



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Propiedades mecánicas de los filamentos intermedios en células”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Química Biológica

Lic. Mariano Smoler

Directoras de tesis: Dra. Valeria Levi

Dra. Luciana Bruno

Consejera de estudios: Dra. Adalí Pecci

Lugar de trabajo: Laboratorio de dinámica Intracelular, Instituto de Química Biológica de Ciencias Exactas y Naturales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Julio 2022

Propiedades mecánicas de los filamentos intermedios en células

El citoesqueleto es una red compleja y dinámica, formada por biopolímeros interconectados - microtúbulos, actina y filamentos intermedios (IFs)- que, entre otras funciones, están involucrados en la determinación de la morfología celular y la generación y transmisión de fuerzas. Tradicionalmente, se ha considerado que los IFs sólo contribuyen pasivamente a la viscoelasticidad celular; sin embargo, en los últimos años, diversos trabajos han mostrado que estos filamentos presentan roles muy activos en una gran variedad de procesos biológicos.

El objetivo central de esta tesis fue estudiar, en células vivas, ciertas propiedades mecánicas de los filamentos intermedios de vimentina relevantes a su función biológica.

Para ello combinamos microscopías confocal y de superresolución con una rutina que permite recuperar las coordenadas espaciales de filamentos individuales con precisión nanométrica. El análisis de las formas de los filamentos, basado en la descomposición en modos de Fourier, muestra que las curvaturas de los IFs en células vivas presentan un comportamiento símil térmico caracterizado por una longitud de persistencia aparente (l_p^*) similar a las reportadas en experimentos in vitro. Adicionalmente, hemos determinado que perturbaciones a las redes de actina o microtúbulos alteran la l_p^* y la movilidad de los IFs. Estos resultados aportan datos relevantes sobre el acoplamiento mecánico entre los IFs con las otras redes del citoesqueleto.

Trabajos recientes han planteado diferencias funcionales entre la red de vimentina perinuclear y la red periférica. Mientras la primera conforma una jaula que protegería mecánicamente al núcleo, la segunda estaría principalmente asociada a la integridad mecánica del citoesqueleto. En este contexto evaluamos propiedades biofísicas en ambas poblaciones de filamentos utilizando la novedosa técnica de superresolución MoNaLISA. Observamos que los filamentos periféricos están caracterizados por una mayor l_p^* , y por ende una mayor rigidez flexural, y que su movilidad se encuentra restringida en mayor proporción que los perinucleares, apoyando la hipótesis de una asociación diferencial con microtúbulos y filamentos de actina en sendas regiones celulares.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la existencia de un acoplamiento mecánico entre la red de vimentina y las redes de actina y microtúbulos que le permite responder activamente para compensar, de forma parcial, las perturbaciones mecánicas generadas en el citoesqueleto o transmitidas desde el exterior celular.

Palabras claves: citoesqueleto, filamentos intermedios, vimentina, microscopía de fluorescencia, recuperación de coordenadas, longitud de persistencia, movilidad intracelular.

Mechanical properties of intermediate filaments in cells

The cytoskeleton is a complex and dynamical network formed by crosslinked biopolymers – microtubules, actin and intermediate filaments (IFs) – which, among other functions, is intimately involved in the definition of the cell morphology and in force generation and transmission. Typically, IFs were only considered to contribute passively to the cell viscoelasticity; nevertheless, in the last years, many works have shown that these filaments have key active roles in a great variety of biological processes.

We explored relevant biophysical properties of the IFs, combining confocal and super-resolution microscopies with a routine that allows the recovery of spatial coordinates from individual filaments with nanometer precision. The analysis of filaments' shapes, based on Fourier decompositions, show that IFs curvatures in live cells have a thermal behaviour, characterized by an apparent persistence length (l_p^*) similar to that obtained in in-vitro preparations. Additionally, we have determined that perturbing the actin or microtubules networks modify the l_p^* and the mobility of the IFs. These results provide relevant data on the mechanical coupling between IFs with the other cytoskeleton networks.

Recent works have stated functional differences between the perinuclear vimentin network and the peripheral network. While the first one makes a cage that would protect mechanically the nucleus, the latter would be mainly associated to the mechanical integrity of the cytoskeleton. In this context we evaluated biophysical properties in both filaments' populations utilizing the novel technique of super-resolution MoNaLISA. We observed that peripheric filaments are characterized by a larger l_p^* , which means a larger flexural rigidity, and its mobility is restricted in larger proportion respect to perinuclear ones, supporting the hypothesis of a differential association with microtubules and actin filaments in both cell regions.

The results obtained in this thesis support a model in which the vimentin network is mechanically coupled with the actin and microtubules network, which allows this network to actively respond to compensate, partially, the mechanical perturbations generated in the cytoskeleton or transmitted from the exterior.

Keywords: cytoskeleton, intermediate filaments, vimentin, fluorescence microscopy, filaments tracking, persistence length, intracellular mobility.

Agradecimientos

En lugar destacado a Valeria Levi por su apoyo constante y guía en este camino de la vocación científica, por la dedicación y acompañamiento en cada instancia de formación en estos años de investigación compartidos. A Luciana Bruno, por sus aportes, pero también por el apoyo y el compromiso con el que acompañó este trabajo.

A mis compañeras, colegas del laboratorio, grandes personas de las cuales también aprendí mucho y supieron colaborar y acompañarme en este proyecto desde sus comienzos: Cecilia De Rossi, Carla Pallavicini, Martin Dodes Traian, Hernan Bucci, Paulita Verner, Martín Stortz.

A Diana Wetzler, por su ayuda y predisposición a lo largo de todos estos años.

A mi compañera de vida, por el amor y el apoyo incondicional.

A mi familia, por estar siempre presentes.

A mis amigos por la compañía y el aguante.

A mis gatos, León y Kisa que son también mi familia. Y a Honorio, que ya no está, pero siempre lo recuerdo y fue parte del proceso.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA que ya es como un segundo hogar, por haberme permitido formarme y continuar creciendo en mi carrera, lugar donde conocí a grandes maestros y mentores, excelentes profesionales, personas a quienes guardo mucho afecto y cariño, y que sigue demostrando que es posible hacer ciencia de calidad y de la cual podemos sentirnos orgullosos.

A CONICET por haber financiado este trabajo a través de una beca doctoral y haberme permitido seguir investigando.

Publicaciones asociadas a esta tesis

Intermediate filaments in living cells and its relation with other cytoskeletal polymers.

Mariano Smoler, Giovanna Coceano, Ilaria Testa, Luciana Bruno, Valeria Levi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(8), 118726. **2020**.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118726>

Dynamical organization of vimentin intermediate filaments in living cells revealed by MoNaLISA nanoscopy. Mariano Smoler, Francesca Pennacchietti, Luciana Bruno, Ilaria Testa, Valeria Levi. Manuscrito en preparación.

índice

Capítulo 1 - El citoesqueleto.....	9
1.1 El citoesqueleto	9
1.2 Microtúbulos	10
1.3 Filamentos de actina	12
1.4 Filamentos intermedios	15
1.5 Vimentina.....	19
1.5.1 La jaula nuclear de vimentina	20
1.5.2 La red de filamentos de vimentina periférica: comunicación con el citoesqueleto y definición de la morfología celular	22
1.5.3 Vimentina y migración.....	23
Capítulo 2 - Aspectos biofísicos de los filamentos intermedios	26
2.1 Longitud de persistencia	26
2.2 Métodos experimentales para la determinación de la l_p	28
2.3 Obtención de la longitud de persistencia a partir de la descomposición en modos de Fourier de las formas de los filamentos	31
2.4 Longitud de persistencia aparente de microtúbulos en células vivas.....	35
2.5 Longitud de persistencia y flexibilidad de los filamentos intermedios	37
Capítulo 3 - Técnicas de microscopía óptica para visualizar y localizar partículas y filamentos individuales con precisión nanométrica	40
3.1 Microscopías de fluorescencia.....	40
3.2 Resolución de un microscopio óptico.....	42
3.3 Microscopías de superresolución.....	43
3.4 Localización y análisis de trayectorias de partículas con precisión nanométrica	47
3.5 Localización de filamentos del citoesqueleto	51
3.6 AFTER: una rutina para recuperar coordenadas de filamentos individuales en células vivas	53
Capítulo 4 - Hipótesis de trabajo y objetivos.....	55
4.1 Motivaciones.....	55
4.2 Hipótesis	55
4.3 Objetivos	55

Capítulo 5 - Métodos experimentales y de análisis	56
5.1 Líneas celulares y cultivos	56
5.1.1 Transfecciones	56
5.2 Depolimerización de microtúbulos	56
5.3 Depolimerización de la red de actina	57
5.4 Inhibición de la dinámica de polimerización y depolimerización de microtúbulos	57
5.5 Fijación de células y marcaciones fluorescentes	57
5.6 Microscopías de fluorescencia.....	58
5.6.1 Microscopía confocal.....	58
5.6.2 Microscopías de superresolución	58
5.7 Cálculo de la relación S/N de imágenes de microscopía	59
5.8 Simulaciones numéricas.....	59
5.8.1 Filamentos en equilibrio térmico.....	59
5.8.2 Movimiento transversal de filamentos.....	60
5.9 Estimación del movimiento lateral de filamentos intermedios	60
5.10 Procesamiento y análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia.....	61
5.10.1 Cálculo del área celular y área ocupada por las redes del citoesqueleto en el plano confocal	61
5.10.2 Determinación de los centros geométricos de las redes del citoesqueleto	62
5.11 Análisis estadísticos	63
5.11.1 Diferencias significativas entre valores de l_p^*	64
5.11.2 Cálculo del error de medianas	64
5.11.3 Cálculo de p valor para diferencias de medianas.....	64
5.11.4 Comparaciones entre múltiples grupos	64
5.11.5 Distribuciones de parámetros	64
Capítulo 6 - Análisis de filamentos intermedios individuales en células a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia.....	66
6.1 Limitaciones de la rutina AFTER para la recuperación de filamentos intermedios.....	66
6.2 Determinación de la longitud de persistencia a partir de ensambles de filamentos	67
6.3 Determinación del error de localización de filamentos	69
6.4 Efecto del error de localización del filamento en el análisis de Fourier.....	70
6.5 Discusión	71
Capítulo 7 - Longitud de persistencia aparente de los filamentos intermedios y sus vínculos mecánicos con el citoesqueleto.....	73

7.1	Determinación de la l_p^* de vimentina en células vivas	73
7.2	Determinación de l_p^* a partir de imágenes de superresolución.....	75
7.3	Influencia de la red de microtúbulos en las propiedades mecánicas de los filamentos intermedios	77
7.4	Influencia de la red de actina en las propiedades mecánicas de filamentos intermedios	83
7.4.1	Longitud de persistencia aparente de vimentina en células tratadas con latrunculina B	86
7.5	Discusión	87
Capítulo 8 - Movilidad de filamentos de vimentina en células vivas		90
8.1	La movilidad de los filamentos de vimentina es modulada por fuerzas generadas en el citoesqueleto.....	90
8.2	Discusión	95
Capítulo 9 - Estudio de las propiedades mecánicas de filamentos intermedios en distintas regiones celulares.....		98
9.1	Longitud de persistencia aparente de filamentos de vimentina en la región perinuclear y la periférica.....	98
9.2	Movilidad lateral intrínseca de los filamentos de vimentina	101
9.3	Movilidad lateral de filamentos de vimentina: influencia de procesos activos intracelulares.....	104
9.4	Simulaciones numéricas de los desplazamientos laterales.....	108
9.5	Discusión	111
Capítulo 10 - Conclusiones generales		112
Bibliografía		115

Capítulo 1 - El citoesqueleto

1.1 El citoesqueleto

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una forma, responder a estímulos mecánicos, ya sea en forma individual o colectiva, requiere del citoesqueleto, un sistema complejo y dinámico integrado por tres tipos de biopolímeros: microtúbulos, microfilamentos de actina y filamentos intermedios. Estos elementos se encuentran interconectados mediante diversas biomoléculas y se hallan en constante remodelación ^{1,2}.

El citoesqueleto también está involucrado en otros procesos muy diversos, incluyendo la endocitosis, la segregación de los cromosomas durante la división celular, el transporte intracelular de vesículas y organelas, la contracción de fibras musculares y la migración celular ³.

La figura 1.1 muestra la distribución observada en muchos tipos de células eucariotas de los filamentos del citoesqueleto en el citoplasma ⁴. En estas células, los microtúbulos presentan un arreglo radial centrado en la región perinuclear y extendiéndose hacia la periferia. Los filamentos de actina se encuentran en mayor densidad próximos a la membrana celular, aunque también se distribuyen en el citoplasma formando, en algunos casos, fibras o manojos. Finalmente, los filamentos intermedios se distribuyen en toda la célula, presentando una densidad mayor en la región perinuclear.

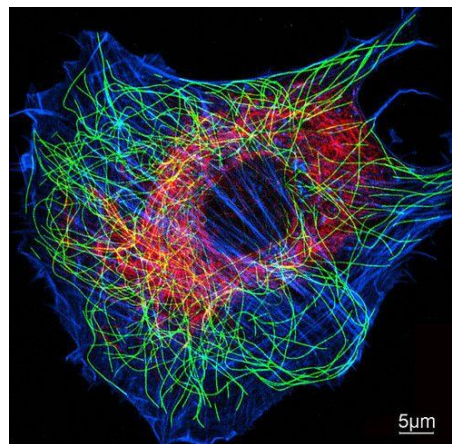


Figura 1.1. Citoesqueleto de una célula eucariota. Imagen de fluorescencia de un fibroblasto en la que cada una de las redes del citoesqueleto fue marcada con sondas fluorescentes específicas (faloidina fluorescente en el caso de **actina** e inmunomarcación para **microtúbulos** y **filamentos intermedios**). Tomado de ⁴.

En las siguientes secciones, describiremos las principales funciones biológicas de cada red de filamentos del citoesqueleto y detallaremos aquellos aspectos relevantes para el desarrollo de este

trabajo. Hacia el final de este capítulo, nos enfocaremos en las propiedades de los filamentos de vimentina, objeto de estudio de esta tesis, y profundizaremos en sus roles fisiológicos más críticos.

1.2 Microtúbulos

Estos filamentos están conformados por dos proteínas denominadas α y β tubulina que se unen formando heterodímeros (fig. 1.2). La polimerización del filamento se produce por unión de heterodímeros en configuración cabeza-cola y requiere energía proveniente de la hidrólisis de ATP. De esta forma, se generan protofilamentos polares (en el sentido de asimetrías estructurales de los extremos, no de carga eléctrica); la unión lateral de protofilamentos (comúnmente 13) da origen a los microtúbulos (fig. 1.2), cuya estructura se asemeja a un cilindro hueco, con diámetros interno y externo de aproximadamente 18 y 25 nm, respectivamente ⁵⁻⁷.

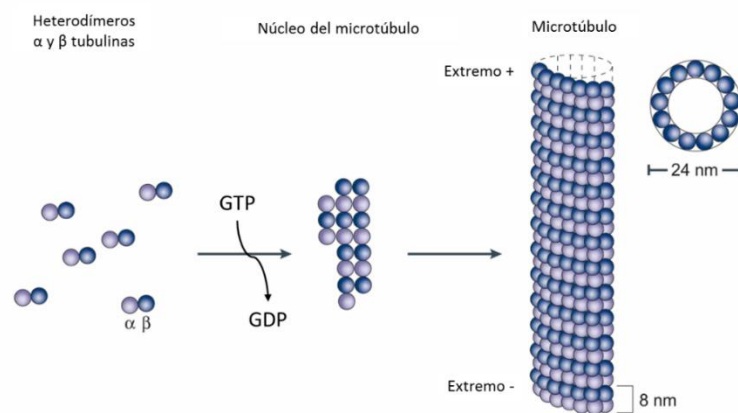


Figura 1.2. Formación de microtúbulos. Los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulinas se unen para formar pequeños fragmentos del microtúbulo. La elongación del microtúbulo por ambos extremos termina formando el cilindro característico compuesto por 13 protofilamentos. Modificado de ⁸.

Tanto la tubulina α como la β tienen sitios de unión a GTP localizados en regiones de la interfaz entre subunidades del dímero. En las α -tubulinas, este sitio juega un rol estructural y la molécula de GTP unida no es intercambiable fácilmente. En el caso de las β -tubulinas, el sitio de unión a GTP permanece expuesto en el dímero terminal sin ensamblar. Durante la adición de nuevos dímeros al microtúbulo, esta molécula de GTP es hidrolizada a GDP cuando se establece la interacción con la α -tubulina siguiente ⁹. La forma en la que los heterodímeros de tubulina se ensamblan les confiere polaridad estructural a los microtúbulos. Esto permite distinguir el extremo positivo (+), con una β -tubulina como subunidad terminal y orientado hacia la membrana plasmática, del extremo negativo (-), con una α -tubulina terminal y orientado hacia la región perinuclear de la célula ¹⁰. La presencia de GTP en el dímero terminal estabiliza el extremo + del microtúbulo y promueve su crecimiento, mientras que su pérdida (por hidrólisis a GDP o eliminación de la subunidad) desestabiliza la estructura del microtúbulo, favoreciendo su despolimerización ⁹.

En las células, los microtúbulos también presentan una organización particular, asociada en parte a las distintas propiedades de sus extremos. En la región perinuclear, las células eucariotas tienen un centro organizador de microtúbulos (*MTOC*) integrado principalmente por γ -tubulina ³. Para las células animales suele ser el centrosoma, una estructura que reúne a cientos de proteínas diferentes ^{11,12}, incluyendo reguladores del ciclo celular y moléculas de señalización ¹³ y que nuclea microtúbulos desde sus extremos negativos ¹⁴. En el extremo + de los microtúbulos, diversas proteínas (+TIPs, por *Plus-end Tracking Proteins*) se asocian dinámicamente y regulan su estabilidad ¹⁰. Finalmente, un conjunto de proteínas específicas (*MAPs* por *Microtubule Associated Proteins*) se unen lateralmente a los microtúbulos, estabilizando su estructura, modificando sus propiedades mecánicas locales y mediando interacciones con otras proteínas ¹⁵⁻¹⁷.

Los microtúbulos no son estructuras estáticas, sino que presentan una rápida alternancia entre fase de elongación y fase de retracción, llamada *inestabilidad dinámica* ¹⁸. Tal como se muestra en la figura 1.3, esta dinámica se encuentra íntimamente asociada al estado del nucleótido GTP / GDP unido a las tubulinas terminales. La transición de crecimiento a decrecimiento se denomina *catástrofe* y está caracterizada por la pérdida muy rápida de dímeros unidos a GDP ⁵. El proceso inverso se conoce como *rescate*, en el que GTP-tubulina puede empezar a agregar dímeros al extremo del microtúbulo nuevamente ¹⁸.

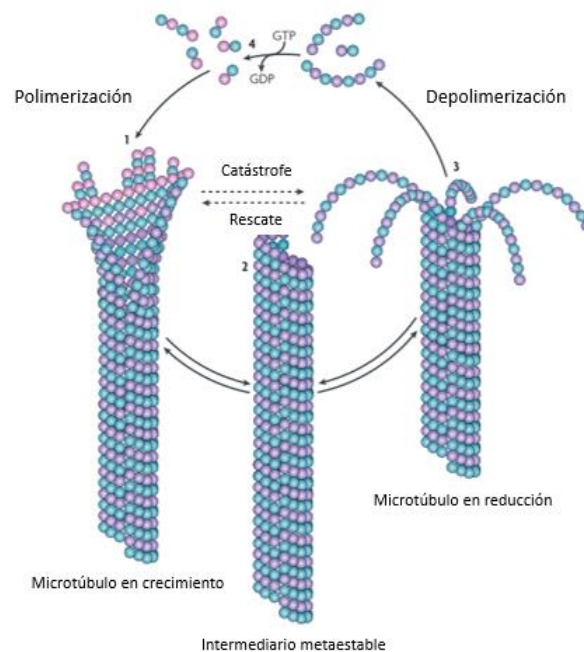


Figura 1.3. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La polimerización y depolimerización de los microtúbulos se produce como consecuencia de la unión, hidrólisis e intercambio de una molécula de GTP en la β -tubulina terminal del microtúbulo. Modificado de ¹⁹.

La inestabilidad dinámica resulta esencial para diversas funciones de los microtúbulos, ya que permite adoptar arreglos espaciales que pueden cambiar rápidamente en respuesta a las

necesidades de la célula e incluso realizar trabajo mecánico, generando fuerzas de empuje o arrastre mediante polimerización y despolimerización, respectivamente ⁵, tal como ocurre durante la mitosis, en la captura, alineación y separación de cromosomas ^{20,21}.

Por otra parte, las fuerzas mecánicas también cumplen un rol relevante en la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. En particular, se ha observado que si un microtúbulo en fase de crecimiento encuentra un obstáculo estático, la fuerza que se opone al crecimiento desencadena su rápida depolimerización ²². Este proceso cumpliría un rol fundamental en la regulación de los tamaños y curvaturas de los microtúbulos en células. Tal como mencionamos anteriormente, los microtúbulos juegan roles claves en diferentes procesos celulares en los que también son sometidos a grandes tensiones, por ejemplo, durante la mitosis, y la migración celular.

Finalmente, los microtúbulos constituyen vías a lo largo de las cuales se transportan, distribuyen y anclan diferentes tipos de cargas ²³, incluyendo vesículas ²⁴, organelas ²³ y proteínas ²⁵. Este movimiento de cargas está mediado por motores moleculares pertenecientes a las familias de las dineínas y kinesinas, los cuales se desplazan hacia los extremos negativo y positivo de los microtúbulos, respectivamente ²⁶.

1.3 Filamentos de actina

Los filamentos de actina (actina-F) se forman por el ensamblado de actina monomérica (denominada actina-G, G por globular). Tal como ocurre con los microtúbulos, la polaridad de los filamentos de actina se debe a la naturaleza asimétrica de sus subunidades y su ordenamiento regular, definiendo dos extremos con propiedades cinéticas diferentes ³.

La figura 1.4 resume los pasos de formación del filamento de actina. Brevemente, pueden distinguirse dos etapas ²⁷. La primera es un proceso lento, en la que se forma un *núcleo* que consiste en tres monómeros de G-actina-ATP asociado a proteínas nucleadoras (Arp2/3, formina) ²⁸. Posteriormente, se adicionan rápidamente monómeros actina-G-ATP al extremo + (llamado *barbed end*) y, más lentamente, al extremo - (*pointed end*) ²⁷. Por otro lado, la depolimerización de los filamentos de actina ocurre con mayor probabilidad en el extremo -, donde la hidrólisis del ATP genera cambios conformacionales que disminuyen la energía de interacción entre las subunidades ²⁸, provocando la pérdida de monómeros.

En las células, los filamentos de actina consisten en una doble hélice formada por dos hebras ²⁷ en las que las subunidades pueden contactarse tanto de forma lateral como en configuración cabeza-cola ²⁸. Estos filamentos poseen un diámetro de 6 nm ²⁹.

En el citoplasma, la cinética de polimerización/depilimerización de los filamentos de actina depende de la concentración de los monómeros de actina y de la interacción de éstos con proteínas ABP (*Actin Binding Proteins*) ³⁰. Estas proteínas cumplen diversas funciones, incluyendo la de mediar

la interacción entre filamentos, anclar los filamentos a la membrana celular, evitar su polimerización uniéndose al extremo +, favorecer la depolimerización y fragmentación^{31,32}.

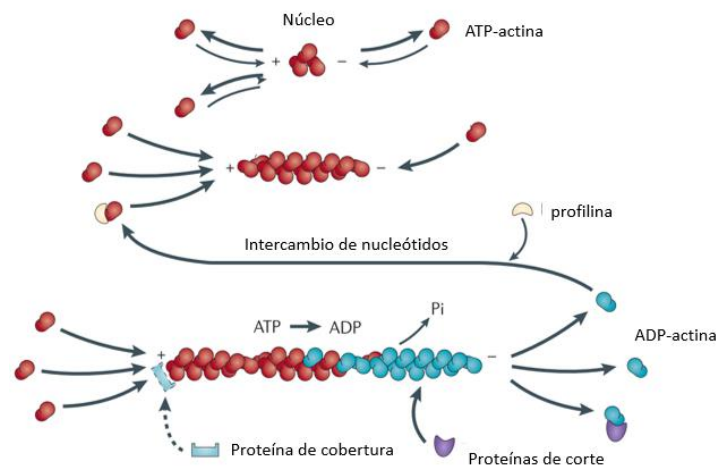


Figura 1.4. Esquema de formación de filamentos de actina. La lenta formación de un núcleo de unos pocos monómeros precede la rápida extensión del filamento, incorporando ATP-actina (rojo) preferentemente por el extremo +. La actividad ATPasa de la actina favorece la incorporación de monómeros al filamento. La hidrólisis de ATP genera monómeros ADP-actina (celeste) que desestabilizan al filamento y lo vuelve más susceptible a la acción de diferentes proteínas reguladoras (violeta). Los monómeros liberados pueden intercambiar el ADP por ATP gracias a la acción de la profilina (amarillo). Los monómeros liberados pueden intercambiar el ADP por ATP gracias a la acción de la profilina (amarillo). Las proteínas de cobertura se asocian al extremo + e inhiben el crecimiento del filamento. Adaptado de²⁷.

Una de las principales funciones fisiológicas de los filamentos de actina es producir fuerzas, ya sean de empuje, mediante la polimerización coordinada de filamentos contra la membrana celular con la consecuente formación de protrusiones, o contráctiles, formando estructuras en asociación con el motor miosina II³³, tal como describiremos más adelante. De esta manera, los filamentos de actina cumplen roles claves en diferentes procesos celulares, tales como contractibilidad de células musculares³⁴, resistencia al estrés mecánico³⁵, migración y adhesión celular^{36,37} y transducción de señales³¹.

La organización del citoesqueleto de actina es también modulada por la rigidez de la superficie sobre la que se adhieren las células³⁸. En sustratos blandos, las células presentan una morfología circular, con los filamentos de actina dispuestos radialmente alrededor del núcleo. En sustratos rígidos, las células presentan morfologías más elongadas, abarcan un área mayor y se muestran polarizadas (se distinguen extremos distintos). En esta última condición, se forman ciertas estructuras denominadas fibras de estrés (fig. 1.5), constituidas por manojos de entre 10-30 filamentos de actina, unidos mediante proteínas de entrecruzamiento y motores moleculares^{33,39}. Estas fibras se alinean en el sentido de la polarización celular³⁸.

La fig. 1.5 muestra una imagen de una célula en la cual se pueden apreciar los distintos tipos de fibras de estrés: dorsales, ventrales y arcos transversales. Estas estructuras de actina varían en su distribución celular, su morfología y/o en la asociación con adhesiones focales, las cuales están involucradas en la comunicación entre la célula y la matriz extracelular en contacto ³³.

Las fibras dorsales están asociadas a adhesiones focales en uno de sus extremos y no son contráctiles; se propone que serían de utilidad como plataforma para el ensamblaje de otros tipos de fibras de estrés ³³. Las fibras ventrales están ancladas por ambos extremos a adhesiones focales, suelen tener longitudes del orden de varios micrómetros, se extienden a lo largo de la célula ⁴⁰ y conforman la mayor maquinaria contráctil en la mayoría de las células ³³. Por último, se observan arcos transversales en células que migran o en ciertos tipos celulares cuando están en expansión sobre un sustrato. Estas fibras con forma convexa se forman detrás del borde de avance y alcanzan la zona perinuclear ⁴⁰. Al ser contráctiles y no estar asociadas a adhesiones focales, transmiten fuerzas a su entorno a través de conexiones con otros tipos de fibras ³³.

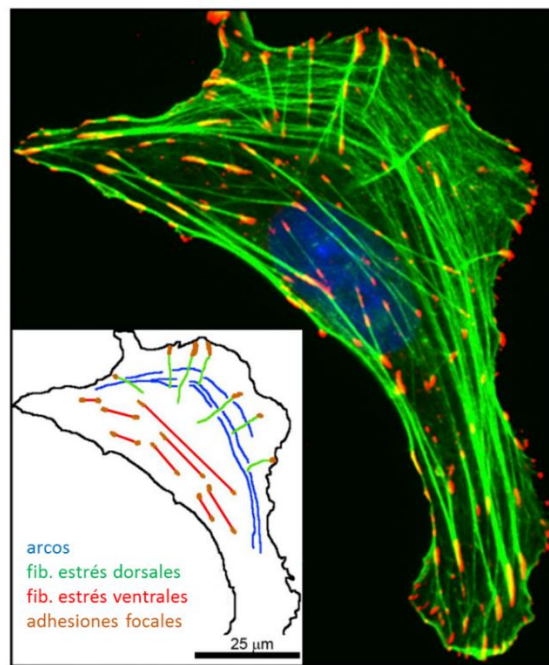


Figura 1.5. Tipos de fibras de estrés de actina. Imagen de inmunofluorescencia de una célula U2OS que exhibe los tres principales tipos de fibras de estrés. Los filamentos de actina fueron marcados con faloidina unida a una sonda fluorescente (verde), las adhesiones focales con anticuerpos específicos antifosfotirosina (rojo) y el núcleo con DAPI (azul). El esquema de la esquina inferior izquierda muestra cada uno de los tipos de fibras y su localización dentro de la célula. Adaptado de ⁴⁰

Por último y de forma similar al caso de los microtúbulos, los filamentos de actina también sirven como vías por las que se desplazan motores moleculares, en este caso, de la familia de las miosinas, los cuales pueden transportar cargas como vesículas y organelas ²⁶.

1.4 Filamentos intermedios

A diferencia de los filamentos de actina o los microtúbulos, que están formados por un tipo reducido de proteínas monoméricas, existen distintos tipos de filamentos intermedios generados por la polimerización de proteínas diferentes. En forma resumida, los filamentos intermedios (IFs) conforman una familia de proteínas relacionadas codificadas por más de 70 genes ⁴¹.

Estas proteínas poseen características comunes en cuanto a su estructura secundaria (fig. 1.6): un dominio tipo “vara” de hélice α , flanqueado por una cabeza y una cola sin estructuras definidas (extremos N y C terminal, respectivamente). El dominio vara, a su vez, contiene tres dominios de hélices superenrolladas, separados por dominios intrínsecamente desordenados ²⁵.

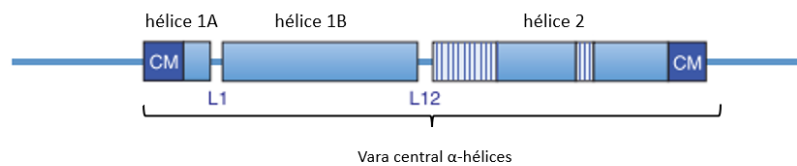


Figura 1.6. Modelo estructural de una proteína de la familia de filamentos intermedios citoplasmáticos. Los tres segmentos helicoidales característicos de los IFs se representan como cajas azules. Estos tres dominios conforman la vara central, flanqueada por los extremos N y C terminales sin estructura definida. L1 y L12 son los dominios intrínsecamente desordenados que conectan las hélices. Los segmentos rayados en la hélice 2 representan regiones que median la formación de hélices superenrolladas. Los segmentos CM son secuencias que definen los extremos del dominio consenso de los IFs. Adaptado de ²⁵.

Los IFs se agrupan en cinco categorías, de acuerdo con la secuencia aminoacídica y las estructuras de las diferentes proteínas (tabla 1.1). Cuatro de estos grupos abarcan filamentos citoplasmáticos, mientras que el restante corresponde a filamentos intermedios nucleares denominados laminas ⁴².

Subtipo	Proteína	Tejido principal
Tipo I	Keratina ácida	Epitelios, cabello, uñas
Tipo II	Keratina básica	Epitelios, cabellos, uñas
Tipo III	Vimentina	Mesenquimal
	Desmina	Cardíaco, esquelético y músculo liso
	GFAP*	Glía, astrocitos
Tipo IV	Neurofilamentos	Sistema nervioso central y neuronas
Tipo V	Laminas	Ubicuo (núcleos)

Tabla 1.1. Clasificación de filamentos intermedios. *Por las siglas en inglés de *proteína ácida fibrilar glial*. Adaptado de ⁴².

A diferencia de los microtúbulos o los filamentos de actina, los IFs no requieren de energía para su polimerización y se ensamblan de manera jerárquica ⁴³, tal como se esquematiza en la figura 1.7. Brevemente, dos subunidades proteicas forman una hélice superenrollada que puede ser homo o

heterodimérica, dependiendo del tipo de filamento. Ésta se ensambla con otro dímero, de manera antiparalela, dando forma a un *tetrámero*⁴³. Como consecuencia de este tipo de ensamblaje, los tetrámeros no son polares. Luego, estos tetrámeros se asocian lateralmente formando *unidades de longitud del filamento* (ULFs, por *unit-length filament*) de aproximadamente 50 nm de longitud⁴⁴. Las ULFs son las unidades estructurales de los IFs y se asocian linealmente para formar filamentos micrométricos, los cuales conservan la no-polaridad propia de los tetrámeros⁴¹⁻⁴³. La formación de ciertos IFs, como desmina y vimentina, incluye un paso adicional en el que el filamento ya formado se compacta y obtiene un diámetro final de ~10nm⁴⁵.

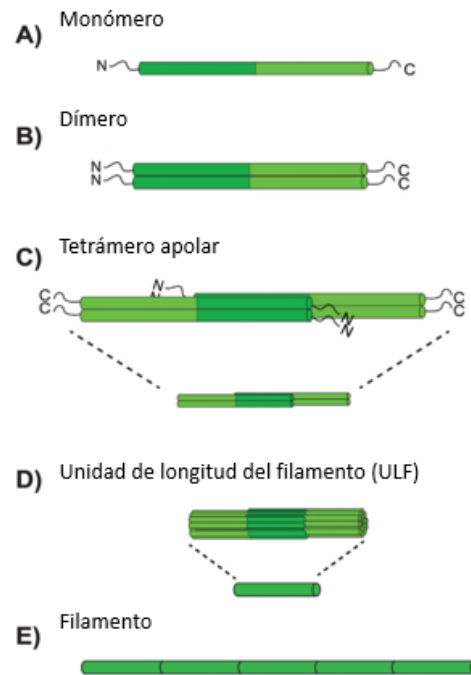


Figura 1.7. Ensamblaje de filamentos intermedios. A) Los monómeros poseen dominios conservados que se representan en los tonos verdes. B) Los dímeros de IFs se forman por la alineación paralela de los dominios tipo vara. C) La asociación lateral y antiparalela de dos dímeros da lugar a un tetrámero no polar. D) Ocho tetrámeros se unen lateralmente para formar una unidad ULF. E) La asociación longitudinal de ULFs da lugar al filamento intermedio maduro. Adaptado de⁴².

La arquitectura específica de los IFs, en particular el gran número de subunidades por sección transversal y el hecho de que no se requiere energía para su polimerización, da lugar a vías de ensamblaje alternativas⁴³, las cuales se esquematizan en la figura 1.8. Una de ellas es la llamada *corte y empalme* (*annealing*), en la que diferentes filamentos se combinan longitudinalmente para formar un filamento nuevo de mayor extensión⁴⁶. Otra vía alternativa es aquella en la que se intercambian subunidades individuales (tetrámeros), tanto en filamentos maduros como en ULFs. Es posible que los intercambios sean entre subunidades del mismo tipo como de otra proteína de la familia, formando mosaicos⁴⁷⁻⁴⁹.

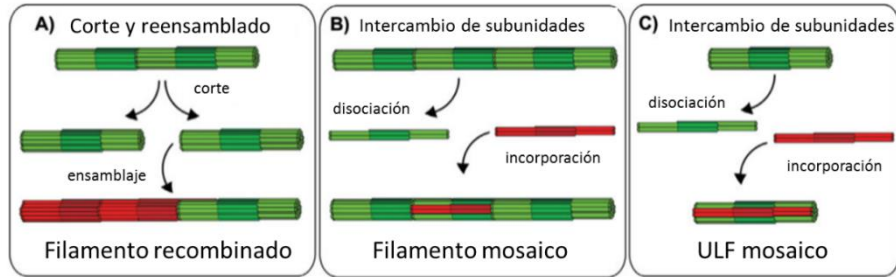


Figura 1.8. Mecanismos de intercambio de subunidades de filamentos intermedios. A) Los IFs pueden fragmentarse en segmentos más cortos que luego pueden fusionarse longitudinalmente con otro filamento. B) y C) Intercambio de subunidades en filamentos maduros o ULFs. Tomado de ⁴².

Los IFs nucleares y citoplasmáticos tienen características mecánicas únicas que no sólo los distinguen de los filamentos de actina y microtúbulos, sino que los convierten en elementos clave para brindar resistencia mecánica a las células ⁵⁰, como veremos en detalle en el capítulo siguiente.

Los filamentos intermedios nucleares son la base estructural de la lamina nuclear, una red que tapiza la membrana nuclear interna y aporta rigidez estructural y resistencia al núcleo ⁵¹. En la figura 1.9 se representa la localización de la lamina nuclear y los diferentes roles que cumple en la fisiología nuclear.

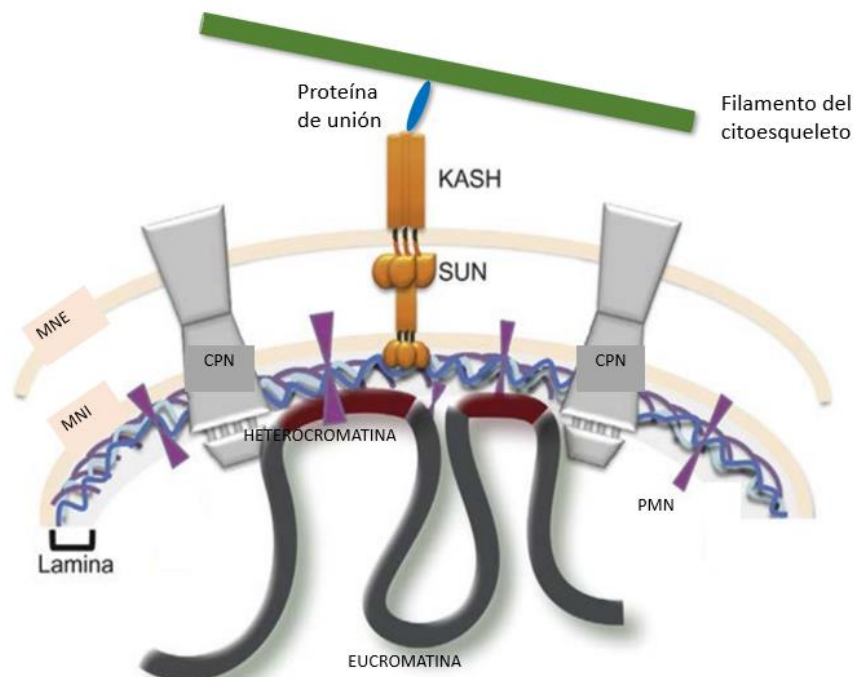



Figura 1.9. Estructura interna de la membrana y lamina nuclear. La membrana nuclear se compone de una membrana nuclear externa (MNE) y una membrana nuclear interna (MNI) que son contiguas. Circundante a la MNI, se encuentra la lamina nuclear, una malla densa conformada por redes de laminas interconectadas. A su vez, las laminas interactúan con

proteínas de la membrana nuclear (representadas por los símbolos ) , entre las que se destacan SUN y el complejo del poro nuclear (CPN) y sirve de anclaje de regiones de la heterocromatina (segmentos periféricos de la cromatina, típicamente con baja expresión - destacado en rojo). Adaptado de ⁵².

La lamina nuclear interactúa directamente con proteínas integrales de la membrana nuclear, anclándolas en su sitio ⁵². Entre ellas se destaca la proteína SUN ⁵³, que junto con KASH forma parte del complejo LINC (*Linker of the Nucleoskeleton and the Cytoskeleton*). Este complejo (fig. 1.9) une mecánicamente el citoesqueleto con el núcleo y establece una conexión entre los polímeros del citoesqueleto y la cromatina que permite la transmisión de fuerzas ⁵⁴.

Tal como se esquematiza en la figura 1.9, la lamina nuclear interactúa con la cromatina y participa de su organización espacial, lo que permite mantener regiones cromatínicas en posiciones determinadas dentro del núcleo ^{55,56}.

Distintos trabajos proponen que las laminas tienen un rol relevante en la regulación de la expresión génica ⁵⁶. Brevemente, los genes que se encuentran en regiones de la cromatina asociadas con las laminas A/C son típicamente inactivos transcripcionalmente ⁵⁶. Adicionalmente, las laminas forman estructuras que interactúan y regulan la actividad de moléculas de señalización y factores de transcripción, pudiendo modular su función actuando como “trampas nucleares periféricas” o servir como plataformas para concentrar moléculas relevantes para la expresión génica, aumentando la velocidad de los procesos biológicos asociados⁵¹ (e.g., la lamina A/C recluta proteínas modificadoras de histonas que, según el caso particular, promueven o reprimen la expresión génica ⁵⁶).

La familia de las laminas nucleares incluye laminas de tipo A/C y B, las cuales forman redes con propiedades físicas particulares y, como consecuencia, distintas funciones asociadas ⁵².

Las laminas del tipo A/C aportan rigidez y viscosidad al núcleo y colaboran en el mantenimiento de la morfología nuclear ^{56,57}. Esta función sería muy relevante en el proceso de mecanotransducción: las laminas estarían involucradas en la detección y señalización de fuerzas mecánicas, en las que también interviene el complejo LINC. Esta conexión le permitiría a las células sensor cambios en la rigidez de la matriz extracelular y alterar la rigidez del núcleo mediante cambios en la proporción de laminas A/C ⁵⁶.

Las laminas tipo B, en cambio, confieren elasticidad y capacidad de deformación al núcleo ⁵¹. Además, tienen un rol crítico como ancla molecular en la interfase núcleo-citoplasma, facilitando el acoplamiento físico entre la membrana nuclear externa y el citoesqueleto que rodea al núcleo, lo que previene la rotación del núcleo a partir de fuerzas generadas por el citoesqueleto en dicha interfase ⁵⁸.

Los filamentos intermedios citoplasmáticos se distribuyen por todo el citoplasma formando redes ⁵⁹ cuya función, entre otras, es aportar a la viscoelasticidad celular (en forma similar a ciertas laminas nucleares que, como hemos mencionado, contribuyen a la viscoelasticidad nuclear) dado que son capaces de resistir grandes deformaciones, como veremos más adelante. Por este motivo, la red de

IFs citoplasmática es fundamental para preservar la integridad de las células en situaciones de estrés mecánico ⁶⁰⁻⁶². Además, por su estructura estable y su distribución celular, se postula que las principales funciones de los IFs se asocian a reforzar estructuralmente a las células y organizarlas en tejidos ⁵⁹.

El estudio de las propiedades mecánicas de IFs en condiciones in vitro llevó a la idea inicial de que dichos filamentos formaban redes estáticas que únicamente brindaban soporte mecánico a las células ^{50,59}. Sin embargo, distintos estudios en células vivas (revisados en ⁵⁰) demostraron que la red de IFs citoplasmáticos pueden remodelarse notoriamente y que los filamentos que las conforman cambian constantemente su forma, acortándose, extendiéndose y translocándose en intervalos de tiempo relativamente cortos. En estos trabajos se reportaron nuevas funciones de los IFs citoplasmáticos que los convierten en elementos que contribuyen activamente a procesos biológicos muy variados. Por ejemplo, se demostró que los IFs citoplasmáticos son fundamentales para la migración celular ⁶³, tal como detallaremos más adelante en la sección 1.5.3. Además, los IFs citoplasmáticos contribuyen a la organización intracelular, ya que forman estructuras tipo jaulas rodeando vesículas y organelas (por ej. mitocondrias), manteniéndolas próximas a los microtúbulos o filamentos de actina y favoreciendo su transporte mediante motores moleculares ^{62,64-66}. Finalmente, se observó que los IFs citoplasmáticos cumplen un rol relevante en el proceso de diferenciación celular determinando el destino celular de células madre in vitro ^{50,67} o en el embrión preimplantatorio ⁶⁸.

