

**SUBCLONAMIENTO Y EXPRESION DE POLIPEPTIDOS C-TERMINAL DE  
 $\alpha$ - Y  $\beta$ -TUBULINA EN *Escherichia coli*. ESTUDIO SOBRE LA FORMACION  
DE CUERPOS DE INCLUSION**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**en cumplimiento parcial de los requisitos**

**para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con mención en Biología**

**Facultad de Ciencias**

**por**



**Carlos Lorenzo González Correa**

**Agosto, 1997**

**Director de Tesis: Dra. Rosalba Lagos Mónaco**

**Co-Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias  
que la Tesis de doctorado presentada por el candidato

CARLOS LORENZO GONZALEZ CORREA

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de  
tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el  
Examen de Defensa de Tesis rendido el Día

Director de Tesis:

Dra. Rosalba Lagos Mónaco

Co-Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio Opazo

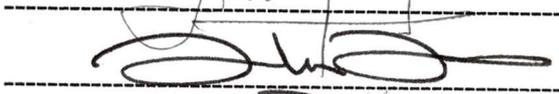
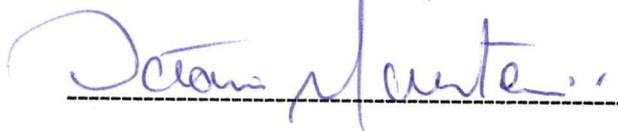
Comisión de evaluación de la Tesis:

Dra. Margarita Carú

Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Alejandro Venegas

Dr. Carlos Jerez



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Rosalba Lagos Mónaco y co-dirección del Dr. Octavio Monasterio Opazo, y fue financiada parcialmente por el Departamento Técnico de Investigación (DTI, Proyecto PG-089) y por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT, Proyectos 92-0039, 1051-92 y 1950556).

La realización de esta Tesis fue apoyada por la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, mediante una comisión de perfeccionamiento.

A mi esposa María Edith

A mis hijos Claudia, Carlos y Carolina

## AGRADECIMIENTOS

Si me diesen a escoger entre amistad y fortuna,  
elegiría siempre satisfacer el hambre de sen-  
timiento fraternal por sobre todas las cosas,  
pues reconforta el espíritu y calma el dolor  
que nos produce la batalla diaria por vivir.

Carlos González C.

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todos quienes, de una u otra forma, contribuyeron a mi formación como persona y me estimularon a completar los estudios y realizar esta Tesis.

A Rosalba Lagos y Octavio Monasterio, en quienes encontré más que tutores, amigos. Gracias por sus sabios consejos y por el tiempo quitado a su familia para dedicarlo a mi persona.

A mis amigos Marcela Wilkens, José Jaime Arbildúa, Esteban Nova y Roberto Sánchez, que siempre estuvieron a mi lado con una palabra de estímulo en los momentos difíciles y un afecto sin límites.

A todos los miembros del Laboratorio de Bioquímica, Eliana Rabajille, Ana Preller, Victoria Guixé, Tito Ureta, Jorge Babul, Carlos Medina, Eduardo Kessi y Patricio Rodríguez, quienes me brindaron su amistad y me hicieron sentir como en casa.

Al personal no docente del Laboratorio de Bioquímica, Marcela Vargas, Pedro Núñez y Ricardo Espinoza, y a Mirta González, eficiente secretaria, quienes siempre respondieron prontamente a mis solicitudes.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción, por su apoyo incondicional para completar esta Tesis.

A todos ellos y a quienes no alcanzo a nombrar, muchas gracias.

## INDICE DE MATERIAS

	pág
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABLAS</b>	xii
<b>ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>RESUMEN</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xx
<b>INTRODUCCION</b>	1
<i>Cuerpos de inclusión en E. coli</i>	5
<i>Plegamiento intracelular de proteínas</i>	10
<i>El modelo experimental: la tubulina</i>	12
<i>Plegamiento de la tubulina</i>	17
<i>Clonamiento y expresión de la tubulina en bacterias</i>	18
<i>Objetivos de la Tesis</i>	19
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	22
<b>I. MATERIALES</b>	22
<i>Reactivos</i>	22
<i>Cepas</i>	22
<b>II. METODOS</b>	23

<i>Amortiguadores</i>	23
<i>Medios de cultivo</i>	25
<i>Cultivos bacterianos</i>	25
<i>Mantenimiento de las cepas bacterianas</i>	26
<i>Plasmidios</i>	26
<i>Purificación de DNA de plasmidios</i>	28
<i>Tratamiento con RNAsa</i>	29
<i>Geles de agarosa</i>	29
<i>Cuantificación del DNA</i>	30
<i>Plasmidios recombinantes</i>	30
<i>Purificación de los fragmentos</i>	32
<i>Purificación del DNA usando el kit comercial</i>	
<i>GenClean II</i>	34
<i>Creación de extremos romos a partir de extremos</i>	
<i>cohesivos</i>	35
<i>Ligamiento de fragmentos de DNA y plasmidios</i>	35
<i>Amplificación por PCR</i>	36
<i>Subclonamiento del fragmento amplificado por PCR</i>	37
<i>Transformación bacteriana</i>	37
<i>Marcación de los polipéptidos sobreproducidos con</i>	
<i><sup>35</sup>S-metionina</i>	39
<i>Ruptura celular</i>	39

<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida -SDS</i>	40
<i>Soluciones para la electroforesis y confección de geles</i>	41
<i>Autorradiografías</i>	42
<i>Western blot</i>	42
<i>Criterio de solubilidad de los polipéptidos</i>	43
<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET)</i>	44
<i>Microscopía de epifluorescencia</i>	45
<i>Microscopía confocal</i>	46
<i>Co-expresión de los polipéptidos C-terminal con chaperoninas</i>	46
<i>Correlación entre algunas propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos de tubulina y el estado de agregación en que se reproducen en <i>E. coli</i></i>	47
<i>Tinción con Stains all</i>	47
<i>Unión de <sup>45</sup>Ca <math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>-tubulina y polipéptidos C-terminal en membranas de nitrocelulosa</i>	47
<i>Unión de calcio al heterodímero de tubulina</i>	48
<b>RESULTADOS</b>	50
<i>Construcción y expresión de plasmidios recombinantes que codifican para polipéptidos C-terminal de <math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>- tubulina</i>	50
<i>Construcción de los plasmidios recombinantes</i>	51

<i>Expresión de los plasmidios recombinantes que codifican para los polipéptidos C-terminal</i>	56
<i>Clonamiento y expresión de los plasmidios que codifican para <math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>-tubulina</i>	60
<i>Solubilidad de <math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>-tubulina y de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli</i>	62
<i>Formación de CI por los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli</i>	66
<i>Factores que influyen sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli</i>	74
<i>Propiedades de la proteína</i>	74
<i>Influencia del sistema de expresión y de la secuencia de <math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>-tubulina</i>	82
<i>Influencia de la cepa bacteriana</i>	84
<i>Cinética de formación de los CI</i>	86
<i>Efecto de detergentes sobre la estabilidad de los CI</i>	89
<i>Influencia de la temperatura de inducción sobre la solubilidad del polipéptido RL-60<math>\beta</math>8</i>	94
<i>Efecto de las condiciones de ruptura celular sobre la solubilidad de los polipéptidos RL-60<math>\beta</math>8 y RL-33<math>\beta</math>6</i>	96
<i>Influencia de la concentración de proteínas y otros</i>	

<i>componentes bacterianos sobre la solubilidad del polipéptido RL-60β8</i>	100
<i>Co-expresión de polipéptidos C-terminal y chaperoni- nas GroEL/GroES</i>	102
<i>Características funcionales y estructurales de los poli- péptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli</i>	106
<i>Sitios de unión para calcio en los polipéptidos de la tu- bulina</i>	106
<i>Secuencia aminoacídica y estructura de algunos poli- péptidos C-terminal</i>	112
<b>DISCUSION</b>	114
<i>Condiciones de ruptura celular</i>	116
<i>Formación de CI</i>	117
<i>Solubilidad de los productos expresados</i>	123
<i>Funcionalidad de los productos de expresión</i>	128
<b>CONCLUSIONES</b>	133
<b>PROYECCIONES</b>	134
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	135

## LISTA DE FIGURAS

	pág
FIGURA 1. Secuencia aminoacídica de $\alpha$ -tubulina de queratocito humano y $\beta$ -tubulina de cerebro de embrión de pollo, deducida a partir de su secuencia nucleotídica	15
FIGURA 2. Esquema simplificado de los cDNA recombinantes que codifican para polipéptidos C-terminal de $\alpha$ -tubulina de queratocito humano	53
FIGURA 3. Esquema simplificado de los cDNA recombinantes que codifican para polipéptidos C-terminal de $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo	54
FIGURA 4. Representación esquemática de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina y sus polipéptidos C-terminal subclonados en <i>E. coli</i>	55
FIGURA 5. Electroforesis en SDS-PAGE de los polipéptidos C-terminal de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina sobreproducidos en <i>E. coli</i> y detectados por tinción con Azul de Coomassie R-250 o autorradiografía	57
FIGURA 6. Electroforesis en SDS-PAGE de los polipéptidos C-terminal de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina sobreproducidos en <i>E. coli</i> y detectados por tinción con Azul de Coomassie R-250, autorradiografía o inmunoblot	59
FIGURA 7. Expresión de los plasmidios pRL $\alpha$ y pRL $\beta$ , que codifican para $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina	61
FIGURA 8. Determinación de la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina sobreproducidos en <i>E. coli</i>	63

FIGURA 9. Determinación de la solubilidad de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina sobreproducidas en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	65
FIGURA 10a. Microscopía electrónica de transmisión de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) que expresan polipéptidos de $\beta$ -tubulina	67
FIGURA 10b. Microscopía electrónica de transmisión de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) que expresan el polipéptido RL-81 $\beta$ 12	68
FIGURA 11. Microscopía confocal de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) que expresan $\beta$ -tubulina y algunos polipéptidos C-terminal	70
FIGURA 12a. Microscopía de epifluorescencia de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) que expresan polipéptidos C-terminal de $\alpha$ -tubulina	71
FIGURA 12b. Microscopía de epifluorescencia de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) que expresan polipéptidos C-terminal de $\beta$ -tubulina	72
FIGURA 13. Relación entre algunos parámetros fisicoquímicos y la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina sobreproducidos en <i>E. coli</i>	79
FIGURA 14. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-03 $\beta$ 2 sobreproducido en <i>E. coli</i>	81
FIGURA 15. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 subclonado en el vector pT7-7/GT	83
FIGURA 16. Determinación de la solubilidad de $\alpha$ -tubulina de <i>Entamoeba histolytica</i> sobreproducida en <i>E. coli</i>	85
FIGURA 17. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 a diversos tiempos después de la inducción	88

FIGURA 18. Estabilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 en los CI	90
FIGURA 19. Tratamiento de los CI del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 con detergentes	92
FIGURA 20. Tratamiento de los CI del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 con diferente concentración de SDS	93
FIGURA 21. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 sobreproducido a baja temperatura	95
FIGURA 22. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 en presencia de detergentes no iónicos usados en el proceso de ruptura celular	97
FIGURA 23. Efecto del uso de detergentes no iónicos en el proceso de ruptura celular sobre la solubilidad del polipéptido RL-33 $\beta$ 6	98
FIGURA 24. Efecto de la concentración de células bacteriana sobre la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8	101
FIGURA 25. Determinación del efecto de la expresión de chaperonas GroEL/GroES sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal.	104
FIGURA 26. Gráfico de Scatchard para la unión de calcio al heterodímero de tubulina de cerebro de pollo	108
FIGURA 27. Detección de motivos de unión de calcio en los polipéptidos RL-11 $\alpha$ 2 y RL-38 $\beta$ 4	109
FIGURA 28. Unión de calcio a tubulina de cerebro de pollo	111

## LISTA DE TABLAS

	pág
TABLA 1. Endonucleasas empleadas para generar los plasmidios quiméricos que codifican para polipéptidos de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina	32
TABLA 2. Cuantificación de la solubilidad de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina y de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	64
TABLA 3. Algunas propiedades fisicoquímicas de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina y de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en <i>E. coli</i>	76
TABLA 4. Efecto de las condiciones de lisis sobre la solubilidad de los polipéptidos RL-33 $\beta$ 6 y RL-60 $\beta$ 8 sobreproducidos en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	87
TABLA 5. Efecto de la coexpresión de chaperoninas GroEL/GroES sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de la tubulina sobreproducidos en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	105

## ABREVIATURAS

A:B	acrilamida:bisacrilamida
APS	persulfato de amonio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BPTI	inhibidor de tripsina de páncreas de bovino
$\beta$ ME	$\beta$ - mercaptoetanol
BSA	seroalbúmina de bovino
cpm	cuentas por minuto
c.s.p.	cantidad suficiente para
DMSO	dimetilsulfóxido
DNAasa	desoxirribonucleasa I
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etilenglicoltetracético
FA	fosfatasa alcalina
GTP	guanosina-5'-trifosfato
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
MET	microscopía electrónica de transmisión

NBT	azul p-nitrotetrazolio
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de polimerasa
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNAasa	ribonucleasa pancreática
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
Taq polimerasa	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris-HCl	cloruro de Tris-hidroximetilaminometano
U	unidades
UK	unidades Klett-Summerson
u.v.	ultravioleta
V	volt

## RESUMEN

El clonamiento y la sobreexpresión de genes en bacterias produce generalmente cuerpos de inclusión (CI), que constituyen un problema serio para la obtención y purificación de proteínas sobreproducidas. Por esto, ha sido habitual incluir ciclos de desnaturalización y renaturalización de proteínas aisladas desde CI, lo cual generalmente conduce a un bajo rendimiento. Grandes esfuerzos se han desplegado para diseñar estrategias que permitan obtener las proteínas en forma soluble en *Escherichia coli*. Sin embargo, el problema persiste, pues aún se desconocen varios de los factores que participan en la formación de los CI.

