Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Estudio de la regulación de la velocidad de síntesis y de la fosforilación de la proteína TAU en el cerebelo de ratón normal durante la sinaptogénesis

Autor: Guillermo Javier Vilá Ortiz

Director: Dr. Víctor Idoyaga Vargas

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"
Buenos Aires, Argentina

Octubre de 1996

Tesis para la Licenciatura en Ciencias Biológicas

№ 4 4 0

ABREVIATURAS:

MAP: proteína asociada a microtúbulos.
MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
kb: kilobases.
aa: aminoácidos.
kDa: kilodaltons.
P(#): edad postnatal en días.
HMW-Tau: proteína Tau de alto peso molecular.
Ser: serina.
Pro: prolina.
Thr: treonina.
PP-2A: proteín fosfatasa 2A.
PP-2B: proteín fosfatasa 2B.
NGF: factor neurotrófico neuronal.
MAP 1A: proteína asociada a microtúbulos 1A.
MAP 1B: proteína asociada a microtúbulos 1B.
UA: unidades arbitrarias.
SNC: sistema nervioso central.
CGE: capa granular externa.
CGI: capa granular interna.
DMEM: medio esencial mínimo de cultivo Dulbecco.
TBS: buffer Tris salino.
PMSF: fluoruro de fenil-metil sulfonilo.
PBS: buffer fosfato salino.
SDS: dodecil sulfato de sodio.
DTT: ditiotreitol.
DOC: deoxicolato.
EDTA: ácido etilen diamin tetra acético.
NP-40: Tergitol NP-40 (Nonilfenóxido polietóxido etanol).
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.
MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.
NaF: fluoruro de sodio.

Índice

	Página
Introducción	1
El cerebelo como modelo experimental para la sinapsis	2
Citoesqueleto	3
Características estructurales de Tau	4
Fosforilación y unión de Tau a microtúbulos	6
Localización de Tau	8
Tau y cerebelo	8
Sinaptogénesis y Tau	9
Mutante *staggerer*	11
Materiales y métodos	13
a) Materiales :	14
Animales	14
Precursores radioactivos	14
Medios de incubación	14
Inhibidores de proteasas	15
Anticuerpos	15
b) Métodos :	17
Extracción de Tau	17
Incubación de tejidos	18
a) Obtención de las mini-unidades de tejido	18
b) Siembra e incubación	18
Inmunoprecipitación	19
Geles y Electroforesis	20
a) Electroforesis en SDS-PAGE	20
b) Tinción de proteínas en geles	20
Tinción con Coomasie	20
Tinción con plata	21

c) Transferencia 21
d) Western blot 21
Fraccionamiento subcelular 22
Radioactividad 23
Inmunocitoquímica 23
Análisis de los datos 23

Resultados 24
Puesta a punto de las condiciones experimentales 25
a) Especificidad del anticuerpo policlonal 25
b) Enriquecimiento de la proteína Tau 25
Distribución de las distintas isoformas de Tau durante el desarrollo postnatal 27
Ubicación subcelular de Tau 32
Inmunoprecipitación de Tau marcada 34
a) Elección del anticuerpo a utilizar 34
b) Síntesis de Tau 35
c) Fosforilación de Tau 39
d) Relación entre la síntesis y la fosforilación de Tau: efecto de la cicloheximida 40
Tau y su relación con el mutante *staggerer* 45
a) Western blot 45
b) Inmunocitoquímica 47

Discusión 49
Heterogeneidad de Tau 50
Ubicación subcelular de Tau 52
Síntesis de Tau 53
Fosforilación de Tau 54
a) Importancia de la fosforilación de Tau 54
b) Fosforilación y crecimiento axonal 55
Mutante *staggerer* 56

Conclusiones 58

Objetivos:

- Identificar que cambios se producen en Tau a nivel de la síntesis.
- Definir cual es el rol que juega la fosfo/defosforilación de la proteína Tau en la cadena de eventos moleculares durante el proceso de estabilización sináptica en el cerebelo de ratón.

Hipótesis:

Los axones de las células grano deben detener su crecimiento cuando se tocan con las células de Purkinje para que las sinapsis permanezcan estables. Nuestra hipótesis es que un importante regulador del crecimiento axonal es Tau. Esta regulación estaría mediada por modificaciones en la velocidad de síntesis y/o la fosforilación neta de las distintas isoformas de Tau durante el desarrollo.

INTRODUCCIÓN

El cerebelo como modelo experimental para la sinapsis

La formación de las conexiones entre las células nerviosas (sinapsis) es el resultado de una compleja secuencia de eventos que se producen durante el desarrollo. La sinaptogénesis se alcanza solo cuando el contacto entre las dos células es estabilizado y mantenido (Changeaux and Danchin, 1976).

A la sinaptogénesis la podemos dividir en tres etapas: a) *Selección del camino axonal* (crecimiento axonal), b) *Selección del blanco* y c) *Selección del sitio de residencia*.

El cerebelo, como modelo experimental, es muy útil para estudiar la sinaptogénesis debido al bajo número de poblaciones neuronales y de aferencias (Palay and Chan-Palay, 1974). Hay 3 tipos celulares gliales y 5 tipos celulares neuronales (las células de Purkinje y las grano son las más abundantes). El cerebelo contiene dos tipos de axones: aquellos que ya están presentes a P0 (los axones de las células de Purkinje, de las fibras musgosas y trepadoras) y aquellos que pertenecen a los diferentes tipos de interneuronas y que son formados durante las dos o tres primeras semanas después del nacimiento (los axones de las células grano) (**Esquema 1**) (Altman, 1972).

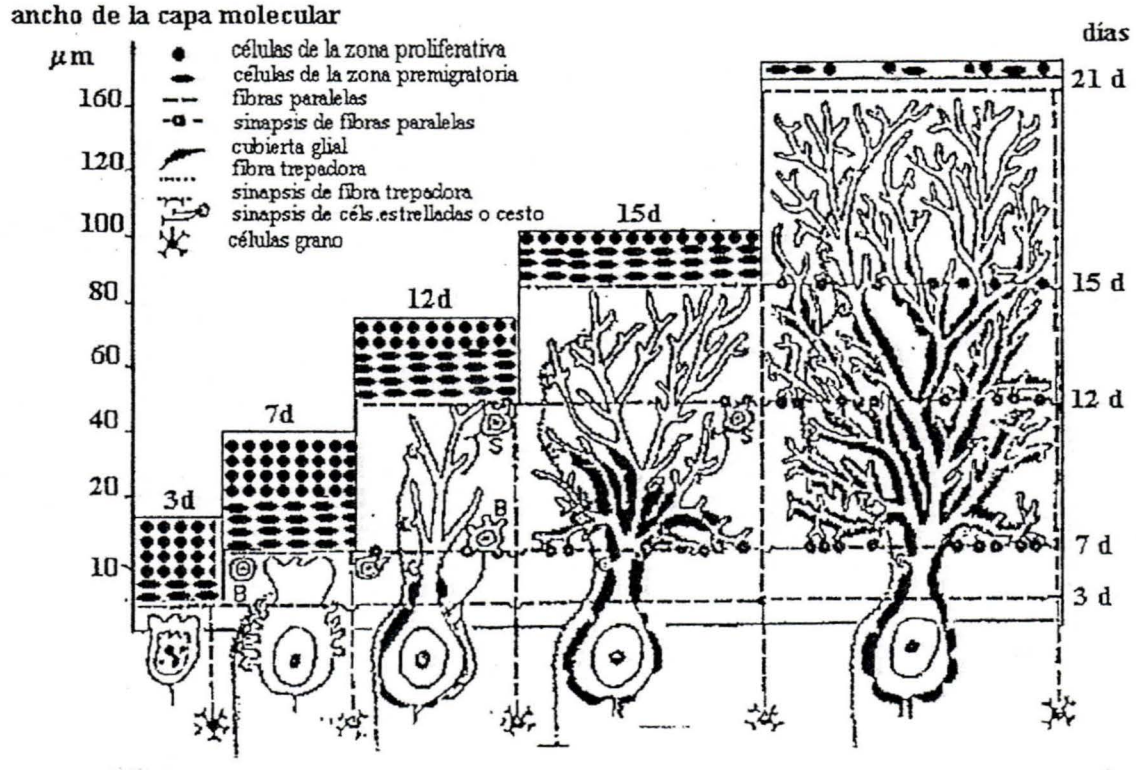
Además, la mayoría de las sinapsis (90%) que se encuentran en la capa molecular del cerebelo se dan entre segmentos sinápticos (o varicocidades) de las fibras paralelas y espinas dendríticas de las células de Purkinje (Palay and Chan-Palay, 1974).

Otra de las grandes ventajas que presenta el cerebelo es que las etapas de sinaptogénesis se encuentran definidas durante el desarrollo postnatal.

a) crecimiento axonal y reconocimiento de su célula blanco (entre 2 y 10 días postnatales (P2 y P10).
b) estabilización sináptica (entre P11 y P21) (Landis and Sidman, 1978).

Esquema 1:

Algunos de los eventos en la maduración de las células de Purkinje y de las células grano. B: células en cesto (Basket cell); S: células estrelladas (Stellat cell). (*Tomado de Altman J., 1972).*



Citoesqueleto

El citoesqueleto está constituido por una compleja red de proteínas filamentosas encargadas de organizar el citoplasma celular. Su componente principal son los microtúbulos que están formados por dímeros de tubulina y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), por ej.: MAP1A, MAP1B, MAP2, Tau. Estas MAPs tienen como función principal la polimerización y estabilización de los microtúbulos.

Las neuronas poseen proyecciones celulares que están especializadas en la transmisión de estímulos. Estas proyecciones pueden ser de dos tipos: a) *dendritas*, que parten de un tronco principal y a medida que se van ramificando disminuyen su diámetro, y b) *axones*, que son más extensos y tienen el mismo diámetro en toda su longitud. Estas proyecciones celulares se diferencian por el

tipo de MAPs que tienen asociadas. Mientras que MAP2 se encuentra en las dendritas, Tau se encuentra principalmente en los axones (Cleveland et al., 1977). Todas las MAPs poseen una región homóloga conservada en el extremo C-terminal que está relacionada con la unión a los microtúbulos (Gustke et al., 1994).

Características estructurales de Tau

Tau es un gen único (Drubin et al.,1984) del cual surge la diversidad tanto por el corte y empalme de mensajeros (splicing alternativo) (Drubin and Kirschner, 1986; Drubin et al., 1988; Himler, 1989) como por múltiples estados de fosforilación (Kosik and Cáceres, 1991). El gen tiene una longitud superior a las 100 kb y posee al menos 15 exones, la mayoría de los cuales funcionan como cassettes que son cortados y empalmados alternativamente. El único exón cassette de Tau que tiene una función asignada es el 10 cuya presencia aumenta la afinidad de la proteína por los microtúbulos. Los exones 2 y 3 al igual que el 10 son regulados durante el desarrollo (Goedert et al., 1989; Kosik et al., 1989).

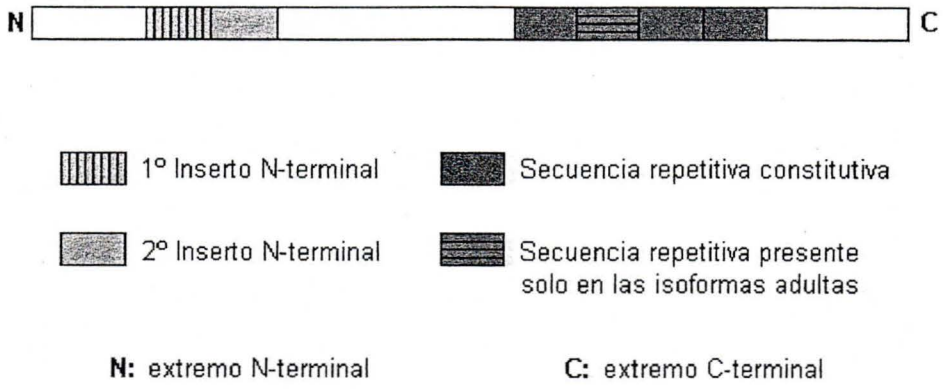
Distintas isoformas de Tau son expresadas en las neuronas dependiendo del estadío del desarrollo en el que se encuentren (Francon et al., 1982). Se han visto entre 6 y 7 isoformas de Tau en el cerebro de ratón con un peso molecular que varía 50 y 68 kDa en geles SDS-PAGE monodimensionales y más de 60 especies en geles bidimensionales (el número y tamaño de las bandas varía según los autores) (Cleveland et al., 1977; Francon et al., 1982; Drubin et al., 1984; Larcher et al., 1992). Al defosforilar el número de bandas de Tau decrece con una concomitante baja en el peso molecular aparente. Después de 48 horas de tratamiento con fosfatasa alcalina solo quedan 4 bandas de las 6 ó 7 observadas (Larcher et al., 1992). Tau también posee una isoforma de alto peso molecular (HMW-Tau) de aproximadamente 120 kDa que se encuentra principalmente en regiones periféricas del SNC (Goedert et al., 1992; Couchie et al., 1992).

Las diferentes variantes de Tau difieren por la presencia de 3 ó 4 secuencias repetitivas localizadas en la mitad del extremo C-terminal y por la presencia o ausencia de insertos de 29 ó 58 aa. localizados en la mitad del N-

terminal (la función de estos insertos es desconocida). La secuencia repetitiva 2 del extremo C-terminal solo es expresada en las variantes adultas (Aniello et al., 1991).

Esquema 2:

Estructura de la proteína Tau.

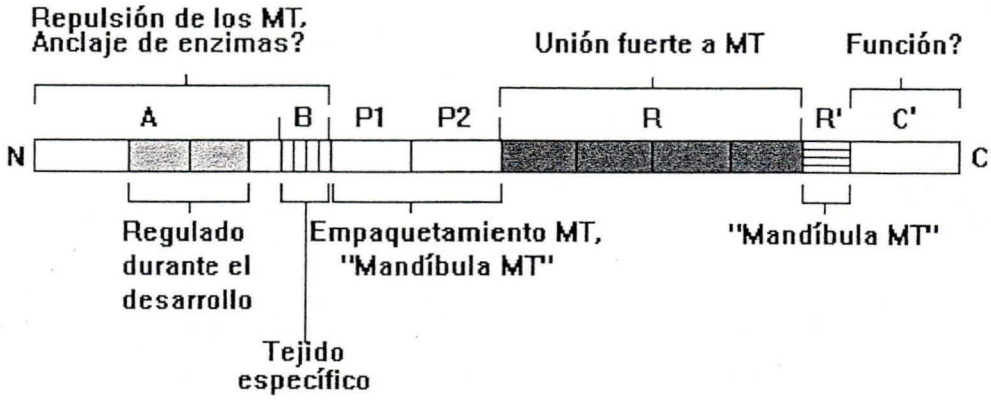


En el cerebro embrionario Tau consiste de 2 isoformas (una juvenil, de aproximadamente 48 kDa, y otra que corresponde a la isoforma de menor peso molecular de las adultas). A medida que transcurre el desarrollo, la forma juvenil desaparece y van apareciendo las otras 5 isoformas. Los principales cambios ocurren durante la segunda semana postnatal, después los cambios solo afectan la relativa abundancia de las diversas isoformas (Larcher et al., 1992).

Tau se une al extremo acídico C-terminal de la tubulina (Littauer et al., 1986) por medio del extremo C-terminal. Las regiones repetitivas solas, que se encuentran en este extremo, se unen débilmente a los microtúbulos. Sin embargo esta unión es fuertemente incrementada por la combinación de estas regiones más una o dos de las regiones flanqueantes, las cuales pueden ser vistas como "mandíbulas" que posee Tau para "envolver" la superficie de los microtúbulos. La transición de la forma con 3 a 4 secuencias repetitivas está regulada por el desarrollo y se da aproximadamente a P8 en el cerebro de rata (Kosik et al. 1989; Gustke et al., 1994).

Esquema 3:

Dominios y probables funciones de los dominios de Tau.



N: extremo N-terminal **B:** dominio básico
C: extremo C-terminal **P:** dominio rico en prolinas y básico
MT: microtúbulos **R:** "quinta" secuencia repetitiva
A: dominio acídico **R':** cola C-terminal
C: cola C-terminal

Fosforilación y unión de Tau a microtúbulos

Los microtúbulos de estadíos fetales o de recién nacidos se ensamblan muy pobremente *in vitro* (Binder et al. 1985). Una de las posibles causas de porque sea menor esta tasa de ensamblado es la presencia de solo 3 secuencias repetitivas en las formas juveniles de Tau. La segunda, y más importante, es que la fosforilación de Tau disminuye la polimerización de los microtúbulos (Tau defosforilada se une con más afinidad a los microtúbulos) (Lindwall and Cole, 1984a). Probablemente este tipo de fosforilación debe tener lugar en la mitad del extremo C-terminal reduciendo así las interacciones carga-carga con la tubulina (Hagestedt et al., 1989) (el valor de 1 molécula de Tau cada 2 dímeros de tubulina pasa a 1 molécula cada 6 dímeros bajo fosforilación (Gustke et al., 1994)).

Hay una gran cantidad de kinasas que fosforilan Tau, tal vez entre las más importantes se encuentren la Proteín Tau Kinasa 1 / Glicógeno Sintasa Kinasa-3 β (TPK1/GSK-3β) y la MAP kinasa, debido a que ambas están asociadas a los microtúbulos en el cerebro, y además su actividad se estimula bajo condiciones

de ensamblado (Ishiguro et al.,1992; Mandelkow et al., 1992). Un hecho notable es que casi todos los sitios fosforilables, con excepción de las Ser262 y Ser356, son parte de motivos Ser-Pro (SP) o Thr-Pro (TP) (Tau posee 7 y 10 respectivamente) (Mandelkow and Mandelkow, 1993).

Muchos de los dominios Ser/Thr-Pro fosforilables que están ubicados en las regiones flanqueantes, que son las que se unen fuertemente a los microtúbulos, no tienen un gran efecto en la unión a los microtúbulos o en el ensamblado, mientras que la Ser-262 que está situada en una región de unión débil en la región repetitiva, tiene una fuerte influencia en la unión a los microtúbulos (Drewes et al., 1995).

