



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Dispersión del aparato de Golgi producida por la sobreexpresión de
la proteína Tau en células de neuroblastoma”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Fanny Rodríguez Cruz

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis:

Dr. Francisco García Sierra

Ciudad de México

Diciembre, 2018.

Comité tutorial

Director de Tesis: Dr. Francisco García Sierra

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Asesores:

Dra. Guadalupe Reyes Cruz

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Dr. Federico Castro Muñoz-Ledo

Departamento de Biología Celular

CINVESTAV-IPN

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Gustavo Basurto Islas

Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica

Campus León, Universidad de Guanajuato

Ciudad de México

Diciembre, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco García Sierra por darme la oportunidad de realizar mi trabajo experimental en su laboratorio, por sus consejos, su enseñanza y por su amistad.

A todos mis asesores por el apoyo en la realización de este proyecto, aportando sugerencias.

A mi familia, que sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida.

A todos mis amigos.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 25 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, bajo la asesoría del Dr. Francisco García Sierra.

Este proyecto fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de la beca correspondiente al grado de doctorado.

ÍNDICE

1.- Resumen5
2.- Abstract6
3.- Introducción7
4.- Hipótesis17
5.- Objetivo General17
6.- Objetivos Particulares17
7.- Materiales y Métodos18
8.- Resultados30
9.- Discusión67
10.- Conclusiones78
11.- Perspectivas78
12.- Referencias 79

RESUMEN

En la enfermedad de Alzheimer (EA) la proteína Tau se convierte en una proteína patológica al perder su afinidad por los Microtúbulos de las neuronas y agregarse anormalmente en el compartimento somatodendrítico. Aunque se han descrito una serie de modificaciones postraduccionales en la molécula de Tau que alteran su estructura y favorecen su agregación en la forma de filamentos durante la enfermedad (filamentos helicoidales), no se conocen los efectos que esta proteína podría producir en etapas tempranas de la enfermedad cuando se acumula en forma monomérica en el espacio citoplásmico de las neuronas afectadas. Con el uso de células de origen neuronal cultivadas *in vitro*, nuestro laboratorio y otros grupos de investigación hemos evidenciado que la sobreexpresión de Tau puede afectar la morfología y función de diversos organelos membranosos como el núcleo, la mitocondria y la membrana plasmática. En el presente trabajo expandimos nuestros hallazgos y encontramos que la acumulación anormal de Tau en el citoplasma de células de neuroblastoma no diferenciadas produjo una dispersión del aparato de Golgi. Para conocer los dominios de la molécula de Tau que podrían ser responsables de dicho efecto, se evaluaron diversas recombinantes con deleciones en sus extremos amino y carboxilo terminal, encontrándose que la zona de dominios repetidos con afinidad a los microtúbulos es la responsable de dicha acción. El mecanismo mediante el cual se presentó la dispersión del aparato de Golgi parece asociarse a la formación de estructuras en anillo de paquetes de microtúbulos, los cuales fueron altamente resistentes a la acción de agentes desestabilizantes del citoesqueleto de Tubulina. Finalmente se evaluó el efecto funcional de la dispersión del aparato de Golgi, encontrándose que el nivel de glicosilación total de proteínas disminuyó en las células que expresaron anormalmente a la proteína Tau. Estas alteraciones evidenciadas en el sistema *in vitro*, podrían presentarse durante las etapas más tempranas de la EA, en las neuronas de pacientes con la enfermedad cuando la proteína Tau acumulada se encuentra en forma no ensamblada.

Abstract

Abnormal fibrillary aggregation of Tau protein in the somatodendritic compartment is a pathological condition observed in Alzheimer's disease (AD). This is in line with a gain of inability to bind and stabilize microtubules. Despite several posttranslational modifications have been involved in promoting the fibrillary aggregation of Tau, little is known about the pathological consequences of early accumulation of Tau in a non-aggregated state on the normal functioning of affected neurons in AD.

By using several neuronal and non-neuronal cell models expressing normal or modified Tau, our group and others have documented the induction of toxic effects altering the structure and function of several organelles named nucleus, mitochondria and plasma membrane. In order to obtain more insights into the mechanisms by which tau may disturb intracellular organization of the membranous elements, in this study we found that transient overexpression of this protein in undifferentiated neuroblastoma cells produces fragmentation of the Golgi apparatus. With the aim to identify which region of Tau molecule is a determining factor to produce this alteration, we also expressed several N- and C- termini truncated Tau variants, and found that the repeated domain region, which has strong affinity to bind microtubules, may be the main promoter of this effect. Noteworthy is that in the majority of cells exhibiting dispersion of the Golgi apparatus, a ring-shaped array of cortical or perinuclear microtubule bundles was also generated under the expression of either variant of Tau. These appeared to be well-organized and stable structures because they were resistant to the action of microtubule-depolymerizing agents. These results further indicate that a mechanical force generated by Tau-induced Mt-bundling may be responsible for Golgi fragmentation. Finally, as a pathological consequence, cells undergoing Tau-induced Golgi apparatus fragmentation exhibited a reduction in total levels of protein glycosylation. We can conclude that *in vitro* evidence supporting disturbance of membranous organelles by a somatic non-fibrillary overabundance of Tau protein may be associated with early neuronal malfunctioning and initial cognitive impairments in the disease.

INTRODUCCION.

La Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en adultos mayores y generalmente se presenta después de los 65 años de edad. Esta enfermedad se caracteriza clínicamente por un proceso neurodegenerativo progresivo que ocasiona deterioro en las funciones cognitivas como lo muestran la pérdida de la memoria, cambios en la personalidad, deterioro del lenguaje, alteraciones en funciones visuales y de orientación espacio-tiempo. Estos síntomas son debidos a la muerte neuronal en áreas específicas del cerebro como son: la corteza cerebral y el hipocampo (Figura 1).

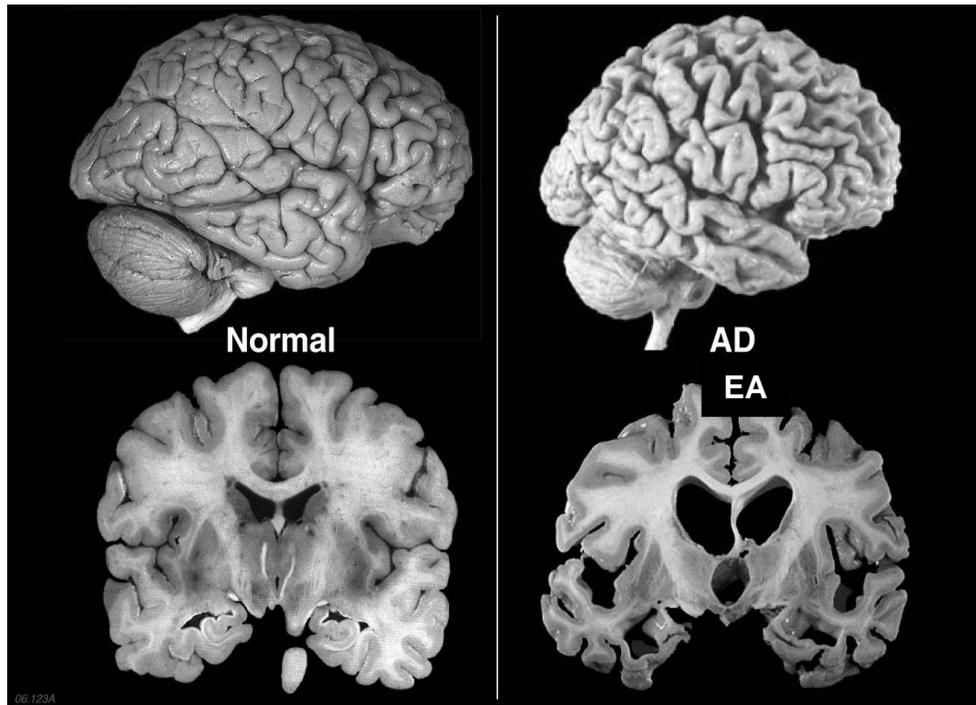


Figura 1. Degeneración y muerte neuronal en el cerebro de sujetos con la EA. Esquema comparativo entre un caso de sujeto sano y un caso con Alzheimer, donde se muestra la disminución de masa cerebral producida por la muerte neuronal en áreas específicas como corteza cerebral e hipocampo.

A nivel histopatológico, la EA se caracteriza por la presencia de estructuras anormales que consisten en proteínas agregadas en forma fibrilar dentro del soma denominadas marañas neurofibrilares (MNF's). Incluso, se ha reportado que la aparición de estas estructuras correlaciona con la severidad de la enfermedad y con los síntomas clínicos (Arriagada y cols., 1992).

Estudios de microscopía electrónica mostraron que estas MNF's están formadas por polímeros anormales denominados filamentos helicoidales apareados (FHAs). Los FHA's consisten de dos estructuras en una doble hélice enrollada hacia la izquierda en su propio eje, con un diámetro aproximado de 8-20 nm. La distancia de cada punto de entrecruzamiento es de 80 nm (Goedert M. y cols., 1992). Cabe destacar que estos filamentos patológicos son altamente insolubles y distintos a los elementos del citoesqueleto. El principal componente estructural de estos filamentos es la proteína Tau.

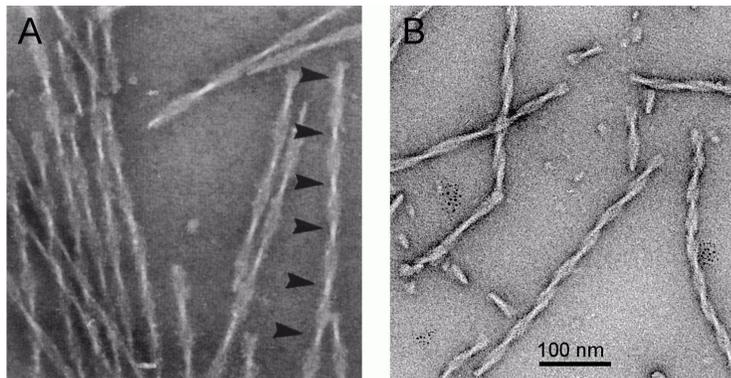


Figura 2. Filamentos Helicoidales Apareados. Micrografía electrónica. A) Aislados de un paciente con Alzheimer. B) Polímeros *in vitro* generados con la recombinante htau23.

La proteína Tau.

La proteína Tau es una proteína fisiológica que pertenece a la familia de las MAP's (Microtubule Associated Proteins) (Binder y cols., 1985). Su principal

función es asociarse a los microtúbulos y estabilizarlos. La unión de esta proteína depende de la presencia de cuatro regiones de repetidos en el extremo carboxilo terminal que tienen afinidad por la Tubulina. Los otros dominios importantes de la proteína son el extremo amino terminal, el cual es conocido como el dominio de proyección que le permite interactuar con otros elementos del citoesqueleto y con la membrana plasmática, así como la región rica en prolinas que contiene una gran cantidad de aminoácidos potencialmente susceptibles a ser fosforilados (Kar S. y cols., 2003; Amos LA., 2004; Bhaskar K. y cols., 2005; Dehmelt and Halpain, 2004).



Figura 3 . Esquema de la estructura de la proteína Tau. Representación esquemática de los dominios funcionales de la proteína Tau completa.

Cambios conformacionales de la proteína Tau.

La función de la proteína Tau de unirse y estabilizar los microtúbulos se ve regulada por fosforilaciones y desfosforilaciones específicas en varios residuos, que regulan la dinámica y la estabilidad normal de estas estructuras. Sin embargo, cuando la proteína Tau sufre una hiperfosforilación en la región de las prolinas y otros sitios por cinasas como: GSK3B, cdk5, p38, entre otras, se disminuye la afinidad de Tau por los microtúbulos (Baumann y cols., 1993; Pei y cols., 1999). Este desbalance produce una reducción en su afinidad por los microtúbulos y patológicamente se favorece su autoagregación en la forma de los FHA y MNFs en el cerebro de sujetos con la EA.

La hiperfosforilación en la proteína Tau es uno de los eventos patológicos iniciales y se ha propuesto que ésta podría promover el desarrollo de cambios conformacionales anormales en su estructura. En la EA se han descrito estos cambios conformacionales o plegamientos anormales de su extremo amino terminal, los cuales son identificados por los anticuerpos Alz-50 y MC1 que reconocen a epítopes discontinuos en la molécula, únicamente cuando ésta se encuentra plegada anormalmente (7-9 y 312-342, para ambos anticuerpos) (Gregory y cols., 1997). La importancia de estos cambios conformacionales radica en que se han asociado al deterioro cognitivo en el establecimiento inicial de la patología fibrilar de la EA.

Otras modificaciones que han llamado la atención son las truncaciones del extremo carboxilo terminal; una producida en el ácido aspártico-421 (Asp⁴²¹) por Caspasa-3, la cual participa activamente en el proceso de muerte celular programa o apoptosis y ocurre en etapas temprana de la enfermedad. La otra truncación se presenta en el ácido glutámico-391 (Glu³⁹¹) y ocurre cuando los síntomas de la enfermedad son muy evidentes (Su, J.H. y cols., 2001; Basurto-Islas y cols., 2008).

Algunos estudios iniciales demostraron que las truncaciones del extremo carboxilo terminal de Tau incrementan su capacidad de agregación *in vitro* en comparación con la proteína Tau completa (Abraha y cols., 2000; Gamblin y cols., 2003). Por lo tanto, estas modificaciones podrían facilitar la formación acelerada de FHAs y MNFs en la enfermedad. A nivel histopatológico se han integrado todos los cambios que sufre la proteína Tau en la EA y se propone un esquema de progresión de los cambios que sufre la proteína Tau durante su agregación en el desarrollo de la EA (Figura 4). En este esquema de progresión se ha encontrado que las truncaciones del carboxilo terminal ocurren de manera secuencial y ordenada, en asociación a cambios

conformacionales del extremo amino terminal (García Sierra y cols., 2003; Basurto-Islas y cols., 2008; Mondragón-Rodríguez y cols., 2009).

A pesar de que estos cambios descritos durante el proceso de agregación fibrilar de la proteína Tau y definen el avance de los síntomas de la demencia, existen otras evidencias que sugieren la aparición de agregados no fibrilares de la proteína Tau, en etapas muy tempranas de la enfermedad y en sólo cierto número de neuronas (García S. y cols., 2000). La proteína Tau en estos agregados no fibrilares presenta las mismas modificaciones postraduccionales ya mencionadas, incluyendo la truncación en el Asp⁴²¹ (Jarero-Basulto y cols., 2013). Se desconoce el significado patológico de estos agregados tempranos, pero se ha supuesto que podrían ser los encargados de alterar el funcionamiento de las neuronas, aún sin producir una muerte neuronal masiva y entonces correlacionar con los síntomas más incipientes de la enfermedad (Figura 5). Por esta razón es importante estudiar el mecanismo de toxicidad que podrían tener estas acumulaciones iniciales de la proteína Tau, para lo cual, el uso de animales transgénicos o sistemas de expresión de proteínas en células cultivada in vitro, podrían ser el mejor abordaje experimental.

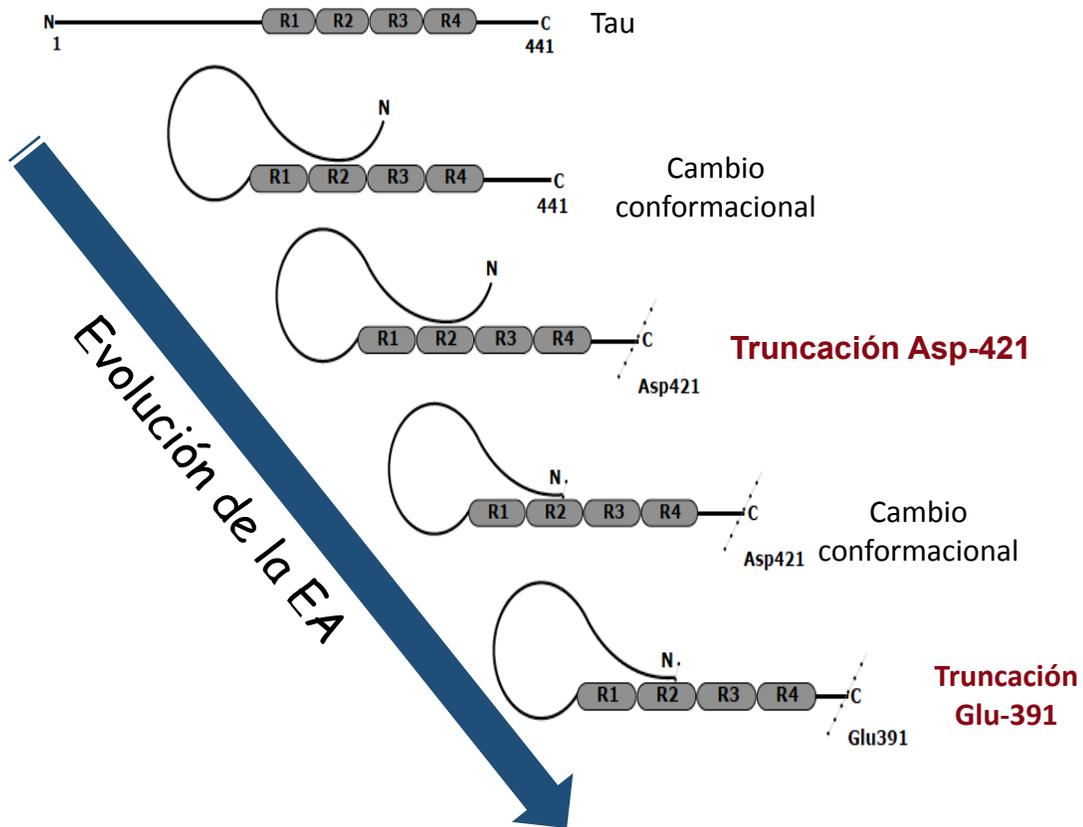


Figura 4. Modificaciones postraduccionales anormales de la proteína tau en la EA.

Diagrama de los cambios conformacionales y truncaciones de la proteína Tau durante su agregación en la forma de FHAs y MNFs (Garcia S. et al., 2003; Binder et al., 2005; Basurto I. et al., 2008; Mondragón R. et al., 2009).

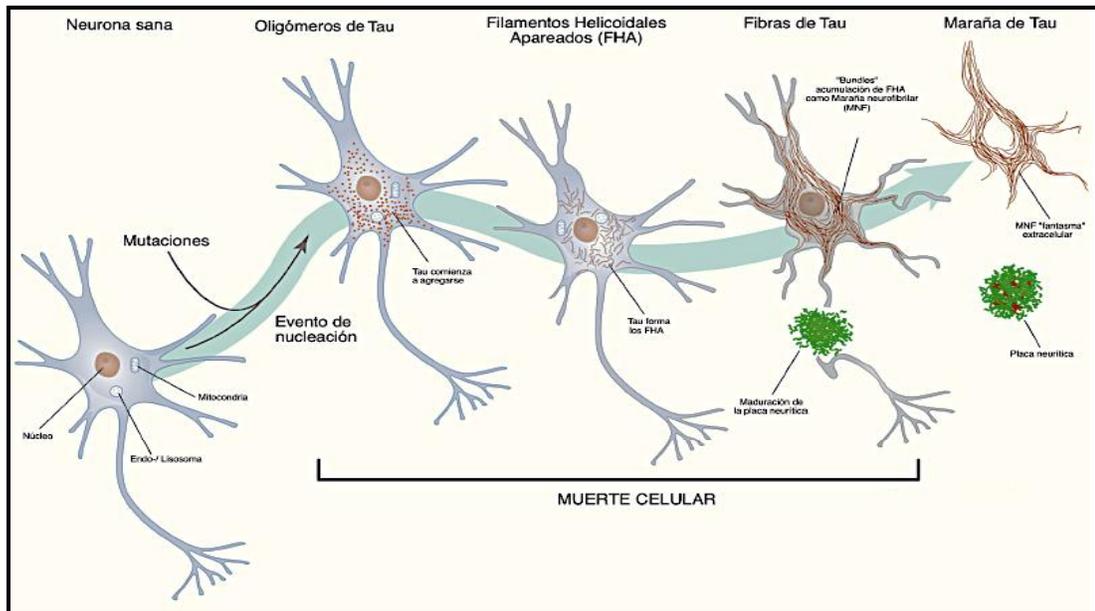


Figura 5. Acumulación temprana de agregados no fibrilares de la proteína Tau. Esquema general de la acumulación inicial de la proteína tau en estado difuso, que con el paso del tiempo se convierte en MNFs, las cuales llevan a la muerte neuronal.

Modelos celulares que expresan la proteína Tau.

Como en los pacientes con la EA no es posible estudiar los mecanismos moleculares de toxicidad celular *in vivo*, se han utilizado otras estrategias experimentales para su investigación como los modelos de animales transgénicos y los cultivos celulares que tratan de replicar los efectos que se producen en la enfermedad. Una de estas estrategias consiste en la sobreexpresión de la proteína Tau (con o sin las alteraciones ya mencionadas) en células neuronales cultivadas *in vitro*, para conocer los mecanismos de toxicidad que esta proteína pudiera tener en su forma no filamentosa. Esta sobreexpresión trataría de replicar el efecto de la acumulación masiva de Tau en el compartimento somático, como cuando esta proteína se redistribuye desde el axón hacia el compartimento somático en las neuronas de pacientes afectados con esta demencia.

Como ejemplo, la expresión de la proteína Tau completa en neuronas corticales inmortalizadas de rata, alteró la morfología y distribución subcelular de las mitocondrias, en comparación con las células control que mantenían una distribución perinuclear de este organelo (Pérez y cols., 2017). Este efecto se incrementó cuando se sobreexpresó a la proteína Tau truncada en el Asp⁴²¹ provocando una fragmentación severa de las mitocondrias.

Otro trabajo en donde se evaluaron nuevamente parámetros de toxicidad, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos. Cuando se sobreexpresó la proteína Tau, se produjo una redistribución del Retículo endoplásmico hacia la zona juxtannuclear, en comparación con las células control donde este componente se distribuyó de manera normal en todo el citoplasma (Yoshiyama y cols., 2003).