En esta Tesis se propuso estudiar en forma sistemática los factores más importantes que contribuyen a la producción de CI en *Escherichia coli*, usando como modelo experimental la sobreproducción de algunos polipéptidos C-terminal de distinto tamaño y la cadena polipeptídica completa de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. El modelo resulta apropiado, pues estas proteínas que se producen en forma soluble *in vitro* en un sistema de reticulocitos de conejo, en *E. coli* lo hacen en forma insoluble. El criterio utilizado para construir los polipéptidos C-terminal se basó en la participación de éstos en módulos o dominios en ambas proteínas. Así, en cada una de ellas se han definido tres dominios estructurales, que se localizan secuencialmente entre los aminoácidos 1 al 120, 170 al 260 y

295 al 430, respectivamente. Además, el último dominio en su extremo C-terminal (últimos 20 aminoácidos) presenta una alta densidad de cargas negativas, pues contienen abundantes residuos de ácido glutámico y ácido aspártico. De éstos, el dominio 2 contiene la zona de interacción entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y es rico en aminoácidos hidrofóbicos (41 %), mientras que el dominio 3 se caracteriza por tener mayor polaridad, pues contiene los últimos 20 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína. Se ha propuesto que proteínas con una elevada carga neta tienen una menor tendencia a la agregación, por lo que la presencia de éstos aminoácidos con carga negativa en el extremo C-terminal debiera ser un factor que contribuye a la solubilidad de los polipéptidos que lo contienen cuando se sobreproducen en *E. coli*. Por otro lado, la presencia del dominio 2 con su carácter hidrofóbico contribuiría a la recuperación de la proteína insoluble. En el modelo de estudio también se consideró la influencia sobre la formación de CI de las condiciones de crecimiento bacteriano y de ruptura celular.

La estrategia consistió en clonar y expresar en *E. coli* el cDNA de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y de algunos polipéptidos derivados. A partir de los cDNA de la isoformas  $\alpha$ 1 de  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano y  $\beta$ 2 de  $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo, por manipulación genética, se construyeron polipéptidos de diferentes tamaños a partir del extremo C-terminal de la proteína con el fin de generar una familia de polipéptidos carentes de uno o más dominios del extremo N-terminal. Así, se obtuvieron los siguientes polipéptidos derivados de la  $\alpha$ -

tubulina: RL-18 $\alpha$ 8 (PM 44018), RL-11 $\alpha$ 2 (PM 31049), RL-52 $\alpha$ 3 (PM 8148); y los polipéptidos derivados de la  $\beta$ -tubulina: RL-81 $\beta$ 12 (PM 37078), RL-38 $\beta$ 4 (PM 32454), RL-60 $\beta$ 8 (PM 18970) y RL-33 $\beta$ 6 (PM 6771). Los resultados de la expresión demostraron que tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -tubulina y la mayoría de los polipéptidos C-terminal se sobreprodujeron en forma insoluble (< 5 % de solubilidad); el polipéptido RL-52 $\alpha$ 3 se sobreprodujo parcialmente soluble (30 % - 40 %) de igual modo que el polipéptido RL-60 $\beta$ 8 (20 % - 30 %) y el polipéptido RL-33 $\beta$ 6 se sobreprodujo sobre un 95 % en forma soluble.

Se demostró que la formación de CI depende principalmente de la carga de la proteína, pues una elevada carga neta negativa promedio favorece la obtención de los polipéptidos en forma soluble. Por ejemplo, la solubilidad del polipéptido RL-33 $\beta$ 6 se debería a su carga neta promedio (-0,293) y no a su tamaño (peso molecular 6771). En términos comparativos, la carga neta promedio presentó una buena correlación con la solubilidad (coeficiente de regresión lineal -0,95), en tanto que la fracción de residuos de aminoácidos formadores de vuelta (glicina + prolina + asparragina + serina) o el tamaño presentaron una baja correlación. Tampoco se observó una buena correlación entre la solubilidad de polipéptidos y la fracción de residuos de cisteína o de prolina.

Se demostró que la solubilidad de la proteína depende de su concentración intracelular y no se afecta por la concentración total de proteína extracelular durante el proceso de ruptura celular. Por otra parte, se demostró

que las condiciones experimentales que se emplean para purificar las proteínas sobreproducidas son importantes, pues, por ejemplo, la utilización de detergentes apolares, como por ejemplo 2 % de Tritón X-100 o 1 % de Nonidet P-40, promueven la formación de agregados insolubles del polipéptido RL-33β6 que se recupera soluble por ciclos de congelamiento y descongelamiento. Este efecto se suprimió con el empleo de NaCl 1M en el amortiguador, lo que indica que en la formación de los agregados participan fuerzas electrostáticas. Finalmente, la formación de CI de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y de polipéptidos C-terminal no se afectó por la co-expresión de las chaperoninas GroEL/GroES, ni con el empleo de bajas temperaturas (15 °C) durante la expresión. Sin embargo, estos agregados mostraron susceptibilidad a proteasas, pues sufrieron degradación después de transcurrida 1 hora desde su inducción, lo que constituye un problema para el desarrollo de protocolos experimentales tendientes a purificarlos.

Puesto que la formación de CI de los polipéptidos pudiese deberse a cambios en las propiedades estructurales o funcionales de ellos, se estudió la relación estructura - función de los polipéptidos sobreproducidos en forma soluble. Por ejemplo, los polipéptidos sobreproducidos en esta tesis permitieron contribuir la determinación del sitio de unión para calcio en el heterodímero de tubulina, pues éste sólo en polipéptidos de la  $\beta$ -tubulina. En el heterodímero de tubulina de cerebro de pollo también se detectó 1,25 sitios en la  $\beta$ -tubulina. La constante de unión de calcio al heterodímero tuvo un valor de 29  $\mu$ M. Por otra

parte, con respecto a la estructura de los polipéptidos RL-52 $\alpha$ 3 y RL-33 $\beta$ 6 se demostró su potencialidad de adquirir estructura  $\alpha$ -hélice cuando se usó trifluor-etanol al 60 % como solvente o se disminuyó el pH a 2 (20 % para el polipéptido RL-52 $\alpha$ 3 y 30 % para el polipéptido RL-33 $\beta$ 6). Estos resultados fueron confirmados por medio de la estructura tridimensional obtenida por resonancia nuclear magnética bidimensional.

## ABSTRACT

Cloning and expression of foreign genes in bacteria usually induces the formation of inclusion body (IB). Thus, denaturation and renaturation cycles must be used to obtain the expressed proteins in a soluble form. This procedure has a poor yield and efforts have been made to improve the strategies for recovering a soluble and functional protein overproduced in *Escherichia coli*. However, the mechanisms involved in formation of IBs are still unknown.

The aim of this thesis was to contribute to the knowledge of IB formation in *E. coli* by conducting a systematic study of the factors involved in this process. The experimental model used was the expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin and its C-terminal region derivatives. Tubulin has three structural domains sequentially distributed in the molecule, and have been defined at positions 1 to 120, 170 to 260, and 295 to 430, respectively. Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin contain a C-terminal tail (last 20 aminoacids) which are highly negatively charged because of their content of aspartic and glutamic aminoacids residues. On the other hand, domain 2 participates in the interaction between  $\alpha$ - and  $\beta$ - tubulins, and it is highly enriched in hydrophobic aminoacids (41 %) while domain 3 is characterized by the presence of a highly charged tail. Thus, we hypothesized that domain 2 contributed to the insolubility of the tubulins and domain 3 increased the solubility of the protein due to the polarity of this region.

We cloned and expressed in *E. coli* the cDNA of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, and of a series of C-terminal polypeptides obtained by deleting variable fragments from the N-terminal region of the protein, that lacked one or more domains of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin. The polypeptides obtained were RL-18 $\alpha$ 8 (MW 44018), RL-11 $\alpha$ 2 (MW 31049), and RL-52 $\alpha$ 3 (MW 8148) derived from  $\alpha$ -tubulin; and polypeptides RL-81 $\beta$ 12 (MW 37078), RL-38 $\beta$ 4 (MW 32454), RL-60 $\beta$ 8 (MW 18970), and RL-33 $\beta$ 6 (MW 6771) derived from  $\beta$ -tubulin.

Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, and the majority of the polypeptides (RL-18 $\alpha$ 8, RL-11 $\alpha$ 2, RL-81 $\beta$ 12, and RL-38 $\beta$ 4) were overproduced as insoluble IBs (< 5 % of solubility); the polypeptide RL-52 $\alpha$ 3 was overproduced as partially soluble protein (30 % - 40 %) similar to the polypeptide RL-60 $\beta$ 8 (20 % - 30 %). In contrast, the polypeptide RL-33 $\beta$ 6 was overproduced as soluble protein (> 95 %). The analysis of the physicochemical properties of the soluble and partially soluble peptides led us to conclude the importance of the charge upon IB formation. The solubility of the polypeptide RL-33 $\beta$ 6 was the consequence of its high negative charge (net average charge -0,293), and it was independent of the size of the peptide expressed. The net average charge showed a good correlation with the solubility of all the polypeptides (correlation coefficient -0,95), in contrast to other parameters measured, such as the turn forming aminoacids fraction (serine + glycine + asparragine + proline) which showed a correlation coefficient of 0,78. Moreover, no good correlation was observed, neither with the cysteine fraction nor with the proline fraction.

On the other hand, it was determined that the solubility of the polypeptides depended on the intracellular concentration of the protein, while no influence upon the solubility of the polypeptide was observed when the total protein concentration varied during the disruption step. The disruption buffer used affected the solubility of the protein recovered, since the presence of non ionic detergents such as 2 % Triton X-100 or 1 % Nonidet P-40 induced the aggregation of the RL-33 $\beta$ 6 polypeptide, which otherwise was recovered in the soluble form. This effect was inhibited when 1 M NaCl was present in the disruption buffer, indicating the electrostatic nature of the forces involved in the polypeptide aggregation. Finally, the IBs formation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, and of the C-terminal polypeptides was not prevented by either the simultaneous overexpression of GroEL/GroES chaperonin or the expression at low temperature (15 °C). The IBs were found to be unstable, and were partially degraded after 1 hour of being produced.

The tubulin polypeptides overexpressed in this thesis allowed us to contribute in determining the binding site of calcium in tubulin, since it was detected only in the  $\beta$ -tubulin molecule. Also, structural studies showed the potential of polypeptides RL-52 $\alpha$ 3 and RL-33 $\beta$ 6 to acquire secondary structure in 60 % trifluor-ethanol or by the lowering of pH to 2 (20 % of  $\alpha$ -helix for the RL-52 $\alpha$ 3 polypeptide and 30 % of  $\alpha$ -helix for the RL- 33 $\beta$ 6 polypeptide). These results were confirmed by bidimensional nuclear magnetic resonance studies.