Esquema 4:

Influencia de la fosforilación de la Ser262 en la interacción de Tau con los microtúbulos.

N: extremo N-terminal **P:** sitio de fosforilación
C: extremo C-terminal **MT:** microtúbulo

Actualmente se atribuye una mayor importancia en la regulación del estado de fosforilación a la actividad de fosfatasas presentes en las neuronas (Gong et al., 1994). Entre estas se encuentran la PP-2A y la calcineurina (PP-2B) (y posiblemente una tercera fosfatasa no identificada), las cuales estarían involucradas en la defosforilación selectiva de Tau (Gustke et al., 1992; Goedert et al., 1992; Mawal-Dewan et al., 1994).

La unión de Tau a los microtúbulos se incrementa concomitantemente con el aumento de la expresión de las isoformas adultas. Todos los datos existentes indicarían que las formas adultas son fosforiladas en los mismos sitios que las fetales aunque a niveles más reducidos (Mawal-Dewan et al, 1994). Sin embargo todos los datos que hay de fosforilación son de experimentos *in vitro* y nada se sabe acerca de como es la fosforilación neta de la proteína *in vivo* durante el desarrollo.

Localización de Tau

Se han propuesto varios mecanismos que causan la localización selectiva de Tau y MAP2 en las neuronas. El primer mecanismo se debería a la localización de los respectivos ARNm (el ARNm de Tau se distribuye en la región terminal del axón mientras que el ARNm de MAP2 lo hace en las dendritas); el segundo a la diferencia de unión a los microtúbulos que hay localmente (Tau se une más fuertemente en el axón que en el cuerpo celular y las dendritas, mientras que MAP2 lo hace más fuertemente en las dendritas y en el cuerpo celular); tercero a la selectiva estabilización (debido a un recambio diferencial de las proteínas); y cuarto a la disminución en el tránsito de MAP2 dentro del axón (debido a la excesiva longitud del dominio N-terminal (Kanai and Hirokawa, 1995). Una nueva hipótesis que ha surgido es que la localización se deba tal vez a una forma de transporte asociado a vesículas (Brandt et al., 1995).

En lo que respecta al segundo mecanismo, el balance entre las actividades de las kinasas y las fosfatasas tendría que ser kinasa dominante en el cuerpo celular y en las dendritas pero fosfatasa dominante en el axón. Conocer la ubicación subcelular de las distintas isoformas de Tau y ver el estado de fosforilación en cada una de estas regiones serviría para dilucidar como regula la fosforilación la unión de Tau a los microtúbulos.

Tau y cerebelo

En la neocorteza cerebral tanto la proteína Tau como sus ARNm siguen una cinética similar pero desfasada en el tiempo del tipo bifásica. En cambio, en

el cerebelo, la cinética de ambos es cualitativa y cuantitativamente diferente. En la neocorteza cerebral aparece un solo pico tanto de ARNm como de proteínas lo cual es explicable ya que la mayoría de las neuronas están ya presentes prenatalmente, correspondiendo dicho pico al diferente crecimiento de axones que se superponen durante un corto y temprano período de desarrollo postnatal. Sin embargo, la separación entre los dos picos (ARNm y proteínas) excede el del intervalo que hay usualmente entre transcripción y traducción, lo que sugiere que la estabilidad de la proteína cambia con el tiempo, una conclusión también soportada por el hecho que muy bajos niveles de ARNm están presentes en estados tardíos del desarrollo, mientras que no hay una gran disminución en el contenido de la proteína Tau. Otra posibilidad es que las formas maduras de Tau tengan una vida media más larga que las especies inmaduras. La estabilización viene dada también debido a que las variantes maduras, a pesar de que están en menor cantidad, tienen una actividad polimerizante mucho mayor. Estos mecanismos de estabilización son observados también cuando se analiza la tubulina.(Francon et al., 1982; Mangin et al., 1989).

En el cerebelo se observan dos picos tanto de ARNm como de proteínas durante el desarrollo. Los primeros picos de ARNm y de proteínas coinciden apróximadamente. Podría ser que parte de estos mensajeros tardíos codifiquen especies maduras de Tau, las cuales incrementan su concentración después de la segunda semana postnatal cuando la mayoría de las aferencias y eferencias estén formadas y comienzan a ser estabilizadas. Estos resultados no son concluyentes ya que no existen datos sobre la velocidad de síntesis *in vivo* de Tau en el Sistema Nervioso Central que apoyen estas suposiciones.

Sinaptogénesis y Tau

Células no neuronales transfectadas con Tau extienden largos procesos en los cuales los haces de microtúbulos formados se parecen a aquellos que conforman los axones (Kanai et al., 1989; Knops et al., 1991; Chen et al., 1992). La sobreexpresión de Tau acelera la extensión de las neuritas (Esmail-Azad et al., 1994). Mitchison y Kirschner (1988) proponen tres fases en el desarrollo axonal: a) *orientación:* los filopodios interactúan favorablemente con ciertos sitios específicos (involucra a la actina); b) *consolidación:* los microtúbulos en el cono

de crecimiento son ensamblados en la futura dirección del crecimiento axonal (Goldberg and Burmeister, 1986); y c) *conversión:* los microtúbulos orientados y la actina son convertidos en formas estables y "comprimidos" lateralmente para formar el tubo axonal.

Se ha demostrado en células PC12 que el NGF induce el crecimiento neurítico, el ensamblado y estabilización de microtúbulos, lo cual está ligado directamente con la expresión y acumulación de diversas MAPs, entre las cuales se encuentra Tau (Black et al., 1983; Greene et al., 1983; Jacobs and Stevens, 1983; Drubin et al., 1985; Brugg and Matus, 1988).

La plasticidad de las neuritas correlaciona inversamente con la estabilidad de los microtúbulos que las componen (los microtúbulos de los conos de crecimiento son muy dinámicos). Al principio en las neuritas hay una gran incorporación de subunidades, mientras que en las que están ya maduras los microtúbulos están muy estabilizados (Horio and Hotani, 1986). Neuronas cerebelares en cultivos disociados, inicialmente extienden neuritas exploratorias y después de un intervalo relativamente constante se vuelven polarizadas (Ferreira et al., 1987). La polaridad se torna evidente cuando una simple neurita excede a las otras en longitud y asume rasgos característicos de axones o dendritas (Cáceres and Kosik, 1990).

Mediante experimentos usando oligonucleótidos antisense se ha visto que la supresión de MAP2 inhibe el establecimiento inicial de las neuritas. En cambio la supresión de Tau bloquea la elongación axonal y la estabilización de los microtóbulos (Cáceres et al., 1992).

El knock out para Tau mostró que el sistema nervioso del ratón era histológicamente normal. Además, el crecimiento axonal no es afectado en cultivos neuronales hechos con células provenientes de estos animales. En los axones de gran calibre se vió un aumento de MAP1A lo cual compensaría la función de Tau. Esta compensación solo se observó en este tipo de axones ya que además de Tau hay una gran proporción de otras MAPs (como ser MAP1A y MAP1B). En cambio en los axones de pequeño calibre, donde por ej. hay una disminución en la estabilización de los microtúbulos de las fibras paralelas del

cerebelo, la estabilidad de los microtúbulos está disminuída y la organización microtubular significativamente alterada (Harada et al, Nature 1994).

Durante la etapa del crecimiento del axón hay un aumento en la velocidad de polimerización de los microtúbulos. Este aumento puede deberse a tres causas: a) la presencia de la isoforma embrionaria de Tau, la cual posee solo tres regiones repetitivas lo que permitiría un rápido intercambio de las moléculas como lo sugieren Bramblett et al (1993); b) Una mayor velocidad de síntesis de la proteína Tau y c) la presencia de una fosfatasa en el extremo de la neurita como proponen Cáceres y Kosik (1991), la cual por defosforilación de Tau incrementaría la capacidad de unión de esta molécula a los microtúbulos.

Una vez que el cono de crecimiento del axón encontró su destino final, la velocidad de polimerización tiene que tornarse nula. Esto implica que tiene que haber una rápida cascada de señales que posibilite el brusco freno en la polimerización (posiblemente debido al accionar de kinasas (siendo desactivadas?) o fosfatasas (siendo activadas?)).

Mutante staggerer

El mutante *staggerer* se caracteriza por poseer alterada la estabilización sináptica. El crecimiento axonal se produce normalmente, la detención del crecimiento también, pero falla en la estabiliación sináptica. El efecto primario la mutación *staggerer* afecta únicamente a las células de Purkinje (Herrup and Mullen, 1979, 1981) que parecen encontrarse arrestadas en su desarrollo (Yoon 1976; Landis and Sidman, 1978).

En este mutante, las células grano migran de la CGE a la CGI, desarrollando normalmente sus axones (las fibras paralelas) que encuentran su célula blanco (las células de Purkinje). La muerte de las células grano se produce posteriormente a su crecimiento, al no poder establecer sinapsis con la célula blanco afectada (el máximo de muerte se produce a los P14) (Sotelo and Changeaux, 1974).

Recientemente se ha descubierto que la mutación *staggerer* se debía a una deleción dentro del gen RORα (un receptor de hormona nuclear huérfano) que previene la traducción del dominio de unión al ligando (Hamilton et al., 1996). Ellos proponen un modelo en el cual RORα interactúa con el pathway de la hormona tiroidea induciéndose la maduración de las células de Purkinje

Se ha observado que la deficiencia de hormona tiroidea, que tiene como período de liberación crítica a la sangre la segunda semana postnatal, altera la expresión de los ARNm de Tau y retrasa la transición entre los transcriptos inmaduros y los maduros. Esto sugiere que la hormona tiroidea regula, directa o indirectamente, el patrón temporal del mecanismo de corte y empalme de los mensajeros del gen de Tau (esto es solo observable en cerebelo pero no así en cerebro, lo cual puede explicarse debido a las diferencias en el curso temporal de la diferenciación neuronal). Se ha observado también que en el hipotiroidismo hay una disminución de la migración de las células grano desde la capa granular externa a través de la capa molecular. El ARNm de Tau permanece a un alto nivel y sin traducir en las células grano hasta tanto ellas no hayan alcanzado su blanco postsináptico, las células de Purkinje. Lo que no se sabe es si el efecto que tiene la hormona en la migración celular y sobre el mecanismo de splicing están relacionados (Altman, 1972; Aniello et al., 1991).

MATERIALES

Y

MÉTODOS

Materiales

Animales

Los ratones utilizados son de la cepa C57BL/6J y fueron criados en el Departamento de Genética Experimental del Instituto Nacional de Genética Médica, provenientes del Laboratorio Jackson (U.S.A.). Se usaron principalmente ratones de entre 9 y 20 días postnatales (P9-P20).

Precursores radioactivos

Se utilizaron: a) ^{35}S-Metionina, 1100-1200 Ci/mmol, de New England Nuclear, Boston, USA).

b) $^{32}PO_4HNa_2$-isotónico, de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

c) ^{3}H-leucina, 60 Ci/mmol, de American Radiolabeled Chemical Inc., St. Louis, USA.

Medios de incubación

En las incubaciones de tejido se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco-DMEM- (Gibco BRL.) suplementado con 3.7 g/l de $NaHCO_3$ para llegar a un pH de 7.4 a 37°C, 1g/l de glucosa y glutamina a una concentración final de 2 mM. Los medios fueron preincubados 2 horas antes a 37 °C en estufa de cultivo gaseada.

Se utilizaron como precursores radioactivos: a) ^{35}S-Metionina 1 mCi/ml, b) $^{32}PO_4HNa_2$ 1 mCi/ml (en este caso se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco - DMEM- sin fosfatos (Gibco BRL.) y c) ^{3}H-leucina 200 μCi/ml.

Inhibidores de proteasas

Se utilizan siempre fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) en una concentración final de 1 mM y apoprotinina y leupeptina (Sigma Chem. Co.) en una concentración final de 1 mg/ml.

Anticuerpos

a) ***Anticuerpo policlonal anti-Tau (Sigma Chem. Co.):*** Para el caso de Western Blots se lo utilizó en una dilución 1:1000 en TBS. Para las inmunoprecipitaciones se lo usó en una dilución 1:50.

b) ***Anticuerpo monoclonal 5E2 anti-Tau (cedido por el Dr. A. Cáceres):*** Se usó para Western Blot en una dilución 1:50 en TBS y para las inmunoprecipitaciones también a 1:50.

c) ***Anticuerpo monoclonal Tau-1 anti-Tau (cedido por el Dr. A. Cáceres):*** Se lo utilizó para Western Blot en una dilución 1:3000 en TBS y para la inmunocitoquímica en una dilución 1:20 en PBS-2 % BSA.

d) ***Anticuerpo monoclonal Tau-2 anti Tau (NeoMarkers):*** Se lo utilizó para la inmunoprecipitación en una dilución 1:50.

e) ***Anticuerpo monoclonal Tau-5 anti Tau (NeoMarkers):*** Se lo utilizó para la inmunoprecipitación en una dilución 1:50.

f) ***Anticuerpo hecho en conejo anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma Chem. Co.).:*** Se lo utilizó como anticuerpo 2º en los Western Blot (1:400) y en las inmunoprecipitaciones (1:50) donde se usó un anticuerpo monoclonal como anticuerpo 1º.

g) ***Anticuerpo hecho en cabra anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma Chem. Co.).*** Se lo utilizó como anticuerpo revelador para los Western Blots en una dilución 1:5000.

h) ***Anticuerpo hecho en conejo anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa (Dako).*** Se lo usó para la inmunocitoquímica en una dilución 1:70 en PBS-2 % BSA.

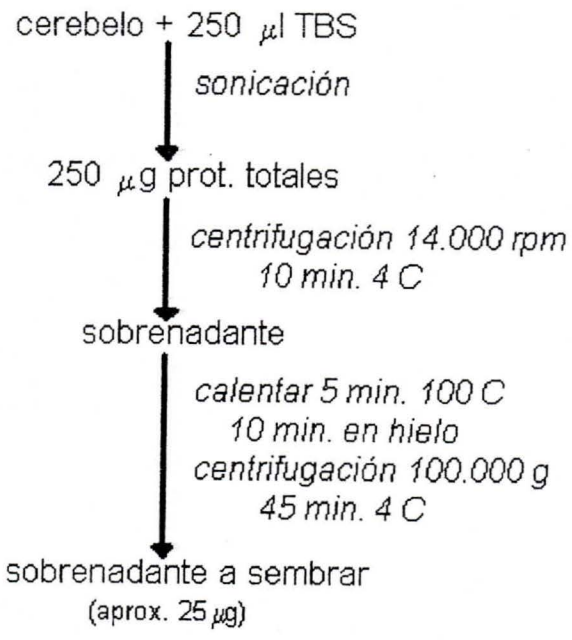
Métodos

Extracción de Tau

Se extraen los cerebelos de distintas edades y se coloca cada uno de ellos en un Eppendorf con 250 μl de buffer TBS (20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 8.0) e inhibidores de proteasas y luego se disgregan por sonicación (Branson Sonic). De este homogenato se determina la concentración proteica por el método de Lowry et al., 1951. Partiendo de entre 250 y 500 μg de proteínas totales de cada una de las distintas edades se centrifuga a 14.000 rpm por 10 min. a 4 °C (Centrífuga Eppendorf). Se toma el sobrenadante, se calienta 5 min. a 100 °C y luego se lo deja 10 min. en hielo. Se centrifuga a 100.000 g por 45 min. a 4 °C (Beckman Airfuge) y el sobrenadante se siembra en un gel SDS-PAGE (**Esquema 5**).

Esquema 5:

Diagrama del método de extracción.



Incubación de tejidos

a)Obtención de las mini-unidades de tejido

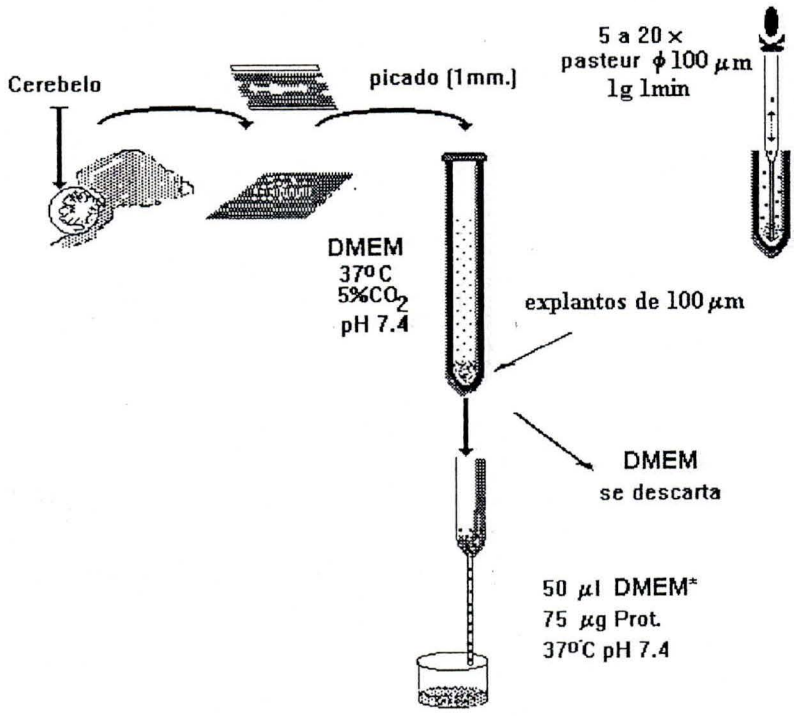
Se procede de acuerdo a lo descripto por Alperín et al. (1986), modificado por Radrizzani et al. (1995). Se extrae el cerebelo, se coloca sobre un papel de filtro y lo embebe con unas gotas de medio de cultivo DMEM a 37 °C. Luego se corta rápidamente en trozos pequeños (0.5-1 mm.) con un bísturí y se transfiere de inmediato a un Eppendorf que contiene 1 ml de DMEM. El material es aspirado y expelido con rapidez usando una pipeta Pasteur de 1 mm. de diámetro y bordes redondeados apróximadamente unas 10 veces (esto varía de acuerdo a las edades de los ratones) hasta obtener una distribución regular y uniforme de las partículas (apróximadamente 100 μm). El material particulado se deja sedimentar y se descarta el medio sobrenadante (se eliminan de esta manera las partículas de las células libres, rotas o fragmentos celulares, proteínas, etc.). Es importante que el tiempo entre la decapitación y el de la incubación sea de 3 minutos como máximo y que durante todo el proceso el tejido se mantenga a 37 °C (**Esquema 6**).

b) Siembra e incubación

El material sedimentado se siembra de inmediato en microcavidades para cultivo con una pipeta Pasteur. La cantidad que se siembra es de entre 5 μl y 10 μl (75-100 μg de proteínas) en el centro de cada microcavidad (precalentada previamente a 37 °C). Luego se agregan 50 μl de medio de cultivo DMEM conteniendo [^{32}P] para el caso que se quiera ver fosforilación, o [^{35}S] para ver síntesis de proteínas), se resupenden las partículas con una suave vibración y a partir de este momento se incuba por 3 hs. en estufa humidificada a 37 °C y 5 % de CO_2. Una vez finalizada la incubación, se retira todo el contenido de las microcavidades, se lo junta en un Eppendorf, se centrifuga 10 seg. a 14.000 rpm y se retira el sobrenadante (medio de cultivo agotado). La marcación se detiene mediante el agregado de 1ml de buffer PBS frío al precipitado. Esto se resuspende suavemente, se vuelve a centrifugar otros 10 seg. a 14.000 rpm y el sobrenadante es descartado.

