contraste, la expresión de REST se ve afectada (Figura 6) en las regiones cerebrales correspondientes en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo que REST puede proteger contra la demencia. Los autores de este estudio sugieren que REST se encarga de reprimir genes que promueven la muerte celular y la patología de Alzheimer, y adicionalmente inducen genes que tienen que ver con la respuesta a estrés, de tal forma que REST protege a las neuronas del stress oxidativo y toxicidad por la proteína A β -amiloide (Lu et al., 2014).

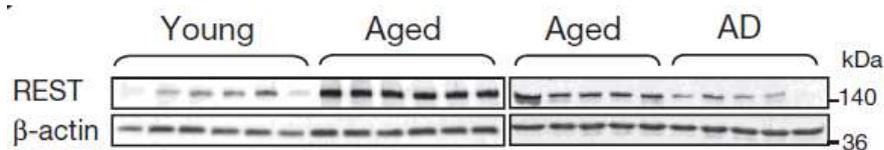


Figura 6. Incremento dependiente de la edad en los niveles de la proteína REST en los adultos mayores sanos y disminución de la misma en adultos mayores con enfermedad de Alzheimer (Lu et al., 2014)

PROTEÍNA HSP90

Las proteínas de choque térmico (Heat shock proteins, Hsps) son una familia de chaperonas moleculares altamente conservadas y ubicuas (Zhao et al., 2012). Son responsables del replegamiento de proteínas desnaturalizadas y de la maduración conformacional de los péptidos nacientes dentro de estructuras nativas biológicamente activas (Chiosis, Vilenchik, Kim, & Solit, 2004). Hsp90 es la chaperona molecular más abundante en el citosol (Bracher & Hartl, 2006), uniéndose a proteínas cliente en presencia de co-chaperonas (Figura 7).

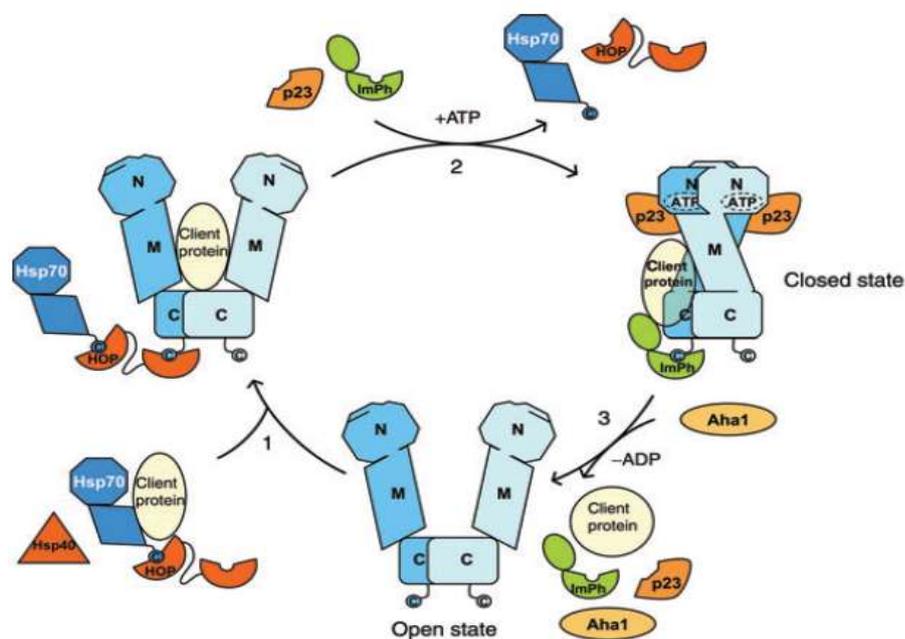


Figura 7. Modelo de trabajo del ciclo conformacional de la chaperona Hsp90 (Bracher & Hartl, 2006)

En los humanos Hsp90 se encuentra presente como homodímero, en donde cada monómero contiene: una región N-terminal de 25 kDa que es el sitio de unión a ATP, una región media de 35 kDa que reconoce al sustrato y una región C-terminal de 12 kDa que contiene un motivo MEEDV para unión a co-chaperonas (Figura 8) (Krukenberg, Street, Lavery, & Agard, 2011).

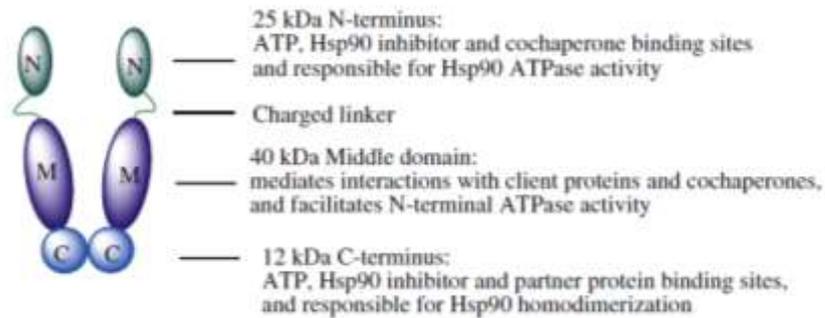


Figura 8. Ilustración de los dominios de Hsp90 y sus principales funciones (Zhao et al., 2012)

Hsp90 regula fuertemente la actividad del regulador maestro de la respuesta de choque térmico HSF1; en condiciones normales Hsp90 se une a HSF1, sin embargo, en presencia de estrés, se disocia, con la subsecuente fosforilación del mismo y trimerización, translocándose a núcleo, dando como resultado la producción de más chaperonas, que incluyen a Hsp27, Hsp40, Hsp70, y Hsp90 (Blagg & Kerr, 2006). El mecanismo anterior reestablece la homeostasis entre proteínas bajo condiciones de estrés, a pesar de esto, dicho mecanismo de regulación se ve superado en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, acumulándose proteínas aberrantes como β -amiloide (Hardy & Higgins, 1992) y tau (Adachi et al., 2009). Se ha observado que las Hsps se encuentran sobrerreguladas en la enfermedad de Alzheimer (Hamos et al., 1991). En condiciones normales Hsp90 interactúa con proteínas cliente en forma dinámica de baja afinidad regulada mediante la unión y liberación de ATP, una vez que ocurre una mutación o desregulación en la función de la proteína cliente sucede una estabilización inusual de la misma que contiene a los complejos de chaperona Hsp90 (Chiosis, 2006).

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

A pesar de los avances en los métodos para lograr una determinación precisa de la estructura de las proteínas, los principales métodos para determinar la estructura de una proteína son: la difracción de rayos X que requieren de la cristalización de proteínas lo cual puede llegar a tomar varios años, y por otra parte la resonancia magnética nuclear (NMR) en la que no se requiere la obtención de un cristal pero que por otra parte, solo es posible aplicarlo a proteínas pequeñas (Blundell, Sibanda, Sternberg, & Thornton, 1987).

Sin embargo, la tecnología computacional aplicada a la determinación de estructuras ha avanzado a una tasa rápida lo cual ofrece posibilidades compensatorias. Esto incluye el uso de base de datos, para guardar, recuperar y comparar con secuencias conocidas; gráficos computacionales, para mostrar modelos y manipular estructuras tridimensionales conocidas; y simulación computacional, para calcular conformeros de baja energía y dinámica molecular (Brooks & Karplus, 1983).

La predicción de estructuras tridimensionales que son originadas una determinada secuencia de aminoácidos se ha logrado utilizando diversos algoritmos computacionales (Skolnick, Fetrow & Kolinski, 2000).

Los métodos mediante los cuales se predicen estructuras tridimensionales de las proteínas se dividen en tres; Modelo comparativo, relacionado a templados homólogos que son identificados por la comparación de una secuencia o perfiles de secuencia (Martí-Renom et al., 2000); Métodos de threading, en los que coincide la secuencia de consulta con estructuras ya resueltas (Bowie, Luthy, & Eisenberg, 1991); Y el modelado *ab initio* en el que las proteínas no presentan estructura relacionada con las proteínas ya resueltas depositadas en el PDB (Wu, Skolnick, & Zhang, 2007).

I-TASSER se ha determinado ser el mejor método para la predicción automatizada de estructura (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010). I-TASSER es un paquete de software independiente para estructuras de proteínas y modelado de la función. El servidor primero intenta recuperar templados

con plegamiento similar del PDB mediante LOMETS, una aproximación instalada localmente de meta-threading. En la siguiente etapa los fragmentos obtenidos del PDB son reensamblados en modelos largos mediante simulaciones replica-intercambio de Montecarlo (Swendsen & Wang, 1986). I-TASSER construye todas las estructuras mediante modelado molecular *ab initio* en caso de que LOMETS no pueda identificar un templado apropiado, posteriormente, los estados de más baja energía son identificados mediante SPICKER a través agrupación de señuelos de simulación. En el tercer paso se realiza de nuevo una simulación de montaje a partir del grupo de centroides de SPICKER, en donde el contenido espacial es colectado de los templados de LOMETS y estructuras del PDB mediante el algoritmo TM-align. Se agrupan las estructuras de más baja energía y se seleccionan. Los modelos atómicos finales son obtenidos por REMO que construye los detalles atómicos a través de la optimización de la red de puentes de hidrógeno (Figura 9).

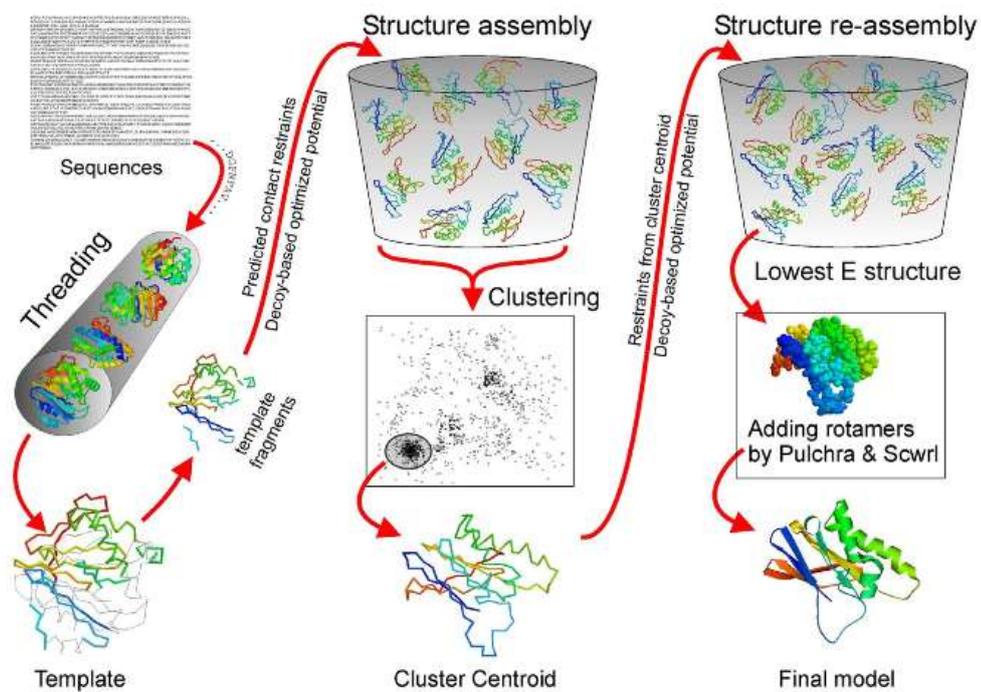


Figura 9. Diagrama de flujo del método I-TASSER para la predicción de estructuras (Wu, Skolnick, & Zhang, 2007)

INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS (*PROTEIN-PROTEIN DOCKING*)

Esclarecer las interacciones proteína-proteína ayuda a entender aspectos estructurales y funcionales de la célula, lo cual ayuda a entender mejor procesos como el control del metabolismo, transducción de señales y regulación genética. Métodos experimentales pueden ayudar a determinar algunas proteínas que interactúan, sin embargo existen complejos que no podrán ser determinados mediante ensayos experimentales. Por lo tanto es importante desarrollar métodos de acoplamiento que pueden dilucidar detalles de las interacciones a nivel atómico (Katz & Levinthal, 1972).