Previamente, nuestro grupo de trabajo estudio si la proteína Tau y sus variantes truncadas producen alguna alteración en diversos componentes citoplásmicos. Por ejemplo, en células de neuroblastoma SH-SY5Y se expresaron independientemente la proteína Tau completa y la variante truncada en el Asp⁴²¹, provocando una deformación extensiva del componente nuclear, alteración que correlacionó con el rearreglo anormal del citoesqueleto de Tubulina en forma de anillos corticales (Monroy-Ramírez y cols., 2013). Por otra parte, en células gliales C6, estas mismas variantes de Tau produjeron lobulaciones anormales en la membrana plasmática, las cuales no se asociaron con marcadores apoptóticos. Esto fue una acción específica de Tau y el mecanismo por el que se produjo este efecto se debió a una reestructuración de las redes citoesqueléticas de Tubulina y Actina, mediado por una vía de activación que involucró a la GTPasa de RhoA (Torrez- Cruz y cols., 2016).

Aparato de Golgi: estructura y función.

El aparato de Golgi (AG) es un organelo que forma parte del sistema de endomembranas y se presenta en muchos tipos celulares, incluidas las neuronas. Este organelo membranoso está estructurado en forma de pilas de cisternas paralelas que se encuentran en la proximidad del núcleo, cerca del centro organizador de microtúbulos (MOC), y es estabilizado por los microtúbulos derivados del MOC (Kreis TE. y cols., 1997). Abarca una serie de compartimentos ordenados, de forma aplanada, limitados por membranas que se dividen en caras cis, media y trans. La composición de estas cisternas le permite desarrollar sus funciones principales como son: modificaciones de los carbohidratos unidos a proteínas (glicosilación), participación en los procesos de secreción (transformación, almacenamiento y transferencia de glicoproteínas) y formación de vesículas (Yadav y cols., 2009).

La estructuración adecuada, el posicionamiento y la estabilidad del AG se controla por múltiples asociaciones entre las proteínas de unión a los microtúbulos, los microtúbulos y proteínas de la matriz del AG, como γ -tubulina y p115 (Radulescu AE. y cols., 2011), GM130 (Rivero S. y cols., 2009), CLASP (Miller PM. y cols., 2009) y GMAP-210 (Infante C. y cols., 1999).

Existen antecedentes que reportan que el AG podría estar alterado en las neuronas de pacientes con la EA. Por ejemplo, Gonatas K. y cols. 1996, observaron la fragmentación del AG en neuronas hipocampales del cerebro de algunos pacientes, datos que han sido corroborados más recientemente (Anton-Fernández y cols., 2016). Debido a la importancia funcional de este organelo, algunos investigadores estudiaron cuál es la relación patológica entre la acumulación anormal de la proteína Tau con alguna alteración funcional y estructural del AG. Para ello se ha utilizado como herramienta de estudio los cultivos de células neuronales y no neuronales, donde se han expresado la proteína Tau y/o algunas variantes patológicas de la misma.

Por ejemplo, en cultivos de astrocitos de rata, la expresión de las formas mutadas de Tau como P301L, V337M y R406W, incrementaron la fragmentación del AG en comparación con la producida por la proteína Tau normal. (Yoshiyama Y. y cols., 2003). Otros estudios en cultivos primarios de hipocampo, demostraron la fragmentación del AG al transfectar en estas neuronas la proteína Tau (Farah C. y cols., 2006). No obstante, la información presentada por estos grupos carece de representatividad, ya que se presentan pocos datos y la evidencia morfológica es de baja calidad. Por esta razón, en mi trabajo de maestría se estudió con mayor precisión este efecto y reportamos que la sobreexpresión de la proteína Tau completa en células de neuroblastoma SH-SY5Y produjo una fragmentación significativa del aparato del AG, y preliminarmente asociamos dicho efecto a una reestructuración del citoesqueleto de Tubulina. No obstante, aún es importante conocer más afondo y con precisión este efecto y caracterizar el mecanismo molecular mediante el cuál la proteína Tau lo produce. En este camino, es importante también conocer qué dominios de la proteína Tau podrían estar involucrados en el establecimiento de esta alteración.

Hipótesis

La dispersión del AG producida por la sobreexpresión de la proteína Tau podría depender de la participación de ciertos dominios de esta molécula reflejándose en una remodelación específica del citoesqueleto de Tubulina.

Objetivo General

Caracterizar qué dominios de la proteína Tau podrían estar involucrados en la dispersión del AG y evaluar su asociación con el citoesqueleto de Tubulina en células de neuroblastoma cultivadas *in vitro*.

Objetivos particulares

1. Evaluar de manera cuantitativa el grado de colocalización entre la proteína Tau completa y los anillos anormales de microtúbulos.
2. Determinar qué dominios de la proteína Tau producen la fragmentación del aparato de Golgi y su asociación con la formación de los anillos de Tubulina.
3. Determinar el nivel de estabilidad de los anillos de Tubulina generados por la proteína Tau.
4. Evaluar el efecto funcional de la dispersión del AG en las células que expresan a la proteína Tau.
5. Investigar si la remodelación del citoesqueleto de Actina altera la estructuración del AG en células SH-SY5Y.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo de células SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y derivadas de neuroblastoma humano se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12) (Invitrogen-GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% (Invitrogen-GIBCO), 100µl/ml de penicilina y estreptomina (GIBCO) y 1µl/ml de Anfotericina B (SIGMA-ALDRICH). Las células se incubaron en una atmosfera con 5% de CO₂. Se tomó una alícuota para determinar la densidad celular en una cámara de Neubauer y los subcultivos se resemebraron en medio fresco a la densidad celular requerida; tanto para mantener un stock de reserva, como para utilizarse en los distintos experimentos.

Construcción de los plásmidos.

En este trabajo se utilizaron algunos plásmidos que se construyeron previamente en nuestro laboratorio, mientras que otro nuevo grupo de plásmidos de interés se construyeron específicamente para la presente investigación. La construcción de los plásmidos que codifican para la proteína Tau completa (Tau441), la variante truncaada en el Asp⁴²¹(Tau421) y la proteína Tau441 completa portando una etiqueta de GFP (Tau-GFP) se describieron con detalle en la tesis del Dr. Basurto-Islas (G. Basurto-Islas, Tesis de Doctorado, 2008). En el presente trabajo se realizaron construcciones adicionales correspondiendo a las variantes truncadas en su ácido glutámico³⁹¹ (Tau391), truncaada en su amino terminal (Tau150-441) y truncaada en ambos extremos (Tau123-391). Los primers utilizados para generar los plásmidos que codificaron para estas nuevas construcciones se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Primers utilizados para la síntesis de plásmidos que codifican para diversas especies truncadas de la proteína Tau

Formas truncadas de Tau	Sentido	Antisentido
Tau1-391	5'- CGGCTCGAGATGGCTGAGCCCCGCCAGGAG- 3'	5'- CCGGAATTCCGGTTACTCCGCCCCGTGGTC- 3'
Tau150-441	5'- CGGCTCGAGATGAAGATCGCCACACCGCGG- 3'	5'- CCGGAATTCTTACAAACCCTGCTTGGCCAG- 3'
Tau123-391	5'-CGGCTCGAGATGACCCAAGCTCGCATGGTC- 3'	5'- CCGGAATTCCGGTTACTCCGCCCCGTGGTC- 3'

Los plásmidos se obtuvieron como producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como templado el plásmido de expresión que contiene la secuencia completa de la proteína Tau. Con cada par de oligos se realizó una clonación sitio dirigida de los fragmentos de interés en el vector de expresión pcDNA 3.1 Zeo (-) (Invitrogene). Cada par de oligos contenía en sus extremos 5' y 3' los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *XhoI* (New England, BioLabs).

Para la mezcla de clonación de la variante **Tau150-441** se usó 1µl de DNA molde (Tau441), 1 µl del oligo 150-441(5 P´) a una concentración de 1 µM, 1 µl del oligo X-441 (3P´) a una concentración de 1 µM, 1 µl de Taq polimerasa, 5 µl de Buffer ThermoPol a 10X, 2.5 µl de la mezcla de dNTPs (a una concentración de 2.5 µM) y 38.5 µl de agua grado biología molecular para tener un volumen final de 50 µl.

Para la mezcla de clonación de la variante **Tau123-391** se usó 1µl de DNA molde (Tau441), 1 µl del oligo 123-441(5 P´) a una concentración de 1 µM, 1 µl del oligo X-441 (3P´) a una concentración de 1 µM, 1 µl de Taq polimerasa, 5 µl de Buffer ThermoPol a 10X, 2.5 µl de la mezcla de dNTPs (a una concentración de 2.5 µM) y 38.5 µl de agua grado biología molecular para tener un volumen final de 50 µl.

Ambas mezclas se amplificaron en las siguientes condiciones de PCR: 94°C por 5 minutos (30 ciclos), 94°C por 30 segundos (Desnaturalización), 52°C por 30 segundos (Alineación), 72°C por 90 segundos (Elongación), 72°C por 5 minutos, y al final se mantuvieron a 4°C. Posteriormente estas mezclas se corrieron en un gel de agarosa al 1 % con 1 µl del colorante GelRed para después purificar los productos de PCR con el kit Gene clean II (MP Biomedicals).

Una vez purificados estos productos (Tau150-441 y Tau123-391) se procedió a digerirlos con las enzimas de restricción correspondientes. El vector de expresión pcDNA 3.1 Zeo (-) también fue digerido con 2 µl de las mismas enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (New England, BioLabs), 0.5 µl de BSA, 2 µl de Buffer EcoRI y agua grado biología molecular. Esta mezcla de digestión se incubó a 37°C durante 3 horas y posteriormente estas digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1 % con 1 µl del colorante GelRed, para después purificar los productos liberados con el kit Gene clean II (MP Biomedicals).

Finalmente se realizó la ligación de los insertos que contienen la secuencia de las construcciones Tau150-441 y Tau123-391 con el vector de expresión pcDNA 3.1 Zeo (-), utilizando una relación de 1:3 de vector-inserto, adicionando 1 µl de ligasa T4, 10 µl de Buffer de ligasa (2x) y se aforó con agua grado biología molecular a un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó a 18 °C toda la noche y la mezcla de ligación se utilizó para transformar un cultivo de bacterias competentes de la cepa C2987 *E. coli* DH5α, por medio de choque térmico a 42°C. De la mezcla que contiene las bacterias competentes y los productos de ligación se tomaron 200 µl y se plaqueó en cajas Petri con medio LB suplementado con ampicilina para la selección de las colonias transformadas.

Extracción y purificación de los plásmidos.

De las bacterias transformadas con los plásmidos de interés, se seleccionaron algunas colonias aisladas y se transfirieron a tubos de ensayos que contenían 10 ml de medio LB suplementado con el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, para posteriormente incubarse a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante toda la noche. Consecutivamente se transfirió 1 ml de cada cultivo a un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 4,000 rpm durante 1 minuto. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de solución de resuspensión a la pastilla remanente. Se resuspendió con la adición de otros 200 µl de Buffer de lisis y se mezcló 6 veces invirtiendo el tubo, para posteriormente dejarlo reposar en frío durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 350 µl de buffer de neutralización y los tubos nuevamente se invirtieron 6 veces para centrifugarse inmediatamente a 14,000 rpm por 10 minutos. Las columnas del kit NA150-1KT de miniprep GenElute HP Plasmid (Sigma Aldrich) se activaron con la adición de 500 µl de solución de activación (incluida en el kit) y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, los lisados bacterianos preparados previamente se transfirieron a las columnas y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Se volvió a resuspender en 500 µl de solución de lavado 1 y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se dio un último lavado con 750 µl de la misma solución y se centrifugaron a 14,000 rpm por 1 minuto. Finalmente, la columna se eluyó con 50 µl de agua grado biología molecular y se verificó la presencia de los insertos deseados en el eluido, a través de un gel de agarosa preparado al 1%.

Transfección transitoria con un plásmido.

Las células SH-SY5Y se cultivaron en cubreobjetos de vidrio (previamente recubiertos durante 24 horas con una capa de colágena tipo-I derivada de piel de ternera (0.01 mg/ml; SIGMA-ALDRICH)) los cuales se colocaron en una caja de 24 pozos y se incubaron a 37 °C. Una vez que las células llegaron a una confluencia aproximada a 70-80 %, se transfectaron de manera independiente con los plásmidos que codifican para la expresión de Tau-GFP y las diferentes variantes de Tau sin etiqueta fluorescente (Tau441, Tau421, Tau391, Tau150-441 y Tau123-391). Para la transfección se preparó de manera independiente la mezcla de DNA (0.5 µg) y 1 de Lipofectamina 2000 (1 µg) (Invitrogen) en 100 µl de medio Optimem (Invitrogen) a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se mezcló el DNA con la Lipofectamina y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Una vez terminado el tiempo de incubación, esta mezcla se agregó a las células previamente incubadas con 200 µl de Optimem, y se mantuvieron por un período de 6 horas a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo se retiró la mezcla y se adicionó medio fresco DMEM-F12 suplementado con 5 % de SFB, dejando incubar las células por 48 horas a 37°C, para posteriormente fijarse y analizarse por inmunofluorescencia.

Transfección transitoria con dos plásmidos.

Para estos experimentos se utilizó el plásmido que codifica para Tau-GFP y un plásmido con información para la expresión de la proteína Galactosiltransferasa del AG, asociada a la bandera fluorescente Turquesa2. Dicho plásmido es denominado Turquesa2-Golgi. Ambos plásmidos se transfectaron simultáneamente a la misma concentración (0.3 µg cada uno). Para la transfección se preparó de manera independiente la mezcla de DNA (0.3 µg de cada plásmido) y Lipofectamina 2000 (1 µg) (Invitrogen) en 100 µl de medio Optimem (Invitrogen) a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se

mezcló el DNA con la Lipofectamina y se incubaron por 20 minutos a TA. Una vez terminado el tiempo de incubación, esta mezcla se agregó a las células previamente incubadas con 200 µl de Optimen, y se mantuvieron por un período de 6 horas a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo se retiró la mezcla y se adicionó medio fresco DMEM-F12 suplementado con 5 % de SFB, dejando incubar las células por 48 horas a 37°C, para posteriormente fijarse y analizarse por inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia.

Para realizar el análisis morfológico por inmunofluorescencia, las células que se transfectaron con los plásmidos durante 48 horas se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS 1X a TA durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X para permeabilizarse con PBS-Tritón al 1% durante 10 minutos en agitación constante. Se realizó un lavado final con PBS 1X. Las células se bloquearon por 1 hora con solución de bloqueo (gelatina 0.5 %, SFB 1.5 % en PBS 1X) a TA, se lavaron 3 veces con PBS 1X, y se incubaron por 1 hora con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2). Una vez transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos cada uno (en agitación constante), para posteriormente incubar las células con los respectivos anticuerpos secundarios (acoplados a distintos fluorocromos) diluidos en PBS 1X por un período de 1 hora y en oscuridad (la dilución usada en todos los secundarios fue de 1:200). Se lavaron las células 3 veces con PBS 1X (5 minutos cada uno) y por último se tiñeron durante dos minutos con Hoechst-33258, un colorante fluorescente con afinidad por el componente nuclear, a una dilución de 1:2000 en PBS 1X. Se lavaron 2 veces con PBS 1X y se montaron en los portaobjetos con Vectashield neutro (VECTOR H-1000) para ser observadas al microscopio.

Tratamientos con drogas que desorganizan el citoesqueleto de Tubulina.

Nocodazol.

Con este agente despolimerizante del citoesqueleto de Tubulina se realizaron varios procedimientos:

1) Un grupo de células sin transfectar se incubaron con 5 μ M de Nocodazol durante 1 hora en medio DMEM-F12 libre de suero, e inmediatamente transcurrido ese tiempo se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante 15 minutos para ser procesadas posteriormente bajo la técnica de inmunofluorescencia.

2) Se realizó un experimento simultaneo bajo las mismas condiciones, pero después de la incubación con Nocodazol las células se lavaron con medio fresco DMEM-F12 suplementado con el 5 % de SFB previamente a su fijación con PFA al 4% en PBS.

3) Se transfectó otro grupo de células con el plásmido codificante para la expresión de Tau-GFP en los tiempos ya descritos, para incubarse posteriormente con 5 μ M de Nocodazol por 1 hora en medio DMEM-F12 libre de suero. Al final de tratamiento y sin ser lavadas, las células se fijaron con PFA al 4 % en PBS.

En los tres tipos de condiciones, las células fijadas se permeabilizaron con PBS-Tritón al 1% y se bloquearon con la solución de gelatina ya descrita previamente (siguiendo las condiciones previamente mencionadas). Una vez terminado este procedimiento, las células se incubaron 1 hora con el anticuerpo monoclonal anti α -tubulina en una dilución de 1:500. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG (gama- específico) de ratón acoplado a TRICT, en una

dilución de 1:200 a TA y en oscuridad. Las células se montaron finalmente en portaobjetos utilizando medio anti-apagamiento Vectashield neutro.

Taxol.

Este agente fue utilizado como una estrategia para producir mayor estabilidad y un efecto de empaquetamiento artificial de los microtúbulos. Las dos condiciones utilizadas fueron las siguientes:

1) Para este tratamiento, las células sin transfectar se incubaron con 10 μM de Taxol durante 4 horas en medio DMEM-F12 libre de suero, y sin lavarse, éstas se fijaron inmediatamente con PFA al 4 % en PBS durante 15 minutos.

2) En otra condición, las células se incubaron previamente con Taxol 10 μM durante 4 horas, se lavó la droga y después se transfectaron con el plásmido codificante para la expresión de Tau-GFP. Transcurridas 44 horas de la transfección las células se fijaron con PFA al 4 % en PBS.

En ambas condiciones, como último procedimiento, las células se procesaron por inmunofluorescencia para detectar el citoesqueleto de Tubulina tal y como fue descrito en el apartado anterior.

Obtención de extractos totales de proteínas y Western blotting (WB).

Para la obtención de extractos totales de las células SH-SY5Y transfectadas y no transfectadas, éstas se sembraron en cajas de 6 pozos para poder obtener material suficiente. Para la transfección se realizaron algunos ajustes de concentración y volúmenes: en cuanto a la concentración del plásmido y de Lipofectamina 2000 éstas fueron 1 μg y 2 μg respectivamente, ambas condiciones se incubaron en 250 μl de medio Optimem (Invitrogen) a 37°C durante 5 minutos para posteriormente continuar con lo ya descrito anteriormente.

Después de 48 de transfección se retiró el medio y se realizó un lavado rápido con PBS 1X con PMSF al 1 %. Posteriormente se adicionó PBS 1X con PMSF (750 μ l), se incubó por 10 minutos en hielo y las células se desprendieron de la superficie de la caja de cultivo para empastillarse por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos. La lisis celular se llevó a cabo mediante la resuspensión de la pastilla en buffer para ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA: Tritón X-100%, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EDTA estos últimos a pH 8.0), complementado con PMSF (1 mM) y Complete (1X) como inhibidores de proteasas. Se mantuvieron en agitación constante a 4°C por 2 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes para cuantificar la concentración de proteínas totales por el método de miniBradford de BIO-RAD (Bradford, 1976). Se tomaron 30 μ g de proteína de cada muestra, la cual se diluyó con un volumen igual de buffer de muestra 2X (10% SDS, 20% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 5% beta-mercaptoetanol, 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8). Dicha mezcla se desnaturalizó por 5 minutos a 95°C y la separación electroforética de las muestras se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% durante 2 horas aproximadamente (voltaje constante de 100 V). Terminada la electroforesis, las proteínas se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa bajo una corriente de 250 mA durante 2 horas. Para verificar la eficiencia de la transferencia de las proteínas, la membrana se tiñó de forma reversible con el colorante Rojo Ponceau y se lavó con PBS para eliminar el colorante. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche semi-descremada al 10 % en PBS 1X- 0.1% Tween 20 (PBS 1X-Tw), para ser incubarse con el anticuerpo primario correspondiente por una hora a TA. Terminado este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X-Tw para incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), (dilución 1:10 000) por una hora a TA. Finalmente, la membrana

se lavó 3 veces con PBS 1X-Tw y se reveló con la reacción de quimioluminiscencia por 3 minutos en oscuridad utilizando Western Ligthtining Plus-ECL (Perkin Elmer Inc., MA, USA).

Ensayo de viabilidad: MTT.

La viabilidad celular se analizó mediante el ensayo de MTT (Thiazolyl blue [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Sigma-Aldrich). Esta técnica colorimétrica determina la actividad metabólica de las células saludables para producir cristales de formazán de color violeta. Para esto, las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 24 pozos (20,000 células por pozo) por 48 horas para tener la mayor cantidad de células posibles. Después de este tiempo, se transfectaron con los plásmidos de interés y 48 horas postransfección las células se incubaron con 100 μ l de MTT (0.5 mg/ml) en medio de cultivo por 3 h a 37°C. El medio conteniendo MTT fue removido y las células se incubaron con 330 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los agregados de formazán. Se colectaron 100 μ l de la resuspensión y se transfirieron a una placa de 96 pozos. La intensidad de la señal se analizó por espectrofotometría (570 nm) en un lector de placas de ELISA (iMark, BioRad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA).

Determinación del contenido de carbohidratos.

El porcentaje de carbohidratos contenido en las muestras se analizó por medio del kit de Estimación de Glicoproteínas Carbohidratadas (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology). Las células SH-SY5Y se transfectaron con los diversos plásmidos por 48 horas, se obtuvieron extractos celulares disolviendo en el Buffer de ensayo de Glicoproteínas y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de miniBradford de BIO-RAD. Posteriormente, en diferentes pozos de una microplaca se colocaron 50 μ l de las muestras problema y muestras estándar (controles positivos y negativos que permitirán

la creación de una curva de referencia). Como blanco se utilizaron 50 µl del Buffer de ensayo de Glicoproteínas. A cada pozo se le añadieron 25 µl de la solución de meta-periodato de sodio, se mezcló durante 30 segundos e inmediatamente se cubrió y se incubó por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 150 µl del Reactivo de Detección de Glicoproteínas a cada pozo y se mezcló por 30 segundos. En esta condición se incubó durante 1 hora a TA. Por último, se evaluó la absorbancia de las muestras problema a 550 nm y las lecturas se compararon con las obtenidas por las respectivas muestras de referencia. La conclusión de cambios en los niveles de carbohidratos totales se definió por el criterio de disminución en un 5 % del contenido de carbohidratos, de acuerdo a las indicaciones del kit de estimación de Glicoproteínas.

Análisis y cuantificación de compactación del AG.