1.5 Vimentina

Vimentina es un filamento intermedio citoplasmático que se expresa principalmente en células mesenquimales, incluyendo las células endoteliales que revisten vasos sanguíneos, células tubulares renales, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y leucocitos ⁶⁹. Por ello, este filamento intermedio es frecuentemente utilizado por investigadores como marcador del desarrollo de células y tejidos mesenquimales ⁷⁰.

Su nombre deriva del latín *vimentum*, que hace referencia al mimbre y las tramas que éste puede generar ⁷¹ y busca ilustrar de esta forma la red intrincada que forma en el citoplasma celular. En la figura 1.10, se muestra la distribución de la red de vimentina en el citoplasma celular que, tal como describimos previamente en forma generalizada, se distribuye en el citoplasma celular y forma en la región perinuclear una estructura con alta densidad de filamentos denominada *jaula nuclear* ⁷². Tal como mencionamos anteriormente, se plantea que la red de vimentina sería clave en el mantenimiento de la morfología celular, la integridad del citoesqueleto, la estabilización de las interacciones del citoesqueleto y las adhesiones de la célula al sustrato ⁷³.

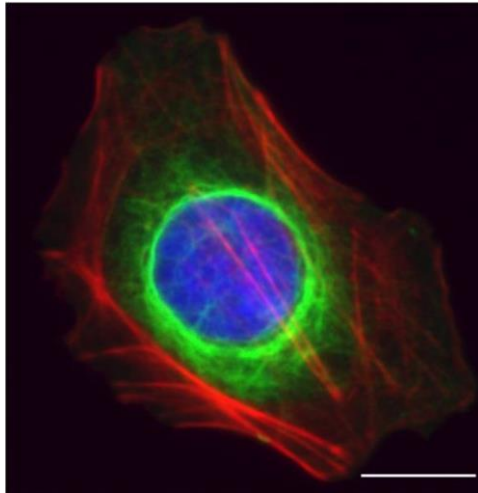


Fig. 1.10. Red de filamentos intermedios y el núcleo celular. Imagen de una célula HUH7 con marcación para vimentina (verde), actina (rojo) y ADN (azul). La localización de los IFs de vimentina rodeando al núcleo es indicativa de una estructura distintiva tipo jaula. Barra de escala = 15 μm . Adaptado de ⁷².

Recientemente, Patteson y colaboradores ⁷² han propuesto un modelo que plantea diferencias funcionales entre la jaula nuclear de vimentina y el *pool* de filamentos citoplasmáticos.

De acuerdo con este modelo, los filamentos de vimentina citoplasmáticos y los perinucleares tendrían diferentes roles en cuanto al mantenimiento de la morfología celular y nuclear. La principal función mecánica de los filamentos citoplasmáticos sería incrementar la rigidez del citoesqueleto y asistir a la transmisión de fuerzas hacia el núcleo, donde la jaula nuclear opone resistencia preservando la integridad de esta organela ⁷².

1.5.1 La jaula nuclear de vimentina

Esta estructura confiere rigidez al núcleo ⁷² y lo protege mecánicamente de deformaciones y de daño al ADN, esto es especialmente relevante para células que migran a través de espacios reducidos, situación en la cual los núcleos se ven sometidos a mayores presiones ⁷⁴. Se ha observado en diferentes tipos celulares que la jaula nuclear también se adapta a la rigidez de los soportes sobre los que se adhieren las células. Cuando éstas crecen sobre sustratos blandos, los filamentos de vimentina se concentran mayormente en la región más próxima al núcleo. De manera opuesta, cuando los sustratos son más rígidos, la superficie de adhesión celular aumenta y la red de vimentina se extiende hacia la periferia ⁷⁵.

Los filamentos de vimentina perinucleares establecen conexiones directas con el complejo LINC que une al núcleo mecánicamente con el resto del citoesqueleto ⁷⁶, tal como se mencionó anteriormente. Esta comunicación es fundamental para la correcta ubicación del núcleo en el citoplasma ⁷⁷.

Maniotis et al ⁷⁸ demostraron que las fuerzas externas que actúan sobre las células inducen alteraciones en el citoesqueleto y, consecuentemente, en la morfología del núcleo. Los filamentos intermedios citoplasmáticos participan en dicha transmisión de fuerzas gracias a su estrecha asociación con el núcleo. En este sentido, la disrupción de la red de vimentina resulta en cambios en la forma del núcleo ^{79,80} producto de la ausencia de una jaula nuclear ⁷⁴.

Recientemente, se han descrito otros roles particulares de la vimentina en asociación con el núcleo celular los cuales aún no son totalmente comprendidos.

Terriac y colaboradores ⁸¹ mostraron que, durante la adhesión de células al sustrato y los procesos de proliferación celular, los filamentos de vimentina se organizan en estructuras tipo esferas, denominadas *knots*, y anillos alrededor del núcleo (fig. 1.11). Estos anillos pueden deslizarse a lo largo del núcleo y deformarlo; aunque se desconoce el origen de las fuerzas involucradas en la dinámica de estos anillos. Los autores especulan que los microtúbulos podrían estar involucrados en dichos movimientos si bien han demostrado que éstos no son necesarios en la formación de estas estructuras.

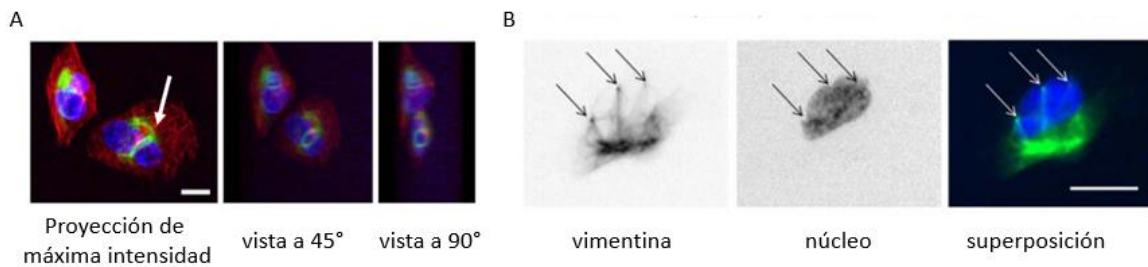


Figura 1.11. Anillos y nudos de vimentina sobre el núcleo. A) Proyección de imágenes confocales de una célula RPE1. Se destaca un anillo de vimentina (flecha blanca) alrededor del núcleo desde diferentes ángulos (vimentina en verde; núcleo en azul y actina en rojo). B) Célula RPE1 observadas 4 hs después de la mitosis. Se muestran la red de vimentina y el núcleo. Las flechas negras señalan los nudos de vimentina. Barras de escala = 10 μ m. Modificado de ⁸¹.

Por otro lado, Feliksiak et al. ⁸² describieron que en células sanas y que migran, los filamentos de vimentina están asociados a surcos nucleares (fig. 1.12), característicos de diferentes células tumorales. Se especula con que los surcos puedan ser generados por microtúbulos y que los filamentos de vimentina evitarían deformaciones mayores.

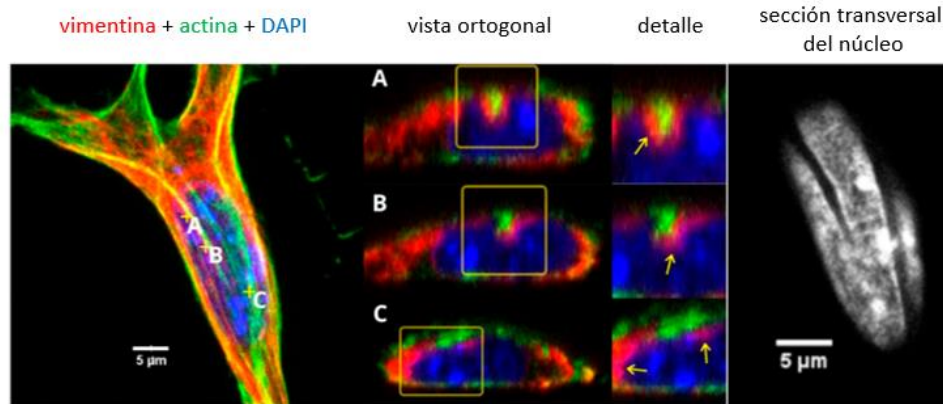


Figura 1.12. Interacción del citoesqueleto con surcos nucleares. Células MEF 3T3 con diferentes marcaciones de citoesqueleto y núcleo (DAPI). Los símbolos “+” (en la esquina superior a las letras superpuestas a la imagen) indican las regiones de las que se muestran imágenes ortogonales, mientras que los detalles corresponden a las regiones encuadradas. Las flechas amarillas indican regiones de interés por la presencia de filamentos de vimentina en el surco. Tomado de ⁸².

1.5.2 La red de filamentos de vimentina periférica: comunicación con el citoesqueleto y definición de la morfología celular

En el citoplasma, los filamentos de vimentina se asocian con microtúbulos y filamentos de actina generando conexiones físicas activas que contribuyen a la integridad del citoesqueleto. Como veremos más adelante, la red de vimentina estabiliza a los microtúbulos, previniendo su depolimerización y asistiendo en su rescate, lo que permite que la red de microtúbulos tenga la rigidez y orientación necesaria para soportar grandes tensiones en las células (discutido en ⁸³). Además, durante mitosis, la vimentina es clave en la regulación del grosor y la integridad mecánica de la membrana celular al formar una trama subcortical que resiste la contractilidad y la expansión de la membrana ⁸⁴.

Así como la red de vimentina contribuye a la organización de microtúbulos y actina, estos últimos también intervienen en el ensamblado de la red de vimentina. Los precursores ULFs son transportados a través de los microtúbulos por motores moleculares (kinesinas y dineínas) hacia aquellos filamentos de vimentina a los que se unen ^{42,85}. A su vez, los ULFs también pueden unirse fuertemente con los filamentos de actina, lo que restringe su transporte vía microtúbulos e impediría su incorporación a filamentos más largos ⁸⁶.

La red de vimentina también influye en la morfología y la viscoelasticidad celular. En particular, la depolimerización de la red de vimentina en ciertas líneas celulares resulta en una forma redondeada de las células ⁷³. Las células epiteliales que expresan vimentina son más planas que aquellas que además expresan queratina, lo que las vuelve menos sensibles a deformaciones ⁶¹. A su vez, la pérdida de vimentina vuelve a la rigidez y plasticidad celular más variable, indicando que la vimentina es importante en la regulación de la morfología y las propiedades viscoelásticas de las células ⁶⁰.

1.5.3 Vimentina y migración

Los filamentos de vimentina son uno de los filamentos intermedios más estudiados debido a su rol en el proceso de migración celular ^{59,87}. Su expresión se incrementa durante la transición epitelio-mesenchimal, proceso en el que se definen cambios en la forma celular, movilidad y adhesión ⁶¹ requeridos en procesos fisiológicos tales desarrollo embrionario y progresión tumoral con metástasis.

En esta sección, ilustraremos la relevancia de la red de vimentina describiendo sus roles en la migración de células individuales. En este proceso, las células se desplazan individualmente sobre el sustrato (en dos o tres dimensiones), a diferencia de la migración colectiva, donde un grupo de células se desplaza de forma coordinada ⁸⁸. En todos los casos, las fuerzas que impulsan los movimientos de las células son generadas en el citoesqueleto ⁸⁹.

La migración celular requiere del citoesqueleto y de estructuras denominadas adhesiones focales, que conectan físicamente la célula con el sustrato ⁹⁰ y permiten que las tensiones generadas en el citoesqueleto sean transmitidas a la matriz extracelular como fuerzas de tracción ^{91,92}. En la figura 1.13, se esquematizan los roles de los distintos componentes del citoesqueleto durante la migración de una célula mesenchimal.

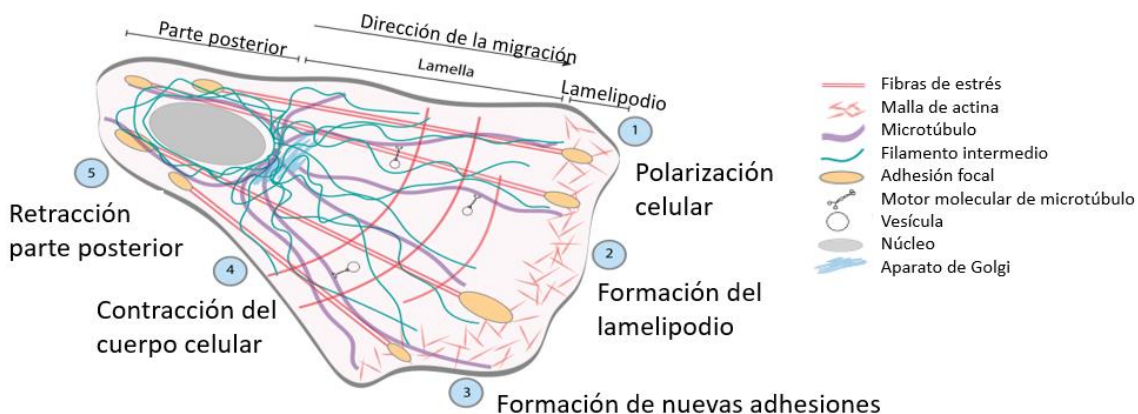


Figura 1.13. Distribución de las redes del citoesqueleto en migración celular. Esquema representando las etapas de la migración celular: 1) establecimiento de la polaridad celular diferenciando una parte posterior de una delantera; 2) extensión del extremo delantero; 3) formación de nuevas adhesiones; 4) contracción del cuerpo de la célula y 5) retracción de la parte posterior de la célula. Adaptado de ⁹³.

Los filamentos de vimentina se conectan a las adhesiones focales ⁹⁴ mediante proteínas de la familia de las plaquinas: BPAG1, desmoplaquinas y plectina ^{91,94,95} e integrinas ⁹⁶. Estas interacciones, a su vez, modularían la distribución y el tamaño de las adhesiones focales ^{61,96}.

La red de vimentina tiene roles integradores y activos en la regulación de la polaridad y la motilidad celular. En células que migran, las fibras de vimentina se orientan en el sentido de avance de la

célula (describiremos estas estructuras más adelante), contribuyendo a reorientar las fuerzas de tracción generadas por el citoesqueleto de actina⁹⁷. Esta disposición contribuye a la polarización de los microtúbulos, esenciales para el control y establecimiento de la polaridad celular⁹⁸ definida también por la red de actina-miosina que impulsan el avance de estas células⁹⁹. En ese contexto, Vakhrusheva y colaboradores¹⁰⁰ observaron que la habilidad de migrar direccionalmente se pierde en células en las que se inhibe la expresión de vimentina. Por ello, plantean que la vimentina, sea como filamento maduro o ULF, sería responsable en el mantenimiento de la polaridad celular y la direccionalidad de migración.

Además, la vimentina interviene en la formación del lamelipodio, una estructura plana, formada por filamentos de actina que crean una malla en el frente celular y que ejerce presión sobre la membrana plasmática (revisado en¹⁰¹). Helfand y colaboradores¹⁰² demostraron una relación antagónica entre los filamentos de vimentina y la formación de lamelipodios, en la que la depolimerización y el retiro de estos filamentos facilita la formación del lamelipodio (fig. 1.14). Además, estos autores muestran que la interrupción de la red de vimentina produce una pérdida de polaridad celular, evidenciada por la formación de un lamelipodio que rodea completamente a la célula, y reducción de la movilidad celular.

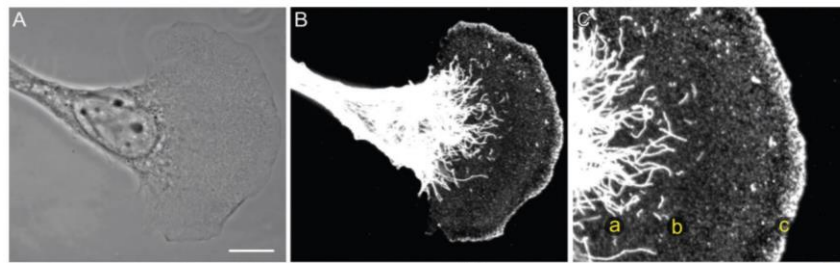


Figura 1.14. Red de vimentina en una célula motil polarizada. A) Imágenes confocales de una célula MEF 3T3 polarizada mostrando el lamelipodio característico en la región de avance y una cola angosta en la región trasera. B) Los filamentos de vimentina más largos se ubican principalmente en la cola, sin alcanzar la periferia celular. C) Lamelipodio enriquecido en pequeñas partículas de vimentina (*squiggles*, *c*), originadas por la depolimerización de filamentos de vimentina en las regiones distales de membrana (*a*,*b*). Barra de escala = 10 μ m. Adaptado de¹⁰².

En un trabajo reciente, Costigliola et al.⁹⁷ exploraron la estructura de la red de vimentina en células que migran. En particular, identificaron dos tipos de estructuras características (fig.1.15): la malla habitualmente observada de filamentos, y fibras formadas por manojos de filamentos que, como mencionamos anteriormente, se alinean con las protrusiones de la célula orientando las fuerzas de tracción en la dirección del movimiento.

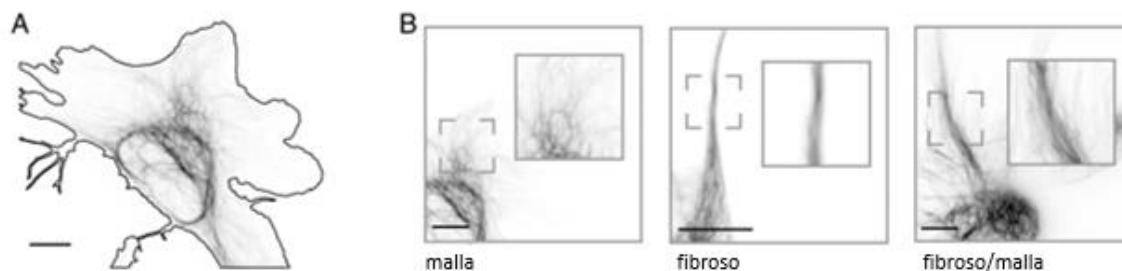


Figura 1.15: Arquitectura de la red de vimentina en células. A) Proyección de máxima intensidad de imágenes confocales de disco giratorio de una célula hFF expresando mEmerald-vimentina. La silueta marca los límites de la membrana celular. B) Arquitecturas de la red de vimentina (proyecciones de máxima intensidad): malla, fibrosa y mixta. Los insertos son los detalles en aumento 2x de las regiones marcadas en cada imagen. Barra de escala = 10 μ m. Tomado y modificado de ⁹⁷.

Por otro lado, Gan y colaboradores ⁸⁵ demostraron que la morfología de la red de vimentina guarda similitudes con la estructura de la red de microtúbulos. Esta similitud se originaría en el transporte (y posterior ensamblado) de ULFs mediante microtúbulos. Dado que el tiempo de recambio de subunidades en los filamentos de vimentina es menor que en el caso de los microtúbulos, la red de vimentina mantiene su distribución celular por tiempos más largos que los microtúbulos. Los autores proponen que la red de vimentina actuaría entonces como un “molde” con memoria mecánica para los microtúbulos en fase de crecimiento (fig. 1.16).

Dado que la polaridad de células que migran es sostenida principalmente por la red de microtúbulos ⁹⁸, la interacción de éstos con los filamentos de vimentina estabiliza dicha polarización. Así, los filamentos de vimentina moldean la red futura de microtúbulos a partir de aquellos que ya fueron polarizados en el pasado reciente, lo que aumenta la eficiencia de la migración direccional ⁸⁵.

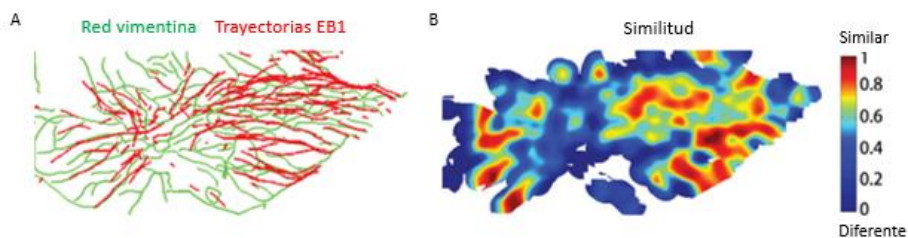


Figura 1.16. Los filamentos de vimentina sirven como molde de la red de microtúbulos. A) Trayectorias de EB1, proteína que se asocia a los extremos en crecimiento de los microtúbulos, siguen la forma de los filamentos de vimentina. B) La correlación espacial entre estas trayectorias y la red de vimentina muestra alta similitud. Modificado de ⁸⁵.

Capítulo 2 - Aspectos biofísicos de los filamentos intermedios

En el capítulo anterior mencionamos que los filamentos intermedios exhiben propiedades mecánicas únicas las cuales resultan esenciales para sus funciones biológicas¹⁰³. Además, los IFs son más flexibles que los filamentos de actina o microtúbulos y pueden estirarse hasta tres veces respecto a su longitud de reposo sin dañarse¹⁰⁴. Gracias a estas características, los IFs aportan viscoelasticidad al citoplasma e integridad mecánica a la célula⁵⁰.

En este capítulo describiremos algunos aspectos biofísicos de los IFs relevantes para este trabajo de tesis. En particular, centraremos la atención en la longitud de persistencia, comentaremos los métodos experimentales que permiten estimarla, y, finalmente, discutiremos ciertos aspectos estructurales que podrían explicar la flexibilidad característica de los IFs.

2.1 Longitud de persistencia

La longitud de persistencia es un parámetro de gran relevancia para cuantificar la rigidez de un polímero a la flexión. Así como la constante elástica de un resorte da cuenta de la rigidez de este frente a extensiones y compresiones longitudinales, la rigidez a la flexión es la resistencia de un elemento contra la deformación por flexión. La rigidez flexural depende del módulo de Young y el segundo momento de área de la sección transversal del filamento con respecto al eje de interés, la longitud del mismo y la condición de borde.

A partir del principio de equipartición de la energía, la longitud de persistencia se define como¹⁰⁵:

$$l_p = \frac{EI}{k_B T} \quad (2.1)$$

donde EI es la rigidez flexural, formada por el producto del módulo de Young E y el segundo momento de inercia I ; k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

La ecuación 2.1 muestra que el valor de l_p resulta de la competencia entre la rigidez flexural de un polímero y la magnitud de las fuerzas térmicas a las que se ve sometido.

Para comprender en detalle el significado de este parámetro, consideremos el filamento esquematizado en la figura 2.1. En dicha figura, el ángulo θ representa la orientación local del filamento respecto del eje horizontal y s , la coordenada curvilínea que parametriza la extensión del filamento. Este parámetro recorre toda la extensión del filamento y toma valores entre 0 y la longitud del segmento del filamento (L).

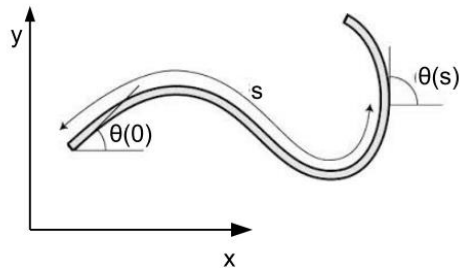


Figura 2.1. Representación esquemática de un filamento. Se muestra la coordenada s a lo largo de su contorno y el ángulo $\theta(s)$, que es tangente al filamento en cada punto. Tomado de ²⁹.

La longitud de persistencia puede entenderse entonces como la distancia a partir de la cual la orientación de dos vectores tangentes al contorno del filamento pierden la correlación ²⁹. En otras palabras, a medida que avanzamos a lo largo del filamento, el ángulo tangente al mismo irá cambiando y la velocidad con la que ese cambio ocurra dependerá de la rigidez flexural del filamento. Se puede demostrar que si se tiene un ensamble de filamentos con la misma rigidez flexural, la pérdida de correlación de la orientación local decae exponencialmente ²⁹:

$$\langle (\cos (\theta(s) - \theta(0))) \rangle = e^{-\frac{s}{2l_p}} \quad (2.2)$$

donde los corchetes $\langle \rangle$ representan el promedio del ensamble (es decir, el promedio sobre un conjunto de filamentos independientes) y l_p está relacionado con la distancia media de la pérdida de correlación.

Cualitativamente, si el filamento es muy rígido, los ángulos θ se mantendrán similares a medida que la distancia s aumenta; si el filamento es flexible, estos ángulos perderán correlación, producto de las curvaturas del filamento, por ello, considerando la ecuación 2.1, la longitud de persistencia es también la longitud del filamento por sobre la cual las fluctuaciones térmicas se vuelven apreciables ²⁹.

En la figura 2.2, se esquematizan diferentes tipos de elementos con l_p creciente y se señala la longitud de extremo a extremo de cada filamento. A medida que la l_p del filamento aumenta, la distancia de extremo a extremo del filamento se asemeja a la longitud del segmento.

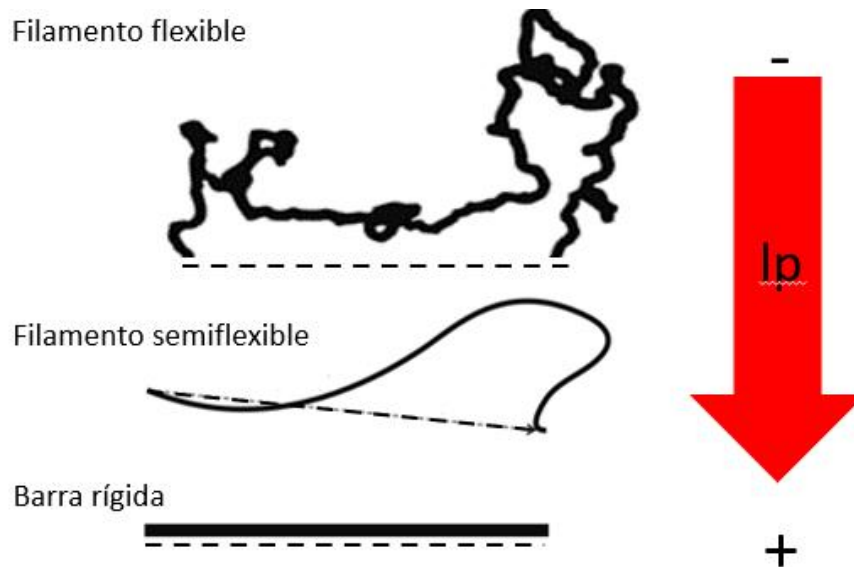


Figura 2.2. Longitud de persistencia. La forma que adopta un polímero depende de su rigidez. Aquellos filamentos con menor l_p son más flexibles por lo que adoptan mayores curvaturas, mientras que los más rígidos no pueden curvarse. En línea punteada negra se señala la longitud de extremo a extremo de los distintos filamentos. Adaptado de ¹⁰⁶.

La tabla 2.1 compila los valores de longitudes de persistencia de los filamentos del citoesqueleto y del ADN, a modo de comparación. Es válido destacar que el bajo valor de l_p del ADN permitiría alcanzar el altísimo grado de empaquetamiento característico del núcleo de células eucariotas ³. Por el otro lado, los filamentos que componen el citoesqueleto tienen longitudes de persistencia muy variadas, que van desde nanómetros a milímetros. En particular, entre los polímeros del citoesqueleto, los IFs son más flexibles que los filamentos de actina y los microtúbulos, a pesar de poseer un diámetro mayor al de los filamentos de actina ¹⁰⁷.

Polímero	l_p (in vitro)
ADN	35 nm ¹⁰⁸
microtúbulos	1.4 mm ¹⁰⁹
Actina	18 μ m ¹¹⁰
Filamentos intermedios	0.2 – 3 μ m ^{43,104}

Tabla 2.1. Longitudes de persistencia típicas para distintos biopolímeros.

2.2 Métodos experimentales para la determinación de la l_p

Para obtener la longitud de persistencia se han aplicado diferentes estrategias. A modo de ejemplo, describiremos brevemente algunos trabajos recientes utilizados para determinar el valor de l_p de los filamentos intermedios.

Mücke y colaboradores ¹¹¹ polimerizaron filamentos de vimentina en condiciones in vitro los cuales fueron posteriormente adsorbidos e inmovilizarlos sobre diferentes sustratos. Luego, obtuvieron imágenes de los IFs utilizando microscopía de fuerza atómica y analizaron los contornos de filamentos cuyas longitudes eran de entre 2 y 4 μm . En esta microscopía (fig. 2.3), resulta clave el sensor de fuerza, que consiste en un brazo de palanca con una punta muy fina en su extremo. Un láser incide sobre esta palanca y es reflejado a un fotodetector que es muy sensible a la posición del haz del láser. Al barrer la superficie de la muestra, las fuerzas entre los átomos de la muestra y los de la punta curvan el brazo lo que provoca un cambio en la incidencia del láser en el fotodetector (Peng et al. 2022).

Analizando la relación entre el contorno de los filamentos y su longitud de extremo a extremo (ver figura 2.2) calcularon, para diferentes condiciones, longitudes de persistencia de vimentina entre 0.3 y 1 μm .

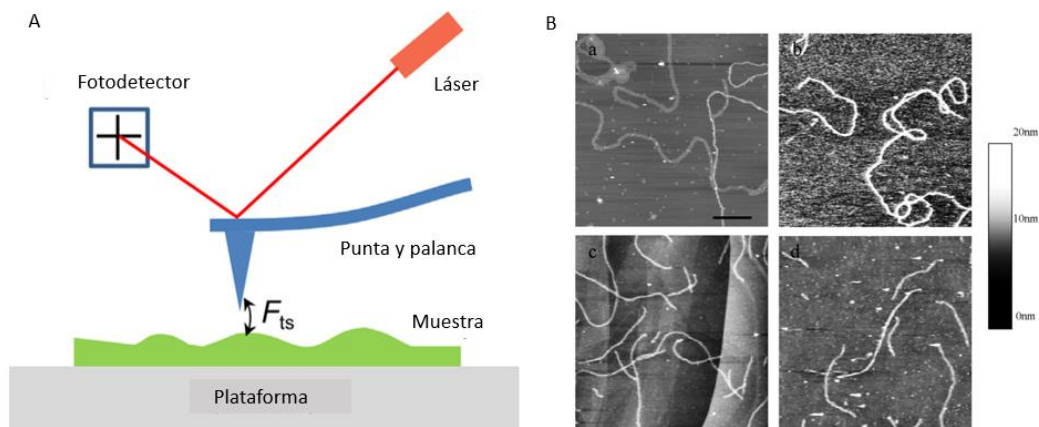


Figura 2.3 Microscopía de fuerza atómica para determinar la forma de filamentos intermedios. A) Esquema funcional de un microscopio de fuerza atómica. Las fluctuaciones que se generan en la punta cuando ésta recorre la superficie de la muestra producen cambios en la posición de propagación de la luz del láser los cuales son detectados por un fotodetector. F_{ts} es la fuerza entre los átomos de la muestra y la palanca Adaptado de ¹¹². B) Imágenes de filamentos de vimentina obtenidas mediante esta microscopía. Los filamentos fueron adsorbidos sobre mica y observados en ausencia de medio (a) o en solución (b), grafito pirrolítico (c) o vidrio hidrofílico (d). Barra de escala = 1 μm . El gradiente de grises representa los cambios en altura de la superficie. Tomado de ¹¹¹.

Por otra parte, Schopferer y colaboradores ¹¹³ reconstituyeron redes de vimentina y realizaron experimentos de corte de alta frecuencia, utilizando un equipo llamado vibrador axial piezoeléctrico, que se esquematiza en la figura 2.4. Esta técnica registra la respuesta del material al variar las frecuencias de las fuerzas aplicadas. Esto permite medir la respuesta elástica de la red con la que puede calcularse su rigidez. De esta forma, calcularon una longitud de persistencia de vimentina de $\sim 0.4 \mu\text{m}$. A diferencia del caso anterior, esta medición no se realiza sobre filamentos individuales, sino que el valor de l_p se deriva de mediciones de la red.

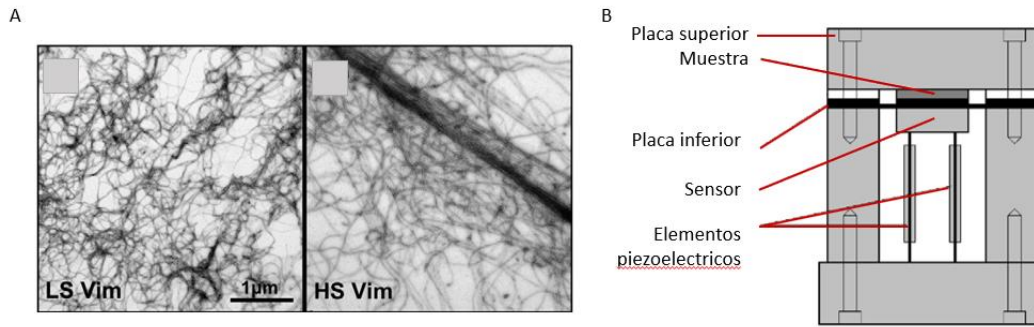


Figura 2.4. Redes de vimentina ensambladas in vitro y esquema de un vibrado axial piezoeléctrico. A) Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de redes de vimentina en dos condiciones diferentes (baja y alta concentración de NaCl, LS y HS, respectivamente). Adaptado de ¹¹³. B) Esquema del dispositivo utilizado para determinar la rigidez de flexión de los filamentos de vimentina (adaptado de ¹¹⁴). La muestra es colocada entre dos placas circulares de 20 mm de diámetro a una distancia regulable de 10 – 30 μm . La placa inferior está conectada con dos elementos piezoeléctricos que reciben un voltaje sinusoidal para generar una oscilación de la placa alrededor de una posición promedio, lo que permite obtener la rigidez de flexión de la red. Tomado de ¹¹³.

Finalmente, Nöding y colaboradores ¹¹⁵ estudiaron, mediante microscopía de fluorescencia, las fluctuaciones de filamentos de vimentina en solución y confinados en cámaras con ancho y altura máximas de 2.7 y 1 μm , respectivamente (fig. 2.5). Con esta configuración experimental buscaron replicar el ambiente intracelular ^{116,117} y restringieron las deformaciones de los filamentos al plano focal, las cuales son independientes de aquellas que ocurren en el plano perpendicular. A partir de las imágenes analizaron los cambios en los contornos de los filamentos y, aplicando un análisis de correlación de ángulos, obtuvieron un valor de l_p de $\sim 2 \mu\text{m}$.

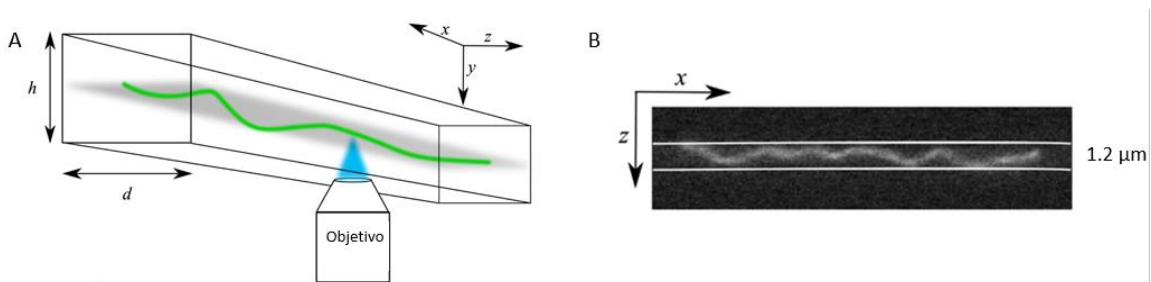


Figura 2.5. Filamentos individuales de vimentina en volúmenes confinados. A) Los filamentos de vimentina son colocados en una cámara cuyas dimensiones les impide curvarse en el plano perpendicular al focal. B) imagen de un filamento en una de las cámaras diseñadas. Barra de escala = 10 μm . Adaptado de ¹¹⁵.

Los métodos hasta aquí descriptos sólo pueden ser aplicados en condiciones in vitro las cuales no son representativas del entorno citoplasmático, el cual, como veremos más adelante, podría afectar las propiedades de los biopolímeros. Por este motivo, durante el desarrollo de esta tesis, implementamos métodos que permiten estudiar a los filamentos en su entorno natural. En la

siguiente sección describiremos algunos trabajos relevantes que fundan las bases del método utilizado en este trabajo para la determinación de l_p en células vivas.

2.3 Obtención de la longitud de persistencia a partir de la descomposición en modos de Fourier de las formas de los filamentos

En 1993, Gittes y colaboradores ¹¹⁰ describieron un método muy sencillo para la determinación de la longitud de persistencia de biopolímeros, el cual se basa en que las curvaturas que adquieren los filamentos en equilibrio térmico están definidas por su longitud de persistencia. De esta forma, estudiando cuantitativamente dichas curvaturas, se puede derivar el valor de l_p .

Este método permite determinar la l_p de filamentos cuyas longitudes son más chicas o están en el orden del valor de l_p . En esta condición, no es posible implementar el método basado en el estudio de la pérdida de la correlación (ec. 2.2) ya que el decaimiento de esta es despreciable para longitudes menores que l_p .

En su trabajo, Gittes y colaboradores colocaron los filamentos de interés en una cámara de dimensiones limitadas, similar al método de Schopferer mencionado en la sección anterior. La figura 2.6 muestra los cambios espontáneos (a temperatura ambiente) en la forma de un filamento de actina.



Figura 2.6. Formas de filamentos de actina en solución. Imágenes secuenciales de un filamento de actina de $15.5 \mu\text{m}$ de largo, separadas por 1.5 s . Los cambios en las curvaturas se deben a fluctuaciones térmicas. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$. Tomado de ¹¹⁰.

A partir de estas imágenes, es posible obtener las coordenadas espaciales discretas (x_k, y_k) que definen la forma de cada filamento (fig. 2.7) y, a partir de las mismas, recuperar sus coordenadas curvilíneas θ y s (fig. 2.1). En el siguiente capítulo (sección 3.5), describiremos algunos de los métodos utilizados en la literatura para recuperar las coordenadas de filamentos a partir de imágenes obtenidas por diversas microscopías.

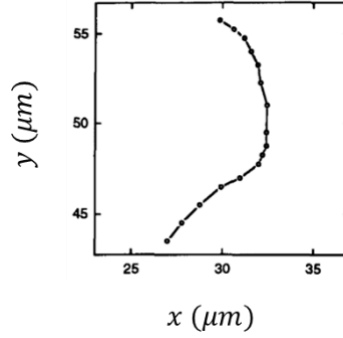


Figura 2.7. Coordenadas (x, y) recuperadas de un filamento. A partir de imágenes de filamentos individuales se obtienen las coordenadas espaciales que definen la forma de dicho filamento. Adaptado de ¹¹⁰.

Al conocer las coordenadas (x, y) puede calcularse el ángulo tangente θ_k , correspondiente a la posición S_k como:

$$\theta_k = \tan^{-1} \left(\frac{y_{k+1} - y_k}{x_{k+1} - x_k} \right) \quad (2.3)$$

y la longitud de arco (S_k):

$$S_k = \sum_{n=1}^{k-1} \Delta S_n + \frac{\Delta S_k}{2} \quad (2.4)$$

donde la distancia entre puntos (ΔS_k) se define como:

$$\Delta S_k = \sqrt{(x_{k+1} - x_k)^2 + (y_{k+1} - y_k)^2} \quad (2.5)$$

Accesoriamente, podemos calcular la longitud del filamento según:

$$L = \sum_{k=1}^M \Delta S_k \quad (2.6)$$

donde M representa el número total de coordenadas discretas que definen la forma del filamento.

La figura 2.8 ilustra el resultado de aplicar este procedimiento al filamento mostrado en la figura anterior.

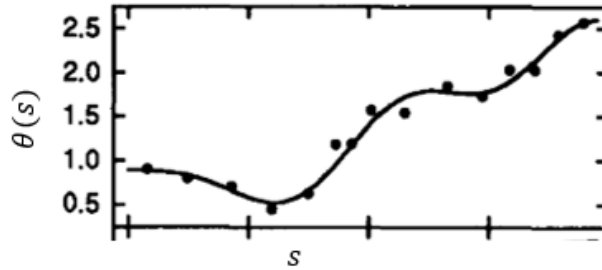


Figura 2.8. Cambio de coordenadas espaciales a coordenadas curvilíneas θ y s . Descripción del mismo filamento mostrado en la figura 2.7 por medio de su curvatura. El ángulo tangente de cada uno de los segmentos determinados por las coordenadas (x, y) recuperadas es graficado en función de la longitud del filamento. Adaptado de ¹¹⁰.

Una vez conocidos los valores de $\theta(s)$ a lo largo del filamento, es posible descomponer esa función en modos de Fourier, expresados como sumas de cosenos:

$$\theta(s) = \sum_n \theta_n(s) = \sqrt{\frac{2}{L}} \cdot \sum_{n=0}^{\infty} a_n \cos\left(\frac{n\pi s}{L}\right) \quad (2.7)$$

donde $n\pi/L$ es el vector de onda q_n y a_0 es el término de orden cero que corresponde a la orientación global del filamento.

En la siguiente figura se muestran los primeros 5 modos de Fourier para el filamento representado en la figura 2.8.

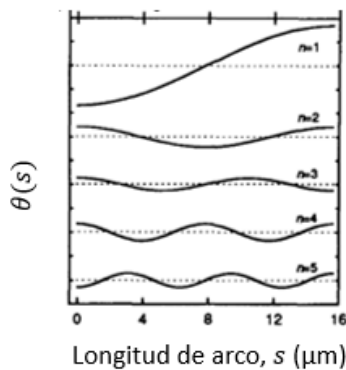


Figura 2.9. Descomposición de las curvaturas de un filamento en modos de Fourier. Cada curva corresponde a un modo de Fourier. Adaptado de (Gittes et al. 1993)

Los valores de las amplitudes de los diferentes modos de Fourier a_n en la ecuación 2.7 se obtienen a partir de la siguiente aproximación:

$$a_n \cong \sum_{k=1}^N \theta_k \Delta s_k \cos\left(\frac{n\pi}{L} s_k^{mid}\right) \quad (2.8)$$

donde $n = 1, \dots, N$ y $s_k^{mid} = \Delta s_1 + \Delta s_2 + \dots + 1/2\Delta s_k$.

Al trabajar con un ensamble de filamentos independientes se generan conjuntos de amplitudes a_n cuyas distribuciones se ilustran, a modo de ejemplo, en la figura 2.10.

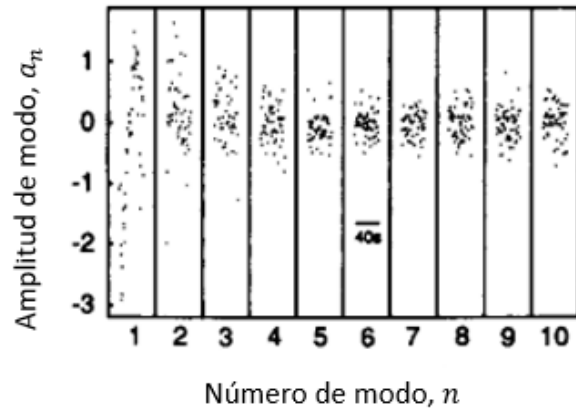


Figura 2.10. Distribución de los valores a_n . Las amplitudes mostradas provienen del análisis de un ensamble de entre 51 y 113 filamentos. Adaptado de (Gittes et al. 1993).