El servidor ClusPro 2.0 se basa en la búsqueda global de cuerpo rígido basado en la transformada rápida de Fourier, evalúa las energías de miles de millones de acoplamientos de conformaciones en un cuadrante (grid). Este servidor participa en CAPRI (Critical Assessment of PRediction of Interactions), una comunidad para la evaluación del acoplamiento proteína-proteína para la predicción de estructura (Janin, 2002).

El servidor desarrolla tres pasos computacionales: (1) cuerpo rígido utilizando como enfoque de correlación la transformada rápida de Fourier; (2) RMSD (**ROOT-MEAN-SQUARE DEVIATION**) basado en la agrupación de estructuras generadas para encontrar los mayores grupos que representen los modelos más probables del complejo, y (3) refinamiento de las estructuras seleccionadas (Kozakov et al., 2013).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Las proteínas chaperonas son la maquinaria celular que puede plegar las cadenas de las proteínas nacientes, plegar de nuevo proteínas incorrectamente plegadas, o marcar proteínas para su degradación (Echeverría, Bernthaler, Dupuis, Mayer, & Picard, 2011).

Hsp90 puede volver a plegar en la célula proteínas no nativas. Sin embargo, no regula de manera correcta a la proteína intrínsecamente desordenada Tau (Luo, Ma, Nussinov, & Wei, 2014), en ciertas condiciones la proteína Hsp90 facilita la agregación y acumulación de tau, incluso puede aumentar la toxicidad (Jinwal et al., 2010).

Se ha demostrado que al inhibir a la chaperona puede promover la degradación de tau (Luo et al., 2007), lo que sugiere que Hsp90 protege a tau de la degradación en las neuronas por razones desconocidas (Blair et al., 2013).

Se ha especulado que Hsp90 preserva a la proteína tau para promover la cinética rápida de los microtúbulos, pero ya que tau se acumula en exceso ocurre daño a los microtúbulos, lo que resulta en agregación y acumulación (Blair, Sabbagh, & Dickey, 2014).

Hay un equilibrio en los estados que presenta la proteína Hsp90, a los cuales se les ha denominado “estado latente” en el que presenta baja afinidad en su interacción con proteínas cliente y el “estado activado” (Figura 10) en el que presenta alta afinidad en su interacción con proteínas cliente (Kamal et al., 2003), dicho equilibrio está en función del estrés del sistema, en el cual intervienen proteínas mutadas o alteradas, hipoxia o baja concentración de nutrientes (Chiosis, Vilenchik, Kim, & Solit, 2004).

Se ha visto que la inducción del factor de transcripción del elemento represor RE1 (REST) es una característica normal del envejecimiento en las neuronas del hipocampo y la corteza, en contraste con el envejecimiento de personas que presentan la enfermedad de Alzheimer (Figura 12), por lo que REST se considera un factor neuroprotector y cuya pérdida contribuye a la vulnerabilidad neuronal en la enfermedad de Alzheimer.

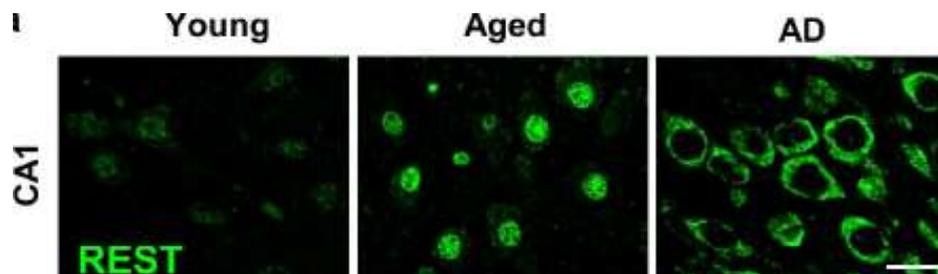


Figura 12. Microfotografía de células piramidales del hipocampo CA1 en la que se muestra la inducción de REST en el envejecimiento, pero la pérdida en el envejecimiento con enfermedad de Alzheimer (Lu et al., 2014)

JUSTIFICACIÓN

Hsp90 es capaz de aumentar la estabilidad de proteínas mutadas o que presentan desregulación postraducciona (Tau), posiblemente por incremento en la afinidad de unión, por lo tanto podría verse afectada la estabilidad de la proteína REST por desprotección provocando la degradación en citoplasma y evitando que se transloque a núcleo. Aunado a lo anterior se sugiere que el mecanismo de vigilancia en las chaperonas es muy sensible y se encuentra fuertemente regulado, por lo que en este trabajo se propone que la afinidad de Hsp90 por REST y tau, juega un papel muy importante en el mantenimiento de la proteína REST en núcleo.

HIPÓTESIS

La proteína Hsp90 presenta mayor afinidad por la proteína tau aberrante que por las proteínas tau normal y REST

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la afinidad de la proteína Hsp90 por las proteínas Tau aberrante, Tau normal y REST

OBJETIVOS PARTICULARES

- Sobrexpresar las proteínas Hsp90 N (9-236), Tau 441 y REST/NRSF
- Purificar las proteínas Hsp90 N (9-236), Tau 441 y REST/NRSF
- Realizar ensayos de interacción de la proteína Hsp90 N (9-236) con las proteínas Tau 441 y REST/NRSF

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

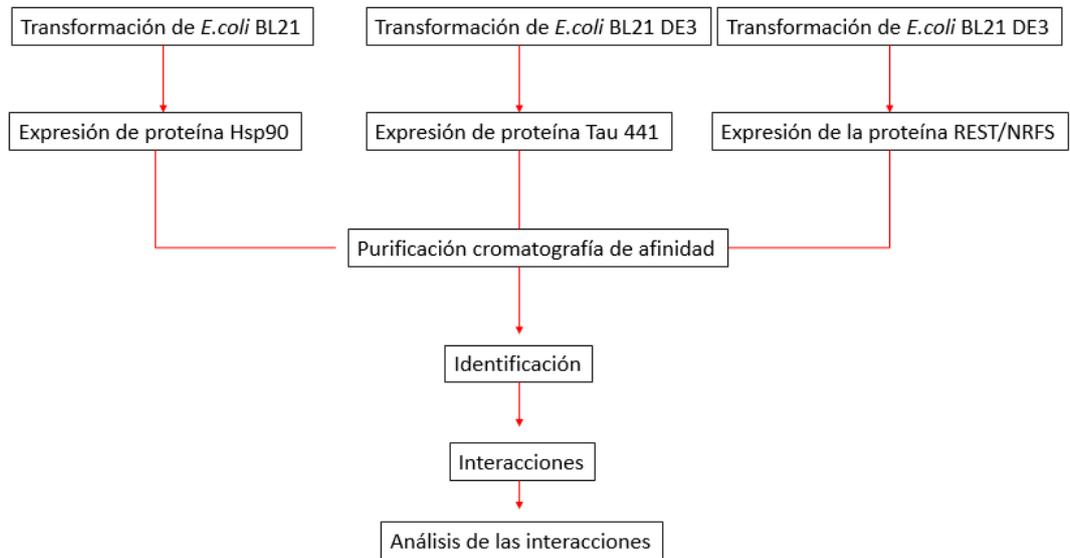


Figura 13. Diagrama de la estrategia experimental seguida

MATERIAL Y METODOS

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se seleccionaron las cepas bacterianas *E. coli* BL21 (genotipo: FHUA2 [LON] OMPT GAL [DCM] ΔHSDS) y *E. coli* BL21 (DE3) (genotipo FHUA2 [LON] OMPT GAL (Δ DE3) [DCM] ΔHSDS Δ DE3 = Δ SBAMHIO ΔECORI-B INT::LACI::PLACUV5::T7 GENE1) I21 ΔNIN5). POSTERIORMENTE SE HICIERON CÉLULAS COMPETENTES DE LAS CEPAS *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 (DE3) mediante el método químico de CaCl₂. Los vectores de expresión utilizados fueron tau/pET29b, GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3 y PRJR1-REST que contienen los insertos de DNA que codifican para las proteínas Tau, el N-terminal de la proteína Hsp90 (9-236) y REST/NRSF, respectivamente. Se transformó la cepa *E. coli* BL21 con el plásmido GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3, y se seleccionaron en placas de agar LB las bacterias que contenían el vector de expresión con el inserto con ampicilina 100 µg/ml. Se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido PRJR1-REST, y se seleccionaron en

placas de agar LB las bacterias que contenían el vector de expresión con el inserto con ampicilina 100 µg/ml. Por último se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido tau/pET29b, y se seleccionaron en placas de agar LB las bacterias que contenían el vector de expresión con el inserto con kanamicina 50 µg/ml.

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

Se incubó en 500 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml hasta una D.O. de 0.6-0.7 a 600nm y se llevó a cabo la inducción con IPTG 1mM durante 5h a 37 °C. Se verificó la expresión al empastillar 1 ml del cultivo inducido después de 5 h resuspendido en 80 µl de buffer de muestra y cargando 20 µl en un gel SDS-PAGE al 10 %. Seguido de una transferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa se identificó la proteína utilizando el anticuerpo monoclonal mAb (AC88).

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441

Se incubó en 500 ml de medio LB con kanamicina 80 µg/ml hasta una D.O. de 0.7-0.8 a 600nm y se llevó a cabo la inducción con IPTG 0.6 mM durante 3h a 37 °C. Se verificó la expresión al empastillar 1 ml del cultivo inducido después de 3h resuspendido en 80 µl de buffer de muestra y cargando 20 µl en un gel SDS-PAGE al 10 %. Seguido de una transferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa se identificó la proteína utilizando el anticuerpo monoclonal Tau (A-10).

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF

Se incubó en 1 L de medio LB con ampicilina 100 µg/ml hasta una D.O. de 0.8-0.9 a 600nm, se adicionó ZnSO₄ 40µM, y se llevó a cabo la inducción con IPTG 1.2 mM durante 4h a 32 °C. Se verificó la expresión al empastillar 1 ml del cultivo inducido después de 4 h resuspendido en 80 µl de buffer de muestra y cargando 20 µl en un gel SDS-PAGE al 7 %. Seguido de una transferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa se identificó la proteína utilizando el anticuerpo policlonal Anti-REST.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

Se realizó la extracción de la proteína Hsp90 N (9-236) utilizando buffer de extracción lisis bacteriana, se agregó 10 ml de buffer de extracción (lisozima 100 µg/ml, 50mM Tris HCl pH 7.4, Tritón 1%, glicerol 10 %) por cada 50 ml de cultivo, se agitó en vortex durante 1 minuto y se incubó en hielo 30 minutos, posteriormente se centrifugó 15 min 20000xg, se recolectaron los sobrenadantes. Se pasaron por un filtro de 0.22 µm, se procedió a la purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con Glutathion-Sepharosa High Performance equilibrada con 10 ml de PBS1x pH 7.4. Se vertieron las alícuotas con la muestra y se eluyó con 15 ml de buffer de elución, glutatión reducido Tris HCl pH 8, se recolectaron fracciones de 500µl y se analizaron mediante SDS-PAGE.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441

Se realizó la extracción de la proteína Tau utilizando buffer de extracción lisis bacteriana, se agregó 1.5 ml de buffer de extracción (lisozima 100 µg/ml, 50mM Tris HCl pH 7.4 tritón 1% glicerol 10 %) por cada 50 ml de cultivo, se agitó en vortex durante 1 minuto y se incubó en hielo 30 minutos, posteriormente se hirvió la muestra durante 20 minutos y se centrifugó 15 min 20000xg, se recolectaron los sobrenadantes. Se pasaron por una filtro de 0.22 µm, se procedió a la purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con Ni Sepharosa High Performance equilibrada buffer de unión (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol). Se vertieron las alícuotas con la muestra y se eluyeron con 10 ml de buffer de unión, 10 ml con buffer 80 mM imidazol (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl) y 10 ml con buffer 250 mM imidazol (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl), se recolectaron fracciones de 500µl y se analizaron mediante SDS-PAGE.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF

Se realizó la extracción de la proteína REST utilizando buffer de extracción lisis bacteriana, se agregó 10 ml de buffer de extracción (lisozima 500 µg/ml, 10mM Tris HCl pH 8.0, glicerol 10 %) por cada 50 ml de cultivo, se agitó en vortex durante 1 minuto y se incubó en hielo 30 minutos, se centrifugó 15 min 20000xg, se recolectaron los sobrenadantes. Se pasaron por una filtro de 0.22 µm, se agregó urea a una concentración final de 8M y se procedió a la purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con Ni Sepharosa High Performance equilibrada buffer de unión (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 30 mM imidazol). Se vertieron las alícuotas con la muestra y se eluyeron con 10 ml de buffer de unión, 10 ml con buffer 80 mM imidazol (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) y 10 ml con buffer 250 mM imidazol (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl), se recolectaron fracciones de 500µl y se analizaron mediante SDS-PAGE.

INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) Y TAU 441 MEDIANTE FAR WESTERN BLOT

Se realizó la interacción de las proteínas Hsp90 N (9-236) y la proteína Tau mediante Far Western Blot, se realizó el SDS-PAGE de la proteína Tau y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa usando transferencia semi-seca, se bloqueó la membrana con 20% de leche en buffer TBST durante 1h, se incubó toda la noche con proteína la Hsp90 N (9-236) purificada 10 µg/ml en buffer TBST, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con buffer TBST y después se adiciono el anticuerpo primario mab (AC88) contra la proteína Hsp90 N (9-236) dilución 1:500 durante 2h , se lavó 3 veces con TBST 10 min cada una y se adicionó el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP 1:10000 se incubó 1h, se lavó 3 veces 10 min cada una y se revelo mediante quimioluminiscencia.

INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236) CON TAU 441 Y CON REST/NRSF MEDIANTE ENSAYO DE OVERLAY

Se realizó la interacción de las proteínas Hsp90 N (9-236) con las proteínas Tau y REST/NRSF ensayos de Overlay, se vertió sobre una membrana de nitrocelulosa 10 µg de proteína Hsp90 N (9-236) purificada , se bloqueó la membrana con 20% de leche en buffer TBST durante 1h, se incubaron toda la noche dos membranas, una con proteína Tau purificada y la otra con proteína REST/NRSF 10 µg/ml, ambas en buffer TBST, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con buffer TBST y después se adicionaron los anticuerpos primarios Tau (A-10) dilución 1:1000 para identificar la interacción de la proteína Tau con Hsp90 N (9-236) y el anticuerpo Anti-REST dilución 1:500 para identificar la interacción de la proteína REST/NRSF con Hsp90 N (9-236) , se lavó 3 veces con TBST 10 min cada una, se adicionó el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP 1:10000 y bovine anti-rabbit-HRP respectivamente, se incubó 1h, se lavó 3 veces 10 min cada una y se revelo mediante quimioluminiscencia.

COMPETENCIA DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS TAU 441 Y CON REST/NRSF POR LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236) MEDIANTE ENSAYO DE OVERLAY

Se realizó la competencia de interacción entre las proteínas Tau 441 y con REST/NRSF por la proteína Hsp90 N (9-236), se adiciono 10 µg de proteína Hsp90 N (9-236) purificada a cuatro membranas, se bloquearon las membranas con 20% de leche en buffer TBST durante 1h, se incubaron toda la noche cuatro membranas dos con proteínas Tau y REST/NRSF con concentración 2:1 (20µg/ml de Tau:10µg/ml de REST/NRSF) y las otra dos invirtiendo las concentraciones (10µg/ml de Tau:20µg/ml de REST/NRSF) de las proteínas, ambas en buffer TBST, se incubaron toda la noche, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con buffer TBST y después se adicionaron los anticuerpos primarios Tau (A-10) dilución 1:1000 a una membrana con concentración de proteína 2:1 (20µg/ml de Tau:10µg/ml de REST/NRSF) y el anticuerpo Anti-REST dilución 1:500 a la segunda membrana de las mismas condiciones, se realizó el mismo procedimiento para la concentración de proteína 1:2 (10µg/ml de Tau:20µg/ml de REST/NRSF), después se lavó 3 veces con TBST 10 min cada una, se adicionó el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP 1:10000 para las membranas con anticuerpo Tau (A-10) y bovine anti-rabbit-HRP 1:10000 para las membranas con anticuerpo Anti-REST, se incubó 1h, se lavó 3 veces 10 min cada una y se revelo mediante quimioluminiscencia.

OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAU 441

Se utilizó la secuencia de la proteína tau de la isoforma de 441 aminoácidos, se realizó el alineamiento de la secuencia insertada en el plásmido tau/pET29b utilizando el algoritmo *pBlast* obteniendo una identidad del 100% con la proteína *microtubule-associated protein tau isoform 2 [Homo sapiens]* con número de referencia en el NCBI NP_005901.2, posteriormente se utilizó el servidor I-TASSER al insertar la misma secuencia alineada para predecir la estructura probable de la

proteína tau, se seleccionó la estructura con un mayor C-score y después el algoritmo ModRefiner para refinar la estructura obtenida previamente, utilizando como validación del modelo obtenido el plot de Ramachandran.

OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

Se utilizó la secuencia de la proteína fragmento N-terminal de la chaperona Hsp90 N (9-236), se realizó el alineamiento de la secuencia insertada en el plásmido GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3 utilizando el algoritmo *pBlast* obteniendo una identidad del 100% con la *proteína Chain A, Hsp90 N-Terminal Domain In Complex With(1r)-2-(5-Chloro* con número de referencia en el NCBI PDB: 3K98_A, posteriormente se utilizó el servidor I-TASSER al insertar la misma secuencia alineada para predecir la estructura probable de la proteína Hsp90 N (9-236), se seleccionó la estructura con un mayor C-score y después el algoritmo ModRefiner para refinar la estructura obtenida previamente, utilizando como validación del modelo obtenido el plot de Ramachandran.

RESULTADOS

Los ensayos para la expresión de las proteínas recombinantes GST-Hsp90 N (9-236), Tau 441 y REST/NRSF, se realizaron utilizando la cepa *E. coli* BL21 para expresar la proteína GST-Hsp90 N (9-236) y la cepa *E. coli* BL21 DE3, para expresar las proteínas Tau 441 y REST/NRSF. En la figura 14 se observa la expresión y purificación de la proteína GST-Hsp90 (Figura 14-A), Tau 441 (Figura 14B) y REST/NRSF (Figura 14C). La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad utilizando en el primer caso Glutation-Sheparosa High Performance, y para las dos últimas se utiliza el mismo tipo de columna de Ni-Sheparosa High Performance, debido a que poseen una bandera de histidinas. Los carriles en la posición 3 de cada uno de los paneles muestran a la proteína purificada, después de la elución con glutatión reducido o con Imidazol a las concentraciones indicadas en Material y Metodos. En el caso particular de la purificación de REST/NRSF el rendimiento de la proteína purificada fue menor y con algunas proteínas que pueden corresponder a formas derivadas de splicing alternativo ya que existen al menos otras 3 isoformas de REST que corresponden con pesos moleculares de 60-75 kD, y de 35 kD (Figura C carril 3).

Una vez que se tenían las proteínas purificadas, se procedió a realizar los ensayos de interacción en un soporte sólido, esta técnica es conocida como ensayos Far western, e implican que se corrieron en un gel desnaturante la proteína BSA (albumina de suero bovino), como control, y en otro carril la proteína Tau441, la interacción siguiente es incubando con la proteína GST-Hsp90 y revelando con un anticuerpo monoclonal anti-Hsp90, lo que observamos en la figura 15 es la interacción de la proteína Hsp90, reconociendo la banda correspondiente a la proteína Tau441. El carril control correspondiente a la proteína BSA y no se observó señal. Estos resultados nos indican una interacción específica de Tau441 con Hsp90.

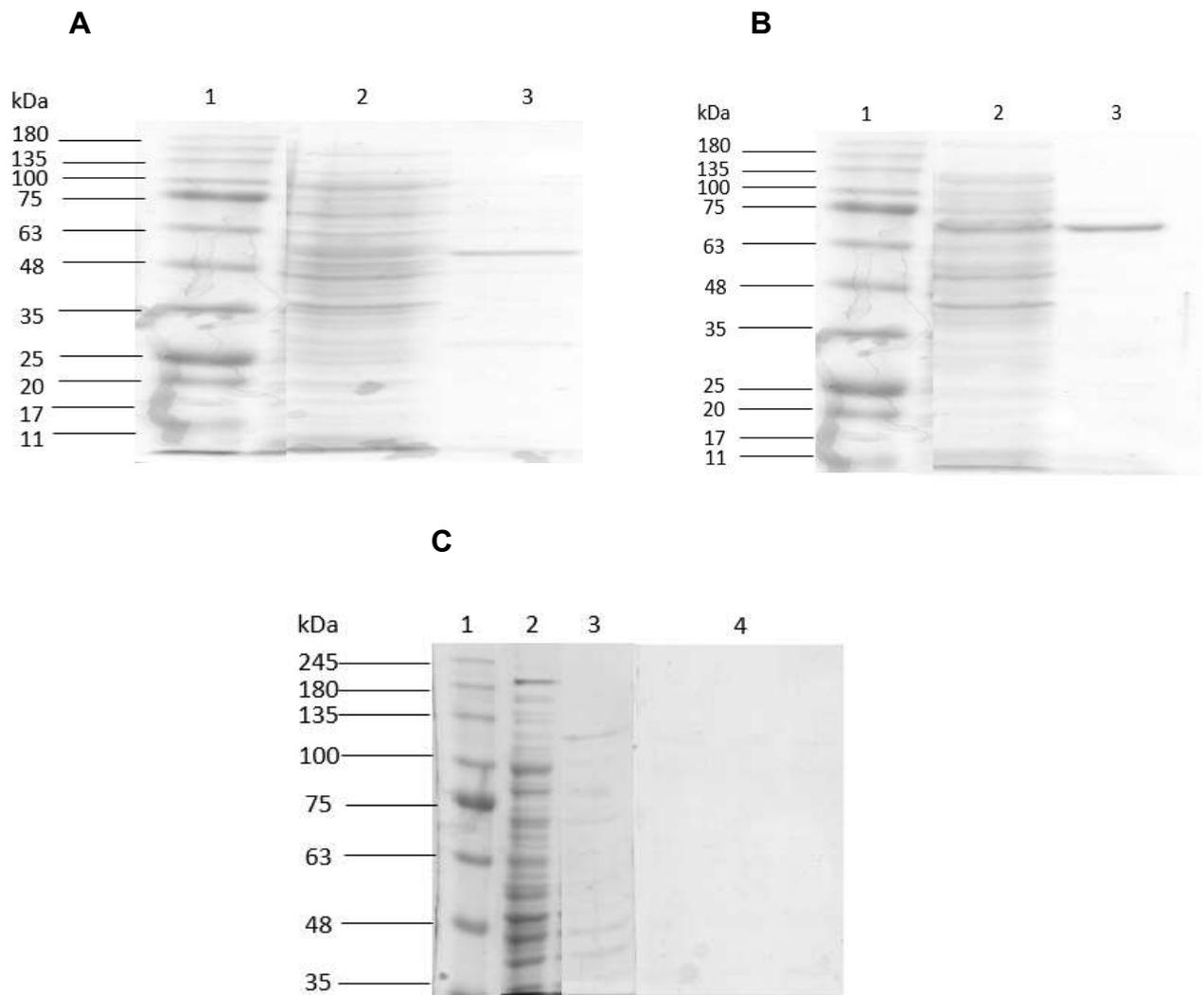


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), expresión de las proteínas GST-Hsp90 N (9-236) en *E. coli* BL21, Tau 441 y REST en *E. coli* BL21 DE3. **(A)** Línea 1, marcador de proteínas; Línea 2, Inducción del cultivo transformado con GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3; Línea 3, purificación de la proteína Hsp90 N (9-236) mediante Glutation-Sepharosa High Performance. **(B)** Línea 1, marcador de proteínas; Línea 2, Inducción del cultivo transformado con tau/pET29b; Línea 3, purificación de la proteína Tau 441 mediante Ni Sepharosa High Performance. **(C)** Línea 1, marcador de proteínas; Línea 2, Inducción del cultivo transformado con PRJR1-REST; Línea 3 y 4, fracciones de la purificación de la proteína REST mediante Ni Sepharosa High Performance.