La cuantificación del grado de dispersión del AG se analizó mediante el programa ImageJ. Para ello, en las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia se definió el AG como una región de interés (ROI) en el campo a 32 bit. El área representó la totalidad de píxeles de la estructura compacta del AG y el perímetro representó la sumatoria de los fragmentos del AG distribuidos en todo el citoplasma. Con estos datos se obtuvo el índice de circularidad o compactación definida por el algoritmo: $4\pi \text{Área} / \Sigma \text{Perímetro}^2$ (Bard et al., 2003; Zilberman Y. et al., 2011). El producto de la intensidad y el número de píxeles para cada célula se estableció en 2 valores (0 y 1); esto es, cada píxel por debajo del fondo se determinó como 0 y cada píxel superior al fondo se determinó como 1.

Tabla 2. Anticuerpos y marcadores fluorescentes empleados

Anticuerpo	Epítotope	Clase hospedera	Procedimiento	Dilución	Referencia
Tau-5	210-230**	Ratón-IgG	IC, WB	1:500, 1:10,000	Dr. L.I. Binder
Tau-13	9-18**	Ratón-IgG	WB	1:10,000	Dr. L.I Binder
Tau 46.1	428-441**	Ratón-IgG	WB	1:10,000	Dr. V. Lee
a-Tubulina	a-Tubulina	Ratón-IgG	IC	1:500	Santa Cruz Biotechnology
a-Tubulina acetilada	Lisina 40	Conejo-IgG	IC,WB	1:200, 1:5,000	Cell Signaling
GAPDH	GAPDH	Ratón-IgG	WB	1:10,000	Millipore
RCAS 1	Glicina 147	Conejo-IgG	IC	1:500	Cell Signaling
Tau policlonal	Región central	Conejo-IgG	WB	1:10,000	GeneTex
GFP policlonal	Región interna de GFP	Cabra-IgG	WB	1:10,000	Santa Cruz Biotechnology
Golgina-97 (CDF4)	Golgina 97 de humano	Ratón-IgG	WB	1:1,000	Molecular probes
Organelo	Marcador Fluorescente	Excitación/ emisión (nm)	Procedimiento	Dilución	Referencia
Núcleo	Hoechst-33258	350/461	FL	1:2,000	Invitrogene molecular probes
Citoesqueleto de actina filamentosa	Faloidina Rodamina	540/565	FL	1:500	Invitrogene

IC, Inmunocitoquímica; WB, Western blot; FL, Fluorescencia **Residuos basados en la isoforma más larga Tau humana (2N4R)

RESULTADOS

1. Alteración estructural de citoesqueleto de Tubulina por la expresión de la proteína Tau en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó alteraciones en la arquitectura nuclear y en la membrana plasmática producidas por la expresión de la proteína tau completa en diversos modelos celulares (Hugo R. y cols., 2013; Torres C. y cols., 2016). Dichas alteraciones están asociadas con la formación de anillos pericéntricos de microtúbulos del citoesqueleto de tubulina.

En el presente trabajo se profundizó más en el efecto patológico y las propiedades de estas estructuras anormales en forma de anillos, así como se evaluó el efecto que tienen sobre la estructuración del AG, un componente membranoso de importancia para el funcionamiento normal de las células. Puesto que dichos anillos de microtúbulos son producidos por la acumulación anormal de la proteína Tau completa en el citoplasma, resultó relevante conocer qué dominios de esta proteína participan en la formación de estas estructuras anormales.

En esta investigación inicialmente se corroboró la formación de estos anillos de microtúbulos al expresar transitoriamente a la proteína Tau en células de neuroblastoma SH-SY5Y en estado no diferenciado, tal y como se demuestra en la Figura 6 y 7. Se utilizaron dos plásmidos para expresar a la proteína Tau completa, uno de ellos permitió observar la expresión de la proteína Tau de 441 aminoácidos, y otro que facilitó la observación de la misma proteína Tau de 441 aminoácidos, pero marcada con la etiqueta fluorescente GFP (Fig. 6 y 7).

En la Figura 5 se muestra el análisis de corrimiento electroforético de los extractos totales de células transfectadas y no transfectadas con los plásmidos ya mencionados. El análisis por WB muestra la inmunodetección de las bandas que corresponden a los pesos esperados para la proteína Tau-GFP y Tau441, utilizando el anticuerpo monoclonal Tau 5 y el policlonal anti-Tau, que reconocen una región común en las distintas variantes de la proteína Tau (epítopes de los aminoácidos 210-230 y 197-244 en la molécula, respectivamente). Es importante hacer notar que, bajo la condición de no diferenciación de las células, se demuestra la ausencia de la proteína Tau endógena en las células control sin transfectar, y en aquellas transfectadas con el vector vacío o que expresaron únicamente a la etiqueta GFP. Para demostrar la especificidad de la expresión de los plásmidos, también se utilizó un anticuerpo que reconoce a la proteína GFP, encontrando bandas específicas en las células que expresaron a esta etiqueta fluorescente, y en aquellas células que hicieron lo propio con la proteína Tau-GFP. Como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína Tubulina, observándose el mismo nivel de expresión de esta proteína en todas las condiciones ensayadas.

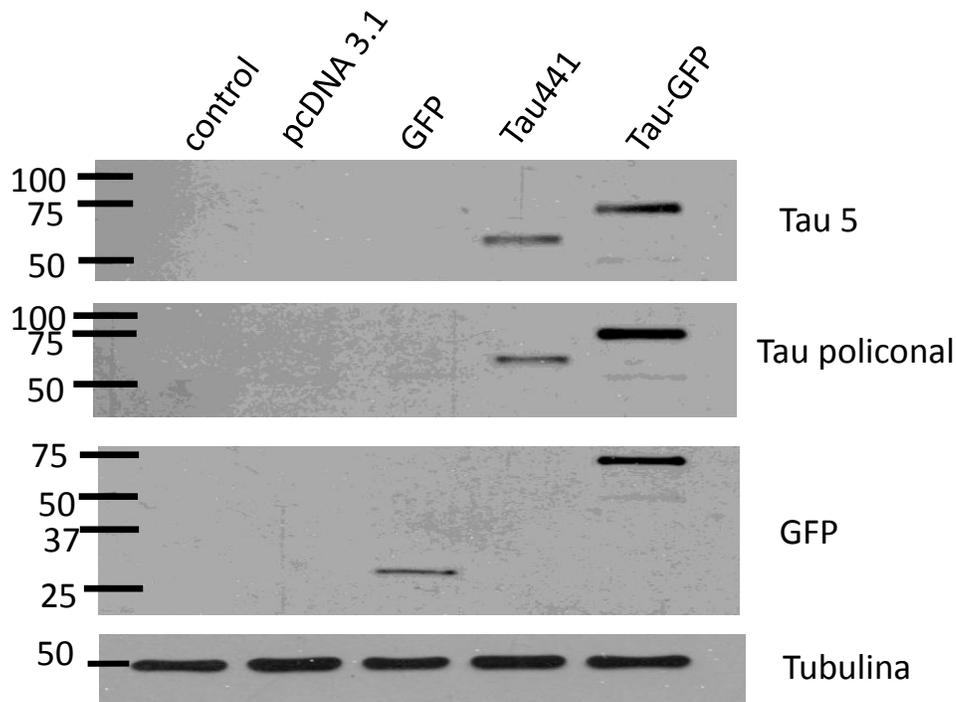


Figura 5. Expresión de la proteína Tau-GFP y Tau441 en células SH-SY5Y. Western blot representativo de los extractos totales de células transfectadas y no transfectadas. Los anticuerpos Tau 5 y conejo policlonal anti-Tau reconocen las dos variantes de tau. Como grupos control se utilizaron células sin transfectar y células transfectadas con el vector vacío, donde claramente no hay detección de Tau endógena. Como control de carga se presenta la expresión endógena de Tubulina.

Cuando estas células se procesaron para inmunofluorescencia y microscopía confocal, se confirmó el cambio en la organización de los microtúbulos observado previamente, constituyendo los anillos corticales y pericéntricos (flechas), bajo la expresión de la proteína Tau completa. Esta proteína fue identificada con el anticuerpo policlonal anti-Tau y los microtúbulos se visualizaron por el inmunomarcaje con el anticuerpo monoclonal anti α -Tubulina (Figura 6). En las células que no expresaron a Tau, la morfología del citoesqueleto de Tubulina permaneció intacta (asterisco).

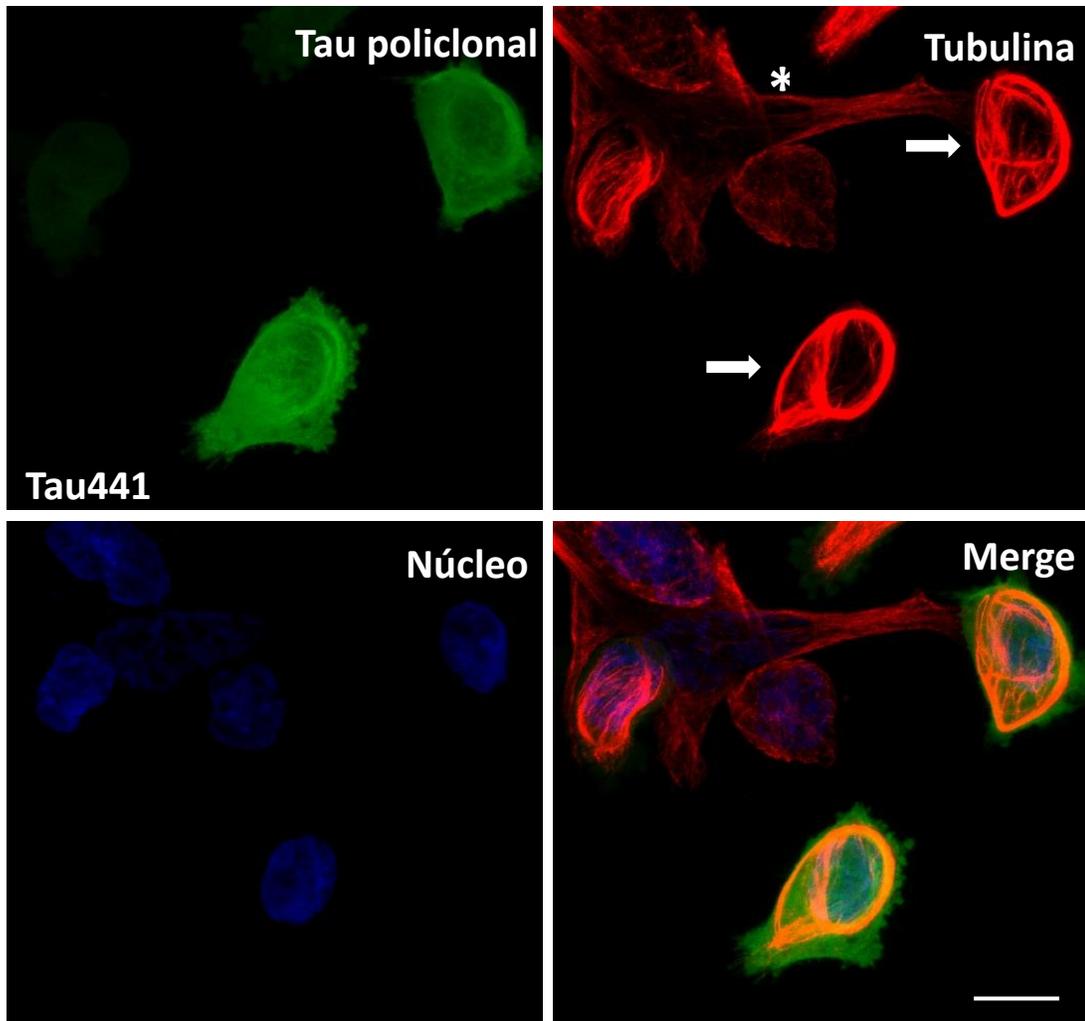


Figura 6. La expresión de la proteína Tau441 promueve la formación de paquetes de microtúbulos en forma de anillos. Las células transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína Tau441 fueron fijadas con glutaraldehído al 4 % y procesadas para inmunomarcaje doble utilizando el anticuerpo policlonal anti-Tau (canal verde) y el anticuerpo monoclonal α -Tubulina (rojo). Se puede apreciar un claro empaquetamiento de los microtúbulos en forma de anillos en aquellas células que expresaron a Tau441 (flechas). Las células no transfectadas mantienen su arreglo normal de microtúbulos radiales (asterisco). La contratinción azul observada en el canal merge corresponde a los núcleos teñidos con el colorante Hoescht-33258. Barra de 20 μ m.

Este experimento se repitió tratando de limitar el uso de anticuerpos. Para ello, otro grupo de células se transfectaron con el plásmido que codifica para Tau-GFP (una variante de la proteína Tau completa de 441 aminoácidos, con una etiqueta de GFP en el amino terminal), observándose una estrecha colocalización entre los anillos de microtúbulos (flecha, canal rojo) y la Tau-

GFP asociada a estas estructuras (flecha, canal verde). El citoesqueleto de Tubulina en las células no transfectadas, permaneció sin cambios en su estructuración (asteriscos). En el canal merge, las estructuras en anillo despliegan un pseudocolor amarillo, lo que es indicativo de una estrecha asociación entre ambas proteínas (colocalización), interpretado claro, a nivel de la resolución de la microscopía óptica.

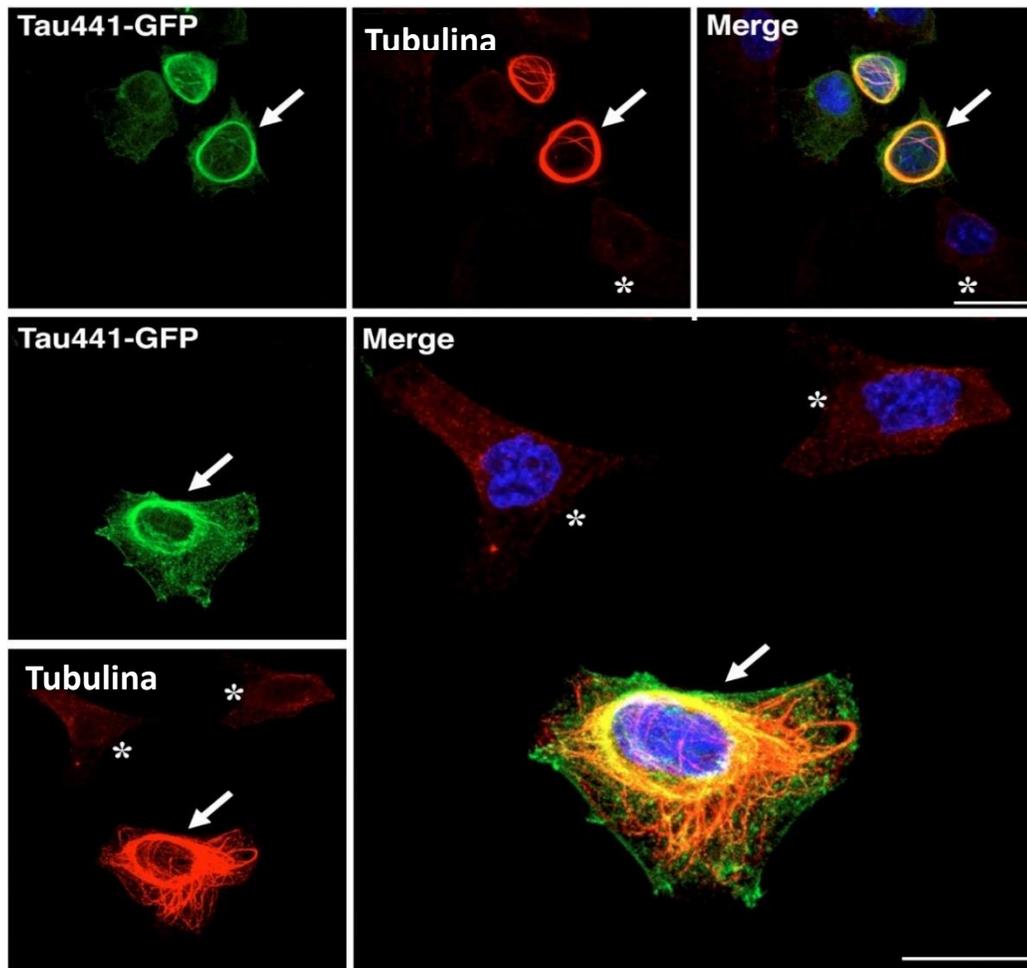


Figura 7. La expresión de la proteína Tau441GFP promueve la formación de paquetes de microtúbulos en forma de anillos. Las células transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína Tau-GFP se fijaron con glutaraldehído al 4 % y se procesaron para inmunomarcaje sencillo utilizando el anticuerpo monoclonal α -Tubulina (rojo). Se puede apreciar un claro empaquetamiento de los microtúbulos en forma de anillos producidos por la expresión de Tau-GFP (flechas). Las células no transfectadas mantienen su arreglo normal de microtúbulos radiales (asteriscos). La contratinción azul observada en el canal merge corresponde a los núcleos teñidos con el colorante Hoescht-33258. Barra de 20 μ m.

2. Determinación cuantitativa del nivel de colocación entre Tau-GFP y Tubulina en los anillos anormales de microtúbulos.

Para precisar la asociación estrecha entre Tau-GFP y Tubulina en las estructuras en anillo de microtúbulos, se analizó cuantitativamente el grado de colocación entre estas proteínas, utilizando la herramienta de análisis de este parámetro incluida en el software del microscopio confocal. En la Figura 4 se presenta una imagen representativa, donde el doble marcaje Tau-GFP-Tubulina en los anillos de microtúbulos (flechas) se presenta en pseudocolor amarillo en el canal merge. Con el software incluido, las células que presentan estos anillos son seleccionadas y la estricta colocación se extrae de la imagen a través de un análisis de píxeles, lo que genera una imagen monocromática que representa la colocación más específica. Dicha selección viene acompañada de un análisis de correlación de Pearson, que determina la significancia de la asociación ($p= 0.75$).

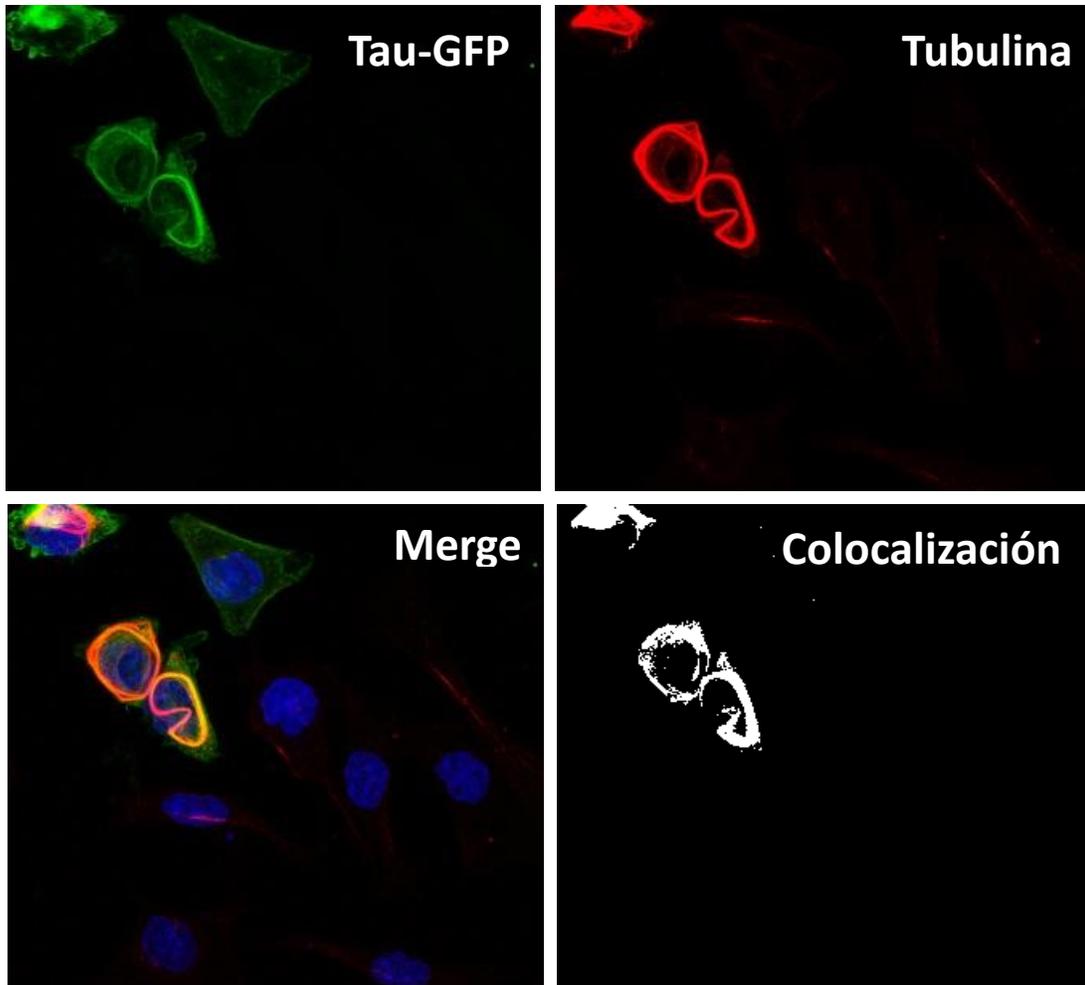


Figura 8. Análisis de colocalización de Tau-GFP y Tubulina. Las imágenes de microscopía confocal se analizaron cuantitativamente usando el software LAS-X (leica SP8 TCS-SP8). La señal de colocalización observada en pseudocolor amarillo en el canal merge, es extraída como región de interés y analizada para su estricta colocalización de pixels. Dicha asociación es proyectada como una imagen monocromática, la cual es evaluada por correlación (r) de Pearson para determinar su significancia ($p=0.7517$). Barra de 20 μm .

3. Efecto de la expresión de Cherry-Tubulina sobre la estructuración normal de la red de microtúbulos en células de neuroblastoma.