A partir de la descripción de Fourier de la forma de un ensamble de filamentos semiflexibles en equilibrio térmico, es posible hallar la energía elástica almacenada y asociarla a la rigidez de los mismos ¹¹⁰. Usando esta aproximación, se obtiene una expresión que relaciona la varianza de las amplitudes de los distintos modos de Fourier del ensamble con la rigidez flexural (ec. 2.1), a través de la longitud de persistencia:

$$var(a_q) = \frac{1}{lp} \frac{1}{q^2} \quad (2.9)$$

donde, tal como se mencionó para la ecuación 2.7, q es el vector de onda equivalente a $n\pi/L$.

En la siguiente figura, se muestra la relación de la varianza con el número de modo n en la que se puede observar también el efecto del ruido experimental, discutido más adelante.

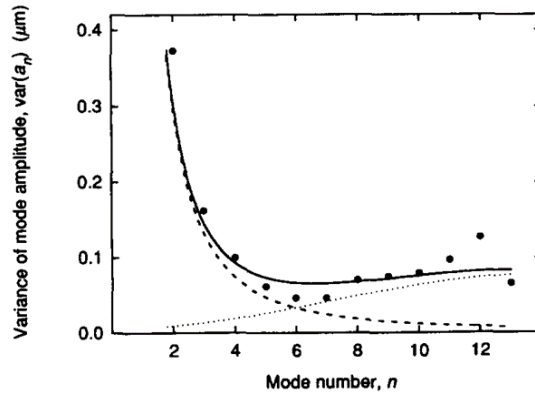


Figura 2.11. Distribución de las varianzas de los modos de Fourier. La línea de barras es un ajuste a la ecuación 2.9. La línea punteada muestra la varianza estimada del ruido experimental según el número de modo. La línea sólida es la suma de ambas expresiones. Adaptado de (Gittes et al. 1993)

A partir de esta relación, los autores plantean que las fluctuaciones térmicas dominan la varianza de los modos más bajos, mientras que el ruido experimental domina aquellas varianzas de los modos mayores (Gittes et al. 1993). Descartando los valores de alta frecuencia (modos más altos), es posible aproximar la varianza de las amplitudes a la expresión dada por la ecuación 2.9, que linealizada es:

$$\ln(\text{var}(a_q)) = -\ln(lp) - 2\ln(q) \quad (2.10)$$

El logaritmo de los datos presenta una distribución normal de errores, por lo cual es posible realizar el ajuste de la ecuación 2.10 mediante cuadrados mínimos¹¹⁰. Ajustando los datos experimentales a esta última expresión se obtiene el valor de longitud de persistencia aplicando antilogaritmo a la ordenada al origen de dicho ajuste.

2.4 Longitud de persistencia aparente de microtúbulos en células vivas

La simplicidad del método de Gittes, el cual no requiere mediciones con técnicas invasivas sino simplemente la observación de los filamentos, derivaron en su utilización para el estudio de biofilamentos en el entorno celular.

En particular, Brangwynne y colaboradores¹¹⁸ utilizaron dicho método para cuantificar la longitud de persistencia de los microtúbulos en células y encontraron diferencias notables con el comportamiento de los filamentos in vitro.

Inicialmente¹¹⁹, analizaron las curvaturas de los microtúbulos en células y determinaron que éstas eran mayores que las esperadas de acuerdo a la lp determinada in vitro. Para explicar estos resultados, los autores postularon que los microtúbulos son capaces de tolerar las grandes cargas a

las que se ven expuestas en condiciones fisiológicas gracias al refuerzo mecánico por parte de la red elástica conformada por filamentos del citoesqueleto circundante, tal como se esquematiza en la figura 2.12.

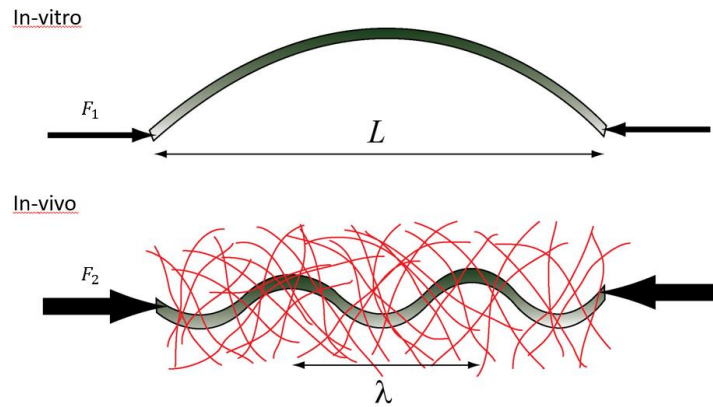


Figura 2.12. Efecto de un medio elástico como refuerzo de los microtúbulos en células vivas. Un microtúbulo libre in vitro sometido a una fuerza crítica de pequeña magnitud se curva en la escala de longitud del filamento (L). Un microtúbulo en una célula viva, reforzado mecánicamente por el citoesqueleto, precisa de una fuerza crítica mayor y adquiere pequeñas curvaturas (λ). $F_2 > F_1$. Adaptado de ¹¹⁹.

En un trabajo posterior, estos mismos autores ¹¹⁸ demostraron que las curvaturas de los microtúbulos en células se distribuyen como si estuviesen en un medio térmicamente equilibrado (llamado estado símil térmico). En particular, verificaron que la varianza de los modos de Fourier sigue el comportamiento esperado por la ecuación 2.10 y determinaron el valor de la longitud de persistencia en el entorno celular. Este parámetro, siguiendo los lineamientos del trabajo de Brangwynne y colaboradores, será denominado en esta tesis “longitud de persistencia aparente” o lp^* .

En dicho trabajo, obtienen para los microtúbulos un valor de lp^* de $\sim 30 \mu\text{m}$, esto es, 100 veces menor a la longitud de persistencia determinada in vitro (revisadas en ¹⁰⁹).

Para explicar estos resultados, los autores postulan que la gran amplitud de las curvaturas de los microtúbulos en células tiene su origen en la acción de fuerzas no térmicas, estocásticas en su dependencia temporal y distribuidas al azar; y que la acción de estas fuerzas afecta la curvatura de los microtúbulos, lo que provoca que, en células vivas, su longitud de persistencia aparente sea menor. En la figura 2.13 se muestran las curvaturas que típicamente adquieren los microtúbulos por acción de estas fuerzas en una célula.

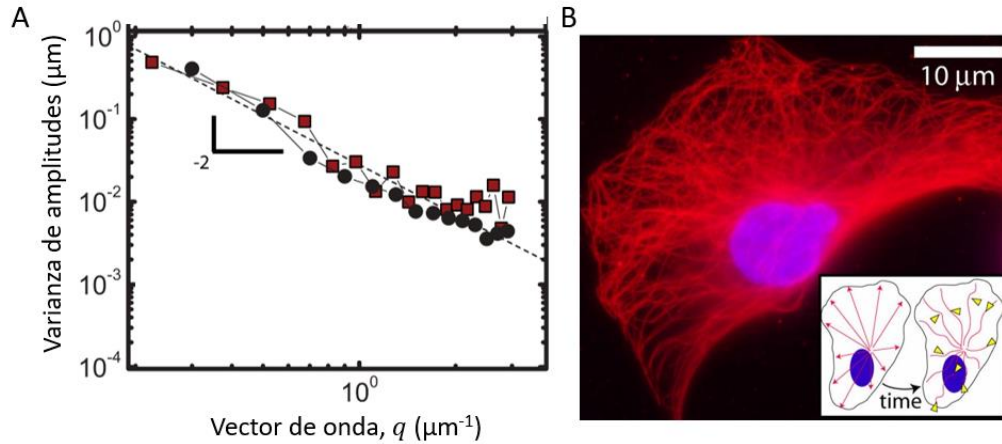


Figura 2.13. Longitud de persistencia en de microtúbulos en células. A) Análisis de Fourier de curvaturas de microtúbulos. Se destaca el comportamiento lineal de los datos, que pueden ser ajustados por una recta con pendiente -2. B) Imagen de epifluorescencia de una célula CHO fijada, con marcación de anticuerpo anti- α -tubulina para mostrar los microtúbulos (en rojo) y DAPI para el núcleo (azul). El esquema inserto muestra que los microtúbulos se polimerizarían de forma recta y subsecuentemente adoptarían curvaturas por la acción de fuerzas intracelulares de origen no térmico orientadas al azar (flechas amarillas). Adaptado de ¹¹⁸

De forma complementaria, Bicek y colaboradores ¹²⁰ demuestran que las curvaturas de los microtúbulos en células vivas son causadas principalmente por la acción de motores moleculares, cuyas fuerzas generadas no son de origen térmico.

Finalmente, nuestro grupo ¹²¹ estudió la influencia de las distintas redes del citoesqueleto en la longitud de persistencia aparente de microtúbulos en células vivas y demostró que los IFs poseen un rol central en la determinación de la distribución de formas de los microtúbulos en células vivas.

Estos resultados ponen de manifiesto el rol clave que tiene el entorno de los filamentos del citoesqueleto en el ambiente citoplasmático para la definición de sus propiedades mecánicas y sus funciones biológicas.

2.5 Longitud de persistencia y flexibilidad de los filamentos intermedios

En el capítulo anterior hemos mencionado que los filamentos intermedios tienen propiedades mecánicas muy relevantes y que cumplen un rol central en la preservación mecánica de la célula en general y el núcleo en particular. En esta sección describiremos algunos aspectos mecánicos de los IFs relacionados con su función biológica.

La tabla 2.1 muestra que, de los biopolímeros que componen el citoesqueleto, los filamentos intermedios presentan el menor valor de l_p . Esta gran flexibilidad relativa de los IFs puede explicarse a nivel molecular por el mayor grado de desorden y espacio de hidratación disponible en la

estructura molecular del filamento, en comparación con microtúbulos o filamentos de actina ¹⁰⁴, lo cual permite a los IFs curvarse notablemente.

Por otra parte, los filamentos intermedios pueden estirarse hasta más de tres veces su longitud natural sin romperse ¹⁰⁴. Esta cualidad estaría asociada a una transición $\alpha \leftrightarrow \beta$, en la que un segmento de la proteína con estructura de hélice α se convierte en lamina β , tal como se muestra en la figura 2.14 ¹²². En este sentido, los IFs constituirían un excelente ejemplo en el cual la estructura molecular y la función mecánica están íntimamente asociadas ⁴³.

Cuando los IFs son estirados más allá de su capacidad, su diámetro se reduce notablemente y la deformación se vuelve permanente ¹²³. En este punto la transición $\alpha \leftrightarrow \beta$ es irreversible ¹⁰⁷.

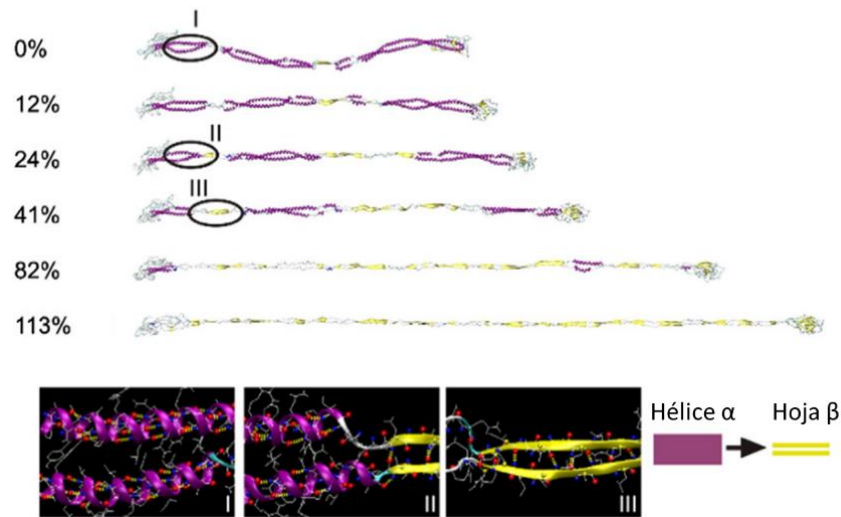


Figura 2.14. Modelo postulado para explicar la extensibilidad de los filamentos intermedios. Distintos instantes durante el estiramiento desde los extremos de un dímero que integra un filamento maduro. El porcentaje a la derecha muestra el estiramiento respecto a la longitud inicial, en ausencia de fuerzas. Los detalles del panel inferior muestran los cambios en la estructura secundaria del filamento que ocurren durante la transición $\alpha \leftrightarrow \beta$. Adaptado de ¹²².

Otra característica destacable de la red de IFs es su capacidad de volverse más rígida ante determinados estímulos ¹²⁴. Se han postulado distintas hipótesis para explicar dicho comportamiento.

Los IFs son polielectrolitos con una densidad de carga de superficie negativa ¹²⁵. Cuando la concentración de cationes divalentes como Mg^{2+} o Ca^{2+} en el medio alcanzan valores fisiológicos, la rigidez de las redes de IFs aumenta sin provocar cambios sustanciales en su morfología ¹²⁶. Se propone que la presencia de estos cationes neutralizaría la densidad de carga superficial de los filamentos individuales y provocaría su colapso en manojos u otros agregados ¹²⁵. Debemos destacar que en el entorno celular también están presentes ciertas proteínas de entrecruzamiento que podrían causar un efecto similar al de estos iones divalentes ¹²⁴.

Por otro lado, el módulo elástico de las redes de IFs (esto es, la resistencia a ser deformados de manera elástica) aumenta cuando son sometidos a grandes tensiones. Esto implica que las redes son más rígidas bajo gran estrés mecánico que en situaciones de bajo estrés ¹⁰⁴. Esta aparente paradoja, en la que los IFs son rígidos bajo tensión pero flexibles para doblarse puede explicarse por un mecanismo en el que los filamentos que constituyen un IF maduro (figura 1.7B) se deslizan libremente unos respecto de otros, similar a lo que ocurre con las fibras que forman sogas más gruesas ^{107,122}.

A partir de sus características mecánicas, se ha postulado que los IFs sólo tienen una influencia limitada en la respuesta mecánica de células ante pequeñas deformaciones ¹²³, sin embargo, bajo presiones que son suficientes para quebrar la red de actina y que provocarían lisis celular, la rigidización de los IFs prevendría la deformación excesiva de la célula ¹⁰³. En este contexto, se plantea que los IFs son entidades versátiles para soportar estrés mecánico y mantener la integridad estructural de las células y sus núcleos ^{43,127}.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de estudiar a los filamentos del citoesqueleto en su entorno fisiológico para comprender sus funciones biológicas.

Capítulo 3 - Técnicas de microscopía óptica para visualizar y localizar partículas y filamentos individuales con precisión nanométrica

En los últimos 20 años, se dio un salto cualitativo en el campo de las microscopías ópticas a partir del desarrollo de novedosas técnicas que permiten obtener imágenes de fluorescencia con una resolución espacial superior a aquella obtenida con las microscopías tradicionales ¹²⁸. Este salto ha sido especialmente beneficioso para la biología celular, ya que permitió estudiar procesos biológicos con resoluciones espaciales del orden del tamaño de las biomoléculas.

Por otra parte, el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes, las cuales no requieren de la permeabilización y fijación de las muestras, permitieron estudiar procesos biológicos en células vivas de una forma muy poco invasiva ^{129,130}. Estos avances determinaron que sea posible explorar el movimiento de moléculas y partículas únicas en el entorno celular y derivar, a partir del análisis de sus trayectorias, información relevante del proceso biológico en estudio.

En este capítulo, describiremos brevemente los principios básicos de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia, algunas de las cuales fueron de utilidad para el desarrollo de esta tesis. Posteriormente, describiremos los distintos tipos de movimientos de partículas en el ambiente citoplasmático y finalmente, discutiremos diferentes métodos dedicados a la localización de filamentos únicos a partir de imágenes de microscopía.

3.1 Microscopías de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia revolucionó el campo de la biología al permitir visualizar estructuras celulares específicas con un contraste muy alto ¹³⁰. Para lograr este contraste, es preciso coleccionar la fluorescencia de la muestra, separándola espacialmente de la luz proveniente de la fuente de excitación.

La figura 3.1 representa un esquema simplificado de un microscopio de fluorescencia de campo amplio. Estos microscopios están equipados con fuentes de alta intensidad que emiten luz en todo el espectro visible. Para limitar la transmisión a aquellas longitudes de onda capaces de excitar el fluoróforo de la muestra, se coloca un filtro de excitación a continuación de la fuente de luz. La luz incide en un espejo dicróico y es reflejada a través del objetivo hacia la muestra y la fluorescencia emitida por la muestra es coleccionada por el mismo objetivo, transmitida por el espejo dicróico y un filtro de emisión, que permite seleccionar el rango espectral de los fotones que serán coleccionados y que llegarán a la cámara. Este tipo de configuración, en la cual se utiliza al objetivo para iluminar la muestra y coleccionar la fluorescencia se denomina epiiluminación ¹³¹.

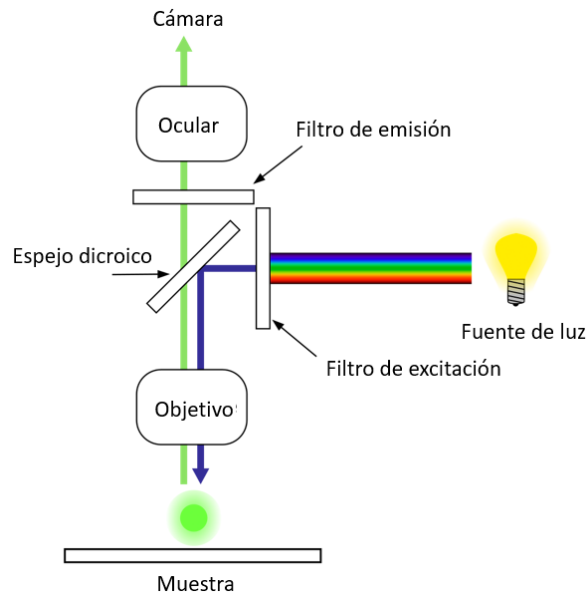


Figura 3.1. Esquema básico de un microscopio de fluorescencia de campo amplio. En azul se muestra el camino que recorre el haz de excitación desde la fuente de luz hasta la muestra, mientras que en verde se indica el camino que recorre la fluorescencia emitida por la muestra hasta la cámara. Adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope.

En la microscopía de campo amplio, la fluorescencia fuera de foco también alcanza la cámara, por lo que las imágenes obtenidas tienen poco contraste. Por ello, en el desarrollo de esta tesis, utilizamos microscopía confocal para adquirir imágenes del citoesqueleto de células vivas (fig. 3.2).

Estos microscopios aumentan el contraste rechazando la luz que proviene de planos fuera de foco utilizando láseres como fuente de excitación y colocando una apertura confocal o *pinhole* en el camino óptico, previo a la colección en el detector de la fluorescencia emitida por la muestra^{132,133}. La luz que proviene de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no se enfoca en el *pinhole* y no alcanza el detector. De esta manera, sólo aquellas moléculas fluorescentes que estén dentro del volumen confocal contribuirán a la luz detectada¹³².

Por otro lado, los microscopios confocales permiten seccionar la muestra, es decir, tomar imágenes de distintos planos en la dirección del eje óptico, con las que pueden realizarse reconstrucciones tridimensionales del espécimen observado.

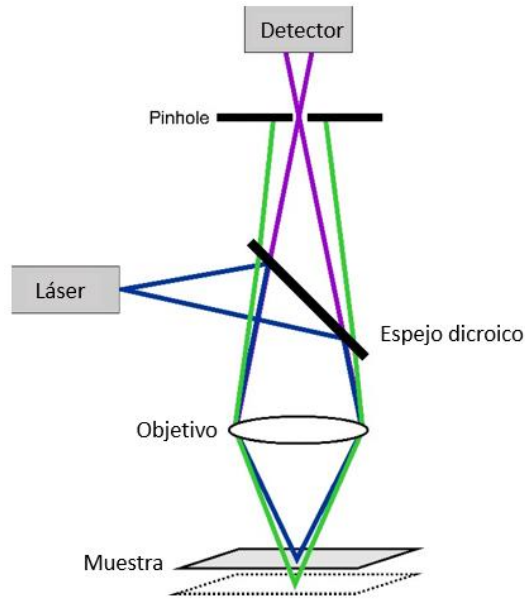


Figura 3.2. Microscopía confocal. La luz del láser de excitación es enfocada en la muestra. La fluorescencia emitida por la muestra pasa por un espejo dicróico y alcanza el detector (en violeta). La luz fuera del plano focal (en verde) no logra alcanzar el detector debido a la presencia del pinhole. Adaptado de <https://www.uni-frankfurt.de/49962827/Methods>.

3.2 Resolución de un microscopio óptico

Se define resolución como la mínima distancia entre dos objetos puntuales a la que puedan ser distinguidos como entidades separadas en la imagen ¹³¹. Como analizaremos cualitativamente más adelante, la resolución de un microscopio óptico está limitada por la difracción de la luz.

La imagen obtenida al observar un objeto puntual a través de un microscopio óptico es el de un patrón denominado disco de Airy ¹³¹, el cual se representa en la figura 3.3.

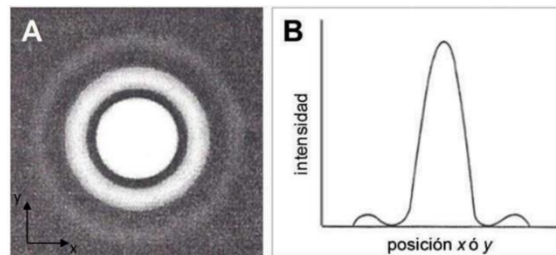


Figura 3.3: Difracción de una fuente puntual. A) Imagen del disco de Airy generado por una fuente puntual observada a través de un microscopio. (B) Intensidad del patrón en A). Adaptado de ¹³¹.

Para definir la resolución, utilizaremos el criterio de Rayleigh que define que la mínima distancia a la cual se pueden resolver dos partículas puntuales es aquella en la cual el máximo del patrón de

una coincide con el primer mínimo de la segunda (fig. 3.4)¹³¹. La resolución, por tanto, viene dada por el radio del disco de Airy (r_{Airy}), que para un microscopio de epifluorescencia, equivale a¹³⁴:

$$r_{Airy} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (3.1)$$

donde λ es la longitud de onda de la luz y NA es la apertura numérica del objetivo utilizado¹³¹. Por ejemplo, la resolución en el caso de un objetivo con una apertura numérica de 1.35 y trabajando con luz en el rango visible ($\lambda \sim 500$ nm), es del orden de 200 nm.

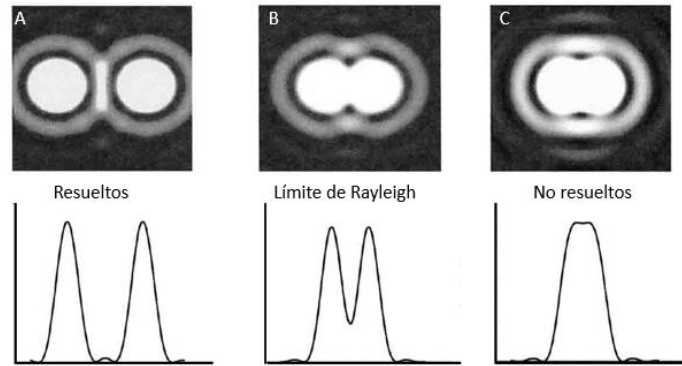


Figura 3.4: Criterio de Rayleigh para la resolución óptica. Ejemplos de imágenes y perfiles de intensidad de dos fuentes puntuales resueltas (A), en el límite de resolución (B) y no resueltas (C). Adaptado de¹³⁵.

3.3 Microscopías de superresolución

El límite de resolución de las microscopías ópticas en torno a los 200 nm impone barreras para el estudio de ciertos fenómenos biológicos, dado el rango de tamaños de las estructuras subcelulares. La figura 3.5 muestra tamaños característicos de distintas estructuras de interés y cuáles son las técnicas capaces de resolverlas.

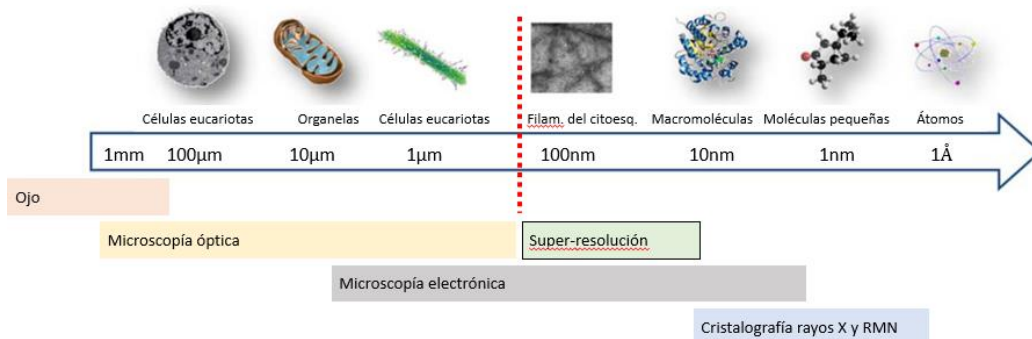


Figura 3.5. Comparación de las resoluciones de distintas microscopías y espectroscopías. La microscopía óptica puede ser utilizada para la localización de proteínas marcadas con reporteros fluorescentes y obtener información dinámica, pero se ve acotada por el límite de difracción de la luz (línea roja). Las microscopías de superresolución consiguen avanzar

sobre dicho límite y resolver estructuras con mayor detalle. La microscopía electrónica puede proveer información estructural dentro de un amplio rango de tamaños. Las estructuras moleculares de biomoléculas de interés pueden ser obtenidas mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnético-nuclear (RMN). Estos últimos métodos no permiten el estudio en el entorno celular. Adaptado de ¹³⁶.

Tal como mencionamos anteriormente, las microscopías de superresolución están revolucionando la forma en la que se estudia la biología, dado que proporcionan información a la que previamente era imposible acceder ¹³⁷. La implementación de estas técnicas permite plantear nuevas preguntas relacionadas con la función celular ¹³⁸, por lo que se están convirtiendo en herramientas centrales en el área de la investigación biomédica ¹²⁸. La relevancia de estas técnicas ha sido tal que sus creadores fueron distinguidos con el premio nobel de química en el año 2014 ¹³⁹.

El éxito de estas técnicas ha promovido el desarrollo de una gran diversidad de métodos, algunos de los cuales son enumerados en la tabla 3.1. Para simplificar esta clasificación, podemos ordenar estos métodos en dos grandes familias: en la primera se emplean patrones de iluminación para modular espacialmente el comportamiento de los fluoróforos (*modelan volumen focal*), mientras que la otra se basa en la localización de moléculas individuales emisoras de fluorescencia (*estocásticas*) ¹²⁸.

Técnica	Resolución X/Y (Z) (nm)	Fluoróforo	Intensidad de iluminación	Admite muestras vivas
CLSM	180 -250 (500-700)	Convencionales	media	si
SIM	100-130 (250-350)	Convencionales	media	Con restricciones
STED	20-60 (40 - 150)	rsFPS	Media - alta	Con restricciones
MoNaLISA	70 – 100 (50-70)	rsFPS	Media - baja	Si
RESOLFT	40 – 80 (80)	rsFPS	Media - baja	si
PALM/STORM	20 -50 (100)	rsFPS	Media - alta	Con restricciones
MINIFLUX	2	rsFPS	baja	no
SOFI	2 – 25	rsFPS	Media	no
LLSM	150 (280)	convencionales	Baja	Si

Tabla 3.1. Técnicas de microscopía de superresolución. En la primera fila se coloca a la microscopía confocal (CLSM, confocal laser scanning microscopy) como patrón de comparación. El color rosado identifica a la familia de técnicas basadas en modular el volumen focal, mientras que el color verde corresponde a las técnicas estocásticas. Tabla confeccionada a partir de ¹⁴⁰⁻¹⁴³. En negritas, se destacan las microscopías de superresolución utilizadas en el presente trabajo.

En el desarrollo de esta tesis, hemos trabajado con imágenes obtenidas mediante dos técnicas diferentes de microscopía de superresolución en las que se modela el volumen focal: STED ¹⁴⁴ y MoNaLISA ¹⁴⁵.

Estas técnicas requieren, además, poder controlar el estado fotofísico de los fluoróforos. Por este motivo, son de elección las proteínas rsFPs (*reversible switchable fluorescent proteins*; figura 3.6), que alternan entre un estado ON en el que pueden emitir fluorescencia y otro estado OFF u oscuro,

en el que no emiten. La transición del estado ON al OFF y viceversa se logra al irradiarlas con luz de la energía adecuada ¹⁴⁶.

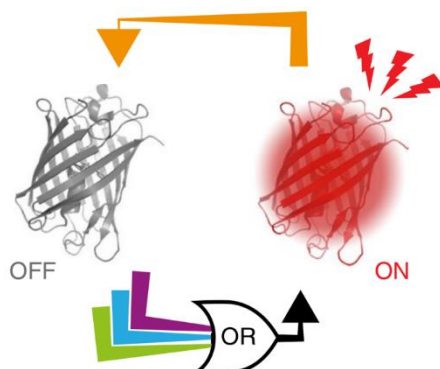


Figura 3.6. Esquema del funcionamiento de una proteína fluorescente interconvertible. Representación de la proteína rsFusionRed. El cambio del estado OFF al estado ON es inducido al excitar el fluoróforo con luz UV-visible, azul o verde (representado por una compuerta lógica OR). La transición del estado ON al OFF es provocada por la iluminación con luz naranja (590 nm). Adaptado de ¹⁴⁷

La microscopía STED (STimulated Emission Depletion) fue la primera técnica de superresolución desarrollada, presentada hacia fines de la década del 1990 por el grupo de Stephan Hell ¹⁴⁸. Esta técnica permite obtener imágenes de muestras biológicas con una resolución de ~60 nm ¹⁴⁹.

STED se basa en una modificación de la microscopía confocal, en la que además del láser de excitación, la muestra se ilumina con un haz de depleción en forma de anillo (fig. 3.7). Esta segunda fuente de luz estimula a los fluoróforos a volver a su estado basal inmediatamente, sin emitir luz ¹⁴⁸. Como resultado, la fluorescencia remanente proviene de una región menor que el foco limitado por difracción ¹⁴⁸. Es decir, el tamaño de la PSF (*point spread function*, i.e. el volumen de observación) efectivamente disminuye ¹⁴⁹. La resolución obtenida puede calcularse según ¹⁵⁰:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA} \frac{1}{\sqrt{1 + \sigma}} \quad (3.2)$$

donde Δx es la resolución, NA es la apertura numérica del objetivo, λ es la longitud de onda de excitación y σ es el factor de saturación, que expresa la relación entre la máxima intensidad aplicada y la intensidad de saturación.

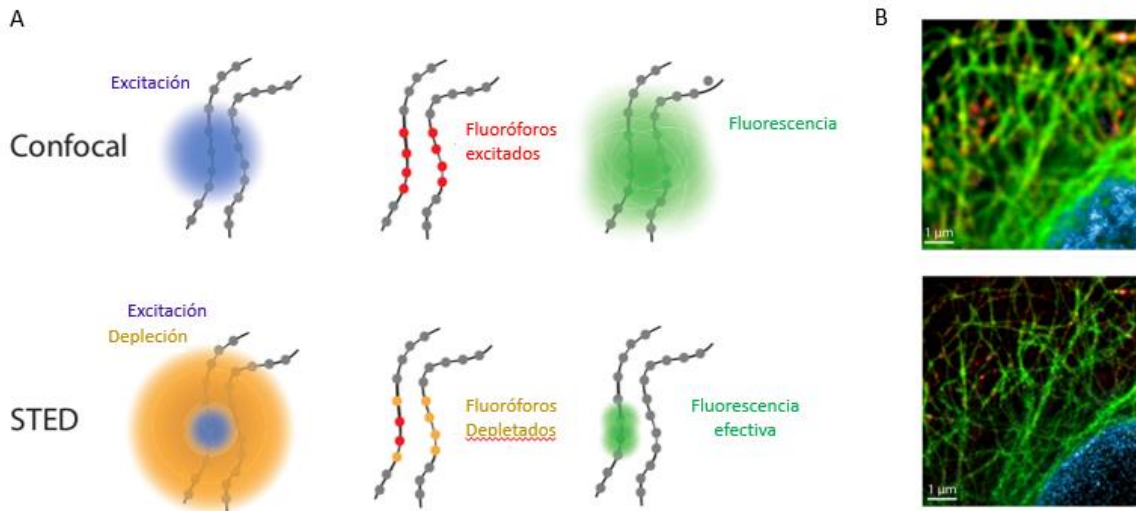


Figura 3.7. Microscopía STED. A) Esquema que compara resolución espacial de la microscopía confocal y STED. Dos estructuras filamentosas (líneas negras) son marcadas con fluoróforos (puntos grises). En microscopía confocal, la mayoría de los fluoróforos en la región focal son excitados (puntos rojos) y son capaces de emitir, derivando en una gran región fluorescente en la imagen. Cuando se utiliza STED, el haz con forma de anillo se superpone con el láser de excitación, provocando la depleción de la mayoría de los fluoróforos excitados en la región superpuesta (puntos amarillos) y dejando que solo emitan los fluoróforos del centro (puntos verdes). Adaptado de ¹⁵⁰. B) Comparación de imágenes de una misma región celular obtenidas mediante microscopía confocal y STED. Adaptado de ¹⁵¹

Una de las desventajas de esta microscopía es que la depleción de la mayoría de las sondas fluorescentes requiere de un haz de muy alta potencia que genera fotoblanqueo severo, limitando la duración de los experimentos, y fototoxicidad en muestras biológicas, lo que limita su aplicación ¹⁴⁹.

La microscopía MoNaLISA (acrónimo de *Molecular Nanoscale Live Imaging with Sectioning Ability*) es un desarrollo novedoso del grupo de Illaria Testa (*KTH Royal Institute, Suecia*) que logra resoluciones de 45 – 65 nm aplicando bajas intensidades de luz ¹⁴⁵. Además, la adquisición de imágenes es más rápida que en sistemas confocales o STED, por lo que se minimiza la exposición de la muestra a altas intensidades de luz, lo que resulta una ventaja para observar especímenes vivos.

Cualitativamente, en esta técnica (fig. 3.8) las rsFPs se iluminan con tres fuentes de luz: encendido, excitación y apagado ¹⁴⁵. Tanto el encendido como la excitación de los fluoróforos se logra mediante un arreglo espacial de N focos separados por una distancia definida. El patrón de apagado de las rsFPs se realiza mediante ondas con una periodicidad P_{sw} , tal como se esquematiza en la figura 3.8B. Al alinear los mínimos de estas ondas con los máximos de los N focos, los puntos de emisión son confinados a un volumen menor, permitiendo mejorar la resolución ¹⁴⁵, de manera similar a lo descrito para STED.

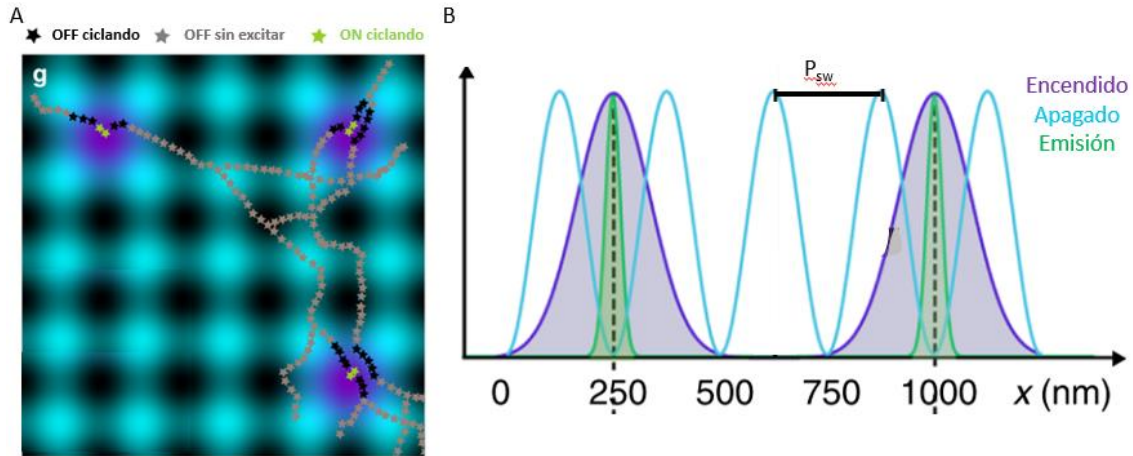


Figura 3.8. Esquema conceptual del funcionamiento de MoNaLISA. A) La muestra consiste en filamentos decorados por rsFPs (puntos) los cuales se muestran superpuestos con el arreglo espacial de los focos de encendido (violeta) y apagado (cian). Las rsFPs se hallan en distintos estados: OFF ciclando (negro) indica que el fluoróforo fue apagado; OFF sin excitar indica que ese fluoróforo no emite y no ha sido excitado (gris); ON ciclando indica que ese fluoróforo ha sido excitado y su emisión es colectada (verde). B) Perfiles, a lo largo de uno de los ejes de la imagen, del arreglo espacial para el apagado (cian) y encendido (violeta) de los fluoróforos. En verde, se muestra el confinamiento de la emisión de fluorescencia. Adaptado de ¹⁴⁵.

Una de las ventajas de esta metodología es que las rsFPs permanecen la mayor parte del tiempo en un estado OFF, ya que sólo pocas de ellas son expuestas a la intensidad máxima de los patrones de encendido y apagado en un mismo ciclo, minimizando el fotoblanqueo ¹⁴⁵. Además, el sistema MoNaLISA cuenta con un *pinhole* digital que rechaza la emisión fuera de foco y aumenta la capacidad de seccionamiento del sistema, lo que permite realizar reconstrucciones tridimensionales de una muestra de hasta 15 μm de espesor ¹⁴⁵.

Estas características permiten observar estructuras subcelulares en condiciones fisiológicamente relevantes. Cabe mencionar que los experimentos descritos en el capítulo 8 de esta tesis fueron realizados en colaboración con el equipo de la Dra. Testa, cuyos integrantes tomaron las imágenes analizadas utilizando esta microscopía.

3.4 Localización y análisis de trayectorias de partículas con precisión nanométrica

El uso de microscopías de fluorescencia para estudiar células permitió observar que la distribución de componentes celulares (de proteínas a organelas) no era homogénea en espacio y tiempo. Entender las reglas que gobiernan estas distribuciones se ha vuelto una prioridad, lo que impulsó el desarrollo de técnicas de microscopía para medir el movimiento de partículas y moléculas in vivo ¹⁵².

Existen numerosos algoritmos para la localización y seguimiento con precisión nanométrica de partículas individuales con geometría esférica ^{24,153}.

Uno de los primeros métodos desarrollados a principios de los 2000 para localizar moléculas únicas en dos dimensiones fue FIONA (*Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy*) ¹⁵⁴. El método requiere muestras muy diluidas de moléculas fluorescentes y hace uso de cámaras muy sensibles que permitan detectar la fluorescencia de moléculas únicas. Posteriormente, se determinan las posiciones de las moléculas con precisión nanométrica ajustando una función gaussiana en dos dimensiones a la imagen de cada una de las moléculas. La posición de la molécula corresponde al centro de la distribución ¹⁵⁵. La figura 3.9 ilustra este procedimiento.

En el microscopio, es posible adquirir una serie de imágenes en función del tiempo y recuperar, en cada uno de los cuadros, las posiciones de las moléculas/partículas, obteniendo así sus trayectorias. Mediante FIONA se ha logrado determinar el tamaño del paso del motor kinesina V y su mecanismo de avance con una precisión de 1.5 nm en experimentos in vitro ¹⁵⁴ y los pasos de 8 nm de los motores dineína y kinesina en células vivas ¹⁵⁶.

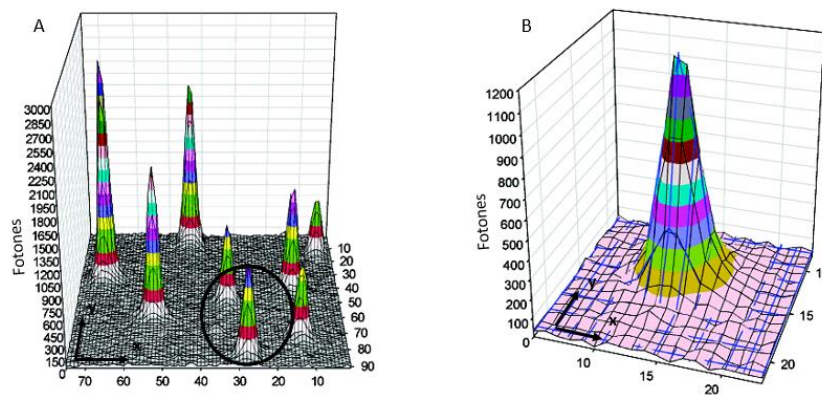


Figura 3.9. Determinación de la posición de moléculas únicas fluorescentes mediante FIONA. A) Imagen obtenida en el plano focal de moléculas fluorescentes individuales (picos de baja intensidad relativa). Los picos de mayor intensidad corresponden a regiones en las que 2 o más fluoróforos se encuentran muy cerca espacialmente y no pueden ser resueltos B) Detalle del pico destacado en A). Adaptado de ¹⁵⁵.

A partir de la trayectoria de una partícula, es posible determinar la dinámica de su movimiento, dado que las trayectorias son firmas de los mecanismos responsables de su movilidad ¹⁵².

Comúnmente, la primera aproximación para el análisis de trayectorias es calcular el desplazamiento cuadrático medio (*Mean Squared Displacement*, MSD) que, para una partícula moviéndose en tres dimensiones, es ¹⁵²:

$$MSD(\tau) = \langle (x(t + \tau) - x(t))^2 + (y(t + \tau) - y(t))^2 + (z(t + \tau) - z(t))^2 \rangle \quad (3.3)$$

donde x, y, z son las coordenadas espaciales; t y τ corresponden al tiempo absoluto y tiempo de retardo, respectivamente y los $\langle \rangle$ representan el promedio sobre el tiempo absoluto.

El MSD indica la distancia cuadrática media recorrida por una partícula luego de un determinado tiempo τ . La dependencia entre esta distancia y τ está relacionada con las propiedades del movimiento de la partícula ¹⁵².

En un sistema en equilibrio, la agitación térmica provoca que las moléculas/partículas se muevan de manera continua y aleatoria, lo que se conoce como movimiento Browniano ¹⁵⁷. Este movimiento es la base de la difusión, que, aunque no es direccional, puede ser un mecanismo de transporte eficiente en células, particularmente para moléculas pequeñas y/o distancias cortas ¹⁵⁸.

Se puede demostrar que un comportamiento difusivo se caracteriza por una relación lineal entre el MSD y el tiempo de retardo ¹⁵⁷:

$$MSD(\tau) = 2nD\tau \quad (3.4)$$

donde D es el coeficiente de difusión, cuyas unidades son área/tiempo y n corresponde a la dimensión del espacio en el que está contenida la trayectoria.