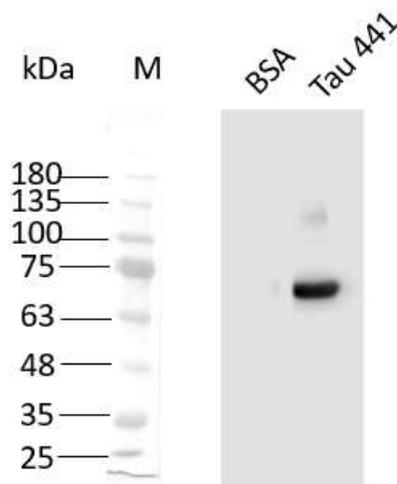


Figura 15. Interacción de las proteínas hsp90 n (9-236) y tau 441 mediante Far western blot. Se separaron mediante SDS-PAGE las proteínas BSA y Tau441 y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y después fue incubada con GST-Hsp90 N (9-236) purificada. Después de lavar, las proteínas (GST-Hsp90 N (9-236)) unidas se detectaron con el anticuerpo mab (AC88). BSA funcionó como control negativo. Correspondiendo la unión de GST-Hsp90 N (9-236) al sitio de la proteína Tau 441.

En los siguientes ensayos tipo dot blot se utilizó el siguiente esquema:

Proteína fijada	Proteína interaccionando	Revelado con Anticuerpo
Hsp90	Tau 441	Anti-Tau (A-10)
Hsp90	Rest	Anti-Rest (07-579)
Tau 441	Hsp90	Anti-Hsp90 (AC88)

En la figura 16 se observan los resultados tipo dot blot, los controles del ensayo incluyen la incubación de las proteínas fijadas en el papel de nitrocelulosa, con los anticuerpos específicos para *tau* (ab A-10), *Hsp90* (ab AC88), y *REST* (ab 07-579), Figura 16 A-1,2; 16 B-1 y 4. Cuando se lleva la interacción de Hsp90 con la proteína Tau y REST y se revela con los anticuerpos de cada uno de ellas, se observa la señal indicando la interacción específica (Figura 16 A 3 y 4). En el panel B se analiza si existe la interacción de Tau441 con Hsp90, en este ensayo adicionalmente se utiliza la proteína Hsp90 incubada a 98 °C durante 5 minutos. De los resultados observados se puede sugerir que la proteína Hsp90 nativa interactúa directamente con Tau441.

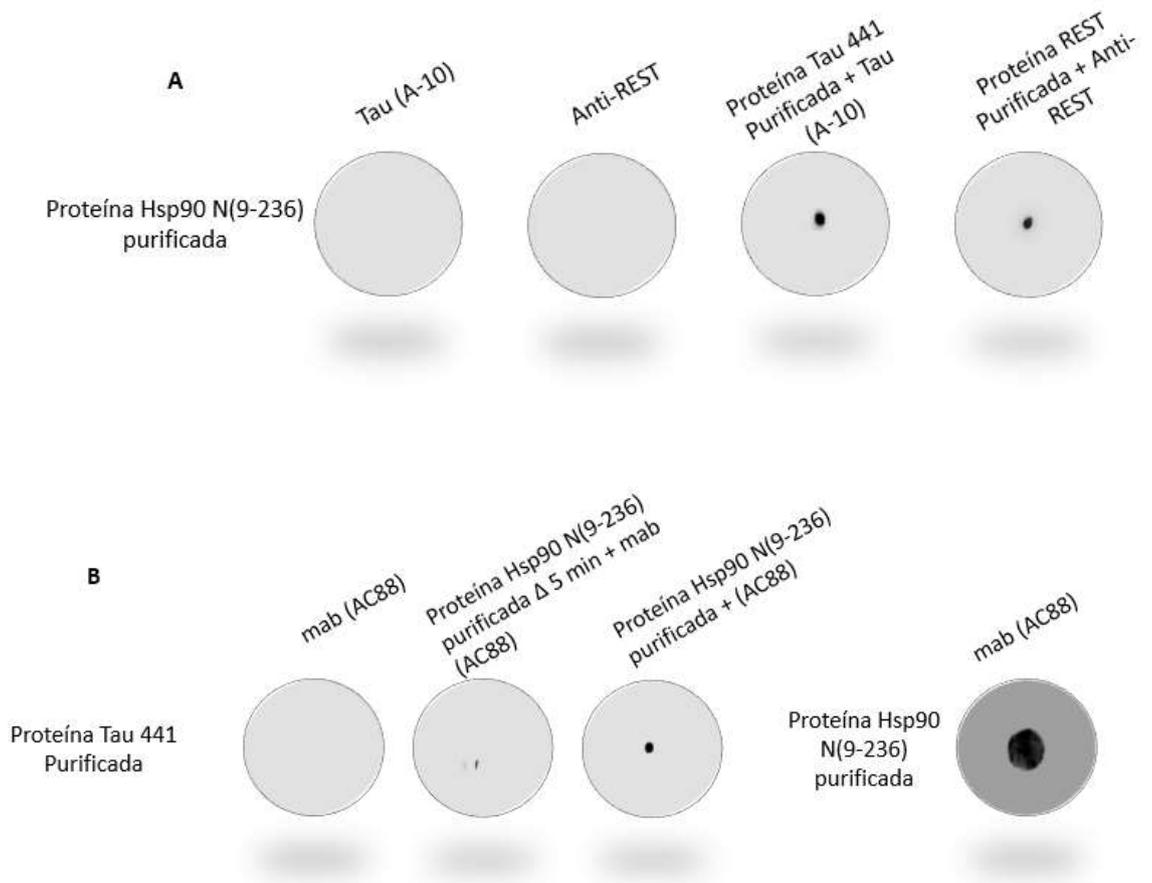


Figura 16. Interacción de la proteína GST-Hsp90 N (9-236) con Tau 441 y con REST/NRSF mediante ensayo de overlay. **(A)** Se adsorbió en varias membranas proteína GST-Hsp90 N (9-236) purificada y se incubaron con las proteínas Tau 441 y REST purificadas por separado. Después de lavar, se identificaron las proteínas unidas Tau 441 y REST con los anticuerpos Tau (A-10) y Anti-REST respectivamente. Tau (A-10) y Anti-REST se usaron como controles negativos de unión de ambas proteínas. Correspondiendo la unión de Tau 441 y REST al sitio en que se adsorbió la proteína GST-Hsp90 N (9-236). **(B)** Se adsorbió en varias membranas proteína Tau 441 y se incubaron con la proteína GST-Hsp90 N (9-236) y GST-Hsp90 N (9-236) calentada durante 5 minutos. Después de lavar, se identificaron la proteína unida GST-Hsp90 N (9-236) con el anticuerpo mab (AC88). GST-Hsp90 N (9-236) calentada durante 10 con mab (AC88) se utilizó como control para verificar que el anticuerpo se une aun a la proteína desnaturalizada y el anticuerpo mab (AC88) como control específico de unión a GST-Hsp90 N (9-236). Correspondiendo la unión de GST-Hsp90 N (9-236) al sitio en que se adsorbió la proteína Tau 441.

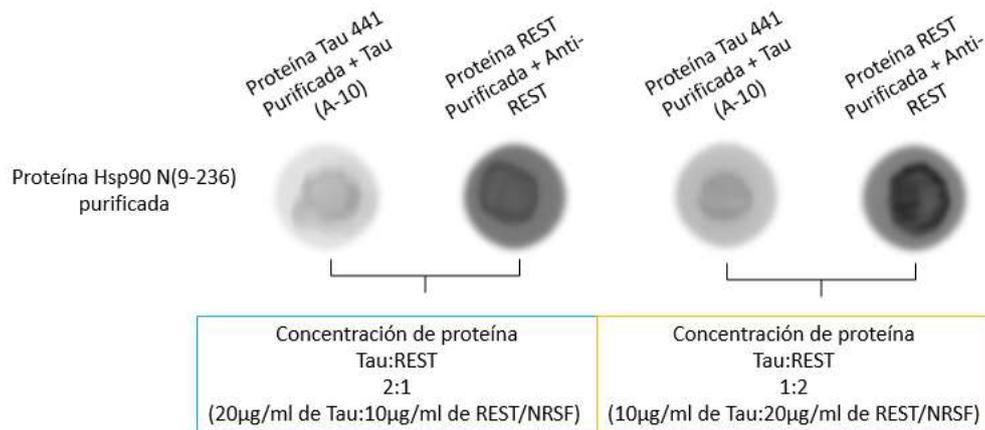


Figura 17. Competencia de interacción entre las proteínas Tau 441 y con REST/NRSF por la proteína Hsp90 N (9-236) mediante ensayo de overlay. Se adsorbió en diferentes membranas 10 µg de proteína GST-Hsp90 N (9-236) purificada a cada una, y se incubaron cada una con las proteínas Tau 441 y REST purificadas; dos con concentración 2:1 Tau-REST y las otras dos con concentración 1:2 Tau-REST. Se identificaron las proteínas unidas Tau 441 y REST con los anticuerpos Tau (A-10) y Anti-REST respectivamente. Correspondiendo la unión de Tau 441 y REST al sitio en que se adsorbió la proteína GST-Hsp90 N (9-236).

Los resultados de interacción utilizando los ensayos tipo far western y dot blot nos sugieren que es posible utilizar esta metodología como un ensayo cualitativo de la interacción de la proteína Hsp90 con las proteínas Tau441 y REST. Para determinar la posible competencia de estas proteínas por la unión a Hsp90, decidimos realizar un ensayo utilizando diferentes concentraciones de cada una de las proteínas en el primer ensayo se utilizó una relación 2:1 de la proteína Tau/REST (Figura 17 panel izquierdo) y en el segundo ensayo se invirtió la relación a 1:2 de Tau/REST (Figura 17 panel derecho). Cuando se reveló cada membrana con los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas se encuentra una señal de mayor intensidad con la interacción de Hsp90 y REST.

MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGS
 EEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHEIPEGTTAEEAGIGDTPSLE
 DEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPA
 KTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPPTREPQKVVAVVRT
 PPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK
 CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRV
 VQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHL
 NVSSTGSIDMVDPQLATLADEVASLAKQGL

Figura 18. Secuencia aminoacídica de la proteína Tau 441

Range 1: 1 to 441 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
878 bits(2268)	0.0	Compositional matrix adjust.	441/441(100%)	441/441(100%)	0/441(0%)
Query 1		MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG			60
Sbjct 1		MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG			60
Query 61		SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG			120
Sbjct 61		SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG			120
Query 121		HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPAPK			180
Sbjct 121		HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPAPK			180
Query 181		TPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPPTREPQKVVAVVRTPPKSPSSAK			240
Sbjct 181		TPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPPTREPQKVVAVVRTPPKSPSSAK			240
Query 241		SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV			300
Sbjct 241		SRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV			300
Query 301		PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI			360
Sbjct 301		PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI			360
Query 361		THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHLNVSSTGSIDMV			420
Sbjct 361		THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHLNVSSTGSIDMV			420
Query 421		DSPQLATLADEVASLAKQGL 441			
Sbjct 421		DSPQLATLADEVASLAKQGL 441			

Figura 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Tau 441 insertada en el plásmido tau/pET29b mediante el algoritmo pBLAST número de referencia en el NCBI NP_005901.2