## INTRODUCCION

El avance de la biología actual está marcado por la habilidad de tener una descripción cuantitativa de los procesos que definen un sistema vivo. El objetivo ha sido desarrollar modelos detallados que permitan obtener una relación estructura-función, que puede ser reconocida y probada con genética molecular. Sin embargo, el estudio y análisis de las relaciones estructura-función en algunas proteínas se ha visto frenado en su avance por la imposibilidad de contar con preparaciones purificadas, homogéneas, que permitan obtener cristales apropiados para tales estudios. Esto se debe a que, en muchos casos, las proteínas presentan más de una iso especie por célula o bien, a la dificultad de contar con la cantidad de tejido necesario para su purificación (George y col., 1981; Kronheim y col., 1986; Takamatsu y col., 1992). Para solucionar estos problemas se ha recurrido a la biología molecular, donde se han desarrollado estrategias experimentales para aumentar la concentración de una determinada proteína en un nuevo hospedador (Marston, 1986; Makrides, 1996). La estrategia consiste en clonar el gen que las codifica y expresarlo, por ejemplo, en *Escherichia coli*. Es así como el empleo de bacterias para expresar proteínas eucariontes y procariontes ha tenido un importante desarrollo en los últimos quince años (Marston, 1986; King y col.,

1993; Liu y col., 1996; Wang y col., 1996; Yamada y col., 1997).

La mayoría de las proteínas sobreproducidas en *E. coli* se recuperan en forma de agregados insolubles desde el citoplasma bacteriano, donde se encuentran formando los llamados cuerpos de inclusión (CI) (Marston, 1986; Schein, 1989). Si bien el proceso de purificación de las proteínas a partir de los CI es sencillo, se debe recurrir a la aplicación de procedimientos de desnaturalización con agentes caotrópicos (por ejemplo, 6 M de clorhidrato de guanidina u 8 M urea), seguido de una etapa de renaturalización para obtenerlas en estado soluble (Basu y col., 1991; Takamatsu y col., 1992). El procedimiento generalmente tiene un rendimiento bajo, en términos de obtención de la proteína soluble y funcional (Buchner y Rudolph, 1991; Orsini y col., 1991). Por esta razón, se han ensayado procedimientos de recuperación de las proteínas recombinantes desde los CI usando detergentes. Así, la actina se obtiene soluble desde los agregados cuando se emplea laurilsarcosinato de sodio (Frankel y col., 1991). El mismo efecto se ha observado con el uso de cloruro de cetilmetilamonio para recuperar la hormona del crecimiento de cerdo sobreproducida en *E. coli* (Puri y col., 1992). Sin embargo, el problema de la obtención de las proteínas heterólogas solubles y funcionales en *E. coli* persiste.

Por qué se agregan las proteínas clonadas y expresadas en bacterias es una interrogante abierta en la actualidad, pues no se han establecido los mecanismos moleculares lo suficientemente claros que den cuenta de este

fenómeno. Se han realizado estudios con proteínas particulares empleando mutagénesis sitio específica para conocer cómo influyen algunos residuos de aminoácidos en su estado de agregación cuando se sobreproducen en *E. coli*, pero los resultados no se pueden generalizar. Por ejemplo, Knappik y Plückthun (1995) observaron que algunas mutaciones localizadas en las zonas de vueltas del fragmento Fab o del fragmento Fv de inmunoglobulinas permitían obtener la proteína en forma soluble cuando se sobreproducía en *E. coli*. En otro estudio, IZARD y col. (1995) encontraron que la sustitución del triptofano 140 por fenilalanina en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) de la colicina A daba por resultados la obtención de un 50 % de la proteína sobreproducida en *E. coli* en forma insoluble. La sustitución de los residuos de triptofanos 86 o 130 por fenilalanina en la proteína no tenían el mismo efecto, pues la solubilidad era poco afectada (22 % y 19 % de proteína insoluble, respectivamente). Resultados similares se han obtenido con otras proteínas cuando se estudian otros residuos de aminoácidos, como por ejemplo los residuos de cisteína en el factor de crecimiento básico de fibroblasto (Rinas y col., 1992). Esta proteína se sobreproduce un 70 % soluble en *E. coli* y tiene cuatro residuos de cisteína. Los residuos 26 y 93 se localizan hacia su interior cuando la proteína está plegada y forman puentes disulfuro; los residuos 70 y 88 se localizan en la superficie y se encuentran como grupos sulfidrilos libres. Los autores observaron que la sustitución de la cisteína 70 por serina disminuía la solubilidad y sólo 41 % de la proteína era soluble. Por otro lado, la sustitución de la cisteína 88 por serina

o la sustitución en forma simultánea de las cisteínas 70 y 88 por serinas, no afectaban la proporción de proteína soluble que se recuperaba desde *E. coli*. Sin embargo, la sustitución simultánea de las cisteínas 26 y 93 por serinas o la sustitución de todas las cisteínas por serinas abolía totalmente la solubilidad, encontrándose la proteína 100 % insoluble en *E. coli*. Los resultados anteriores sugieren que la producción de los CI no se relaciona sólo con la presencia o ausencia de determinados residuos de aminoácidos, sino que parece ser la consecuencia de un conjunto de factores que afectan en forma particular a cada proteína que se sobreproduce en *E. coli*.

Se han realizado numerosos esfuerzos tendientes a predecir la solubilidad con que se sobreproducirá una proteína en *E. coli*. Así, Schein (1990) sugiere que las proteínas insolubles, que forman CI, poseen esta característica tanto por las propiedades de la proteína que se está sobreproduciendo como por las del solvente que se usa en su recuperación. Otro estudio, realizado por Wilkinson y Harrison (1991), utilizando un elevado número de proteínas cuyos genes han sido expresados en *E. coli*, indica que parece existir una fuerte correlación entre la formación de CI y la carga neta promedio de la proteína o la fracción de residuos formadores de vuelta (fracción combinada de asparragina, prolina, glicina y serina) que contiene la molécula. Así, cuanto menos electronegativa sea una proteína o mayor sea su contenido de residuos de aminoácidos formadores de vuelta, mayor es la probabilidad de que se exprese en forma insoluble. Sin embargo, estudios en los cuales se

reemplazan los residuos de triptofano presentes en distintas posiciones de la molécula (Chrnyk y col., 1993) o cuando se sustituye un triptofano por fenilalanina (Izard y col., 1994), y por lo tanto no se modifican los parámetros señalados por Wilkinson y Harrison (1991), conducen a la obtención de la proteína con distinta solubilidad. Estos resultados sugieren que además deben considerarse otros factores para poder predecir si una determinada proteína se sobreproducirá soluble o insoluble en *E. coli*.

En esta Tesis nos proponemos contribuir al conocimiento del mecanismo de formación de los CI en *E. coli*, usando como modelo experimental la sobreproducción de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y algunos polipéptidos C-terminal. Esta proteína es motivo de intensos estudios con el propósito de establecer relaciones estructura-función y se ha propuesto el clonamiento molecular como una alternativa válida para superar el problema de la heterogeneidad de la macromolécula obtenida desde su fuente de origen natural.

*Cuerpos de inclusión en E. coli.* De acuerdo con lo señalado anteriormente, la mayoría de las proteínas clonadas y expresadas en *E. coli* forman agregados insolubles en su citoplasma, denominados CI. Los CI se han definido como estructuras amorfas, opacas a los electrones, sedimentables por centrifugación a baja velocidad, carentes de envoltura y compuestos mayoritariamente por las proteínas sobreproducidas en el citoplasma bacteriano (Marston, 1986). La mayoría de los CI no presentan actividad proteolítica, por lo cual se descarta

que sean producidos como una estrategia de las células bacterianas para eliminarlos mediante proteasas citoplasmáticas, como ocurre normalmente con aquellas proteínas de la bacteria cuya síntesis aumenta abruptamente o con proteínas que sufren mutaciones (Prouty y col., 1975; Miller, 1987).

Para superar el problema de la formación de agregados insolubles con las proteínas que se sobreproducen en *E. coli* se han usado diversas estrategias, entre las que se incluyen la modificación de dichas proteínas para promover su excreción al medio extracelular y evitar su acumulación intracelular (Holland y col., 1990; Stader y Silhavy, 1990), o la variación de algunos parámetros fisicoquímicos susceptibles de manejar en el laboratorio (por ejemplo, temperatura) y que pueden afectar tanto a la bacteria como al plegamiento de la proteína sobreproducida (Chalmer y col., 1990; Schein, 1989). Un ejemplo, de esta última alternativa se ha aplicado en la obtención de la enzima kanamicina nucleotidil transferasa, la cual se recupera soluble y activa cuando se sobreproduce a 23 °C, pero forma CI cuando se sobreproduce a 37 °C (Liao, 1991).

Para promover la excreción de las proteínas recombinantes y evitar la producción de CI, se han generado proteínas de fusión entre las proteínas de interés y un fragmento de una proteína bacteriana extracelular que es responsable de su excreción (región que contiene el péptido señal). Tal es el caso de la proteína que une retinol (RBP), donde se fusionó el cDNA que la codifica con el DNA que codifica para la secuencia señal de la proteína

bacteriana OmpA (Sivaprasadarao y Findlay, 1993), y también para la proteína inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI), que se fusionó con el péptido señal de la fosfatasa alcalina (Marks y col., 1986). El propósito de esta nueva estrategia era evitar la acumulación intracelular del polipéptido clonado, pues se sospechaba que el aumento brusco de la concentración intracelular de los intermediarios del plegamiento de las proteínas recombinantes los haría alcanzar su punto crítico de solubilidad, precipitando (Mitraki y King, 1989, Chrunyk y col., 1993). En ambos casos la estrategia aplicada tuvo éxito, pues las fusiones permitieron la obtención de las proteínas RBP y BPTI solubles y correctamente plegadas. Sin embargo, esta estrategia no siempre lleva a los resultados deseados, porque la proteína permanece insoluble o bien, no es secretada como en el caso de la expresión de algunas variantes de receptores de células T (para revisión, ver Makrides, 1996).

Una idea alternativa empleada para evitar la formación de CI, consiste en fusionar las proteínas de interés con proteínas que se sabe que son solubles en el citoplasma bacteriano, como por ejemplo, la fusión del receptor de progesterona de pollo, trunco, con ubiquitina (Power y col., 1990) o la fusión de diversas citoquinas y factores de crecimiento con tioredoxina (La Valle y col., 1994). Los resultados observados con esta estrategia han sido contradictorios, pues se ha logrado éxito con las proteínas mencionadas anteriormente, mientras que otras proteínas, como por ejemplo, la hormona paratiroidea humana (Wingender y col., 1989) y la neurotoxina B-IV de *Cerebratulus*

(Howell y Blumenthal, 1989) fusionadas con  $\beta$ -galactosidasa continúan expresándose en forma insoluble.

Los métodos utilizados para romper las células que sobreproducen proteínas heterólogas y homólogas han demostrado tener importancia sobre la solubilidad con que se recuperan los polipéptidos. Por ejemplo, cuando se emplea laurilsarcosinato de sodio para romper células que sobreproducen actina en *E. coli*, ésta se recupera soluble, a diferencia de lo observado cuando la ruptura celular se realiza con métodos alternativos (Frankel y col., 1991). Otros procedimientos utilizados en casos particulares incluyen el tratamiento de los cultivos con ácido perclórico (Hubbard, 1993) o el uso de columnas de intercambio iónico a pH ácido (Darby y Creighton, 1990). Hubbard empleó el ácido perclórico (7 % v/v) para purificar una proteína que une calcio (peso molecular 9000) clonada y expresada en *E. coli*, pues con estas condiciones la proteína permanece soluble mientras que las proteínas bacterianas precipitan. Darby y Creighton (1990) usaron una resina de intercambio catiónico y pH 2 para purificar el BPTI, aprovechando la característica de la proteína de permanecer soluble a este pH. Los autores sugieren que en las condiciones descritas se disociarían componentes bacterianos ácidos que estarían fuertemente unidos por cargas al BPTI, dado que el BPTI es una proteína básica. La unión de estos componentes bacterianos a la proteína serían la causa de su agregación para formar CI a pH fisiológico.

La composición de los CI también ha sido motivo de algunos estudios,

tendientes a conocer si existiría alguna proteína responsable de su formación. Veeraragavan (1989) observó que los CI de la proteína recombinante papaína fusionada a  $\beta$ -galactosidasa presentaban como contaminantes las proteínas OmpA y OmpF. Sin embargo, estas proteínas parecen ser contaminantes que se asocian a los CI en una etapa posterior a la ruptura celular, puesto que las proteínas mencionadas, que se purificaban desde los CI, carecían del péptido señal y se sabe que ellas maduran fuera del citoplasma. Resultados similares fueron informados por Hart y col. (1990) estudiando los CI de la hemoglobina de *Vitreoscilla* sobreproducida en *E. coli*. Los autores observaron, además, que los CI contenían el factor de elongación Tu como contaminante. Otras proteínas asociadas con la formación de los CI corresponden a proteínas inducibles por estrés térmico, cuyo peso molecular es 16000 (Allen y col., 1992). Estas proteínas se inducen durante la sobreproducción de renina humana, prorenina o factor 2 de crecimiento de bovino.