Esquema 6:

Obtención y sembrado de las mini-unidades.



Inmunoprecipitación

El material obtenido después de la incubación de las mini-unidades de tejido se resuspende en 250 μl de TBS con inhibidores de proteasas. Se sonica y se toman 2 alícuotas de 10 μl para determinar la concentración proteica por Lowry y otras 2 alícuotas también de 10 μl para determinar la radioactividad incorporada. A 250 μg de proteínas se le agregan 45 μl de buffer "boiling" (Tris-HCl 0.05 M, SDS 0.5%, DTT 1mM, pH 8) y se calienta a 100 °C entre 2 y 5 min. Luego se agregan 4 volúmenes de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NP-40 1.25%, DOC 1.25%, NaF 50 mM, EDTA 2mM, pH 7.2) más inhibidores de proteasas (Coligan et a., 1995; 1996). Se agregan 10 μl de Proteína A (acoplada a Sefarosa CL-4B) (Sigma Chem. Co.) y se incuba 1 hora (todas las incubaciones son con agitación constante) para que se adsorba todo lo inespecífico, se centrifuga y el sobrenadante se incuba con el anticuerpo anti-Tau correspondiente por 1 hora. Para el caso de incubaciones con un anticuerpo monoclonal, se realiza además una segunda incubación de 1 hora con un anticuerpo 2º (policlonal de conejo anti ratón). Se agrega luego 10 μl de Proteína A y se incuba

otra hora más, se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Se hacen 3 lavados de 10 min. cada uno con TBS y 1 lavado con TTBS (TBS, 0.05% Tween 20) (volumen final 1 ml). Se centrifuga y al precipitado se le agregan 20 μl de cracking buffer con β-mercapto, se calienta 5 min. a 100 °C (para separar las proteínas de la Proteína A) y se siembra el sobrenadante en un gel SDS-PAGE.

Geles y Electroforesis

a) Electroforesis en SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida se realizan de acuerdo a Laemmli et al. (1970), con algunas modificaciones. Los gradientes de poliacrilamida se construyen con vasos comunicantes, agregando un 10 % de sacarosa al gel inferior. Se utilizan geles de 10 % de acrilamida y gradientes lineales de 7,5 % -15 %.

Las muestras antes de ser sembradas se hierven 5 min. a 100 °C con cracking buffer con β-mercapto.

b) Tinción de proteínas en geles

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se tiñieron con Coomasie Blue o con plata.

Tinción con Coomasie

Se coloca el gel a teñir en una solución 0,3 % de Coomasie Blue R-250 (Biorad) en 4:1:5 de metanol, ácido acético, agua durante 8 hs. y luego se realizan 2 lavados con 3:1:6 de metanol, ácido acético, agua de 2 hs. cada uno en agitación. Para conservar el gel o exponerlo para autorradiografiar, primero se lo enjuaga con agua y luego es secado al vacío a 80 °C. El gel puede equilibrarse 20 min. con glicerol 0,2 % antes de secar.

TInción con plata

El gel se prefija en 4:1:5 de metanol, ácido acético, agua durante 30 min. o más. Se lava en 5 % de metanol-7 % de ácido acético toda la noche. Luego se fija con 10 % de glutaraldehído en agua durante 30 min. y se hacen 3 lavados con abundante agua de 10 min. cada uno y luego un lavado con agua bidestilada de 2 hs. Se equilibra el gel con una solución de plata amoniacal (1.4 ml de NH_3, 1.9 ml de NaOH 1 M + $AgNO_3$ 19.4 % -0.8 g en 4 ml de agua- con agitación y agua para 100 ml) no más de 15 min. y luego se lava con agua bidestilada varias veces. El revelado se realiza con una solución reductora de 0.005 % de ácido cítrico, 0.019 % de formaldehído y se para lavando el gel con abundante agua (Oakley B., 1980).

c) Transferencia

Tanto el gel de poliacrilamida como la membrana de nitrocelulosa se equilibran durante 20 min. en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 0.3 % SDS: metanol 20 % (v/v)), y luego se transfiere a 300 mA durante 1 hora con refrigerante (-80 °C) y agitación. Las membranas de nitrocelulosa se tiñen con colorante de Ponceau S (Sigma Chem. Co.) como control de transferencia. Se marcan los estándares de peso molecular y se lava con abundante agua.

d)Western blot

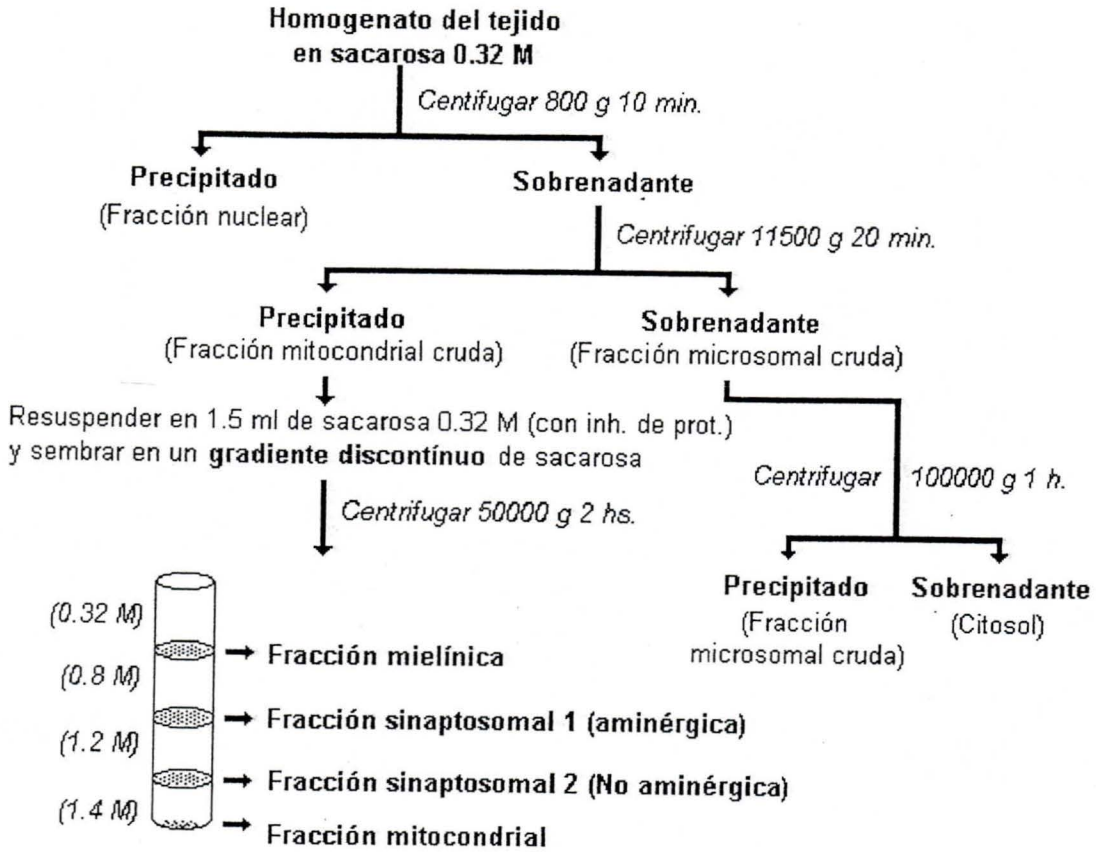
La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloquea con TBS-caseína (5%) durante 1 hora. Se incuba con el anticuerpo anti-Tau diluído en TBS-caseína (2.5%) el tiempo correspondiente (1 hora a temp. amb. en el caso de usar el policlonal de conejo, el monoclonal Tau-1 o toda la noche en el caso de usar 5E2). El anticuerpo 1° es lavado 2 veces con TBS y 1 vez con TTBS (10 min cada uno). Se agrega el Ab 2° (anti conejo acoplado con fosfatasa alcalina) y se incuba otra hora (en el caso de usar anticuerpos monoclonales es utilizado un anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulinas de ratón como anticuerpo 2°). Se repite la misma serie de lavados, la membrana es con solución reveladora (8.8 ml H_2O, 1 ml Tris 1 M, 200 μl NaCl 5 M, 2.5 μl $MgCl_2$ 2 M) y revelada con esta misma solución utilizando como sustratos 20 μl NBT (Promega) y 20 μl BCIP (Promega) en oscuridad.

Fraccionamiento subcelular:

El fraccionamiento se lleva a cabo de acuerdo con la técnica de De Robertis et al. (1962) adaptado a microescala por Radrizzani et al. (1995). Partiendo de tejido particulado al que se le agrega sacarosa 0.32 M (la relación tejido:sacarosa tiene que estar entre 5 y 10 %) se homogeneiza en un potter en presencia de inhibidores. (**Esquema 7**).

Esquema 7:

Pasos a seguir en el fraccionamiento subcelular (todos los pasos deben hacerse en frío).



*** Fuente de sinaptosomas = fracción mitocondrial cruda.**

Radioactividad

La radiación β se leyó en un contador de centelleo líquido Wallac 1214 Rackbeta. Como líquido de centelleo se usó Tolueno-PPO. Las autorradiografías de los geles secos se realizaron con pantalla amplificadora a -70 °C y placas Kodak X-Omat K para el caso de marcaciones con ^{32}P, o sin pantalla a temperatura ambiente para el caso de marcaciones con ^{35}S.

Inmunocitoquímica

El cerebelo se fija inmediatamente durante 5 hs. después de la decapitación en 5 % de ácido acético en etanol 96 % previamente enfriado a -20 °C. Se embebe el tejido en parafina y los cortes de micrótomo en secciones de 5 mm se montan en portaobjetos y el tejido se desparafina con diferentes grados de alcoholes (xilol, etanol 100 %, 96 %, 70 %, 50 %). El bloqueo de la actividad peroxidasa endógena se realiza con metanol 50 %-H_2O_2 durante 30 min.

Se incuba el tejido con el anticuerpo Tau-1 en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora. El tejido se lava posteriormente con PBS-2 % BSA y se incuba con el anticuerpo 2° (anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa). Luego de 1 hora de incubación se realizan los lavados y se revela con diaminobenzidina (DAB). La tinción de contraste se realiza con colorante básico de hematoxilina, la cual marca los núcleos celulares.

Análisis de los datos

En todos los casos las densitometrías fueron realizadas con el programa Image Quant.

RESULTADOS

Puesta a punto de las condiciones experimentales.

a) Especificidad del anticuerpo policlonal.

Para determinar la especificidad del anticuerpo policlonal (Sigma Chem. Co.) se efectuó un Western blot a partir de un minigel (SDS-PAGE 10% de acrilamida) donde se corrió un homogenato de proteínas totales de cerebelo de distintas edades postnatales (**Figura 1**). El anticuerpo reconoce bien a Tau (zona de 46-56 kDa.), pero también tiene reacción cruzada con otras proteínas (se observan 5 zonas de reacción cruzada).

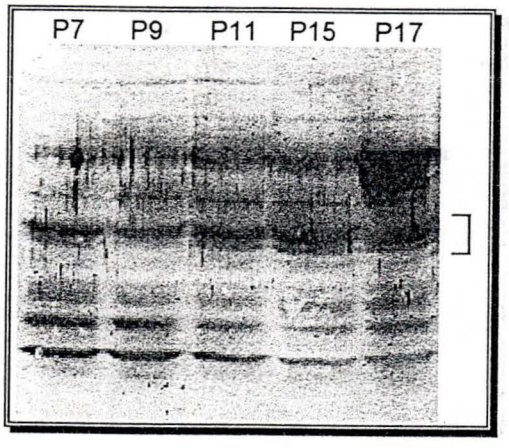


Figura 1:
Western blot de un homogenato de proteínas totales. Se sembraron 100 μg de proteínas totales en cada calle. La marca señala la zona donde se hallan las distintas isoformas de Tau, el resto de las bandas corresponde a zonas que muestran reacción cruzada con el anticuerpo. Las edades postnatales se indican en la parte superior de cada calle.

b) Enriquecimiento de la proteína Tau.

Para eliminar las proteínas que muestran reacción cruzada con este anticuerpo se procedió a realizar una extracción parcial a partir del homogenato de proteínas totales. Aprovechando la estabilidad de Tau al calor (Herzog et al., 1978) que presenta esta proteína probamos distintos tipos de buffers para la extracción (TBS, MES, mezclas de TBS-MES) y también vimos como influía la solubilidad en ácido perclórico (Lindwall and Cole, 1984b) (**Figura 2**).

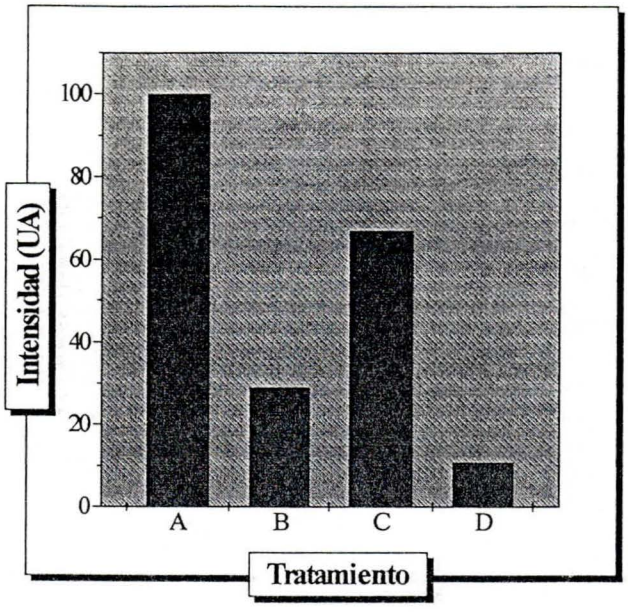


Figura 2:

Ensayos para la extracción de Tau. Histogramas que muestran la intensidad de las bandas obtenidas por densitometría de un Western blot de Tau con distintos tratamientos. Las muestras corresponden a cerebelo de P18 y fueron reveladas con el anticuerpo policlonal-fosfatasa alcalina. **A:** TBS ; **B**: MES ; **C**: TBS-MES ; **D**\: MES-ácido perclórico (2.5%v/v).

A partir de estos resultados se decidió utilizar la estrategia ya descripta en **Materiales y Métodos**. Esta consiste en realizar primero una rápida centrifugación del homogenato, previamente sonicado, para bajar la mayor parte de las membranas, calentar 5 minutos a 100 ºC, dejar la muestra unos instantes en hielo y luego centrifugar a 100.000 g (quedando así Tau en el sobrenadante). Como bufffer se utilizó TBS para asegurarnos la obtención de todas las isoformas.

Las proteínas obtenidas de las distintas etapas de la extracción de Tau pueden visualizarse en la **Figura 3** donde se muestra la tinción de plata de un gel SDS-PAGE.

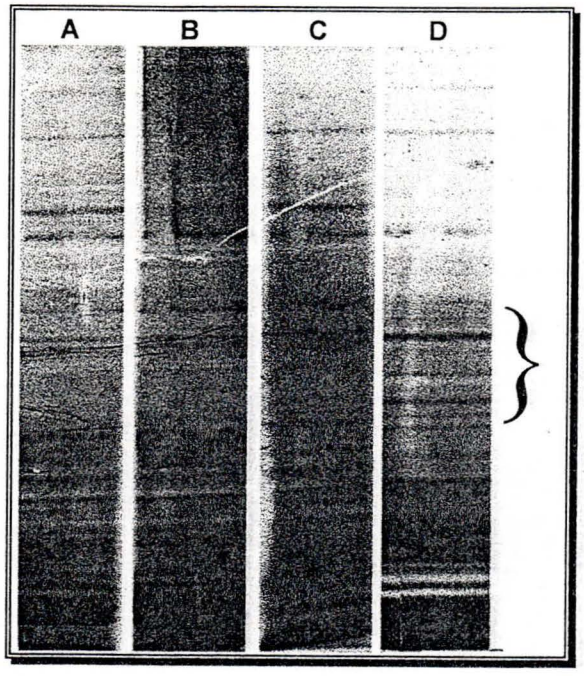


Figura 3:

Fracciones de la extracción de Tau. Gel SDS-PAGE en gradiente 7,5-15% teñido con plata. La llave muestra la zona donde se localiza Tau. **A**: homogenato total (50 μg) ; **B**: precipitado de la centrifugación a 14.000 rpm (50 μg) ; **C**: precipitado luego del calentamiento y centrifugación a 100.000 g (50 μg) ; **D**: sobrenadante del calentado y centrifugado a 100.000 g (25 μg).

Distribución de las distintas isoformas de Tau durante el desarrollo postnatal.

Para determinar la expresión de Tau durante la sinaptogénesis en el cerebelo el primer paso fue realizar Western Blots con distintos tipos de anticuerpos (anticuerpo policlonal anti-Tau (Sigma Chem. Co.), Tau-1 y 5E2 (cedidos ambos por el Dr. A. Cáceres)). Se escogieron edades representativas de los distintos estadíos de la sinaptogénesis. Para eso se tomó P9 (crecimiento axonal), P12 y P13 (inicio de la estabilización sináptica) y P20 (culminación de la estabilización sináptica).