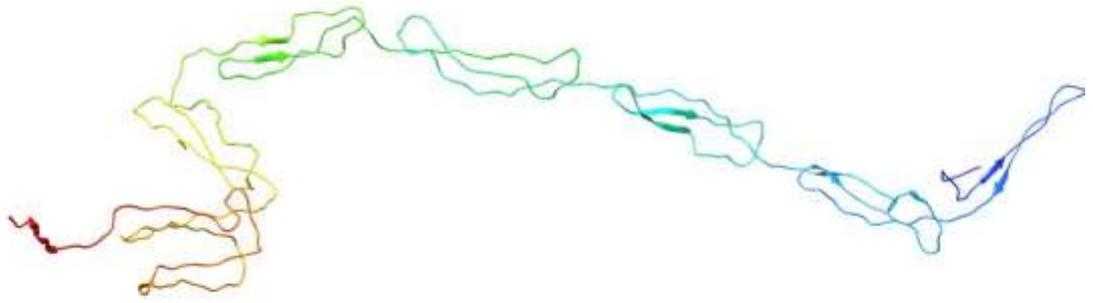


Figura 20. Modelo obtenido de la proteína Tau 441 mediante el servidor I-TASSER C-score=-0.72 y refinada por el algoritmo ModRefiner, visualización (*software UCSF Chimera 1.10.2*)

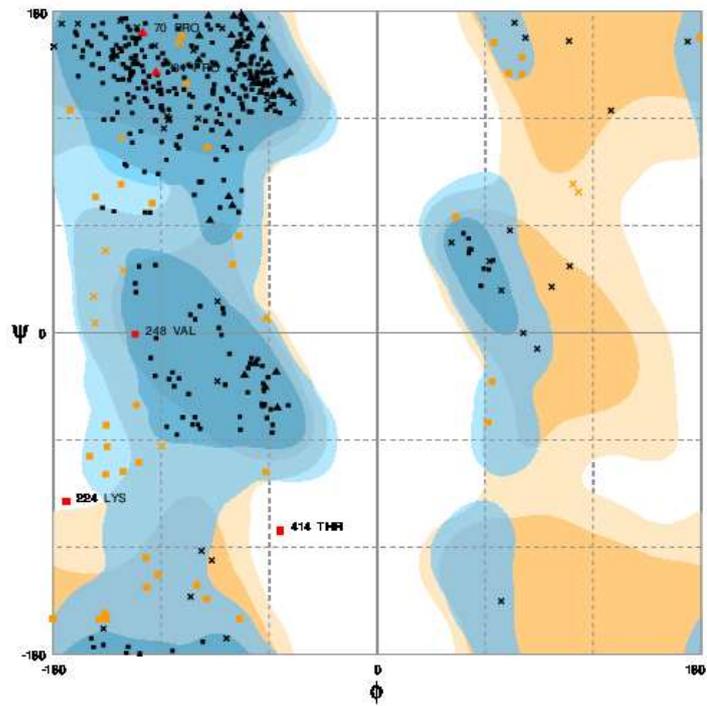


Figura 21. Gráfico de Ramachandran obtenido de la estructura de la proteína Tau 441 refinada, mediante el servidor RAMPAGE

MEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTD
 PSKLD SGKELHINLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFM
 EALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFT
 VRTDTGPEMGR

Figura 22. Secuencia aminoacídica de la proteína Hsp90 N (9-236)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
352 bits(904)	2e-122	Compositional matrix adjust.	171/171(100%)	171/171(100%)	0/171(0%)
Query 1	MEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPSKLD				60
Sbjct 5	MEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDPSKLD				64
Query 61	SGKELHINLIPNKQDRILTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMI				120
Sbjct 65	SGKELHINLIPNKQDRILTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMI				124
Query 121	GQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRTDTGPEMGR			171	
Sbjct 125	GQFGVGFYSAYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRTDTGPEMGR			175	

Figura 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hsp90 N (9-236) insertada en el plásmido GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3 mediante el algoritmo pBLAST número de referencia en el NCBI PDB: 3K98_A

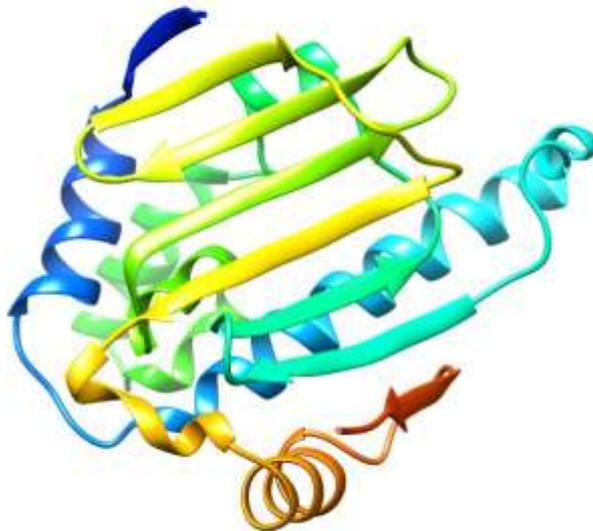


Figura 24. Modelo obtenido de la proteína Hsp90 N (9-236) mediante el servidor I-TASSER C-score= 1.14 y refinada por el algoritmo ModRefiner, visualización (*software UCSF Chimera 1.10.2*)

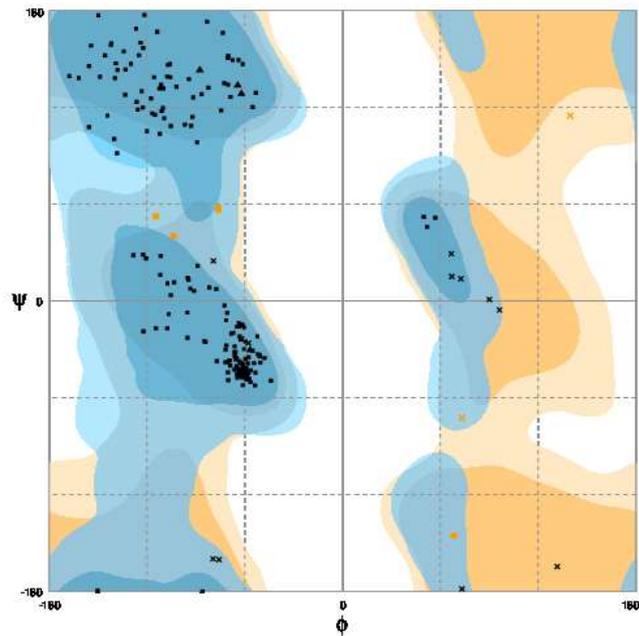


Figura 25. Gráfico de Ramachandran obtenido de la estructura de la proteína Hsp90 N (9-236) refinada, mediante el servidor RAMPAGE

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	86	Center	-854.4
		Lowest Energy	-946.0
1	72	Center	-953.3
		Lowest Energy	-953.3
2	68	Center	-1088.6
		Lowest Energy	-1261.6
3	64	Center	-1166.0
		Lowest Energy	-1247.7
4	55	Center	-1012.6
		Lowest Energy	-1247.2
5	52	Center	-976.8
		Lowest Energy	-1005.5
6	52	Center	-911.9
		Lowest Energy	-911.9
7	44	Center	-874.8
		Lowest Energy	-1110.1
8	39	Center	-892.5
		Lowest Energy	-960.1
9	35	Center	-885.6
		Lowest Energy	-976.5
10	29	Center	-1013.3
		Lowest Energy	-1056.9

Figura 26 .Cluster Scores de los modelos de las interacciones favorecidos hidrofobicamente (Hydrophobic-favored) de las proteínas Hsp90 N (9-236) y Tau 441.

Pesos de los coeficientes (Coefficient weights)
 $E = 0.40E_{rep} - 0.40E_{att} + 600E_{elec} + 2.00E_{DARS}$. *ClusPro 2.0*

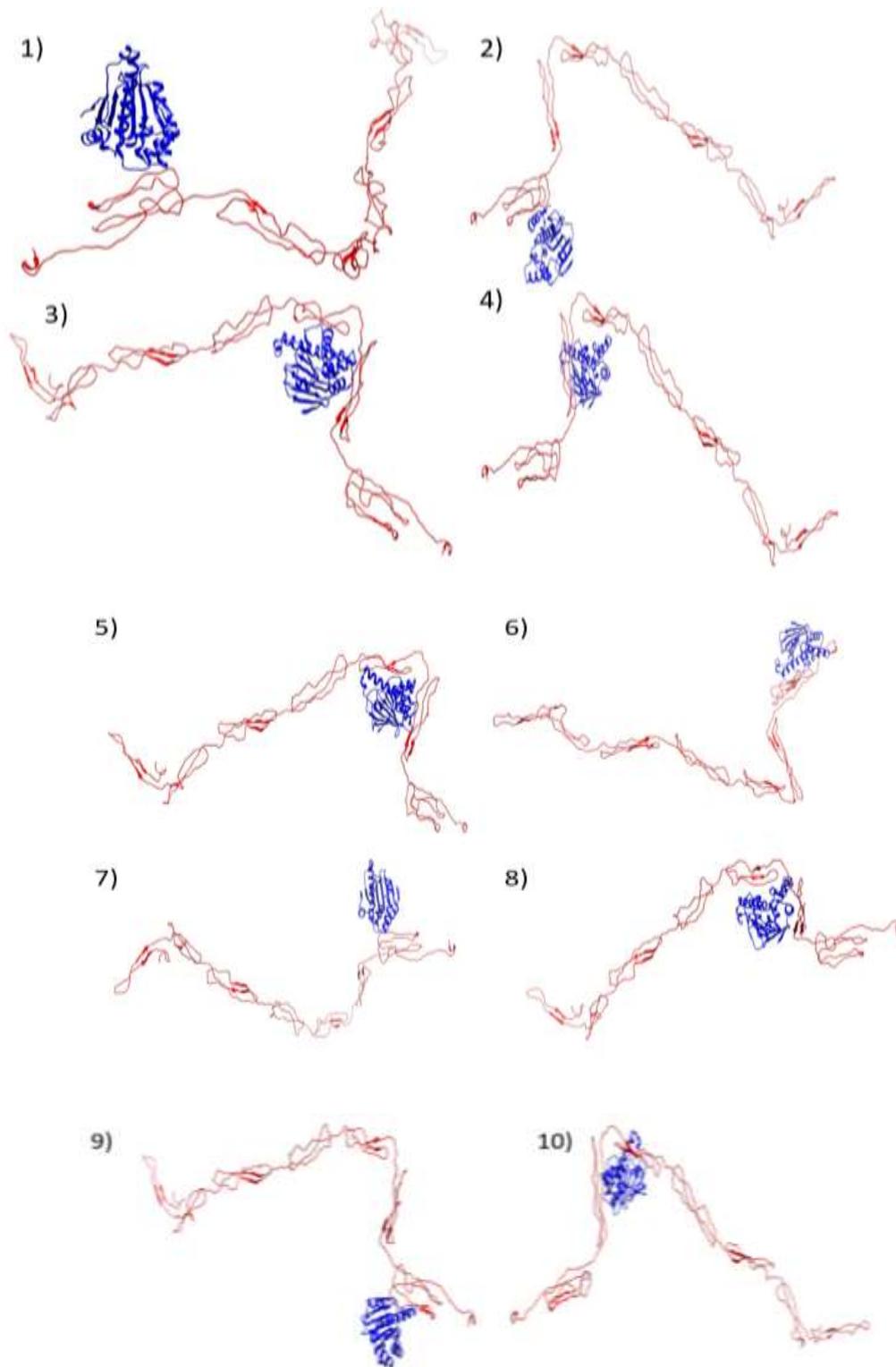


Figura 27. Modelos obtenidos del cluster de interacciones favorecidas por hidrofobicidad de las proteínas Hsp90 N (9-236) y Tau 441 mediante el servidor *ClusPro 2.0*. Pesos de los coeficientes (Coefficient weights) $E=0.40E_{rep}+-0.40E_{att}+600E_{elec}+2.00E_{DARS}$. Visualización mediante el software *software UCSF Chimera 1.10.2*

DISCUSIÓN

Se realizó la sobreexpresión de las proteínas recombinantes de los tres genes utilizando dos diferentes cepas bacterianas; *E. coli BL21* se utilizó para expresar la proteína GST-Hsp90 N (9-236), mientras que para la expresión de la proteína asociada a microtúbulos Tau 441 y REST/NRSF se utilizó la cepa *E. coli BL21* DE3. Diferentes condiciones fueron requeridas para lograr la expresión de las proteínas en estudio.