Dado que el citoplasma es un fluido viscoso y con obstáculos, las partículas no pueden difundir libremente. En este medio, los movimientos de las partículas muestran comportamientos complejos, en los que la difusión suele estar acoplada a otros tipos de movimientos. Esto es consecuencia de la existencia de fuerzas, como las originadas por transporte activo, interacciones entre moléculas y presencia de obstáculos ¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

Diversos estudios realizados en células han mostrado que el movimiento de macromoléculas y organelas suele ser anómalo ^{159,160,162,163}. Esto implica que el cambio del MSD con el tiempo ya no es lineal, sino que puede caracterizarse por una ley de potencia ¹⁵⁹:

$$MSD(\tau) = A\tau^\alpha \quad (3.5)$$

donde A es el coeficiente de difusión generalizado y α es el exponente de difusión anómala.

El valor de α permite caracterizar el tipo de movimiento. En particular, el valor $\alpha = 1$ corresponde a una trayectoria al azar (régimen difusivo) mientras que $\alpha = 2$ describe un movimiento procesivo en una dirección. En estos casos, el factor preexponencial A representa el coeficiente de difusión o la velocidad al cuadrado, respectivamente ¹⁶⁴.

Los valores de α comprendidos en el intervalo $0 < \alpha < 1$ representan un régimen subdifusivo en el cual las partículas difunden pasivamente en un ambiente con obstáculos o trampas (i.e. sitios de interacción) que retrasan su movimiento respecto a lo esperado para difusión al azar ^{165,166} y finalmente, $1 < \alpha < 2$ indica la presencia de fuerza activas intermitentes operando sobre las partículas, por lo que se observan períodos de movimiento procesivo intercalados con pausas y cambios en la dirección de movimiento (comportamiento superdifusivo) ^{167,168}.

En la figura 3.10 se muestra esquemáticamente la dependencia del MSD con τ para cada uno de estos mecanismos de movimiento. Se observa que para un movimiento difusivo esta relación es lineal, mientras que para una partícula sometida a fuerzas activas direccionales o restrictivas (movimientos superdifusivo, subdifusivos y confinados) la relación entre MSD y τ se aparta de la linealidad.

Las partículas que difunden en el citoplasma generalmente presentan un comportamiento subdifusivo debido a los obstáculos en el entorno y las interacciones con componentes del citoplasma que las ralentizan ¹⁵². Aquellos componentes trasladados activamente presentan generalmente un comportamiento superdifusivo. Esto ocurre, por ejemplo, con el transporte de organelas mediante motores moleculares ^{64,158}.

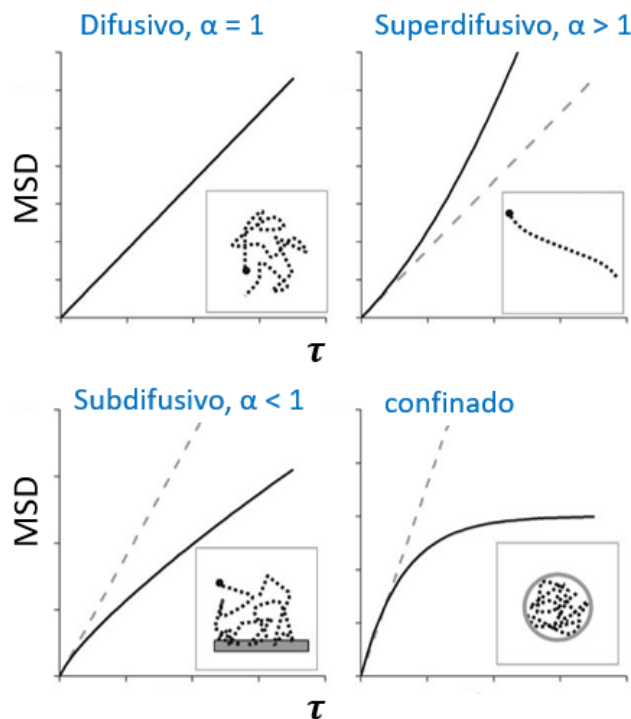


Figura 3.10. Esquemas de las correspondientes dependencias del MSD con τ para una partícula. Cada panel ilustra un tipo de movimiento diferente y los valores de α (ec. 3.5) que lo caracterizan. La línea punteada indica un movimiento netamente difusivo. Adaptado de ¹⁶⁹.

En otras situaciones, el MSD en función de τ alcanza un *plateau*, tal como muestra la figura 3.10, lo que se conoce como difusión confinada. En muchos casos, la movilidad de la partícula se puede aproximar con un modelo que considera un *corral* dentro del cual la partícula se encuentra encerrada¹⁶⁴.

$$MSD_L(\tau) = rc^2 \left(1 - A_1 \cdot e^{-\frac{\tau}{t_c}} \right) \quad (3.6)$$

donde rc es el radio del corral, A_1 es una constante determinada por la geometría de este corral, τ es el tiempo de retardo y t_c es un tiempo característico asociado a la exploración del corral.

Este modelo considera que el movimiento confinado de la partícula en 2D es descrito por movimientos difusivos independientes en cada una de las coordenadas espaciales ¹⁷⁰.

La difusión confinada es el movimiento característico de aquellas partículas que se encuentran en regiones delimitadas, de las cuáles no pueden escapar durante el tiempo de observación ¹⁷¹. Es decir, la partícula difunde únicamente dentro del área a la cual tiene acceso ¹⁷². Ejemplos de estas situaciones son proteínas que forman parte de dominios de membrana asociados al citoesqueleto ¹⁷¹; receptores de membrana ¹⁷³ y proteínas que difunden dentro del núcleo celular ¹⁷⁴.

3.5 Localización de filamentos del citoesqueleto

Para poder estudiar las propiedades de los polímeros del citoesqueleto, es necesario extraer información cuantitativa respecto a su posición, deformación y movimiento a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia.

Un factor que puede limitar la localización de partículas a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia es la relación señal/ruido o S/N (*Signal to Noise ratio*). Formalmente se define como:

$$S/N = \frac{\langle I_s \rangle - \langle I_b \rangle}{\sigma_{ruido}} \quad (3.7)$$

Donde $\langle I_s \rangle$ e $\langle I_b \rangle$ son los valores promedio de la señal de interés y del fondo, mientras que σ_{ruido} es el desvío estándar de la señal de fondo.

A diferencia de las partículas “puntuales” o con formas estacionarias, recuperar la trayectoria de un filamento que se encuentra continuamente cambiando su forma y posición es más complejo. Además, la relación S/N dentro de las células suele ser baja, por lo que recuperar estas posiciones implica un desafío. Para afrontar estas dificultades, varios autores han propuesto distintos métodos para recuperar las posiciones de filamentos fluorescentes, los cuales se compilan en la tabla 3.2.

Autores y ref.	Filamentos analizados	fundamento
Gittes et al. ¹¹⁰	In vitro y aislados	Selección manual de puntos sobre la imagen e interpolación
Käs et al. ¹⁷⁵	In vitro y aislados	Análisis de perfiles
Janson et al. ¹⁷⁶	In vitro, aislados y horizontales	Análisis de perfiles
Brangwynne et al. ¹⁷⁷	In vitro, aislados ó in vivo y estáticos	Segmentación y esqueletización de la imagen y análisis de perfiles
Runhow et al. ¹⁷⁸	In vitro	Segmentación y esqueletización de la imagen. Reconoce intersecciones entre filamentos.
Valdman et al. ¹⁷⁹	In vitro y aislados	Ajuste del contorno completo.

Tabla 3.2. Técnicas para la localización de filamentos del citoesqueleto.

En términos generales, estos métodos tienen un primer paso, en el que la imagen inicial es binarizada mediante la aplicación de un umbral de intensidad. Luego, a esta imagen binaria se la trata con algoritmos que erosionan pixeles pero mantienen la conectividad de los puntos para lograr una curva de un píxel de ancho, en un proceso conocido como esqueletización. Se ajusta esta curva con un polinomio para obtener coordenadas (x, y) iniciales. Estas posiciones se aplican sobre la imagen de fluorescencia original y se extraen perfiles de intensidad perpendiculares al polinomio en cada posición x . Posteriormente, se aplica una deconvolución a los perfiles, de manera tal que el máximo de los perfiles convolucionados corresponde a la coordenada y del centro del filamento.

La figura 3.11 esquematiza, a modo de ejemplo, el funcionamiento del método desarrollado por Brangwynne y colaboradores, citado en la tabla 3.2 y utilizado para el estudio de las curvaturas de microtúbulos mencionado en el capítulo anterior

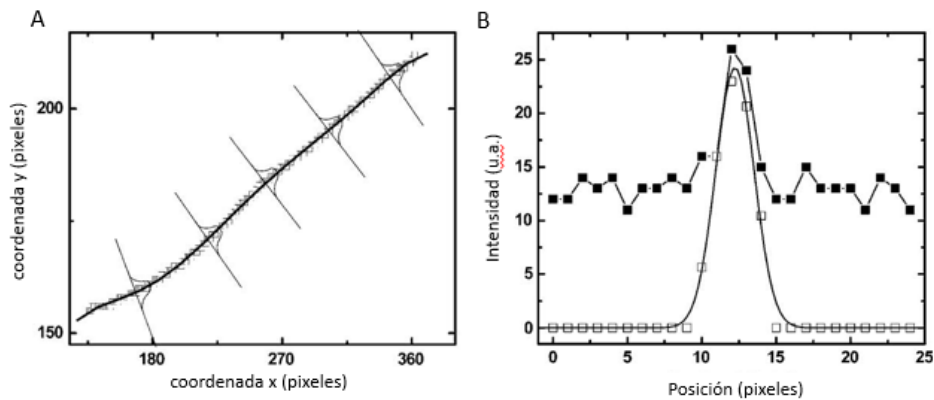


Figura 3.11: Obtención de posiciones de un filamento. A) Esqueleto de un filamento ajustado a una función polinómica (línea negra). Se muestran esquemáticamente algunos perfiles de intensidad perpendiculares al ajuste. B) Perfil de intensidad extraído de la imagen de fluorescencia sin procesar (cuadrados negros) y de la imagen filtrada para reducir el ruido (cuadrados blancos). El perfil de la imagen filtrada es ajustado a una función gaussiana (línea negra). Adaptado de 177

Estos métodos presentan una buena performance en situaciones en las que la relación S/N es alta, el fondo de la imagen es homogéneo y requieren que no haya intersecciones entre filamentos. Por ello, se los suele utilizar en condiciones in vitro y no son de elección al estudiar filamentos en células vivas.

A continuación, describiremos la herramienta cuyo desarrollo nos permitió sobrepasar estas limitaciones.

3.6 AFTER: una rutina para recuperar coordenadas de filamentos individuales en células vivas

AFTER (*Automated Filament Tracking & Evaluation Routine*) es un algoritmo escrito e implementado en Matlab que recupera, con precisión nanométrica, las coordenadas espaciales de filamentos a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia ¹²¹. Este método, desarrollado por nuestro grupo, fue diseñado inicialmente con el objeto de optimizar la detección de microtúbulos en células vivas ¹²¹ y será una herramienta fundamental para esta tesis.

El primer paso de la rutina es indicar, sobre la imagen inicial de la película, suficientes puntos del segmento del filamento a analizar que delineen aproximadamente su forma (fig. 3.12). Una vez indicados estos puntos iniciales, el programa aplica una rotación a la imagen, de forma tal que cada nueva coordenada x_k del filamento esté unívocamente asociada a una única coordenada y_k . Luego, estas coordenadas (x_k, y_k) son interpoladas usando un polinomio de tercer grado para aproximar las coordenadas y_k de cada posición x_k (con $1 < k \leq m$, donde m es la cantidad de pixeles del segmento del filamento). Esta interpolación sirve para obtener las posiciones del filamento en la primera imagen de la secuencia. Finalmente, para cada x_k , el algoritmo localiza las coordenadas y_k con precisión nanométrica aplicando una red generalizada de regresión neuronal para encontrar el máximo de la distribución de intensidad ^{180,181}. En el siguiente ciclo, el algoritmo repite este procedimiento empleando como posiciones iniciales aquellas coordenadas del filamento determinadas en la imagen anterior.

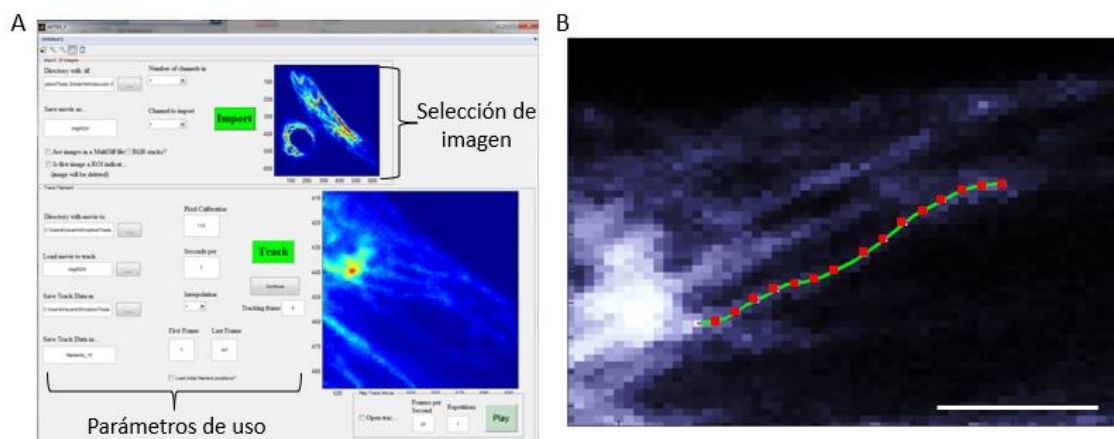


Figura 3.12. Implementación de la rutina AFTER. A) Interfaz de usuario de AFTER. En el panel superior se selecciona la imagen a ser analizada. El panel inferior dispone las opciones para nombrar y guardar la información de los filamentos recuperados y permite ampliar la imagen para definir la forma del filamento de interés (cuadrados rojos). B) Resultado del procesamiento del AFTER (línea verde) superpuesto con las coordenadas iniciales ingresadas manualmente. Barra de escala = 2 μ m.

Dado que AFTER se basa en el reconocimiento del máximo de intensidad de un perfil, su performance (como la de los métodos mencionados anteriormente) también se ve afectada por la relación S/N de las imágenes. La figura 3.13 muestra que AFTER supera estos métodos, típicamente basados en deconvolución gaussiana de perfiles de intensidad, proporcionando coordenadas con menor error ¹²¹.

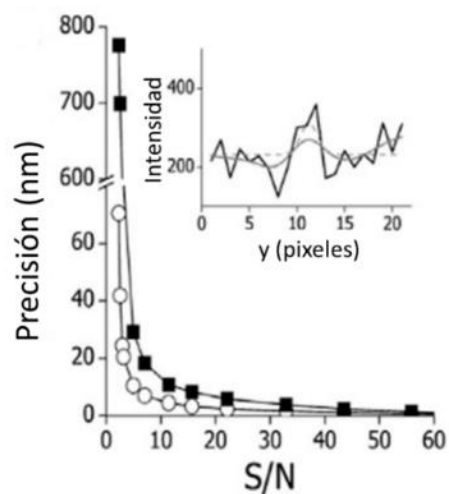


Figura 3.13. Precisión para la localización de filamentos utilizando la rutina AFTER respecto a la relación S/N. Comparación en la precisión de localización obtenida al utilizar AFTER (círculos vacíos) y un algoritmo basado en deconvolución Gaussiana (cuadrados negros). Las mediciones fueron hechas sobre 20 imágenes confocales simuladas de un filamento fluorescente individual. El inserto muestra un perfil de intensidad representativo perpendicular a un microtúbulo (línea negra) ajustado por la rutina basada en una red neuronal (línea continua gris) o una función gaussiana (línea punteada). Adaptado de (Pallavicini et al., 2014b).

Tal como mostraremos en el capítulo 5, la recuperación de las coordenadas de IFs individuales representa un desafío, debido a la organización y las formas que adquieren estos filamentos en el citoplasma.

Capítulo 4 - Hipótesis de trabajo y objetivos

4.1 Motivaciones

El citoesqueleto es una red compleja y dinámica, formada por biopolímeros interconectados que están involucrados en la determinación de la morfología celular y en la generación y transmisión de fuerzas, entre otras funciones ¹. A diferencia de los microtúbulos y los filamentos de actina, las propiedades mecánicas in vivo de los filamentos intermedios (IFs) han sido poco exploradas, a pesar de estar íntimamente implicados en diferentes procesos de relevancia biológica.

Trabajos recientes han demostrado que fuerzas físicas, tanto internas como externas, pueden actuar a través del citoesqueleto para modificar localmente las propiedades mecánicas y el comportamiento celular ^{2,101,182}. Por este motivo, es muy importante entender cómo las redes que conforman el citoesqueleto son capaces de generar, transmitir y responder a las señales mecánicas y de ese modo afectar la forma, función y destino celular.

4.2 Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo es que el estudio de la dinámica y organización de los filamentos intermedios de vimentina en células vivas proveerá información valiosa para comprender la respuesta mecánica de esta red de filamentos y su función fisiológica.

4.3 Objetivos

Para poner a prueba esta hipótesis, planteamos los siguientes objetivos.

1. Caracterizar la organización de la red de filamentos intermedios en células y las propiedades mecánicas relevantes a la función celular.
2. Explorar la comunicación mecánica entre los IFs y las redes del citoesqueleto.
3. Estudiar si los filamentos de vimentina presentan distintas propiedades mecánicas y de movimiento en distintas regiones celulares.

Queremos mencionar que el desarrollo de esta tesis se vio atravesado por la pandemia de Covid-19. Por este motivo, debimos interrumpir el trabajo experimental durante los periodos de aislamiento y distanciamiento social y redirigir nuestros esfuerzos en otras direcciones que las planeadas originalmente. En este sentido, nos enfocamos en la colaboración con el equipo de la Dra. Ilaria Testa, quienes pudieron proveernos resultados experimentales de interés para nuestra área de estudio, aún en períodos de aislamiento en Argentina.

Capítulo 5 - Métodos experimentales y de análisis

5.1 Líneas celulares y cultivos

Las células BHK fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂ con medio DMEM de alta glucosa (Gibco) enriquecido con bicarbonato de sodio, suplementando con 10% suero fetal bovino (Internegocios S.A.) y 1% penicilina/streptomycin (Gibco).

Para los experimentos de microscopía, las células BHK fueron depositadas sobre cubreobjetos circulares de 25 mm de diámetro, previamente esterilizados por irradiación de luz UV, dentro de placas de Petri de 35 mm de diámetro conteniendo 1.5 mL de medio completo.

Trabajamos en colaboración con el grupo de la Dra. Ilaria Testa (KTH Royal Institute, Suecia), en cuyo laboratorio se cultivaron y trataron distintas líneas celulares. Los fibroblastos BJ expresan vimentina de manera endógena y fueron transformados para generar tumores y metástasis en condiciones experimentales (Hahn et al. 1999). Las células U2OS han sido modificadas para expresar vimentina-rsEGFP2 de forma endógena ¹⁸³.

5.1.1 Transfecciones

Las células BHK se transfectaron 24hs después de haber sido sembradas, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y medio DMEM sin suero siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron tres plásmidos diferentes según el objetivo: a) GFP-vimentina que contiene la secuencia completa de este filamento intermedio fusionada a GFP, cuyo producto se ensambla con la proteína endógena y nos permite observar la red de vimentina en células. Este plásmido fue cedido gentilmente por el Dr. Vladimir Gelfand, de University of Northwestern, EEUU ⁶⁴, b) α -tubulina-GFP, que expresa la proteína completa fusionada a GFP y se ensambla con las tubulinas endógenas y nos permiten observar los microtúbulos y c) EMTB-GFPx3, una construcción que expresa el dominio de unión al microtúbulo de la proteína *ensconsin* (también conocida como MAP 7) fusionado a 3 dominios GFP en tándem. Este plásmido ha sido cedido gentilmente por la Dra. Arpita Upadhyaya de University of Maryland, EEUU ¹⁸⁴.

Los fibroblastos BJ fueron transfectados transientemente con lipofectamine LTX Reagent con PLUS reagent (Thermo Fisher Scientific, 15338100) con un plásmido que codifica EGFP-vimentina ¹⁸³.

5.2 Depolimerización de microtúbulos

Para depolimerizar los microtúbulos, se incubaron células BHK con 10 μ M nocodazole durante 30 min a 0°C en el mismo medio de cultivo ¹⁸⁵. El nocodazole es un compuesto que se asocia a varios sitios de las β -tubulinas, interfiere en la dinámica de los microtúbulos y provoca su

despolimerización ¹⁸⁶. Las células fueron observadas durante los 30 minutos siguientes en el microscopio.

5.3 Depolimerización de la red de actina

La depolimerización total del citoesqueleto de actina se logró incubando las células con 1.5 μM latrunculina B (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Para la depolimerización parcial de la red de actina, se incubaron con 0.15 μM de latrunculina B durante 30 minutos. En ambos casos, la incubación se realizó en medio DMEM sin suero.

La latrunculina B es una toxina naturalmente producida por esponjas marinas que se une a los monómeros de actina en el sitio de polimerización y con estequiometría 1:1. Esto previene la síntesis de los filamentos de actina y, además, en células vivas, provoca la disrupción de los filamentos ya existentes ¹⁸⁷.

Estas células fueron posteriormente observadas en el microscopio durante 30 minutos.

5.4 Inhibición de la dinámica de polimerización y depolimerización de microtúbulos

Para inhibir la dinámica de los microtúbulos, las células BHK fueron incubadas durante 10 minutos con vinblastina 30 nM en el mismo medio de cultivo. Luego, las células fueron observadas al microscopio durante los 30 minutos siguientes.

La vinblastina es un compuesto que a concentraciones < 100 nM estabiliza a los microtúbulos, inhibiendo su polimerización y depolimerización. Mayores concentraciones de esta droga pueden ocasionar fractura y depolimerización de los microtúbulos ¹⁸⁸.

5.5 Fijación de células y marcaciones fluorescentes

Las células BHK fueron fijadas 24 hs post transfección. Para ello, se incubaron en una solución de 3.7% paraformaldehído en PBS durante 20 min. Luego, se permeabilizaron con una solución 0.1 % de triton-X-100 en PBS. Posteriormente se preincubaron con una solución 1% BSA en PBS durante 30 minutos y finalmente, se incubaron con una solución con Texas Red-X-phalloidin (Invitrogen, T7471). En todos los casos, los preparados fueron montados con mowiol (Sigma, EEUU).

Las células BJ transformadas que expresaban EGFP-vimentina fueron fijadas con el mismo protocolo que las BHK. Luego se marcó la red de vimentina con un anticuerpo de conejo anti-GFP (Abcam, Cambridge, EEUU) y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 (Abcam, Cambridge, EEUU).

5.6 Microscopías de fluorescencia

Tal como mencionamos anteriormente, durante el desarrollo del trabajo de esta tesis colaboramos con el grupo de la Dra. Ilaria Testa (*KTH Royal Institute* de Suecia), quienes tomaron las imágenes de microscopía de superresolución de la red de vimentina mostradas en los capítulos de resultados.

5.6.1 Microscopía confocal

Las imágenes confocales fueron adquiridas en un microscopio confocal FV 1000 (Olympus). Las proteínas fusionadas a sondas GFP fueron observadas usando un láser multilínea de argón a 488 nm como fuente de excitación (0.3 – 1.5 μ W sobre la muestra). La luz del láser fue reflejada en un espejo dicróico y enfocada sobre la muestra a través de un objetivo de inmersión de aceite 60x con 1.35 de apertura numérica (Olympus). La fluorescencia emitida por la muestra fue colectada por el mismo objetivo, transmitida a través de un *pinhole* seleccionada en el rango 500-600 nm con una red de difracción. El citoesqueleto de actina de las células BHK fue observado usando como fuente de excitación un láser diodo de 543 nm (1 μ W sobre la muestra). La fluorescencia fue colectada en el rango 555 - 655 nm. Los fotones fueron detectados con fotomultiplicadores configurados en el modo de detección *photon counting*. El tamaño de píxel de las imágenes fue definido en el rango 65 – 110 nm.

Para observar la red de vimentina en el tiempo, se adquirieron imágenes confocales de células BHK con una resolución temporal de 0.3 cuadros/s durante aproximadamente 2 min.

5.6.2 Microscopías de superresolución

Las imágenes de fibroblastos BJ fueron adquiridas mediante microscopía STED por la Dra. Giovanna Coceano del laboratorio de la Dra. Testa. Para ello, se utilizó un microscopio Leica TCS SP8 3X STED equipado con un objetivo STED blanco 100x/1.4. Estas imágenes fueron registradas al excitar la proteína fusión vimentina-Alexa 488 con un láser de excitación de 488 nm y otro para la depleción STED de 592 nm. El tamaño de los píxeles de las imágenes fue 20 nm¹⁸⁹.

Las imágenes de células U2OS fueron tomadas mediante microscopía MoNaLISA por la Dra. Francesca Pennacchietti del laboratorio de la Dra. Testa.

Por un lado, para registrar la posición del núcleo, se adquirió una única imagen de Sir-Hoechst¹⁹⁰ en modo confocal (canal rojo) en el mismo plano en el que se registra la fluorescencia de vimentina-rsEGFP2 y en un plano 1.5 μ m encima de éste. Esto permitió registrar de manera más nítida la forma de los núcleos. El tiempo de adquisición de cuadros en este canal fue 4.9 s. Posteriormente, se adquirieron imágenes MoNaLISA de vimentina-rsEGFP2 (canal verde) en función del tiempo. En todos los casos, el tiempo de adquisición de cada cuadro fue 1.94 s. En los casos indicados, se utilizó además un tiempo de retardo entre cuadros de 30 s.

5.7 Cálculo de la relación S/N de imágenes de microscopía

Para calcular la relación señal ruido S/N (*signal to noise*) de las imágenes de microscopía confocal, se tomaron perfiles de intensidad de fluorescencia de diferentes filamentos a partir de imágenes representativas de células BHK expresando GFP-vimentina. A cada perfil se lo ajustó con una función gaussiana definida por:

$$y = Ae^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-m}{s}\right)^2} + b \quad (5.1)$$

donde A es la amplitud de la curva; m es la posición del pico; s es el desvío de los datos que define el ancho de la curva y b es la línea de base.

Finalmente, se calculó cada cociente como:

$$S/N = \frac{A}{std(res)} \quad (5.2)$$

donde A es la amplitud del ajuste gaussiano y res es la dispersión de los residuos del ajuste.

Estos ajustes fueron hechos con una rutina escrita particularmente en R ¹⁹¹.

5.8 Simulaciones numéricas

Para poner a prueba aspectos teóricos que complementasen los resultados experimentales, implementamos distintas simulaciones numéricas.

5.8.1 Filamentos en equilibrio térmico

Para simular las formas de filamentos en equilibrio térmico, generamos amplitudes a_q a partir de una distribución normal, cuya varianza está dada por la ecuación 2.10 con los siguientes parámetros: longitud de persistencia de $3 \mu\text{m}$ y $1 < n < 100$ (vector de onda q). Las longitudes L de los filamentos fueron tomadas de una distribución uniforme en el rango $0.5 - 6 \mu\text{m}$. La cantidad de filamentos simulados fue de 250.

Para cada set de a_n , computamos $\theta(s)$ de la ecuación 2.7 usando pasos de 1 nm para s y recuperando las coordenadas x e y del filamento según ¹⁹²:

$$x(\theta(s)) = \int_0^s \cos(\theta(s')) ds' \quad (5.3)$$

$$y(\theta(s)) = \int_0^s \sin(\theta(s')) ds' \quad (5.4)$$

Luego, remuestreamos las formas de los filamentos usando un tamaño de píxel de 90 nm, similar al tamaño de píxel experimental. En determinados casos, agregamos ruido en la coordenada y de los filamentos a partir de una distribución normal con un desvío estándar de 20 nm.

5.8.2 Movimiento transversal de filamentos

Modelamos el movimiento transversal del centro de masa de un segmento de filamento en el citoplasma activo como una caminata aleatoria confinada en una dimensión. Los pasos en intervalos dt y de tamaño l están dados por $l = \sqrt{2Ddt}$, donde D es el coeficiente de difusión dentro del corral.

Con una probabilidad $p(\text{salto})$ se produce un paso de mayor tamaño (*patada*) en la dirección positiva o negativa.

Para cada conjunto de valores de los parámetros se simularon 100 trayectorias, de 600 segundos de duración con este modelo. Luego, las trayectorias fueron remuestreadas a una frecuencia de 1Hz en concordancia con los datos experimentales. En el capítulo 8 se detallarán los valores aplicados de estos parámetros.

5.9 Estimación del movimiento lateral de filamentos intermedios

La rutina AFTER recupera las coordenadas (x, y) de un filamento en una región delimitada del espacio, de forma tal que la distancia horizontal entre los extremos del segmento analizado permanece constante durante el análisis. Se analizaron segmentos de filamentos suficientemente cortos de forma tal que sus curvaturas no varíen excesivamente. De este modo la coordenada vertical del centro de masa (y_{CM}) corresponde aproximadamente al desplazamiento lateral de todo el segmento. Calculamos esta coordenada como:

$$y_{CM} = \sum_{k=1}^m \frac{y_k}{m} \quad (5.5)$$

donde y_k es la posición vertical de cada punto k del filamento y m la cantidad de puntos recuperados para cada filamento.

Luego, calculamos el desplazamiento lateral cuadrático medio de y_{CM} (MSD_L) según ¹²¹:

$$MSD_L = \langle (y_{CM}(t) - y_{CM}(t + \tau))^2 \rangle \quad (5.6)$$

donde t y τ son el tiempo absoluto y un tiempo de retardo, respectivamente, y $\langle \rangle$ representa el promedio temporal.

La figura 5.1 esquematiza el proceso de obtención del MSD_L a partir de las trayectorias del CM.

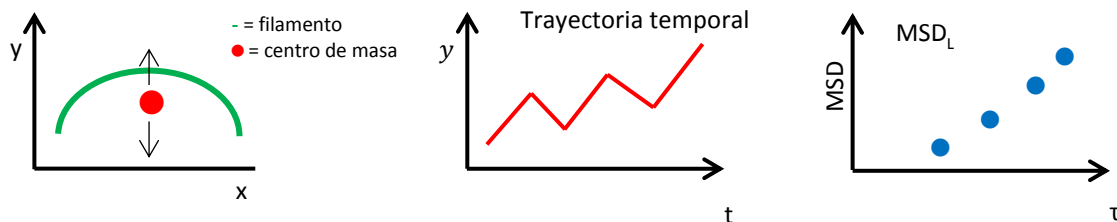


Figura 5.1. Cálculo del MSD_L a partir de las trayectorias del CM de filamentos de vimentina. Esquema representativo del cálculo del desplazamiento lateral cuadrático medio de un filamento. En el primer panel se muestra un filamento con su respectivo centro de masa. El único grado de libertad del CM es en el sentido vertical. El panel central muestra el cambio en la coordenada y del CM del filamento en función del tiempo. El panel de la derecha muestra el MSD_L calculado a partir de la trayectoria del CM.

5.10 Procesamiento y análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia

El procesamiento de imágenes (filtrado, asignación de colores a los canales, máscaras, etc.) se realizó utilizando diferentes herramientas de FIJI ¹⁹³. Posteriormente, se realizaron diferentes análisis sobre estas imágenes para obtener información cuantitativa.

5.10.1 Cálculo del área celular y área ocupada por las redes del citoesqueleto en el plano confocal

Observamos de manera simultánea las redes de actina y vimentina a partir de células BHK fijadas que expresaban GFP-vimentina y fueron marcadas con faloidina-Texas Red X (sección 5.5 de este capítulo).

Tal como mencionamos en el capítulo 1 (sección 1.3), la red de actina es especialmente densa cerca de la cara interna de la membrana plasmática ²⁸. Por ello, para cuantificar el área que cubre cada célula en el plano confocal, utilizamos la marcación de actina para identificar los bordes de la célula y definir su contorno.

En una primera etapa, binarizamos la imagen utilizando un umbral de intensidad de fluorescencia en cada imagen, de manera de eliminar aquellos elementos de la imagen que no corresponden a estructuras de la célula. Con esta segmentación obtuvimos la máscara. Para disminuir el ruido de las imágenes, eliminamos aquellas partículas con radio menor a 3 píxeles, usando un umbral de intensidad de 50. A continuación, rellenamos cada máscara de manera que no quedaran regiones vacías dentro de su perímetro. Finalmente, seleccionamos la región de interés en la máscara y medimos el área de dicha región. La siguiente figura esquematiza este procedimiento.

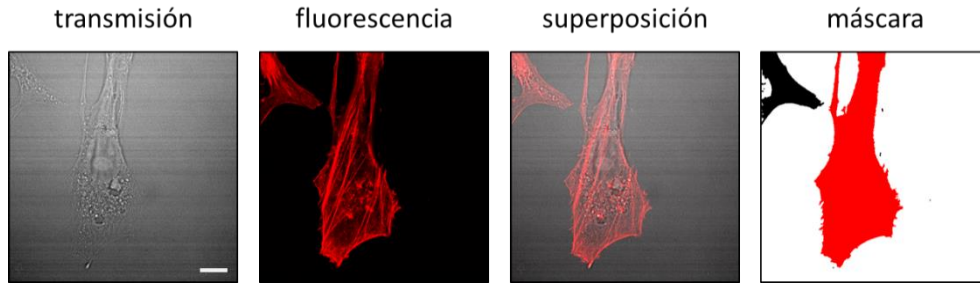


Figura 5.2. Determinación del área celular. Imagen de transmisión representativa de una célula BHK fijada. En la imagen de fluorescencia vemos su citoesqueleto de actina. Se destacan las fibras de estrés citoplasmáticas y la región cortical enriquecida en actina que permiten definir el contorno celular. La binarización de la imagen de fluorescencia nos permite obtener la máscara de la célula en estudio (en rojo) junto con fragmentos de otras células que no son considerados (en negro). Barra de escala = 10 μm .

Para calcular el área ocupada por la red de vimentina, procedimos de manera similar, utilizando las imágenes obtenidas en el canal que registró GFP-vimentina. Dado que la red de vimentina presenta baja intensidad en la zona cortical, los bordes de la célula resultan más difíciles de definir que en las imágenes de actina. Por ello aplicamos umbrales más bajos para segmentar las imágenes. Esto permite incluir en la máscara las regiones periféricas más tenues de la red (fig. 5.3). Finalmente, a partir de estas máscaras medimos el área ocupada por la red de vimentina.

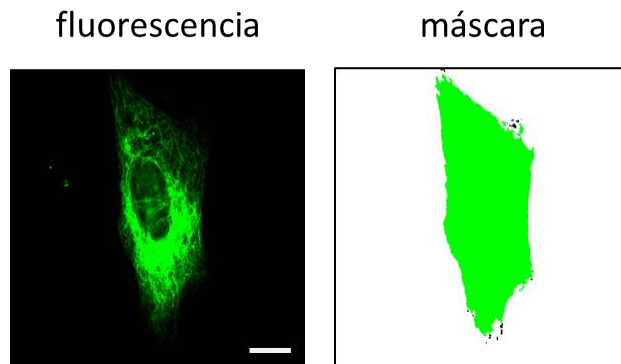


Figura 5.3. Determinación del área de la red de vimentina. Imagen confocal representativa de una célula BHK fijada que expresaba GFP-vimentina y su respectiva máscara binaria. Barra escala = 10 μm .

5.10.2 Determinación de los centros geométricos de las redes del citoesqueleto

Tal como mencionamos en la sección anterior, consideramos que el citoesqueleto de actina define el contorno de la célula. Por ello, a partir de la máscara de actina calculamos el centro geométrico de la célula ($CM_{\text{célula}}$).

Por otro lado, a partir de las imágenes de la red de vimentina, computamos el centro de masa de esta red (CM_{vim}) el cual considera la distribución heterogénea de los filamentos de vimentina, ponderando la intensidad de fluorescencia de cada píxel.

Como paso inicial, multiplicamos la máscara de actina por la imagen de vimentina y obtuvimos una imagen en la que sólo están presentes los píxeles que forman los filamentos de vimentina, mientras que los píxeles de fondo tienen valor 0 (fig. 5.4).



Figura 5.4. Tratamiento de las imágenes para el cálculo del CM_{vim} . A) imagen representativa de la red de vimentina de una célula BHK. La imagen ha sido saturada para mostrar píxeles verdes por fuera del contorno celular. B) Máscara de actina de esta célula. C) Imagen de la red de vimentina sin fondo. Barra de escala = 10 μ m.

Sobre esta imagen, calculamos las coordenadas del CM_{vim} según:

$$CM_x = \frac{1}{I_{tot}} \sum_{i=1}^N x_i \cdot I_i \quad (5.7)$$

$$CM_y = \frac{1}{I_{tot}} \sum_{i=1}^N y_i \cdot I_i \quad (5.8)$$

donde x, y son las coordenadas espaciales de cada píxel; I_i es la intensidad en cada píxel e I_{tot} es la suma de las intensidades de todos los píxeles de la red de vimentina. En el caso del $CM_{célula}$, $I = I_{tot} = 1$.

Finalmente computamos la diferencia entre los centros de ambas estructuras como:

$$\Delta CM = |CM_{cel} - CM_{vim}| \quad (5.9)$$

Los cálculos del centro de masa en cada imagen y los cómputos de ΔCM fueron realizados con una rutina especialmente escrita en Python.

5.11 Análisis estadísticos

Los resultados experimentales se expresan como media \pm error estándar de la media. Las diferencias significativas entre grupos fueron analizadas usando una prueba t de Welch de dos medidas ¹⁹⁴. Las

diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0.05$ y fueron marcadas con el símbolo *. Estas pruebas fueron realizadas con las herramientas del lenguaje R ¹⁹¹.

5.11.1 Diferencias significativas entre valores de lp^*

Para comparar valores de lp^* , analizamos los intervalos de error obtenidos al ajustar los datos de Fourier con la ecuación 2.10, utilizando Sigmaplot 14.0 (*Jandel Scientific, EEUU*). Si los intervalos no mostraban solapamiento, consideramos esas diferencias como significativas.

5.11.2 Cálculo del error de medianas

Para calcular los errores de las medianas en las distribuciones de los parámetros obtenidos a partir de los ajustes de MSD_L a los distintos modelos de movilidad, aplicamos la técnica *bootstrap* ¹⁹⁵. Para este procedimiento tomamos a partir de la población inicial 2000 muestras con reposición y de igual tamaño que la población original. De cada una de esas muestras calculamos la mediana. Finalmente, sobre el ensamble total de medianas muestrales, calculamos el desvío estándar, que constituye el error de la mediana poblacional. Este procedimiento fue realizado con una rutina específica escrita en Python.

5.11.3 Cálculo de p valor para diferencias de medianas

Para evaluar si las medianas de dos grupos diferentes son significativamente diferentes, realizamos una prueba de hipótesis. Los p-valores fueron calculados de la siguiente manera:

$$p - valor = 2 \left[1 - Norm \left(\frac{|mediana_1 - mediana_2|}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} \right) \right] \quad (5.10)$$

donde *Norm* es la distribución normal estándar y σ^2 es la varianza de cada grupo estimada a partir del error bootstrap ¹⁹⁶.

5.11.4 Comparaciones entre múltiples grupos

Para probar si diferentes grupos de datos caracterizados por su mediana se originan a partir de la misma distribución, utilizamos la prueba Kruskal Wallis ¹⁹⁷. La implementación de la prueba fue con el lenguaje Python.

5.11.5 Distribuciones de parámetros

Para representar las distribuciones de los parámetros obtenidos de ajustes por cuadrados mínimos, estimamos las funciones de densidad de probabilidad (*PDF*) de forma no paramétrica mediante la

estimación de núcleos de densidad (*kernel density estimation*)¹⁹⁵. Para ello, se desarrolló una rutina en Python que implementa núcleos gaussianos.

Capítulo 6 - Análisis de filamentos intermedios individuales en células a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia

Mencionamos en el capítulo 3 que las rutinas de análisis de filamentos individuales fueron originalmente desarrolladas para el estudio de microtúbulos. Sin embargo, como detallaremos más adelante, la organización de la red de filamentos intermedios es más compleja y, hasta la fecha, no hay rutinas particularmente diseñadas para el análisis de filamentos en estas condiciones. Por ello, como paso inicial en nuestro estudio, debimos optimizar la rutina AFTER para su implementación en estas condiciones.

En este capítulo describiremos las adaptaciones metodológicas desarrolladas para el análisis de las propiedades mecánicas de los filamentos intermedios en células.

6.1 Limitaciones de la rutina AFTER para la recuperación de filamentos intermedios

En los siguientes capítulos describiremos experimentos en los cuales se buscó comprender diversos aspectos de la red de filamentos intermedios en células vivas a partir de la localización de segmentos de dichos filamentos en el entorno celular.

En el capítulo 3 (secciones 3.5 y 3.6) mencionamos que la *performance* de las rutinas de localización de filamentos disminuye en aquellas regiones de las imágenes que muestran alto grado de entrecruzamiento de filamentos y no pueden identificarse con facilidad los filamentos individuales.

Por este motivo, buscamos segmentos de filamentos de vimentina en las regiones de la red tipo *malla* (ver fig. 1.15), donde los filamentos se encuentran más separados y pueden distinguirse individualmente, a diferencia de las zonas más densas o más fibrosas de la red, donde los filamentos forman *manojos*. La figura 6.1 muestra distintos segmentos de filamentos de vimentina recuperados de una imagen confocal típica de una célula BHK.

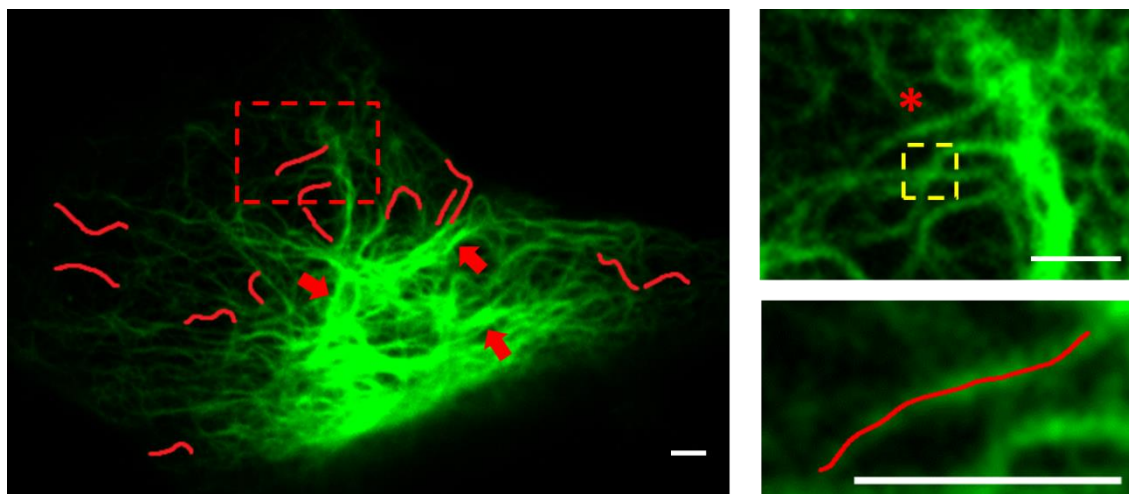


Figura 6.1. Obtención de coordenadas de filamentos de vimentina con AFTER. Imagen confocal de una célula BHK expresando GFP-vimentina mostrando diferentes filamentos recuperados (líneas rojas) en regiones tipo malla. Las flechas rojas muestran manojos de filamentos. La región encuadrada se muestra aumentada a la derecha, donde se detalla la recuperación de un filamento particular (*) y un cruce típico de filamentos (cuadrado amarillo). Barra de escala: 2 μm .