En general, se puede concluir que uno o más de los factores mencionados han demostrado tener influencia importante sobre la formación de los CI de algunas proteínas particulares, pero no se ha podido obtener conclusiones generales para explicar la formación de estos agregados insolubles y el problema persiste con la mayoría de las proteínas clonadas y expresadas en *E. coli*.

Dado que se ha señalado que los CI estarían compuestos por la proteína sobreproducida, la que se encuentra en un estado intermedio en su

plegamiento y no por la proteína completamente desplegada, nos referiremos brevemente algunos factores que son importantes para el plegamiento de las proteínas *in vivo*.

*Plegamiento intracelular de proteínas.* Desde la propuesta de Anfinsen (1973), en que se señala que el plegamiento de una proteína depende exclusivamente de su estructura primaria, pues en ella se encuentra toda la información necesaria para definir su estructura terciaria y su función biológica, hasta el presente, el conocimiento de cómo se pliegan las proteínas no ha podido dar origen a un modelo general de plegamiento. En la actualidad se sabe que, con muy pocas excepciones, las proteínas requieren de la asistencia de proteínas auxiliares para completar su plegamiento en forma exitosa y obtener una proteína plegada soluble y con actividad biológica (Hartl y Martin, 1992; Horwich y col., 1993; Hartl y col., 1994). Las proteínas accesorias más estudiadas en los últimos años corresponden a las chaperonas moleculares. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos vivos, tanto en eucariontes como en procariontes (Georgopoulos, 1992), donde tienen importancia fundamental en diversos procesos biológicos (Travers y col., 1994; Ewbank y Creighton, 1992). Las chaperonas relacionadas con el plegamiento de proteínas se han dividido en dos grandes grupos de proteínas, la familia de chaperonas hsp70 y la familia de chaperonas hsp60 o chaperoninas (Ellis, 1992; Hartl y Martin, 1992). Los componentes de estos dos

grupos se caracterizan por ser inducidos por estrés térmico y tener peso molecular cercanos a 60000 y 70000, respectivamente (Craig y col., 1993). La familia de las chaperoninas incluye a la hsp60 de mitocondrias (Ostermann y col., 1989), la GroEL de bacterias (Tilly y col., 1981; Hemmingsen y col., 1988), la proteína que une Rubisco de cloroplasto (Goloubinoff y col., 1989), el complejo de chaperoninas TCP-1 del citoplasma de células eucariontes (Yaffe y col., 1992) y la TF55 de arqueas (Trent y col., 1991), así como a la chaperonina GroES (PM 10000). En bacterias, las proteínas que están siendo sintetizadas son asistidas en su plegamiento primero por las chaperonas DnaK/DnaJ y por la chaperona GrpE (Hartl y col., 1994). Luego, cuando tienen estructura secundaria, las asisten las chaperoninas GroEL/GroES (Schmidt y Buchner, 1992; Viitanen y col., 1992; Martin y col., 1993).

Sin embargo, los factores que participan asistiendo el plegamiento de las proteínas *in vivo* o *in vitro* no son los mismos en todos los casos y dependen de la proteína en particular. Por ejemplo, Thomas y Baneyx (1996) observaron que para obtener el plegamiento correcto de la preS2-S'- $\beta$ -galactosidasa y evitar la formación de CI se requería de la sobreproducción de las chaperonas DnaK/DnaJ. Los autores indican que las chaperoninas GroEL/GroES no tienen el mismo efecto que las chaperonas DnaK/DnaJ, probablemente por no ser capaces de unirse a preS2-S'- $\beta$ -galactosidasa. Por otro lado, se ha observado que la citrato sintetasa, la cetoglutarato deshidrogenasa o la polinucleótido fosforilasa no pueden alcanzar su plegamiento correcto en el citoplasma

bacteriano cuando no disponen de las chaperoninas GroEL/GroES (Horwich y col., 1993).

Otro aspecto importante a considerar en la formación de CI se relaciona con la cinética de plegamiento de las proteínas *in vivo*. El grupo de Jonathan King ha sugerido que el problema de la agregación de las proteínas heterólogas en bacterias depende, fundamentalmente, de la inestabilidad de los intermediarios de plegamiento de cada proteína (para revisión, ver Mitraki y King, 1989). Este grupo ha estudiado la formación de agregados usando la expresión de la proteína de la espícula del bacteriófago P22 en *Salmonella typhimurium*. Con este propósito prepararon una proteína mutada termosensible que se agrega a la temperatura no permisiva, pero que es capaz de conservar su estado nativo a esta temperatura, cuando se ha plegado a la temperatura permisiva (Sturtevant y col., 1989). Los autores lograron obtener mutaciones en la proteína que suprimen la mutación termosensible original, permitiendo que la proteína se pliegue normalmente a cualquier temperatura (Mitraki y col., 1991). Estas nuevas mutaciones les permitieron definir zonas en la proteína que serían responsables de la formación de los agregados.

*El modelo experimental: la tubulina.* La tubulina es una proteína heterodimérica con un coeficiente de sedimentación de 5.8S y un peso molecular de 100.000 (Ludueña y col., 1992). La disociación entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina tiene una constante de 1  $\mu$ M (Rodríguez y col., 1996). La tubulina es el componente principal del

citoesqueleto en células eucariontes, donde interviene en numerosos procesos celulares. Para cumplir su función, la proteína participa en la polimerización y despolimerización de microtúbulos, proceso que puede ser reproducido *in vitro* a partir de la proteína purificada y en presencia de GTP y cationes divalentes que modulan el proceso (para revisión, ver Monasterio y col., 1995).

El mecanismo de la polimerización y despolimerización de los microtúbulos (inestabilidad dinámica), tanto *in vivo como in vitro*, y la regulación de este proceso ha sido el tema de interés en nuestro laboratorio. Sin embargo, la heterogeneidad de la proteína en su fuente natural, dada por la presencia de numerosas isoformas de tubulina en un mismo tejido (George y col., 1981), hacen difícil la interpretación de los resultados obtenidos. Por otra parte, para comprender el mecanismo molecular de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos es necesario conocer la estructura de la tubulina a alta resolución; sin embargo, no se ha podido utilizar la cristalografía de rayos-X para este efecto, debido a que esta proteína tiene la tendencia a agregarse a altas concentraciones y no se ha logrado obtener los cristales apropiados (por ejemplo, ver Nogales y col., 1995). Por otro lado, en el caso de lograr la cristalización aparecen dos nuevos problemas: uno es la heterogeneidad de las preparaciones, debida a la presencia de distintas isoformas de la tubulina en un mismo tejido y el otro, la presencia de modificaciones post-traduccionales que debe sufrir la proteína para ser funcional (George y col., 1981; Porque y col., 1991).

Una estrategia utilizada en el caso de otras proteínas que no ha sido posible cristalizar, es estudiar su estructura por partes a través del estudio de dominios de la proteína, los cuales por definición debieran tener la misma estructura terciaria tanto en la proteína como en forma aislada como segmentos (Creighton, 1992). En el caso de la tubulina este camino, aunque más largo, puede servir para conocer la estructura de módulos más pequeños por resonancia nuclear magnética y otros métodos espectroscópicos, con los cuales se pueden reconstruir la estructura de la proteína usando como base la estructura de la tubulina que se conoce a baja resolución (Nogales y col., 1995).

Estructuralmente, se ha propuesto la división de esta molécula en tres regiones compactas, con similar número de aminoácidos, las que estarían unidas por segmentos más accesibles al ataque proteolítico, considerados como vueltas expuestas (de la Viña y col., 1988). Estas tres regiones podrían ser entendidas como dominios (ver Esquema 1): un dominio N-terminal (dominio 1), un dominio central (dominio 2) y otro, C-terminal (dominio 3) (Beese y col., 1987; de la Viña y col., 1988). Cada dominio comprendería los siguientes aminoácidos (Figura 1):

dominio 1: aminoácidos 1 al 120

dominio 2: aminoácidos 170 al 260

dominio 3: aminoácidos 295 al 430.

*Subunidad  $\alpha$* 

1 60  
MRECISIHVGGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK

61 123  
HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTyrQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDRI

124 183  
KLADQCTRLQGFLVFHSFGGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVE

184 246  
PYNSILTTHTTLEHSDCAFVMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLISQIVSSITASLRFDGA

247 309  
LNVDLTEFQTNLVPYPRIHFLATYAPVISAEEKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPGH

310 370  
GKYMACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRTIQVDWCPTGFKVGINYQPPTVVPGGDLAK

371 429  
VQRAVCMLSNNTTAAIEAWARLDHKFDLMYAKRAFWHWYVGEEMEEGFSEAREDMAALE

430 451  
KDYEEVGVDSVEGEGEEEGEEY

*Subunidad  $\beta$* 

1 60  
MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDSLQLERINVYYNEATGNKYV

61 119  
PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDV

120 179  
VRKESESCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVMPSPKVSDTV

180 241  
VEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPTYGDLNHLVSAATMSGVTTCLR

242 300  
FPGQLNADLRKLVANMVPEPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDSKNMM

301 359  
AACDPRHGRYLTVAEIFRGRMSMKEVDEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPR

360 419  
GLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEEMDEMEFTEAESNMNDLV

420 445  
SEYQQYQDATADEQGEFEEEGEEDEA

**FIGURA 1. Secuencia aminoacídica de  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano y  $\beta$ -tubulina de cerebro de embrión de pollo, deducida a partir de su secuencia nucleotídica. El dominio 2 está subrayado. En verde se indican los residuos de aminoácidos ácidos y en rojo, los residuos de aminoácidos hidrofóbicos.**

En el dominio 1 de la tubulina se localizaría el sitio de unión intercambiable para el GTP, que tiene importancia en la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (Erickson y O'Brien, 1992). El dominio central (dominio 2, subrayado en la figura) contendría la zona de interacción entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina; en tanto que el dominio 3, se caracteriza por tener unida una cola (últimos 20 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína) altamente cargada, lo que le confiere mayor polaridad a esta región de la tubulina, y aquí se encontrarían los sitios para calcio y proteínas MAP que tienen una importante participación en la inestabilidad dinámica (Monasterio y col., 1995).

Recientemente, de Pereda y col. (1996a) realizaron un estudio sistemático de los sitios accesibles a digestión controlada con 12 proteasas comerciales de diferente especificidad. Los autores pudieron definir así los sitios expuestos en la superficie de microtúbulos inducidos por taxol, lo que les permitió contribuir a establecer un mapa topológico de la proteína. Además, este grupo estudió la estructura secundaria de 75  $\alpha$ -tubulinas, 106  $\beta$ -tubulinas y 14  $\gamma$ -tubulinas, y las comparó con las 12 secuencias de la proteína bacteriana FtsZ, que participa en la división celular, disponibles en el banco de datos SWISS-PROT. De este modo lograron definir un núcleo estructural y evolutivo común entre tubulinas y FtsZ, que es diferente del de otras proteínas que unen GTP (de Pereda y col., 1996b), lo que hace aún más importante el estudio del dominio donde se encuentra el sitio intercambiable para GTP.

*Plegamiento de la tubulina.* Al inicio de esta Tesis se conocían sólo algunos factores que eran necesarios para el proceso de plegamiento de la tubulina *in vivo*, los cuales habían sido deducidos de los requerimientos *in vitro*. Así, Yaffe y col. (1992) observaron que el complejo TCP1 (complejo polipeptídico t-1), presente en todas las células eucarióticas (Lewis y col., 1992), actuaba como chaperona molecular citosólica en el plegamiento de la tubulina. Los autores encontraron que en un sistema *in vitro* de lisado de reticulocito de conejo, la tubulina formaba un complejo susceptible a proteasas con la chaperona TCP1, de peso molecular 900000. La adición de MgATP al medio inducía la liberación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina como heterodímeros competentes para el ensamblaje y con una conformación relativamente resistente a proteasas. Esta chaperona TCP1 sería equivalente a la chaperonina citoplasmática bacteriana GroEL (Lewis y col., 1992). Por otra parte, trabajando con un sistema *in vitro*, Phadtare y col. (1995) observaron que la chaperonina GroEL era capaz de unirse con la tubulina desnaturalizada formando un complejo GroEL-tubulina  $\alpha\beta$ , cuando la chaperonina estaba presente en el amortiguador de replegamiento. Este complejo podía ser purificado por inmunoafinidad, usando anticuerpos anti GroEL, y la tubulina era liberada mediante la adición de GroES y ATP. Por lo tanto, es posible suponer que la tubulina clonada y expresada en bacterias pudiera requerir de las chaperoninas GroEL/GroES para plegarse correctamente en el citoplasma bacteriano.