Para descartar que la formación de anillos de microtúbulos fuera el resultado de un incremento en la expresión de Tubulina, como consecuencia de la abundancia de Tau citoplásmica, un grupo de células se transfectó únicamente con el plásmido Cherry-Tubulina y se visualizó el citoesqueleto total de Tubulina por la inmunodetección del anticuerpo monoclonal α -Tubulina (canal

verde). La figura 9 muestra que bajo esta condición las células que expresaron una mayor cantidad de Tubulina (Tubulina endógena + Cherry Tubulina) no presentaron alguna alteración en la red microtúbulos (flechas), sin observarse alguna estructura en forma de anillos, ni un empaquetamiento anormal de este componente. Este resultado nos indicó que la formación de anillos anormales de microtúbulos es un cambio estructural en la Tubulina producido específicamente por la abundancia de Tau en el soma celular.

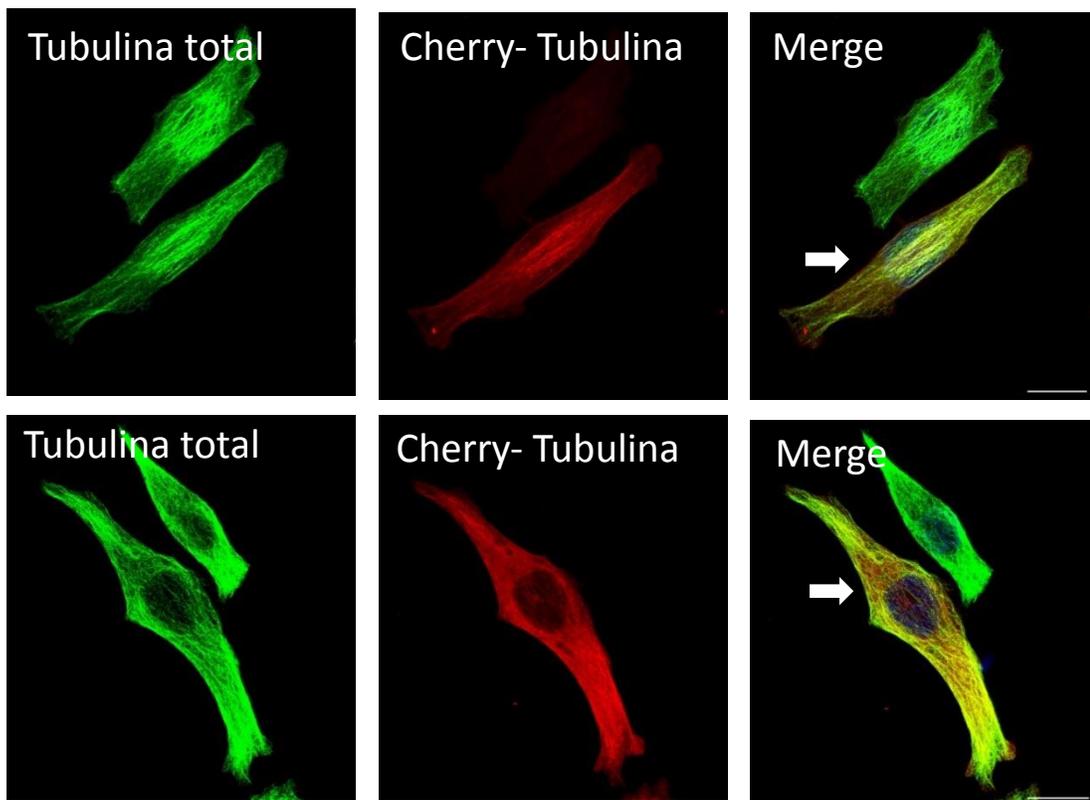


Figura 9. La expresión de Cherry-Tubulina en células SH-SY5Y no promueve la formación de anillos de microtúbulos. Se transfectaron células de neuroblastoma con un plásmido que permite la expresión de Cherry-Tubulina. Después de 48 horas de transfección las células se evaluaron por inmunofluorescencia hacia Tubulina total con el anticuerpo α -Tubulina (canal verde). Se puede apreciar que no se presentó un cambio en la estructuración del citoesqueleto de Tubulina y no se observaron estructuras en anillo de microtúbulos en aquellas células expresando la Tubulina exógena (flechas). La contratinción azul observada en el canal merge corresponde a los núcleos teñidos con el colorante Hoescht-33258. Barra de 20 μ m.

4. Expresión de galactosiltransferasa (Turquesa2-Golgi) para la visualización del efecto producido por la proteína Tau sobre la estructuración del AG.

Considerando que durante en mi trabajo de Maestría se evidenció una alteración en la estructuración del AG cuando la proteína Tau se expresó en las mismas células de origen neuronal, en el presente trabajo se analizó este efecto y se amplió su caracterización. Para ello, la visualización del AG se realizó mediante la transfección del plásmido Turquesa2-Golgi, que codifica para la expresión de la proteína galactosiltransferasa (un componente importante de este organelo), asociada a Turquesa-2, una etiqueta fluorescente que emite en el pico de 474 nm. En la Figura 10 se observa la expresión de Turquesa2-Golgi, con la cual se aprecia la estructura compacta y normal del AG, localizándose en las inmediaciones del componente nuclear (flechas). Las imágenes se acompañan de la inmunolocalización para Tubulina (canal rojo) y de la tinción nuclear con Hoechst 33258 (canal azul). El arreglo de los microtúbulos no cambia bajo la expresión de Turquesa-2 y las células mantienen su morfología normal.

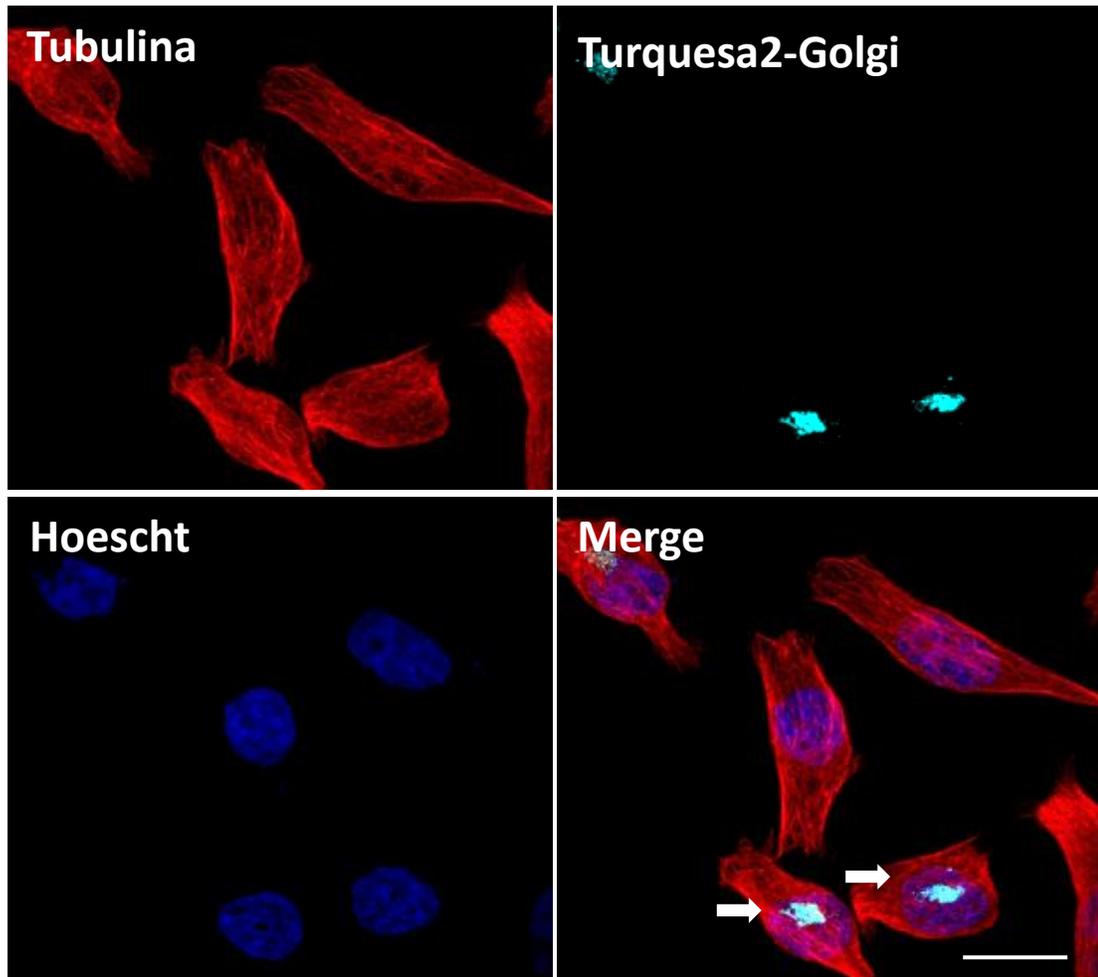
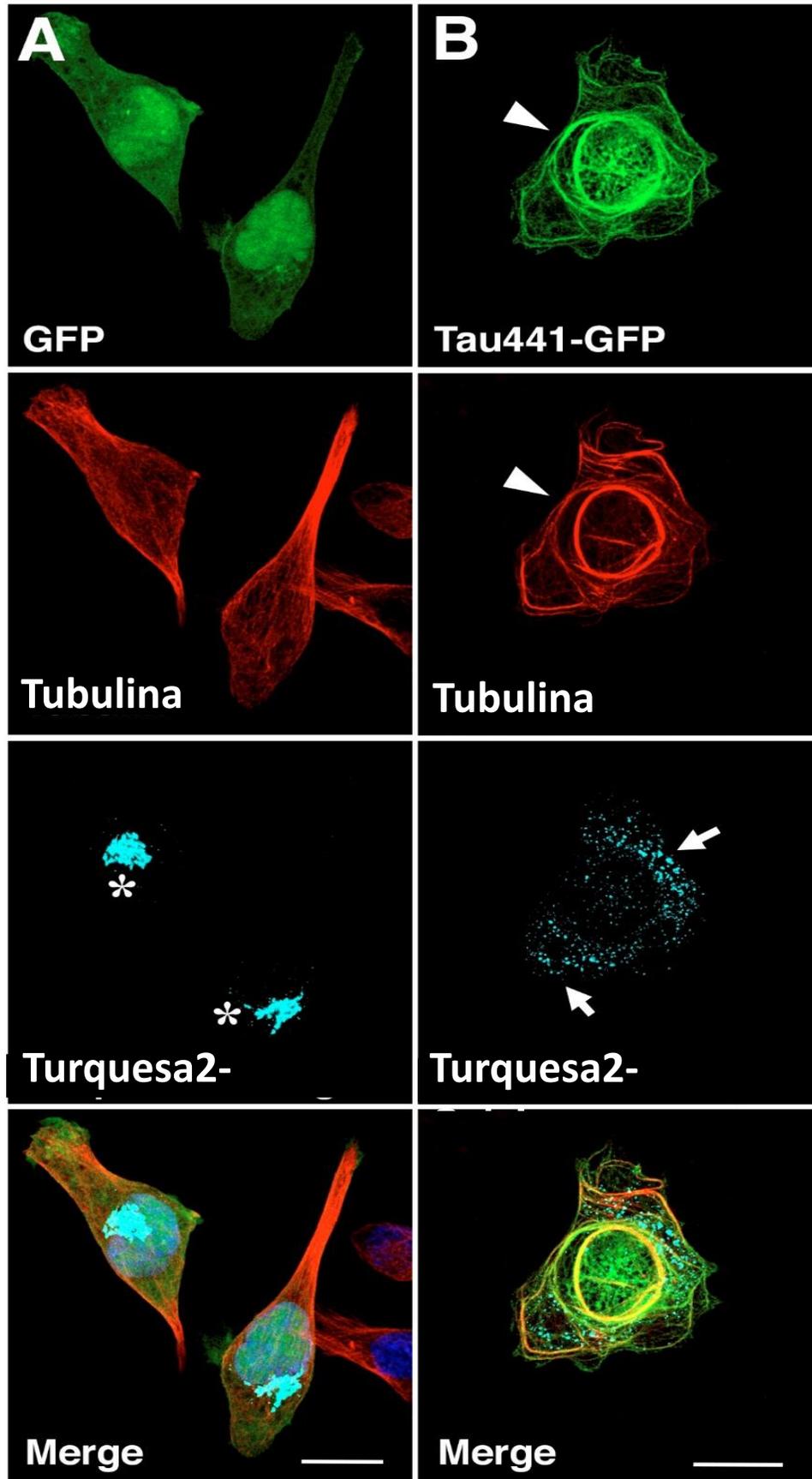


Figura 10. Morfología normal del AG visualizado por la expresión de Turquesa2-Golgi. Las células SH-SY5Y se transfectaron con el plásmido Turquesa2-Golgi. El canal rojo representa el inmunomarcaje con el anticuerpo monoclonal α -Tubulina. El canal azul corresponde al reconocimiento del compartimento nuclear con el colorante Hoechst 33258. Nótese la distribución perinuclear del AG en el canal de colocalización (merge). Escala: 20 μ m.

Bajo este nuevo acercamiento para visualizar el AG fuera del uso de anticuerpos dirigidos hacia la estructura, se realizó una doble transfección utilizando el plásmido Turquesa2-Golgi con uno u otro de los plásmidos que codifican para Tau-GFP o GFP como etiqueta individual. Como se muestra en la figura 11, cuando se expresó la etiqueta GFP en las células de neuroblastoma, esta proteína fluorescente se distribuyó homogéneamente en

el espacio citoplásmico y en el compartimento nuclear (panel A). El citoesqueleto de Tubulina tuvo un aspecto normal y el AG presenta una morfología normal en forma compacta y cerca del compartimento nuclear (asteriscos, figura 11A). Sin embargo, cuando las células se transfectaron con el plásmido que codifica para Tau-GFP se presentó la fragmentación ya descrita del AG (flechas en figura 11B). Este efecto se asoció estrechamente con la formación de paquetes de microtúbulos en forma de anillo. Claramente se pudo observar que Tau-GFP se encontró asociada a estos anillos de microtúbulos (cabeza de flechas en figura 11B).

En el presente trabajo, adicionalmente determinamos en forma cuantitativa el nivel de dispersión del AG, a través del cálculo indirecto de su índice de compactación. La descripción del proceso se mencionó en la sección de material y Métodos, encontrándose que el grado de compactación del AG disminuyó significativamente en las células que expresaron a Tau-GFP ($p < 0.0001$) en comparación a las células que solo expresaron la etiqueta fluorescente de GFP (Figura 11C).



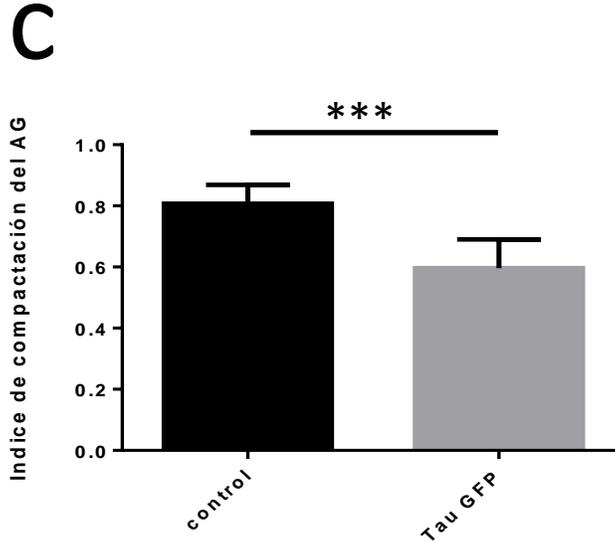


Figura 11. La expresión de la proteína Tau produce fragmentación del AG visualizado por la expresión de Turquesa2-Golgi. En las células SH-SY5Y control que expresaron GFP (A) se observó una morfología compacta y perinuclear del AG (asteriscos), el cual fue identificado por la transfección del plásmido Turquesa2-Golgi (A). El citoesqueleto normal de Tubulina (canal rojo) fue visualizado por la inmunodetección con el monoclonal α -Tubulina. Sin embargo, en las células que expresaron Tau-GFP (B) se observó una fragmentación del AG (flechas en B) y la formación de anillos pericéntricos de microtúbulos (cabezas de flecha). (C), gráfica del análisis cuantitativo de dispersión del AG entre células que expresaron a GFP y Tau-GFP. Utilizando el software ImageJ se obtuvo el área y perímetro del AG por célula (54 células analizadas) y se calculó indirectamente el índice de compactación y circularidad de este organelo. *** $p < 0.0001$ por t de Student. Barra de 20 μm .

5. Efecto de las truncaciones de la proteína Tau en su extremo carboxilo terminal (Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹) sobre la estructuración del citoesqueleto de Tubulina y del AG.

Considerando que previamente se ha propuesto que las truncaciones del carboxilo terminal en los sitios Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ de la molécula de Tau pueden incrementar sus efectos patológicos en la EA, y conociendo que en mi trabajo de Maestría también encontré una alteración en la estructura del AG cuando estas variantes truncadas se expresaron en las células SH-SY5Y, en el presente trabajo investigamos si dicho efecto se asociaba también a la formación de anillos anormales de microtúbulos.

Para este propósito las células SH-SY5Y se transfectaron de manera independiente con los plásmidos (pcDNA3.1Zeo (-)) que codifican para la expresión de estas variantes truncadas. Los productos de la transfección transitoria de estos plásmidos se presentan en el análisis de western blot de los extractos celulares totales, visualizados con el anticuerpo monoclonal Tau-5, un genérico que reconoce Tau completa (Tau441) y las dos variantes truncadas de la proteína Tau (Tau421 y Tau391 en Figura 12). También se presenta la identificación de estas especies con el anticuerpo monoclonal Tau 13 (reconoce el extremo amino de la proteína Tau), las cuales mantienen su extremo amino intacto. Es importante recalcar que nuevamente se corroboró la ausencia de Tau endógena en nuestro sistema de neuronas no diferenciadas (nótese carriles 1 y 2 de células control y células transfectadas únicamente con el vector vacío) (Fig. 12).

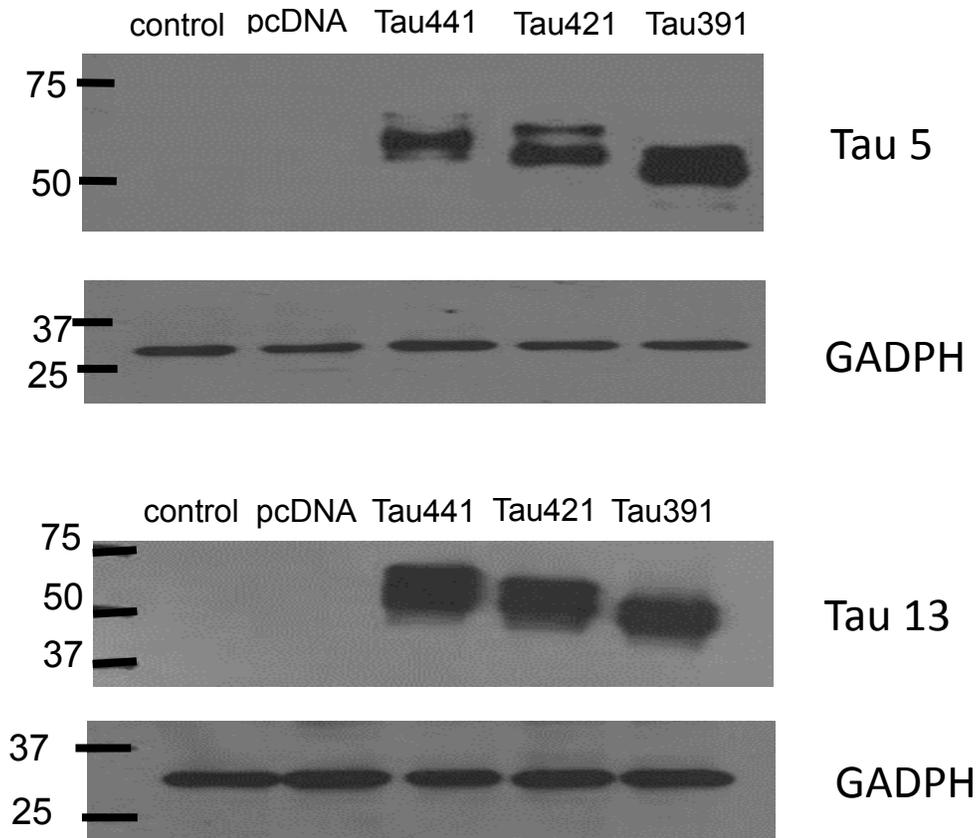


Figura 12. Expresión de la proteína Tau completa y sus variantes truncadas en el carboxilo terminal en células SH-SY5Y. Western blot representativo de los extractos totales de células transfectadas y no transfectadas con el plásmido pcDNA3.1Zeo (-), portando o no la secuencia de las variantes truncadas en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹. Los anticuerpos Tau 5 y Tau 13 reconocen todas las variantes de tau. Como grupo control se utilizaron células sin transfectar y células transfectadas con el vector vacío. En éstas claramente se nota la falta de detección de dichos anticuerpos, indicativo de no expresión de Tau endógena. Como control de carga se utilizó GADPH.

Otro grupo de células, bajo las mismas condiciones de transfección, se analizaron por inmunofluorescencia y microscopía confocal. En la figura 13 se observa cómo en las células que expresaron en forma independiente a Tau421 y Tau391, se produjo un empaquetamiento anormal de la red de microtúbulos en forma de las mencionadas estructuras en anillo (flechas en figura 13A y 13B). Concomitantemente, en células procesadas paralelamente para la detección del AG con el anticuerpo policlonal α -RCAS1 (proteína endógena de la cara trans-Golgi) se observó una dispersión del AG en las células que expresaron a las variantes truncadas de Tau (asteriscos en Figura 13C y 13D). Además, como ya se había descrito, este organelo se mantiene sin cambios en las células visualizadas en el campo que no expresan a ninguna de las variantes de Tau evaluadas (cabeza de flecha en Figura 13C y 13D).