Por otro lado, el alto grado de entrecruzamiento entre los filamentos de la red, impone límites respecto a la longitud de los segmentos de filamentos que pueden identificarse como individuales. Dada su gran flexibilidad y las grandes curvaturas que estos filamentos adquieren en células, identificar la continuidad de un filamento luego de un cruce con otro es muy complejo y poco riguroso (fig. 6.1).

Por estos motivos, los segmentos de los filamentos seleccionados para los estudios son las regiones de filamentos que pueden identificarse como únicos, sin asociarse con otros vecinos. Por estas limitaciones, el número de filamentos que pueden recuperarse a partir de cada imagen de una célula es bajo (aproximadamente 15) y sus longitudes resultan muy variadas (0.5 - 6 μm).

6.2 Determinación de la longitud de persistencia a partir de ensambles de filamentos

En el capítulo 2 (sección 2.3), hemos descrito el método de Gittes para la obtención de la longitud de persistencia de filamentos. Tradicionalmente, se han utilizado regiones de filamentos de una misma longitud L ¹²¹ de forma tal de simplificar los cálculos (ec. 2.7 y 2.8).

Hemos mencionado en la sección anterior que la longitud el tamaño de los segmentos de filamentos de vimentina que pueden ser identificados como filamentos únicos es muy variable. Una primera opción para la aplicación directa del método de Gittes sería cortar los filamentos recuperados a un menor tamaño, de forma tal de obtener un ensamble de filamentos de igual longitud. Lamentablemente, con este procedimiento se obtendrían filamentos muy cortos haciendo

difícil la determinación de la l_p ; por otro lado, se estaría desaprovechando información valiosa al descartar regiones de filamentos. Por este motivo, modificamos el procedimiento de manera de poder contar con todos los filamentos recuperados de longitud variable para el análisis.

La figura 6.2 muestra esquemáticamente este nuevo procedimiento, aplicado al análisis de 250 filamentos simulados en equilibrio térmico, generados tal como se describe en el capítulo 5 (sección 5.8.1), mediante el algoritmo de Gittes basado en modos de Fourier y descrito en el capítulo 2 (sección 2.3).

Para estas simulaciones, consideramos un valor de l_p de $3 \mu\text{m}$, en el orden de la obtenida en determinaciones in vitro (ver tabla 2.1) y simulamos filamentos con longitudes en el rango $0.5 - 6 \mu\text{m}$, similar al rango de los segmentos de filamentos recuperados con AFTER.

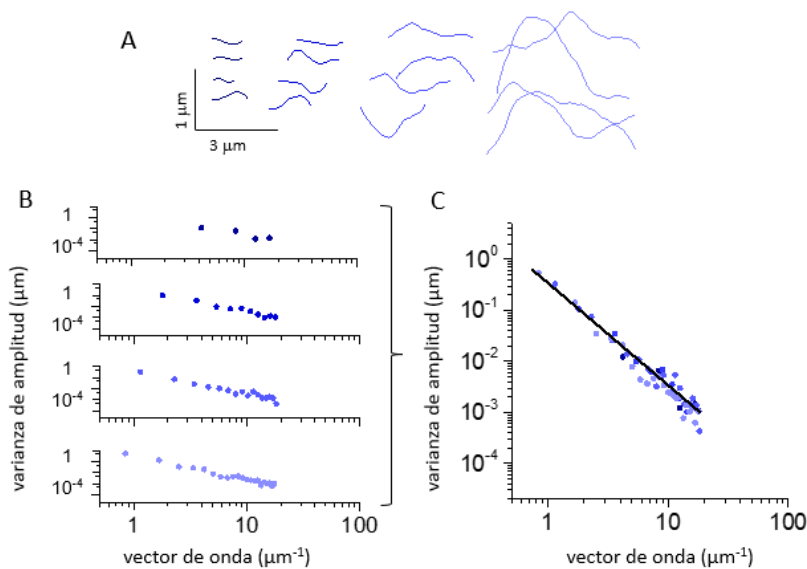


Figura 6.2. Determinación de la l_p para filamentos de distinta longitud. A) Ejemplos de filamentos simulados de $l_p = 3 \mu\text{m}$ divididos en grupos de acuerdo con sus longitudes (coloreados en diferentes tonos azules). B) Análisis de Gittes para cada grupo de filamentos. C) Ajuste global de la varianza de las amplitudes de los diferentes modos de Fourier con la ecuación 2.10 (—).

Brevemente, en este procedimiento los segmentos de filamentos son ordenados según longitudes crecientes en M grupos diferentes, cada uno de los cuales abarca un intervalo 500 nm . Aquellos grupos que poseían menos de 8 filamentos fueron descartados del análisis, pues la información obtenida con una estadística tan pobre no resulta suficientemente robusta.

Los grupos restantes fueron tratados como ensambles independientes de acuerdo con lo detallado en el capítulo 2 (sección 2.3), asignándoles una longitud equivalente al centro del intervalo. A partir de las coordenadas espaciales x e y de cada filamento se obtienen sus coordenadas curvilíneas θ y s . Sobre estas últimas coordenadas, se descomponen las curvaturas en modos de Fourier.

Por último, las amplitudes de los modos de Fourier de todos los ensambles son analizadas globalmente. Si las varianzas de las amplitudes de los modos de Fourier se comportan de forma lineal con una pendiente -2, se ajustan con la ecuación 2.10 y a partir de la ordenada al origen se obtiene el valor de la longitud de persistencia aparente l_p .

Las curvaturas de los filamentos simulados siguieron el comportamiento esperado según dicha ecuación y obtuvimos una l_p de $2.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$. Este valor no es significativamente diferente al valor simulado, lo que indica que este procedimiento de análisis permitiría recuperar la l_p de un ensamble de filamentos con precisión.

6.3 Determinación del error de localización de filamentos

La robustez de la información obtenida a partir de los experimentos que describiremos en las siguientes secciones depende en gran medida de la precisión con la que se localizan los filamentos individuales. En el capítulo 3 (sección 3.6) hemos descrito la rutina AFTER y mencionamos que esta rutina permite localizar microtúbulos en células vivas con 5 – 20 nm de precisión, dependiendo de, entre otros factores, la relación S/N.

Por este motivo, como punto de partida, evaluamos la precisión en la localización de filamentos de vimentina en células con AFTER. Para ello adquirimos películas confocales (0.3 cuadros/s durante ~ 2 min) de células BHK fijadas que expresaban GFP-vimentina y recuperamos las coordenadas de 27 filamentos distintos en cada cuadro de la película, tal como se muestra en la figura 6.3.

Luego, calculamos el centro de masa (CM) para cada filamento en cada cuadro y analizamos las fluctuaciones de la coordenada del CM calculando el desplazamiento cuadrático medio lateral (MSD_L , ver figura 5.1).

La fig. 6.3D muestra el promedio de los MSD_L obtenidos en este estudio. Se observa que la curva crece levemente en función del tiempo, probablemente por pequeños desplazamientos en la muestra producidos, por ejemplo, por un gradiente térmico¹⁹⁸. Estimamos el error de localización a partir del primer punto de la curva obteniendo un valor de ~ 18 nm.

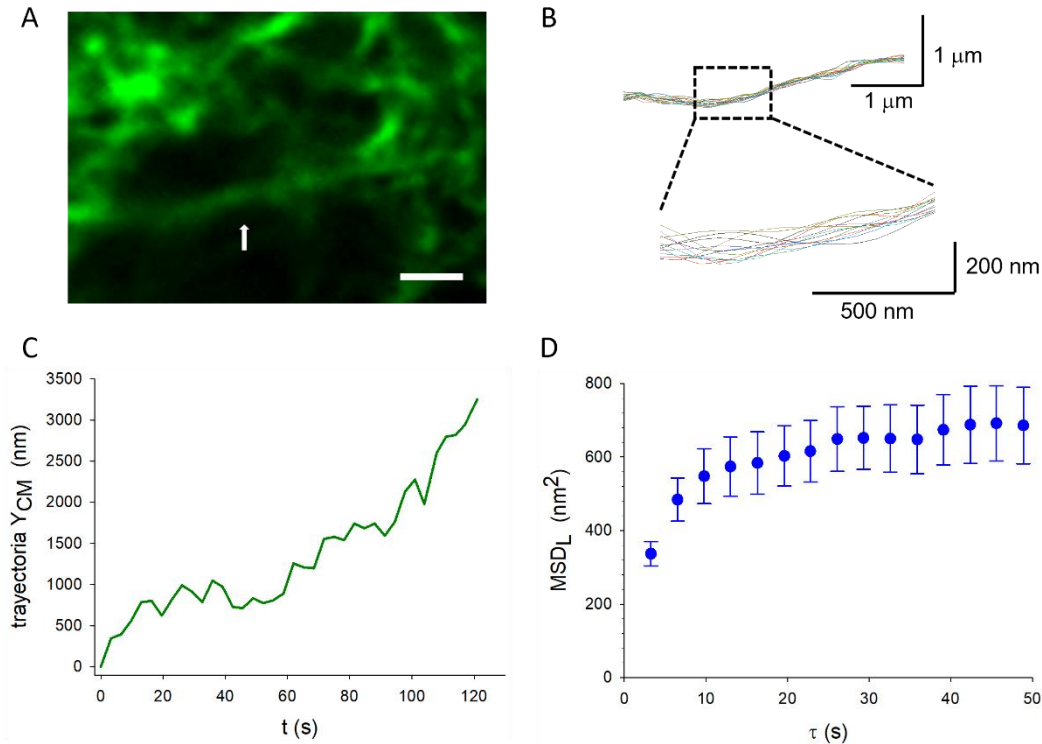


Figura 6.3. Determinación de la precisión en la localización de filamentos. A) Imagen confocal promedio obtenida a partir de una película de 15 cuadros de una célula BHK fijada expresando GFP-vimentina. La flecha blanca muestra uno de los filamentos analizados. Barra de escala = 1 μm . B) Superposición de las coordenadas recuperadas para dicho filamento en 10 cuadros de la película. C) Desplazamiento de la coordenada vertical del CM de un filamento en el tiempo D) MSDL_{\perp} promedio de los centros de masa de los filamentos (N=27).

6.4 Efecto del error de localización del filamento en el análisis de Fourier

A continuación, exploramos el efecto del error de localización del filamento en la determinación de la longitud de persistencia. Para ello, utilizamos los filamentos simulados de la sección 6.2 y, a cada coordenada le sumamos una variable aleatoria obtenida de una distribución normal con un desvío estándar de 20 nm que emula el error de localización experimental estimado en la sección anterior.

Estos filamentos fueron analizados siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En la figura 6.4 se observa que la amplitud de las varianzas de los modos de Fourier es mayor para las frecuencias menores y que, para las frecuencias mayores, el ruido experimental domina, en línea con lo demostrado previamente¹¹⁰. En esta región del espectro de frecuencias se produce un desvío de la linealidad.

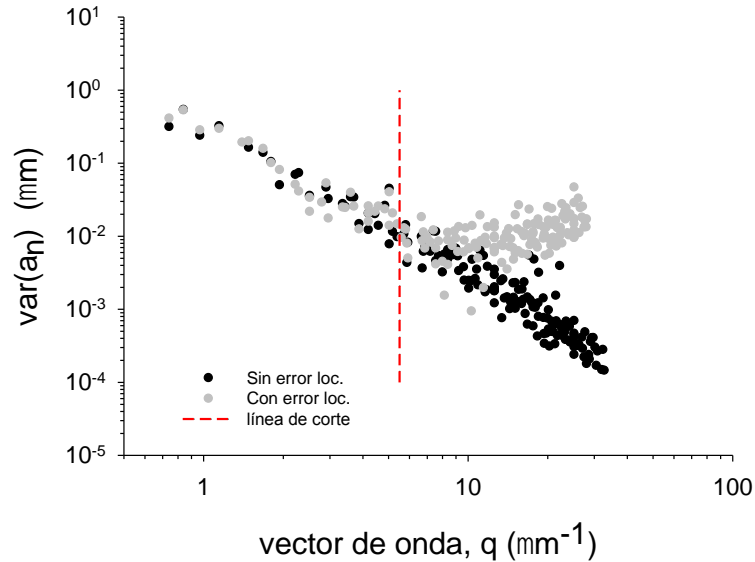


Figura 6.4 Error de localización del filamento en la determinación de la l_p^* . Varianza de las amplitudes de los modos de Fourier para los filamentos simulados con (●) y sin (●) error de localización. La línea de corte (--) marca el límite de los datos considerados para la determinación de la l_p .

Por estos motivos, en los experimentos que se describirán en los siguientes capítulos consideramos solamente datos cuyos vectores de onda sean menores a $5.5 \mu\text{m}^{-1}$, a menos que se especifique lo contrario.

6.5 Discusión

Tal como mencionamos en los capítulos 1 y 2, los filamentos de vimentina son muy flexibles, por lo que adoptan formas muy diversas, comúnmente con grandes curvaturas, y pueden unirse para formar manojos. Por ello, identificar filamentos individuales en imágenes de microscopía de fluorescencia de células es una tarea compleja.

En este capítulo, evaluamos la performance de la rutina AFTER para recuperar las coordenadas espaciales de filamentos de vimentina. Debido a las características mencionadas de esta red, los filamentos recuperados tienen longitudes muy variadas.

A causa de estas particularidades, debimos adaptar la rutina, inicialmente diseñada para el estudio de microtúbulos ¹²¹, típicamente de mayores longitudes y más homogéneas, para este contexto, donde no pueden recuperarse filamentos tan largos. Por ello realizamos los análisis de Fourier por grupos según las longitudes y el estudio de las curvaturas de forma global. Este procedimiento nos permitió recuperar la longitud de persistencia en ensambles de filamentos simulados.

También determinamos el error de localización en estas condiciones obteniendo un valor de ~ 20 nm, una distancia que representa aproximadamente el 20% del tamaño del píxel de la imagen confocal adquirida. Evaluamos también el impacto de este error en la obtención de la longitud de persistencia y observamos que, en acuerdo con trabajos previos¹¹⁰, el ruido térmico domina en los vectores de onda menores, mientras que el ruido experimental predomina en los vectores de onda mayores. Por ello, definimos un rango de frecuencias en el cual es posible analizar los datos obtenidos con la ecuación 2.10.

En conclusión, adaptamos la rutina AFTER y el análisis de Fourier a las nuevas condiciones que impone el estudio de la red de vimentina en células. En los capítulos siguientes, exploraremos las características mecánicas y la influencia del citoesqueleto sobre estos IFs en el medio intracelular.

Capítulo 7 - Longitud de persistencia aparente de los filamentos intermedios y sus vínculos mecánicos con el citoesqueleto

En los capítulos anteriores, describimos la relevancia de la longitud de persistencia como parámetro para analizar propiedades mecánicas de filamentos y la adaptación de un procedimiento para la determinación de este parámetro en filamentos intermedios de células. Además, tal como mencionamos en el capítulo 1 (sección 1.4), diversas funciones fisiológicas de estos filamentos involucran la comunicación con las redes de actina y microtúbulos. En este contexto, decidimos cuantificar la longitud de persistencia de filamentos de vimentina en células vivas y analizar si este parámetro depende además de los otros biopolímeros que integran el citoesqueleto.

7.1 Determinación de la l_p^* de vimentina en células vivas

En el capítulo 2 (sección 2.1), definimos la longitud de persistencia (l_p) como un parámetro muy relevante para biopolímeros, relacionada con la rigidez flexural de un filamento y la temperatura (ec. 2.1).

Mencionamos además, ciertos estudios previos (capítulo 2, sección 2.4)^{118,121} demostrando que los microtúbulos en células presentan una longitud de persistencia aparente (l_p^*) que es dos órdenes de magnitud menor que la determinada in vitro. Estos autores sugieren que esta gran diferencia se debe a fuerzas activas (e.g. aquellas producidas por motores moleculares) que operan estocásticamente sobre los microtúbulos y los deforman de manera aleatoria, determinando curvaturas similares a las que se producirían en equilibrio térmico, pero a una temperatura aparente más alta.

Estos antecedentes muestran que ciertas propiedades del citoesqueleto no pueden ser completamente entendidas considerando únicamente observaciones de los filamentos in vitro¹¹⁸. Además, enfatizan que el análisis de la l_p^* puede ser de utilidad para obtener información del microentorno y de las fuerzas que actúan sobre los filamentos.

Por estos motivos, decidimos determinar la longitud de persistencia aparente (l_p^*) de los filamentos de vimentina en células vivas. Para ello, adquirimos imágenes confocales de células BHK que expresaban GFP-vimentina (fig. 7.1A) y recuperamos, utilizando la rutina AFTER, las coordenadas de segmentos de filamentos elegidos de manera tal que representaran la variedad de formas que pueden encontrarse en esta línea celular.

La figura 7.1B muestra la dependencia de la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier con el vector de onda para $q < 5.5 \mu\text{m}^{-1}$ (capítulo 6, sección 6.4). La dependencia encontrada es lineal, tal

como se observó previamente para microtúbulos en células vivas, y es el comportamiento que se espera en condiciones de equilibrio térmico o para una condición símil térmica.

Estos resultados muestran que en el citoplasma de células vivas las curvaturas de los filamentos intermedios se distribuyen de manera aleatoria. Ajustamos estos datos experimentales con la ecuación 2.10 y obtuvimos un valor de l_p^* de $2.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$.

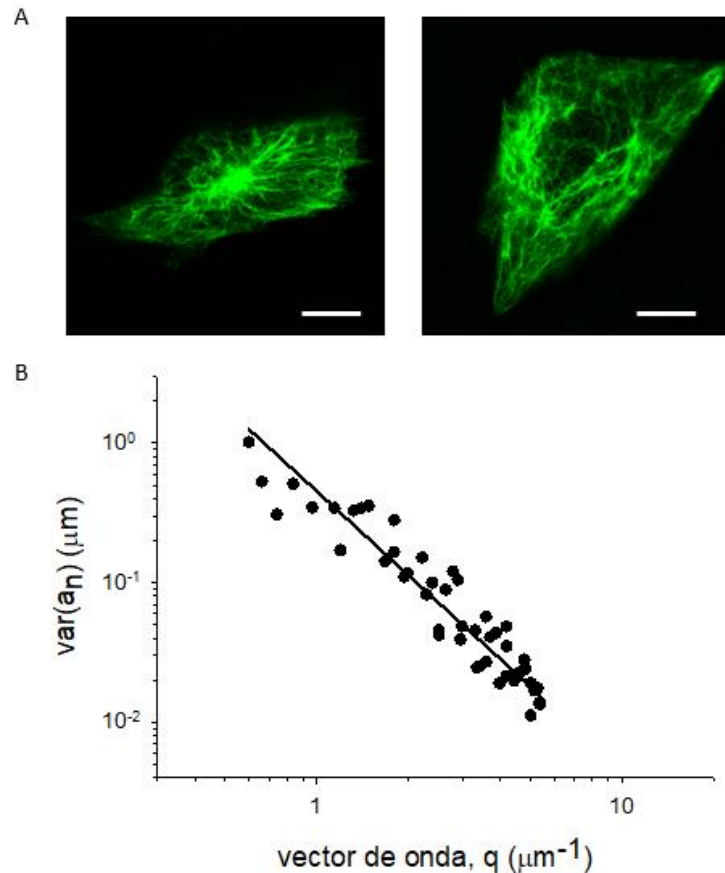


Figura 7.1. Red de filamentos de vimentina y determinación de l_p^* en células BHK. A) Imágenes confocales representativas de células BHK expresando GFP-vimentina. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$. B) Análisis de Fourier de los filamentos de GFP-vimentina recuperados de células BHK (\bullet ; $N_{\text{filamentos}} = 167$, $N_{\text{células}} = 7$). La línea continua (—) muestra el ajuste de la ecuación 2.10 a partir del cual se calculó el valor de l_p^* mencionado en el texto.

En el capítulo 2 (sección 2.2), mencionamos distintos métodos con los cuales se estimó la longitud de persistencia de filamentos de vimentina en condiciones in vitro. En particular, Mücke y colaboradores¹¹¹ utilizaron microscopía de fuerza atómica y determinaron valores de l_p de $\sim 0.3 \mu\text{m}$ (cuando los filamentos son adsorbidos en mica) ó $\sim 1 \mu\text{m}$ (si son depositados sobre un vidrio hidrofóbico y estudiados en un buffer fisiológico). Estas divergencias ilustran que las interacciones con el sustrato afectan en gran medida las curvaturas de los filamentos.

En el trabajo de Nöding y colaboradores¹¹⁵, descrito previamente, obtuvieron un valor de l_p de 2.1 μm para filamentos de vimentina en solución, en línea con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

El valor de l_p^* obtenido en células no es significativamente diferente del registrado in vitro en solución acuosa, lo que sugiere que las curvaturas de los filamentos intermedios no estarían definidas por la acción de fuerzas netas en el medio intracelular.

Esta conclusión parece, en primera instancia, contradictoria con diversos trabajos que muestran interacciones físicas entre la red de filamentos intermedios y las redes de microtúbulos y actina, sobre las que efectivamente se generan fuerzas (por ej., por la acción de los motores moleculares). Por estos motivos, más adelante en este capítulo exploraremos si las propiedades de la red de vimentina son moduladas por los microtúbulos y el citoesqueleto de actina.

7.2 Determinación de l_p^* a partir de imágenes de superresolución

Dada la compleja trama de la red de vimentina en células, nos preguntamos si el límite de resolución impuesto por la difracción de la microscopía confocal (~ 200 nm) impedía visualizar detalles de las formas de los filamentos que afectarían la determinación de la longitud de persistencia.

Para responder esta pregunta, trabajamos en colaboración con la Dra. Ilaria Testa (*KTH Royal Institute of Technology*, Suecia) y analizamos imágenes de células BJ modificadas que expresaban EGFP-vimentina¹⁹⁹ las cuales fueron fijadas de acuerdo a los procedimientos descritos en el capítulo 5 (sección 5.5). Se tomaron pares de imágenes de las mismas regiones celulares, una mediante microscopía confocal y otra utilizando STED.

La figura 7.2 muestra ejemplos representativos de imágenes en las que se puede apreciar la diferencia de resolución entre ambas técnicas (~ 200 nm para confocal y ~ 80 nm para STED). De forma cualitativa, la mayor resolución de la microscopía STED permite visualizar detalles de entrecruzamientos y asociaciones entre los filamentos individuales que no son detectados en las imágenes confocales. Además, observamos que las estructuras filamentosas de menor intensidad observadas con microscopía confocal suelen corresponder a filamentos individuales de acuerdo con las imágenes STED.

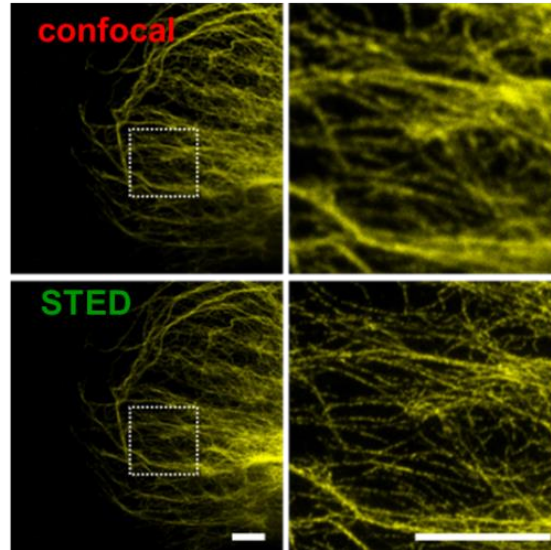


Figura 7.2. Comparación de imágenes confocal y STED de filamentos intermedios. A) Imágenes representativas de fibroblastos BJ modificados obtenidas mediante microscopías confocal y STED. Los paneles a la derecha muestran los detalles de las regiones señaladas en la izquierda. Barras de escala: 5 μm .

A partir de estas imágenes, recuperamos las coordenadas espaciales de los mismos segmentos de filamentos en las imágenes confocales y STED para ser analizados mediante el método de Fourier.

La figura 7.3 muestra que las curvaturas de los filamentos provenientes de cada tipo de imagen presentan un comportamiento similar térmico, tal como se verificó en la fig. 7.1. Sin embargo, el rango de linealidad de STED ($q < 10 \mu\text{m}^{-1}$) es mayor al confocal ($q < 6.7 \mu\text{m}^{-1}$), debido a que la mayor resolución de la microscopía STED permite recuperar las coordenadas de los filamentos con menor error, por lo que podrían incluirse más modos de Fourier en la determinación de la l_p^* .

Finalmente, ajustamos cada conjunto de datos con la ecuación 2.10 en su respectivo rango de linealidad y obtuvimos los siguientes valores de l_p^* : $(2.4 \pm 0.2) \mu\text{m}$ y $(2.2 \pm 0.3) \mu\text{m}$ para STED y confocal, respectivamente. Estos valores no son significativamente diferentes, lo que sugiere que la menor resolución de las imágenes confocales no afecta la información recuperada de la organización de la red de vimentina en células.

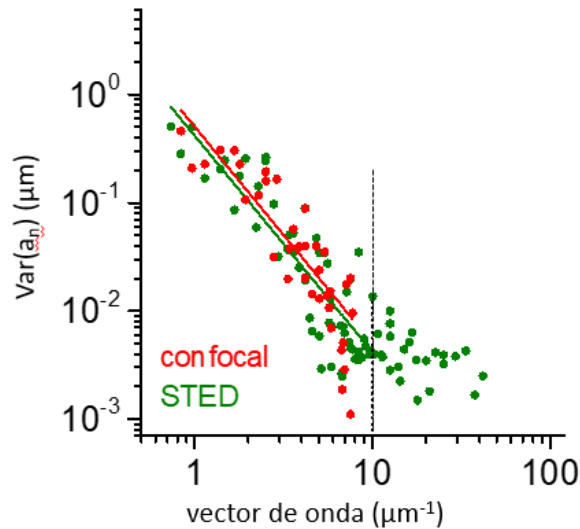


Figura 7.3. Análisis de Fourier de filamentos recuperados de imágenes STED y confocales. Las curvaturas de filamentos recuperados de cada ensamble (círculos llenos) muestran un comportamiento símil térmico (líneas rectas). Las curvaturas de las imágenes STED tienen un mayor rango lineal (línea cortada). $N_{\text{filamentos}} = 138$, $N_{\text{células}} = 9$.

Además, el valor de lp^* de vimentina en fibroblastos BJ no es significativamente diferente de aquella de células BHK, lo que sugeriría que, en diferentes líneas celulares, los filamentos de vimentina tienen una lp^* similar y que el proceso de fijación no altera sustancialmente las curvaturas de los filamentos.

7.3 Influencia de la red de microtúbulos en las propiedades mecánicas de los filamentos intermedios

En esta sección, estudiaremos diversos aspectos de la relación mecánica entre los filamentos de vimentina y los microtúbulos en las células. En modo general, el procedimiento utilizado en los experimentos que se describen en esta sección consistió en tratar células BHK que expresaban GFP-vimentina con diferentes agentes farmacológicos destinados a modificar la arquitectura de la red de microtúbulos. Luego, tomamos imágenes confocales de las células y recuperamos las coordenadas de filamentos individuales con la rutina AFTER, tal como se describió previamente.

Para visualizar la red de microtúbulos, transfectamos las células BHK con un plásmido que expresa EGFP- α -tubulina. La figura 7.4 muestra que esta proteína de fusión permite detectar a los microtúbulos, aunque con una baja relación S/N (8.3 ± 0.6 , $N=7$; capítulo 5, sección 5.7), producida por una intensidad de fluorescencia relativamente alta en el citoplasma. Esta observación sugiere una concentración anormalmente alta de EGFP- α -tubulina monomérica, probablemente producida por sobreexpresión.

Para evitar este inconveniente utilizamos un plásmido que codifica la proteína de fusión EMTB-GFPx3, que consiste en el dominio de unión de la MAP7, ensconsina¹⁸⁴, unido a tres copias en tándem de la sonda GFP. Esta proteína interactúa dinámicamente con los microtúbulos y encontramos que la relación S/N es mayor que al expresar EGFP- α -tubulina (14.2 ± 1.3 , N=7; fig. 7.4). Por otra parte, dado que el recambio de MAPs es más rápido que el de subunidades de tubulina, las moléculas de EMTB-GFPx3 fotoblanqueadas y unidas al microtúbulo se recambian por otras fluorescentes, permitiendo la observación de los microtúbulos por periodos de tiempo más largos. En un trabajo anterior, se demostró que la marcación de la red de microtúbulos por MAPs fluorescentes no alteraba las propiedades mecánicas de los microtúbulos¹²¹.

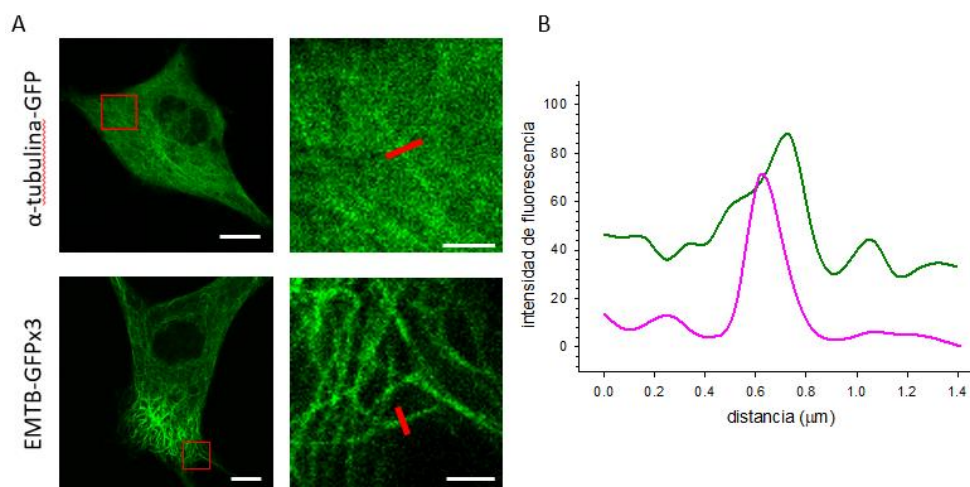


Figura 7.4. Observación de la red de microtúbulos. A) Imágenes confocales representativas de células BHK expresando α -tubulina-GFP o EMTB-GFPx3 (barra de escala = 10 μ m). Los detalles corresponden a las regiones encuadradas en rojo (barra de escala = 2 μ m). B) Perfiles de intensidad y relaciones S/N de los microtúbulos señaladas con líneas rojas en los detalles de A: 9.8 para α -tubulina-GFP (—) y 19.5 para EMTB-GFPx3 (—).

Luego, analizamos si los microtúbulos ejercen un efecto mecánico sobre la red de vimentina en células. Para ello, ensayamos los efectos de nocodazole, una droga que interfiere con el proceso de polimerización de los microtúbulos²⁰⁰ e induce su depolimerización. Incubamos las células BHK que expresaban GFP-vimentina con nocodazole, en las condiciones descritas en el capítulo 5 (sección 5.2). La figura 7.5 muestra que este tratamiento provoca una reducción apreciable en la cantidad de microtúbulos en las células BHK, sin cambios cualitativos en la morfología típica de las células.

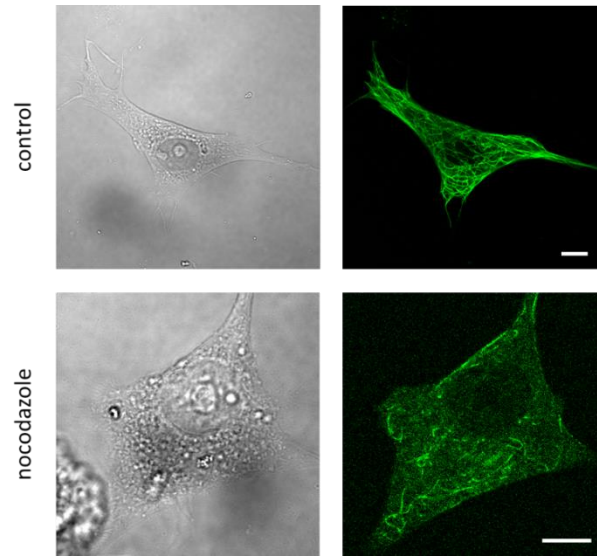


Figura 7.5. Efecto del nocodazole en la red de microtúbulos. Imágenes confocales representativas de células BHK expresando EMTB-GFP en condiciones control o tratadas con 10 μ M nocodazole. Barra de escala = 10 μ m.

La figura 7.6 muestra que, luego de la despolimerización de los microtúbulos, la estructura general de la red de vimentina, cualitativamente, se preserva. Debemos destacar que en algunas imágenes se observaron manojos o fibras de filamentos de vimentina, similares a los descritos en ⁹⁷, que se orientan en la dirección del movimiento en células que migran.

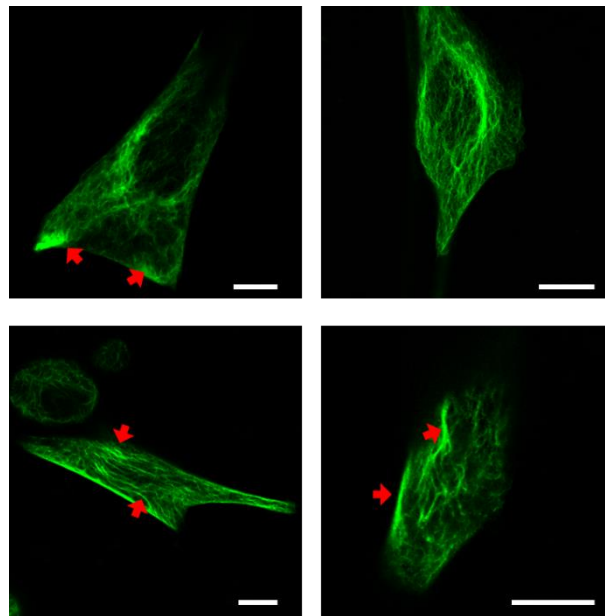


Figura 7.6. Efecto del tratamiento con nocodazole sobre la red de vimentina. Imágenes confocales de células BHK expresando GFP-vimentina y sometidas al tratamiento de despolimerización de microtúbulos. Las flechas rojas muestran manojos de filamentos de vimentina. Barras de escala = 10 μ m. A modo comparativo, se sugiere observar las imágenes de la red de vimentina en células sin tratar en la figura 7.1.

A partir de imágenes confocales similares a las expuestas en la figura 7.6, recuperamos las coordenadas de filamentos de vimentina utilizando el algoritmo AFTER, las cuales fueron posteriormente analizadas según el procedimiento descrito en el capítulo 6.

La figura 7.7 muestra que las varianzas de las amplitudes de los modos de Fourier en función de los vectores de onda de los filamentos de células tratadas con nocodazole se distribuyen de forma similar térmica, tal como verificamos en las células control (fig. 7.1). Ajustamos la ecuación 2.10 a estos datos y obtuvimos una l_p^* de $2.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$. Este valor no es significativamente diferente a aquél determinado en células BHK sin tratar, lo que sugiere que la red de microtúbulos no afecta la distribución de curvaturas de los filamentos de vimentina en células.

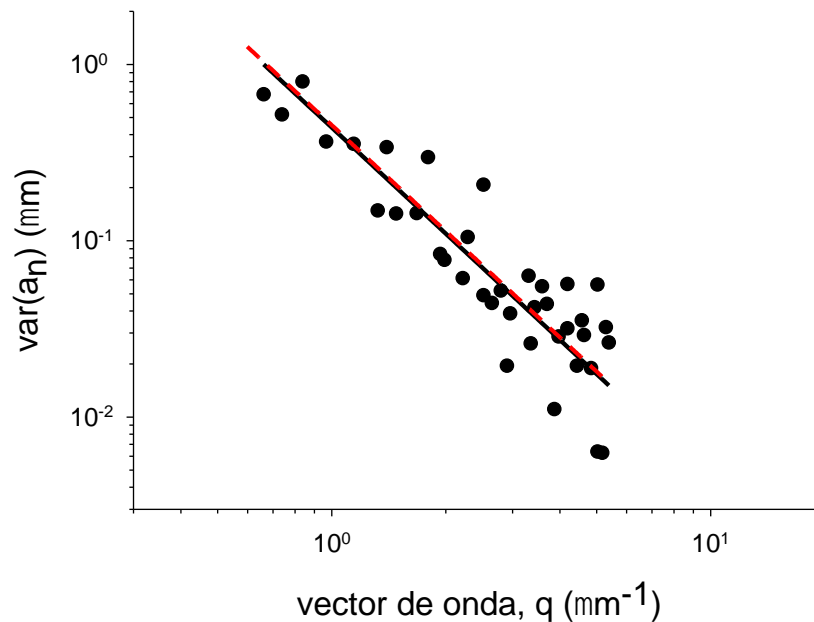


Figura 7.7. Determinación de l_p^* en células BHK tratadas con nocodazole. Análisis de Fourier de los filamentos de vimentina recuperados a partir de imágenes de células tratadas con nocodazole (●), ajuste de la ecuación 2.10 de estos datos (—) y ajuste de los datos control (---).

Hemos mencionado previamente distintas evidencias de comunicación entre las redes de microtúbulos y de vimentina, tanto en transporte de precursores de vimentina como en procesos que involucran remodelación de la red de microtúbulos ^{42,85}. En este contexto, y dado que la depolimerización de la red de microtúbulos no afecta la l_p^* de los filamentos de vimentina, nos preguntamos si este parámetro podría verse afectado por fuerzas o desbalances mecánicos generados en la red de microtúbulos.

Para ello ensayamos los efectos de vinblastina, una droga que se une reversiblemente a las β -tubulinas e induce un cambio conformacional que aumenta la afinidad entre las subunidades del

polímero¹⁸⁸. En consecuencia, la tasa de polimerización y depolimerización de los microtúbulos se reduce, los microtúbulos conservan su longitud por períodos mayores de tiempo⁸ y, en consecuencia, no se depolimerizan en respuesta a estrés mecánico, acumulando tensión.

Para observar los efectos de esta droga, incubamos células BHK que expresaban EMTB-GFPx3 con vinblastina, tal como se describe en la sección 5.4 del capítulo 5 y tomamos imágenes secuenciales (0.3 cuadros/s) de regiones de interés. La figura 7.8 muestra algunos ejemplos en los cuales se verifica que el tratamiento provoca la disminución esperada en la frecuencia de los ciclos de polimerización y depolimerización característicos de los microtúbulos.

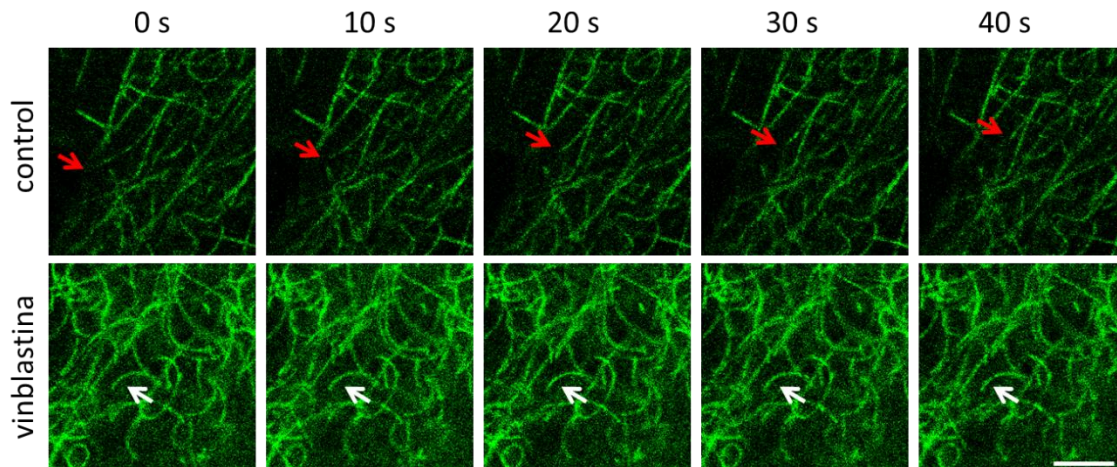


Figura 7.8. Efecto de vinblastina en la inestabilidad dinámica de microtúbulos. Cuadros de películas que muestran regiones representativas de células BHK expresando EMTB-GFP sin tratar (control) o incubadas con 30 nM vinblastina. La flecha roja muestra un microtúbulo que se depolimeriza, mientras que la flecha blanca señala un microtúbulo que permanece inalterado a lo largo de esta secuencia. Barra de escala = 5 μ m.

Por otro lado, la figura 7.9 muestra que cualitativamente, no hay alteraciones en la morfología general de las células tratadas con vinblastina respecto de las células control. Sin embargo, se destaca el aumento en la curvatura de los microtúbulos; un efecto similar fue reportado en²⁰¹, donde utilizan una concentración de tres veces la utilizada aquí.

En condiciones normales, cuando los microtúbulos se polimerizan contra una barrera rígida (por ej. la membrana), acumulan tensión, se curvan y se desencadena un evento catástrofe^{22,120}. Dado que la vinblastina impide su despolimerización, los microtúbulos mantienen su longitud y las curvaturas adquiridas. Por otra parte, Gigant y colaboradores²⁰² plantean que cuando la vinblastina se une al extremo de un microtúbulo, la interfase longitudinal de unión de las tubulinas queda impedida estéricamente, forzándolas a ensamblarse de manera curva. En línea con estos resultados, Jordan y colaboradores⁸ plantean que la unión de la vinblastina a las β -tubulinas induce un cambio conformacional en la unión entre las tubulinas. Además, dado que la vinblastina también se une a tubulinas solubles, este efecto origina agregados de tubulina en forma de espiral a expensas del crecimiento del microtúbulo²⁰². En cualquiera de los dos casos, las estructuras de los microtúbulos

en presencia de vinblastina no son las esperadas en condiciones fisiológicas y generan, probablemente, desbalances en las fuerzas que regulan la organización del citoesqueleto.

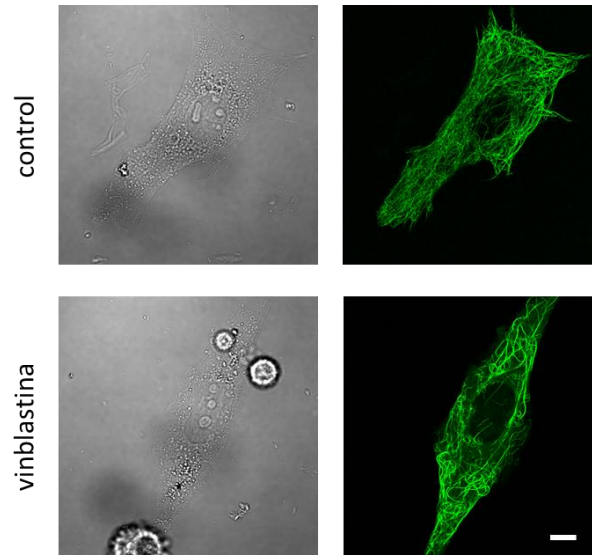


Figura 7.9. Efecto de la vinblastina sobre la red de microtúbulos. Imágenes de transmisión y confocales de células BHK expresando EMTB-GFP sin tratar (control) o tratadas con vinblastina. Se observa el incremento de las curvaturas en los microtúbulos producto de la incubación con vinblastina. Barra de escala = 10 μm .

Para evaluar el efecto de la perturbación de los microtúbulos sobre la red de vimentina, incubamos células BHK expresando GFP-vimentina con vinblastina y adquirimos imágenes confocales de las células (fig. 7.10). Luego, recuperamos las coordenadas de segmentos de filamentos de vimentina con el algoritmo AFTER tal como mencionamos en la sección 7.1 de este capítulo.