Estudios recientes relacionados con el plegamiento de la tubulina han

permitido formarse una idea más completa de los factores que participarían en el proceso. Por ejemplo, se ha observado que el plegamiento de  $\alpha$ -tubulina requiere de la presencia de la chaperonina citosólica (c-cpn) (Tian y col., 1995a) y que las chaperoninas GroEL/GroES pueden suplir a la chaperonina c-cpn, pero la  $\alpha$ -tubulina obtenida en estas condiciones no adquiere su conformación nativa (Tian y col., 1995b). El estado nativo de la proteína sólo se obtiene cuando, además, se adicionan cofactores proteicos específicos (Paciucci, 1994; Tian y col., 1996). Por ejemplo, para el plegamiento de la  $\beta$ -tubulina se requieren factores proteicos denominados A, C, D y E, que tiene un orden correlativo de participación en el plegamiento. Las proteínas A y D actúan estabilizando la  $\beta$ -tubulina en un estado casi nativo, en tanto que las proteínas E y C se relacionan con la formación de los microtúbulos (Tian y col., 1996).

*Clonamiento y expresión de la tubulina en bacterias.* La tubulina obtenida desde diversas fuentes ha sido clonada y expresada en bacterias. Así, Wu y Yarbrough (1987) clonaron y expresaron la  $\alpha$ -tubulina y la  $\beta$ -tubulina de *Trypanosoma brucei* en *E. coli*, observando que ambas tubulinas se recuperaban en forma insoluble, formando CI. Por otra parte, Sánchez y col. (1994) clonaron la  $\alpha$ -tubulina de *Entamoeba histolytica*, pero no se ha informado el estado de agregación en que se sobreproduce la proteína en *E. coli*. La  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo (Valenzuela y col., 1981) y de

queratocito humano (Cowan y col., 1983) han sido expresadas en bacterias e *in vitro*, usando lisado de reticulocitos. Cuando la expresión se realiza en *E. coli*; tanto  $\alpha$ -como  $\beta$ -tubulina se producen en forma insoluble, formando CI; pero se obtienen en forma soluble como monómeros cuando se emplea la transcripción *in vitro* en el sistema de lisado de reticulocitos (Yaffe y col., 1988a; Yaffe y col., 1988b; Yaffe y col., 1989). La  $\alpha$ -tubulina también se expresa soluble por traducción *in vitro* cuando se utiliza un lisado de células de *E. coli* (Yaffe y col., 1988b). Sin embargo, esta  $\alpha$ -tubulina no es capaz de coensamblar en microtúbulos, a diferencia de lo observado con la  $\alpha$ -tubulina obtenida por traducción *in vitro* usando un sistema de lisado de reticulocitos. La solubilidad observada puede ser explicada por la baja concentración de la  $\alpha$ -tubulina obtenida por traducción *in vitro* (5 a 40  $\mu$ M).

Sólo la  $\beta$ -tubulina ha sido posible clonarla en bacteria y expresarla soluble (Bell y col., 1995). Para ello, se empleó una cepa de *Bacillus brevis*, donde la proteína se excreta al medio extracelular en presencia de EGTA, obteniéndose concentraciones de 2 mg/ml de proteína. La funcionalidad de esta proteína expresada en *B. brevis* no ha sido informada y los fundamentos que permiten explicar por qué una proteína citoplasmática de eucariontes es excretada en *B. brevis* no están claros.

*Objetivos de la Tesis.* En la actualidad se están explorando diversas estrategias para obtener proteínas clonadas solubles en bacterias, con el propósito de

aumentar la cantidad de proteína funcional que se obtiene. Sin embargo, hasta el momento no parece existir una estrategia común que permita evitar la formación de CI en los distintos sistemas ensayados y se necesitan nuevos antecedentes, con sistemas particulares, para establecer las bases de un posible mecanismo general en la formación de estos CI.

Dado el conocimiento que se tenía de algunos aspectos estructurales de la tubulina y la factibilidad de poder realizar estudios que implican el uso de herramientas de biología molecular y de manejo microbiológico, se decidió estudiar cómo influyen algunos factores propios de la célula bacteriana, del ambiente o de la tubulina sobreproducida en *E. coli* sobre la formación de agregados insolubles, como un modelo para explicar el problema más general de la formación de CI en bacterias. Este modelo permite, además, aportar información relativa a la proteína, su estructura y función, y presenta la ventaja de usar polipéptidos derivados de una misma proteína. De este modo se restringen las variables en el sistema, pues los requerimientos de factores bacterianos que asisten el plegamiento de la proteína elegida son los mismos y la carencia de alguno de ellos debiera afectar a todos los polipéptidos en forma similar. Otros autores han empleado para su análisis resultados obtenidos con proteínas muy diversas, que tienen requerimientos para su plegamiento bastante distintos y que sufren diferentes modificaciones postraduccionales, lo que contribuye a aumentar la incertidumbre en este tipo de análisis.

De acuerdo con lo expuesto, el objetivo general de esta Tesis fue

estudiar sistemáticamente algunos factores que influyen en la formación de los CI de polipéptidos C-terminal de la tubulina en *E. coli*, con el propósito de establecer los factores intrínsecos o extrínsecos al sistema que promueven su formación.

Este objetivo se sustenta en las siguientes proposiciones: 1) La mayoría de las proteínas clonadas y sobreproducidas en *Escherichia coli* se agregan en el citoplasma bacteriano, formando CI; entre ellas, la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y sus polipéptidos C-terminal. 2) En la formación intracelular de los CI de polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina participan proteínas bacterianas. 3) La acumulación de intermediarios de plegamiento y la falta de las proteínas accesorias que asisten el plegamiento de las proteínas clonadas en su fuente natural de origen, contribuye a la formación de los CI.

## MATERIALES Y METODOS

### I. MATERIALES.

*Reactivos.* De Sigma Chemical Co. se obtuvo anti  $\gamma$ -globulina de conejo conjugada con FA, aminoácidos (Kit 20 aminoácidos), APS, azul de bromofenol, azul de Coomassie R-250,  $\beta$ -mercaptoetanol, BCIP, bromuro de etidio, desoxirribonucleasa I, ditioneitol, glicerol, glucosa, IPTG, kanamicina, lisozima, NBT, PMSF, ribonucleasa pancreática, rifampicina, SDS, Stains all, tetróxido de osmio y Tricina; de Merck Química Ltda., ácido clorhídrico, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, dimetilsulfóxido, fosfato de potasio dihidrógeno, fosfato de sodio monohidrógeno, fosfato de sodio dihidrógeno, glicina, hidróxido de sodio, HEPES, metanol P.A., Tris-HCl y Trizma base; de Gibco BRL, acrilamida, agar Luria, bis-acrilamida y caldo Luria; de BioRad, agarosa, agarosa de bajo punto de fusión y TEMED; de Difco, agar-agar, extracto de levadura y triptona; de Laboratorios Chile, ampicilina y tetraciclina; de Fluka, cloruro de calcio y sulfato de magnesio; de New England BioLabs, endonucleasas y sus amortiguadores y ligasa T4 y su amortiguador.

*Cepas.* Las cepas empleadas en este estudio y sus características genotípicas

relevantes fueron las siguientes:

*E. coli* XLI-Blue (Bullock y col., 1987): *supE44 hsdR17 RecA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>Q</sup> lacZ M15]*.

*E. coli* BL21(DE3) (Studier y Moffatt, 1986): *hsd gal (λcl<sup>ts857</sup> ind1S am7 nin5 lac UV5<sup>-</sup> T7 gene1)*.

*E. coli* UH302 (Cole y col., 1982): *thi argE proA thr leu mte xyl arg galk lacY str supE*.

*E. coli* K38 (S. Tabor, comunicación personal): HfrC (λ).

La cepa de *E. coli* XLI-Blue se obtuvo comercialmente de Stratagene. La cepa de *E. coli* BL21(DE3) se obtuvo comercialmente de Novagene. La cepa de *E. coli* UH302 fue proporcionada por el Dr. G. Mora, Pontificia Universidad Católica de Chile. Finalmente, la cepa de *E. coli* K38 se obtuvo del Dr. S. Tabor, Universidad de Harvard, EE.UU.

## II. METODOS.

*Amortiguadores.* Se emplearon los siguientes amortiguadores:

- Amortiguador de electroforesis (Laemmli, 1970): Tris-HCl 25 mM - glicina 192 mM - SDS 0,1 % (no se ajustó el pH).

- Amortiguador de electroforesis (Schägger y von Jagow, 1987): *cátodo* Tris-HCl 100 mM - Tricina 100 mM - SDS 0,1 % (no se ajustó el pH). *Anodo* Tris-HCl 200 mM, pH 8,9.
- Amortiguador de geles (Laemmli, 1970): *concentrador* Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8. *Separador* Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.
- Amortiguador de geles (Schägger y von Jagow, 1987): Tris-HCl 100 mM - Tricina 100 mM - SDS 0,1 % (no se ajustó el pH).
- Amortiguador de muestras 1X: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 - SDS 2 % - glicerol 10 % -  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % - azul de bromofenol 0,01 %.
- Amortiguador para FA: Tris-HCl 100 mM, pH 9,5 -  $MgCl_2$  5 mM - NaCl 100 mM.
- Amortiguador PBS: fosfato de sodio 10 mM (monobásico/dibásico), pH 7,1 - NaCl 150 mM.
- Amortiguador TAE: Trizma base 40 mM - 57,1 ml de ácido acético glacial - EDTA 1 mM (no se ajustó el pH).
- Amortiguador TE: Tris-HCl 10 mM , pH 8,0 - EDTA 1 mM
- Amortiguador TEN: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 - EDTA 1 mM - NaCl 100 mM.
- Amortiguador TGM: Tris-HCl 25 mM - glicina 192 mM - metanol 20% (no se ajustó pH).
- Amortiguador de unión de calcio: PIPES 10 mM, pH 6,9 - NaCl 50 mM -  $MgCl_2$  0,1 mM

*Medios de cultivo.* En esta Tesis se usaron los siguientes medios de cultivo:

- Caldo Luria: Se obtuvo comercialmente o bien, se preparó en el laboratorio a partir de sus componentes (triptona 10 %, extracto de levadura 5 %, NaCl 10 % y se ajustó a pH 7,4 con NaOH).
- Agar Luria: Se obtuvo comercialmente o bien, se preparó en el laboratorio a partir de sus componentes (caldo Luria suplementado con 1,2 % de agar-agar).
- Medio M9: Se preparó en el laboratorio de acuerdo a Maniatis y col. (1982). El medio contenía por litro: 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de NaCl y 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El pH se ajustó a 7,4 y se esterilizó en autoclave (15 min. a 121 °C y 15 libras/pulgada<sup>2</sup> de presión). Una vez esterilizado, el medio se suplementó con  $\text{MgSO}_4$  2 mM,  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  y glucosa 0,2 %, para obtener el medio M9 completo. La solución stock de glucosa (20 %) se esterilizó por filtración.

En los experimentos de marcación con  $^{35}\text{S}$ -metionina, el medio M9 completo se suplementó con aminoácidos (diecinueve aminoácidos esenciales, excepto metionina) en concentración 100  $\mu\text{M}$ .

*Cultivos bacterianos.* A menos que se indique lo contrario, en todos los experimentos las cepas bacterianas se crecieron en caldo Luria. La incubación se realizó a 30 °C, con agitación constante (150 rpm). Cuando se requirió, el medio de cultivo se suplementó con alguno de los siguientes antibióticos, en las

concentraciones que se indican: ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ , kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$ , rifampicina 200  $\mu\text{g/ml}$ , tetraciclina 20  $\mu\text{g/ml}$ .

*Mantenimiento de las cepas bacterianas.* Todas las cepas bacterianas se mantuvieron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en DMSO. Con este propósito, los cultivos bacterianos crecidos en medio líquido se suplementaron con DMSO 10 %, se congelaron en forma rápida sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido y manteniendo los cultivos a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Stanley Maloy, Universidad de Illinois, comunicación personal).

*Plasmidios.* Como vector de expresión se empleó el plasmidio pT7-7, gentilmente proporcionado por el Dr. S. Tabor, Universidad de Harvard, EE.UU (resultados no publicados). Este plasmidio contiene el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y, río abajo de este promotor, secuencias nucleotídicas que generan en el plasmidio sitios de corte único con algunas enzimas de restricción, de modo que se pueden insertar fragmentos de DNA foráneos. La RNA polimerasa del fago T7, requerida por este sistema para transcribir los genes subclonados en el vector pT7-7, puede ser suministrada por un segundo plasmidio (plasmidio pGP1-2; Tabor y Richardson, 1985), también proporcionado por el Dr. S. Tabor. Alternativamente, la RNA polimerasa T7 puede ser suministrada por la cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Studier y Moffatt, 1986) que tiene el gen de esta enzima incorporado en su cromosoma, río abajo del

promotor *lac*. El plasmidio pGP1-2 se caracteriza por codificar resistencia a kanamicina y por tener clonado el gen de la RNA polimerasa T7 río abajo del promotor  $p_L$  del bacteriofago  $\lambda$ . Este promotor se encuentra reprimido por el represor termosensible,  $cl^{857}$ , que está codificado en el mismo plasmidio. El represor  $cl^{857}$  es activo a 30 °C e inactivo a 42 °C; por lo tanto, en este caso, la inducción de la síntesis de la RNA polimerasa T7 se realiza cambiando la temperatura de incubación a 42 °C durante 30 min. Cuando se emplea la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la inducción de la síntesis de la RNA polimerasa T7 se hace mediante la adición al medio de cultivo de IPTG en concentración final 0,5 mM o 1 mM.