Utilizamos geles en gradiente lineal de 7.5-15% que poseen una mayor resolución para la zona de movilidad electroforética de las distintas isoformas de Tau.

En la **Figura 4** se ve una región inespecífica ubicada por encima de las bandas de Tau. Esto se debe a una reacción cruzada con proteínas provenientes

de algún buffer de SDS-PAGE, la cual fue disminuída parcialmente preadsorbiendo las soluciones con carbón activado.

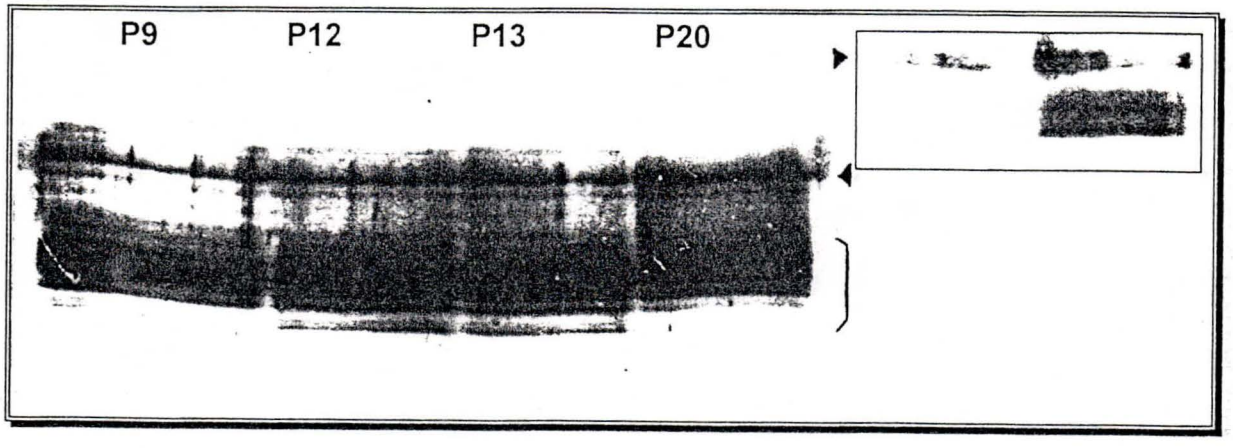


Figura 4:

Distribución de las isoformas de Tau durante la sinaptogénesis. Western blot de un gel en gradiente 7.5-15% con el anticuerpo policlonal. La punta de flecha muestra las proteínas del buffer que muestran reacción cruzada con el anticuerpo. La llave muestra las distintas isoformas de Tau. Se parte de 250 μg de proteínas totales y después de la extracción se siembra el sobrenadante. **Inserto:** se puede observar más en detalle las proteínas contaminantes del buffer que producen reacción cruzada.

La **Figura 5** muestra un detalle de la **Figura 4** donde se ven claramente las seis isoformas de Tau. Según la resolución de nuestros geles se pueden observar 6 bandas principales cuyos pesos moleculares aparentes son 47, 49, 50.5, 51.5, 52.5 y 55 kDa. También hay una serie de bandas de menor intensidad entremezcladas con estas bandas. En general lo que se observa es que después del período de estabilización sináptica (P20) hay una disminución en la intensidad de las bandas de menor peso molecular.

La **Figura 6** muestra la densitometría de las bandas de la **Figura 5**, mientras que en la **Figura 7** se observan los histogramas de intensidad de las distintas isoformas a las distintas edades.

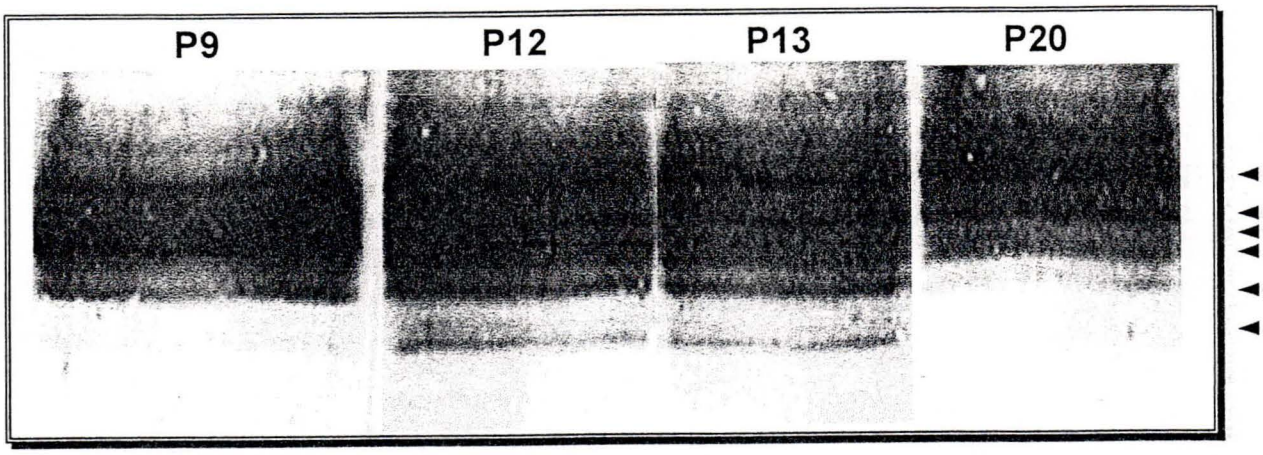


Figura 5:

***Detalle de la* Figura 4**. Se ven las 6 bandas principales (55, 52.5, 51.5, 50.5, 49 y 47 kDa) señaladas por puntas de flecha y diversas bandas de menor intensidad.

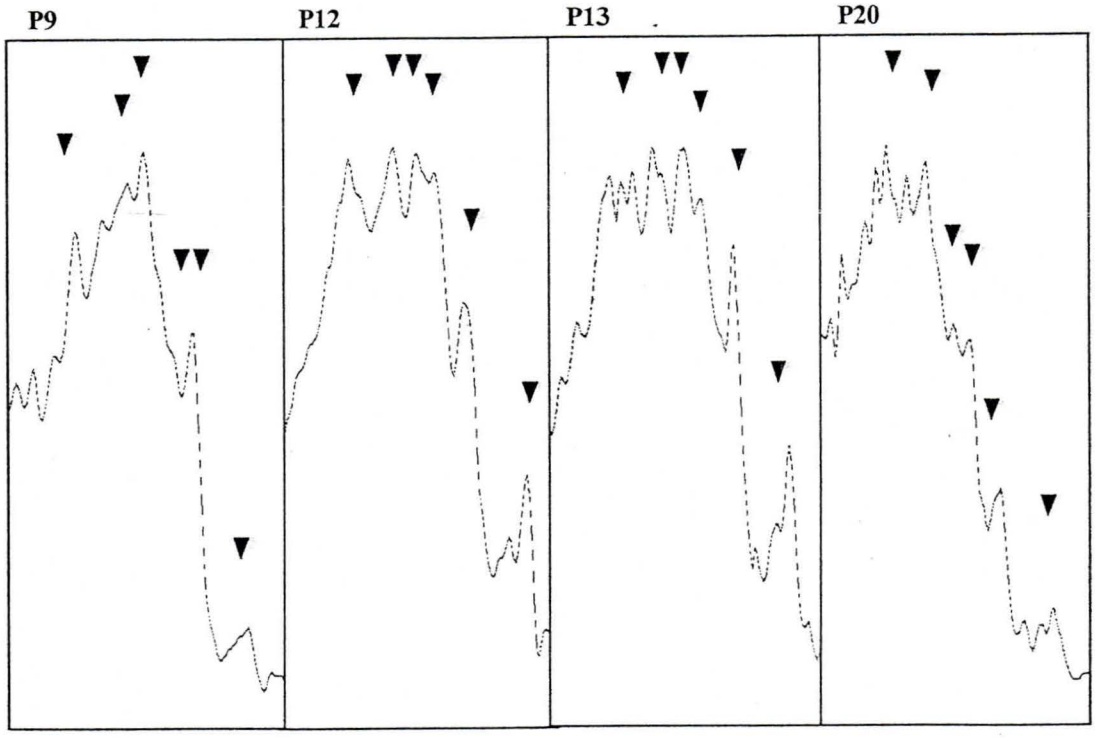
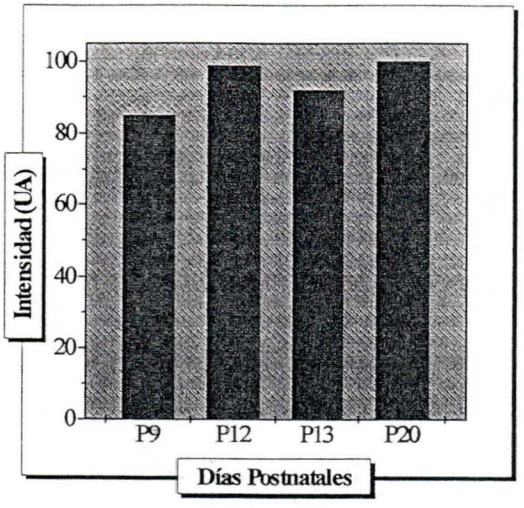


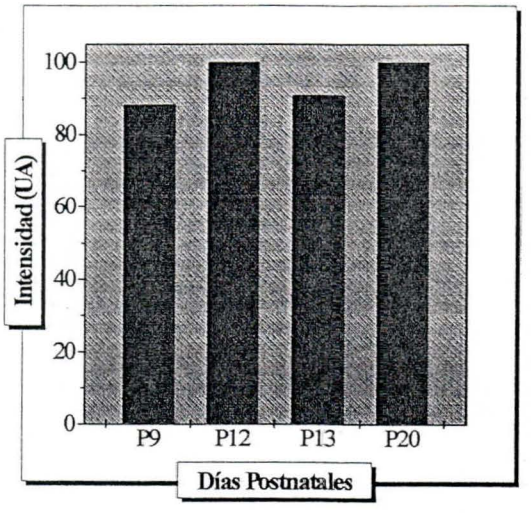
Figura 6:

***Densitometrías de las cuatro edades del Western blot de la* Figura 5**. Las puntas de flecha muestran las 6 bandas principales de Tau ya mencionadas.

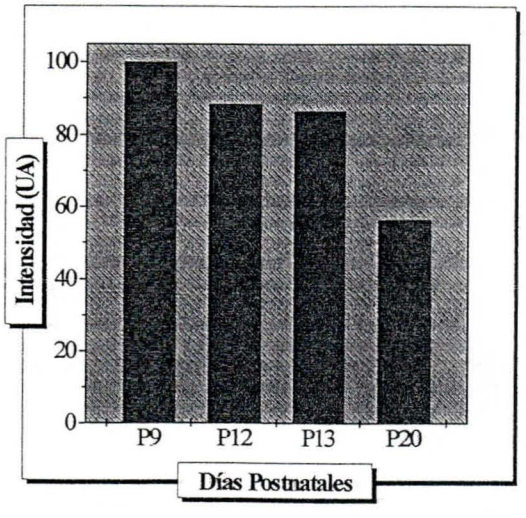
Banda de 55 kDa



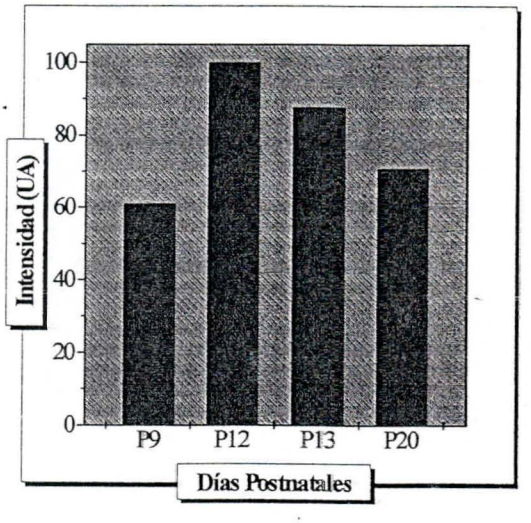
Banda de 52.5 kDa



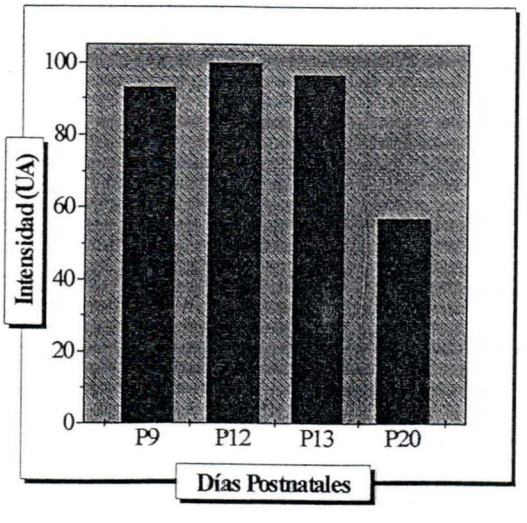
Banda de 51.5 kDa



Banda de 50.5 kDa



Banda de 49 kDa



Banda de 47 kDa

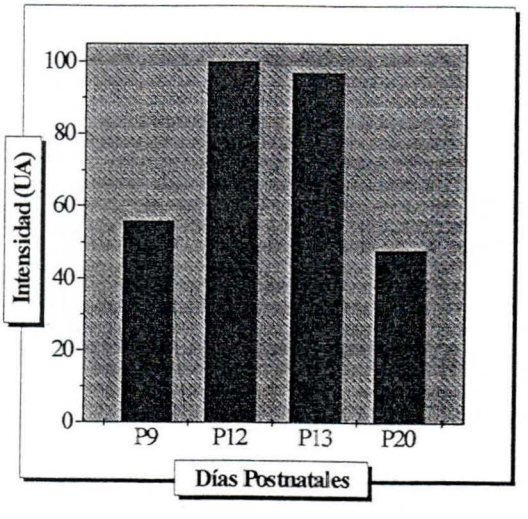


Figura 7:

***Histogramas de las 6 bandas señaladas en las densitometrías en la* Figura 6.** Se compara la banda de un mismo PM a las distintas edades, tomando como referencia (100%) la de mayor intensidad (100 UA, UA: unidades arbitrarias).

Las dos bandas de mayor peso molecular (55 y 52.5 kDa) sufren pocas variaciones durante todo el período analizado. La banda de 51.5 kDa sufre una disminución en su intensidad con el transcurso del tiempo.

Las tres bandas inferiores se comportan de un modo similar. Su intensidad se incrementa a P12 en relación con P9, y después, a P20 vuelve a caer. El ejemplo más notorio de esto es lo que ocurre con la banda de menor peso molecular, la de 47 kDa.

La **Figura 8** el patrón de acumulación a cada edad de todas las isoformas de Tau con el anticuerpo policlonal.. Se ve que hay un máximo en la acumulación de Tau en el inicio del período de estabilización sináptica (P12-P13).

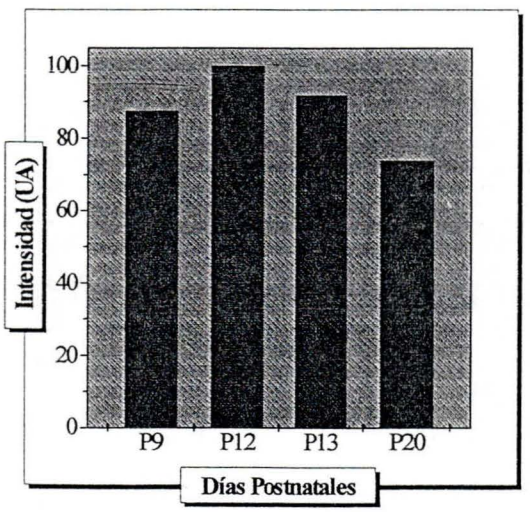


Figura 8:

Acumulación de las isoformas de Tau durante la sinaptogénesis. Se muestra como varía la acumulación de Tau con el desarrollo. El histograma fue realizado a partir de los datos del Western blot realizado con el anticuerpo policlonal de la **Figura 4**.

También se probaron dos anticuerpos monoclonales (5E2 (**Figura 9**) y Tau-1 (**Figura 10**)) para la detección de Tau en Western blots. Utilizamos el anticuerpo policlonal para los ensayos ya que reconocía mejor que 5E2 y Tau-1 todas las isoformas (comparar **Figura 4** con **Figuras 9** y **10**).

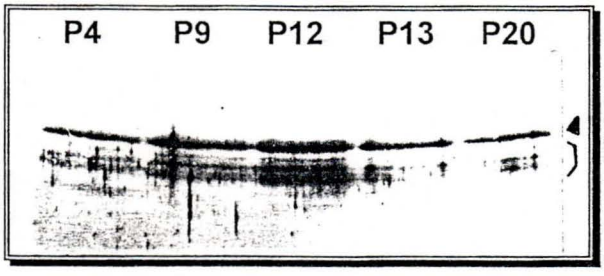


Figura 9:

Western blot anticuerpo 5E2. La punta de flecha señala la región de unión inespecífica al anticuerpo, la llave las distintas isoformas de Tau. Gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. Se parte de 250 μg de proteínas totales y se siembra el sobrenadante de la extracción

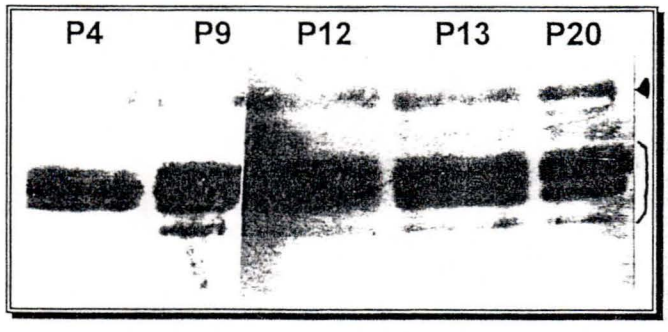


Figura 10:

Western blot Tau-1. La punta de flecha señala la región de unión inespecífica al anticuerpo, la llave las distintas isoformas de Tau. Gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15% Se parte de 250 μg de proteínas totales y se siembra el sobrenadante de la extracción

Ambos tipos de anticuerpos también muestran una zona de unión inespecífica al anticuerpo por arriba de las isoformas de Tau, y reconocen un número menor de bandas que el anticuerpo policlonal. Tau-1 y 5E2 reconocen entre tres y cuatro bandas tal cual lo descripto para Tau-1 por Binder et al. (1985); Kosik et al. (1988); Szendrei et al. (1993) y para 5E2 por Kosik et al. (1988) y Pizzi et al. (1995).