GST-Hsp90 N (9-236) que corresponde al dominio N-terminal de la proteína chaperona Hsp90, la cual es una proteína altamente conservada debido a su papel que es mantener la homeostasis del proteoma (proteostasis) (Hartl, Bracher, & Hayer-Hartl, 2011). Su sobreexpresión se obtuvo a las 5 horas después de la inducción con IPTG 1 mM a una D.O. de 0.6-0.7 y la temperatura fue de 37°C.

Tau 441, correspondiente a la isoforma más larga de la proteína Tau (Buée, Bussière, Buée-Scherrer, Delacourte, & Hof, 2000), una proteína intrínsecamente desordenada (Luo, Ma, Nussinov, & Wei, 2014) que en condiciones normales permite la estabilización de los microtúbulos en las neuronas, pero que se encuentra implicada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Su sobreexpresión se obtuvo a las 3 horas después de la inducción con IPTG 0.6 mM a una D.O. de 0.7-0.8 y la temperatura fue de 37°C.

REST/NRSF, el regulador maestro de genes neuronales en células no neuronales que cuya función en el envejecimiento parece ser la de neuroprotección ya que en la enfermedad de Alzheimer se observa disminuido (Lu et al., 2014). Su sobreexpresión se obtuvo a las 4 horas después de la inducción con IPTG 1.2 mM a una D.O. de 0.8-0.9, la temperatura fue de 32°C y que además se tuvo que adicionar ZnSO₄.

Las variables modificables para lograr la expresión de las proteínas fueron: el tiempo, observándose que la expresión de la proteína Tau fue el menor 3h, después la proteína REST/NRSF 4h y posteriormente GST-Hsp90 N (9-236) 5h; concentración de IPTG, utilizando 1.2 mM para expresar

REST/NRSF, 1 mM para GST-Hsp90 N (9-236) y 0.6 mM para Tau; D.O., 0.8-0.9 para la proteína REST/NRSF, 0.7-0.8 para Tau y 0.6-0.7. Estas tres variables, el tiempo, la concentración de IPTG y la D.O., se encuentran relacionadas, la D.O., nos da una estimación de la cantidad de bacterias en el medio de cultivo por lo que una mayor cantidad de IPTG será necesaria para sostener la sobreproducción de proteína a un determinado tiempo en una temperatura dada.

Para la expresión de la proteína REST/NRSF además fue requerida la adición de ZnSO₄. El dominio de unión a DNA de la proteína REST/NRSF contiene 8 dedos de Zinc clase Krüppel-GL1C₂H₂ (Cys₂His₂) (Chong et al., 1995). El Zinc tiene la propiedad de jugar el papel de elemento estructural en las regiones de unión a ácidos nucleicos (Berg & Shi, 1996), es decir, es por razones estructurales que se requiere para la expresión de dicha proteína en nuestro sistema.

Se identificó mediante la técnica de Far western blot la unión de la proteína GST-Hsp90 N (9-236) a la proteína Tau, observándose que la unión de la chaperona es específica, ya que no se observó interacción con la proteína control BSA. La técnica utilizada para la interacción deriva del western blot estándar. La proteína cebo, en este caso Tau, se detecta en donde la proteína presa, GST-Hsp90 N (9-236), se localiza, si es que se forma un complejo, lo que determina que dos proteínas interactúan directamente (Wu, Li, & Chen, 2007). La desventaja de la técnica es que se utilizan condiciones desnaturizantes en el buffer de muestra al realizar el SDS-PAGE y muchas proteínas dependen de su estructura secundaria y terciaria para su interacción. Teniendo en cuenta los contras de la técnica, se aprovecharon las características no estructurales de la proteína Tau (Skrabana, Skrabanova-Khuebachova, Kontsek, & Novak, 2006), por esta razón fue seleccionada como la proteína cebo obteniendo así la interacción con GST-Hsp90 N (9-236). El ensayo se realizó utilizando a la proteína GST-Hsp90 N (9-236) como cebo, y como presa a la proteína Tau, en estas condiciones que son contrarias a las del ensayo anterior, no se observó interacción entre las proteínas, lo cual nos sugiere que la estructura de la proteína GST-Hsp90 N (9-236) es necesaria para que pueda interactuar con la proteína no estructurada Tau.

Posteriormente para confirmar que efectivamente la estructura de GST-Hsp90 N (9-236) se encontraba involucrada en la interacción con Tau se planteó el experimento de overlay (Figura 16B) en el que no se utilizan condiciones desnaturizantes ya que la proteína cebo en este caso la proteína Tau 441 se vierte sobre la membrana de nitrocelulosa que por las cargas de esta y las que contiene la proteína queda adsorbida, se incubó posteriormente GST-Hsp90 N (9-236) no calentada y calentada en ebullición durante 5 minutos, se observó que al desnaturizar mediante calor, la chaperona pierde capacidad de unión a la proteína Tau. Sin embargo existía la posibilidad de que la unión del anticuerpo con GST-Hsp90 N (9-236) fuera la que se estaba perdiendo, debido a lo anterior el calentar la proteína GST-Hsp90 N (9-236) a ebullición el doble de tiempo, es decir 10 minutos para asegurar la desnaturización de la misma, observándose que el anticuerpo mab (AC88) continuaba reconociendo a la proteína, verificando que la estructura de GST-Hsp90 N (9-236) si participa en su unión con Tau.

Debido a las desventajas de la desnaturización de proteínas en la técnica de Far western blot, esta no se realizó para realizar la interacción de GST-Hsp90 N (9-236) con REST/NRSF ya que ambas presentan estructura tridimensional definida. Por lo anterior se procedió directamente a realizar la interacción mediante la técnica de overlay utilizando como blanco a la chaperona y como proteína presa a REST/NRSF, comprobando que existe interacción entre ambas proteínas.

Posteriormente a comprobar las interacciones de REST/NRSF y Tau con GST-Hsp90 N (9-236), se realizaron ensayos de competencia. En los que se utilizaron diferentes concentraciones de REST/NRSF y Tau, en una se adicionó el doble de concentración de una proteína y en otra se invirtieron las concentraciones. Se observó que en ambas concentraciones de proteínas la mayor intensidad se encontró en la unión de la proteína rest, lo cual sugiere que en estas condiciones parece ser la que presenta mayor afinidad por la chaperona, sin embargo no son definitivos los resultados, por lo que otros estudios son requeridos para poder determinar que proteína presenta mayor afinidad por la chaperona. Además de que la

hipótesis planteada es que tau fosforilada anormalmente presentaría mayor afinidad que REST/NRSF por la chaperona, es posible que REST presente mayor afinidad que tau no modificada y esta se invierta al hiperfosforilar tau.

Para obtener la estructura de la proteína Tau 441 se realizó un alineamiento de la secuencia insertada (Figura 18) en el plásmido tau/pet29b con el algoritmo pBLAST (Figura 19) para asegurar que dicha secuencia correspondía con la proteína Tau 441 isoforma 2 del NCBI obteniendo identidad del 100% por lo que todos los aminoácidos de la proteína insertada en el plásmido corresponde a la proteína depositada. Después de comprobar la secuencia, se modeló mediante I-TASSER obteniéndose 5 estructuras, de las cuales se tomó la de mayor C-Score el cual fue -0.72 (Figura 20), es necesario recalcar que existen casos en los que la estructura de la proteína obtenida con mayor C-score puede no ser la correcta, por lo que hay que recurrir a métodos de validación como el gráfico de Ramachandran el cual nos indica las regiones permitidas en las que puede encontrarse un determinado aminoácido de acuerdo a los ángulos de rotación dados, para la obtención de una mejor estructura fue utilizado el algoritmo ModRefiner ya que en el modelo previo de la estructura de la proteína en el gráfico de Ramachandran se observaban residuos en regiones no permitidas, después del refinamiento se aumentó el porcentaje de residuos en regiones permitidas en el gráfico de Ramachandran (Figura 21) mediante el servidor RAMPAGE. Para obtener la estructura de la proteína Hsp90 N (9-236) se realizó un alineamiento de la secuencia insertada (Figura 22) en el plásmido GST-Hsp90 N (9-236)/pGEX-4T3 con el algoritmo pBLAST (Figura 23) para asegurar que dicha secuencia correspondía con la proteína Hsp90 N (9-236) del NCBI obteniendo identidad del 100% por lo que todos los aminoácidos de la proteína insertada en el plásmido corresponde a la proteína depositada. Después de comprobar la secuencia, se modeló mediante I-TASSER obteniéndose 5 estructuras, de las cuales se tomó la de mayor C-Score el cual fue 1.14 (Figura 24), para la obtención de una mejor estructura fue

utilizado el algoritmo ModRefiner y fue validada usando el gráfico de Ramachandran (Figura 25) mediante el servidor RAMPAGE.

Las estructuras obtenidas de las proteínas Hsp90 N (9-236) y Tau 441 se sometieron a docking proteína-proteína utilizando el servidor ClusPro 2.0, la proteína Hsp90 N (9-236) se seleccionó como receptor y Tau 441 como ligando de la proteína, de acuerdo a la interacción determinada entre estas dos proteínas mediante dispersión de ángulo pequeño de rayos x (SAXS) se ven favorecidas las interacciones hidrofóbicas (Karagöz et al., 2014) , se seleccionaron las 10 estructuras de las interacciones con los scores más altos (Figura 26) que correspondían a las favorecidas por hidrofobicidad de acuerdo al servidor, observándose que de acuerdo a las características de ambas proteínas y al pequeño tamaño en este caso del N-terminal de Hsp90 se pueden llevar a cabo interacciones en distintos sitios de la estructura de la proteína Tau 441 (Figura 27). Un mejor refinamiento de la estructura de la proteína Tau puede ser requerido debido a sus características de proteína intrínsecamente desordenada, posiblemente utilizando dinámica podría ser factible, para este tipo de proteínas el campo de fuerza que se ha utilizado es CHARMM 22* (Rauscher et al., 2015), por lo que representa una buena opción para el mejoramiento de la estructura de la proteína Tau 441.

CONCLUSIONES

- Se requirió de la modificación de diferentes variables para la sobreexpresión de las proteínas en estudio.
- Es necesario utilizar diferentes condiciones para realizar la purificación de las proteínas
- Las proteínas REST/NRSF y Tau interactúan directamente con el N-terminal de la proteína Hsp90
- Se sugiere que la estructura del dominio N-terminal de Hsp90 es necesario para que la interacción con las proteínas
- La afinidad de REST/NRSF parece ser mayor que la de Tau por el dominio N-terminal de Hsp90
- Diversos sitios entre la interacción de las proteínas Tau y el dominio N-terminal de Hsp90 parecen ocurrir

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi, H., Katsuno, M., Waza, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., & Sobue, G. (2009). Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: Pathogenic roles and therapeutic implications. *International Journal Of Hyperthermia*, 25(8), 647-654. <http://dx.doi.org/10.3109/02656730903315823>

Augustinack, J., Schneider, A., Mandelkow, E., & Hyman, B. (2001). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 103(1), 26-35. <http://dx.doi.org/10.1007/s004010100423>

Berg, J. & Shi, Y. (1996). The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc. *Science*, 271(5252), 1081-1085. <http://dx.doi.org/10.1126/science.271.5252.1081>

Bertram, L. (2004). Alzheimer's Disease: One Disorder, Too Many Genes?. *Human Molecular Genetics*, 13(90001), 135r-141. [Http://Dx.Doi.Org/10.1093/Hmg/Ddh077](http://Dx.Doi.Org/10.1093/Hmg/Ddh077)

Blagg, B. & Kerr, T. (2006). Hsp90 inhibitors: Small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Medicinal Research Reviews*, 26(3), 310-338. <http://dx.doi.org/10.1002/med.20052>

Blair, L., Nordhues, B., Hill, S., Scaglione, K., O'Leary, J., & Fontaine, S. et al. (2013). Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau. *Journal Of Clinical Investigation*, 123(10), 4158-4169. <http://dx.doi.org/10.1172/jci69003>

Blair, L., Sabbagh, J., & Dickey, C. (2014). Targeting Hsp90 and its co-chaperones to treat Alzheimer's disease. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, 18(10), 1219-1232. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2014.943185>