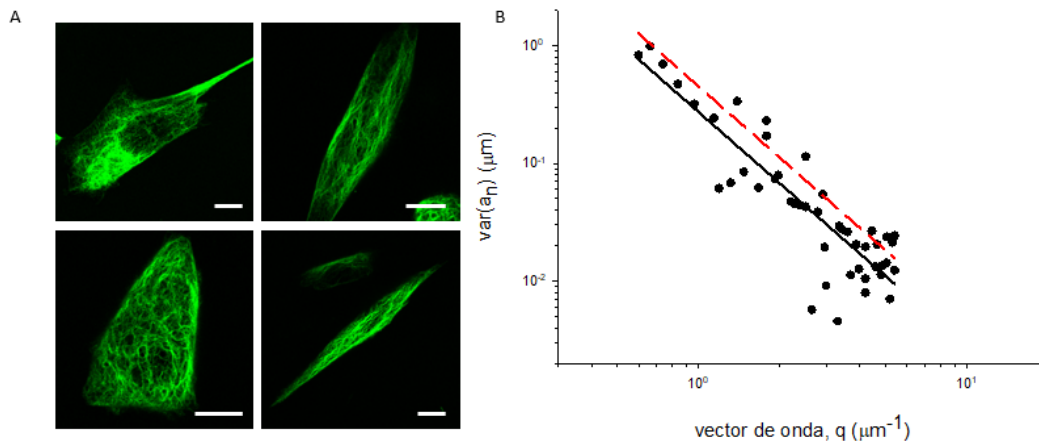


Figura 7.10. Determinación de lp^* de vimentina en células tratadas con vinblastina. A) Imágenes representativas de células BHK expresando GFP-vimentina y tratadas con vinblastina. Barras de escala = 10 μm . B) Análisis de Fourier de las curvaturas de filamentos de vimentina en células tratadas con vinblastina (\bullet) con el correspondiente ajuste de la ecuación 2.10 (—) y representación del ajuste de los datos obtenidos en células control (---).

El análisis de Fourier mostró acuerdo con lo predicho por la ecuación 2.10, y obtuvimos un valor de l_p^* de $3.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (fig. 7.8). Este valor es $\sim 65\%$ mayor a la l_p^* determinada en células control, sugiriendo que el arresto de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos provoca que los filamentos de vimentina presenten menores curvaturas.

El aumento de l_p^* de vimentina en presencia de vinblastina y los resultados obtenidos en el tratamiento con nocodazole sugieren que los microtúbulos alteran las curvaturas de los filamentos de vimentina cuando están bajo tensión. La tabla 7.1, presentada hacia el final de este capítulo, compila los resultados obtenidos en estos experimentos.

7.4 Influencia de la red de actina en las propiedades mecánicas de filamentos intermedios

En esta sección, estudiamos la relación mecánica entre los filamentos de vimentina y los de actina en las células. Para ello, seguimos una estrategia similar a la utilizada en la sección anterior, donde estudiamos la relación de la red de vimentina con microtúbulos. En este caso, ensayamos el efecto de latrunculina B, una toxina que se une a los monómeros de actina y evita su polimerización, provocando además la depolimerización de los filamentos preexistentes ²⁰³.

Mencionamos en el capítulo 1 que el citoesqueleto de actina es clave para definir la forma de las células ^{204,205}. En consecuencia, la pérdida de esta red provoca que las células se redondeen (similares resultados en ²⁰⁶) debido a la pérdida de sitios de anclaje al sustrato ^{92,207}. Por estos motivos, evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de latrunculina B para depolimerizar sólo una fracción de los filamentos, sin alterar catastróficamente la estructura de las células.

En un trabajo previo ²⁰⁸, se mostró que al tratar fibroblastos embrionarios de pollo con concentraciones de latrunculina B del orden de $0.6 - 0.1 \mu\text{M}$, disminuye la elasticidad celular sin cambios aparentes en la morfología celular o la red de actina, de acuerdo a imágenes de microscopía de fluorescencia. Los autores indican que este cambio en la elasticidad celular se produce por alteraciones de la integridad de la red de actina que no son detectables por microscopía óptica. En consecuencia, decidimos utilizar concentraciones de latrunculina B en el rango sugerido en dicho trabajo.

Para evaluar los cambios producidos por este tratamiento en las redes de actina y vimentina, incubamos células BHK que expresaban GFP-vimentina con una solución $0.15 \mu\text{M}$ latrunculina-B. Luego fijamos las células y marcamos el citoesqueleto de actina con faloidina-Texas Red X, tal como se explica en el capítulo 5 (sección 5.3). La Figura 7.11 muestra, en una célula representativa, que este tratamiento causa una disminución en la cantidad de fibras de estrés ventrales (ver fig. 1.5), mientras que las fibras corticales se mantienen sin alteraciones evidentes. Por otra parte, la red de vimentina no presenta cambios cualitativos en su organización típica, presentando la jaula nuclear característica y una menor densidad de filamentos alcanzando la periferia celular. Al superponer las

imágenes, no se aprecian, a simple vista, cambios cualitativos producidos por latrunculina en la relación entre ambas redes.

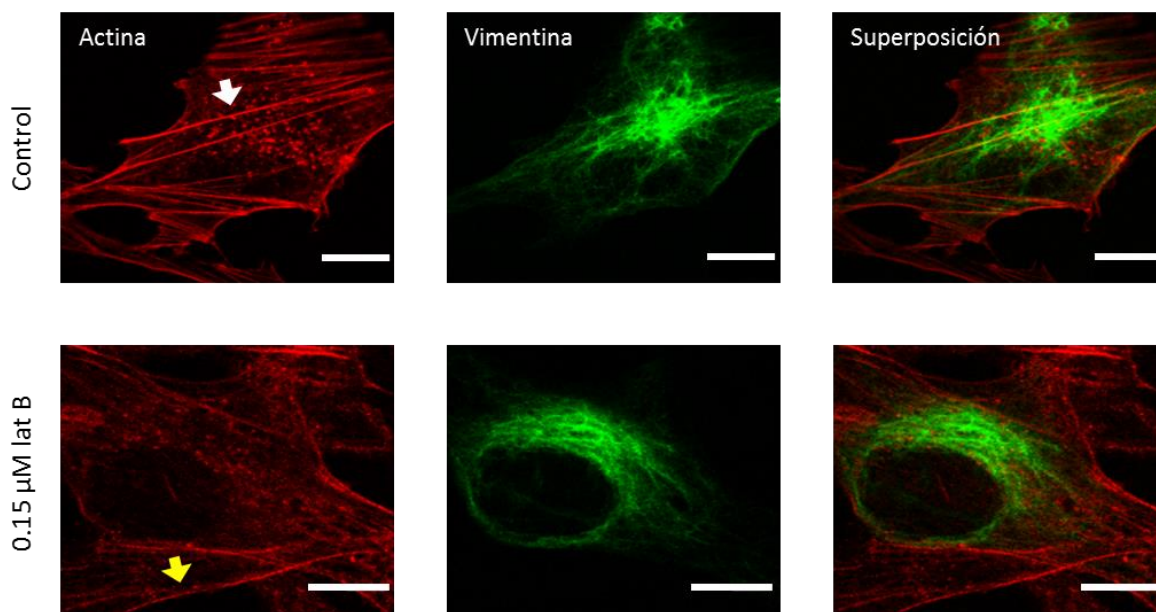


Figura 7.11. Efectos en el citoesqueleto de concentraciones submicromolares de latrunculina B. Imágenes confocales representativas de células BHK fijadas, sin tratar e incubadas con 0.15 μM latrunculina B. En rojo y verde se muestran el citoesqueleto de actina (faloidina-Texas Red X) y la red de vimentina (GFP-vimentina), respectivamente. Las flechas blanca y amarilla señalan ejemplos de fibra de estrés ventral y cortical, respectivamente. Barras de escala: 10 μm .

Para explorar en detalle los efectos de esta baja concentración de latrunculina, definimos cuatro parámetros que proveen información cuantitativa de las posibles alteraciones en las redes de actina y vimentina y sus consecuencias en la estructura general de la célula, la cual, como hemos mencionado, depende íntimamente de la integridad del citoesqueleto de actina. En particular, analizamos el número de fibras de estrés y el área de la célula en el plano de contacto con el cubreobjeto. Los parámetros restantes monitorean aspectos de la red de vimentina: la fracción del área celular ocupada por IFs (cobertura de IFs) y la distancia entre los centros de masa de la célula y la red de vimentina. Las determinaciones de estos parámetros se realizaron tal como se explican en el capítulo 5 (sección 5.10). Los resultados obtenidos para las células control y tratadas, se resumen en la figura 7.12.

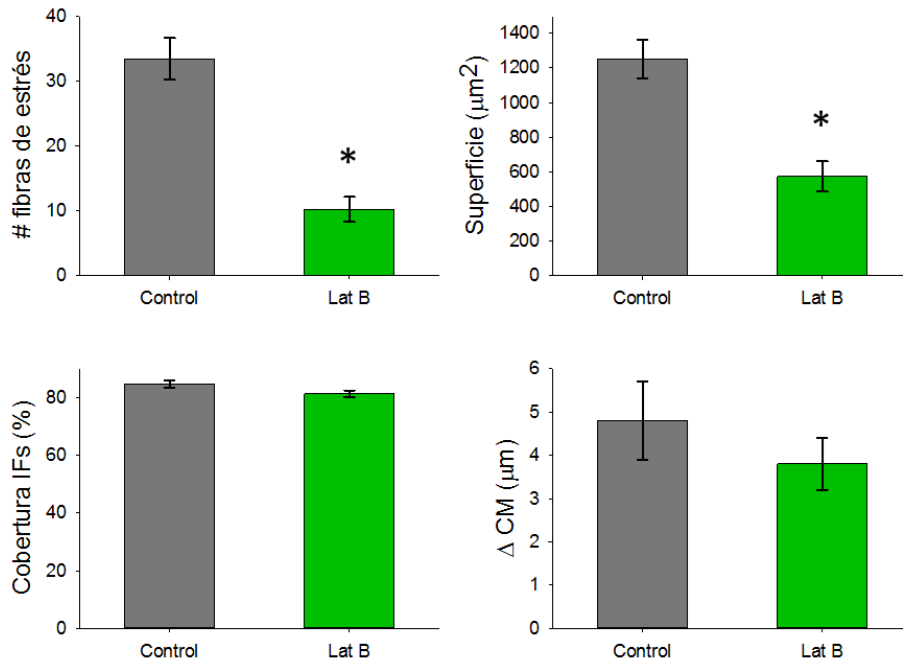


Figura 7.12. Cambios producidos por el tratamiento de latrunculina B. Efectos de 0.15 μM latrunculina B sobre diversas propiedades de las células. Las barras grises y verdes corresponden a los resultados obtenidos en células control o tratadas con latrunculina B, respectivamente. Las barras corresponden a los valores promedios ± error estándar. Los “*” señalan diferencias significativas. $N_{\text{células}} = 31$ y 35, para control y Lat B, respectivamente.

La figura muestra que el tratamiento con 0.15 μM latrunculina B reduce significativamente la cantidad de fibras de estrés en las células. Cualitativamente, no se observan cambios apreciables en la intensidad y tamaño de las fibras remanentes luego del tratamiento, con respecto a aquellas observadas en células control. Esto sugiere que las fibras que se pierden luego de la incubación con latrunculina serían aquellas más tenues, es decir, las que están constituidas por un menor número de filamentos. Estos resultados son compatibles con una depolimerización parcial de la red de actina^{209,210}.

Por otro lado, las células tratadas con latrunculina presentan menores valores de área celular. Tal como mencionamos anteriormente, el citoesqueleto de actina es clave en la determinación de la morfología celular²¹¹. Además, las fibras de estrés están asociadas a los complejos de unión al sustrato²¹² y su desensamblado lleva a la retracción celular y el redondeo de las células²¹³, efectos acordes con la reducción del área celular.

Determinamos además la “cobertura relativa de IFs” para explorar aspectos globales de la red de vimentina. Por ejemplo, si el tratamiento con latrunculina B promueve una reducción en las interacciones entre actina y vimentina en la zona periférica de las células, esperaríamos que la red de vimentina se concentre en mayor medida en la zona perinuclear y el valor de este parámetro se vea reducido. La figura 7.12 muestra que la incubación con 0.15 μM latrunculina B no produce

cambios significativos en este parámetro, sugiriendo que las fibras depolimerizadas de actina no presentan conexiones con la red de vimentina determinantes de su distribución macroscópica en el citoplasma.

Para profundizar en este aspecto, analizamos si la inducción de la depolimerización parcial de la red de actina promueve cambios en la organización espacial del citoesqueleto y, en especial, de la red de vimentina. Para ello, calculamos el centro de masa (CM) geométrico de cada célula, a partir del citoesqueleto de actina, y el CM de la red de vimentina (CM_{vim}). En particular, el cálculo del CM_{vim} pondera la intensidad de fluorescencia de cada píxel de la imagen. Luego, aplicamos la ecuación 5.9 para obtener la distancia ΔCM de cada célula y finalmente, calculamos las medias en cada condición. La figura 7.12 muestra que el tratamiento con $0.15 \mu M$ latrunculina B no altera las posiciones relativas del centro de masa de la red de vimentina respecto al centro de masa celular, sugiriendo que esta red se reordena en un escenario de retracción celular manteniendo su posición y distribución relativa.

7.4.1 Longitud de persistencia aparente de vimentina en células tratadas con latrunculina B

Incubamos células BHK expresando GFP-vimentina con una solución $0.15 \mu M$ de latrunculina-B, tal como mencionamos previamente y determinamos la lp^* de vimentina tal como se describe en la sección 7.1.

La figura 7.13 muestra que la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier en función del vector de onda q sigue un comportamiento símil-térmico, por lo que ajustamos la ecuación 2.10 a estos datos experimentales y obtuvimos un valor de lp^* de $2.7 \pm 0.3 \mu m$, el cual es leve, pero significativamente mayor a la lp^* control en las células BHK.

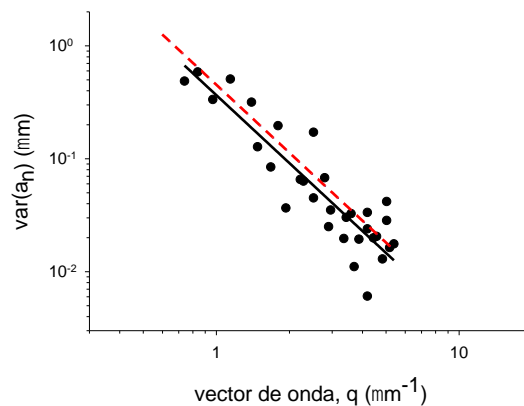


Figura 7.13. Determinación de la longitud de persistencia en células tratadas con latrunculina B. Análisis de Fourier de filamentos de vimentina de células BHK tratadas con latrunculina B (●) con su correspondiente ajuste a la ecuación 2.10 (—) y comparación con el ajuste de la curva control (—). $N_{células} = 24$, $N_{filamentos} = 149$.

Se ha propuesto que la red de vimentina prevendría la deformación celular excesiva en presencia de perturbaciones que son suficientes para promover cambios significativos en la red de actina¹⁰³. En ese contexto, el aumento observado en l_p^* indica que los filamentos presentan curvaturas menores y sugiere un aumento en su rigidez aparente. Este punto será discutido en detalle en la siguiente sección y el siguiente capítulo.

La tabla 7.1 resume los valores de longitud de persistencia aparente obtenidos en las diferentes condiciones estudiadas a lo largo de este capítulo.

Condición	l_p^* (μm)
Control	2.2 ± 0.1
Fibroblastos BJ [§]	2.4 ± 0.2 / 2.2 ± 0.3
Nocodazole	2.3 ± 0.2
Vinblastina	3.7 ± 0.4 *
Latrunculina B	2.7 ± 0.3 *

Tabla 7.1. Valores de l_p^* para cada determinación. El símbolo[§] indica que se trata de células fijadas, mientras que * indica diferencias significativas respecto al valor control.

7.5 Discusión

En este capítulo utilizamos la rutina AFTER para recuperar las coordenadas espaciales de filamentos individuales de vimentina en células vivas y determinar su longitud de persistencia aparente. Este parámetro provee información relevante sobre las propiedades mecánicas de estos filamentos en su ambiente natural.

En primera instancia, determinamos que las curvaturas de los filamentos de vimentina en células vivas se distribuyen de manera similar térmica y que el valor de la l_p^* es similar a la longitud de persistencia determinada en condiciones in vitro. Este resultado sugeriría que la red de IFs no está expuesta a la acción de fuerzas netas en el citoplasma. Este modelo contrastaría con las múltiples interacciones físicas entre las distintas redes que conforman el citoesqueleto. Sin embargo, los análisis realizados en condiciones donde se altera la red de microtúbulos o de actina, sugieren que el escenario sería más complejo.

Comprobamos, que la resolución de las imágenes confocales es adecuada para determinar la longitud de persistencia aparente de los filamentos de vimentina en células. En el capítulo 8, retomaremos esta discusión cuando analicemos imágenes tomadas con la técnica MoNaLISA.

En este capítulo observamos además que la l_p^* de vimentina depende de la interacción con microtúbulos. Si bien la depolimerización de estos últimos no provoca cambios en la l_p^* de vimentina, el arresto de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos promueve el aumento en la rigidez aparente de los filamentos intermedios estudiados.

Los filamentos de vimentina interactúan con los microtúbulos de forma directa y afectan su organización. Por ejemplo, a través de proteínas como APC⁷⁷, plectina⁹⁴ y motores moleculares²¹⁴⁻²¹⁶. También interactúan de forma indirecta, controlando el posicionamiento del centro organizador de microtúbulos⁷⁷ y el transporte de mitocondrias⁶⁶. Además, en regiones celulares donde hay más interacciones entre microtúbulos y filamentos de vimentina, los microtúbulos serían más resistentes a la acción del nocodazole⁸⁵.

En un trabajo previo, Pallavicini y colaboradores¹²¹ observaron que en células que expresan una versión dominante negativa de vimentina (la cual promueve la depolimerización de la red endógena de este filamento intermedio), la l_p^* de los microtúbulos es $\sim 60\%$ menor al valor determinado en células control. Esto implica que los microtúbulos adquieren mayores curvaturas en esa condición, sugiriendo que, en condiciones normales, los IFs actúan mecánicamente sobre los microtúbulos y como consecuencia, experimentan la acción de fuerzas mecánicas por parte de estos. Por otro lado, tal como mencionamos en el capítulo 2 (sección 2.3), Brangwynne y colaboradores¹¹⁹ demostraron que los microtúbulos que están embebidos en una matriz flexible, son capaces de tolerar, fuerzas compresivas cientos de veces mayores a las toleradas in vitro, sin romperse. Es decir que el medio elástico circundante refuerza mecánicamente a los microtúbulos.

En este contexto, proponemos que, cuando se produce un aumento en la tensión sobre un microtúbulo, aquellos filamentos de vimentina interconectados se tensionarían y consecuentemente se estirarían parcialmente, lo que se refleja en el incremento de l_p^* observado en este trabajo. Nuestros resultados sugieren que hay una transmisión de la tensión de los microtúbulos a los filamentos de vimentina y, consecuentemente, la red de vimentina contribuye a preservar la integridad mecánica de los microtúbulos. Este modelo será también discutido en el siguiente capítulo

En este capítulo, también analizamos si la l_p^* de los filamentos de vimentina es modulada por el citoesqueleto de actina. Ambas redes están conectadas indirectamente a través de plectina²¹⁷, fimbrina²¹⁸ y BPAG1²¹⁹. Además se unen indirectamente por los complejos de adhesiones focales, con los que las células se adhieren al sustrato²²⁰.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con baja concentración de latrunculina B provocaría una despolimerización parcial del citoesqueleto de actina que modifica la morfología celular y promovería un aumento leve en la l_p^* de vimentina, sugiriendo que los filamentos intermedios responden a esta alteración del citoesqueleto.

Como veremos en el capítulo siguiente, este aumento de l_p^* se produce paralelamente a un aumento en la movilidad de los filamentos intermedios. Por estos motivos, hipotetizamos que la despolimerización parcial de la red de actina ocasionaría la pérdida de puntos de anclaje para los filamentos de vimentina, los cuales ganan libertad para autoasociarse y formar manojos de filamentos que compensan parcialmente la pérdida de resistencia mecánica de la célula. Tal como mencionamos en el capítulo 2 (sección 2.5), distintos antecedentes muestran que concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} y Ca^{2+} promueven la asociación entre filamentos¹²⁴ dando lugar a la formación

de manojos y al aumento de rigidez aparente de las redes de filamentos intermedios¹²⁵. Por ello y por las características mecánicas, se ha propuesto que los filamentos intermedios prevendrían la excesiva deformación de la célula¹⁰³.

En este contexto teórico, podríamos estimar cuál debería ser la estequiometría de la autoasociación de IFs en células tratadas con 0.15 μm latrunculina B a partir del valor de lp^* obtenido, considerando que la longitud de persistencia es proporcional a la rigidez flexural (ecuación 2.1). A su vez la rigidez flexural contiene al segundo momento de inercia I que es proporcional a la cuarta potencia del radio r del filamento²⁹. Entonces, suponiendo un filamento isotrópico y cilíndrico homogéneo en el que las propiedades mecánicas intrínsecas del filamento se conservan, obtenemos:

$$lp^* \propto r^4 \quad (7.1)$$

Esta relación predice que el incremento en lp^* observado luego del tratamiento con latrunculina B implicaría un aumento, en promedio, de $\sim 5\%$ en el radio efectivo de los filamentos. Esta pequeña variación indicaría que sólo una pequeña fracción de los filamentos de vimentina se autoasociarían, formando fibras más gruesas y rígidas luego del tratamiento. Es necesario enfatizar que estos pequeños cambios en la red no podrían ser visualizados mediante microscopía óptica, pero sí podrían ser indirectamente detectados a través del análisis de curvaturas de los filamentos.

En conclusión, en este capítulo, hemos analizado diferentes aspectos de la interacción mecánica entre los filamentos intermedios con los microtúbulos y los filamentos de actina. Si bien los IFs no generan fuerzas *per se*, encontramos que responden activamente a perturbaciones del citoesqueleto, tales como arresto de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos o la despolimerización parcial del citoesqueleto de actina. Este comportamiento implica un rol más complejo, lejos del rol pasivo que típicamente se la ha asignado a los filamentos intermedios en células^{50,59}: elementos amortiguadores que únicamente aportan viscoelasticidad y resistencia mecánica al citoesqueleto.

En el próximo capítulo continuaremos explorando características de interés biológico de los filamentos intermedios que nos permitan comprender mejor las relaciones que establecen con los polímeros del citoesqueleto.

Capítulo 8 - Movilidad de filamentos de vimentina en células vivas

En el capítulo anterior estudiamos algunas propiedades mecánicas de los filamentos de vimentina en células sometidas a diferentes tratamientos farmacológicos que alteran el estado del citoesqueleto. Observamos que la red de vimentina responde activamente compensando, de forma parcial, desbalances mecánicos en el citoesqueleto.

Tal como discutimos en el capítulo 3, el análisis cuantitativo del movimiento de los filamentos en su ambiente natural provee información relevante sobre las propiedades del microentorno y las fuerzas a las que se ven sometidos. Por este motivo, para comprender en más detalle las respuestas de la red de vimentina a condiciones de estrés mecánico, nos propusimos estudiar la movilidad de los filamentos de vimentina en células vivas.

8.1 La movilidad de los filamentos de vimentina es modulada por fuerzas generadas en el citoesqueleto

Para registrar el desplazamiento lateral de los filamentos de vimentina, adquirimos películas confocales de regiones de células BHK que expresaban GFP-vimentina durante ~ 2 min, tomando un cuadro cada 3.3 s. Luego, repetimos estos experimentos en células tratadas con vinblastina o una baja concentración de latrunculina B; en el capítulo 7 hemos descripto que estas drogas provocan el arresto de la dinámica de polimerización/depimerización de los microtúbulos y la depimerización parcial de las fibras de actina, respectivamente. Finalmente, utilizamos la rutina AFTER para recuperar las coordenadas de segmentos de filamentos en cada uno de los cuadros de las películas.

Cuantificamos el movimiento lateral de los filamentos siguiendo un procedimiento similar al descripto en el capítulo 5 (sección 5.9) y que se resume en la figura 8.1. Muy brevemente, calculamos el centro de masa (CM, ec. 5.5) de cada filamento en cada cuadro de la película. Luego, evaluamos los cambios en la forma del filamento a partir del índice de deformación (I_d), definido como:

$$I_d = \frac{L}{L_{media}} \quad (8.1)$$

donde L y L_{media} son las longitudes del segmento del filamento en cada cuadro y la longitud promedio, respectivamente, calculados a partir de los datos de salida del algoritmo AFTER (ec. 2.6).

Dado que esta rutina recupera las coordenadas espaciales de los filamentos de un sector de las imágenes de tamaño constante, los cambios en las longitudes de los filamentos visualizados están

asociados a cambios en su forma. Típicamente, I_d toma valores cercanos a 1. Si este índice permanece acotado entre 0.9 y 1.1 consideramos que la deformación del filamento es pequeña en la ventana temporal analizada y por lo tanto podemos aproximar el desplazamiento del centro de masa al desplazamiento neto del filamento. En caso contrario, el filamento es descartado de los análisis posteriores. Por último, a partir de las trayectorias del CM, calculamos el desplazamiento lateral cuadrático medio (MSDL; ec. 5.6).

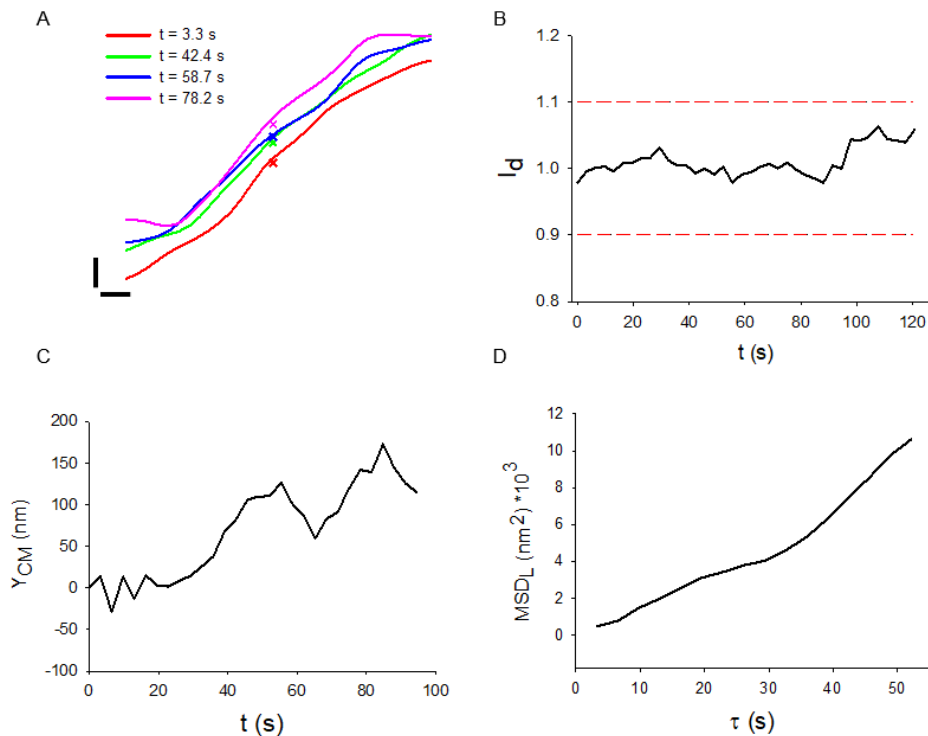


Figura 8.1. Análisis del movimiento de filamentos de vimentina en el citoplasma. A) Formas recuperadas de un único filamento a partir de diferentes cuadros de una película. Las \times indican los centros de masa; barras de escala = 100 nm. B) Índice de deformación en función del tiempo para el filamento mostrado en A). Las líneas rojas indican los límites aceptados para la deformación del filamento. C) Trayectoria del centro de masa del filamento. D) Desplazamiento cuadrático medio lateral del centro de masa del filamento (MSDL) mostrado en C en el intervalo de τ considerado.

Recuperamos segmentos de filamentos con longitudes de 1 – 6 μm para las distintas condiciones estudiadas. En la figura 8.2A se muestra la longitud media de aquellos filamentos cuyas deformaciones se encontraban en el rango aceptado. Luego, calculamos el desvío estándar de I_d para cada filamento, tal como se muestra en la figura 8.2B. Las medianas de estos desvíos se encuentran en el rango 0.02 – 0.03, lo que implica que, entre los diferentes tratamientos, las deformaciones de los filamentos fueron similares.

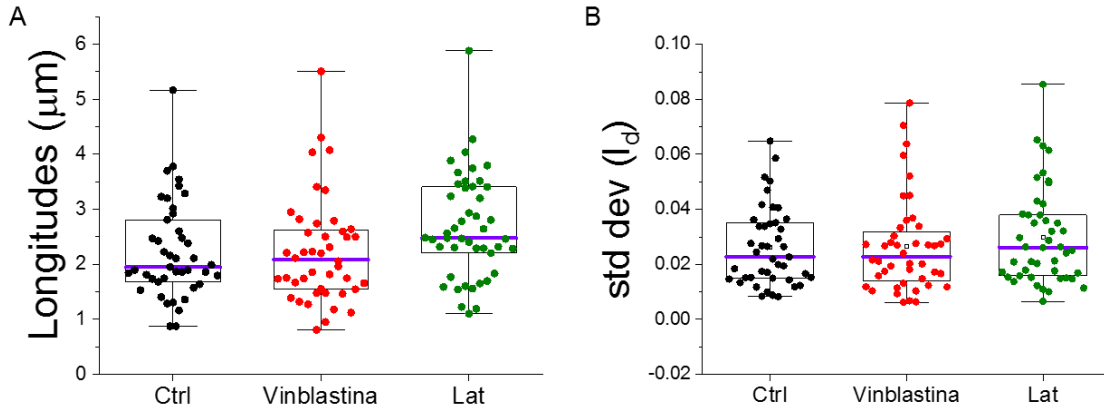


Figura 8.2. Características de los filamentos recuperados. A) Longitudes medias de los filamentos recuperados en células sin tratar (Ctrl; N = 43), incubadas con vinblastina (N = 44) y latrunculina (Lat; N = 45). B) Desvío estándar del Índice de deformación de los filamentos recuperados mostrados en A. La línea violeta en las cajas indica la mediana de las distribuciones.

En una primera aproximación al análisis de movilidad, comparamos el comportamiento promedio de los desplazamientos de los filamentos en cada una de las condiciones estudiadas. Para ello, calculamos el promedio del ensamble del MSD_L para cada valor de τ , tal como se muestra en la figura 8.3. Estos resultados indican que el tratamiento con vinblastina reduce la movilidad de los IFs mientras que en células tratadas con latrunculina B, los filamentos presentan mayor movilidad que en las células control.

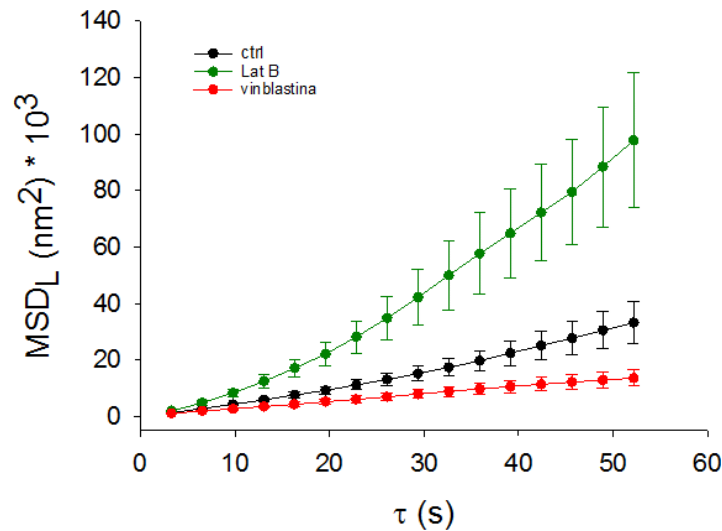


Figura 8.3. Curvas promedio del MSD_L para filamentos intermedios. La movilidad de estos filamentos se estudió en condiciones control (ctrl, ●), tratamiento con vinblastina (Vinbl, ●) y latrunculina B (Lat B, ●), como se indica en el texto. Las barras representan el error estándar del promedio ($N_{ctrl} = 29$, $N_{lat B} = 30$, $N_{vinb} = 35$).

Para explorar en detalle el origen y las características de las fuerzas que actúan sobre los filamentos de vimentina provocando sus desplazamientos, analizamos individualmente cada curva, ya que el análisis realizado en la figura 8.3 puede ocultar, por ejemplo, poblaciones de filamentos con distinto comportamiento.

La figura 8.4A muestra, en ejes logarítmicos, que la mayoría de los MSD_L de los filamentos recuperados presenta un comportamiento lineal en el rango de τ : 3.3 – 45 s, indicando que pueden ser analizados considerando un modelo de difusión anómala (ec. 3.5).

Es importante destacar que, en las determinaciones experimentales, es necesario incluir el término MSD_0 ¹²¹, asociado al error de recuperación de las coordenadas espaciales de los filamentos:

$$MSD(\tau) = MSD_0 + A\tau^\alpha \quad (8.2)$$

donde A es el coeficiente de difusión generalizado y α es el exponente de difusión anómala.

En el capítulo 6 (sección 6.3), mostramos que este error de localización es de ~ 18 nm, equivalente a $MSD_0 = 324$ nm², un valor notablemente por debajo del primer punto de los MSD en cada condición, tal como se muestra en la tabla 8.1.

	Control	Vinblastina	Latrunculina B
MSD_L (nm ²) ^f	1132 ± 165	886 ± 95	1678 ± 144

Tabla 8.1 Valor de la mediana del MSD_L para τ 3.3s.^f El error de las medianas fue calculado mediante la técnica bootstrap (capítulo 5, sección 5.11.2).

Por este motivo consideramos que $A\tau^\alpha \gg MSD_0$ para valores de $\tau > 3.3$ s, por lo que despreciamos el término MSD_0 de la ecuación 8.2 y ajustamos cada MSD_L con la ecuación 3.5.

Dado que los movimientos para $\tau \rightarrow 0$ están asociados a procesos cuyas dinámicas son más rápidas que la tasa de muestreo^{167,221,222}, no podemos observar detalles del comportamiento del MSD para $\tau < 3.3$ s. Además, establecimos la cota máxima para los ajustes de manera tal que no sea superior al 50% del $\tau_{m\acute{a}ximo}$. En consecuencia, ajustamos los MSD_L con la ecuación 3.5 en el rango 3.3 s $< \tau < 43$ s.

La figura 8.4B-C muestra rangos de valores similares del parámetro A obtenido en las distintas condiciones. Mediante la prueba de Kruskal Wallis determinamos que no hay diferencias significativas entre estos valores (ver tabla 8.2), lo que implica que las tasas de movimiento en cada condición son similares. Además, aproximamos las distribuciones de estos valores de manera no paramétrica mediante la función de densidad de probabilidad (capítulo 5, sección 5.11.5). Debido a la asimetría de estas distribuciones, las caracterizamos mediante su mediana, por ser más robusta que la media en estas condiciones²²³.

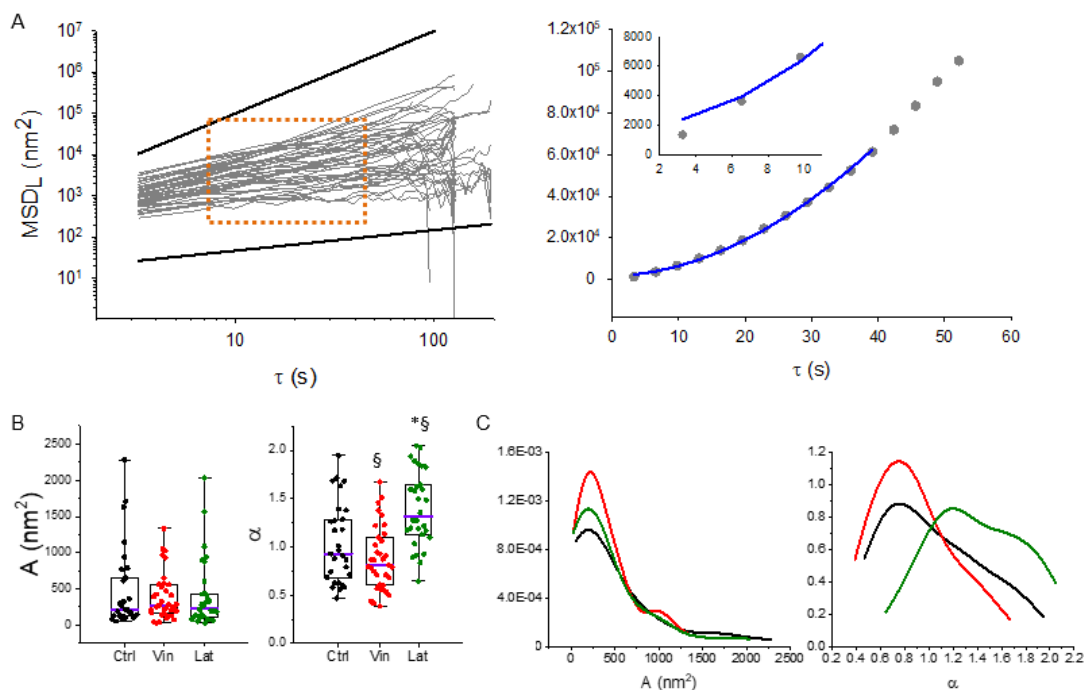


Figura 8.4. Influencia de las redes del citoesqueleto en el movimiento lateral de filamentos de vimentina. A) En el panel izquierdo se muestra la dependencia de MSD_L en función de τ para todas las trayectorias obtenidas en la condición control (—). Las líneas de referencia muestran el comportamiento esperado para difusión anómala con α = 0.5 (abajo) y α = 2 (arriba); el recuadro naranja muestra el rango de τ en el que se hizo el ajuste con la ecuación 8.2. El panel derecho muestra un ejemplo de ajuste de una curva particular con el modelo de difusión anómala y el desvío del primer punto experimental, probablemente asociado a procesos dinámicos rápidos, que no pueden observarse con la velocidad de muestreo utilizada en este experimento. B) Boxplots del parámetro A y el exponente de difusión anómala α obtenidos en condición control (Ctrl, ●, N = 29), Vinblastina (●, N = 35) y Latrunculina B (Lat ●; N = 30). La línea violeta en cada caja muestra la mediana de cada distribución. Los símbolos * y § indican diferencias significativas respecto al control y al valor 1, respectivamente. C) Distribuciones de las funciones de densidad de probabilidad para cada parámetro y condición (mismo código de colores).

Tal como observamos en la figura 8.4, α toma valores en el rango 0.4 – 2 en todas las condiciones evaluadas, sugiriendo que parte de los filamentos de vimentina se encuentran parcialmente restringidos en su movimiento, mientras que otros están sometidos a fuerzas activas. Las distribuciones fueron caracterizadas por su mediana ± error bootstrap. Para el control, obtuvimos una mediana de α de 0.93 ± 0.13, que no resultó significativamente diferente del valor 1 (ec. 5.10). Esto implicaría un movimiento al azar y/o que las fuerzas que actúan sobre los filamentos lo hacen de manera aleatoria, y que no hay una direccionalidad definida en los desplazamientos, en línea con las observaciones realizadas en el capítulo anterior.

Para el tratamiento con vinblastina, la mediana de α es de 0.81 ± 0.06. Dado que este intervalo se superpone con el control, implica que ambas distribuciones no están suficientemente separadas para afirmar que provienen de distribuciones diferentes (fig. 8.4C). Sin embargo, para esta

condición, realizamos una prueba de hipótesis (ec. 5.10) y obtuvimos que la diferencia entre esta mediana y el valor 1 era significativa. Este resultado indicaría que la movilidad de los filamentos de vimentina en células tratadas con vinblastina responde, en su mayoría, a un régimen subdifusivo.

En las células tratadas con latrunculina B, la mediana del parámetro α fue 1.32 ± 0.13 , significativamente diferente al valor obtenido de α en condiciones control y al valor 1. Es decir que, en esta condición, los filamentos se ven más afectados por fuerzas direccionales. La tabla 8.2 compila los valores de cada parámetro en cada una de las condiciones experimentales estudiadas durante este capítulo.

	A (nm ²)	α	N
Control	210 ± 70	0.93 ± 0.13	29
Vinblastina	270 ± 55	0.81 ± 0.06 §	35
Latrunculina B	240 ± 60	1.32 ± 0.13 * §	30

Tabla 8.2. Valores de amplitud (A) y coeficiente α para cada condición experimental analizada. Los valores se informan como mediana de la distribución \pm error bootstrap. Los * indican diferencias significativas respecto al control; los § indican diferencia significativa respecto al valor 1 (régimen difusivo). N corresponde al número de trayectorias analizadas

8.2 Discusión

Hemos descrito anteriormente que la movilidad de los filamentos que componen el citoesqueleto es modulada por diversos factores, entre ellos, por las interacciones con otros filamentos sobre los cuales actúan fuerzas activas^{121,189} como las causadas por motores moleculares durante el transporte de organelas²²⁴, entre otros.

Genéricamente, podemos considerar que la movilidad de los filamentos resulta de las fuerzas operando sobre ellos y los obstáculos/interacciones con elementos del microentorno. En este capítulo encontramos que, al perturbar el citoesqueleto, varían ciertas características de la movilidad de los filamentos, a las que identificamos cualitativamente a partir de los MSD_t promedio y cuantitativamente a través de los parámetros A y α analizados a nivel de filamento único.

El parámetro A combina información de las fuerzas pasivas y activas actuando sobre los filamentos y la respuesta viscoelástica del citoplasma¹⁵⁸. El hecho de que sea indistinto entre las condiciones sugiere que la magnitud de las fuerzas que actúan es, en promedio, similar en todas las condiciones estudiadas; sin embargo, nuestros experimentos revelan ciertas diferencias en el exponente α lo cual sugiere variaciones en la direccionalidad promedio de los movimientos, en la ventana temporal estudiada.

En células control, el valor de la mediana de la distribución de α no fue significativamente distinto a 1, indicando que la movilidad lateral de los filamentos de vimentina tiene características símil-difusivas. Esto sugiere que las fuerzas que operan sobre estos filamentos no favorecen, en

promedio, ninguna dirección. Considerando además que el valor de l_p^* determinado en estas condiciones no es significativamente distinto al medido in vitro, en solución (capítulo 7, sección 7.1), nuestros resultados sugieren que, en promedio, la red de filamentos de vimentina se comporta como una red pasiva.

Sin embargo, la variedad de valores de α obtenidos representan fenómenos de distinta naturaleza: procesos activos con $\alpha > 1$ y procesos subdifusivos con $\alpha < 1$. Parte de esta variedad podría explicarse por el hecho de que sólo recuperamos coordenadas de segmentos y no del filamento completo, del que esperaríamos un movimiento lateral limitado, producto del anclaje a la estructura de la red. Además, los filamentos podrían alternar entre períodos de distinta movilidad que no logramos observar por la limitada ventana temporal analizada. Finalmente, los diferentes tipos de movilidad de los filamentos de vimentina podrían deberse a la ubicación subcelular de los distintos filamentos. En el próximo capítulo, abordaremos estas hipótesis.

Por otra parte, al tratar las células con vinblastina, se reduce la tasa de polimerización y depolimerización de los microtúbulos, lo que implica la pérdida de una fuente de fuerzas activas. Encontramos que el régimen de movimiento predominante se torna subdifusivo ($\alpha < 1$), sugiriendo que los desplazamientos de los filamentos de vimentina se ven obstaculizados, lo que se refleja en el comportamiento promedio como una disminución de la movilidad (fig. 8.3).