Ubicación subcelular de Tau.

Mediante el uso de la técnica de fraccionamiento subcelular quisimos establecer si existían variaciones en la distribución de las distintas isoformas de Tau durante el desarrollo.

Como primera aproximación se realizó fue un fraccionamiento subcelular para determinar en que fracciones podría llegar a localizarse Tau (**Figura 11**). En

la figura se puede apreciar que Tau se encuentra presente en la fracción nuclear, microsomal cruda, sinaptosomal 1 (aminérgica) y en la sinaptosomal 2 (no aminergica). Tau no se detecta en la fracción mielínica. Las muestras se sembraron directamente del fraccionamiento, sin extracción de Tau. Esto aumenta el número de bandas inespecíficas.

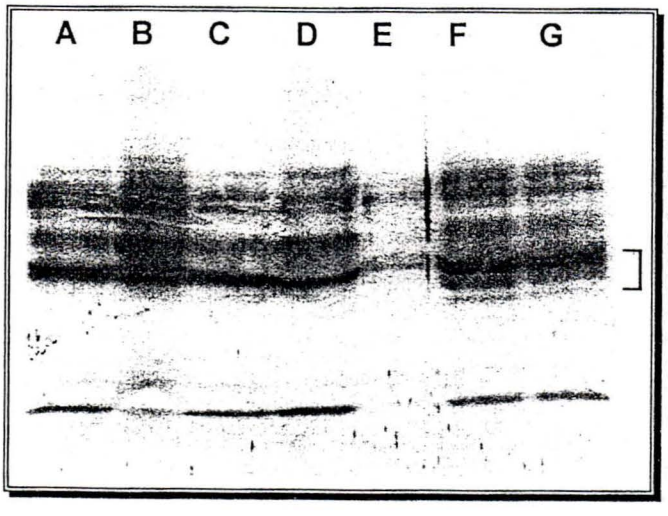


Figura 11:

Fraccionamiento subcelular total. Se siembran 50 μg de proteínas totales en un minigel SDS-PAGE 10% acrilamida. **A**; homogenato total; **B**: fracción nuclear; **C**: sobrenadante de la fracción nuclear; **D**: fracción microsomal + proteínas citosólicas; **E**: fracción mielínica; **F**: sinaptosomas aminérgicos; **G**: sinaptosomas no aminérgicos. La marca señala la región donde se encuentra Tau.

Pudimos observar en los sinaptosomas (**Figura 12**) la presencia de las seis isoformas de Tau y además que éstas siguen un patrón de acumulación similar al observado en el tejido total (**Figura 5**). En cambio el citosol está enriquecido con las dos isoformas de más alto peso molecular y las dos de más bajo peso molecular (**Figura 13**).

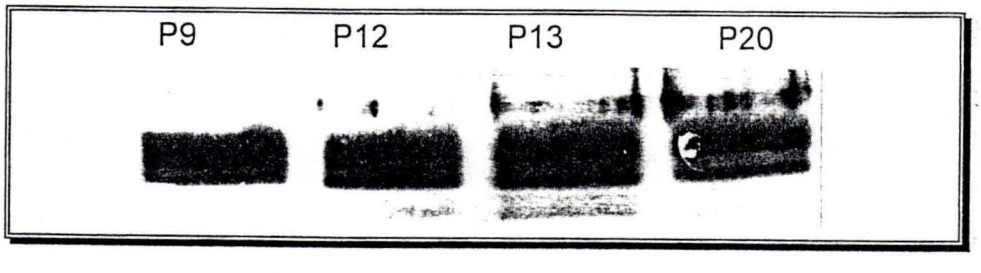


Figura 12:

Western blot de sinaptosomas. Gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15% utilizando anticuerpo policlonal. Se parte de 250 μg de proteínas totales de cada una de las fracciones mitocondriales crudas de las distintas edades y se siembra el sobrenadante de la extracción

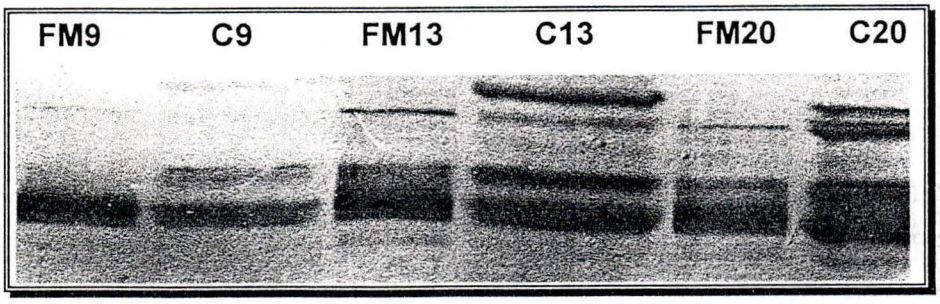


Figura 13:

Western blot fraccionamiento. Se muestran los sinaptosomas y el citosol de tres edades durante el desarrollo. Gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. **FM**: fracción mitocondrial cruda; **C**: sobrenadante de 100.000 g de la fracción microsomal. Se parte de 250 μg de proteínas totales de cada una de las y se siembra el sobrenadante de la extracción

Inmunoprecipitación de Tau marcada

a) Elección del anticuerpo a utilizar

Contábamos con cuatro tipos de anticuerpos para realizar la inmunoprecipitación (PAb, 5E2, Tau-2 y Tau-5). El 5E2 y el Tau-2 tienen la desventaja de que no reconocen las isoformas de Tau fosforiladas (Paposozomenos and Su, 1991; Szendrei et al., 1993; Pizz et al., 1995). El PAb no presentaba esta desventaja y con respecto al Tau-5 no está descripto.

Se realizó una prueba par ver como inmunoprecipitaba cada uno de ellos. Para ello se hizo un cultivo de tejido cerebelar de P9 incubado en presencia de

^{32}P (**Materiales y Métodos**). Tau fue extraída e inmunoprecipitada con los distintos anticuerpos bajo las mismas condiciones. Los resultados se muestran en la **Figura 14**.

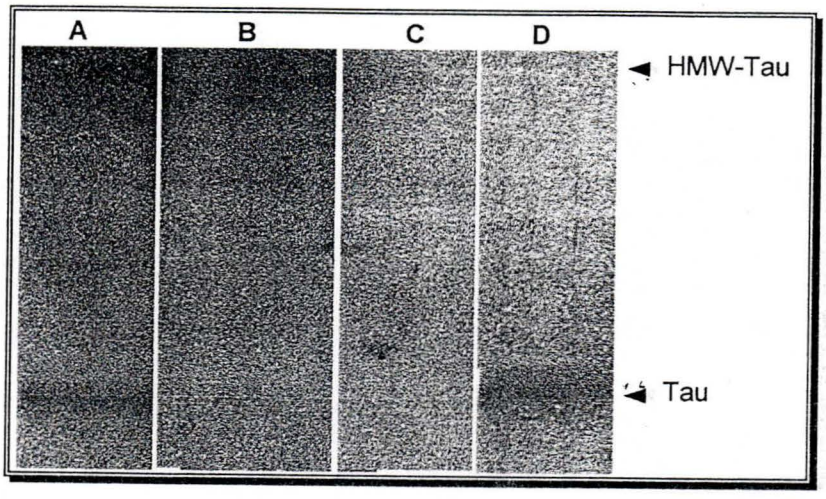


Figura 14:

Puesta a punto de la inmunoprecipitación. Autorradiografía de un gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15% con Tau inmunoprecipitada de un cultivo de P9 incubado con ^{32}P **A :** anticuerpo policlonal ; **B** : 5E2 ; **C** : Tau-2 ; **D** : Tau-5.

El anticuerpo policlonal inmunoprecipitó Tau y HMW-Tau. Tau-5 inmunoprecipitó solo Tau, mientras que el 5E2 solo HMW-Tau. El monoclonal Tau-2 no inmunoprecipitó ninguna forma.

b) Síntesis de Tau.

Para analizar las variaciones en la velocidad de síntesis y el patrón de las distintas isoformas de Tau durante las etapas de sinaptogénesis, procedimos a inmunoprecipitar con el anticuerpo policlonal proteínas marcadas con ^{35}S-metionina.

La autorradiografía del SDS-PAGE con las proteínas totales obtenidas de la incubación de 3 horas con ^{35}S-metionina. El patrón de proteínas totales sintetizadas se muestra como control en la **Figura 15**.

Tau inmunoprecipitada se muestra en la **Figura 16**. La autorradiografía revela la presencia de 4 bandas nítidas en la zona comprendida entre 46-56 kDa y con menos nitidez la banda de HMW-Tau (135 kDa).

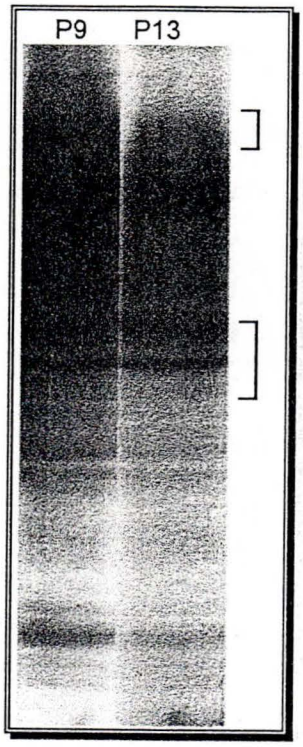


Figura 15:

Proteínas totales marcadas con ^{35}S-metionina. Autorradiografía de un SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. Se corrió en cada carril la misma cantidad de radioactivo para poder observar el patrón de síntesis. El tejido fue incubado 3 hs. en presencia de ^{35}S-metionina (1 mCi/ml) (ver Materiales y Métodos). Las marcas señalan las zonas donde se encuentra Tau.

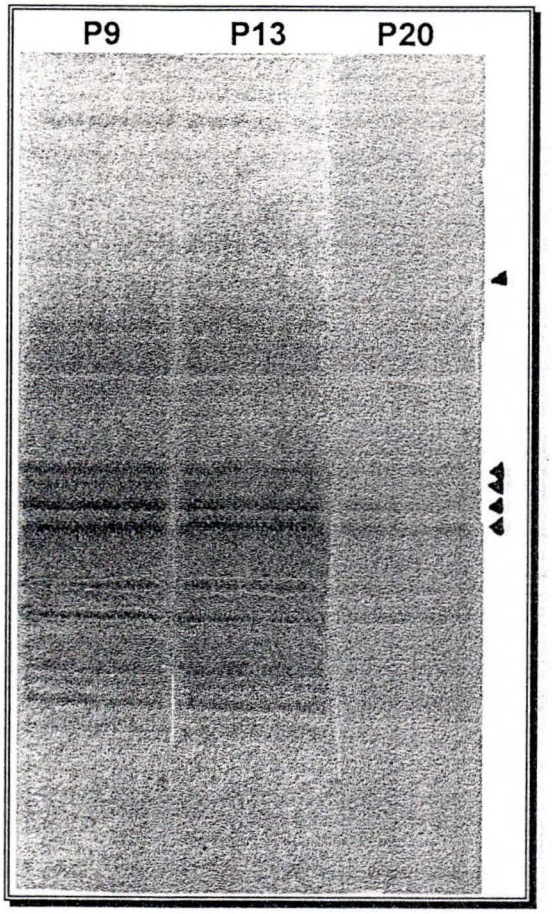


Figura 16:

Inmunoprecipitación de Tau marcada con ^{35}S-metionina.

Autorradiografía de un gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. Al tejido marcado se le extrae Tau y luego se procede con la inmunoprecipitación (ver Materiales y Métodos). Las puntas de flecha muestran las bandas correpondientes a Tau.

Los histogramas de la densitometría de las bandas (**Figura 17**) muestran que salvo HMW-Tau (135 KDa) y la banda de menor peso molecular (47 KDa) las cuales sufren un muy leve incremento a los P13 con respecto a los P9, las otras tres banda (55, 52.5 y 49 KDa) no sufren variaciones entre las dos edades. En cambio a los P20 se observa una gran disminución en la síntesis en las 5 bandas analizadas.

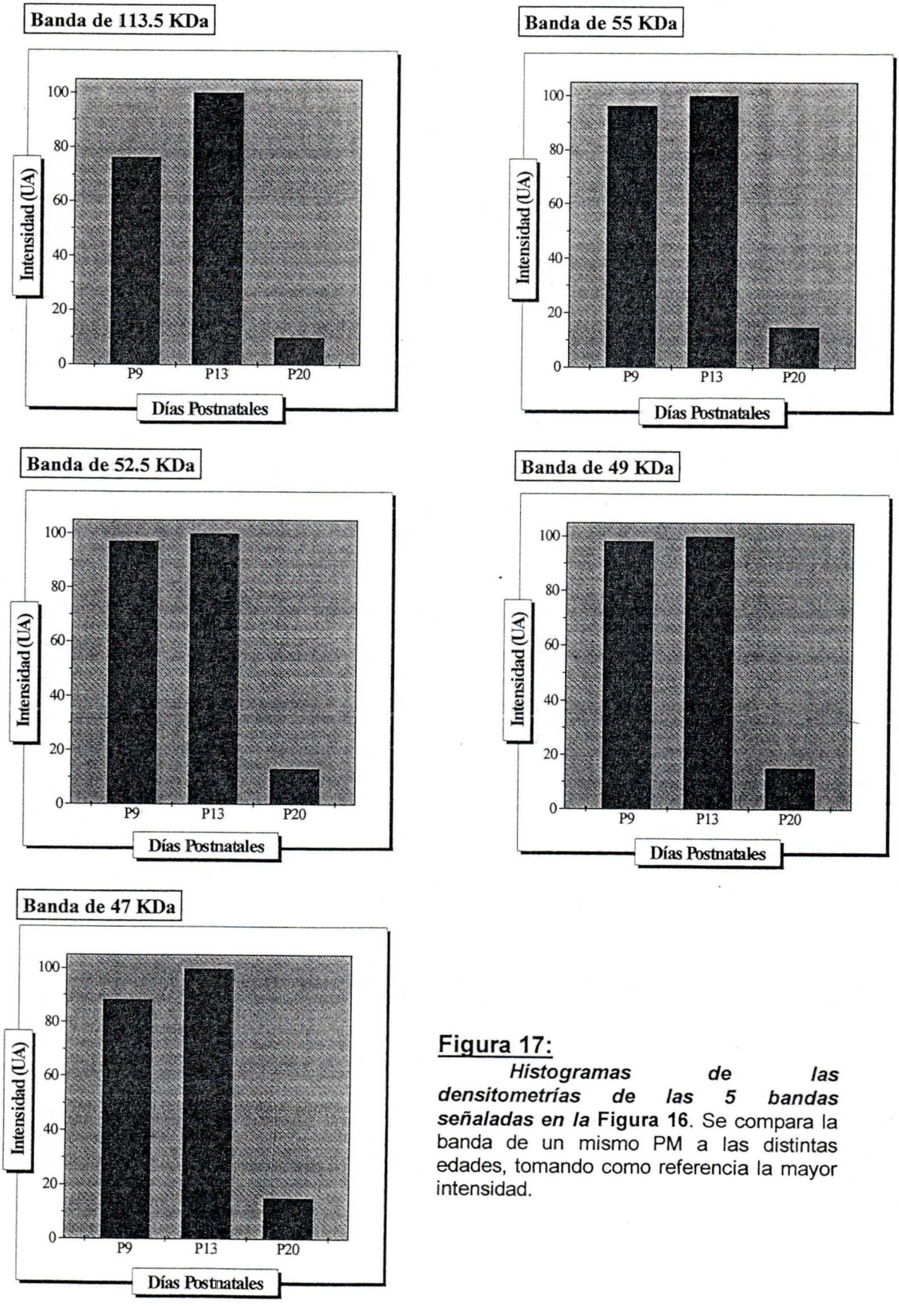


Figura 17:

***Histogramas de las densitometrías de las 5 bandas señaladas en la* Figura 16**. Se compara la banda de un mismo PM a las distintas edades, tomando como referencia la mayor intensidad.

No se observaron cambios en la síntesis cuando se realizaron incubaciones de 8 horas en lugar de 3 horas (dato no mostrado).

c) Fosforilación de Tau.

Los cambios que observamos en los Western blots durante la estabilización sináptica no se acompañan con variaciones en la velocidad de síntesis neta de Tau. La posibilidad que surge por lo tanto es que Tau sufra modificaciones a nivel de la fosforilación (Lindwall and Cole, 1984a; Kosik and Cáceres, 1991; Larcher et al., 1992).

La variación de la fosforilación neta de Tau se muestra en las **Figuras 18** y **19**. La autorradiografía del inmunoprecipitado, de un cultivo incubado durante 3 horas, revela una máxima incorporación de ^{32}P a P9. Esta disminuye a P12 y casi no se detecta a P20.

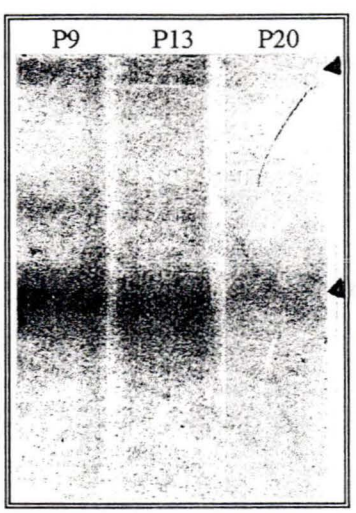


Figura 18:
Inmunoprecipitación de Tau marcada con ^{32}P-ortofosfato. Autorradiografía de un gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. La incubación con ^{32}P fue de 3 horas, luego se extrajo Tau y se inmunoprecipitó con el anticuerpo policlonal.

Se observa una banda de aproximadamente 84 KDa que es obtenida también, al igual que las otras bandas, por Peng et al (1986) cuando realizan la inmunoprecipitación a partir de cultivos neuronales. Ellos atribuyen esta banda a un fragmento de la HMW-Tau.