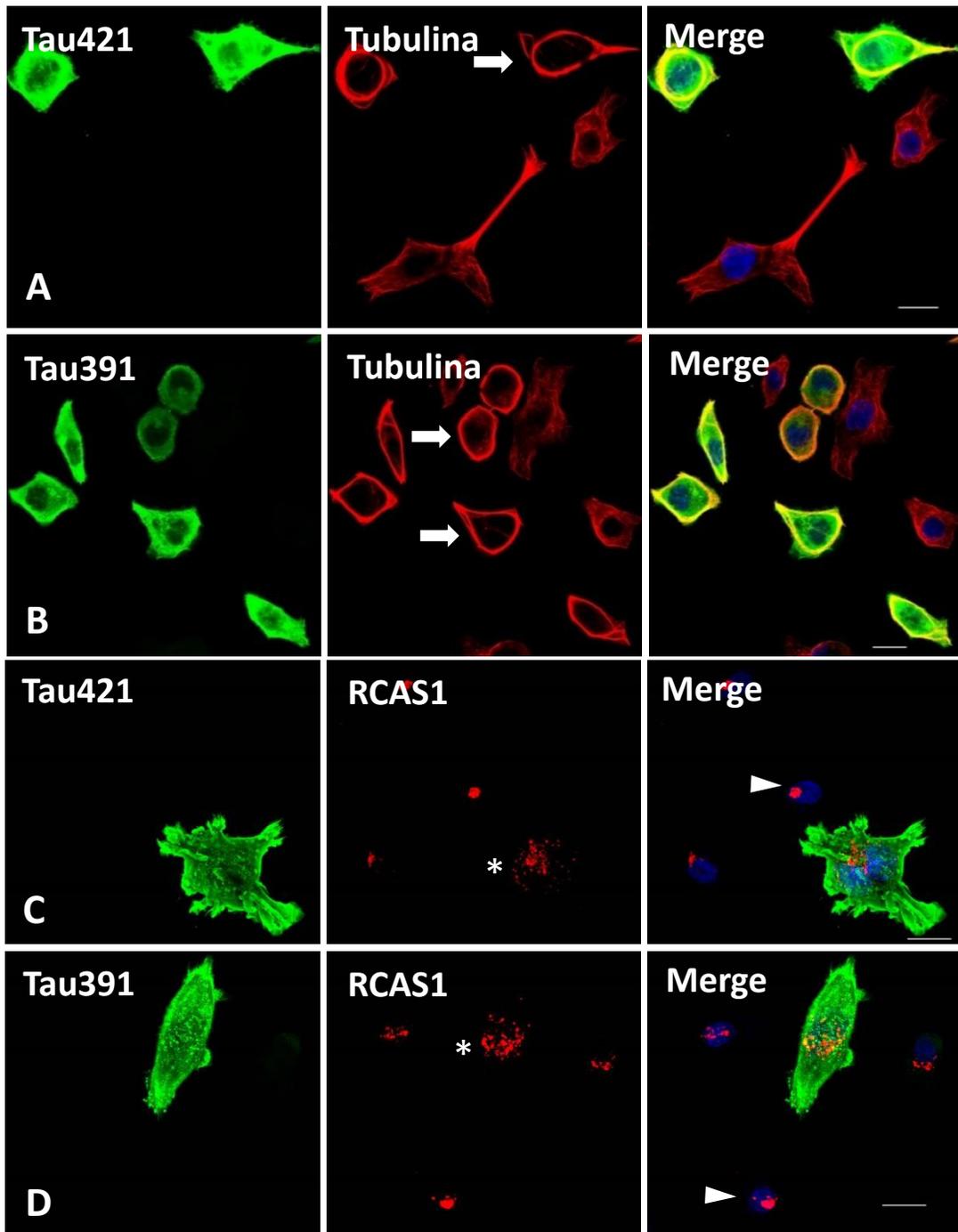


Figura 13. Las especies truncadas de Tau en su carboxilo terminal producen anillos anormales de microtúbulos y dispersión del AG. Se expresaron las variantes truncadas de Tau: Tau421 y Tau 391, en células de neuroblastoma por 48 hrs. Para ambas especies truncadas se observó el desarrollo de anillos anormales de microtúbulos (flechas en paneles A y B) y fragmentación del AG (asteriscos en paneles C y D). La morfología normal del AG se indica con las cabezas de flechas en C y D. En A y B se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo α -Tau, y el anticuerpo monoclonal de ratón hacia Tubulina. En C y D se utilizó el anticuerpo monoclonal Tau5 y el anticuerpo policlonal α -RCAS1 para la marca del Golgi. Los núcleos se tiñieron con el colorante Hoescht-33258. Barra de 20 μ m.

6. Determinación de los dominios de la proteína Tau involucrados en la dispersión del AG.

Debido a que las últimas variantes de la proteína Tau truncada carecían del extremo carboxilo y aun así se presentaron los efectos descritos anteriormente, se decidió generar nuevas construcciones para identificar con mayor certeza los dominios de la molécula que pudieran estar involucrados en el establecimiento de las diversas alteraciones producidas por la misma. Particularmente, se buscó saber si el extremo amino terminal tendría una actividad determinante, a raíz de los antecedentes funcionales descritos para este dominio. Para este propósito se construyeron dos variantes de Tau truncada: una molécula sin el amino (N)- terminal pero manteniendo la región rica en prolinas y su extremo carboxilo (C)-terminal intacto (Tau150-441), y otra variante doble truncada, tanto en el N- como en el C- terminal (Tau123-391).

Para determinar la expresión correcta y específica de Tau150-441 y Tau123-391, se obtuvieron extractos totales de las células transfectadas y no transfectadas, y se analizaron por western blot. En la Figura 14A se muestra el reconocimiento específico de estas variantes truncadas utilizando el anticuerpo Tau-5. Se acompañan en la Figura otras variantes de Tau ya conocidas, para corroborar los patrones corrimiento electroforético y pesos esperados. En este sentido, también se usó el anticuerpo Tau-46.1, el cual reconoce específicamente a esas especies de Tau que mantienen su C-

terminal intacto (Tau150-441). Con este último anticuerpo, se vuelve a corroborar la ausencia de una variante endógena de Tau, al menos en nuestro sistema de neuronas no diferenciadas. Cuando estas mismas células se procesaron para inmunofluorescencia y microscopía confocal, se observó claramente una fragmentación del AG (flechas en la figura 14B) en las células que expresaron independientemente a la proteína Tau150-441 o Tau123-391, en comparación con la apariencia normal y compacta de este organelo en las células no transfectadas en el campo (asteriscos en la figura 14B). Cuando se analizó de manera cuantitativa si las diversas variantes truncadas de la proteína Tau potenciaron la fragmentación del AG, en comparación a la proteína Tau completa, no se observó algún cambio significativo en el porcentaje de células transfectadas presentando esta alteración (Figura 14C) ($p=0.52$ mediante análisis de Varianza de una vía (ANOVA)).

Con la información obtenida hasta el momento, se podría sugerir que la región de la proteína Tau responsable del establecimiento de este efecto, es aquella que incluye a la zona de los dominios repetidos.

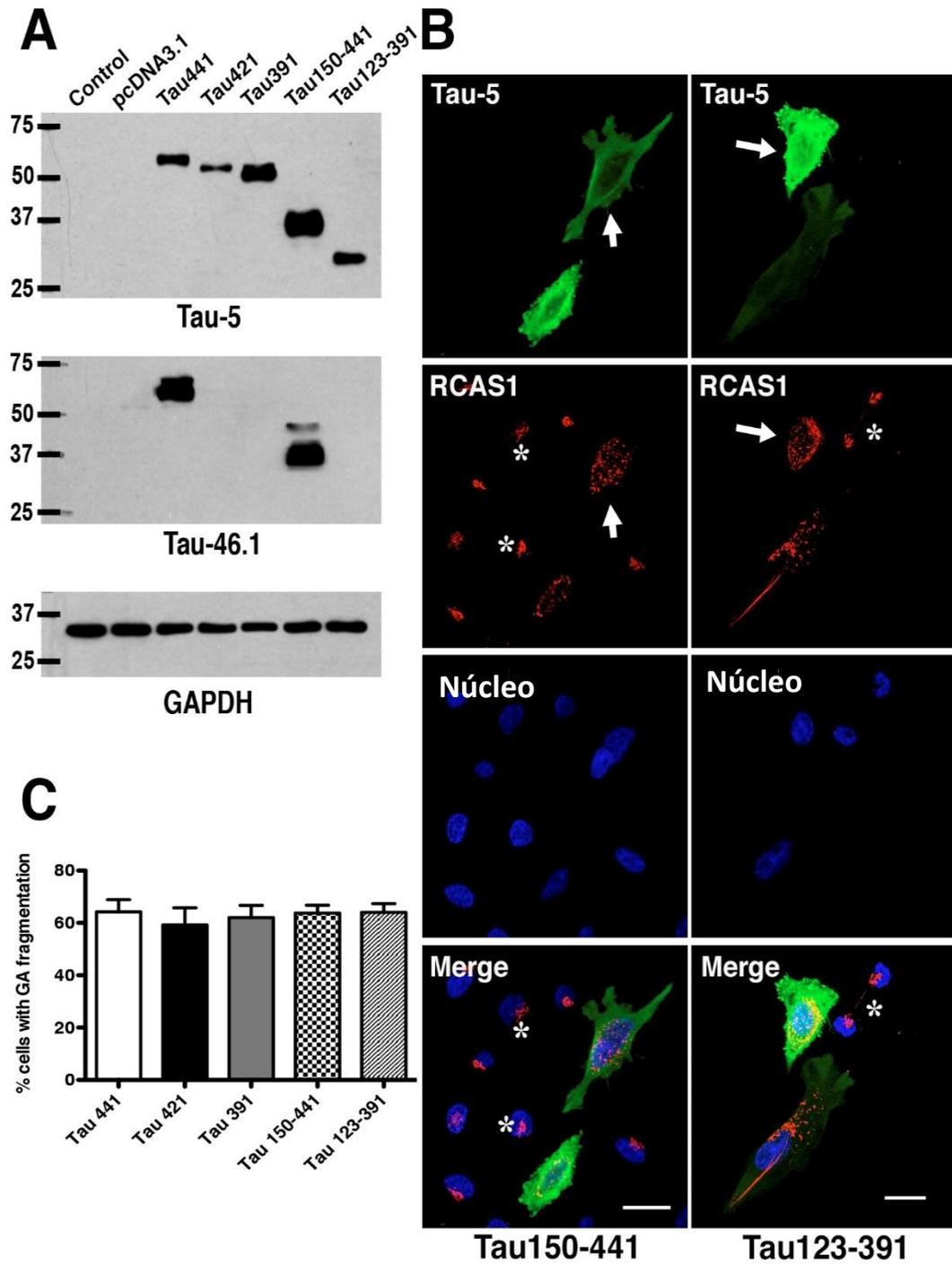


Figura 14. Tau truncada en el N-terminal causa fragmentación del AG en las células de neuroblastoma. En A se presenta el análisis por western blot de los extractos totales de las células transfectadas con plásmidos que codifican para las especies truncadas Tau150-441 y Tau123-391. Comparativamente se presentan los corrimientos electroforéticos de otras

variantes de Tau para comparar los tamaños entre las especies truncadas. Todas especies son reconocidas por el anticuerpo Tau-5, y solo aquellas preservando su carboxilo intacto son detectadas por el anticuerpo Tau-46.1. Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce a GAPDH. En B, Triple marcaje fluorescente de las células que expresaron Tau150-441 o Tau123-391, con la combinación de Tau-5, un anticuerpo policlonal que reconoce a RCAS1, y Hoescht-33258 para la detección del componente nuclear. Las flechas indican las células que expresando una u otra de las especies truncadas de Tau en su amino terminal, presentaron también una disgregación del AG. Los asteriscos muestran la estructuración compacta y perinuclear del AG en células sin transfectar. En C se muestra la representación gráfica del nivel normalizado de dispersión del AG (% de células transfectadas presentando dispersión del AG) entre las células que expresaron las diversas variantes de Tau incluidas en este estudio. No se observó una diferencia significativa entre los grupos al analizarse por ANOVA de una vía ($p=0.52$). La escala de la barra es de 20 μm .

Por otra parte, para constatar que los cambios descritos en las secciones anteriores (formación de anillos anormales de microtúbulos y fragmentación del AG), podrían tener un significado patológico en el funcionamiento de las células, pero no producir una muerte inmediata de las neuronas como reportó previamente Fasulo y cols. (1998,2000), se evaluó la viabilidad de las neuronas sobreexpresando Tau, hasta por un período de 72 horas. Realizando un análisis de viabilidad celular con la técnica de MTT (descrita en Material y Métodos), no se encontró una disminución significativa de este parámetro entre los diversos grupos de células que expresaron las distintas variantes truncadas de la proteína Tau, así como con la forma nativa no truncada de la molécula (Figura 15).

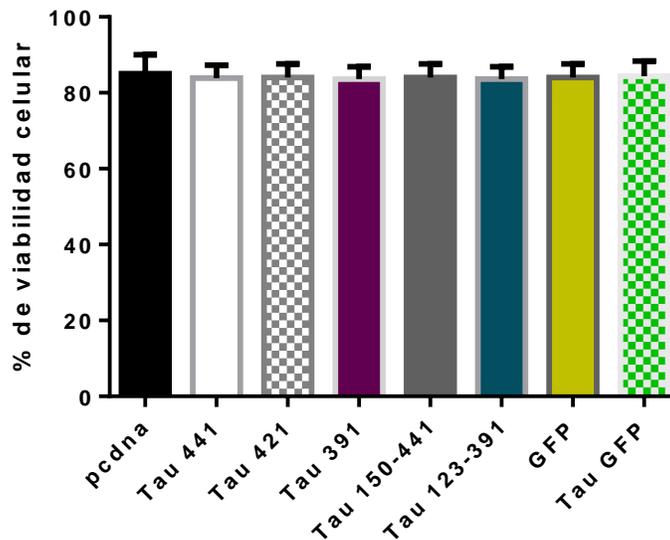


Figura 15. Viabilidad de las células SH-SY5Y que expresan a las variantes truncadas y no truncadas de la proteína Tau. Las células transfectadas y no transfectadas se colectaron 72 horas pos-transfección, para determinar su viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los valores representan el promedio (\pm Desviación Estándar) del porcentaje de células viables con respecto al grupo control sin transfectar. No existen diferencias significativas entre las células control (pcDNA) y aquellas que expresaron cualquier variante de tau ($p= 0.82$ por ANOVA de una vía).

7. La desestabilización del citoesqueleto de Tubulina, pero no su sobre-polimerización, produce una extensiva fragmentación del AG.

Hasta el momento, nuestros resultados indicaron que un rearrreglo del citoesqueleto de Tubulina, inducido por la proteína Tau, producía una fragmentación del AG. De acuerdo a la literatura, no existen reportes hasta el momento que hayan descrito esta alteración promovida por la sobre-polimerización específica de los microtúbulos como principales elementos que dan posicionamiento y estabilidad al conjunto de cisternas membranosas que componen al AG. Por el contrario, sí hay evidencia que la despolimerización masiva de los microtúbulos, directamente incide en la estabilidad del AG,

presentándose una fragmentación de dicho componente membranoso (Jason H. y cols., 2001).

Para profundizar en los mecanismos que participan en la estabilidad del AG y entender mejor los resultados que hemos obtenido de nuestra investigación, evaluamos el efecto de la despolimerización y polimerización masiva de los microtúbulos con agentes químicos, sobre la estabilidad del AG en nuestro modelo de células neuronales no diferenciadas.

Para ello, se utilizaron comparativamente dos agentes que afectan la estabilidad de los microtúbulos: el Nocodazol (que produce su despolimerización), y el Taxol (que promueve la polimerización). Como se muestra en la imagen 16B (flecha), las células de neuroblastoma sin transfectar presentaron una extensiva fragmentación del AG (visualizado con el anticuerpo α -RCAS) cuando se sometieron a la acción de Nocodazol ($5 \mu\text{M}$) por 1 hora. Nótese el aspecto difuso de la marca para Tubulina (reconocida con el anticuerpo monoclonal α -Tubulina) como resultado de su despolimerización masiva (canal rojo en figura 16, panel B). En el panel A de la Figura 16, comparativamente se presenta el arreglo normal de los microtúbulos en células no tratadas, así como el aspecto compacto del AG.

Para corroborar la especificidad de este efecto, otro grupo de células sometidas al mismo tratamiento se lavaron por 6 horas después de la incubación con la droga y se analizaron por inmunofluorescencia para los mismos marcadores. Nótese en la Figura 16C, como el citoesqueleto de Tubulina se volvió a reestructurar y se recuperó la estructura compacta del AG (flecha). Esto corroboró en nuestro modelo que, efectivamente la desorganización masiva de los microtúbulos incide sobre la adecuada organización y localización del AG.

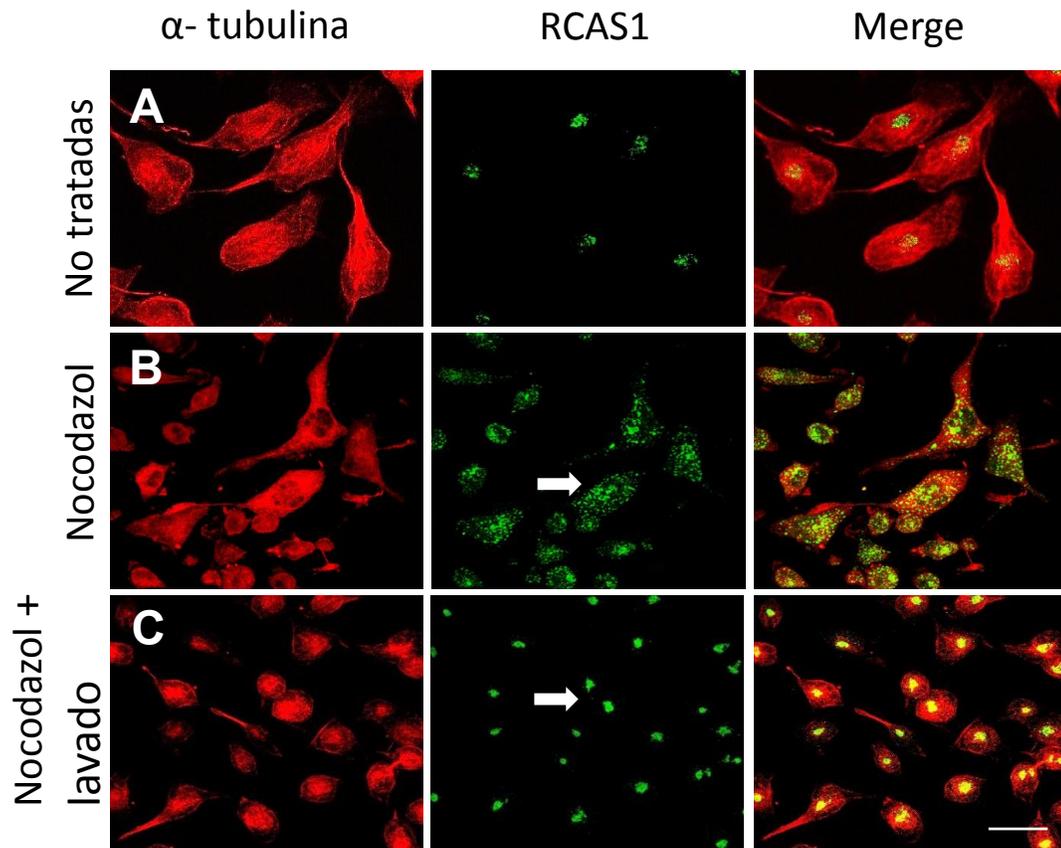


Figura 16. La despolimerización de la red de microtúbulos produce una extensiva dispersión del AG. En (A), las células sin tratamiento presentan una distribución normal del citoesqueleto de Tubulina y del AG. (B), En las células tratadas con Nocodazol (5 μ M) por una hora se produjo una fragmentación extensiva del AG a (detectado con el anticuerpo α -RCAS1). (C) Cuando estas células se lavaron por 6 horas y se removió el Nocodazol, el AG recuperó su localización y compactación en asociación a un reensamble de la red de microtúbulos. Escala de 20 μ m.

Por el contrario, cuando las células se incubaron con 10 μ M de Taxol (una droga que promueve la polimerización de Tubulina) se formaron paquetes más densos de microtúbulos, localizándose sobre la superficie cortical y en procesos celulares incipientes (flechas en Figura 17A). No obstante, como resultado de esta remodelación estructural no se observaron cambios evidentes en la morfología y localización del AG (asteriscos en Figura 17A) (asteriscos en Figura 17A).

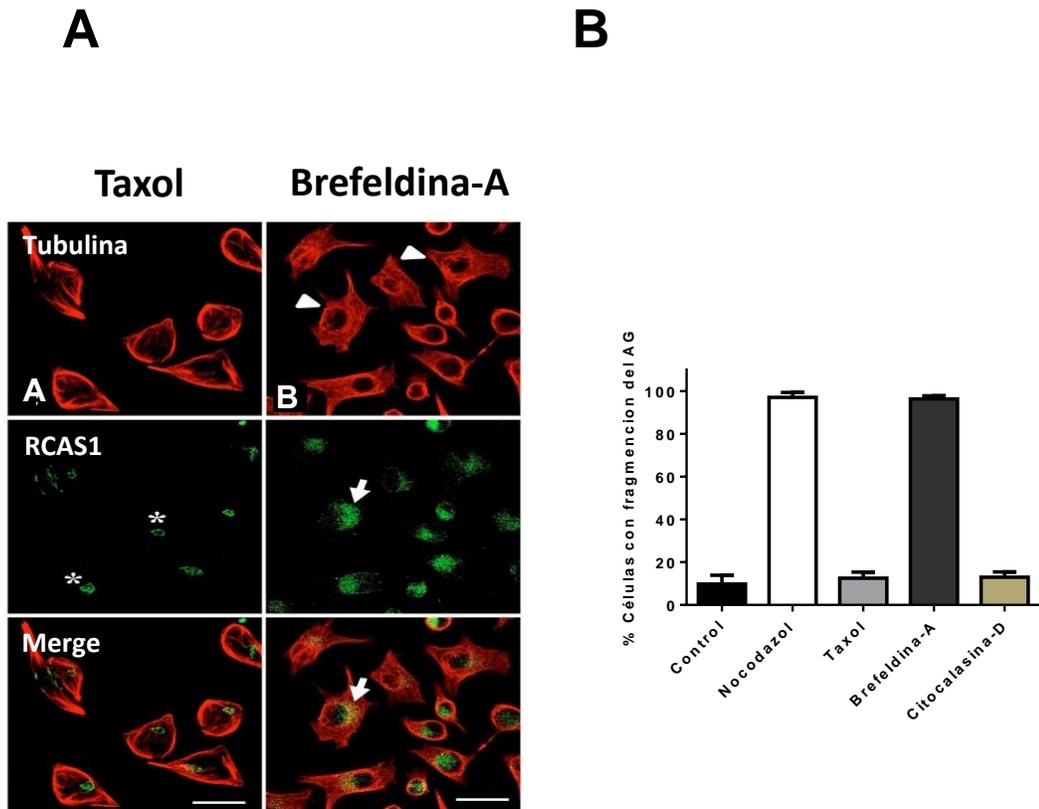


Figura 17. El incremento y empaquetamiento masivo de microtúbulos producido por Taxol no promueve la dispersión del AG. En (A), células incubadas con Taxol (10 μM) durante 3 horas presentaron un incremento y empaquetamiento anormal de microtúbulos (flechas en canal rojo) que no alteró la morfología normal y localización del AG (asteriscos en canal verde). En (B), células tratadas con Brefeldina-A (10 μM) por 1 hora, observándose una fragmentación parcial del AG (flecha en canal verde). Bajo esta condición los microtúbulos permanecieron intactos (cabezas de flecha en canal rojo. El AG se detectó con un anticuerpo policlonal α RCAS1 (canal verde) y los microtúbulos con un monoclonal α-Tubulina (canal rojo). Escala: 20 μm. En C, porcentaje de células que presentaron fragmentación del AG con cada uno de los tratamientos.