En un trabajo anterior, Pallavicini y colaboradores obtuvieron resultados complementarios al observar que la disrupción de la red de vimentina causa un incremento significativo en la movilidad de los microtúbulos, sugiriendo que, en condiciones normales, los IFs restringen el movimiento de los microtúbulos¹²¹. Además, mencionamos previamente un trabajo de Gan y colaboradores⁸⁵ quienes mostraron que la morfología general de la red de vimentina reproduce cualitativamente la forma de la red de microtúbulos.

Las fuerzas activas generadas por los microtúbulos (por ej. polimerización y depolimerización y desplazamiento de motores moleculares) causan movimientos en estos polímeros. Dado que los IFs están mecánicamente acoplados a los microtúbulos, su movilidad es influenciada por la red activa. El arresto de la inestabilidad dinámica de microtúbulos elimina parte de estas fuerzas que operan sobre la red de IFs y su movilidad se ve reducida.

Por otro lado, al tratar a las células con bajas concentraciones de latrunculina B se depolimeriza parcialmente el citoesqueleto de actina. Esto provoca un aumento de la movilidad promedio de los filamentos de vimentina (fig. 8.3). Además, la mediana de $\alpha > 1$, indica que los desplazamientos varían hacia un régimen superdifusivo, por lo que los filamentos de vimentina serían más propensos a la acción de fuerzas activas.

La red de actina, de forma similar a los microtúbulos, producen fuerzas activas que influyen en la movilidad de los IFs por acoplamiento mecánico. En un trabajo previo, Tolić-Nørrelykke y colaboradores¹⁶⁵ analizaron trayectorias de gránulos lipídicos en el citoplasma de levaduras y

reportaron un aumento significativo del parámetro α luego de tratar a las células con citocalasina D (un agente que disrumpe los filamentos de actina).

Este resultado demuestra que los filamentos de actina pueden restringir el movimiento de partículas en el citoplasma. Por ello, planteamos que la depolimerización parcial del citoesqueleto de actina causa pérdidas de sitios de anclaje para los filamentos de vimentina. Esto favorecería la asociación entre filamentos individuales de vimentina para formar estructuras más rígidas (tal como se discute en el capítulo 6), lo que prevendría la deformación excesiva de la célula ¹⁰³. La despolimerización parcial del citoesqueleto de actina modifica el balance de fuerzas sobre los IFs al eliminar una red activa, por lo que las fuerzas no térmicas remanentes, principalmente las generadas en la red de microtúbulos causan mayor impacto en la movilidad de los IFs.

En conclusión, la perturbación de las redes de microtúbulos y actina en células vivas modifica el balance de las fuerzas que actúan sobre los filamentos de vimentina, lo que modifica las características de sus desplazamientos. A partir de los resultados que hemos presentado en este capítulo, y a partir de la relación mecánica entre microtúbulos y filamentos de vimentina (capítulo 1, sección 1.4), planteamos que las fuerzas preponderantes que desplazan lateralmente a los IFs serían originadas por los microtúbulos.

En el próximo capítulo estudiaremos el balance de las fuerzas que operan sobre la red de vimentina y determinan aspectos de sus propiedades mecánicas a nivel intracelular, a partir del análisis de imágenes de superresolución.

Capítulo 9 - Estudio de las propiedades mecánicas de filamentos intermedios en distintas regiones celulares

En el capítulo 1 describimos antecedentes experimentales que sugieren funcionalidades distintas para aquellos filamentos de vimentina que se encuentran en la región perinuclear (esto es, integrando la jaula nuclear de vimentina,²²⁵) y los que se encuentran en la periferia⁷². Mientras que los primeros serían relevantes para proteger al núcleo de estrés mecánico, la segunda población tendría funciones asociadas, entre otras, a la preservación mecánica de la célula y su adhesión al sustrato.

Lamentablemente, la resolución óptica de la microscopía confocal limita la visualización de ciertos detalles de ambas poblaciones, particularmente de la perinuclear, complicando el estudio y la comprensión de aspectos funcionales de los filamentos de vimentina.

Por estos motivos trabajamos en colaboración con el grupo de la Dra. Ilaria Testa (KTH Royal Institute, Estocolmo, Suecia) y estudiamos la red de vimentina con una técnica de superresolución, compatible con el análisis de células vivas. En particular, utilizamos la técnica MoNaLISA (capítulo 3, sección 3.3) que permite obtener imágenes de especímenes vivos con 45-65 nm de resolución espacial, en función del tiempo. Todas las imágenes analizadas en las siguientes secciones fueron adquiridas por la Dra. Francesca Pennacchiotti en el KTH Royal Institute (Estocolmo, Suecia).

9.1 Longitud de persistencia aparente de filamentos de vimentina en la región perinuclear y la periférica

En el capítulo 7 describimos que la rigidez aparente de los filamentos de vimentina es modulada por las redes de actina y microtúbulos, evidenciando una comunicación mecánica entre estos polímeros del citoesqueleto.

A partir de este resultado, nos preguntamos si los filamentos de vimentina que conforman la jaula nuclear presentan interacciones diferentes con las otras redes del citoesqueleto, en comparación a aquellos filamentos periféricos.

Dado que el valor de l_p^* permitió detectar cambios en estas interacciones (capítulo 7), decidimos cuantificar este parámetro en estos dos grupos de filamentos. Por las limitaciones ya mencionadas en cuanto a la resolución de la microscopía confocal, adquirimos y analizamos imágenes obtenidas por microscopía MoNaLISA de células U2OS que expresan vimentina-rsEGFP2 endógenamente¹⁸³. Para visualizar la posición del núcleo, estas células fueron incubadas con la sonda fluorescente Sir-Hoechst y, previo a la adquisición de las imágenes MoNaLISA, se registraron imágenes confocales del núcleo celular, tal como se indica en el capítulo 5 (sección 5.6.2).

Es importante destacar que, para los experimentos descritos en este capítulo, seleccionamos células que no presentan desplazamientos sustantivos en las escalas temporales estudiadas. En una etapa posterior, nos propondremos realizar experimentos similares durante la migración, ya que las fuerzas asimétricas involucradas en este proceso pueden afectar en forma no-homogénea el comportamiento de los IFs de vimentina.

La figura 9.1 muestra una imagen representativa obtenida en estos experimentos. Tal como mencionamos en el capítulo 3 (sección 3.3), MoNaLISA permite observar detalles de la red de vimentina no accesibles a la microscopía confocal.

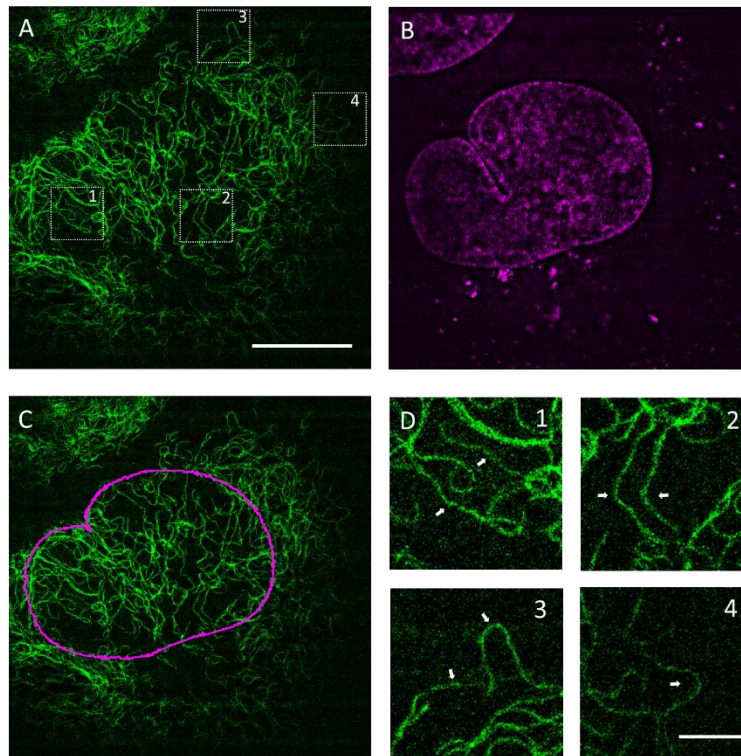


Figura 9.1. Red de vimentina. A) Imagen obtenida mediante microscopía MoNaLISA de la red de vimentina de una célula U2OS que expresa endógenamente vimentina-rsEGFP2. Barra de escala = 10 μm . B) Imagen confocal del núcleo marcado con Sir-ADN. C) Delimitación del contorno nuclear sobre la red de vimentina. Los filamentos dentro de esta área fueron considerados perinucleares y los externos, periféricos. D) Detalles de filamentos de vimentina de las regiones recuadradas en A) cuyas coordenadas fueron recuperadas con AFTER (flechas blancas). Barra de escala = 2 μm .

Como primer paso, clasificamos los filamentos como perinucleares y periféricos, dependiendo de su localización intracelular. Para ello, generamos una máscara a partir de la imagen confocal del núcleo y consideramos perinucleares a los filamentos comprendidos en el área ocupada por el núcleo y periféricos al resto (fig. 9.1C).

Posteriormente, seguimos los procedimientos descritos en el capítulo 6 para el análisis de imágenes y la obtención de l_p^* .

El análisis de Fourier de ambos ensambles de filamentos mostró el comportamiento esperado por la ecuación 2.10 (fig. 9.2). La tabla 9.1 muestra que el valor de l_p^* para la región periférica fue ~40 % mayor que el obtenido en la región perinuclear; por otra parte, ambas l_p^* se encuentran en el rango de la obtenida a partir del análisis de imágenes confocales de células BHK (2.2 μm ; capítulo 7, sección 7.1).

Esta diferencia en l_p^* sugiere que los filamentos periféricos presentan menos curvaturas que aquellos de la región perinuclear. Una hipótesis que podría explicar estas diferencias es que los filamentos periféricos se encuentran asociados -en mayor medida que los perinucleares- a filamentos de actina y microtúbulos ²¹⁸ y, tal como se describió en los capítulos 7 y 8, estas estructuras se encuentran constantemente expuestas a tensiones que son indirectamente transmitidas a los filamentos de vimentina asociados, lo que derivaría en una menor curvatura de los filamentos que integran la red periférica.

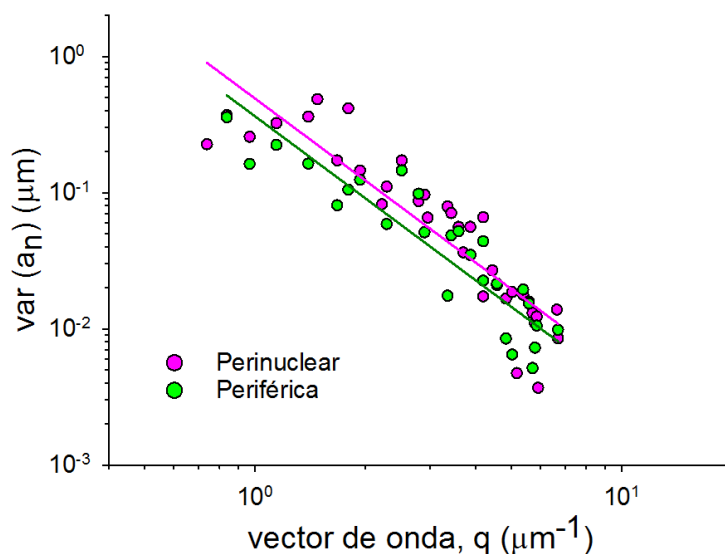


Figura 9.2. Análisis de Fourier de los filamentos perinucleares (●, N= 135) y periféricos (●, N= 115). $N_{\text{células}} = 10$.

Línea celular	l_p^* (μm)	Microscopía
BHK	2.2 ± 0.2	Confocal
U2OS	2.0 ± 0.2 perinuclear	MoNaLISA
	2.8 ± 0.3 periferia	

Tabla 9.1. Comparación entre l_p^* obtenida mediante diferentes microscopías y células.

En este marco, decidimos estudiar la movilidad de los filamentos en ambas regiones para obtener información relacionada con los microentornos de los filamentos y las fuerzas que indirectamente actúan sobre ellos.

9.2 Movilidad lateral intrínseca de los filamentos de vimentina

Como punto de partida, registramos imágenes de células U2OS expresando vimentina-rsEGFP en función del tiempo. Debemos destacar que una de las ventajas principales de MoNaLISA sobre otras microscopías de superresolución es su capacidad de adquirir imágenes de campos amplios de la muestra en muy poco tiempo, con una relación S/N muy alta y mínimo fotodaño¹⁴⁵. De esta forma, obtuvimos imágenes de células enteras con una velocidad de adquisición de 1 cuadro cada 1.94 s durante 40 s.

De acuerdo a antecedentes de nuestro grupo, los tiempos característicos de movimientos laterales de microtúbulos se encuentran en el rango 10-100 s²²⁶ sugiriendo que la red de microtúbulos puede considerarse como cuasi-estática en la escala temporal de estos experimentos. Por otro lado, las fluctuaciones de la red de actina producto de la actividad de motores moleculares miosinas, estarían en el orden de milisegundos a segundos¹⁵⁸. Por este motivo, consideramos que los experimentos que realizaremos en esta ventana temporal pueden proveer información de los movimientos intrínsecos de los IFs de vimentina en un citoplasma en el cual las fuerzas que pueden fluctuar son originarias en la red de actina.

Las regiones de los filamentos analizados a partir de las imágenes MoNaLISA tuvieron longitudes entre 0.5 – 6.5 μm y tanto los índices de deformación (I_d ; ec. 8.1) como sus respectivos desvíos estándar se encontraron dentro del rango aceptable (capítulo 8, sección 8.1).

A partir de las posiciones de los filamentos recuperadas con el algoritmo AFTER, cuantificamos el movimiento de los filamentos analizando el MSD_L , tal como mostramos en el capítulo 8 (sección 8.1). La figura 9.3A compila los MSD_L obtenidos para filamentos pertenecientes a ambas regiones estudiadas, en ejes logarítmicos.

Inspeccionamos individualmente los MSD_L de los filamentos recuperados y observamos que el MSD_L presenta un primer plateau, característico de un comportamiento confinado, en el 54% de las curvas perinucleares y el 68% de las periféricas (fig. 9.3B). Los datos restantes mostraron comportamientos variables; una alta proporción de ellos pudo ser clasificada como difusión anómala, tal como se profundizará en la siguiente sección.

El movimiento lateral confinado a una región espacial (capítulo 3, sección 3.4) es esperado para filamentos “anclados” a otras estructuras estáticas en la ventana temporal estudiada. Estos resultados sugieren que, en estos casos, no hay fuerzas activas actuando sobre los filamentos que promuevan su desplazamiento por fuera de la región confinada. En este sentido, el análisis de la dinámica de los filamentos en el régimen confinado podrá proveer información del movimiento intrínseco de los filamentos en su microentorno, como veremos más adelante.

Por otra parte, la mayor proporción de filamentos confinados en la región periférica sugiere una mayor interconexión de estos filamentos a estructuras estáticas en la escala temporal estudiada. Esta observación podría ser explicada por el alto grado de conectividad entre los filamentos de vimentina y microtúbulos, descrita en los capítulos anteriores (capítulos 7 y 8).

Luego del plateau, las curvas de MSD_L muestran comportamientos muy variados probablemente asociados a otros procesos activos que directa o indirectamente modifican la dinámica del filamento. Este tipo de transiciones entre distintos regímenes de movilidad es muy frecuente en el interior celular ya que las partículas o estructuras en estudio se ven expuestas a una gran variedad de procesos activos y pasivos en distintas escalas temporales¹⁵⁸. Aquellas curvas de MSD_L vs τ que presentan el plateau fueron analizadas utilizando la ecuación 3.6 (capítulo 3, sección 3.4) que considera difusión en un “corral” de dimensiones conocidas.

Los datos experimentales fueron ajustados individualmente entre $\tau = 1.94$ s y τ_{corte} , parámetro que fue determinado visualmente como el tiempo máximo de duración del plateau. La figura 9.3B muestra, a modo ilustrativo, dos curvas obtenidas a partir de trayectorias experimentales que mostraron un comportamiento confinado junto con los ajustes correspondientes.

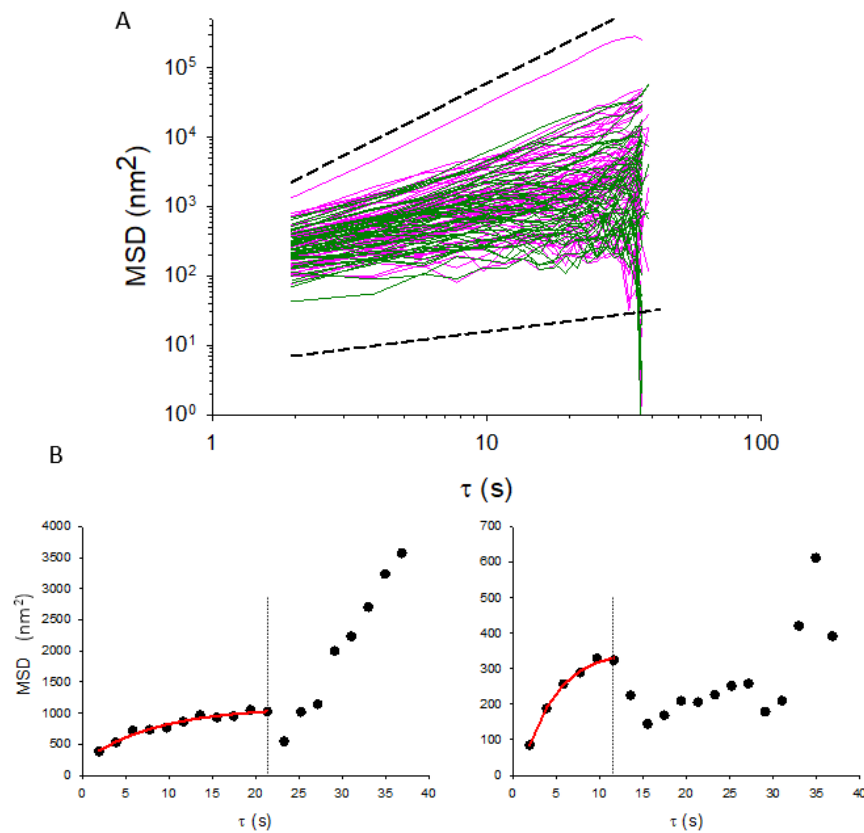


Figura 9.3. Características de los desplazamientos de filamentos de vimentina. A) MSD_L para los filamentos perinucleares (— magenta) y periféricos (— verde). Las líneas de referencia (—) muestran comportamientos difusivos anómalos con $\alpha=2$ (arriba) y $\alpha=0.5$ (abajo). B) Ejemplos de la dependencia de MSD_L con τ y el ajuste obtenido en cada caso utilizando la ecuación 3.6 (líneas rojas). Las líneas punteadas indican el τ_{corte} elegido en cada caso.

A partir de los ajustes de las curvas experimentales con comportamiento confinado, se obtienen los parámetros rc , A_1 , y t_c . Posteriormente, caracterizamos las distribuciones de estos parámetros mediante su función de densidad de probabilidad (fig. 9.4) y, en primera instancia, comparamos el

valor de la mediana de cada uno de los parámetros en las regiones perinuclear y periférica (tabla 9.2).

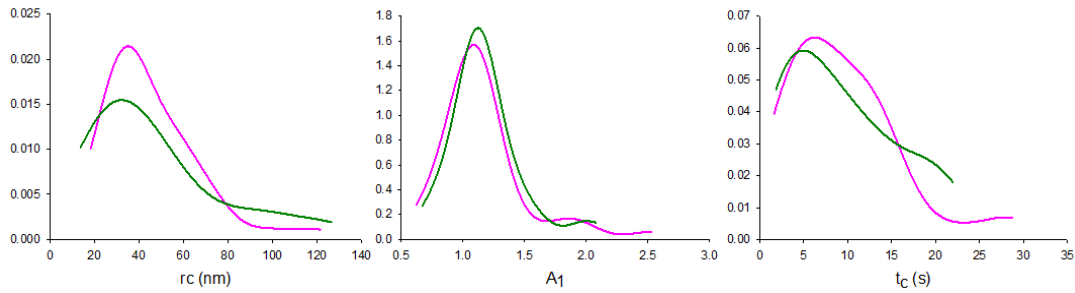


Figura 9.4. Distribuciones de parámetros de los ajustes al modelo corral. Gráficos de la función de densidad de probabilidad para el radio del corral (rc), A_1 y tiempo característico (t_c). Las — curvas magenta corresponden a la región perinuclear mientras que las — verdes a las periféricas.

	N	% corrales	rc (nm)	A_1	t_c (s)	τ_{corte} (s)
Perinuclear	39	54	38.9 ± 3.4	1.12 ± 0.04	8.3 ± 1.5	17.5 ± 0.5
periférica	34	68	38.4 ± 4.7	1.14 ± 0.02	8.1 ± 1.6	18.4 ± 1.4

Tabla 9.2. Difusión confinada de filamentos intermedios. Estadísticas relevantes y valores de las medianas de los parámetros de difusión confinada, clasificados de acuerdo con su región subcelular. Expresados mediante su mediana \pm error bootstrap.

La tabla 9.2 muestra que no hay diferencias significativas en los parámetros determinados en las regiones perinuclear y periférica, sugiriendo que la movilidad de los filamentos en esta escala temporal es similar en ambas regiones.

Por otra parte, en estas regiones celulares el radio del corral estimado es ~ 40 nm. Si consideramos que el diámetro de un filamento de vimentina es de ~ 11 nm²²⁷, el movimiento del CM se encuentra restringido a una distancia equivalente de 7 veces dicho diámetro.

Buscamos además estimar el coeficiente de difusión dentro del corral en ambas regiones, parámetro que será de utilidad en las simulaciones que mostraremos en la sección 9.4. De acuerdo a la bibliografía¹⁶⁴ y considerando difusión al azar dentro del corral, el valor de D se puede estimar a partir de la siguiente ecuación:

$$D = \frac{rc^2}{2t_c} \quad (9.1)$$

Analizamos la relación entre el área del corral y el tiempo característico, tal como se muestra en la figura 9.5. Ajustamos los grupos de datos con una función lineal y , a partir de la pendiente estimamos el coeficiente de difusión obteniendo valores de $(270 \pm 40) \text{ nm}^2/\text{s}$ y $(250 \pm 70) \text{ nm}^2/\text{s}$ para las regiones perinuclear y periférica, respectivamente.

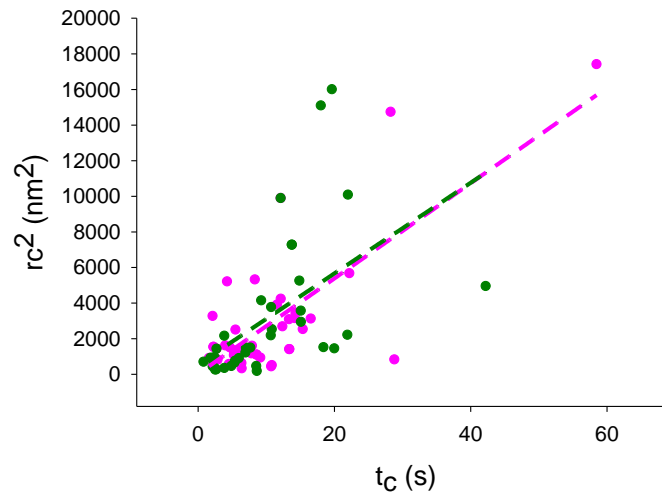


Figura 9.5. Estimación del coeficiente de difusión en los corrales. Los datos de los filamentos perinucleares se muestran en magenta (●) mientras que los periféricos en verde (●). Los ajustes para cada región se muestran en línea cortada con el mismo código de colores (R^2 de 0.56 y 0.29, respectivamente).

Debemos mencionar que estos valores se derivan a partir de datos con una gran dispersión (probablemente por variaciones intercelulares) por lo cual estos valores de D proveen únicamente una estimación de los procesos difusivos en el microentorno a los filamentos de vimentina.

9.3 Movilidad lateral de filamentos de vimentina: influencia de procesos activos intracelulares

En una etapa siguiente, decidimos explorar la movilidad de los filamentos de vimentina en una ventana temporal más grande que la utilizada en los experimentos descritos en la sección anterior. En la ventana temporal utilizada en estos experimentos (30 – 600 s), esperamos que los movimientos activos de microtúbulos ya sean evidentes, tal como referimos anteriormente. Por estos motivos, consideramos que los nuevos experimentos proveerán información relevante del acoplamiento de los IFs con las otras redes que componen el citoesqueleto. Todos los procedimientos experimentales fueron similares a los descritos en la sección anterior, con la excepción de que las imágenes MoNaLISA se adquirieron a una frecuencia de un cuadro cada 30 s durante 10 min.

Al analizar los MSD_L de forma individual observamos que el 70% de estas curvas sigue un comportamiento del tipo difusivo anómalo (fig.9.6A). Para recuperar información cuantitativa, procedimos de la misma forma que lo indicado en el capítulo 8 (sección 8.1) y ajustamos la ecuación 3.5 en el intervalo de $\tau = [60 - 240]$ s, ventana temporal en la cual no se ven transiciones entre regímenes dinámicos distintos (fig. 9.6A-B). Recordemos que los parámetros de este modelo son el

coeficiente de difusión generalizado (A) y el exponente de difusión anómalo (α). Tal como mencionamos en el capítulo 8, excluimos al primer punto del MSD_L pues está influido por fenómenos cuyas dinámicas son más rápidas que la tasa de muestreo experimental. Además, determinamos la cota máxima de τ para los ajustes de manera tal que los datos incluidos en el análisis (50% del $\tau_{m\acute{a}ximo}$) sean robustos estadísticamente.

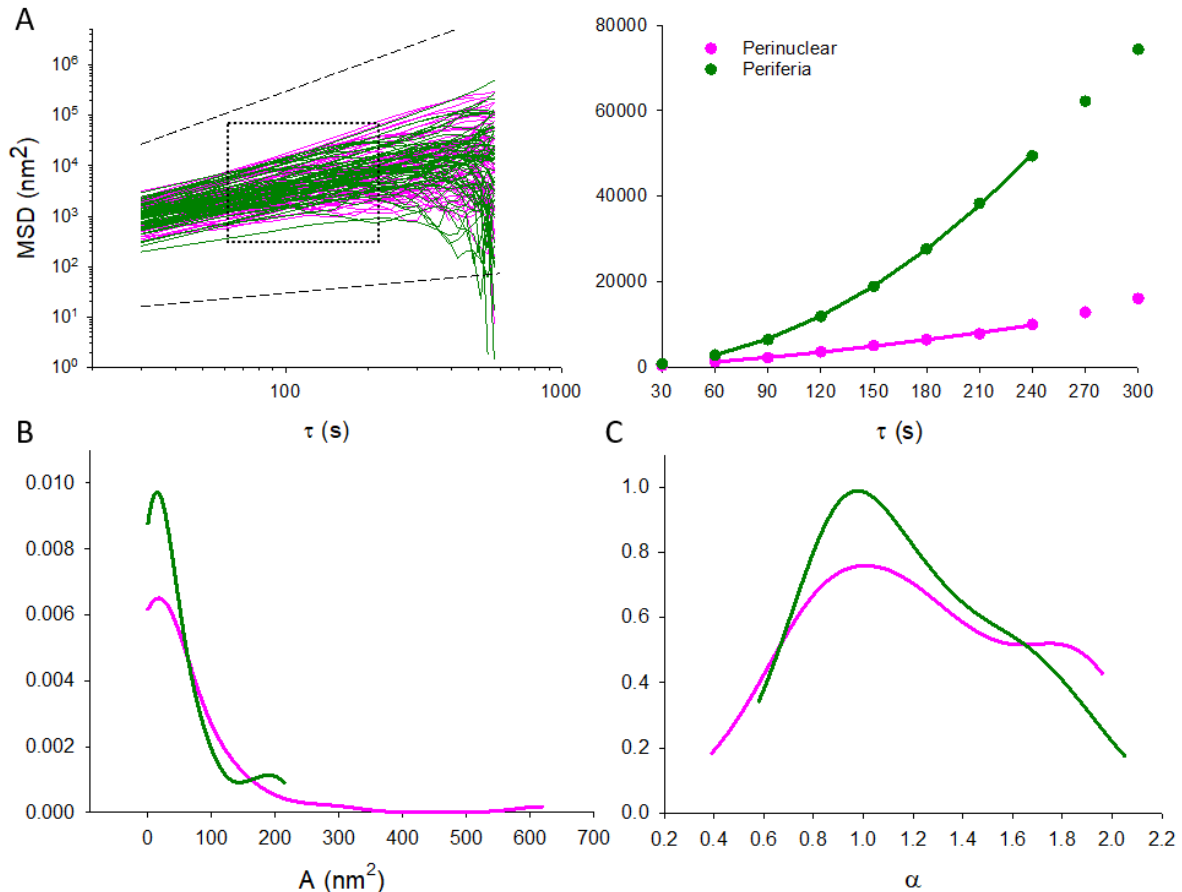


Figura 9.6. Dinámica de los filamentos de vimentina en las regiones perinuclear y periférica. A) El panel izquierdo muestra los MSD_L obtenidos para los filamentos perinucleares (— magenta) y periféricos (— verde). Las líneas de referencia (—) muestran el comportamiento esperado para difusión anómala con $\alpha=0.5$ (abajo) y $\alpha=2$ (arriba). El recuadro negro muestra el rango de τ en el que se hizo el ajuste con la ecuación 3.5. El panel derecho muestra dos ejemplos de MSD_L (círculos) con sus respectivos ajustes al modelo de difusión anómala (líneas). B) Distribuciones de los parámetros obtenidos a partir del ajuste de la ecuación 3.5 a los datos experimentales.

Caracterizamos las distribuciones de los parámetros A y α mediante su función de densidad de probabilidad y no observamos diferencias cualitativas en estas distribuciones (fig. 9.6 C-D). En forma similar a lo realizado en la sección anterior, computamos las medianas para cada región subcelular y, tal como se muestra en la tabla 9.3, no encontramos diferencias significativas entre los parámetros. Estos resultados sugieren que, en esta escala temporal, la movilidad de los filamentos es similar entre regiones.

	N	A	α
Perinuclear	45	18 ± 5	1.1 ± 0.1
Periferia	44	20 ± 7	1.1 ± 0.1

Tabla 9.3. Valores de amplitud (A) y exponente α para cada región subcelular. Los valores se expresan como mediana \pm error bootstrap.

La figura 9.6 muestra que α presenta una distribución ancha, abarcando valores en el rango 0.5-2, aproximadamente. Esta gran variedad de valores sugiere que los filamentos de vimentina se encuentran en microambientes muy variados, expuestos a fuerzas activas que actúan transientemente, probablemente intercalados con períodos de movimientos pasivos.

Comparamos además estos resultados con aquellos obtenidos en células BHK (capítulo 8, fig. 8.4). A pesar de la diferencia de líneas celulares, metodologías empleadas y ventanas temporales analizadas, observamos que ciertas propiedades dinámicas son similares, por ejemplo, la distribución y valores característicos de α .

Nos preguntamos además si la clasificación arbitraria de los filamentos en perinucleares o periféricos podría ocultar dependencias espaciales de la distribución de parámetros. Por este motivo, realizamos un mapa celular de los parámetros A y α , tal como se muestra en la figura 9.7 (página siguiente). Esta figura no muestra una correlación evidente entre la ubicación de los filamentos y los parámetros recuperados sugiriendo que la variabilidad observada no se relaciona con la localización de los filamentos en el interior celular.

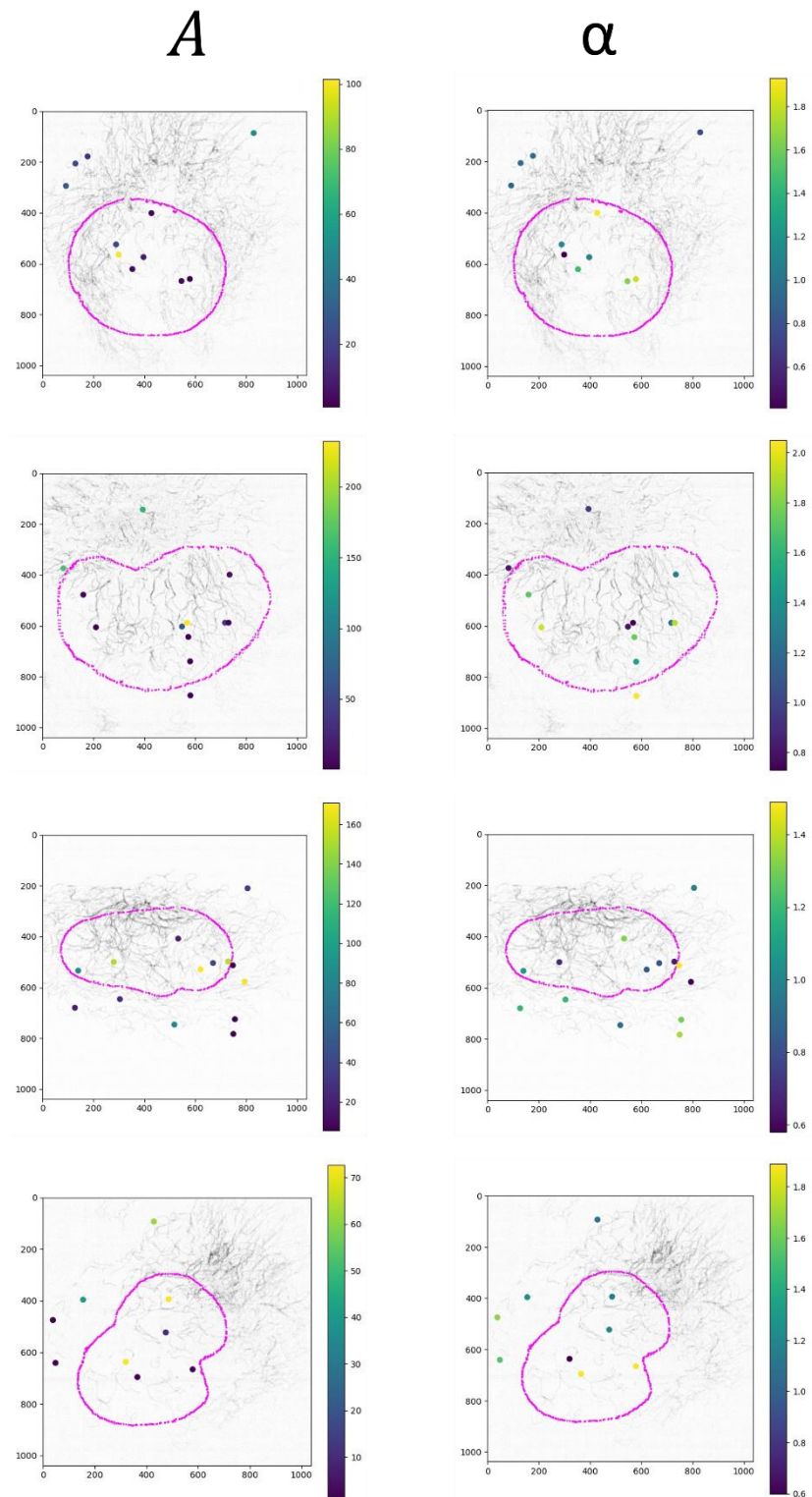


Figura 9.7. Mapas de parámetros de difusión anómala en células vivas. Disposición de los parámetros A , y α en células U2OS. La línea punteada magenta indica el contorno de los núcleos de cada célula. La localización de los puntos corresponde a las coordenadas del CM de cada filamento. En cada caso el valor del parámetro está codificado por el gradiente de colores correspondiente.

Finalmente, analizamos si existía alguna correlación entre los parámetros obtenidos (fig. 9.8) y, sorprendentemente, observamos que aquellas trayectorias que presentaban una gran direccionalidad (i.e. valores altos de α) mostraban bajos valores de A , indicando que el proceso responsable del movimiento del filamento es más lento. Esta dependencia podría ser consecuencia de la competencia entre dos procesos dinámicos distintos actuando sobre los filamentos. Estudiaremos en detalle esta hipótesis en la siguiente sección.

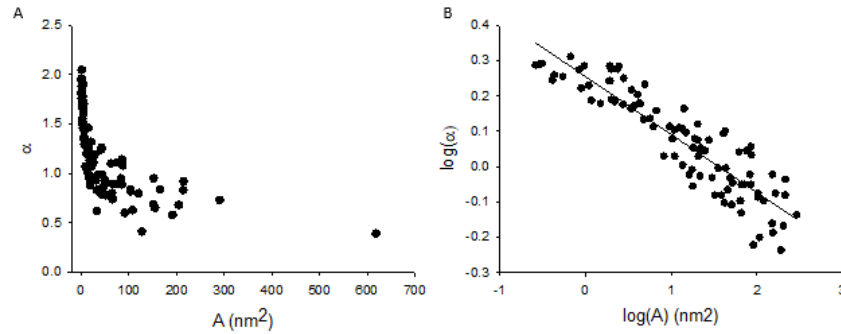


Figura 9.8. Relación entre los parámetros del modelo de difusión anómala. A) Gráfico de los parámetros obtenidos de los ajustes de MSD_L con la ecuación 3.4. B) Logaritmos de los valores mostrados en A) mostrando un ajuste lineal.

9.4 Simulaciones numéricas de los desplazamientos laterales

Para comprender en detalle las observaciones realizadas en la sección anterior, realizamos simulaciones numéricas, tal como se describe en el capítulo 5 (sección 5.8.2).

Mencionamos previamente que los resultados observados en la figura 9.8 pueden ser consecuencia de una competencia entre dos procesos responsables del movimiento de los filamentos. En este sentido y, de acuerdo con los datos obtenidos previamente, consideramos un modelo en el cual el filamento se mueve lateralmente dentro de un espacio confinado (i.e. un corral) y, esporádicamente, sufre la acción de fuerzas activas direccionales (i.e. aquellas transmitidas por los otros filamentos del citoesqueleto) que actúan transientemente.

Brevemente, la simulación considera un filamento que se mueve lateralmente y cuyo centro de masa realiza una caminata aleatoria con pasos de tamaño l explorando el espacio del corral de tamaño Rc donde se encuentra confinado. Luego de un tiempo t_c se le permite al filamento dar un salto de longitud $l_{salto} > l$. La dirección del salto (positiva o negativa) se sortea con una probabilidad $p(salto)$. La simulación termina al alcanzar los 600 segundos, en línea con los experimentos mostrados en la sección 9.3. Los parámetros utilizados se resumen en la tabla 9.4.

Parámetro	Valor	Definición
dt	10^{-4} s	Paso temporal de la simulación.
D	250 nm ² /s	Coefficiente de difusión dentro del área de confinamiento.
I	$I=2Ddt$	Tamaño de los pasos del movimiento aleatorio confinado determinado.
l_{salto}	$10 - 120$ nm	Salto de mayor longitud
R_c	$10 - 60$ nm	Radio del área confinada.
$p(salto)$	$0.5 - 1$	Probabilidad de patadas en la dirección positiva.
t_c	$10 - 30$ s	Intervalo temporal entre patadas mayores sucesivas.

Tabla 9.4. Resumen de parámetros implementados en las simulaciones numéricas.

Los valores de los parámetros D , R_c y t_c fueron tomados de los valores obtenidos experimentalmente. Los valores de los parámetros $p(salto)$, l_{salto} e I se variaron en las simulaciones buscando que las trayectorias simuladas representaran adecuadamente a los resultados experimentales.

Las trayectorias simuladas se analizaron de la misma forma que las experimentales: calculamos sus MSD, inspeccionamos las curvas individualmente y las ajustamos al modelo de difusión anómala. En menor proporción se observaron curvas con comportamiento confinado y fueron descartadas. En la figura 9.9 se muestran algunas trayectorias simuladas y experimentales y sus respectivos MSD.

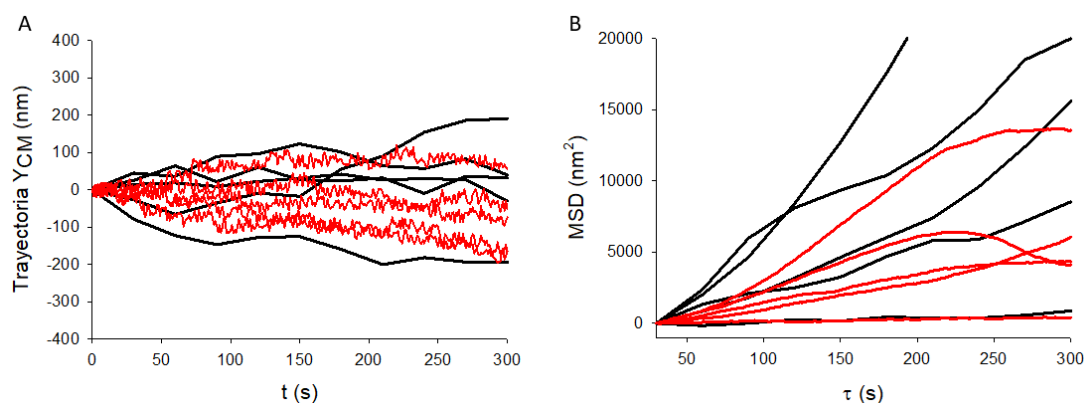


Figura 9.9. Trayectorias y MSDL experimentales y simuladas. A) Trayectorias representativas del CM. La aparente oscilación de las curvas en rojo se debe a la mayor frecuencia de muestreo respecto de las negras. Los parámetros de estas simulaciones corresponden a la mayor similitud con los resultados experimentales. B) MSDL de las respectivas trayectorias de A). En ambos casos las líneas negras (—) representan datos experimentales mientras que las rojas (—) simulados.

De todo el rango de parámetros explorados, observamos que el conjunto con $p(salto) = 0.5$, $l_{salto} = 10$ nm, $R_c = 20$ nm y $t_c = 18$ s, resultó el que mejor aproximaba a los resultados experimentales.

Tal como se muestra en la figura 9.10, los parámetros obtenidos de los ajustes de los MSD_L simulados se distribuyen de forma similar a los parámetros experimentales (que incluía perinucleares y periféricos); en particular, estas simulaciones logran recuperar las formas de las distribuciones y la gran dispersión del parámetro α observada en los experimentos.

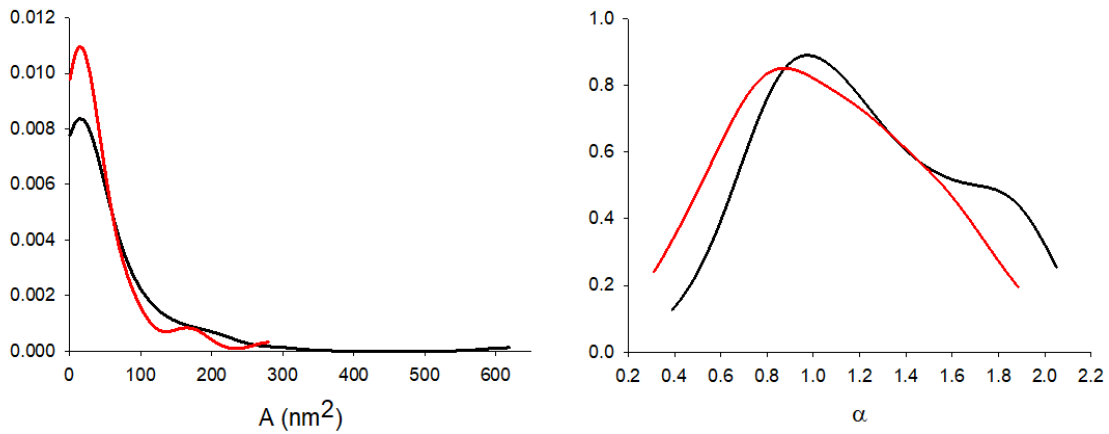


Figura 9.10. Distribuciones de los parámetros de difusión anómala para el conjunto de parámetros que mejor aproxima los resultados experimentales. Comparaciones de los A y alfa obtenidos al analizar MSD_L experimentales y simulados. En ambos casos las líneas negras (—) representan datos experimentales mientras que las rojas (—) datos simulados.