El cDNA de la  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano y el cDNA de la  $\beta$ -tubulina de cerebro de embrión de pollo, proporcionados por el Dr. D. Cleveland (Johns Hopkins University), se encontraban disponibles en el laboratorio de la Dra. Rosalba Lagos, Universidad de Chile. Estos cDNA habían sido clonados en el plasmidio pBR322, que codifica resistencia para ampicilina y tetraciclina; la  $\alpha$ -tubulina estaba clonada en el sitio *Pst*I, interrumpiendo el gen que codifica resistencia a ampicilina y, por lo tanto, para su selección se usó la resistencia a tetraciclina (Cowan y col., 1983). Por otra parte, la  $\beta$ -tubulina estaba clonada en el sitio *Hind*III, interrumpiendo el gen que codifica resistencia a tetraciclina, y para su selección se usó la resistencia a ampicilina (Valenzuela y col., 1981). Además, en el laboratorio de la Dra. Lagos se disponía del plasmidio recombinante pRL $\alpha$  (C. Basso y R. Lagos, resultados no publicados), el cual

codifica y expresa para la  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano.

Los plasmidios que codifican para las chaperoninas GroEL y GroES (pOF39) y las chaperonas DnaK y DnaJ (pCG203) fueron proporcionados por el Dr. Carlos Jerez, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

*Purificación de DNA de plasmidios.* Todos los DNA de plasmidios se purificaron por el método de extracción rápida en NaOH, en la forma descrita por Lagos (1985), con algunas modificaciones menores. Cuatro ml de cultivo bacteriano de 16-24 horas de incubación se centrifugaron a 5000 rpm (rotor SS-34, centrífuga Sorvall RC-2B) durante 5 min., eliminándose el sobrenadante por aspiración. El sedimento de células bacterianas se resuspendió en 100  $\mu$ l de solución de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 - glucosa 50 mM - EDTA 10 mM) que contenía 2 mg/ml de lisozima. La suspensión se incubó 30 min. en hielo y se agregó 200  $\mu$ l de una solución NaOH 0,2 N - SDS 0,1 %, agitándose el tubo por rotación suave. La incubación se continuó por otros 5 min., para permitir que se completara la lisis celular, y se agregó 150  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, pH 4,8. La mezcla se agitó en forma enérgica por breves instantes y se incubó por otros 60 min. en hielo. Finalizada la incubación, la mezcla se centrifugó a 15000 rpm (rotor SS-34, centrífuga Sorvall RC-2B) durante 15 min. El sobrenadante (400  $\mu$ l) se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se precipitó con 1 ml de etanol absoluto a -20 °C durante 1 hora. El DNA precipitado fue sedimentado por centrifugación a 14500 g durante 10 min., secado a temperatura ambiente por 20 min. y

disuelto en 100  $\mu$ l de amortiguador TE.

*Tratamiento con RNAsa.* Cuando se requirió, el DNA plasmidial se trató con RNAsa y se precipitó nuevamente, usando acetato de amonio y etanol. Para ello, a la solución que contenía el plasmidio se le agregó RNAsa 100  $\mu$ g/ml, concentración final, y se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalizada la incubación, se eliminó la RNAsa por extracción del DNA con un 1 volumen de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) seguido de centrifugación a 14500 *g* durante 5 min. Se extrajo la fase acuosa (fase superior) y se precipitó mediante la adición de 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M y 3 volúmenes de etanol absoluto, frío (-20 °C). La precipitación se realizó a -20 °C durante 14 - 18 horas. El DNA se obtuvo por centrifugación en la forma ya descrita y se resuspendió en amortiguador TE o agua destilada estéril.

El DNA purificado por este método es susceptible de ser digerido con endonucleasas y ligado sin ningún otro tratamiento previo.

*Geles de agarosa.* A menos que se indique lo contrario, en todos los experimentos se usó geles de agarosa al 1 %. Para ello, se disolvió la agarosa en amortiguador TAE 1X. Las muestras de DNA se suplementaron con 1/4 de volumen de solución colorante 4X (ficol 10 % - azul de bromofenol 0,1%). Los geles se corrieron a 70 V, voltaje constante, hasta que el colorante migró a 2 cm

del borde inferior del gel. Posteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y los plasmidios se visualizaron en un transiluminador u.v. (longitud de onda 254 nm). Como referencia se empleó DNA del bacteriofago  $\lambda$  digerido con las enzimas *HindIII* o *BstEII*.

*Cuantificación del DNA.* La concentración de DNA en las diferentes muestras obtenidas se determinó a partir de los geles de agarosa, por comparación de la fluorescencia de la banda del DNA estudiado con la de la banda de DNA del estándar, de peso molecular más cercano.

*Plasmidios recombinantes.* Se construyeron siete plasmidios que codifican para polipéptidos C-terminal de las  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y uno, que codifica para un polipéptido de la  $\beta$ -tubulina que carece tanto del extremo carboxilo terminal como del extremo amino terminal de la proteína. Todas las construcciones se realizaron usando el plasmidio pT7-7 como vector de expresión.

La estrategia general consistió de tres etapas: 1) digestión del cDNA de la tubulina con las endonucleasas apropiadas, de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores de las enzimas; 2) purificación del fragmento a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, usando una sal de amonio cuaternario (bromuro de trimetilcetilamonio, CTAB) (Langridge y col., 1980); y 3) ligamiento del fragmento purificado con el vector de expresión pT7-7, usando ligasa T4. En cada construcción se trabajó con 1-2  $\mu\text{g}$  de cDNA de la

tubulina respectiva. Este cDNA se digirió en un volumen de mezcla de digestión de 120  $\mu$ l durante 2 horas a la temperatura recomendada por los proveedores de las endonucleasas. La mezcla de reacción contenía los siguientes reactivos, en las cantidades que se indican: amortiguador de la enzima 10X 12  $\mu$ l, cDNA 60  $\mu$ l (1-2  $\mu$ g), BSA (1 mg/ml) 12  $\mu$ l, agua estéril c.s.p. 120  $\mu$ l y enzima (stock sin diluir) 1  $\mu$ l (2 -10 U).

El amortiguador (comercial) para las diversas enzimas de restricción, en general, contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,9; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 1 mM, y en el caso de algunas enzimas de restricción, diferentes concentraciones de NaCl o la presencia de alguna sal específica para la enzima (por ejemplo, sales de potasio para la enzima *Sma*I). Finalizada la incubación, se adicionó 40  $\mu$ l de solución colorante 4X a la mezcla de reacción y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

En la tabla 1 se muestran las enzimas para digerir el vector de expresión y el cDNA de  $\alpha$ - o  $\beta$ -tubulina, empleadas en la construcción de seis de los clones recombinantes. Los plasmidios pRL-52 $\alpha$ 3 y pRL-60 $\beta$ 8 se obtuvieron a partir de los plasmidios pRL-18 $\alpha$ 8 y pRL-81 $\beta$ 12, respectivamente.

La construcción del plasmidio pRL-52 $\alpha$ 3 se realizó en un trabajo paralelo a esta Tesis (R. Sánchez y R. Lagos, resultados no publicados), por medio de la digestión del plasmidio pRL-18 $\alpha$ 8 con las endonucleasas *Sma*I y *Stu*I y la purificación del fragmento de 2695 pb y recircularización con ligasa T4. Para la construcción del plasmidio pRL-60 $\beta$ 8 se digirió el plasmidio pRL-81 $\beta$ 12 con las

endonucleasas *AvaI* y *SmaI*, se purificó el fragmento mayor, se rellenó el extremo cohesivo generado por *AvaI* con DNA polimerasa Klenow para generar un extremo romo y se recircularizó el plasmidio con ligasa T4 (González y col., 1996).

**Tabla 1. Endonucleasas empleadas para generar los plasmidios quiméricos que codifican para polipéptidos de las  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina.**

<i>Plasmidio</i>	<i>tubulina subunidad</i>	<i>endonucleasas usadas sobre el DNA de tubulina</i>	<i>endonucleasas usadas sobre el DNA del plasmidio vector</i>
pRL-18 $\alpha$ 8	$\alpha$	<i>SmaI/PstI</i>	<i>SmaI/PstI</i>
pRL-11 $\alpha$ 2	$\alpha$	<i>PvuII/PstI</i>	<i>SmaI/PstI</i>
pRL-52 $\alpha$ 3	$\alpha$	<i>StuI/SmaI</i>	<i>SmaI</i>
pRL-81 $\beta$ 12	$\beta$	<i>PstII/HindIII</i>	<i>PstII/HindIII</i>
pRL-38 $\beta$ 4	$\beta$	<i>XmnII/HindIII</i>	<i>SmaII/HindIII</i>
pRL-33 $\beta$ 6	$\beta$	<i>StuI/SalI</i>	<i>SmaI/SalI</i>
pRL-03 $\beta$ 2	$\beta$	<i>SmaI/StuI</i>	<i>SmaI</i>

*Purificación de los fragmentos.* Los fragmentos de cDNA de interés se purificaron a partir de los geles de agarosa por el método del CTAB (Langridge y col., 1980). Para ello, el cDNA digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión. Finalizada la electroforesis, se procedió a

cortar una fracción del gel y teñirla con bromuro de etidio para localizar el fragmento de interés. Una vez que se localizó la posición en que migra el fragmento a subclonar, se cortó esa zona del gel de agarosa, se transfirió a un tubo para microcentrifuga y se calentó a 65 °C durante 20 min. en un termoblock, con el propósito de fundir la agarosa. Todas las etapas posteriores se realizaron a 37 °C. Una vez fundida la agarosa, se agregó 1 volumen de CTAB disuelto en agua y 1 volumen de CTAB disuelto en butanol. Se centrifugó 1 min. a 14500 g para permitir la separación de las fases acuosa (inferior) y butanólica (superior) y se aspiró la fase butanólica. Se repitió la extracción con 1/2 volumen de butanol-CTAB y se procedió a extraer el DNA con 1/4 volumen de acetato de sodio 0,3 M. La mezcla se centrifugó durante 1 min. a 14500 g y se aspiró la fase acuosa (fase inferior), se trató con 1 volumen de cloroformo y se incubó durante 20 min. en hielo. Se repitió la centrifugación para separar las fases y se aspiró la fase acuosa (fase superior), que se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante 1 hora. El DNA precipitado se recuperó por centrifugación a 14500 g durante 10 min., se secó a temperatura ambiente por 20 min. y se resuspendió en el mínimo de volumen posible de amortiguador TE o agua destilada estéril.

En algunos casos los fragmentos de DNA se purificaron a partir de los geles de agarosa usando membranas de DEAE (Schleicher & Schuell NA45), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En estos casos, una vez finalizada la electroforesis se procedió a visualizar las bandas de interés en la forma ya

descrita y se realizó una incisión inmediatamente por delante de cada una de ellas e insertando un trozo de membrana. La electroforesis se continuó por 2 a 5 min. aumentando el voltaje al doble, para permitir que el DNA se adhiriera a las membranas. A continuación, cada membrana se retiró del gel, se lavó con agua destilada estéril y se procesó para eluir el DNA. Las tiras de membrana que contenían el DNA se lavaron tres veces con amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM y NaCl 150 mM. Luego, las membranas se resuspendieron en el mismo amortiguador, que contenía NaCl 1,5 M y se incubaron a 60 °C durante 30 min. para liberar el DNA. El bromuro de etidio contenido en las muestras se eliminó por extracción con 3 volúmenes de n-butanol saturado en agua, seguido de la precipitación del DNA con 2,5 volúmenes de etanol frío.

*Purificación del DNA usando el kit comercial GenClean II.* Cuando se requirió, algunos fragmentos de DNA se limpiaron mediante el sistema GenClean II, de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. El fragmento de DNA se separó por electroforesis en geles de agarosa en la forma descrita anteriormente y la porción del gel de agarosa que contenía la banda de DNA correspondiente al fragmento a ser purificado se resuspendió en 3 volúmenes de la solución de NaI y se mantuvo a 50 °C hasta que se disolvió toda la agarosa (aproximadamente 5 min.). Luego, la solución se incubó en hielo durante 1 min. y se agregó el reactivo glassmilk (5 µl por cada ml de solución) y se continuó la incubación durante 10 min. en hielo. La mezcla se agitó en forma manual cada 2 min.