Braak, H., Braak, E., Bohl, J., & Reintjes, R. (1996). Age, neurofibrillary changes, A β -amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 210(2), 87-90. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12668-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12668-9)

Bracher, A. & Hartl, F. (2006). Hsp90 structure: when two ends meet. *Nat Struct Mol Biol*, 13(6), 478-480. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb0606-478>

Blundell, T., Sibanda, B., Sternberg, M., & Thornton, J. (1987). Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 326(6111), 347-352. <http://dx.doi.org/10.1038/326347a0>

Bowie, J., Luthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, 253(5016), 164-170. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1853201>

Brooks, B. & Karplus, M. (1983). Harmonic dynamics of proteins: normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 80(21), 6571-6575. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.80.21.6571>

Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders¹¹These authors contributed equally to this work. *Brain Research Reviews*, 33(1), 95-130. [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0173\(00\)00019-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-0173(00)00019-9)

Chiosis, G. (2006). Targeting chaperones in transformed systems – a focus on Hsp90 and cancer. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, 10(1), 37-50. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.10.1.37>

Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J., & Solit, D. (2004). Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discovery Today*, 9(20), 881-888. [http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446\(04\)03245-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446(04)03245-3)

Chong, J., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J., Zheng, Y., & Boutros, M. et al. (1995). REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 80(6), 949-957. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90298-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90298-8)

Echeverría, P., Bernthaler, A., Dupuis, P., Mayer, B., & Picard, D. (2011). An Interaction Network Predicted from Public Data as a Discovery Tool: Application to the Hsp90 Molecular Chaperone Machine. *Plos ONE*, 6(10), e26044. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026044>

Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519-526. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)

Golde, T., Estus, S., Younkin, L., Selkoe, D., & Younkin, S. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, 255(5045), 728-730. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1738847>

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y., Quinlan, M., Wisniewski, H., & Binder, L. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 83(13), 4913-4917. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>

Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519-526. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)

Hamos, J., Oblas, B., Pulaski-Salo, D., Welch, W., Bole, D., & Drachman, D. (1991). Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology*, 41(3), 345-345. <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.41.3.345>

Hardy, J. & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends In Pharmacological Sciences*, 12, 383-388. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-v](http://dx.doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-v)

Hardy, J., Duff, K., Hardy, K. G., Perez-Tur, J., & Hutton, M. (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nature neuroscience*, 1(5), 355-358.

Hardy, J. & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1566067>

Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends In Neurosciences*, 20(4), 154-159. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236\(96\)01030-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236(96)01030-2)

Hartl, F., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10317>

Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Smith, A., George, L., Tung, Y., & Zaidi, T. (1989). Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 86(14), 5646-5650. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.14.5646>

Janin, J. (2002). Welcome to CAPRI: A Critical Assessment of PRedicted Interactions. *Proteins: Structure, Function, And Genetics*, 47(3), 257-257. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10111>

Jinwal, U., Koren, J., Borysov, S., Schmid, A., Abisambra, J., & Blair, L. et al. (2010). The Hsp90 Cochaperone, FKBP51, Increases Tau Stability and Polymerizes Microtubules. *Journal Of Neuroscience*, 30(2), 591-599. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4815-09.2010>

Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M., Fritz, L., & Burrows, F. (2003). A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 425(6956), 407-410. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01913>

Karagöz, G., Duarte, A., Akoury, E., Ippel, H., Biernat, J., & Morán Luengo, T. et al. (2014). Hsp90-Tau Complex Reveals Molecular Basis for Specificity in Chaperone Action. *Cell*, 156(5), 963-974. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.037>

Katz, L. & Levinthal, C. (1972). Interactive Computer Graphics and Representation of Complex Biological Structures. *Annual Review Of Biophysics And Bioengineering*, 1(1), 465-504. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bb.01.060172.002341>

Kosik, K., Joachim, C., & Selkoe, D. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 83(11), 4044-4048. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.11.4044>

Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S., Xia, B., Hall, D., & Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking?. *Proteins*, 81(12), 2159-2166. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.24403>

Krukenberg, K., Street, T., Lavery, L., & Agard, D. (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Quarterly Reviews Of Biophysics*, 44(02), 229-255. <http://dx.doi.org/10.1017/s0033583510000314>

Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., & Chen, Y. et al. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 507(7493), 448-454. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13163>

Luo, W., Dou, F., Rodina, A., Chip, S., Kim, J., & Zhao, Q. et al. (2007). Roles of heat-shock protein 90 in maintaining and facilitating the

neurodegenerative phenotype in tauopathies. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 104(22), 9511-9516. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701055104>

Luo, Y., Ma, B., Nussinov, R., & Wei, G. (2014). Structural Insight into Tau Protein's Paradox of Intrinsically Disordered Behavior, Self-Acetylation Activity, and Aggregation. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5(17), 3026-3031. <http://dx.doi.org/10.1021/jz501457f>

Luo, Y., Ma, B., Nussinov, R., & Wei, G. (2014). Structural Insight into Tau Protein's Paradox of Intrinsically Disordered Behavior, Self-Acetylation Activity, and Aggregation. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5(17), 3026-3031. <http://dx.doi.org/10.1021/jz501457f>

Martí-Renom, M., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., & Šali, A. (2000). Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure*, 29(1), 291-325. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.291>

Masters, C., Simms, G., Weinman, N., Multhaup, G., McDonald, B., & Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 82(12), 4245-4249. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>

Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., & Watanabe, A. et al. (1995). Hyperphosphorylation of Tau in PHF. *Neurobiology Of Aging*, 16(3), 365-371. [http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00027-c](http://dx.doi.org/10.1016/0197-4580(95)00027-c)

Rauscher, S., Gapsys, V., Gajda, M., Zweckstetter, M., de Groot, B., & Grubmüller, H. (2015). Structural Ensembles of Intrinsically Disordered Proteins Depend Strongly on Force Field: A Comparison to Experiment. *J. Chem. Theory Comput.*, 11(11), 5513-5524. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00736>

Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5(4), 725-738. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.5>

Sebolt-Leopold, J. & English, J. (2006). Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature*, 441(7092), 457-462. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04874>

Schmidt, M., Zhukareva, V., Newell, K., Lee, V., & Trojanowski, J. (2001). Tau isoform profile and phosphorylation state in dementia pugilistica recapitulate Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 101(5), 518-524.

Schoenherr, C. & Anderson, D. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, 267(5202), 1360-1363. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7871435>

Seilheimer, B., Bohrmann, B., Bondolfi, L., Müller, F., Stüber, D., & Döbeli, H. (1997). The Toxicity of the Alzheimer's β -Amyloid Peptide Correlates with a Distinct Fiber Morphology. *Journal Of Structural Biology*, 119(1), 59-71. <http://dx.doi.org/10.1006/jsbi.1997.3859>

Selkoe, D. J. (1996). Amyloid β -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18295-18298.

Shimojo, M. (2008). Huntingtin Regulates RE1-silencing Transcription Factor/Neuron-restrictive Silencer Factor (REST/NRSF) Nuclear Trafficking Indirectly through a Complex with REST/NRSF-interacting LIM Domain Protein (RILP) and Dynactin p150Glued. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(50), 34880-34886. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m804183200>

Skolnick, J., Fetrow, J. S., & Kolinski, A. (2000). Structural genomics and its importance for gene function analysis. *Nature biotechnology*, 18(3), 283-287.

Skrabana, R., Skrabanova-Khuebachova, M., Kontsek, P., & Novak, M. (2006). Alzheimer's-disease-associated conformation of intrinsically disordered tau protein studied by intrinsically disordered protein liquid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytical Biochemistry*, 359(2), 230-237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.031>

Spillantini, M. & Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends In Neurosciences*, 21(10), 428-433. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01337-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01337-x)

Swendsen, R. & Wang, J. (1986). Replica Monte Carlo Simulation of Spin-Glasses. *Phys. Rev. Lett.*, 57(21), 2607-2609. <http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.57.2607>

Terry, R. (1996). The Pathogenesis of Alzheimer Disease: An Alternative to the Amyloid Hypothesis. *Journal Of Neuropathology And Experimental*

Neurology, 55(10), 1023-1025. <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199655100-00001>

Wang, J., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal Of Neuroscience*, 25(1), 59-68. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x>

Wischik, C., Novak, M., Edwards, P., Klug, A., Tichelaar, W., & Crowther, R. (1988). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 85(13), 4884-4888. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.85.13.4884>

Wu, S., Skolnick, J., & Zhang, Y. (2007). Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC Biology*, 5(1), 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7007-5-17>

Wu, Y., Li, Q., & Chen, X. (2007). Detecting protein–protein interactions by far western blotting. *Nat Protoc*, 2(12), 3278-3284. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.459>

Zhao, H., Michaelis, M. L., & Blagg, B. S. (2012). Hsp90 modulation for the treatment of Alzheimer's disease. *Adv Pharmacol*, 64, 1-25.

APÉNDICE

DETALLE DE PROCEDIMIENTOS

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

- Picar una colonia de una placa recién cultivada y transferirla a 300 ml de medio LB, incubar a 37°C en agitación hasta una D.O. de 0.6-0.7 a una longitud de onda de 600 nm
- Transferir las células a tubos de polipropileno de 50 ml fríos
- Recuperar las células centrifugando a 4000 rpm/10 min a 4°C en un rotor sorvall JA-10
- Decantar el medio sobrenante de las pastillas
- Resuspender las células en CaCl₂ 0.1 M a 4°C
- Recuperar las células centrifugando a 4000 rpm/10 min a 4°C en un rotor sorvall JA-10
- Resuspender cada pastilla en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M más 15% de glicerol frío
- Transferir a tubos eppendorf 150 µl la suspensión de células competentes obtenidas
- Guardar las células en congelamiento a -80°C

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

- Descongelar una alícuota de células competentes en hielo
- Mezclar 50 ng de DNA cuantificado con 50 μ l de la alícuota descongelada
- Incubar 10 minutos en hielo
- Calentar a 42°C durante 50 segundos
- Dejar en hielo 5 minutos
- Adicionar 1 ml de medio LB sin antibiótico e incubar durante 10 minutos
- Tomar una alícuota de 150 a 200 μ l y espatular en una caja con agar LB con antibiótico de acuerdo al plásmido utilizado

EXTRACCIÓN DE DNA MEDIANTE MINIPREP

- Crecer una colonia en 10 ml de medio LB con el determinado antibiótico 50-100 µg/ml según el plásmido utilizado
- Incubar de 12 a 16 horas en agitación
- Recolectar las células en 2 tubos eppendorf centrifugando 1min a 10000xg
- Resuspender las células con 350 µl de solución STET, centrifugar 1min a 10000xg y retirar sobrenadante
- Resuspender las células con 350 µl de solución STET, adicionar lisozima 10mg/ml en Tris base pH 8.0 e incubar 2 minutos a temperatura ambiente
- Colocar en un termoblock a 90°C durante un minuto
- Centrifugar 10 min 10000xg
- Retirar el pellet formado del fondo con un palillo de madera estéril
- Agregar 75 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 µl de isopropanol e incubar durante 10 min a temperatura ambiente
- Centrifugar 10000xg durante 10 minutos y desechar el sobrenadante
- Lavar con etanol al 70% con 1 ml
- Dejar evaporar el etanol y resuspender en agua inyectable 200 a 400 µl
- Verificar integridad mediante un gel de agarosa el 0.8%

GEL SDS-PAGE (GELES DE AGAROSA A DIFERENTES PORCENTAJES)**GEL SEPARADOR**

	7%		7.5%		10%		12%	
Solución stock	4.5ml	9ml	4.5ml	9ml	4.5ml	9ml	4.5ml	9ml
Acrilamida	1.05	2.1	1.125	2.25	1.5	3	1.8	3.6
Tris-Cl 4X pH 8.8	1.125	2.25	1.121	2.25	1.125	2.25	1.125	2.25
Agua destilada	2.325	4.65	2.25	4.5	1.875	3.75	1.575	3.15
Persulfato de amonio	0.015	0.03	0.015	0.03	0.015	0.03	0.015	0.03
TEMED	0.003	0.006	0.003	0.006	0.003	0.006	0.003	0.006

GEL CONCENTRADOR

Solución stock	1.5 ml	3ml
Acrilamida	0.196	0.391
Tris-Cl 4X pH 6.8	0.377	0.753
Agua destilada	0.919	1.837
Persulfato de amonio	0.0075	0.0151
TEMED	0.0025	0.005

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

- Crecer durante 12-14 h una colonia de *E.coli* BL21 con el vector de expresión GST-Hsp90 N (9-236)/ pGEX-4T3 un tubo con medio líquido LB con ampicilina 100 µg/ml
- Verter el tubo a 500 ml de medio líquido LB en un matraz de con amplicilia 100 µg/ml
- Incubar en agitación 200 rpm/min hasta una D.O. de 0.6-0.7 a 600nm
- Adicionar IPTG a una concentración de 1mM para la inducción y agitar durante 5h a 37 °C
- Verificar expresión empastillando 1 ml del cultivo inducido después de la inducción resuspendido en 80 µl de buffer de muestra y cargando 20 µl en un gel SDS-PAGE al 10 %

EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

- Recolectar el cultivo después de inducción centrifugando 4000xg 15 min a 4°C en tubos Falcon de 50 ml
- Por cada 50 ml de cultivo, adicionar 10 ml de buffer de lisis (lisozima 100 µg/ml , 50mM Tris HCl pH 7.4 tritón 1% glicerol 10 %)
- Agitar 1 min en vortex e incubar en hielo durante 30 min
- Vaciar en alícuotas de 1 ml cada una y centrifugar 20000xg 15 min
- Recolectar sobrenadante y pasar por una membrana de 0.22 µm

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

-Posterior a la extracción, montar una columna para purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con Glutation-Sepharosa High Performance.