Finalmente, la relación entre A y α para las trayectorias simuladas también muestra la misma tendencia que la observada para los datos experimentales tal como se muestra en la figura 9.11.

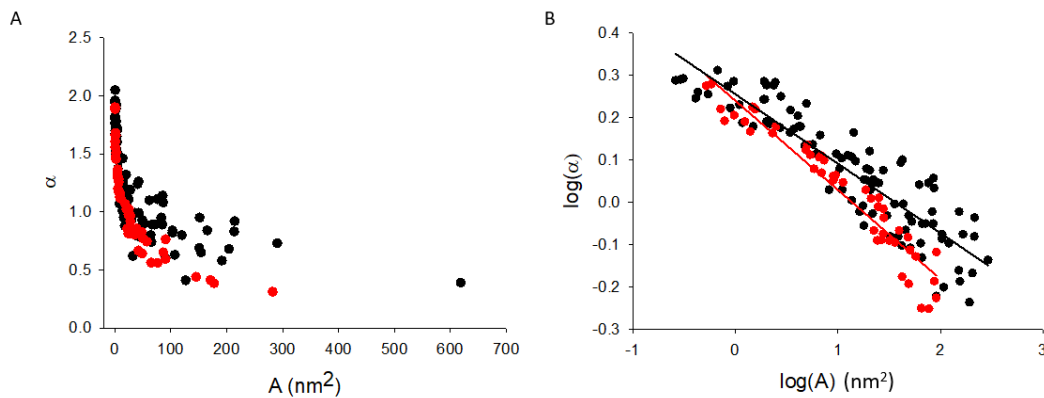


Figura 9.11. Relación entre parámetros del modelo de difusión anómala. A) Comparación de la relación entre los A y α obtenidos de los ajustes de MSD_L experimentales (círculos negros) y simulados (círculos rojos). B) Logaritmos de los valores mostrados en A) mostrando ajustes lineales.

9.5 Discusión

Las fuerzas internas y externas que actúan sobre las células afectan sus propiedades mecánicas locales y globales. En un trabajo anterior, Maniotis y colaboradores ⁷⁸ demostraron que los filamentos intermedios por sí solos son suficientes para transmitir perturbaciones mecánicas generadas en la membrana hacia el núcleo.

En diversos trabajos anteriores, se ha mapeado la elasticidad celular hallando que esta varía entre 5 - 8 veces a lo largo de la célula, siendo menor en el núcleo e incrementándose hacia la periferia²²⁸. Resultados similares se han reportado para células que migran, en las que el extremo posterior es dos veces más elástico que el frente de avance ²²⁹ (ver figura 1.13).

Tal como mencionamos en el capítulo 1, Patten y colaboradores ⁷² postularon que los filamentos de vimentina que conforman la jaula nuclear tienen diferentes funciones que aquellos filamentos periféricos, que están principalmente asociados al resto de los polímeros que componen el citoesqueleto y brindan soporte mecánico a la célula.

Nuestros resultados muestran que algunas propiedades mecánicas de la red de vimentina son diferentes en la región perinuclear y la periferia celular.

En particular, los filamentos periféricos muestran curvaturas menores que los perinucleares, lo que implica una mayor rigidez aparente. Una posible explicación a esta observación sería un mayor grado de interacción de los IFs periféricos con las otras redes del citoesqueleto debido a la distribución inhomogénea de los filamentos de actina y los microtúbulos en las células.

Por otra parte, observamos una mayor cantidad de trayectorias confinadas para los filamentos periféricos; este resultado es compatible con una mayor asociación a estructuras estáticas en la ventana temporal estudiada (probablemente microtúbulos), que restringen el movimiento.

En ventanas temporales del orden de minutos, los desplazamientos de los filamentos de vimentina presentan comportamientos sub y superdifusivos, debido a la acción de fuerzas activas actuando sobre ellos. Dado que en esta escala temporal los movimientos laterales de microtúbulos son apreciables, planteamos que éstos podrían ser generadores de fuerzas que afectan la movilidad de los filamentos de vimentina.

Finalmente, mediante simulaciones numéricas, integramos información sobre ambas dinámicas y observamos una relación entre los parámetros A y α que indica que los desplazamientos más procesivos son más lentos que aquellos difusivos. Esta relación sugiere que los filamentos de vimentina se encuentran sometidos a fuerzas activas que compiten con los procesos difusivos, aún en células que no se encuentran expuestas a situaciones de estrés mecánico.

Capítulo 10 - Conclusiones generales

El citoesqueleto de las células eucariotas está compuesto por tres tipos de polímeros semiflexibles y proteínas reguladoras, que está en constante remodelación y permite que las células cambien su forma, se desplacen y se dividan, entre otras funciones ¹. Existe un gran interés en diseccionar aspectos fundamentales de la organización y las funciones del citoesqueleto en células vivas dada su relevancia en procesos biológicos muy diversos.

Si bien los filamentos intermedios han sido los componentes del citoesqueleto menos estudiados, sus llamativas propiedades mecánicas despertaron interés, por lo que fueron examinadas principalmente en preparaciones *in vitro*. Estos estudios sugirieron que la red de IFs era un componente esencial que, pasivamente, contribuía a la preservación mecánica de la célula ^{50,59}.

El estudio de los filamentos intermedios en células vivas proveyó sustento experimental a esta hipótesis ⁶¹ y simultáneamente aportó evidencias notables del involucramiento de los IFs en funciones que exceden el mero aporte de viscoelasticidad y soporte mecánico y que, en muchos de los casos, requieren de una comunicación mecánica con el resto del citoesqueleto ⁶³.

En este sentido, en esta tesis nos propusimos estudiar ciertas propiedades mecánicas y dinámicas de los filamentos intermedios en células vivas que pueden proveer información valiosa para comprender sus roles en la función celular. Nos enfocamos en el IF vimentina, debido a su importancia en la definición de la morfología celular, motilidad y adhesión, claves en procesos tales como progresión tumoral con expansión metastásica.

Para desarrollar este trabajo, en primera instancia, adaptamos la rutina AFTER y el análisis de Fourier al estudio de la red de vimentina en células (capítulo 5). A partir de estas modificaciones, pudimos determinar la longitud de persistencia aparente de los filamentos de vimentina en células vivas. A pesar de que las células son sistemas fuera del equilibrio, encontramos que las curvaturas de estos filamentos se distribuyen de forma símil-térmica y que su l_p^* es similar a la l_p *in vitro*. Esto sugiere que la red de vimentina no estaría expuesta a fuerzas netas constantes, a pesar de que esta red se encuentra interactuando con los restantes biopolímeros del citoesqueleto que sí generan fuerzas.

Para comprender en detalle estos resultados, exploramos la influencia de las redes de microtúbulos y actina sobre la longitud de persistencia y la movilidad de filamentos de vimentina (capítulos 6 Y 7). En este estudio, observamos que tanto la l_p^* como la movilidad de los IFs depende de la interacción con microtúbulos. Si bien la depolimerización de estos últimos no produce cambios en la l_p^* de vimentina, el arresto de su inestabilidad dinámica provoca un aumento de la rigidez aparente de la red de vimentina. Además, en esta condición, la movilidad de los IFs disminuye sugiriendo una transferencia de tensión generada en los microtúbulos hacia los IFs. Estos resultados se encuentran en línea con otras evidencias que sugieren que los filamentos intermedios refuerzan mecánicamente a los microtúbulos y preservan su organización intracelular.

La depolimerización parcial de la red de actina ocasionó un aumento en la l_p^* de la red de vimentina y un aumento de la movilidad de estos filamentos. Por eso concluimos que la ausencia de una fracción de las fibras de actina liberaría a los filamentos de vimentina de puntos de anclaje, lo que facilita su agregado en fibras más rígidas que compensan la pérdida de sostén de la célula. Estos resultados van en línea con el trabajo de Costigliola y colaboradores ⁹⁷ en el que demuestran la formación de fibras de vimentina alineadas con protrusiones de membrana en la dirección de migración orientando las fuerzas de tracción.

En conjunto, estos resultados muestran un acoplamiento mecánico de los filamentos de vimentina con los microtúbulos y los filamentos de actina. Estas últimas dos redes generan fuerzas activas que son transmitidas a los filamentos de vimentina afectando sus propiedades mecánicas aparentes en el entorno citoplasmático.

Mencionamos antecedentes que sugieren funcionalidades distintas para aquellos filamentos de vimentina que se encuentran en la región perinuclear (esto es, integrando la jaula nuclear) y los que se encuentran en la periferia (capítulo 1, sección 1.5). Dado que la resolución óptica de la microscopía confocal limita la visualización de las regiones celulares densas de IFs, utilizamos la novedosa técnica de MoNaLISA, técnica de superresolución detallada en el capítulo 3, que permite la observación de especímenes vivos con mínimo fotodaño, entre otras ventajas.

Nuestros datos muestran que la rigidez aparente de la red de vimentina es ligeramente menor en la región perinuclear, en la cual se ha descrito la existencia de una malla densa de filamentos que protege mecánicamente al núcleo (capítulo 9).

Complementamos este estudio con un análisis de la movilidad de los filamentos de vimentina en ambas regiones (secciones 9.2 y 9.3). Observamos una proporción mayor de filamentos confinados en la región periférica que en la zona perinuclear sugiriendo un mayor nivel de anclaje a otros componentes celulares y, en particular, a filamentos de actina y microtúbulos que los mantienen ligeramente más estirados y limitan sus desplazamientos.

Posteriormente estudiamos la movilidad de los filamentos de vimentina a lo largo de períodos de tiempo suficientemente largos que permiten notar la influencia de aquellos procesos activos que ocurren en el citoesqueleto y afectarían la movilidad de los IFs. Observamos que el movimiento de los filamentos es muy variado, mostrando componentes tanto super como subdifusivos. En una primera instancia no observamos variaciones entre las dinámicas de los filamentos periféricos y perinucleares, sugiriendo que el acoplamiento con las redes activas del citoesqueleto sería similar para ambas poblaciones de IFs en esta escala temporal.

Los resultados obtenidos en esta tesis proveen información del acoplamiento mecánico diferencial (tanto espacial como temporalmente) de la red de vimentina con las redes de actina y microtúbulos. Este acoplamiento permite que la red de vimentina responda activamente para compensar, de forma parcial, las perturbaciones mecánicas generadas en el citoesqueleto o transmitidas desde el exterior celular.

A partir de estos resultados, han surgido nuevas preguntas e hipótesis a ser exploradas. Entre ellas, sería de gran interés realizar estudios similares a los presentados en esta tesis, pero en situaciones celulares que involucren estrés mecánico, por ejemplo, durante migración celular. La evidencia demuestra que la red de vimentina resulta clave en este proceso en el que los filamentos de actina generan las fuerzas que empujan la membrana celular en el sentido del avance y los microtúbulos soportan estas tensiones. En este contexto nos preguntamos qué cambios mecánicos en los filamentos de vimentina sostienen sus funciones.

Bibliografía

1. Mizuno, D., Tardin, C., Schmidt, C. F. & MacKintosh, F. C. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science* (80-.). **315**, 370–373 (2007).
2. Pegoraro, A. F., Janmey, P. A. & Weitz, D. A. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a022038 (2017).
3. Alberts, B. *et al.* *Biología Molecular de la Célula*. (Ediciones Omega, 2002).
4. Pollard, T. D. & Goldman, R. D. Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a030288 (2018).
5. Desai, A. & Mitchison, T. J. Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83–117 (1997).
6. Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203 (1998).
7. Amos, L. A. Microtubule structure and its stabilisation. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2153–2160 (2004).
8. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules As a Target for Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
9. Zhang, R., Alushin, G. M., Brown, A. & Nogales, E. Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell* **162**, 849–859 (2015).
10. Galjart, N. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Current Biology* **20**, (2010).
11. Andersen, J. S. *et al.* Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570–574 (2003).
12. Alves-Cruzeiro, J. M. D. C., Nogales-Cadenas, R. & Pascual-Montano, A. D. CentrosomeDB: A new generation of the centrosomal proteins database for Human and Drosophila melanogaster. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
13. Arquint, C., Gabryjonczyk, A. M. & Nigg, E. A. Centrosomes as signalling centres. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369**, (2014).
14. Conduit, P. T., Wainman, A. & Raff, J. W. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 611–624 (2015).
15. Mandelkow, E. & Mandelkow, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 72–81 (1995).
16. Samsonov, A., Yu, J. Z., Rasenick, M. & Popov, S. V. Tau interaction with microtubules in vivo. *J. Cell Sci.* **117**, 6129–6141 (2004).

17. Mohan, R. & John, A. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life* **67**, 395–403 (2015).
18. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubules. *Nature* **312**, 237–242 (1984).
19. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 309–322 (2008).
20. Nogales, E. & Alushin, G. *Tubulin and microtubule structure: Mechanistic insights into dynamic instability and its biological relevance. Comprehensive Biophysics* **4**, (Elsevier Ltd., 2012).
21. Risteski, P., Jagrić, M., Pavin, N. & Tolić, I. M. Biomechanics of chromosome alignment at the spindle midplane. *Curr. Biol.* **31**, R574–R585 (2021).
22. Janson, M. E., De Dood, M. E. & Dogterom, M. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *J. Cell Biol.* **161**, 1029–1034 (2003).
23. Barlan, K. & Gelfand, V. I. Microtubule-based transport and the distribution, tethering, and organization of organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a025817 (2017).
24. Levi, V., Serpinskaya, A. S., Gratton, E. & Gelfand, V. Organelle transport along microtubules in *Xenopus melanophores*: Evidence for cooperation between multiple motors. *Biophys. J.* **90**, 318–327 (2006).
25. Herrmann, H. & Aebi, U. Intermediate filaments: Structure and assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
26. Mallik, R. & Gross, S. P. Molecular motors: Strategies to get along. *Current Biology* **14**, (2004).
27. Nürnberg, A., Kitzing, T. & Grosse, R. Nucleating actin for invasion. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 117–187 (2011).
28. Pollard, T. D., Blanchoin, L. & Mullins, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 545–576 (2000).
29. Howard, J. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. (Sinauer Assoc Inc, 2001).
30. Dos Remedios, C. G. *et al.* Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews* **83**, 433–473 (2003).
31. Revenu, C., Athman, R., Robine, S. & Louvard, D. The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 635–646 (2004).
32. Lee, S. H. & Dominguez, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and cells* **29**, 311–325 (2010).
33. Tojkander, S., Gateva, G. & Lappalainen, P. Actin stress fibers - Assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* **125**, 1855–1864 (2012).

34. Gordon, A. M., Homsher, E. & Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**, 853–924 (2000).
35. McCue, S., Noria, S. & Langille, B. L. Shear-induced reorganization of endothelial cell cytoskeleton and adhesion complexes. *Trends in Cardiovascular Medicine* **14**, 143–151 (2004).
36. Rottner, K. & Schaks, M. Assembling actin filaments for protrusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **56**, 53–63 (2019).
37. Bachir, A. I., Horwitz, A. R., Nelson, W. J. & Bianchini, J. M. Actin-based adhesion modules mediate cell interactions with the extracellular matrix and neighboring cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
38. Gupta, M. *et al.* Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).
39. Zhang, Z., Xia, S. & Kanchanawong, P. An integrated enhancement and reconstruction strategy for the quantitative extraction of actin stress fibers from fluorescence micrographs. *BMC Bioinformatics* **18**, 268 (2017).
40. Burridge, K. & Wittchen, E. S. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell Biol.* **200**, 9–19 (2013).
41. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H. & Goldman, R. D. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *J. Biol. Chem.* **290**, 17145–17153 (2015).
42. Robert, A., Hookway, C. & Gelfand, V. I. Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. *BioEssays* **38**, 232–243 (2016).
43. Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N. & Köster, S. Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 3053–3064 (2015).
44. Dutour-Provenzano, G. & Etienne-Manneville, S. Intermediate filaments. *Curr. Biol.* **31**, R522–R529 (2021).
45. Engel, A., Eichner, R. & Aebi, U. Polymorphism of reconstituted human epidermal keratin filaments: Determination of their mass-per-length and width by scanning transmission electron microscopy (STEM). *J. Ultrastructure Res.* **90**, 323–335 (1985).
46. Çolakoğlu, G. & Brown, A. Intermediate filaments exchange subunits along their length and elongate by end-to-end annealing. *J. Cell Biol.* **185**, 769–777 (2009).
47. Vikstrom, K. L., Borisy, G. G. & Goldman, R. D. Dynamic aspects of intermediate filament networks in BHK-21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 549–553 (1989).
48. Ngai, J., Coleman, T. R. & Lazarides, E. Localization of newly synthesized vimentin subunits reveals a novel mechanism of intermediate filament assembly. *Cell* **60**, 415–427 (1990).

49. Coleman, T. R. & Lazarides, E. Continuous growth of vimentin filaments in mouse fibroblasts. *J. Cell Sci.* **103**, 689–698 (1992).
50. Sanghvi-Shah, R. & Weber, G. F. Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**, 81 (2017).
51. Osmanagic-Myers, S., Dechat, T. & Foisner, R. Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes Dev.* **29**, 225–237 (2015).
52. Gaillard, M.-C. & Reddy, K. L. The Nuclear Lamina and Genome Organization. in *Nuclear Architecture and Dynamics* 321–343 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/b978-0-12-803480-4.00014-4
53. Östlund, C. *et al.* Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *J. Cell Sci.* **122**, 4099–4108 (2009).
54. Lombardi, M. L. *et al.* The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **286**, 26743–26753 (2011).
55. Briand, N. & Collas, P. Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology* **21**, (2020).
56. Dubik, N. & Mai, S. Lamin A/C: Function in normal and tumor cells. *Cancers* **12**, 1–21 (2020).
57. Lammerding, J. *et al.* Lamins a and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J. Biol. Chem.* **281**, 25768–25780 (2006).
58. Ji, J. Y. *et al.* Cell nuclei spin in the absence of lamin B1. *J. Biol. Chem.* **282**, 20015–20026 (2007).
59. Etienne-Manneville, S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 1–28 (2018).
60. Mendez, M., Restle, D. & Janmey, P. A. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophys. J.* **107**, 314–323 (2014).
61. Mendez, M., Kojima, S. & Goldman, R. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* **24**, 1838–1851 (2010).
62. Guo, M. *et al.* The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics. *Biophys. J.* **105**, 1562–1568 (2013).
63. Leduc, C. & Etienne-Manneville, S. Intermediate filaments in cell migration and invasion: The unusual suspects. *Curr. Opin. Cell Biol.* **32**, 102–112 (2015).
64. De Rossi, M. C., Bruno, L., Wolosiuk, A., Despósito, M. A. & Levi, V. When size does matter: Organelle size influences the properties of transport mediated by molecular motors. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 5095–5103 (2013).

65. Nekrasova, O. E. *et al.* Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2282–2289 (2011).
66. Schwarz, N. & Leube, R. Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells* **5**, 30 (2016).
67. Boraas, L. C. & Ahsan, T. Lack of vimentin impairs endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
68. Lim, H. Y. G. *et al.* Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo. *Nature* **585**, 404–409 (2020).
69. Kidd, M. E., Shumaker, D. K. & Ridge, K. M. The role of Vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 1–6 (2014).
70. Eriksson, J. E. *et al.* Introducing intermediate filaments: From discovery to disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1763–1771 (2009).
71. Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. & Weber, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 5034–5038 (1978).
72. Patteson, A. E., Vahabikashi, A., Goldman, R. D. & Janmey, P. A. Mechanical and Non-Mechanical Functions of Filamentous and Non-Filamentous Vimentin. *BioEssays* 2000078 (2020). doi:10.1002/bies.202000078
73. Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P. & Steinert, P. M. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J. Cell Biol.* **134**, 971–983 (1996).
74. Patteson, A. E. *et al.* Vimentin protects cells against nuclear rupture and DNA damage during migration. *J. Cell Biol.* **218**, 4079–4092 (2019).
75. Murray, M. E., Mendez, M. & Janmey, P. A. Substrate stiffness regulates solubility of cellular vimentin. *Mol. Biol. Cell* **25**, 87–94 (2014).
76. Ketema, M., Kreft, M., Secades, P., Janssen, H. & Sonnenberg, A. Nesprin-3 connects plectin and vimentin to the nuclear envelope of Sertoli cells but is not required for Sertoli cell function in spermatogenesis. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2454–2466 (2013).
77. Dupin, I., Sakamoto, Y., Etienne-Manneville, S., Liu, W. F. & Chen, C. S. Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *J. Cell Sci.* **124**, 865–872 (2011).
78. Maniotis, A. J., Chen, C. S. & Ingber, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 849–854 (1997).
79. Tusamda Wakhloo, N. *et al.* Actomyosin, vimentin and LINC complex pull on osteosarcoma nuclei to deform on micropillar topography. *Biomaterials* **234**, 119746 (2020).
80. Keeling, M. C., Flores, L. R., Dodhy, A. H., Murray, E. R. & Gavara, N. Actomyosin and vimentin

cytoskeletal networks regulate nuclear shape, mechanics and chromatin organization. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).

81. Terriac, E., Schütz, S. & Lautenschläger, F. Vimentin Intermediate Filament Rings Deform the Nucleus During the First Steps of Adhesion. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
82. Feliksiak, K., Witko, T., Solarz, D., Guzik, M. & Rajfur, Z. Vimentin association with nuclear grooves in normal MEF 3T3 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–13 (2020).
83. Schaedel, L., Lorenz, C., Schepers, A. V., Klumpp, S. & Köster, S. Vimentin intermediate filaments stabilize dynamic microtubules by direct interactions. *Nat. Commun.* **12**, 3799 (2021).
84. Serres, M. P. *et al.* F-Actin Interactome Reveals Vimentin as a Key Regulator of Actin Organization and Cell Mechanics in Mitosis. *Dev. Cell* **52**, 210–222.e7 (2020).
85. Gan, Z. *et al.* Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Syst.* **3**, 252–263.e8 (2016).
86. Robert, A., Herrmann, H., Davidson, M. W. & Gelfand, V. I. Microtubule-dependent transport of vimentin filament precursors is regulated by actin and by the concerted action of Rho- and p21-activated kinases. *FASEB J.* **28**, 2879–2890 (2014).
87. Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H. & Snider, N. T. Vimentin on the move: New developments in cell migration [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* **7**, 1–10 (2018).
88. Etienne-Manneville, S. Neighborly relations during collective migration. *Current Opinion in Cell Biology* **30**, 51–59 (2014).
89. Holle, A. W. *et al.* Intermediate filament reorganization dynamically influences cancer cell alignment and migration. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
90. Del Álamo, J. C. *et al.* Spatio-temporal analysis of eukaryotic cell motility by improved force cytometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13343–13348 (2007).
91. Jefferson, J. J., Leung, C. L. & Liem, R. K. H. Plakins: Goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 542–553 (2004).
92. Han, S. J., Bielawski, K. S., Ting, L. H., Rodriguez, M. L. & Sniadecki, N. J. Decoupling substrate stiffness, spread area, and micropost density: A close spatial relationship between traction forces and focal adhesions. *Biophys. J.* **103**, 640–648 (2012).
93. Seetharaman, S. & Etienne-Manneville, S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology* **30**, 720–735 (2020).
94. Wiche, G., Osmanagic-Myers, S. & Castañón, M. J. Networking and anchoring through plectin: A key to IF functionality and mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology* **32**, 21–29 (2015).
95. Huber, F., Boire, A., López, M. P. & Koenderink, G. H. Cytoskeletal crosstalk: When three

- different personalities team up. *Current Opinion in Cell Biology* **32**, 39–47 (2015).
96. Bhattacharya, R. *et al.* Recruitment of vimentin to the cell surface by β 3 integrin and plectin mediates adhesion strength. *J. Cell Sci.* **122**, 1390–1400 (2009).
 97. Costigliola, N. *et al.* Vimentin fibers orient traction stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 5195–5200 (2017).
 98. Etienne-Manneville, S. Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 471–499 (2013).
 99. Gupta, S. & Yap, A. S. How adherens junctions move cells during collective migration. *Fac. Rev.* **10**, (2021).
 100. Vakhrusheva, A. *et al.* The Role of Vimentin in Directional Migration of Rat Fibroblasts. *Cytoskeleton* cm.21572 (2019). doi:10.1002/cm.21572
 101. Hohmann, T. & Dehghani, F. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **8**, 55 (2019).
 102. Helfand, B. T. *et al.* Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1274–1289 (2011).
 103. Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P. & Schliwa, M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J. Cell Biol.* **113**, 155–160 (1991).
 104. Charrier, E. E. & Janmey, P. A. Mechanical properties of intermediate filament proteins. *Methods Enzymol.* **568**, 35–55 (2016).
 105. Reif, F. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. (Waveland Press, Inc., 2009).
 106. Pritchard, R. H., Shery Huang, Y. Y. & Terentjev, E. M. Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft Matter* **10**, 1864 (2014).
 107. Fudge, D. S., Gardner, K. H., Forsyth, V. T., Riekel, C. & Gosline, J. M. The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: Insights from hagfish slime threads. *Biophys. J.* **85**, 2015–2027 (2003).
 108. Brinkers, S., Dietrich, H. R. C., De Groot, F. H., Young, I. T. & Rieger, B. The persistence length of double stranded DNA determined using dark field tethered particle motion. *J. Chem. Phys.* **130**, (2009).
 109. Van Mameren, J., Vermeulen, K. C., Gittes, F. & Schmidt, C. F. Leveraging single protein polymers to measure flexural rigidity. *J. Phys. Chem. B* **113**, 3837–3844 (2009).
 110. Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J. & Howard, J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* **120**, 923–934 (1993).
 111. Mücke, N. *et al.* Assessing the Flexibility of Intermediate Filaments by Atomic Force Microscopy. *J. Mol. Biol.* **335**, 1241–1250 (2004).

112. Peng, J., Guo, J., Ma, R. & Jiang, Y. Water-solid interfaces probed by high-resolution atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.* **77**, 100549 (2022).
113. Schopferer, M. *et al.* Desmin and Vimentin Intermediate Filament Networks: Their Viscoelastic Properties Investigated by Mechanical Rheometry. *J. Mol. Biol.* **388**, 133–143 (2009).
114. Crassous, J. J., Régisser, R., Ballauff, M. & Willenbacher, N. Characterization of the viscoelastic behavior of complex fluids using the piezoelectric axial vibrator. *J. Rheol. (N. Y. N. Y.)* **49**, 851–863 (2005).
115. Nöding, B. & Köster, S. Intermediate filaments in small configuration spaces. *Phys. Rev. Lett.* **108**, (2012).
116. Morse, D. D. Tube diameter in tightly entangled solutions of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **63**, 1–22 (2001).
117. Köster, S. & Pfohl, T. An in vitro model system for cytoskeletal confinement. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 771–776 (2009).
118. Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C. & Weitz, D. A. Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16128–16133 (2007).
119. Brangwynne, C. P. *et al.* Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J. Cell Biol.* **173**, 733–741 (2006).
120. Bicek, A. D. *et al.* Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2943–2953 (2009).
121. Pallavicini, C. *et al.* Lateral motion and bending of microtubules studied with a new single-filament tracking routine in living cells. *Biophys. J.* **106**, 2625–2635 (2014).
122. Qin, Z., Kreplak, L. & Buehler, M. J. Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. *PLoS One* **4**, (2009).
123. Kreplak, L., Bär, H., Leterrier, J. F., Herrmann, H. & Aebi, U. Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *J. Mol. Biol.* **354**, 569–577 (2005).
124. Lin, Y. C. *et al.* Origins of elasticity in intermediate filament networks. *Phys. Rev. Lett.* **104**, 1–4 (2010).
125. Janmey, P. A., Slochow, D. R., Wang, Y. H., Wen, Q. & Cebers, A. Polyelectrolyte properties of filamentous biopolymers and their consequences in biological fluids. *Soft Matter* **10**, 1439–1449 (2014).
126. Lin, Y. C. *et al.* Divalent cations crosslink vimentin intermediate filament tail domains to regulate network mechanics. *J. Mol. Biol.* **399**, 637–644 (2010).
127. Sapra, K. T. & Medalia, O. Bend , Push , Stretch : Insight into the Structure and Mechanics of Single Intermediate Filaments and Meshworks. *Cells 2021, Vol. 10, Page 1960* **10**, 1–18 (2021).

128. Jing, Y., Zhang, C., Yu, B., Lin, D. & Qu, J. Super-Resolution Microscopy: Shedding New Light on In Vivo Imaging. *Frontiers in Chemistry* **9**, 740 (2021).
129. Hell, S. W., Lindek, S., Cremer, C. & Stelzer, E. H. K. Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 222 (1994).
130. Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C. & Ha, T. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Annual Review of Biochemistry* **77**, 51–76 (2008).
131. Wayne, R. *Light and Video Microscopy*. *Light and Video Microscopy* (Elsevier, 2014). doi:10.1016/c2012-0-07122-0
132. Webb, R. H. Confocal Optical Microscopy. *Encycl. Condens. Matter Phys.* **427**, 229–235 (2005).
133. Inoué, S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. *Handb. Biol. Confocal Microsc. Third Ed.* 1–19 (2006). doi:10.1007/978-0-387-45524-2_1
134. Demmerle, J., Wegel, E., Schermelleh, L. & Dobbie, I. M. Assessing resolution in super-resolution imaging. *Methods* **88**, 3–10 (2015).
135. Liao, Y. *Practical Electron Microscopy and Database*. (Northwestern University, 2006).
136. Celler, K., Koning, R. I., Koster, A. J. & van Wezel, G. P. Multidimensional view of the bacterial cytoskeleton. *Journal of Bacteriology* **195**, 1627–1636 (2013).
137. Jungmann, R. *et al.* Quantitative super-resolution imaging with qPAINT. *Nat. Methods* **13**, 439–442 (2016).
138. Galbraith, C. G. & Galbraith, J. A. Super-resolution microscopy at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 1607–1611 (2011).
139. Van Noorden, R. Insider view of cells scoops Nobel. *Nature* **514**, 286 (2014).
140. Schermelleh, L., Heintzmann, R. & Leonhardt, H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology* **190**, 165–175 (2010).
141. Achimovich, A. M., Ai, H. & Gahlmann, A. Enabling technologies in super-resolution fluorescence microscopy: reporters, labeling, and methods of measurement. *Current Opinion in Structural Biology* **58**, 224–232 (2019).
142. Dertinger, T., Colyera, R., Iyer, G., Weiss, S. & Enderlein, J. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22287–22292 (2009).
143. Sharma, R., Singh, M. & Sharma, R. Recent advances in STED and RESOLFT super-resolution imaging techniques. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **231**, (2020).
144. Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S. & Hell, S. W. Breaking the diffraction barrier in

- fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17565–17569 (2005).
145. Masullo, L. A. *et al.* Enhanced photon collection enables four dimensional fluorescence nanoscopy of living systems. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 146. Grotjohann, T. *et al.* rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells. *Elife* **2012**, (2012).
 147. Pennacchietti, F. *et al.* Fast reversibly photoswitching red fluorescent proteins for live-cell RESOLFT nanoscopy. *Nat. Methods* **15**, 601–604 (2018).
 148. Klar, T. A. & Hell, S. W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**, 954 (1999).
 149. Liu, Y. *et al.* Shedding New Lights Into STED Microscopy: Emerging Nanoprobes for Imaging. *Frontiers in Chemistry* **9**, (2021).
 150. Dijkstra, R. R. M. Brightness characterization of single core and core/shell Yb³⁺,Er³⁺-doped NaYF₄ upconversion nanoparticles & Design and realization of a CW-STED super-resolution microscope setup. (University of Twente, 2012).
 151. Bückers, J., Wildanger, D., Vicidomini, G., Kastrup, L. & Hell, S. W. Simultaneous multi-lifetime multi-color STED imaging for colocalization analyses. *Opt. Express* **19**, 3130 (2011).
 152. Levi, V. & Gratton, E. Exploring dynamics in living cells by tracking single particles. *Cell Biochemistry and Biophysics* **48**, 1–15 (2007).
 153. Cheezum, M. K., Walker, W. F. & Guilford, W. H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.* **81**, 2378–2388 (2001).
 154. Yildiz, A. *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science (80-.)*. **300**, 2061–2065 (2003).
 155. Yildiz, A. & Selvin, P. R. Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: Application to molecular motors. *Acc. Chem. Res.* **38**, 574–582 (2005).
 156. Kural, C. *et al.* Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5378–5382 (2007).
 157. Spichal, M. & Fabre, E. The emerging role of the cytoskeleton in chromosome dynamics. *Front. Genet.* **8**, 13 (2017).
 158. Brangwynne, C. P., Koenderink, G. H., MacKintosh, F. C. & Weitz, D. A. Intracellular transport by active diffusion. *Trends Cell Biol.* **19**, 423–427 (2009).
 159. Woringe, M., Izeddin, I., Favard, C. & Berry, H. Anomalous Subdiffusion in Living Cells: Bridging the Gap Between Experiments and Realistic Models Through Collaborative Challenges. *Front. Phys.* **8**, 1–9 (2020).
 160. Wu, J. & Berland, K. M. Propagators and time-dependent diffusion coefficients for anomalous

- diffusion. *Biophys. J.* **95**, 2049–2052 (2008).
161. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: An important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 114–119 (2001).
 162. Rashid, R., Chee, S. M. L., Raghunath, M. & Wohland, T. Macromolecular crowding gives rise to microviscosity, anomalous diffusion and accelerated actin polymerization. *Phys. Biol.* **12**, (2015).
 163. Malchus, N. & Weiss, M. Elucidating anomalous protein diffusion in living cells with fluorescence correlation spectroscopy-facts and pitfalls. *J. Fluoresc.* **20**, 19–26 (2010).
 164. Saxton, M. J. & Jacobson, K. Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **26**, 373–399 (1997).
 165. Tolić-Nørrelykke, I. M., Munteanu, E. L., Thon, G., Oddershede, L. & Berg-Sørensen, K. Anomalous diffusion in living yeast cells. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 1–4 (2004).
 166. Gal, N. & Weihs, D. Experimental evidence of strong anomalous diffusion in living cells. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **81**, 5–8 (2010).
 167. Metzner, C., Raupach, C., Mierke, C. T. & Fabry, B. Fluctuations of cytoskeleton-bound microbeads - The effect of bead-receptor binding dynamics. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, 194105 (2010).
 168. Robert, D., Aubertin, K., Bacri, J. C. & Wilhelm, C. Magnetic nanomanipulations inside living cells compared with passive tracking of nanoprobe to get consensus for intracellular mechanics. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **85**, 1–9 (2012).
 169. Levi, V. & Gratton, E. Chromatin dynamics during interphase explored by single-particle tracking. *Chromosom. Res.* **16**, 439–449 (2008).
 170. Mortensen, K. I., Flyvbjerg, H. & Pedersen, J. N. Confined Brownian Motion Tracked With Motion Blur: Estimating Diffusion Coefficient and Size of Confining Space. *Front. Phys.* **8**, 601 (2021).
 171. Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**, 2021–2040 (1993).
 172. Bickel, T. A note on confined diffusion. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **377**, 24–32 (2007).
 173. Saxton, M. J. Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys. J.* **64**, 1766–1780 (1993).
 174. Kues, T., Peters, R. & Kubitscheck, U. Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus. *Biophys. J.* **80**, 2954–2967 (2001).
 175. Käs, J. *et al.* F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions. *Biophys. J.* **70**, 609–625 (1996).

176. Janson, M. E. & Dogterom, M. A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophys. J.* **87**, 2723–2736 (2004).
177. Brangwynne, C. P. *et al.* Bending dynamics of fluctuating biopolymers probed by automated high-resolution filament tracking. *Biophys. J.* **93**, 346–359 (2007).
178. Ruhnnow, F., Zwicker, D. & Diez, S. Tracking single particles and elongated filaments with nanometer precision. *Biophys. J.* **100**, 2820–2828 (2011).
179. Valdman, D., Atzberger, P. J., Yu, D., Kuei, S. & Valentine, M. T. Spectral analysis methods for the robust measurement of the flexural rigidity of biopolymers. *Biophys. J.* **102**, 1144–1153 (2012).
180. Philip D. Wasserman. *Advanced Methods in Neural Computing* | Guide books. (1993). Available at: <https://www.worldcat.org/title/advanced-methods-in-neural-computing/oclc/27429729>. (Accessed: 10th February 2021)
181. Haykin, S. *Neural networks: A comprehensive foundation*. **3**, (Prentice Hall, 1999).
182. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
183. Ratz, M., Testa, I., Hell, S. W. & Jakobs, S. CRISPR/Cas9-mediated endogenous protein tagging for RESOLFT super-resolution microscopy of living human cells. *Sci. Rep.* **5**, 1–6 (2015).
184. Faire, K. *et al.* E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* **112**, 4243–4255 (1999).
185. Levi, V., Gelfand, V. I., Serpinskaya, A. S. & Gratton, E. Melanosomes transported by myosin-V in xenopus melanophores perform slow 35 nm steps. *Biophys. J. Biophys. Lett.* **90**, L07–L09 (2006).
186. Blajeski, A. L., Phan, V. A., Kottke, T. J. & Kaufmann, S. H. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J. Clin. Invest.* **110**, 91–99 (2002).
187. Spector, I., Shorlet, N. R., Blasberger, D. & Kashman, Y. Latrunculins - novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil. Cytoskeleton* **13**, 127–144 (1989).
188. Dhamodharan, R., Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L. & Wadsworth, P. Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1215–1229 (1995).
189. Smoler, M., Coceano, G., Testa, I., Bruno, L. & Levi, V. Apparent stiffness of vimentin intermediate filaments in living cells and its relation with other cytoskeletal polymers. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1867**, 118726 (2020).
190. Lukinavičius, G. *et al.* SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. *Nat. Commun.* **6**, 1–7 (2015).
191. R: A language and environment for statistical computing. (2013).

192. Gittes, F., Meyhöfer, E., Baek, S. & Howard, J. Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule. *Biophys. J.* **70**, 418–429 (1996).
193. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682 (2012).
194. Ruxton, G. D. *The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test.* *Behavioral Ecology* **17**, 688–690 (Oxford Academic, 2006).
195. Wasserman, L. *All of Statistics - A Concise Course in Statistical Inference.* Springer texts in statistics (Springer, 2004). doi:10.1198/tas.2005.s30
196. De Rossi, M. C. *et al.* Asymmetries in kinesin-2 and cytoplasmic dynein contributions to melanosome transport. *FEBS Lett.* **589**, 2763–2768 (2015).
197. Kruskal, W. H. & Wallis, W. A. USE OF RANKS IN ONE-CRITERION VARIANCE ANALYSIS. *Am. Stat. Assoc. J.* **47**, 583–621 (1952).
198. Thompson, R. E., Larson, D. R. & Webb, W. W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82**, 2775–2783 (2002).
199. Hahn, W. C. *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464–468 (1999).
200. Hoebeke, J., Van Nijen, G. & De Brabander, M. Interaction of oncodazole (R 17934), a new anti-tumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 319–324 (1976).
201. Harkcom, W. T. *et al.* NAD⁺ and SIRT3 control microtubule dynamics and reduce susceptibility to antimicrotubule agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).
202. Gigant, B. *et al.* Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **435**, 519–522 (2005).
203. Morton, W. M., Ayscough, K. R. & McLaughlin, P. J. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat. Cell Biol.* **2**, 376–378 (2000).
204. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* (80-). **326**, 1208–1212 (2009).
205. Dominguez, R. & Holmes, K. C. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 169–186 (2011).
206. Stack, T., Vahabikashi, A., Johnson, M. & Scott, E. Modulation of Schlemm's canal endothelial cell stiffness via latrunculin loaded block copolymer micelles. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **106**, 1771–1779 (2018).
207. Gliem, M., Heupel, W. M., Spindler, V., Harms, G. S. & Waschke, J. Actin reorganization contributes to loss of cell adhesion in pemphigus vulgaris. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **299**, (2010).

208. Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C. & Elson, E. L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* **114**, 1025–36 (2001).
209. Irazoqui, J. E., Howell, A. S., Theesfeld, C. L. & Lew, D. J. Opposing roles for actin in Cdc42p polarization. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1296–1304 (2005).
210. Lillie, S. H. & Brown, S. S. Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **125**, 825–842 (1994).
211. Sun, B. *et al.* Actin polymerization state regulates osteogenic differentiation in human adipose-derived stem cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **26**, 15 (2021).
212. Calderwood, D. A., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. Integrins and actin filaments: Reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 22607–22610 (2000).
213. Dao, V. T., Dupuy, A. G., Gavet, O., Caron, E. & de Gunzburg, J. Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *J. Cell Sci.* **122**, 2996–3004 (2009).
214. Hookway, C. *et al.* Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments. *Mol. Biol. Cell* **26**, 1675–1686 (2015).
215. Leduc, C. & Etienne-Manneville, S. Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization. *J. Cell Biol.* **216**, 1689–1703 (2017).
216. Yoon, M., Moir, R. D., Prahlad, V. & Goldman, R. D. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J. Cell Biol.* **143**, 147–157 (1998).
217. Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B. & Borisy, G. G. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **135**, 991–1007 (1996).
218. Correia, I., Chu, D., Chou, Y. H., Goldman, R. D. & Matsudaira, P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons: Adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J. Cell Biol.* **146**, 831–842 (1999).
219. Yang, Y. *et al.* An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* **86**, 655–665 (1996).
220. Vohnoutka, R. B. *et al.* The focal adhesion scaffold protein Hic-5 regulates vimentin organization in fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **30**, 3037–3056 (2019).
221. Bruno, L., Levi, V., Brunstein, M. & Desposito, M. Transition to superdiffusive behavior in intracellular actin-based transport mediated by molecular motors. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **80**, 1–7 (2009).
222. Brunstein, M., Bruno, L., Desposito, M. & Levi, V. Anomalous dynamics of melanosomes driven by myosin-V in *Xenopus laevis* melanophores. *Biophys. J.* **97**, 1548–1557 (2009).

223. Fu, M. meng & Holzbaur, E. L. F. Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* **24**, 564–574 (2014).
224. Chang, L. *et al.* The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *J. Cell Sci.* **122**, 2914–2923 (2009).
225. Skalli, O. & Goldman, R. D. Recent insights into the assembly, dynamics, and function of intermediate filament networks. *Cell Motil. Cytoskeleton* **19**, 67–79 (1991).
226. Pallavicini, C. *et al.* Characterization of microtubule buckling in living cells. *Eur. Biophys. J.* **46**, 581–594 (2017).
227. Denz, M., Marschall, M., Herrmann, H. & Köster, S. Ion type and valency differentially drive vimentin tetramers into intermediate filaments or higher order assemblies. *Soft Matter* **17**, 870–878 (2021).
228. Shroff, S. G., Saner, D. R. & Lal, R. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **269**, (1995).
229. Su, J. *et al.* Geometric confinement influences cellular mechanical properties II - Intracellular variances in polarized cells. *MCB Mol. Cell. Biomech.* **4**, 105–118 (2007).