Finalizada la incubación, la suspensión se centrifugó a 14000 g durante 5 segundos para sedimentar las glassmilk, que contenían el fragmento de DNA. El material sedimentado se lavó 3 veces con 20 volúmenes de reactivo new wash. Por último, el fragmento de DNA se eluyó de la glassmilk resuspendiendo las partículas sedimentadas en 10  $\mu$ l de agua destilada estéril e incubando la suspensión a 50 °C por 5 min. La suspensión se centrifugó a 14000 g durante 15 segundos descartándose el sedimento.

*Creación de extremos romos a partir de extremos cohesivos.* Para lograr este propósito, el DNA de interés se trató con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. La mezcla de reacción (25  $\mu$ l) contenía los siguientes componentes, en las cantidades que se indican: amortiguador Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; BSA 50  $\mu$ g/ml, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, dNTP 20  $\mu$ M cada uno, DNA 1 $\mu$ g y DNA polimerasa (Klenow) 3 U. La reacción se incubó a 20 °C durante 15 min. y se detuvo por calentamiento a 65 °C durante 10 min. Luego, el DNA se precipitó adicionando 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M y 3 volúmenes de etanol e incubando la mezcla a -20 °C durante 16 horas. El DNA precipitado se obtuvo mediante centrifugación a 15000 g durante 10 min., se resuspendió en amortiguador TE y se ligaron los extremos romos con DNA ligasa T4 en la forma que se describe a continuación.

*Ligamiento de fragmentos de DNA y plasmidios.* Las reacciones de ligamiento se

realizaron por incubación de la siguiente mezcla a 16 °C durante 16 horas: amortiguador ligasa 5X 2 µl, BSA (1 mg/ml) 1 µl, DNA de fragmento en estudio 100 ng, DNA de vector 50 ng y ligasa T4 1 U. El amortiguador comercial de ligasa 5X contenía Tris-HCl 250 mM, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM y polietilenglicol 8000 25 % p/v.

*Amplificación por PCR.* La reacción de amplificación por PCR se realizó en un volumen de 100 µl de mezcla, que contenía los siguientes reactivos: amortiguador Taq 10X 10 µl, dNTPs 200 µM cada uno, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, partidores 30 picomoles, DNA templado 360 picogramos, agua c.s.p. 100 µl y polimerasa Taq 2,5 U. El amortiguador comercial Taq 10X contenía Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 y KCl 500 mM.

La amplificación se realizó durante 26 ciclos en un termociclador Perkin Elmer modelo GenAmp 9600. Previo al inicio de los ciclos, la mezcla de reacción, sin enzima, fue calentada a 94 °C durante 2 min. para desnaturalizar el DNA. Cada ciclo contempló una etapa de desnaturalización a 94 °C por 1 min., seguido de un periodo de apareamiento del DNA a 40 °C por 1 min. y una etapa de elongación a 72 °C durante 1,2 min. Una vez finalizados los ciclos, la muestra se mantuvo a 72 °C por 10 min., con el propósito de permitir que se completara la polimerización de todas las cadenas. Finalmente, los productos de la amplificación se analizaron mediante geles de agarosa, en la forma que se describe más adelante.

*Subclonamiento del fragmento amplificado por PCR.* El cDNA de la  $\beta$ -tubulina se subclonó en el vector de expresión pT7-7. La estrategia experimental consistió en unir parte del plasmidio pRL-81 $\beta$ 12 con un fragmento de DNA que codifica para el extremo amino terminal de la proteína, obtenido por PCR a partir del cDNA de la tubulina. Para ello, 2  $\mu$ g del plasmidio pRL-81 $\beta$ 12 se digirieron con las endonucleasas *NdeI* y *BamHI*, purificándose el fragmento mayor mediante el sistema GenClean II, en la forma ya descrita. Paralelamente, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1200 pb, usando el cDNA de la  $\beta$ -tubulina como templado y como partidores, los siguientes oligonucleótidos obtenidos comercialmente en la Pontificia Universidad Católica de Chile (Dr. Alejandro Venegas, Laboratorio de Biología Molecular):

pGGATCCATATGCGTGAGATCGTGACACA	NH <sub>2</sub> - 27 mer
pGCGCCGGAACATGGCCGTGAACTG	COOH - 24 mer

El fragmento amplificado por PCR se purificó con el sistema GeneClean II, se digirió con las endonucleasas *NdeI* y *BamHI*, se purificó nuevamente y se ligó al fragmento obtenido a partir del plasmidio pRL-81 $\beta$ 12. El plasmidio recombinante, pRL $\beta$ , se transformó en *E. coli* BL21(DE3) para su expresión.

*Transformación bacteriana.* Los plasmidios recombinantes se transformaron en las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este estudio, mediante la técnica

descrita por Hanahan (1985). De acuerdo al autor, este método permite obtener aproximadamente  $10^8$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA con las diferentes cepas de *E. coli* ensayadas. El método emplea hexamina cobalto III, cloruro de calcio y cloruro de manganeso II, los cuales en conjunto aumentan la eficiencia del proceso de transformación. En forma resumida, las cepas a transformar se crecieron hasta fase exponencial temprana ( $4 - 7 \times 10^7$  células viables por ml de cultivo), se centrifugaron a baja velocidad (2000 g) durante 5 min. y se resuspendieron en 1/3 de volumen de reactivo, que contenía KCl 100mM, MnCl 45 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM,  $(\text{NH}_3^+)_6\text{CoCl}_3$  3 mM y K-MES 10 mM, pH 6,2. La suspensión bacteriana se incubó durante 10 min. a 4 °C, se centrifugó a baja velocidad y las células se volvieron a resuspender en 1/12,5 volumen de reactivo. A cada 200  $\mu\text{l}$  de suspensión de células se agregaron 15  $\mu\text{l}$  de solución DnD, que contenía DTT 1 M, DMSO 90 % v/v y acetato de potasio 10 mM. De este modo se obtuvieron las células "competentes" para la transformación. Luego, se agregó el plasmidio que se deseaba transformar en cantidad inferior a 100 ng de DNA y la incubación se continuó a 4 °C durante 30 min. Finalmente, el proceso de transformación se inició mediante un corto pulso térmico (42 °C por 90 segundos). Las células sometidas a pulso se mantuvieron en hielo por 1 min. y se adicionó caldo LB. Las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora para que se recuperaran metabólicamente y se seleccionaron las células transformantes en agar Luria suplementado con el antibiótico apropiado, que actúa como presión selectiva.

*Marcación de los polipéptidos sobreproducidos con <sup>35</sup>S-metionina.* Todos los polipéptidos de tubulina sobreproducidos en *E. coli* se marcaron radiactivamente con <sup>35</sup>S-metionina. Con este propósito, las células se crecieron hasta alcanzar su fase exponencial y se indujeron para que sintetizaran la RNA polimerasa T7, por la adición de 1 mM de IPTG e incubación durante 60 min. a 30 °C (cuando se utilizó como huésped la cepa de *E. coli* BL21(DE3)) o por incubación a 42 °C durante 30 min. (cuando se utilizó como huésped la cepa de *E. coli* K38/pGP1-2). A continuación se adicionó 200 µg/ml de rifampicina para inhibir la transcripción de las proteínas bacterianas. Posteriormente, las células se centrifugaron a baja velocidad (4000 rpm, rotor SS-34, centrífuga Sorvall RC-2B) durante 5 min. y se resuspendieron en medio mínimo M9 completo suplementado con 100 µM de cada aminoácido (excepto metionina) y 200 µg/ml de rifampicina. La incubación se prolongó por otros 30 min., para permitir que las células bacterianas se adaptaran previo a la marcación con <sup>35</sup>S-metionina. Fracciones de 0,5 ml de la suspensión bacteriana se marcaron con 10 µCi de <sup>35</sup>S-metionina durante 10 min. Las células marcadas se lavaron dos veces con amortiguador TEN y se resuspendieron en el mismo amortiguador para su procesamiento.

*Ruptura celular.* Se emplearon diversos métodos de ruptura celular. Como referencia se empleó el congelamiento/descongelamiento, que se describe en detalle más adelante (en "Criterio de solubilidad de los polipéptidos"). Cuando así se requirió, se emplearon métodos alternativos de ruptura celular, que incluían el

uso de detergentes o el ultrasonido. Para ello, la suspensión bacteriana en amortiguador TEN, mantenida en hielo, se incubó con 1 - 2 mg/ml de lisozima durante 30 min. Luego, la suspensión bacteriana se suplementó con Tritón X-100 2 %, lauril sarcosinato 1,5 % (Frankel y col., 1991) o nonidet P-40 1 % (Kleid y col., 1981). La suspensión se continuó incubando por otros 20 min. y se suplementó con 100 µg/ml de DNAsa, 10 µg/ml de RNAsa y 10mM de MgCl<sub>2</sub>, e inmediatamente se agregó el inhibidor de proteasas PMSF en concentración 1 mM. En forma alternativa a la adición de detergentes, la ruptura celular de la suspensión bacteriana se realizó mediante 4 ciclos de ultrasonido (Sonifier Cell Disruptor, Heat System- Ultrasonic Inc., modelo W185, Plainview, N.Y.) de 15 segundos de duración cada uno. Cuando se usó ultrasonido, se omitió la adición de DNAsa, RNAsa y MgCl<sub>2</sub>.

*Electroforesis en geles de poliacrilamida -SDS.* Se emplearon dos sistemas para desarrollar las electroforesis en geles de poliacrilamida: el sistema descrito por Laemmli (1970), que usa como amortiguador Tris/glicina, y el sistema descrito por Schägger y von Jagow (1987), que utiliza como amortiguador Tris/Tricina. Este último sistema de geles ha demostrado tener una mayor capacidad de resolución para la separación de proteínas que el sistema tradicional, descrito por Laemmli. La visualización de las proteínas en los geles se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 y, cuando se requirió tener un resultado rápido, se utilizó la tinción reversa (Fernández-Patrón y col., 1992). Esta última técnica

consiste en incubar el gel en una solución de imidazol 0,2 M durante 10 min., seguido de la incubación en  $Zn(NO_3)_2$  durante 1 min., lo que permite el depósito de un complejo insoluble de un metal (zinc o cobre) donde no hay proteínas. Así, se genera un fondo homogéneo, coloreado, en el gel y zonas claras donde hay proteínas, las que permanecen sin modificarse.

*Soluciones para la electroforesis y confección de geles.* Se trabajó con minigeles de 8,5 cm de alto, 9 cm de ancho y 0,85 mm de grosor. Para la confección de geles al 10 % de poliacrilamida-SDS en el sistema descrito por Shägger y von Jagow (1987) se emplearon las siguientes soluciones madres, en las cantidades que se indican: 1) *gel concentrador*: acrilamida:bis-acrilamida (48 % : 1,5 %) 0,25 ml, amortiguador de geles 0,6 ml, agua 1,65 ml, APS (10 % p/v) 20  $\mu$ l y TEMED (99 %) 10  $\mu$ l; 2) *gel espaciador*: acrilamida:bis-acrilamida (48 % : 1,5 %) 1 ml, amortiguador de geles 1,7 ml, agua 2,3 ml, APS (10 % p/v) 20  $\mu$ l y TEMED (99%) 2  $\mu$ l; y 3) *gel separador*: acrilamida:bis-acrilamida (48 % : 1,5 %) 2 ml, amortiguador de geles 3,3 ml, glicerol (99 %) 1 ml, agua 3,6 ml, APS (10 % p/v) 50  $\mu$ l y TEMED (99 %) 5  $\mu$ l. La polimerización de las soluciones se inició con la adición del TEMED. Los geles se prepararon colocando en los vidrios 5 ml de solución de gel separador seguido de 0,7 ml de solución de gel espaciador, para que polimerizaran en forma simultánea. Una vez polimerizado el gel espaciador-separador, se agregó 1 ml de solución de gel concentrador.