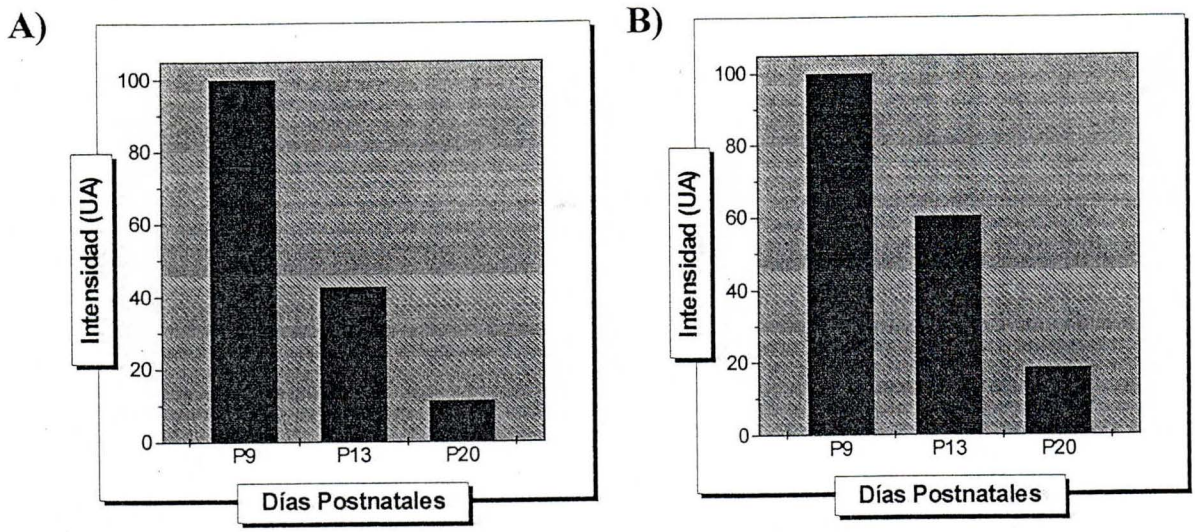


Figura 20:
***Histogramas de la densitometrías de las bandas de la* Figura 19**. Se muestra la fosforilación de HMW-Tau (**A**) y de las isoformas de bajo peso molecular (**B**) durante las tres edades postnatales.

Debido a la marca que produce el ^{32}P es muy difícil poder determinar si se fosforila solo una banda o más. Lo que pudimos determinar es que la zona fosforilada abarca los pesos moleculares de 48-51.5 kDa, siendo probablemente la isoforma de 49 kDa.

d) Relación entre la síntesis y la fosforilación de Tau: efecto de la cicloheximida.

Debido a que los cambios que nosotros observamos parecen solo ser debidos a la fosforilación y no a la síntesis de Tau, lo que quisimos ver es cual era el efecto que produciría la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, en los cultivos con ^{32}P.

Realizamos una curva de tiempo para ver como variaba la síntesis de proteínas con el transcurso de la incubación en presencia de cicloheximida (**Tabla**

I y **Figura 20**). La incubación de las mini-unidades de tejido se realiza con ^{3}H-leucina y midiendo la actividad específica (cpm ^{3}H/mg de prot.). Se observa que a las 3 horas de incubación (tiempo empleado para las marcaciones) hay aproximadamente un 54 % de inhibición utilizando 20 μg/ml de cicloheximida y con 40 μg/ml, que fue utilizada para las siguientes incubaciones, hay una inhibición del 65 % (**Tabla II** y **Figura 21**).

Tiempo *(hs.)*	***Control*** *(cpm/mg prot.)*	***Cicloheximida****(cpm/mg prot.)*
0.5	2.475 ±0.884	1.465±0.115
1	3.885±0.129	1.813±0.223
2	6.0625±1.371	2.483±0.519
3	6.7875±1.212	3.140±1.077

Tabla I:

Tratamiento con y sin cicloheximida a cultivos marcados con ^{3}H-leucina. El n en todos los casos es 4.

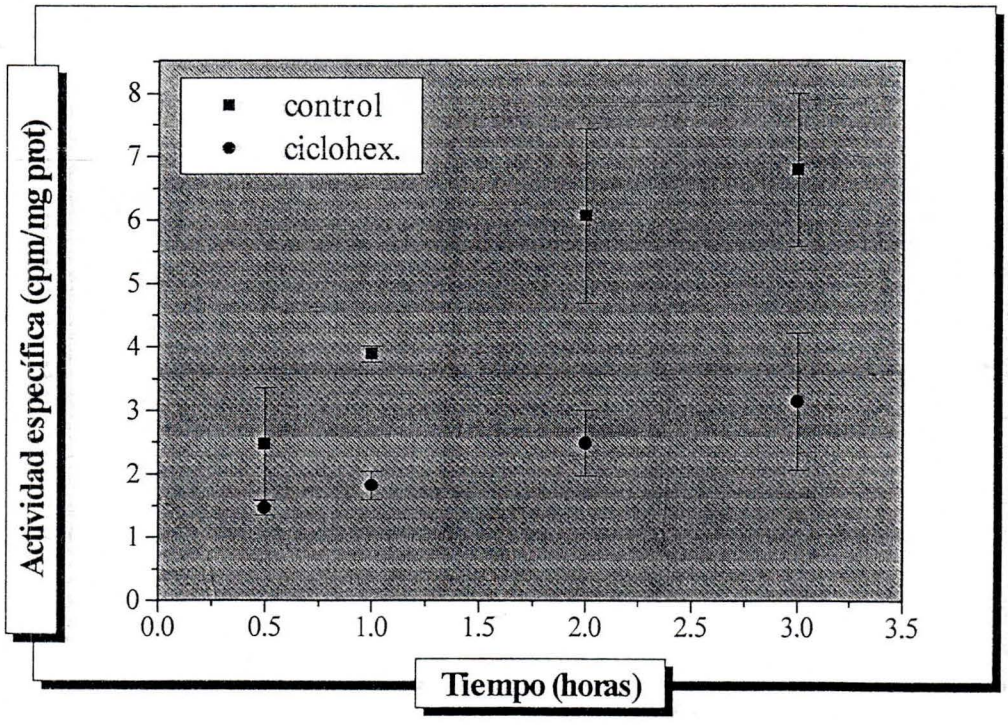


Figura 20:

Curva de tiempo mostrando el efecto de la cicloheximida sobre la síntesis de proteínas totales. La concentración de cicloheximida utilizada fue de 20 μg/ml. Las proteínas fueron marcadas distintos tiempos con ^{3}H-leucina. Las barras representan el desvío estándar, n=4.

	Control (cpm/mg prot.)	*Cicloheximida (cpm/mg prot.)*
Media	25.667	9.182
Error	2.587	1.923
n	*7*	*6*

Tabla II:

Efecto de la cicloheximida a P9. La concentración utilizada fue de 40 mg/ml. El cultivo se realizó con ^{3}H-leucina.

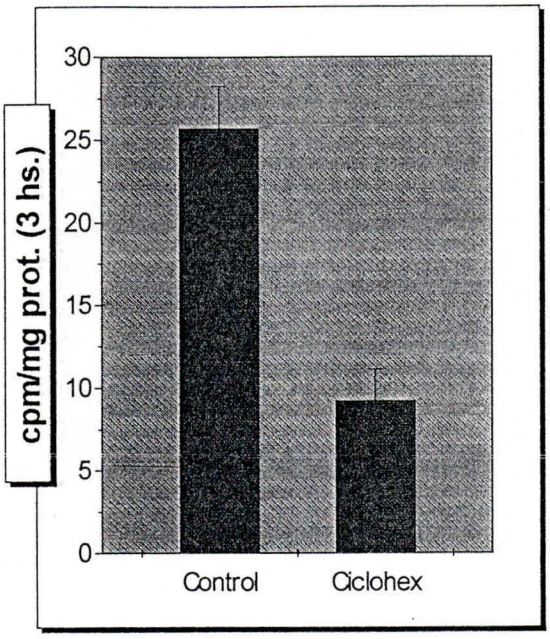


Figura 21:

Histograma que muestra la inhibición que causa la cicloheximida a P9. 3 horas de incubación con 10 μCi/50 μl MEM.

Utilizando entonces una concentración de 40 μg/ml de cicloheximida se inmunoprecipitó Tau proveniente de tejido marcado con ^{32}P. En este caso se realizaron dos inmunoprecipitaciones, una con el anticuerpo policlonal (**Figura 22**) y otra con el anticuerpo monoclonal Tau-5 (**Figura 24**). Los histogramas muestran los niveles de fosforilación en las **Figuras 23** y **Figura 25**.

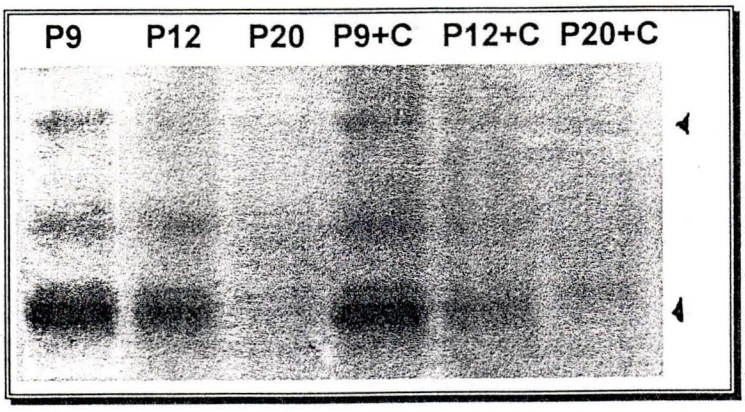


Figura 22:

Autorradiografía del inmunoprecipitado con el anticuerpo policlonal con y sin cicloheximida en el medio. Gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. C: cicloheximida (40 μg/ml) fue añadida al medio de cultivo antes de sembrar el tejido. Las bandas de Tau están señaladas por flechas.

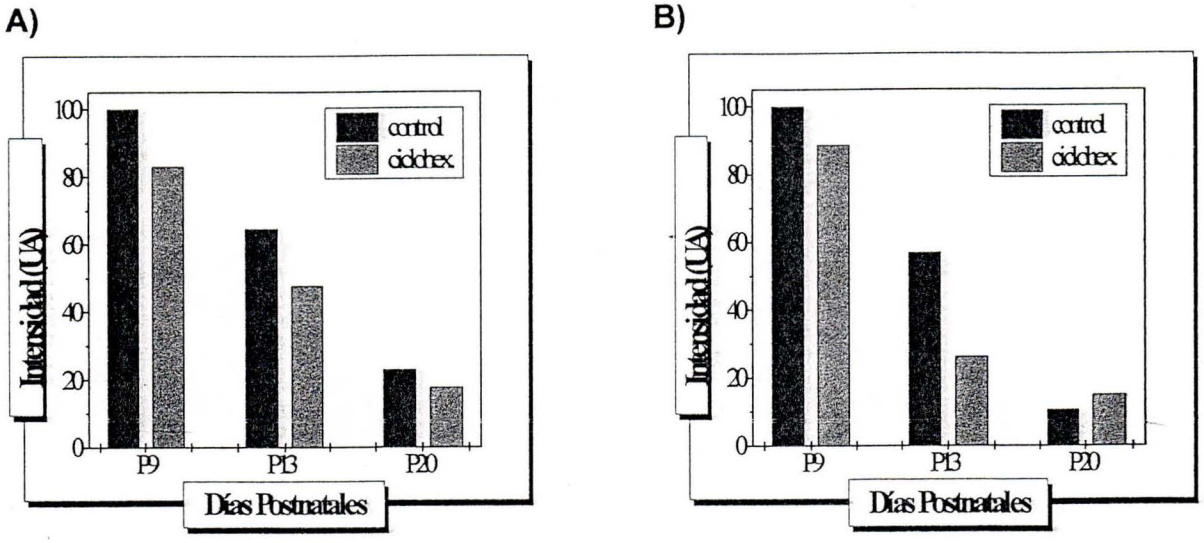


Figura 23:

***Histogramas de la* Figura 23.** Se observa el efecto producido por la cicloheximida a las distintas edades. **A):** HMW-Tau; **B):** Tau

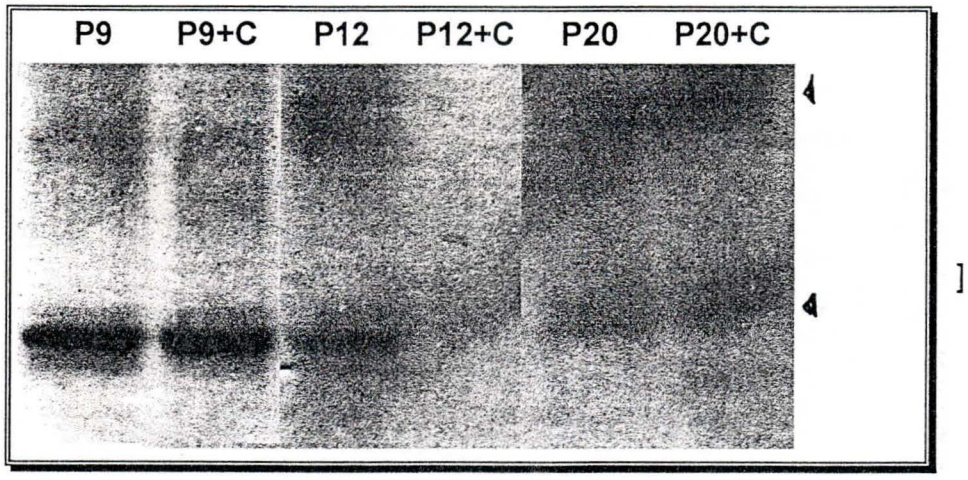
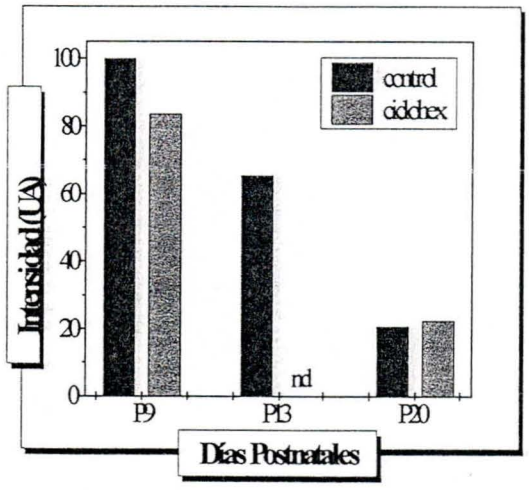


Figura 25:

Autorradiografía del inmunoprecipitado con el anticuerpo monoclonal Tau-5 con o sin n cicloheximida en el medio. Gel SDS-PAGE en gradiente 7.5-15%. C: cicloheximida (40 μg/ml).Las bandas de Tau están marcadas con puntas de flecha, se observan dos bandas débiles por encima y de abajo de una mayor.

A)



B)

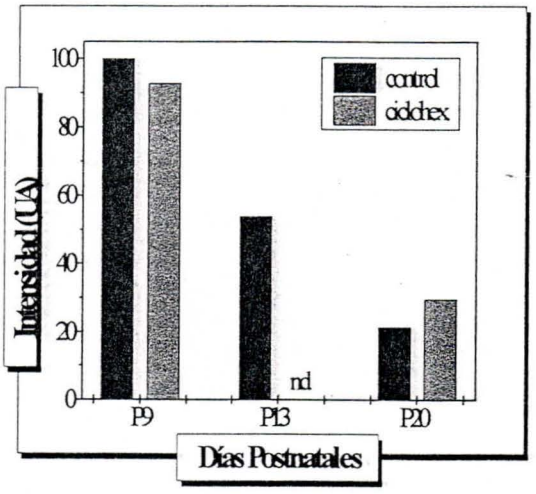


Figura 26:

***Histogramas de la* Figura 25.** Se observa el efecto producido por la cicloheximida a las distintas edades. **A):** HMW-Tau; **B):** Tau (se grafica la banda de mayor intensidad). nd: no determinado.

En la inmunoprecipitación con Tau-5 no se observa marca a P12 con cicloheximida porque el cultivo en esas condiciones no funcionó. Con el

monoclonal Tau-5 en este experimento si se ve, en forma muy débil, la HMW-Tau que no se apreciaba en el experimento de la **Figura 15**. Además se aprecian 2 bandas muy débiles, por encima y por debajo de una banda de mayor intensidad de Tau.

La inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal muestra un patrón similar a la de Tau-5, con la sola excepción de que las bandas por debajo y por arriba de la banda mayor no pueden ser distinguidas claramente. Esto puede deberse a la intensidad de esta banda con este anticuerpo.

No se puede decir si los dos anticuerpos están bajando la o las mismas isoformas ya que como ya se ha mencionado la marca que deja el ^{32}P es muy difusa. Sin embargo sí se puede decir que ambos anticuerpos muestran un patrón de fosforilación similar.

En el control se ve que la fosforilación es máxima a P9 y luego va disminuyendo hasta ser casi indetectable a P20. Se observa el mismo patrón que el de la **Fgura 18**.

A P9 la cicloheximida casi no causa efecto en la fosforilación (hay solo una leve disminución), pero a P13 la cicloheximida inhibe más de un 50 % la fosforilacion. Esto lamentablemente no pudo ser verificado con el anticuerpo monoclonal Tau-5.

Tau y su relación con el mutante *staggerer*.

a) Western blot.

Debido a que el mutante *staggerer* se encuentra afectado en la estabilización sináptica, esto nos llevó a tratar de analizar como se encontraba Tau. Lo que cabría esperar es que las isoformas que estén involucradas en el crecimiento axonal no estén afectadas, mientras que si lo estén las involucradas en la estabilización sináptica.

Se compararon muestras provenientes de cerebelo mutante y de wild type de 12 días postnatales (edad critica en la estabilización sináptica). Se observa en la **Figura 26** y más claramente en los histogramas correspondientes a la densitometría de las bandas en la **Figura 27** que hay una gran diferencia de expresión en las isoformas de 52.5 y 51.5 kDa. Las otra isoformas en el mutante muestran una intensidad normal. La isoforma de menor peso molecular (47 KDa) no se observa en ninguna de las dos muestras probablemente debido a la muy baja intensidad de marca que hubo.