En forma comparativa, otro grupo de células se trató con 10 μM de Brefeldina-A (BFA) durante 1 hora. Es sabido que este compuesto interfiere con el transporte anterógrado desde el Retículo endoplásmico hacia el AG e interrumpe la organización del apilamiento de las cisternas del AG (Fujiwara

T. et al., 1988). Como se muestra en la figura 17B, corroboramos que este tratamiento produce una dispersión del AG, sin embargo, el colapso de esta estructura se manifiesta como una desorganización de vesículas dispersas, localizadas generalmente alrededor del área juxtanclear (flechas en B). Este efecto, como se mencionó anteriormente, es independiente a la organización de los microtúbulos, pues el citoesqueleto de Tubulina no sufrió de cambios significativos en su estructuración (cabezas de flecha en B).

Para precisar los datos, se determinó cuantitativamente el nivel de afectación como el porcentaje de células que presentaron fragmentación del AG bajo los distintos tratamientos. Los datos presentados en la Figura 17C, corroboran nuestras observaciones. Estos resultados indicaron que la polimerización masiva de microtúbulos no es una condición limitante para producir una fragmentación del AG; no obstante, la formación de un arreglo específico de microtúbulos en forma de anillos, promovido por Tau, una proteína con afinidad a la Tubulina, sí lo es. Este ensamble específico de los microtúbulos, seguramente es un proceso de mayor complejidad donde deben intervenir otros factores, y que para precisarlo se requiere de más estudios.

8. Estabilidad y resistencia de los anillos de microtúbulos producidos por la expresión de la proteína Tau en células de neuroblastoma.

Para investigar con mayor detalle algunas de las propiedades mecánicas de los anillos de Tubulina producidos por la abundancia de la proteína Tau en el soma neuronal, se realizaron varios experimentos que permitieron validar su resistencia y estabilidad.

8a. Acetilación de Tubulina

Primeramente, conociendo que una modificación postraduccional que le confiere estabilidad a los microtúbulos es la acetilación de la α -Tubulina (Hubbert, C., et al, 2002), se decidió evaluar si esta modificación se presentaba en aquellos anillos pericéntricos de Tubulina, que son producidos por la expresión de la proteína Tau. Como se muestra en las figuras 18A y B, sí se presentó un incremento en el nivel de acetilación de la Tubulina en los paquetes de microtúbulos que conforman estas estructuras en anillos (flechas). Interesantemente, en las células que expresaron a Tau existen otros paquetes de microtúbulos no asociados a las estructuras en anillos, sin embargo estos no mostraron reconocimiento por el anticuerpo policlonal α -Tubulina acetilada. Parece ser que esta modificación se presentó en forma exclusiva sobre los anillos de microtúbulos, o de manera incipiente en la zona que corresponde al centrosoma en aquellas células no transfectadas que aparecen en el campo (asteriscos en Figura 18 A). Concomitantemente, la dispersión del AG que se observa en las imágenes (a través de la transfección con el plásmido Turquesa2-Golgi) (cabeza de flecha en Figuras 18A y B), se produjo en las células que expresaron la proteína Tau y que presentaron los anillos de Tubulina acetilados.

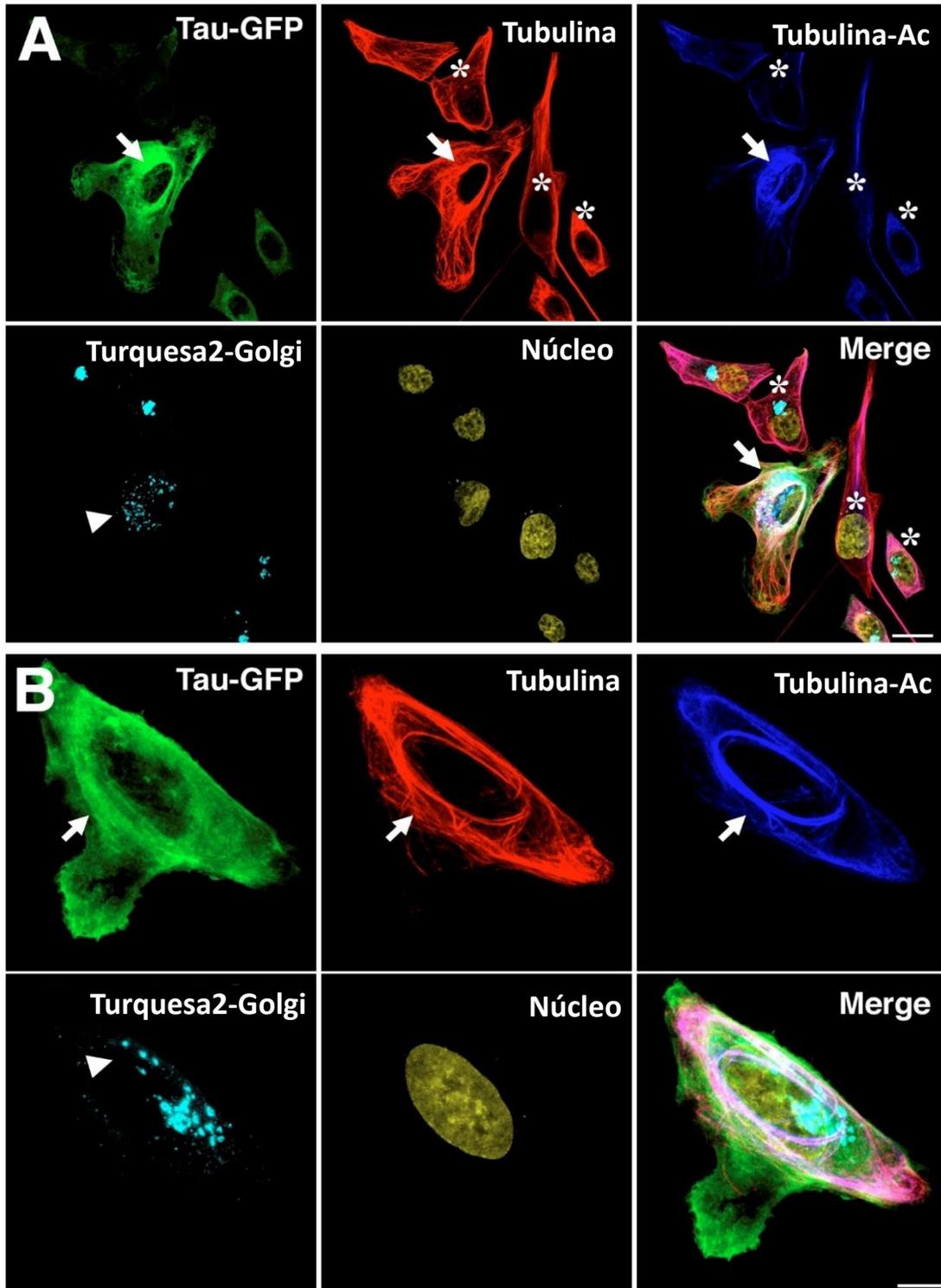


Figura 18. Incremento de Tubulina acetilada en los paquetes de microtúbulos que conforman los anillos de microtúbulos. En A y B se realizaron dobles transfecciones con los plásmidos que codifican para la expresión de Tau-GFP y Turquesa2-Golgi, y se procesaron para multimarcado fluorescente de Tubulina total (canal rojo), Tubulina acetilada (canal azul),

y tinción nuclear con Hoechst-33258 (esta fue virada a pseudocolor amarillo). Las flechas en el canal azul muestran el alto nivel de acetilación de los microtúbulos asociados a las estructuras en anillo, y los asteriscos representan la poca cantidad de Tubulina acetilada que se observa en el centrosoma de células no transfectadas en el campo. Las cabezas de flechas indican la fragmentación del AG en las células que expresan a Tau-GFP. Barra de escala: 20 μm en A; 7 μm en B.

Cuando esta modificación se analizó en células que expresaron alguna variante truncada de la proteína Tau (Tau123-391), también se encontró que la Tubulina acetilada se presentaba casi exclusivamente en la estructura en anillo (flecha en panel B de la Figura 19).

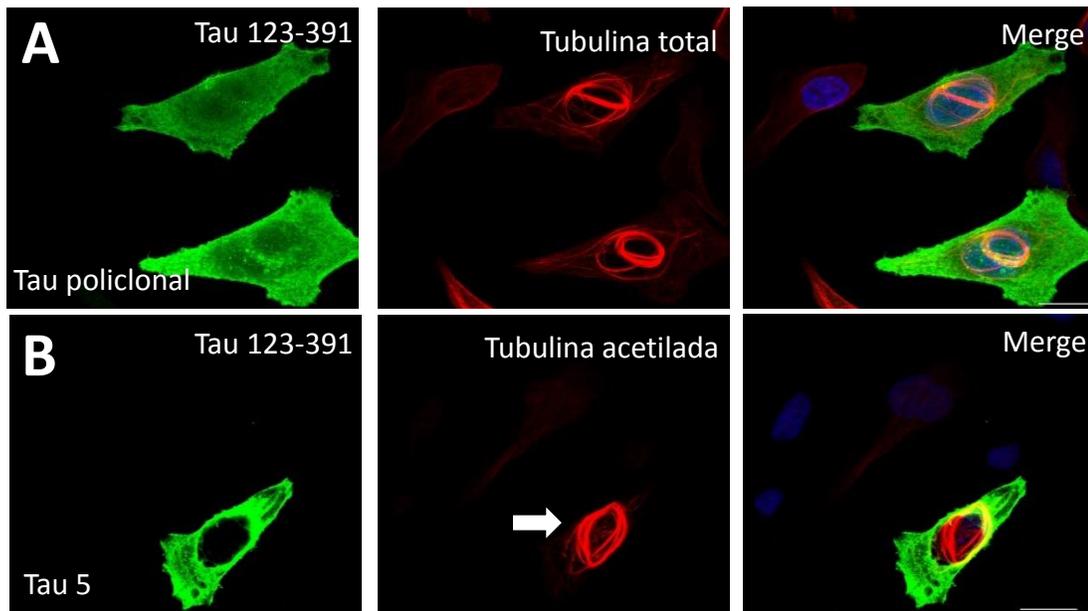


Figura 19. La expresión de Tau truncada (Tau123-391) produjo anillos de microtúbulos compuestos de Tubulina acetilada. Después de 48 horas de transfección, las células de neuroblastoma se fijaron y procesaron por inmunofluorescencia de doble marca, combinando los anticuerpos policlonal α -Tau y monoclonal α -Tubulina (Panel A); así como monoclonal Tau 5 y policlonal α -Tubulina acetilada (Panel B). En B, la flecha señala la marca intensa de Tubulina acetilada en los anillos de los microtúbulos inducidos por la proteína Tau. En el merge se incluyen los núcleos de las células visualizados en azul con Hoescht-33258. Barra de escala: 20 μm .

Para corroborar bioquímicamente este incremento en el nivel de acetilación de la α -Tubulina, los extractos totales de células de neuroblastoma que expresaron a Tau completa y Tau123-391 se procesaron para su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) e inmunoblot con el anticuerpo policlonal α -Tubulina acetilada. En la figura 20 se observa un incremento en la banda que corresponde a la Tubulina acetilada (aprox. 55 KDa) en los extractos de células que expresaron las variantes de la proteína Tau completa (Tau441 y Tau-GFP) y truncada (Tau123-391). En las células control no transfectadas, así como en aquellas que se transfectaron con el vector vacío (pcDNA3.1), o que expresaron únicamente a la proteína GFP, el nivel de Tubulina acetilada es mínimo o nulo. La α -Tubulina total sirvió como proteína de referencia, observándose la misma intensidad de expresión en todos los carriles.

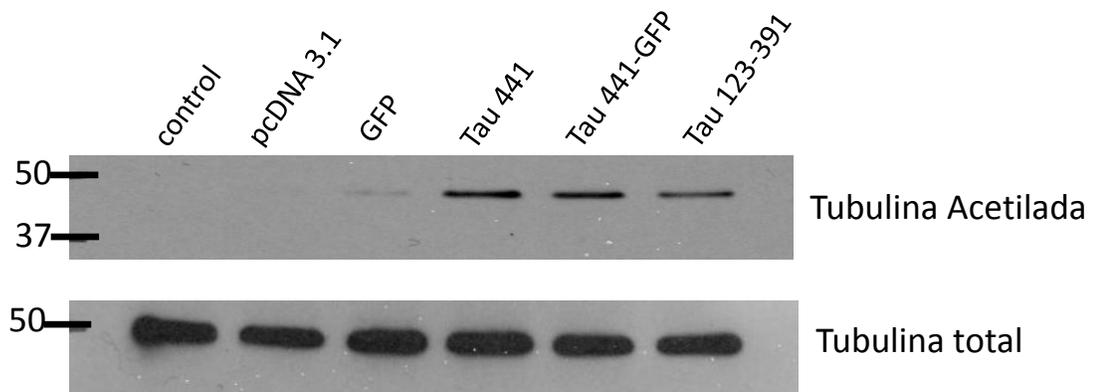


Figura 20. El incremento en el nivel de acetilación de Tubulina correlaciona con la expresión de Tau-GFP, Tau 441 y Tau 123-391. Análisis por PAGE e inmunoblot de extractos totales de células que expresaron a la proteína Tau completa (Tau441, Tau-GFP) o Tau truncada (Tau123-391). Como se muestra en los carriles 4,5 y 6 se produjo un incremento en los niveles de Tubulina acetilada en las células que expresaron a cualquier variante de Tau, en comparación con las células control (células sin transfectar, transfectadas con el vector vacío, o células que expresaron únicamente a GFP). No se visualizaron cambios en el nivel de expresión de la Tubulina total.

8b. Resistencia de los anillos de Tubulina producidos por la proteína Tau contra agentes desestabilizantes y estabilizantes de los microtúbulos.

Para evaluar la capacidad de la proteína Tau para promover el cambio en la organización del citoesqueleto de Tubulina para formar los anillos anormales de microtúbulos, se evaluó si Tau completa podría producir esta modificación en microtúbulos previamente estabilizados con Taxol.

En este primer esquema experimental las células de neuroblastoma se incubaron inicialmente con Taxol (10 μ M) por 3 horas, se lavó la droga del medio y posteriormente se transfectaron las células con el plásmido que codifica para la expresión de Tau-GFP. Después de 48 hrs de transfección, las células se procesaron para evaluar por inmunofluorescencia la expresión de Tau-GFP y la organización del citoesqueleto de Tubulina (anticuerpo monoclonal α -Tubulina).

Como se muestra en la figura 21A, B, la proteína Tau completa fue capaz de formar los anillos de microtúbulos aún bajo tratamiento previo con Taxol (flechas). La forma de estos anillos fue un tanto irregular (flechas en panel A de la Figura 21), incluso en proceso de formación (cabeza de flecha en panel B de la Figura 21), sin embargo, es muy claro que Tau fue capaz de dirigir este ensamble circular en microtúbulos estabilizados químicamente. Nótese cómo en las células que no expresan Tau, los microtúbulos presentaron el empaquetamiento típico que produce el tratamiento con Taxol (asteriscos en Panel A de la Figura 21).

En el segundo esquema experimental, y para evaluar la resistencia y estabilidad de los anillos anormales de Tubulina, las células de neuroblastoma que expresaron a Tau se sometieron a la acción de Nocodazol (un agente despolimerizante de microtúbulos, como se mencionó anteriormente), y se

evaluó su resistencia a este compuesto. Para este propósito, las células se transfectaron con el plásmido que codifica para la expresión de Tau-GFP y después de 48 horas de transfección las células se incubaron con Nocodazol (5 μ M) por 1 hora. Al finalizar el tratamiento y sin lavar, las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia utilizando los marcadores definidos en el apartado anterior. Como se muestra en la Figura 21C, los anillos de microtúbulos en las células que expresaron a la proteína Tau-GFP, permanecieron intactos y soportaron el efecto despolimerizante del Nocodazol (flecha en canal rojo de la Figura 21C). Nótese en este mismo canal, cómo las células en el campo que no expresaron a Tau-GFP presentaron un citoesqueleto de Tubulina despolimerizado, lo cual es el resultado del efecto del Nocodazol (asteriscos en canal rojo de la Figura 21C).

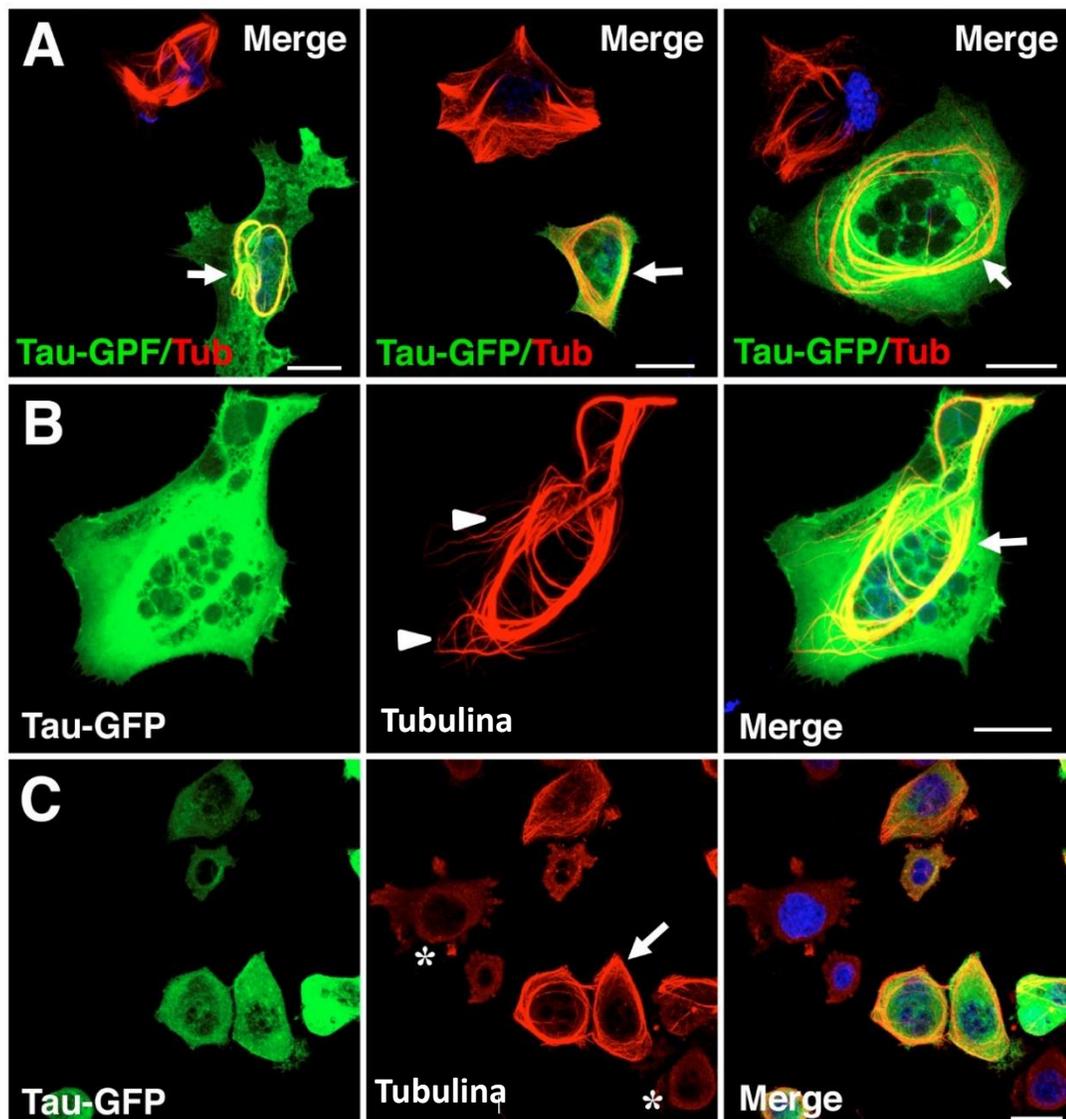


Figura 21. Los anillos de microtúbulos producidos por la proteína Tau son resistentes a drogas desestabilizadores del citoesqueleto de Tubulina. En A y B las células se incubaron inicialmente con Taxol a 10 μM por 3 horas para estabilizar los microtúbulos, y posteriormente se transfectaron con el plásmido que codifica para la expresión de Tau-GFP. Después de 48 horas de transfección, las células se fijaron para visualizar el citoesqueleto de Tubulina. El panel A corresponde a los canales de merge de tres campos, que muestran células transfectadas con Tau-GFP, inmunodetección de Tubulina y contratinción para núcleos. Nótese los paquetes de microtúbulos que aún se formaron con la expresión de Tau (flechas). El panel B se observan anillos en formación proyectando algunos paquetes de microtúbulos fuera de la estructura. Los asteriscos denotan a las células que no expresan a Tau y que presentan empaquetamiento masivo de microtúbulos de acuerdo a la acción conocida del Taxol. Cuando las células inicialmente expresaron Tau-GFP por 48 horas y posteriormente se trataron con Nocodazol 5 μM por 1 hora (panel C), en ellas aún se observaron anillos de microtúbulos resistentes a la acción despolimerizante de la droga (flecha). Las células que no expresaron a Tau-GFP presentaron un citoesqueleto de Tubulina despolimerizado (asterisco en C). Escalas de las barras en panel A de izquierda a derecha: 20 μm , 20 μm y 15 μm ; 15 μm en el panel B; 20 μm en panel C.