-Equilibrar la columna con 5 volúmenes de buffer de unión (PBS, pH 7.3 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl)

-Aplicar la muestra y recolectar en una alícuota para verificar unión a la resina mediante SDS-PAGE

-Lavar con 10 ml de buffer de unión (PBS, pH 7.3 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar que no haya elución de la muestra mediante SDS-PAGE

-Eluir la muestra con 10 volúmenes de buffer de elución 50 mM Tris-HCl, 10 mM glutatión reducido, pH 8.0 y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar elución de la muestra mediante SDS-PAGE

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441

- Crecer durante 12-14 h una colonia de *E.coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión tau/pET29b un tubo con medio líquido LB con kanamicina 80 µg/ml
- Verter el tubo a 500 ml de medio líquido LB en un matraz de con kanamicina 80 µg/ml
- Incubar en agitación 200 rpm/min hasta una D.O. de 0.7-0.8 a 600nm
- Adicionar IPTG a una concentración de 0.6 mM para la inducción y agitar durante 3h a 37 °C
- Verificar expresión empastillando 1 ml del cultivo inducido después de la inducción resuspendido en 80 µl de buffer de muestra y cargando 20 µl en un gel SDS-PAGE al 10 %

EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441

- Recolectar el cultivo después de inducción centrifugando 4000xg 15 min a 4°C en tubos Falcon de 50 ml
- Por cada 50 ml de cultivo, adicionar 1.5 ml de buffer de lisis (lisozima 100 µg/ml , 50mM Tris HCl pH 7.4 tritón 1% glicerol 10 %)
- Agitar 1 min en vortex e incubar en hielo durante 30 min
- Calentar a ebullición las alícuotas durante 20 min
- Vaciar en alícuotas de 1 ml cada una y centrifugar 20000xg 15 min
- Recolectar sobrenadante y pasar por una membrana de 0.22 µm

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU 441

-Posterior a la extracción, montar una columna para purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con Ni sepharosa High Performance

-Lavar la columna con 5 volúmenes de agua destilada

-Equilibrar la columna con 5 volúmenes de buffer de unión (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.4)

-Aplicar la muestra y recolectar en una alícuota para verificar unión a la resina mediante SDS-PAGE

-Lavar con 10 ml de buffer de unión (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.4) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar que no haya elución de la muestra mediante SDS-PAGE

-Eluir la muestra con 10 volúmenes de buffer de elución (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 80 mM imidazol, pH 7.4) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar elución de la muestra mediante SDS-PAGE

-Eluir la muestra con 10 volúmenes de buffer de elución (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 250 mM imidazol, pH 7.4) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar elución de la muestra mediante SDS-PAGE

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF

- Crecer durante 12-14 h una colonia de *E.coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión PRJR1-REST un tubo con medio líquido LB con ampicilina 100 µg/ml
- Verter el tubo a 1L de medio líquido LB en un matraz de con ampicilina 100 µg/ml
- Incubar en agitación 200 rpm/min hasta una D.O. de 0.8-0.9 a 600nm
- Adicionar IPTG a una concentración de 1.2 mM para la inducción, y adicionar ZnSO₄ 40µM, agitar durante 4h a 32 °C a 150 rpm.
- Verificar expresión empastillando 1 ml del cultivo inducido después de la inducción resuspendido en 80 µl de buffer de muestra y cargando 20 µl en un gel SDS-PAGE al 7 %

EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF

- Recolectar el cultivo después de inducción centrifugando 4000xg 15 min a 4°C en tubos Falcon de 50 ml
- Por cada 50 ml de cultivo, adicionar 10 ml de buffer de lisis (lisozima 500 µg/ml , 10mM Tris HCl pH 8.0, glicerol 10 %)
- Agitar 1 min en vortex e incubar en hielo durante 30 min
- Vaciar en alícuotas de 1 ml cada una y centrifugar 20000xg 15 min
- Recolectar sobrenadante y pasar por una membrana de 0.22 µm
- Agregar urea a una concentración final de 8 M

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA REST/NRSF

-Posterior a la extracción, montar una columna para purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con Ni sepharosa High Performance

-Lavar la columna con 5 volúmenes de agua destilada

-Equilibrar la columna con 5 volúmenes de buffer de unión (20mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl y 20 mM imidazol, pH 7.4)

-Aplicar la muestra y recolectar en una alícuota para verificar unión a la resina mediante SDS-PAGE

-Lavar con 10 ml de buffer de unión (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 30 mM imidazol) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar que no haya elución de la muestra mediante SDS-PAGE

-Eluir la muestra con 10 volúmenes de buffer de elución (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 80 mM imidazol) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar elución de la muestra mediante SDS-PAGE

-Eluir la muestra con 10 volúmenes de buffer de elución (20mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 250 mM imidazol) y recolectar en alícuotas de 500 µl cada una y verificar elución de la muestra mediante SDS-PAGE

WESTERN BLOT PROTEÍNA HSP90 N (9-236)

- Realizar la transferencia semi-seca de un gel SDS-PAGE al 10 % a un voltaje de 13 volts durante 35 minutos a una membrana de nitrocelulosa
- Verificar la transferencia mediante la tinción con rojo de Ponceau
- Bloquear la membrana con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST
- Incubar con el anticuerpo primario mab (AC88) dilución 1:500 en buffer TBST durante 2h a temperatura ambiente en agitación
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Incubar con el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP en buffer TBST dilución 1:10000 1h
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol

WESTERN BLOT PROTEÍNA TAU

- Realizar la transferencia semi-seca de un gel SDS-PAGE al 10 % a un voltaje de 13 volts durante 35 minutos a una membrana de nitrocelulosa
- Verificar la transferencia mediante la tinción con rojo de Ponceau
- Bloquear la membrana con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST
- Incubar con el anticuerpo primario Tau (A-10) en buffer TBST dilución 1:1000 durante 2h a temperatura ambiente en agitación
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Incubar con el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP en buffer TBST dilución 1:10000 1h

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol

WESTERN BLOT PROTEÍNA REST/NRSF

-Realizar la transferencia semi-seca de un gel SDS-PAGE al 7 % a un voltaje de 13 volts durante 35 minutos a una membrana de nitrocelulosa

-Verificar la transferencia mediante la tinción con rojo de Ponceau

-Bloquear la membrana con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST

-Incubar con el anticuerpo primario Anti-REST en buffer TBST dilución 1:500 durante 2h a temperatura ambiente en agitación

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Incubar con el anticuerpo secundario bovine anti-rabbit-HRP en buffer TBST dilución 1:10000 1h

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol

INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) Y TAU 441 MEDIANTE FAR WESTERN BLOT

-Realizar la transferencia de la proteína Tau 441 semi-seca de un gel SDS-PAGE al 7 % a un voltaje de 13 volts durante 35 minutos a una membrana de nitrocelulosa

-Verificar la transferencia mediante la tinción con rojo de Ponceau

-Bloquear la membrana con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST

-Incubar con la proteína Hsp90 N (9-236) 10µg/ml en buffer TBST durante toda la noche

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Incubar con el anticuerpo primario mab (AC88) dilución 1:500 en buffer TBST durante 2h a temperatura ambiente en agitación

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Incubar con el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP en buffer TBST dilución 1:10000 1h

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno

-Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol

INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) Y TAU 441 MEDIANTE OVERLAY

- Adicionar sobre una membrana de nitrocelulosa 10 µg de proteína Hsp90 N (9-236) purificada
- Bloquear la membrana con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST
- Incubar con la proteína Tau 441 10µg/ml en buffer TBST durante toda la noche
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Incubar con el anticuerpo primario Tau (A-10) en buffer TBST dilución 1:1000 durante 2h a temperatura ambiente en agitación
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Incubar con el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP en buffer TBST dilución 1:10000 1h
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol

INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS HSP90 N (9-236) Y REST/NRSF MEDIANTE OVERLAY

- Adicionar sobre una membrana de nitrocelulosa 10 µg de proteína Hsp90 N (9-236) purificada
- Bloquear la membrana con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST
- Incubar con la proteína REST/NRSF 10µg/ml en buffer TBST durante toda la noche
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Incubar con el anticuerpo primario Anti-REST en buffer TBST dilución 1:500 durante 2h a temperatura ambiente en agitación
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Incubar con el anticuerpo secundario bovine anti-rabbit-HRP en buffer TBST dilución 1:10000 1h
- Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno
- Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol

**COMPETENCIA DE INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS TAU 441 Y
CON REST/NRSF POR LA PROTEÍNA HSP90 N (9-236) MEDIANTE
ENSAYO DE OVERLAY**

-Adicionar sobre 4 membranas de nitrocelulosa 10 µg de proteína Hsp90 N (9-236) purificada

-Bloquear las membranas con una solución de leche en polvo al 20% durante una hora en buffer TBST

-Incubar 2 membranas con las proteínas purificadas Tau y REST/NRSF concentración 2:1 (20µg/ml de Tau:10µg/ml de REST/NRSF) en buffer TBST toda la noche

-Incubar 2 membranas con las proteínas purificadas Tau y REST/NRSF concentración 1:2 (10µg/ml de Tau: 20µg/ml de REST/NRSF) en buffer TBST toda la noche a temperatura ambiente en agitación

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno a cada una de las 4 membranas

-Adicionar los anticuerpos Tau (A-10) dilución 1:1000 a una membrana con concentración de proteína 2:1 (20µg/ml de Tau:10µg/ml de REST/NRSF) y el anticuerpo Anti-REST dilución 1:500 a la segunda membrana de las mismas condiciones, incubar 2h a temperatura ambiente en agitación

- Adicionar los anticuerpos Tau (A-10) dilución 1:1000 a una membrana con concentración de proteína 1:2 (10µg/ml de Tau: 20µg/ml de REST/NRSF) y el anticuerpo Anti-REST dilución 1:500 a la segunda membrana de las mismas condicione, incubar 2h a temperatura ambiente en agitación

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno a cada una de las 4 membranas

-Adicionar el anticuerpo secundario bovine anti-mouse-HRP 1:10000 para las membranas con anticuerpo Tau (A-10) y bovine anti-rabbit-HRP 1:10000 para las membranas con anticuerpo Anti-REST, incubar 1h a temperatura ambiente en agitación

-Realizar 3 lavados con buffer TBST 10 min cada uno a cada una de las 4 membranas

-Adicionar PBS1X y retirar, revelar la membrana con reactivo Luminol