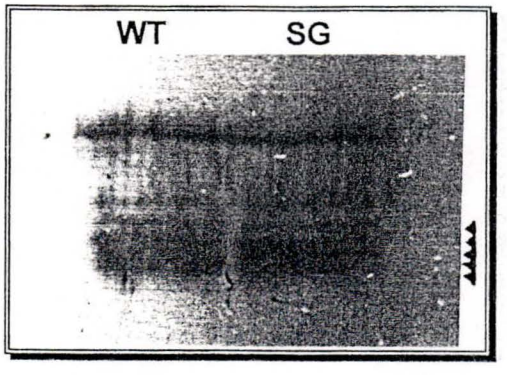


Figura 27:
***Western blot de muestras de cerebelo de P12 en un ratón wt y en un mutante* staggerer.** Las puntas de flecha señalan las isoformas de Tau.

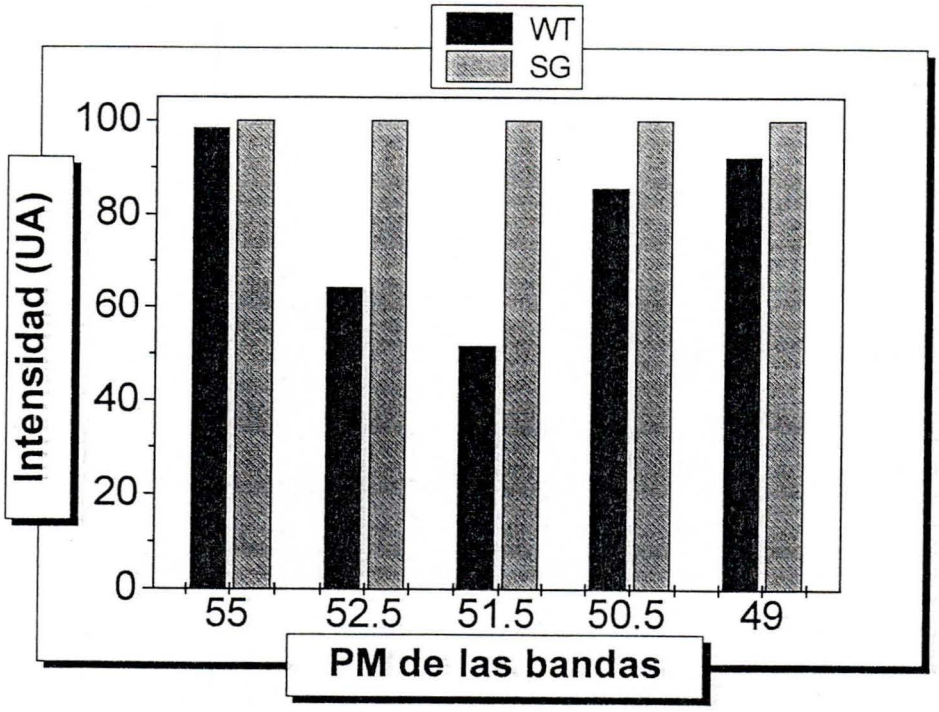


Figura 28:

***Histogramas correspondientes a las densitometrías de las 5 bandas que se observan en lel Western blot de la* Figura 15**. Se compara la intensidad de cada una de las bandas tomando como referencia la de mayor intensidad.

b) Inmunocitoquímica

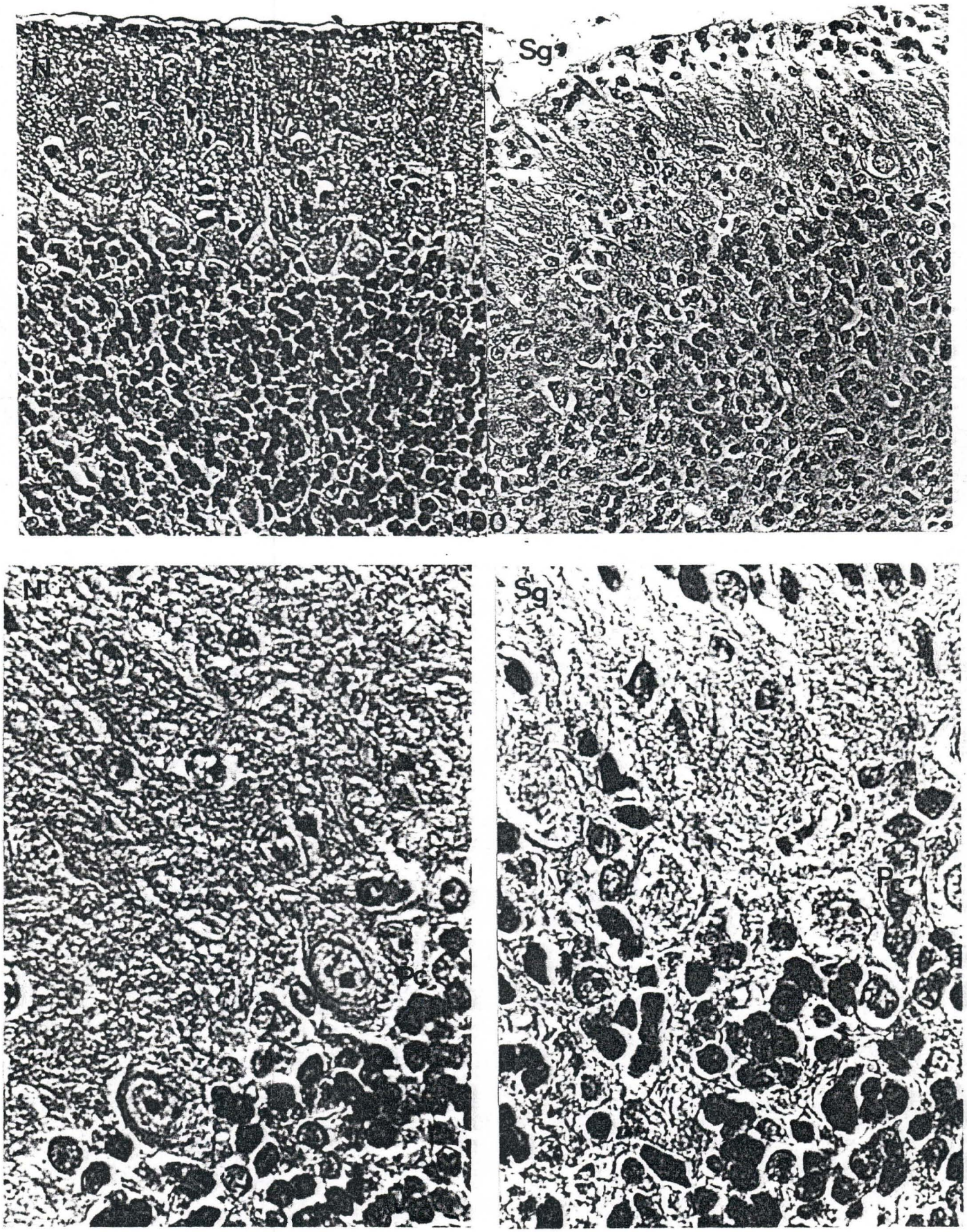
Mediante inmunocitoquímicas de muestras de P16 realizadas con el anticuerpo monoclonal Tau-1 se ve que Tau presenta una distribución normal en el mutante (**Figura 28**).

Figura 28:

***Distribución de Tau en el cerebelo del ratón normal y del mutante* staggerer. A:** wt; **B:** mutante staggerer.La detección del antígeno se realiza con peroxidasa (coloración marrón) y la tinción nuclear de fondo es con hematoxilina (coloración azul-violeta) a 400X. **M**: capa molecular; **E**: capa granular externa; **I**: capa granular interna: **P**: capa de células de Purkinje; **W**: sustancia blanca; **Pc**: célula de Purkinje.

Fig 31

TAU



1000 x

DISCUSIÓN

Heterogeneidad de Tau

Debido a que nuestro objetivo era estudiar los cambios que se producían a nivel de Tau durante la sinaptogénesis, el empleo del cerebelo como modelo experimental es ideal. A diferencia de lo que ocurre con otros tejidos del SNC, el cerebelo posee un gran número de sinapsis de una misma clase (grano-Purkinje: 90%) y además la sinaptogénesis transcurre postnatalmente (Landis and Sidman, 1978).

Existen varios métodos para la purificación de Tau (ensamblado y desensamblado de microtúbulos (Skelanski M., 1973; Weingarten M. Et al., 1975), solubilidad en ácido perclórico (Lindwall and Cole, 1984b), estabilidad a altas temperaturas de la proteína (Herzog and Weber, 1978). El método de ensamblado y desensamblado de microtúbulos, usado durante muchos años, se descartó por que no se obtienen todas las isoformas de Tau (Drubin, 1984). Esto se debería a la presencia en ciertos momentos del desarrollo de formas hiperfosforiladas que tienen una menor afinidad por los microtúbulos (Lindwall and Cole, 1984a). La muestra sonicada, la resistencia a las altas temperaturas y la posterior centrifugación a muy altas velocidades (100.000 g) es ideal ya que nos permite recuperar todas las isoformas de Tau y además es un procedimiento sumamente rápido (**Esquema 5**). La poca diferencia de peso molecular que existe entre las distintas isoformas obliga a emplear geles SDS-PAGE en gradiente o a la utilización de corridas "largas" para lograr una separación adecuada de las bandas.

A pesar de que casi no hay coincidencias entre los distintos autores en el peso molecular de cada una de las isoformas, y de que todavía no está claro cuantas isoformas hay realmente (hay descriptas entre 4 y 7), lo inequívoco es la gran heterogeneidad que tiene esta proteína (Francon et al., 1982; Binder et al., 1985; Kosik et al., 1988; Larcher et al., 1992). La variedad de isoformas, la diferente intensidad de las mismas y la distribución en cada tejido contribuyen a esta heterogeneidad (Larcher, 1992). A esto hay que sumarle el momento del desarrollo que se analiza.

Las dos isoformas de más alto peso molecular que nosotros observamos en el cerebelo (**Figura 4**) (55 y 52.5 KDa) se mantienen a un nivel constante durante el período analizado, comportándose como isoformas "constitutivas".

La isoforma de 51.5 kDa se encuentra a muy altos niveles a P9, disminuye levemente a P12 y P13, y cae bruscamente a P20, lo que indicaría que podría llegar a tener un rol específico en la elongación axonal. En este período, los axones de las células grano, es decir, las fibras paralelas, son los que están siendo elongados mayoritariamente (Altman, 1972) por lo que esta isoforma podría formar parte de los mismos. La isoforma de 49 kDa parecería comportarse de un modo similar, pero no es del todo claro como es su comportamiento a P9 en comparación con P12 (**Figura 7**).

Las otras dos isoformas (50.5 y 47 kDa) se comportan de una manera similar entre sí (**Figura 7**). Poseen niveles bajos a P9, se incrementan entre P12 y P13 y caen de nuevo a P20. El máximo de acumulación de estas isoformas parecería estar relacionado con el inicio de la estabilización sináptica. La isoforma más representativa de este comportamiento es la de menor peso molecular (47 kDa).

La disminución que se observa en los niveles de Tau a partir de los P20 aproximadamente en las cuatro isoformas de más bajo peso molecular (51.5, 50.5, 49 y 47 kDa), podría estar relacionada con el reemplazo que sufriría esta proteína por otras MAPs, como ser MAP1A y MAP1B (Harada et al., 1994; Di Tella, 1995).

El mantenimiento de los niveles de las dos isoformas de mayor peso molecular podría indicar que éstas serían formas maduras de Tau. Esto está de acuerdo con Francon et al. (1982) y Larcher et al. (1992), los cuales observan durante el desarrollo la aparición y el mantenimiento de las bandas de mayor peso molecular.

Ubicación subcelular de Tau

Se observó en el fraccionamiento subcelular que había expresión de Tau en la fracción nuclear (poca, tal vez debida a contaminación) y fundamentalmente en las fracciones sinaptosomales y en el citosol. Debido a que no observamos grandes diferencias entre las fracciones sinaptosomales aminérgicas y no aminérgicas, y a que no hallamos evidencia de la presencia de Tau en la fracción mielínica ni en la mitocondrial pura (**Figura 11**), nosotros utilizamos la fracción mitocondrial cruda como fuente de sinaptosomas evitando pérdidas de material. No encontramos Tau en la fracción mielínica y vemos gran cantidad en las fracciones sinaptosomales, parecería ser que los axones se han recuperado en la fracción sinaptosomal.

En las fracciones sinaptosomales se observan que están las seis isoformas de Tau, y el patrón de distribución es similar al del homogenato total (comparar **Figuras 4** y **12**). En el citosol solo se observan las dos isoformas de más bajo peso molecular (47 y 49 kDa) y las dos de más alto peso molecular (52.5 kDa y 55 kDa) (**Figura 13**).

Esta es la primera vez que se realiza un fraccionamiento subcelular de esta proteína. Seria interesante poder lograr separar los axones del cono de crecimiento para así poder tener más datos para poder dilucidar las modificaciones, principalmente a nivel de la fosforilación, que se producen en la zona del cono de crecimiento durante la elongación y en el momento de la estabilización sináptica.

Síntesis de Tau

La velocidad de síntesis de Tau no sigue la velocidad de síntesis de proteínas totales (Radrizzani, 1995) (**Figura 29**). A P13, cuando la síntesis de proteínas totales cae (aproximadamente un 30% en comparación con P9), la síntesis de las isoformas de Tau permanece a los mismos niveles que a P9 (**Figura 16** y **17**).

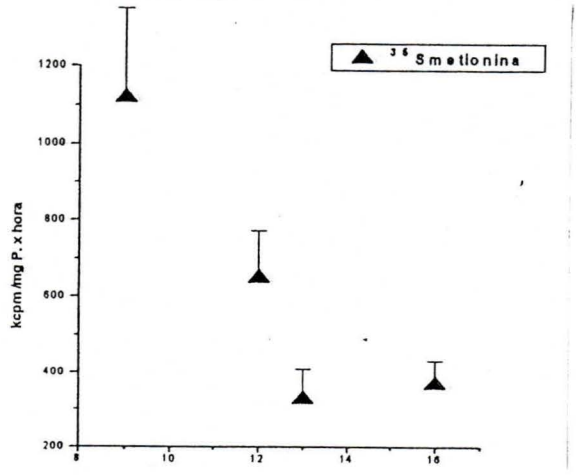


Figura 29:
Incorporación de ^{35}S-metionina en cerebelo de ratón normal durante la estabilización de sinapsis grano-Purkinje. Los triángulos representan los valores promedios y las barras la desviación estándard (n=3).

La síntesis de proteínas se mantiene constante hasta el inicio de la estabilización sináptica, siguiendo el patrón de crecimiento axonal y no el de la síntesis de proteínas comúnmente involucradas en la división celular.

El hecho de que aparezcan cuatro bandas de entre 47 y 55 kDa en la inmunoprecipitación con tres horas de incubación, está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores al tratar Tau con fosfatasa alcalina. Lindwall and Cole (1984) y Larcher et al. (1992) encuentran que luego de la defosforilación solo cuatro bandas aparecen en los Western blots en lugar de las seis o siete que obtenían normalmente. También se obtuvieron solo cuatro

bandas cuando se realizó la transcripción *in vitro* de mensajeros de Tau provenientes de ratones de seis días de edad (Drubin et al., 1984).

La no aparición de las dos isoformas de peso molecular intermedio puede ser explicada de dos maneras. a) Surgen a partir de procesamientos postraduccionales (por ej. fosforilación) lentos, tal que no pueden ser detectados durante las tres horas de incubación. b) Estas isoformas pertenecen a las fibras musgosas o a las fibras trepadoras y no pueden ser marcadas con ^{35}S-metionina ya que estas fibras tienen sus cuerpos celulares (donde se sintetiza Tau) fuera del cerebelo.

La primera hipótesis es poco probable ya que en incubaciones de 8 horas con ^{35}S-metionina observamos el mismo patrón de bandas (datos no mostrados).

Fosforilación de Tau.

a) Importancia de la fosforilación de Tau.

La fosforilación de Tau tiene una gran importancia en la enfermedad de Alzheimer debido a que el principal constituyente de los filamentos helicoidales paralelos (PHF), carcterísticos de esta enfermedad, contiene a Tau en un estado hiperfosforilado (Nukina, Goedert 1988). Esta hiperfosforilaci ón que se da durante el Alzheimer se diice que "recapitula"la fosforilación normal que se produce durante el desarrollo debido a que los sitios de fosforilación son los mismos.Todo esto sugiere que al menos algunos de los mecanismos que están activados durante el desarrollo y que luego son äpagados"durante la maduración normal del sistema nervioso pueden ser reactivados durante el transcurso de la enfermedad (Bramblett, Goedert 1993). Esta hiperfosforilación puede deberse tanto a un incremento en la actividad kinasa como a una disminución en la actividad fosfatasa. Se ha observado un 30% de disminución de la actividad fosfatasa sobre Tau en el Alzheimer por lo que se supone que debe existir algún tipo de deficiencia en el accionar de estas proteínas (Ono, Gong, Khatoon).

b) Fosforilación y crecimiento axonal

Hemos observado que la fosforilación durante el período de elongación del axón es intensa (P9) y cuando se empieza a producir la estabilización sináptica disminuye (P13) (**Figura 18**). En consecuencia la fosforilación sigue el mismo patrón que el balance existente entre las kinasas y fosfatas en el cerebro (Mawal-Dewan, 1994).

El período entre P8 y P11 es una época en el desarrollo del cerebro en el cual se encuentran afectadas entre otras proteínas, las kinasas y las fosfatasas. Durante este tiempo, la actividad de las kinasas comienza a disminuir y la actividad fosfatasa a aumentar (Mawal-Dewan, 1994).

La banda principal que se ve fuertemente con los dos tipos de anticuerpos probados ve disminuída su intensidad a P13. Esto podría significar que se trata de la forma embrionaria, la cual se conoce que está intensamente fosforilada y desaparece a partir de la segunda semana postnatal (Francon et al., 1982; Larcher et al., 1992).