9. La organización del AG en células SH-SY5Y no depende de cambios en la estructuración del citoesqueleto de Actina.

De acuerdo a lo previamente reportado por nuestro laboratorio en células de origen glial, la proteína Tau altera de manera indirecta la organización de componentes membranosos a través de una remodelación del citoesqueleto de Actina (Torres-Cruz y cols., 2016). Por lo tanto, decidimos evaluar en nuestro modelo de células de neuroblastoma si la reestructuración de este citoesqueleto incide en la organización y estabilidad del AG.

Para cumplir con este objetivo, las células de neuroblastoma no transfectadas se sometieron a varios agentes desestabilizantes del citoesqueleto de Actina y se evaluó por inmunofluorescencia la morfología de este componente y del AG. Como se muestra en la figura 22A, las células control no tratadas presentaron un citoesqueleto de Actina cortical normal y fibras de estrés,

detectadas con Faloidina-Rodamina, un compuesto fluorescente que tiene afinidad específica por Actina polimerizada (Actina-F). El AG presentó una morfología normal y su localización fue en las inmediaciones del núcleo (flecha en canal verde, panel A). Cuando estas células se incubaron de manera independiente con inhibidores específicos de la vía RhoA-GTPasas-ROCK que regula la organización de Actina-F, como C3-transferasa (inhibidor específico de la GTPasa RhoA) y NSC23766 (inhibidor específico de la Rac-I-GTPasa), no se observó alguna alteración en la morfología del AG (Figura 22, flechas en canal verde, paneles B y C. En una condición determinante, en la cual se despolimerizó la actina-F bajo la incubación de las células con Citocalacina-D (CitoD) 20 μ M (Cito-D) por 30 minutos (canal rojo, panel D en Figura 22), tampoco se observó un cambio significativo en la morfología del AG (flecha en canal verde, panel D en Figura 22). La cuantificación del número de células que presentaron mínima fragmentación del AG bajo el tratamiento de Cito-D se muestran en la Figura 22C.

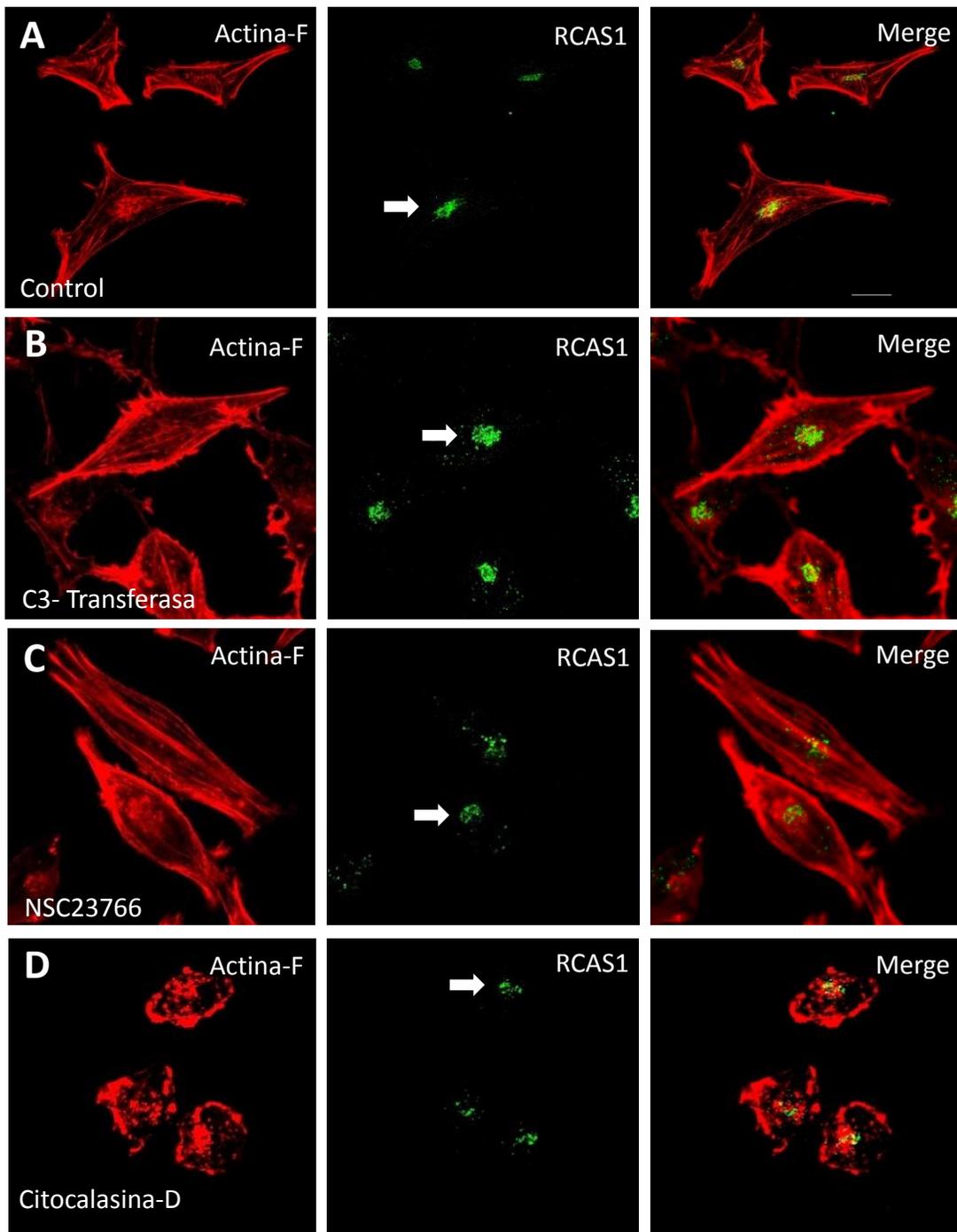


Figura 22. La morfología del AG en células de neuroblastoma SH-SY5Y no depende de cambios en la estructuración del citoesqueleto de actina. Las células de neuroblastoma sin transfectar se trataron con drogas que alteran la organización el citoesqueleto de Actina y se analizaron por doble marcaje con el anticuerpo α -RCAS1 (canal verde) y Faloidina-Rodaminada, la cual detecta la poza de Actina filamentosa (canal rojo). A: células no tratadas;

B: células tratadas con C3-Transferasa (Inhibidor de GTPasa-RhoA); C: células tratadas con NSC23766 (Inhibidor de GTPasa- Rac); D: células tratadas con Citocalacina-D. Las flechas de A-D indican la morfología normal y compacta del AG en todos los tratamientos. Nótese que bajo una intensa despolimerización del citoesqueleto de Actina con Citocalasina-D, no se produjo la fragmentación del AG (panel D). Escala de la barra: 20 μ m

Para corroborar que la organización del citoesqueleto de Actina es independiente en la fragmentación del AG, las células que expresaron Tau-GFP produjeron fragmentación del AG (flechas en la Figura 23), pero no se observaron cambios en la organización de actina-F (asteriscos en la Figura 23). Estos resultados indican que la organización del AG en células SH-SY5Y no diferenciadas es independiente de la estructuración del citoesqueleto de Actina.

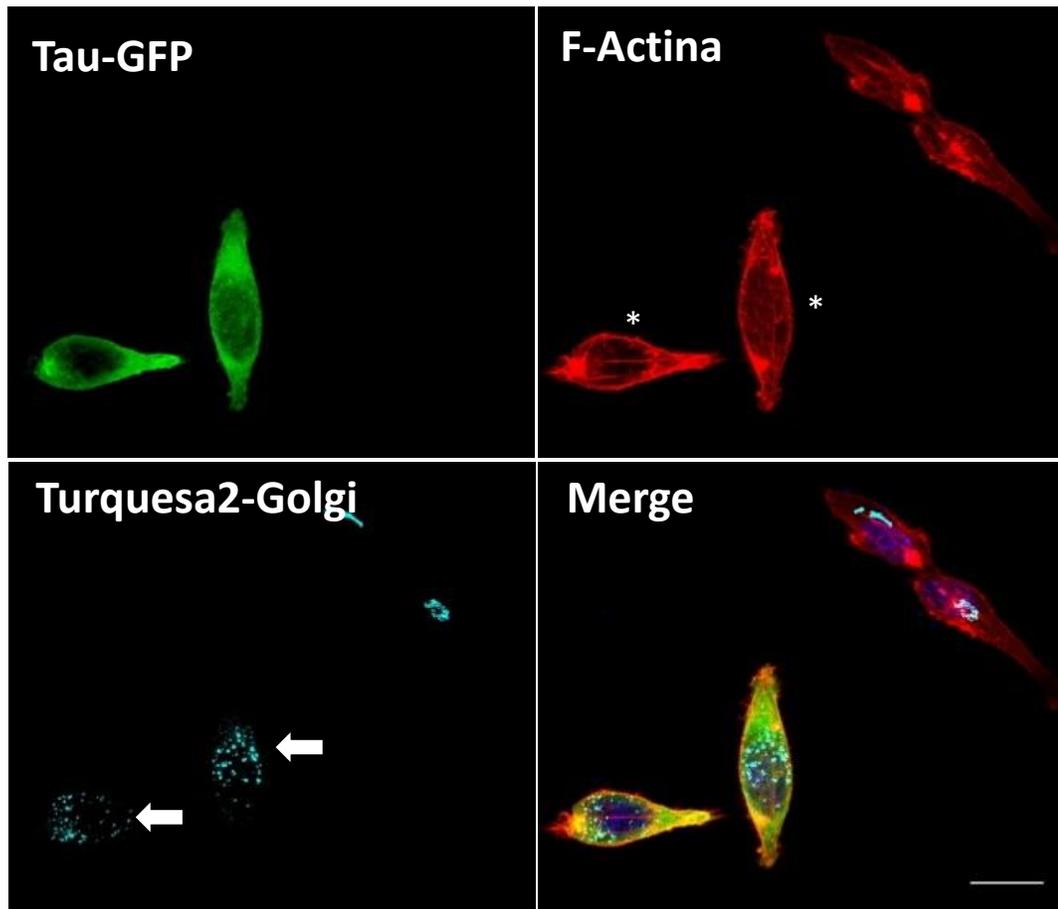


Figura 23. La dispersión del AG producido por Tau es independiente de la estructuración del citoesqueleto de Actina. Se realizó doble transfección de las células SH-SY5Y con el plásmido que codifica para Tau-GFP y con el plásmido Turquesa2- Golgi. Las células se contratiñeron con Faloidina Rodaminada al final de la transfección. Las flechas indican fragmentación del AG en células que expresaron Tau-GFP. En estas mismas células el citoesqueleto de Actina no presentó alguna alteración morfológica (asteriscos). Escala de la barra: 20 μ m

10. Alteración en el nivel de glicosilación de proteínas en células de neuroblastoma que presentaron fragmentación del AG, producida por la expresión de la proteína Tau.

Considerando que algunas de las actividades que se desempeñan en el AG son la maduración y glicosilación de proteínas para su adecuada distribución, en este trabajo se evaluó el significado funcional como nivel de glicosilación total de proteínas, que tendría la fragmentación del AG producida por la proteína Tau. Para este propósito, se analizó el contenido de carbohidratos totales de los extractos de células transfectadas y no transfectadas utilizando un kit de Estimación de Glicoproteínas Carbohidratadas (Thermo Fisher Scientific). Esta herramienta permite determinar por espectrofotometría el nivel de carbohidratos totales de las muestras problema, al comparar con las lecturas obtenidas de una serie de proteínas glicosiladas de referencia, las cuales son incluidas en el kit (Tabla 2). El nivel de carbohidratos totales de las muestras problema se expresa en valor porcentual y las variaciones arriba del 3 % entre ellas son consideradas como significativas (de acuerdo a las indicaciones del proveedor). Como se muestra en la tabla 2, se encontró una disminución significativa en la cantidad normalizada de carbohidratos totales en las muestras que expresaron a Tau441, Tau123-391 y Tau-GFP, con respecto a las células control (alrededor del 7-8 %).

Proteína	Proteína (mg/ml)	Contenido Total de carbohidratos (%)	Absorbancia (550 nm)
Blanco	0	0	0.111
Lisozima	2.5	0	0.180
BSA	2.5	Trazas	0.192
Ovalbumina	2.5	3.2	0.300
Apo-Transferrina	2.5	5.8	0.520
Fetuina	2.5	22.9	3.63
α -Acido Glicoproteico	2.5	41.4	4.47
Muestra control	2.5	28	0.469
pcDna	2.5	27	0.52
GFP	2.5	27.5	0.461
Tau441	2.5	21	0.352
Tau123-391	2.5	21	0.352
Tau-GFP	2.5	20	0.335

Tabla 3. Determinación del contenido total de carbohidratos. Los valores normalizados se obtuvieron de proteínas de referencia que presentaron alta glicosilación.

DISCUSIÓN

1. Toxicidad de la proteína Tau en su forma monomérica no ensamblada

La agregación anormal de la proteína Tau en forma de FHAs es un proceso patológico que se presenta en las neuronas corticales y del hipocampo en los pacientes con la EA, y que normalmente correlaciona con la aparición de síntomas clínicos ya bien definidos de la enfermedad (Selkoe DJ. 2001). Sin embargo, existen evidencias que incluso en su forma no fibrilar, la acumulación anormal de la proteína Tau en el compartimento somatodendrítico también podría generar una toxicidad primaria afectando la funcionalidad de estas neuronas (Makrides, V. y cols., 2003). De ocurrir esto, es posible que los síntomas clínicos más incipientes de la enfermedad correlacionen con alteraciones en la funcionalidad de las neuronas, más que con una muerte celular por la agregación filamentosa de la proteína (en forma de PHFs y MNF's).

Para comprobar estas hipótesis, diversos investigadores se han enfocado en el entendimiento de los mecanismos de toxicidad de la proteína Tau en forma monomérica, más allá de analizar al tejido cerebral de sujetos que padecieron la EA, donde ya no es factible explorar fenómenos dinámicos *in vivo*. Varios grupos han confirmado la inducción de anomalías en la estructura y función de diversos organelos en las células cultivadas *in vitro* donde se ha expresado exógenamente la proteína Tau completa, o en sus formas modificadas (fosforilada, troncada o mutada) (Roberson y cols., 2007; Ebner A. y cols., 1998; Yu D. y cols., 2015). Un ejemplo de esto es la fragmentación mitocondrial y alteración de la dinámica de este organelo observada en neuronas corticales, cuando se expresó la proteína Tau completa y su variante troncada (en Asp⁴²¹), ya mencionada anteriormente (Pérez M.J. y cols., 2018).

Apoyando estas evidencias, en cultivos primarios de neuronas inmortalizadas, la expresión de la proteína Tau troncada en el Asp⁴²¹ alteró el funcionamiento

y morfología de las mitocondrias (Quintanilla y cols., 2009). Otra alteración ocasionada por la expresión de la proteína Tau fue la redistribución perinuclear del Retículo endoplásmico observada en astrocitos cultivados *in vitro* (Yoshiyama y cols., 2003).

Considerando la idea que hace suponer a Tau como una proteína capaz de alterar la organización de diversos organelos membranosos, se buscaron más evidencias sobre los efectos citotóxicos que la expresión de la Tau completa o sus variantes truncadas pudieran producir sobre otros componentes celulares. Cuando estas especies se sobre-expresaron en células de neuroblastoma SHSY5Y no diferenciadas, nuestro grupo observó una alteración significativa en la arquitectura del compartimento nuclear, presentandose lobulaciones extensas a lo largo de la envoltura nuclear (Monroy R. y cols., 2013). Esta acción fue producida por una fuerza mecánica generada por ciertos anillos anormales de microtúbulos que se distribuyeron pericéntricamente dentro de la célula. A pesar de que el efecto promotor de la polimerización de Tubulina ha sido documentado largamente (Cleveland DW. y cols., 1977), no existen tantos reportes donde se hayan descrito estos anillos de microtúbulos inducidos por Tau, y menos existente una caracterización más precisa de sus propiedades y significado patológico.

2. El AG, un organelo afectado por la acumulación anormal de la proteína Tau.

El AG es un organelo muy dinámico y está implicado en el procesamiento, maduración, tráfico y distribución intracelular, así como secreción de proteínas (Diao y cols., 2003; Yadav y cols., 2009), entre otras funciones. A través del análisis por inmunohistoquímica del cerebro de sujetos con EA y otros trastornos neurodegenerativos, se evidenció que en algunas neuronas de la corteza y del hipocampo se presentaba una alteración en la morfología del AG (Stieber y cols., 1996).

Estudios más recientes, utilizando nuevos marcadores de las proteínas del AG, han corroborado la alteración de la morfología normal del AG, evidenciándose una fragmentación de este organelo en el citoplasma de algunas neuronas en el cerebro de sujetos que padecieron la EA (Antón F. cols., 2017; Baloyannis S.J. 2014). De manera interesante, en la mayoría de las células que presentaron esta alteración, no se observaron acumulaciones filamentosas de Tau, pero en varios casos sí se pudo observar una acumulación difusa de Tau en citoplasma de neuronas hipocampales las cuales presentaron alteraciones en la morfología del AG (Antón F. y cols., 2016; Antón F. y cols., 2017).

Cuando estas alteraciones ocasionadas por la proteína Tau se estudiaron en cultivos celulares *in vitro* para descifrar sus mecanismos de patogenicidad, se encontró que efectivamente, la sobreexpresión de Tau completa, así como de las diversas variantes mutadas de la misma (P301L, V337M, R406W), las cuales se presentan en algunas tauopatías (demencias de carácter genético por mutaciones de la proteína Tau), promovieron la fragmentación del AG en células cultivadas del hipocampo de rata. Este grupo también encontró fragmentación del AG en neuronas motoras del cerebro del ratón transgénico JNPL3, que expresa la forma mutada de Tau P301L (Liazoghli D. y cols., 2005). En otro trabajo donde se expresó la variante completa de Tau en diversas líneas celulares (cultivos primarios de astrocitos), observándose también una fragmentación aparente del AG (Yoshiyama y cols., 2003). No obstante, a pesar de que se describió este efecto, los datos e imágenes presentadas fueron muy limitadas y mucho menos se precisó el mecanismo molecular por el cuál la sobreexpresión de la proteína Tau producía este efecto.

Ante este escenario, en el presente estudio se buscó evidencia para comprender mejor los mecanismos moleculares que están involucrados en la alteración del AG por diversas variantes de la proteína Tau. Se pretendió

estudiar los efectos y mecanismos de acción que tendría la proteína Tau completa y sus variantes truncadas en el carboxilo terminal, sobre la estructuración del AG en células de neuroblastoma cultivadas *in vitro*. La selección de especies truncadas de Tau se debió, a que se ha propuesto que aquellas que presentan una truncación en los sitios Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ de su extremo carboxilo terminal, son especies más patológicas en la EA (Su, J.H. y cols., 2001; Basuto-Islas y cols., 2008). Como se mostró en nuestros resultados, tanto la variante completa de Tau como éstas formas truncadas produjeron una fragmentación clara del AG, la cual fue evidenciada por el uso de diversos anticuerpos y con la expresión del plásmido Turquesa2- Golgi, presentándose información morfológica y cuantitativa de este efecto con mayor precisión y calidad que en estudios previos.

Como lo mencionamos, las truncaciones del extremo carboxilo de Tau no potenciaron el efecto de dispersión del GA y esto concuerda con datos reportados anteriormente por nuestro grupo, en los que la expresión de la proteína Tau truncada en el Asp⁴²¹, tampoco incrementó significativamente el porcentaje de células que presentaron alteraciones en el núcleo y membrana plasmática, en comparación a la proteína Tau completa (Monroy R. y cols., 2013; Torrez C. y cols., 2016). El carácter patológico de estas truncaciones, basado en la utilización de modelos celulares por distintos grupos, continúa siendo motivo de controversia y requiere mayor investigación.

3. Los anillos anormales de microtúbulos producidos por la sobreexpresión de Tau son los responsables de la dispersión del AG.

A nivel subcelular es sabido que la red de microtúbulos y específicamente aquellos asociados con el AG, son importantes para mantener la organización y estabilidad de este organelo multilamelar. Los microtúbulos son un instrumento importante en el tráfico de vesículas a través de los elementos del Golgi, por lo que un cambio en su estructuración podría llevar a una alteración

en su morfología y función (Wu J. y cols., 2016; Sanders A.A. y Kaverina I. 2015). Esta dependencia ha sido comprobada con el uso de agentes desestabilizadores de microtúbulos, tales como Colchicina y Nocodazol. Se encontró que al utilizarse estos agentes y despolimerizar el citoesqueleto de Tubulina en células NRK y MDBK también se presentó una disgregación del AG (Rogalski A.A. y cols., 1984; Turner J.R y Tartakoff M.A., 1989).

De manera contrastante en nuestro estudio, la fragmentación del AG dependió de un empaquetamiento específico de los microtúbulos en forma de anillos pericéntricos, los cuales fueron producidos por la sobre-abundancia de la proteína Tau en el espacio citoplásmico. Este ensamble contrasta con los paquetes discontinuos de microtúbulos generados por Taxol, los cuales no fueron capaces de producir una fragmentación del AG. Una posible explicación sería que el Taxol se une de manera específica y saturable en el sitio interno de los microtúbulos, permitiendo la polimerización de Tubulina en forma de matrices paralelas y haces estables. Tau, por el contrario, se asocia a la superficie de los microtúbulos a través de los puentes disulfuro de las cisteínas 291 y 322 presentes en el segundo y tercer repetido (Martinho M. y cols., 2018).

Por otra parte, el tratamiento con BFA, una droga que es conocida por disgregar el AG al bloquear el tráfico anterógrado entre este organelo y el Retículo endoplásmico, produjo un efecto moderado en su dispersión, pues las vesículas formadas aún permanecieron cerca de la región centrosomal. (Figura 16A). Considerando que la dispersión del AG producida por Tau parecía exceder al producido por el tratamiento con BFA, corroboramos que esta alteración se produjo por una fuerte remodelación de los microtúbulos. Esto se apoya por el hecho de no haber encontrado algún cambio significativo en el citoesqueleto de Tubulina bajo la incubación con BFA.

Por otra parte, la sobreexpresión de Tubulina (con el plásmido Cherry-Tubulina) en las células de neuroblastoma, tampoco fue factor determinante

para conducir el ensamble de esta proteína en forma de anillos pericentricos de microtúbulos; de hecho, no se observó cambio alguno en la típica distribución radial de estas estructuras (Figura 9). Cuantitativamente determinamos la elevada colocalización que existe entre la proteína Tau y estos anillos de Tubulina, llevándonos a concluir que es esta proteína asociada, la responsable de dirigir una polimerización específica de la Tubulina a un estado de ensamble patológico, situación que consecuentemente afecta la distribución y morfología de otros organelos como el AG. Algunas propiedades de estos anillos anormales se discuten adelante.

No obstante, a pesar de proponer que la dispersión del AG es resultado de una fuerza mecánica y cambios en la tensegridad intracelular de las células producida por los anillos anormales de Tubulina, no se puede descartar que la proteína Tau por sí misma pudiera interaccionar con diversas proteínas que integran los diferentes dominios que componen al AG y desestabilizar las interacciones entre estas proteínas y la estructura lamelar.

En función de esto, también es factible que Tau pudiera interferir y alterar la función de algunas proteínas que contribuyen no solo a la estabilidad de AG, como GRASP65 y GRASP55; sino también, aquellas que participan en el tráfico vesicular tales como GM130 (Lowe M. y cols., 1998), p115 (Chiu R. y cols., 2002) y Golgina-160 (Hicks S.W. y cols., 2002). Además, existe una proteína llamada GMAP-210 que se comporta como la mayoría de las MAP'S (proteínas asociadas a microtúbulos) y algunos datos bioquímicos han evidenciado que la GMAP-210 es una proteína asociada al AG y que interactúa directamente con los microtúbulos (Rios R.M. y cols., 2004). Consistente con este dato, la sobreexpresión de la proteína GMAP-210 induce perturbaciones en el AG; y por lo tanto, esta información nos hace suponer que la proteína Tau podría tener un efecto similar. Para probar interacción directa entre Tau y las mencionadas proteínas del AG, nuevos experimentos se conducen actualmente en nuestro laboratorio.

4. Dominios de la proteína Tau responsables de la fragmentación del AG

Como se mencionó anteriormente, en nuestro modelo de células SH-SY5Y donde se sobre-expresó la proteína Tau ninguna de las formas truncadas en el carboxilo terminal incrementó el grado de fragmentación del AG, a pesar de su supuesto carácter patológico en la EA (Su, J.H. y cols., 2001; Basuto-Islas y cols., 2008). En este sentido, quizás exista una diferencia temporal en el momento en el cual estas especies incrementan su toxicidad y parece ser que esto ocurre cuando la molécula comienza a autoagregarse. Se ha descrito que estas dos truncaciones incrementan la velocidad de polimerización de Tau *in vitro* (Abraha y cols., 2000; Glamblin y cols., 2003), con lo cual uno debería suponer que esta propiedad favorece la formación de polímeros anormales de Tau, y por lo tanto la aparición de esos FHAs y marañas neurofibrilares en la enfermedad. En su forma monomérica, como se analizó en este trabajo, algunos efectos citotóxicos de esta proteína quizás no dependan de la pérdida de su carboxilo terminal, y más bien la contribución de otros dominios sería más relevante. En virtud de esto, decidimos caracterizar qué otras regiones de la molécula podrían estar involucradas en establecimiento del fenotipo con AG fragmentado en las células, y la expresión de dos variantes que carecían de fragmentos variables en su extremo amino (Tau150-441; Tau123-391) produjeron fragmentación del AG al mismo nivel generado por la Tau completa y otras variantes truncadas (Figura 14C). Este resultado nos indicó que el amino terminal no era determinante en promover la dispersión del AG.

Debido a que la única región que fue común en todas las variantes de Tau ensayadas es la de los dominios repetidos de la molécula con elevada afinidad por los microtúbulos, entonces pudimos concluir que ésta es la región clave en promover la aparición de anillos anormales de Tubulina, y como consecuencia, la inducción del fenotipo celular con AG fragmentado. La integridad de esta región sería necesaria para promover estos efectos y los datos reportados por Amadoro y cols. (2004), donde la expresión de una variante parcialmente

truncada en los dominios repetidos (Tau1-230) en células MDCK solo se asoció parcialmente a los microtúbulos, apoya nuestra suposición.

En nuestro laboratorio la creación y ensayo reciente de una variante truncada en el Asp²¹⁴ (producto del corte por caspasa-2) que secciona parcialmente la región de los dominios repetidos, parece tener menos capacidad de formar los anillos anormales de Tubulina, sin embargo, dichos experimentos están bajo comprobación. Será necesario evaluar si esto también correlaciona con un cambio en el nivel de fragmentación del AG.

5. Estabilidad y resistencia de los anillos anormales de Tubulina que son producidos por la expresión de Tau en células de neuroblastoma.

En este trabajo hemos propuesto que la formación de anillos anormales de Tubulina es un proceso específico conducido por la abundancia de Tau en el soma celular. Previo a nuestro trabajo, algunas evidencias incipientes existían sobre el potencial papel inductor de empaquetamiento de Tubulina promovido por la proteína Tau (Samsonov A. y cols., 2004), sin embargo, quizás por su ausencia, o por haber pasado desapercibidos con las técnicas de marcaje y observación microscópica, anillos propios como los descritos aquí no fueron del dominio común.

No obstante, un trabajo relevante que apoyaría varias de nuestras aseveraciones está relacionado con el análisis de las propiedades funcionales de otra proteína del grupo de las MAPs; MAP1B, la cual normalmente se encuentra distribuida en el soma de las células neuronales y las dendritas (Moreno FJ. y cols., 1999). Cuando esta proteína se sobreexpresó en células COS, ciertas estructuras en forma de anillos irregulares de microtúbulos se presentaron en algunas células (Takemura y cols., 1992); y similar a lo observado por nosotros, estas estructuras presentaron incremento en su nivel de acetilación. Es sabido que algunas modificaciones postraduccionales le

confieren estabilidad a los microtúbulos y así como la acetilación, se ha hipotetizado que otras modificaciones como la detirosinación y poliglutaminación podrían compensar algunas deficiencias en la desestabilización de microtúbulos susceptibles en neuronas de cerebros de sujetos que desarrollaron la EA (Yoshiyama Y. y cols., 2003). Aunque esta evidencia presentada proviene de otra proteína del grupo de las MAPs, resulta interesante conocer más sobre las posibles implicaciones fisiológicas y patológicas que tienen estas proteínas que comparten homologías en regiones específicas (dominios repetidos) que les dan su carácter de estabilizadoras del citoesqueleto de Tubulina.

Otra propiedad interesante que fue estudiada en los anillos anormales de microtúbulos en nuestras células fue su resistencia a la acción despolicimerizante del Nocodazol; y concomitantemente, la capacidad de ser formados por Tau, a pesar de haber sido previamente estabilizados por Taxol (Figura 21). Esto nos indicó, que Tau tiene una dominante dirección y conducción del ensamble de los microtúbulos que permite la formación de estructuras muy estables; pero que sin embargo, y como se describió en ésta y otras investigaciones de nuestro grupo, esta propiedad tendría a corto o largo plazo consecuencias en la estructura y funcionalidad de las neuronas. La posible reversibilidad en la formación de estos anillos por otras moléculas accesorias, más allá del uso de agentes químicos, sería un interesante tópico de investigación a futuro.

6. El citoesqueleto de Actina no participa en la estabilidad del AG en células de neuroblastoma.

Aunque se ha documentado que el citoesqueleto de Actina participa en la adecuada estructuración del AG en diversos modelos celulares (Zilberman Y. y cols., 2011), en nuestras células de neuroblastoma que sobreexpresaron a la proteína Tau, no observamos alteraciones en la organización normal de este

citoesqueleto. La propia desestabilización de la Actina-F con drogas que afectan su estabilidad fue insuficiente para producir una dispersión del AG en las mismas células (Figura 22). Esta diferencia la atribuimos a propiedades particulares en los elementos que regulan las interacciones entre citoesqueleto y organelos intracelulares en cada contexto celular. Previamente hemos reportado en líneas celulares de origen glial, que la sobreexpresión de Tau sí afecta el ensamble de Actina-F, así como la formación de anillos anormales de microtúbulos (Torrez-Cruz y cols., 2016). Hemos estudiado la relación patológica entre estos dos citoesqueletos y encontrado una acción cooperativa para alterar la estructuración de la membrana plasmática, todo promovido por la presencia de Tau en las células gliales. Será interesante a futuro conocer si la organización de AG es alterado en estas células y cuál sería la participación de ambos componentes del citoesqueleto celular.

7. Significado funcional de la dispersión del AG por la sobreexpresión de la proteína Tau en células de neuroblastoma.

Como se mencionó previamente, es importante resaltar que una de las principales funciones del AG es la maduración de las proteínas; es decir, su glicosilación y adecuada distribución intracitoplásmica (Climer L.K y cols., 2018). Debido a esto, se estudió si la fragmentación del AG producida por Tau, resultaba en alguna alteración funcional en alguno de los diversos mecanismos intracelulares mediados por este organelo, como lo es la glicosilación de proteínas. Se encontró una disminución del contenido de carbohidratos totales en las células que expresaron a la proteína Tau, resultado que comprueba el significado patológico que tendría la proteína Tau, afectando indirectamente el procesamiento adecuado de proteínas que transitan por este organelo y que cumplen funciones primordiales en las células. Este efecto a corto o mediano plazo podría llevar transitoriamente a una muerte neuronal. Extrapolando a la situación real en la enfermedad, esta consecuencia observada en nuestro modelo celular podría ser una de las

acciones iniciales que se presentan en las neuronas alteradas de pacientes, cuando la proteína Tau se acumula anormalmente en su forma monomérica en el compartimento somatodendrítico. De hecho, existe evidencia de una disminución de ácido siálico, uno de los componentes importantes en el proceso de glicosilación de proteínas, en el cerebro de sujetos que desarrollaron la EA (Zhang Zui y cols., 2017).

En general con este trabajo podemos concluir que, añadimos evidencia morfológica y estructural sobre la formación de anillos anormales de microtúbulos generados por la sobreabundancia de la proteína Tau en el soma neuronal. Parece ser que la región responsable de la formación de estos anillos de microtúbulos es la zona de los dominios repetidos de la molécula de Tau. Como consecuencia de estas acciones promovidas por Tau, se evidenció una fragmentación del AG, que se tradujo en una alteración en los niveles de glicosilación total de proteínas. Extrapolando a la EA, la redistribución inicial de Tau al compartimento somatodendrítico de las neuronas podría contribuir a la remodelación anormal de los microtúbulos, dispersión del AG y alteración en la maduración y procesamiento de proteínas.

CONCLUSIONES

- 1.- El arreglo del citoesqueleto de Tubulina en forma de anillos corticales es un efecto específico de la proteína Tau.
- 2.- La formación de anillos de microtúbulos con la resultante dispersión del aparato de Golgi depende de la presencia de los dominios repetidos de la proteína Tau.
- 3.- La alteración morfológica del aparato de Golgi tiene como consecuencia una disminución en el nivel de glicosilación de proteínas.
- 4.- La dispersión del aparato de Golgi producida por la proteína Tau es independiente del citoesqueleto de Actina.

PERSPECTIVAS

En experimentos futuros se pretende investigar si la alteración del AG altera la expresión de proteínas constituyentes de este organelo, así como la construcción de una variante de la proteína Tau con mutaciones puntuales en la región de repetidos para corroborar que esta región es la encargada de generar la disgregación del AG

REFERENCIAS

Abraha, A., N. Ghoshal, T.C. Gambelin, V. Cryns, R.W. Berry, J. Kuret, and L.I. Binder. 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3737-45.

Amos LA. 2004. Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem* 2153-60

Anton F.A., Aoaricio T.G., Tapia S., DeFelipe J., Muñoz A. 2016. Morphometric alterations of golgi apparatus in AD are related to tau hyperphosphorylation. *Neurobiology of Disease.* 97:11-13.

Antón F.A., Merchán R.J., Avila J., Hernández F., DeFelipe J., Muñoz A., 2017. Phospho-tau accumulation and structural alterations of the Golgi apparatus of cortical pyramidal neurons in the P301S tauopathy mouse model. *JAD-170332*

Arriagada P., Growdon J., Hedley-Whyte E., Hyman B.1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer disease. *Neurology*

Baloyannis S.J. 2014. Golgi Apparatus and Protein Trafficking in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 42 .JAD-132660 IOS Press

Basurto I., Luna M.,Guillozet B., Binder L.,Mena R.,García S. 2008. Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer. *J Neuropathol Exp. Neurol.*67(5)p.470-83

Baumann K., Mandelkow E.,Biernat J., Piwnica-Worms H., Mandelkow E. 1993.Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *Febs Letts*

Bhaskar K.,Yen SH.,Lee G. 2005. Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and Tau. *J. Biol Chem* 35119-25

Binder, L.I., A.L. Guillozet-Bongaarts, F. Garcia-Sierra, and R.W. Berry. 2005. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1739:216-23.

Chiu R., Novikoy L.,Mukherjee S., Shields D. 2002. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol* 159,637-648

Cleveland D.W., Shu-Ying Hwo., Kirschener M.W. 1997. Purification of Tau, a Microtubule-associated Protein that Induces Assembly of Microtubules from Purified Tubulin. *J. Mol. Biol.* 116,207-225.

Climmer L.K., Hendri D.R., Lupashin V.V. 2018. Conserved oligomeric Golgi and Neuronal Vesicular Trafficking. *Handb Exp Pharmacol.*245: 227–247. doi:10.1007/164_2017_65.

Dehmenlt L. and Halpain S. 2004. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Protein family review* 6:204

Diao A., Rahman D., Pappin D., Lucocq J. Lowe M. 2003. The coiled-coil membrane protein Golgi-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. *J Cell Biol.* 201-2012

Ebneth A., Godemann R., Stamer K., Illenberger S., Trinczek B., Mandelkow E., E. Mandelkow. 1998. Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease. *The Journal of Cell Biology, Volume 143, 777–794.*

Farah C., Perreautl S., Liazoghli D., Desjardins M., Anton A., Lauzon M., Paiement J., Leclerc N. 2006. Tau Interacts With Golgi Membranes and Mediates Their Association With Microtubules. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63:710-724.

Gamblin, T.C., F. Chen, A. Zambrano, A. Abraha, S. Lagalwar, A.L. Guillozet, M. Lu, Y. Fu, F. Garcia-Sierra, N. LaPointe, R. Miller, R.W. Berry, L.I. Binder, and V.L. Cryns. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10032-7.

Garcia S.F., Hauw JJ., Duyckaerts C., Wischik CM., Luna M.J., Mena R. 2000. The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old. *Acta Neuropathol* 2000;29-25

García-Sierra, F., N. Ghoshal, B. Quinn, R.W. Berry, and L.I. Binder. 2003. Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 5:65-77.

Goedert M., Crowther RA., Olesen OF., Jakes R. 1992. The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Letters* Vol. 309

Gonatas K., Stieber A., Mourelatos Z., 1996. In Alzheimer's Disease the Golgi Apparatus of a Population of Neurons without Neurofibrillary Tangles Is Fragmented and Atrophic. . *American journal of Pathology, Vol. 148, No. 2*

Hicks SW., Machamer CE. 2002. The NH₂-terminal domain of Golgin-160 contains both Golgi and nuclear targeting information. *J Biol Chem* 277, 35833-35839

Infante C, Ramos-Morales F, Fedriani C, Bornens M, Rios RM. 1999. GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol* 145, 83-98

Jarero B.JJ., Luna M., Mena R., Kristofikova Z., Ripova D., Perry G., Binder L. Garcia S. 2013. Proteolytic cleavage of polymeric tau protein by caspase-3: implications for Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*;72(12):1145-61.

Kar S., Florence GJ., Paterson I., Amos LA. 2003. Discodermolide interferes with the binding of tau protein tau microtubules. *FEBS Letters* Vol.539

Kreis TE., Scales SJ., Pepperkok R. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell Press* 1137-58

Liazoghli, D., S. Perreault, K.D. Micheva, M. Desjardins, and N. Leclerc. 2005. Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol.* 166:1499-514.

Lowe M., Rabouille C., Nakamura N., Watson R., Jackman M., Jamsa E., Rahman D., Pappin DJ., Warren G. 1998. Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* 94, 783-793

Makrides V., Shen T., Bhatia R., Smith B., Thimm J., Lal R., Feinstein S. 2003. Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *JBC* 33298-304

Martinho M., Allegro D., Huvent I., Chabaud C., Etienne E., Kovacic H., Guigliarelli B., Peyrot V., Landrieu I., Belle V., Barbier P. 2018. Two Tau binding sites on tubulin revealed by thiol-disulfide exchanges. *Scientific Reports* 8:13846

Miller PM, Folkmann AW, Maia AR, Efimova N, Efimov A, Kaverina I. 2009. Golgi derived CLASP dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol* 11, 1069-1080.

Mondragon-Rodriguez, S., R. Mena, L.I. Binder, M.A. Smith, G. Perry, and F. Garcia-Sierra. 2008. Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34:62-75.

Monroy R., Basurto I., Mena R., Cisneros B., Binder L., Avila J., Garcia S. 2013. Alteration in the nuclear architecture produced by the overexpression of tau protein in neuroblastoma cells. *J. Alzheimer's Dis.* 34:62-75.

Moreno F., Diaz-Nido J., Jimenez JS., Avila J. 1999. Distribution of CK2, its substrate MAP1B and phosphatases in neuroal cells. *Mol Cell Biochem* (1-2);201-5

Pei J.J., Braak E., Braak H., Grundke I., Iqbal K., Winblad B., Cowburn R. 1999. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 beta in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J. Neurophatol Exp. Neurol*

Perez M.J., Vergara-Pulpar K., Jara C., Cabezas-Opazo F., Quintanilla. 20018. Caspase-cleaved tau impairs mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 55, 1004-1018.

Quintanilla R., Matthews R., Dolan P., Jhonson G. 2009. Caspase-cleaved Tau Expression Induced Mitochondrial Dysfunction in Immortalized Cortical Neurons. *JBC Vol.284 no. 28 pp.18754-18766*

Radulescu AE, Mukherjee S, Shields D.2011.The Golgi protein p115 associates with gamma-tubulin and plays a role in Golgi structure and mitosis progression. *JBiolChem*286, 21915-21926.

Rios Rosa M., Sanchis A., Tassin A.M., Fedriani C and Bornens M. 2004. GMAP-210 Recruits γ -Tubulin Complexes to cis-Golgi Membranes and Is Required for Golgi Ribbon Formation. *Cells Press.* ;118(3):323-35.

Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM.2009. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* 28, 1016-1028.

Roberson E., Scarse-Lvie K., Palop J., Yan Fregrong., Cheng I., Wu T.2007. Reducing Endogenous Tau A meliorates Amyloid B-Induced Deficits in a Alzheimer's disease Mouse Model. *Science* 1141736

Rogalski A. BERGMANN J., SINGER J. 1984.Effect of Microtubule Assembly Status on the Intracellular Processing and Surface Expression Integral Protein of the Plasma Membrane . *The Journal of cell biology* .99 -1101-1109

Rogalski AA., Bergmann JE., Siger SJ., 1984. Effect of microtubule assembly status on the intracellular processing and Surface expression of an integral protein of the plasma membrane. *J Cell Biol* 99, 1101-1109

Samsonov A., Yu J., Rasenick M., Popov S. 2004. Tau interaction with microtubule in vivo. *Journal of cell Science* 117,6129-6141.

Sanders A.,Kaverina I.2015. Nucleation and Dynamics of Golgi-derived Microtubules. *Frontiers in Neuroscience* .00431

Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*

Stieber A., Mourelatos Z., Gonatas N. 1996. In Alzheimer's disease the Golgi apparatus of a population of neurons without neurofibrillary tangles is fragmented and atrophic. *American journal of Pathology, Vol. 148, No. 2*

Su JH., 2001. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain:correlation with Alzheimer pathology. . *Brain Res 898(2):p350-7*

Takemura R., Okabe S., Umeyama T., Kanai Y., Cowan N., Hirokawa N.1992. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or TAU. *Journal of Cell Science* 103, 953-964

Torres C.F., Rodriguez C.F.,Escobar H.,Barragan A., Basurto I.,Ripova D.,Avila J.,GarciaS. 2016. Expression of Tau Produces Aberrant Plasma Membrane Blebbing in Cells through RhoA-ROCK-Dependent F-Actin Remodeling. *J. Alzheimer's Dis.* 103, 953-964

Turner J.R. y Tartakoff M.A. 1989. The Response of the Golgi Complex to Microtubule Alterations: The Roles of Metabolic Energy and Membrane Traffic in Golgi Complex Organization. *The Journal of Cell Biology*, Volume 109. 0021-9525

Wu J., Heus C.,Qingyang L. Bouchet B., Noordstra I., Jliang K., Hua S. Martin M., Yang C.,2016 Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus. *CellPress.10.1016.0800*

Yadav S.,Puri S., Linstedt A.2009. A Primary Role for Golgi Positioning in Directed Secretion, Cell Polarity and Wound Healing. *Mol Biol Cell* 1728-1736

Yoshiyama, Y., B. Zhang, J. Bruce, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2003. Reduction of detyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. *J Neurosci.* 23:10662-71

Yu D., Feinstein S., Valentine M., 2015. Effect of wild type tau and disease-linked tau mutations on micritubule organization and intracelular trafficking. *Journal of Biomechanics* 1280-1285

Zhanga Z., Takeda U., Foyeza T., Ohtake N., Narentuyaa, Akatsu H., Nishitsujid K. Makoto M.,Wyss-Corayg, Kadomatsua K., Uchimuraa K., 2017.Dficiency of a sulfotransferase for sialic acidmodified glycans mitigates Alzheimer's pathology. *PNAS* E2947–E2954.

Zilberman Y., Alievab O., Miserey L., Lichtensteina A., Zvi Kama, Sabanaya H., Bershadskeya A. 2011. Involvement of the Rho-mDia1 pathway in the regulation of Golgi complex architecture and dynamics. *Molecular Biology of the Cell*. E11-01-0007.