En la inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal Tau-5 (**Figura 24**) se ven dos bandas débiles, una por encima y otra por debajo de la banda principal. Estas dos bandas no muestran la misma disminución con el desarrollo que la principal, sino que se mantiene constante. Esto que podría indicar que se trata de una isoforma de Tau adulta.

La isoforma embrionaria de Tau además de tener un alto grado de fosforilación, (Mawal-Dewan et al., 1994) presenta solo tres regiones repetitivas (de unión a microtúbulos) (Goedert et al. ; 1989,1989 ; Himmler, 1989). Estas características puede facilitar cambios más rápidos entre los estados polimerizado y despolimerizado, y esto podría aumentar la capacidad de las dendritas y axones para crecer y establecer contactos con otras neuronas (Bramblett et al., 1993).

Otro dato que se desprende de nuestros experimentos es que la fosforilación no depende de la síntesis (**Figuras 22** y **24**), por lo menos a P9. Esto va en contra de la hipótesis propuesta por Kanai y Hirokawa (1995) que señalan,

en base al seguimiento de Tau con distintos tipos de anticuerpos por técnicas inmunocitoquímicas, que Tau se fosforilaría apenas de sintetiza para así poder ser "cargada"dentro del sistema de transporte del axón.

El hecho que a P12 se observe una inhibición de la síntesis con cicloheximida (**Figura 23**) y no a P9 podría deberse a la ausencia de algún factor (por ej. una proteasa) que cause la estabilización de las fosfatasas presentes a esa edad.

En todas las inmunoprecipitaciones se ve que se fosforila, con un patrón similar a las isoformas de bajo peso molecular, HMW-Tau. Esta isoforma debido a su gran tamaño (138 kDa aproximadamente) se encontraría formando parte de axones de gran calibre como ser los axones de las células de Purkinje que se dirijen hacia los nucleos cerebelares profundos. A pesar que no es detectada en los Western blots, bajo nuestras condiciones, y apenas es detectada en los experimentos de síntesis, muestra un gran nivel de fosforilación.

La **Figura 30** muestra esquemáticamente como varán la acumulación, la velocidad de síntesis y la fosforilación neta de Tau durante el período de sinaptogénesis.

5.- Mutante staggerer.

Debido a que este mutante no estabiliza la sinapsis, cualquier diferencia entre los patrones de las bandas podría implicar que estas están involucradas en la estabilización sináptica.

Las bandas que muestran diferencia son las isoformas de 52.5 KDa y 51.5 KDa. Esta última es la que proponemos que podría tener relación con la elongación de las células grano. Si esto es así, la de 52.5 kDa podría ser la que estuviera alterada en la célula de Purkinje, que es la célula donde mapea la mutación

La inmunocitoquímica del ratón wt y del mutante no muestran diferencias a P16. Lo más probable es que esto se deba al anticuerpo utilizado para la

inmunocitoquímica ya que este no reconoce todas las ciertas formas fosforiladas de Tau 9binder et al., 1985; Szendrei et al., 1993).

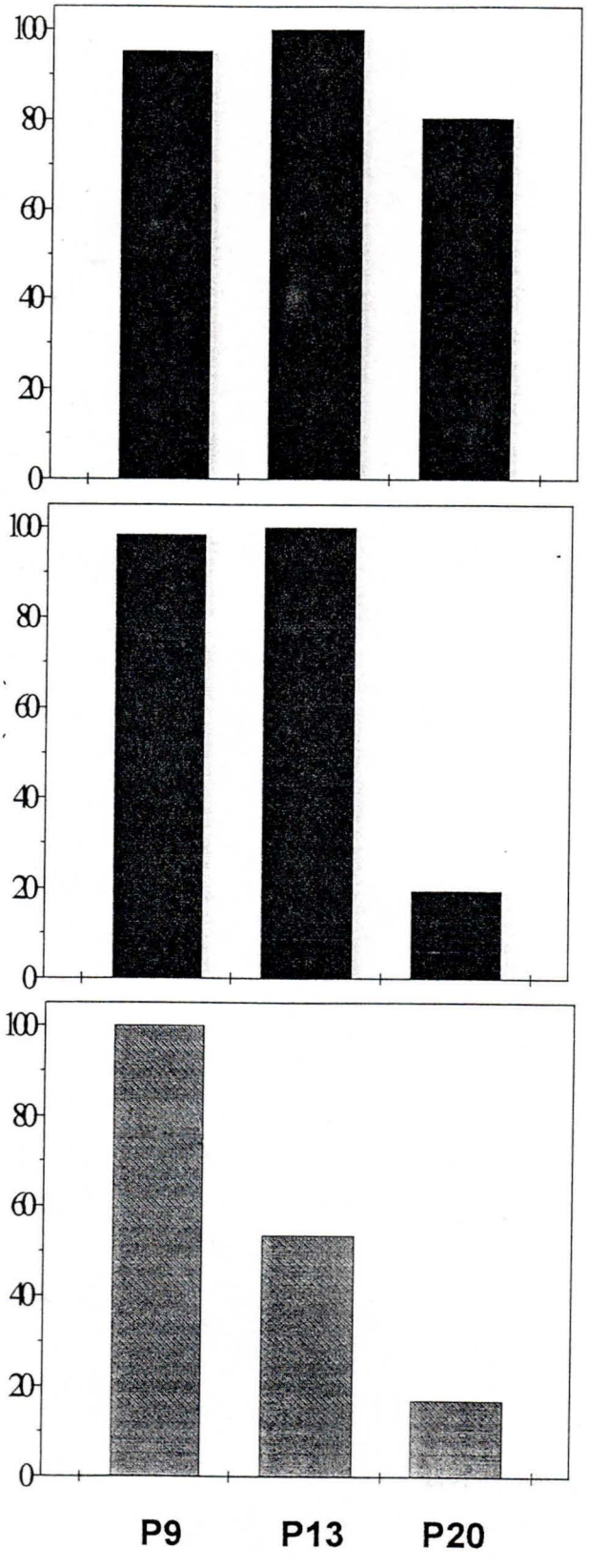


Figura 30:

Histogramas comparando la acumulación, síntesis y fosforilación de Tau. Los datos muestran experimento realizados con el anticuerpo policlonal. **A**: acumulación; **B**: síntesis; **C**: fosforilación. Se toma como referencia la mayor intensidad (100) para cada gráfico. Al pie se observan los días postnatales correspondientes.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

Existen 6 isoformas de Tau en el cerebelo detectables en nuestros geles.

Hay un diferente patrón de isoformas en la fracción sinaptosomal que en el citosol.

La síntesis de solo 4 isoformas puede explicarse suponiendo que las otras dos isoformas no son sintetizadas en la corteza cerebelosa. Estas pueden originarse en los cuerpos celulares de las fibras musgosas y de las fibras trepadoras, los cuales no pertenecen a la corteza cerebelosa o, por procesamientos post-traduccionales (por ej. fosforilación) más lentos que tres horas de otras isoformas.

La fosforilación de Tau sigue un patrón similar al balance que existe en el cerebro durante ese período entre la actividad de las kinasas y la actividad de las fosfatasas.

La banda principal que se observa de Tau fosforilada parecería corresponder a la isoforma embrionaria de Tau.

Las bandas accesorias que se ven junto a la banda principal pueden reflejar la fosforilación de isoformas de Tau adultas.

La fosforilación no depende de la síntesis de proteínas, por lo menos a P9..

La HMW-Tau se fosforila en gran medida.

BIBLIOGRAFÍA

* Altman J. 1972. Postnatal development of cerebellar cortex in rat. II. Phases in the maduration of Purkinje cells and of the molecular layer.

* Alperín M., Idoyaga Vargas V. and Carminatti H. 1986. Rate of protein glycosilation in rat cerebral cortex. J. Neurochem. 47; 355-362.

* Aniello F., Couchie D., Bridoux A.M., Gripois D. and Nunez J. 1991. Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88; 4035-4039.

* Binder L., Frankfurter A. and Rebhun L. 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. J. Cell Biol. 101; 1371-1378.

* Black M., Aletta J. and Greene L. 1986. Regulation of microtubule composition and stability during nerve growth factor-promoted neurite outgrowth. J. Cell Biol. 103; 545-557.

* Bramblett G., Goedert M., Jakes R., Merrik S., Trojanowski J. and Lee M. 1993. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron 10; 1089-1099.

* Brandt R., Léger J. and Lee G. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. J. Cell Biol. 131; 1327-1340.

* Brugg B. and Matus A. 1988. PC12 cells express juvenile microtubule associates-proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. J. Cell Biol. 107; 643-650.

* Cáceres A. and Kosik K. 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. Nature 343; 461-463.

* Cáceres A., Mautino J. and Kosik K. 1992. Supression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurones inhibits minor neurite formation. Neuron 9; 607-618.

* Changeaux J. and Danchin A. 1976. Selective stabilization of developing synapses, a mechanism for the specification of neuronal networks. Nature 264 ; 705-712.

* Chen J., Kanai Y., Cowan N. and Hirokawa N. 1992. projection domains of microtubuleassociated protein 2 (MAP2) and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. Nature 360; 674-677.

* Cleveland D., Hwo S. and Kirschner M. 1977. Purification of tau, amicrotubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. J. Mol. Biol. 116; 207-225.

* Coligan J., Dumn B., Ploegh H., Speizher D. and Wingfield P. 1995. Labelling cultured cells with $^{32}P_i$ and preparing cell lysates for immunoprecipitation. In Current Protocols in Protein Science. J. Wiley & Sons, Inc.

* Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevack E. and Storber W. 1996. Immunoprecipitation. In Current Protocols in Immunology. J. Wiley & Sons, Inc.

* Couchie D., Fages C., Bridoux A., Rolland B., Tardy M. and Nunez J. 1985. Microtubule-associated proteins and "in vivo" astrocyte differentiation. J. Cell Biol. 101; 2095-2103.

* Couchie D., Mavilia C., Georgieff I., Liem R., Shelanski M. and Nunez J. 1992. Primary estructure of high molecular weight tau present in the pheripheral nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 4378-4381.

* De Robertis E. pellegrino de Iraldi A., Rodriguez de Lorez Arnais G. and Salganicoff L. 1962. Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase. J. neurochem. 9; 23-35.

* DiTella M., Feiguin F., Morfini G. and Cáceres A. 1994. Microfilament-associated growth cone component depends upon tau for its intracellular localization. Cell Motil. Cytosk. 29; 117-130.

* Di Tella M. 1995. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

* Drewes G., Trinczek B., Illenberger S., Biernat J., Schmitt-Ulms G., Meyer H., Mandelkow E. M. and Mandelkow E. 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). J. Biol. Chem. 270; 7679-7688

* Drubin D., Caput D., and Kirschner M. 1984. Studies on the expression of the microtubule-associated protein, tau during mouse brain development, with newly isolated complementary DNA probes. J. Cell Biol. 98; 1090-1097.

* Drubin D., Feinstein S., Shooter E. and Kirschner M. 1985. Nerve growth factor induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. J. Cell Biol.101; 1790-1805.

* Drubin D. and Kirschner M. 1986. Purification of tau protein from brain. Methods Enzimol. 134; 156-160.

* Drubin G., Kobayashi S., Kellog D. and Kirschner M. 1988. Regulation of microtubule protein levels during cellular morphogenesis in nerve growth factor-treated PC12 cells. J. Cell Biol. 106; 1583-1591.

* Esmaeli-Azad B., Mc Carty J. and Feinstein S. 1994. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. J. Cell Sci. 107; 869-879.

* Ferreira A., Busciglio J. and Cáceres A. 1987. An immunocytochemical analysis of the ontogeny of the microtubule-associates proteins MAP-2 and Tau in the nervous system of the rat. Dev. Brain Res. 34; 9-31.

* Francon J., Lennon A. M., Fellous A., Mareck A., Pierre M., and Nunez J. 1982. Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. Eur. J. Biochem. 129; 465-471.

* Ginzburg I., Scherson T., Giveon D., Behar L., and Littauer U. 1982. Modulation of mRNA for microtubule-associated proteins during brain development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79; 4892-4896.

* Goedert M., Spillantini M., Potier M., Ulrich J. and Crowther R. 1989. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 1983-1987.

* Goedert M., Spillantini M., and Crowther R. 1992. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 1983-1987.

* Goedert M., Jakes R. Crowther R., Six J., Lübke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J. and Lee V. 1993. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90; 5066-5070

* .

* Goedert M. 1993. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. Trends in Neurosci. 16; 460-465.

* Goldberg D. and Burmeister D. 1989. Looking into growth cones. Trends Neurosci. 12; 503-506.

* Greene L., Liem R. and Shelanski M. 1983. Regulation of a high molecular weight microtubule-associated protein in PC12 cells by nerve growth factor. J. Cell Biol. 96; 76-83.

* Gustke N., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E.-M. and Mandelkow E. 1994. Domains of t Protein and interactions with microtubules. Biochem. 33; 9511-9522.

* Hagestedt T., Lichtenberg B., Wille H., Mandelkow E. M. and Mandelkow E. 1989. Tau protein becomes long and stiff upon phosphorylation: correlation between paracrystalline structure and degree of phosphorylation. J. Cell Biol. 109; 164-1651.

* Hamilton B., Frankei W., Kerrebrock A., Hawkins T., FitzHugh W., Kusumi K., Rusell L., Mueller K., van Berkel V., Birren B., Kruglyak L. and Lander E. 1996.

Disruption of the nuclear hormone receptor RORα in *staggerer* mice. Nature 379; 736-739.

* Hanemaaijer R. and Ginzburg Y. 1991. Involvement of mature tau isoforms in the stabilization of neurites in PC12 cells. J. Neurosci. Res. 30;163-171.

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

* Herrup K. and Müllen J. 1979. *Staggerer* chimeras : intrinsic nature of Purkinje cell defect and implication for normal cerebellar development. Brain Res. 178; 443-457.

* Herrup K. and Müllen J. 1981. Role of *staggerer* gene in determining Purkinje cell number in cerebellar cortex of mouse chimeras. Dev. Brain Res. 1; 475-485.

* Himmler A. 1989. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. Mol. Cell. Biol. 9; 1389-1396.

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

* Ishiguro K., Takamatsu M., Tomizawa K., Omori A., Takahashi M., Arioka M., Uchida T. and Imahori K. 1992. Tau protein kinase I converts normal tau protein in A68-like component of paired helical filaments. J. Biol. Chem. 267; 10897-10901.

* Jacobs J. and Stevens J. 1983. Changes in the organization of the neuritic cytoskeleton during nerve growth factor-activation differentiation of PC12 cells: a serial electron microscopic study of the development and control of neuritic shape. J. Cell Biol. 103; 895-906.

* Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Mori H., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T. and Hirokawa N. 1989. Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. J. Cell Biol. 109; 1173-1184.

* Kanai Y. and Hirokawa N. 1995. Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: supressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. Neuron 14; 421-432.

* Knops J., Kosik K., Lee G., Pardde J., Cohen-Gould L. and McConlogue L. 1991. Overexpression of tau in a non-neuronal cell induces long cellular processes. J. Cell Biol. 78; 958-965.

* Kosik K., Orecchio L., Bakalis S. and Neve R. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. Neuron 2; 1389-1397.

* Kosik K. and Cáceres A. 1991. Tau protein and the establishment of an axonal morphology. J. Cell Sci., Suppl. 15; 69-74.

* Landis D. And Sidman R. 1978. Electron microscopic analysis of postnatal hystogenesis in cerebellar cortex of *staggerer* mutant mice. Cerebellar development in *staggerer*. J. Comp. Neur. 179; 831-863.

* Laemli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227; 680-685.

* Lindwall G. and Cole D. 1984a. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. J. Biol. Chem. 259; 5301-5305.

* Lindwall G. and Cole D. 1984b. The purification of tau protein and the ocurrence of two phosphorylation states of tau in brain. J. Biol. Chem. 259; 12241-12245.

* Littauer U., Giveon D., Thierauf M. Ginzburg Y. and Ponstingl H. 1986. Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83; 7162-7166.

* Mandelcow E., Drewes G., Biernat J., Gustke N., Van Lint J., Vandenheede J. and Mandelcow E. 1992. Glycogen synthase kinase 3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. FEBS Lett. 314; 315-321.

* Mandelkow E.-M. and Mandelkow E. 1993. Tau as a marker for Alzheimer's disease. Trends Biochem. Sci. 18; 480-483.

* Mangin G., Couchie D., Charrière-Bertrand C. and Nunez J. 1989. Timing of expression of t and its encoding mRNAs in the developing cerebral neocortex and cerebellum of the mouse. J Neurochem 53; 45-50.

* Mawal-Dewan M., Henley J., Van de Voorde A., Trojanowski J. and Lee V. 1994. The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. J. Biol. Chem. 269; 30981-30987.

* Mitchison T. and Kirshner M. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. Neuron 1; 761-772.

* Oakley B. 1980. Simplified silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 105; 361-363.

* Pizzi M., Valerio A., Arrighi V., Galli P., Belloni M., Ribola M., Alberici A., Spano P. And Memo M. 1995. Inhibition of glutamate-induced neurotoxicity by a tau antisense oliginucleotide in primary culture of rat cerebellar granule cells. Eur. J. Neurosc. 7; 1603-1613.

* Radrizzani M. 1995. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

* Radrizzani M., Carminatti H., Pivetta O. and Idoyaga Vargas V. 1995. Developmental regulation of Thy 1.2 rate of synthesis in the mouse cerebellum. J. Neurosci. res. 42; 220-227.

* Shelanski M., Gaskin F. and Cantor C. 1973. Microtule assembly in the absence of added nucleotides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70; 765-768.

* Sotelo C. And Changeaux J. 1974. Transsynaptic degeneration "in cascade" in the cerebellar cortex of *staggerer* mutant mice. Brain Res. 67; 519-526.

* Szendrei G., Lee V. and Otvos L. Jr. 1993. Recognition of minimal epitope of monoclonal antibody Tau-1 depends upon the presence of a phosphate group but not its location. J. Neurosci. Res. 34;243-249.

* Vincent J., Legrand C., Rabié AA. And Legrand J. 1982-83. Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum. J. Physiol., París 78; 729-738.

* Yoon C. 1976. Pleiotropic effect of the *staggerer* gene. Brain Res. 109; 206-215.