Para la confección de geles al 10 % de poliacrilamida-SDS en el sistema

descrito por Laemmli (1970) se emplearon las siguientes soluciones madres, en las cantidades que se indican: 1) *gel concentrador*: acrilamida : bis-acrilamida (44 % : 1,2 %) 0,23 ml, amortiguador de geles 0,5 ml, agua 1,22 ml, SDS (10 %) 20  $\mu$ l, APS (10 % p/v) 14  $\mu$ l y TEMED (99 %) 12  $\mu$ l; y 2) *gel separador*: acrilamida:bis-acrilamida (44 % : 1,2 %) 1,36 ml, amortiguador de geles 1,5 ml, agua 3,06 ml, SDS (10 %) 60  $\mu$ l, APS (10 % p/v) 20  $\mu$ l y TEMED (99 %) 3  $\mu$ l. La polimerización de las soluciones se inició con la adición del TEMED. Los geles se prepararon colocando en los vidrios 6 ml de solución de gel separador. Una vez polimerizado el gel separador, se agregó 1 ml de solución de gel concentrador.

*Autorradiografías.* Las proteínas marcadas radiactivamente se visualizaron mediante autorradiografía. Para ello, los geles SDS-PAGE se tiñeron en la forma descrita anteriormente, se secaron usando papel celofán y se expusieron frente a una película sensible a rayos X (X-Omat RP, Kodak). Una vez expuestos por 24 a 48 horas, la película se reveló y fijó, de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores.

*Western blot.* Cuando se requirió, los polipéptidos analizaron por Western blot (Towbin y col., 1979), usando un suero policlonal anti heterodímero de tubulina obtenido en conejo. Este suero se empleó sin purificar o purificado por afinidad mediante una columna de sepharose-heterodímero de tubulina. El suero

policlonal anti heterodímero de tubulina se encontraba disponible en el laboratorio y tenía un título superior a 1/1000. Como segundo anticuerpo se usó gama globulina de ratón antigamaglobulina de conejo, conjugada con fosfatasa alcalina. En forma resumida, una vez finalizada la electroforesis, el gel se incubó en el amortiguador TGM y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (poro de diámetro 0,22  $\mu\text{m}$ ). La transferencia se hizo a 40 mA durante 13 horas. La membrana se lavó con amortiguador PBS (tres lavados con 100 ml cada vez) y los sitios libres se bloquearon con PBS - leche descremada 10 %. El primer anticuerpo se usó diluido 1/150 durante 2 horas y el segundo anticuerpo, diluido 1/1500 durante 1 hora. El revelado del Western blot se hizo por incubación de la nitrocelulosa en el sustrato para fosfatasa alcalina durante 10 min. (NBT 0,33 mg/ml y BCIP 0,16 mg/ml en amortiguador para FA). La reacción se detuvo por lavado con agua destilada.

*Criterio de solubilidad de los polipéptidos.* Se definirá como "solubles" a los monómeros o agregados que permanecen en la solución después de centrifugar a 15000 g durante 30 min. Los agregados que sedimenten en las condiciones experimentales utilizadas se definirán como "insolubles".

El estado de agregación de los polipéptidos sobreproducidos en *E. coli* se investigó de la siguiente manera. Una vez crecidas y marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina, las células se centrifugaron y resuspendieron en amortiguador TEN conteniendo lisozima 2 mg/ml. La suspensión se incubó a 4 °C durante 30 min. y

se sometió a ruptura celular por congelamiento/descongelamiento en nitrógeno líquido (4 ciclos). A la suspensión de células rotas se agregó DNAsa 10 µg/ml, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, RNAsa 10 µg/ml y PMSF 1 mM, concentraciones finales, y la incubación se continuó por 20 min. a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, la suspensión fue centrifugada a 15000 g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en amortiguador de muestras para geles SDS-PAGE, en un volumen igual al original. Tanto la fracción sobrenadante como la fracción sedimentada de la centrifugación se separaron por SDS-PAGE. Las bandas en el gel correspondientes a los polipéptidos en ambas fracciones se cortaron y contaron en un contador de centelleo líquido Tri-Carb modelo 1600TR (Packard Instrument Co.), determinándose la proporción del polipéptido en cada fracción. En algunos casos, para comprobar que el polipéptido remanente en la fracción sobrenadante era soluble, alícuotas de esta fracción se centrifugaron a 105000 g durante una hora y se repitió el procedimiento de SDS-PAGE y medición de radiactividad.

*Microscopía electrónica de transmisión (MET).* Los estudios por MET se realizaron de acuerdo a la metodología tradicional (por ejemplo, ver Graham y col. ,1991). Los cultivos bacterianos inducidos se centrifugaron y las células se resuspendieron en glutaraldehído 2% - HEPES 50 mM, pH 6,8, durante 2 horas para su fijación. Las células fijadas se embebieron en agar Noble 2 %, se cortaron en cubos de aproximadamente 27 mm<sup>3</sup> de volumen y se fijaron

nuevamente con tetróxido de osmio 2 % durante 2 horas. Los bloques se lavaron en amortiguador HEPES (cinco cambios de amortiguador, 15 min. cada lavado), se tiñeron con acetato de uranilo 2 % (solución acuosa) y se volvieron a lavar. El proceso de deshidratación se realizó mediante una serie con acetona de distinta graduación. Las muestras teñidas, fijadas y deshidratadas se embebieron en resina Epon 810, se cortaron con micrótopo y se prepararon para su observación microscópica en el Laboratorio de Microscopía Electrónica, Centro de Equipo Mayor (CEM), Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. La observación microscópica se realizó en un microscopio electrónico Philips EM300.

*Microscopía de epifluorescencia.* Los clones que expresan cada uno de los polipéptidos C-terminal de la tubulina se crecieron e indujeron en la forma ya descrita. Los cultivos inducidos (0,5 ml) se tiñeron con igual volumen de una solución de naranja de acridina 0,02 % y formaldehído 2 % durante 3 min., a temperatura ambiente. Las bacterias teñidas se filtraron a través de filtros negros de policarbonato de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Nucleopore cat. # 110656), se lavaron con 10 ml de agua ultrapura y los filtros se secaron a temperatura ambiente previo a su análisis por microscopía de epifluorescencia (McFeters y col., 1991). Las preparaciones fueron visualizadas con un microscopio modelo Leitz y fotografiadas usando película Kodak color de 100 asa para su posterior análisis, en el Departamento de Microbiología, Facultad

de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

*Microscopía confocal.* Alícuotas de los cultivos inducidos empleados para los estudios de microscopía de epifluorescencia fueron usados para realizar las observaciones mediante microscopía confocal. Para ello, se prepararon frotis de cada cultivo y muestras para la observación de las bacterias en suspensión. Ambos tipos de preparaciones fueron analizadas con un microscopio confocal (modelo Zeiss, Axiovert T 135), en el Laboratorio de Microscopía Confocal, Centro de Equipo Mayor (CEM), Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

*Co-expresión de los polipéptidos C-terminal con chaperoninas.* El efecto de la co-expresión de los polipéptidos derivados de la tubulina y las chaperoninas GroEL/GroES sobre el estado de agregación de los polipéptidos se investigó transformando la cepa de *E. coli* BL21(DE3), en forma simultánea, con cada uno de los plasmidios que codifican para los polipéptidos y el plasmidio pOF39, que codifica para las chaperoninas. Para ello, fue necesario insertar un marcador de resistencia (kanamicina) en el plasmidio pOF39, generándose el plasmidio pOF39K (Michael Seeger, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Por lo tanto, la selección de las cepas cotransformadas se realizó suplementando las placas de agar Luria con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina.

*Correlación entre algunas propiedades físicoquímicas de los polipéptidos de tubulina y el estado de agregación en que se sobreproducen en E. coli.* La carga neta promedio aproximada por residuo fue estimada por la diferencia entre los residuos básicos (Lisina + Arginina) y ácidos (Aspártico + Glutámico) dividida por el número total de residuos del polipéptido; las diferentes fracciones de aminoácidos fueron calculadas dividiendo la cantidad de un determinado residuo de aminoácido en el polipéptido por el número total de residuos (Wilkinson y Harrison, 1991). Para graficar los datos experimentales y obtener los coeficientes de correlación respectivos se usó el programa de computación SIGMAPLOT versión 5.0.

*Tinción con Stains all.* La tinción con Stains all se realizó de acuerdo a Campbell y col. (1983). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se fijaron toda la noche en isopropanol 25 % seguido de cuatro lavados en el mismo alcohol, para eliminar el SDS. La tinción se realizó por incubación del gel, protegido de la luz, durante 48 horas en la solución colorante que contenía Stains all 0,0025 %, isopropanol 25 %, formamida 7,5 % y Trizma base 30 mM, pH 8,8, y las bandas coloreadas fueron inmediatamente fotografiadas (película Kodak color de 400 asa).

*Unión de  $^{45}\text{Ca}$  a  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y polipéptidos C-terminal en membranas de nitrocelulosa (NC).* Los polipéptidos sobreproducidos en *E. coli* y la tubulina

purificada desde su fuente de origen (disponible en el laboratorio) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a una membrana NC, en la forma descrita anteriormente. La membrana NC que contiene las proteínas se procesó de acuerdo a las recomendaciones de Serrano y col. (1986). Para ello, la NC se lavó 4 veces con amortiguador de unión de calcio. Luego, la membrana se incubó en amortiguador de unión de calcio suplementado con  $^{45}\text{CaCl}_2$  2  $\mu\text{M}$  durante 15 min. Finalizada la incubación, la NC se lavó con agua destilada durante 5 min., se secó a temperatura ambiente y se expuso frente a un film sensible a rayos X (Omat-RP) durante 48 horas.

*Unión de calcio al heterodímero de tubulina.* En el laboratorio se disponía de preparaciones de tubulina de cerebro de pollo purificadas por el método de Weisenberg descrito en Soto (1993). Empleando estas preparaciones se determinó el número de sitios de unión para el metal en el heterodímero de tubulina, de acuerdo a la metodología descrita por Soto (1993). Con este propósito, las preparaciones de tubulina de cerebro de pollo purificadas, almacenadas a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ , se descongelaron en hielo, se centrifugaron a 105000 g (centrífuga airfuge) durante 30 min. y al sobrenadante libre de agregados sedimentables se le intercambió el amortiguador de almacenamiento por amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,8, mediante filtración en una minicolumna (0,5cm x 5 cm) de Sephadex G-25 fino equilibrada con el nuevo amortiguador

(Penefsky, 1977). Para ello, 400  $\mu$ l de la solución de tubulina libre de agregados sedimentables se cargaron en la minicolumna, que se había centrifugado a 3000 rpm (centrífuga Sorvall RC-2B) durante 4 min., se dejaron reposar por 5 min. y la proteína se eluyó de la columna con una nueva centrifugación a 3000 rpm durante 4 min. La tubulina en el nuevo amortiguador se purificó de los agregados no sedimentables por cromatografía en una columna de Sephacryl S300 (Pharmacia) equilibrada con el mismo amortiguador. Las fracciones libres de agregados se utilizaron para los ensayos de unión de calcio.

Los ensayos de unión se realizaron empleando concentraciones variables de calcio (hasta 100  $\mu$ M) suplementadas con  $^{45}\text{Ca}$  (1 $\mu$ Ci/ml). La mezcla de reacción para los estudios de unión contenía amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,8, tubulina 1 a 1,5 mg/ml y calcio (mezcla frío+radioactivo), en un volumen final de 500  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 25 °C durante 15 min. y 400  $\mu$ l de ella se centrifugaron durante 2 min. a 2000 rpm (SS-34, Sorvall RC-2B) usando el sistema de filtración MPS-1 (Amicon) con membranas de límite de exclusión de 30000 de peso molecular, lo que permitió la filtración de 200  $\mu$ l. Alícuotas de 40  $\mu$ l del filtrado y de la mezcla de reacción inicial se contaron en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb modelo 1600TR, Packard Instrument Co.), para medir la cantidad de calcio libre y total, respectivamente. Los moles de calcio unido por mol de tubulina se determinaron mediante una gráfica de Scatchard, con el programa SigmaPlot 5.0.

## RESULTADOS

De acuerdo con lo descrito en la Introducción de esta Tesis, el problema fundamental de los estudios tendientes a conocer la relación estructura-función de la tubulina ha sido la imposibilidad de cristalizarla y obtener su estructura tridimensional a alta resolución (Monasterio y col., 1995). Otra dificultad adicional para estos estudios se debe a que la tubulina, dependiendo de su origen, presenta una o varias isoformas y una serie de modificaciones postraduccionales. Los estudios estructurales se han realizado con estas preparaciones heterogéneas, lo cual aumenta la incertidumbre en las conclusiones que se pueden obtener a partir de los resultados hasta ahora publicados. Para solucionar este problema se presenta como una vía factible el clonamiento y expresión en bacterias del cDNA de una isoforma de tubulina, de secuencia conocida, o de polipéptidos recombinantes de parte de la proteína.

### ***Construcción y expresión de plasmidios recombinantes que codifican para polipéptidos C-terminal de $\alpha$ -y $\beta$ -tubulina.***

La  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina de *Trypanosoma brucei* y la  $\alpha$ -tubulina humana

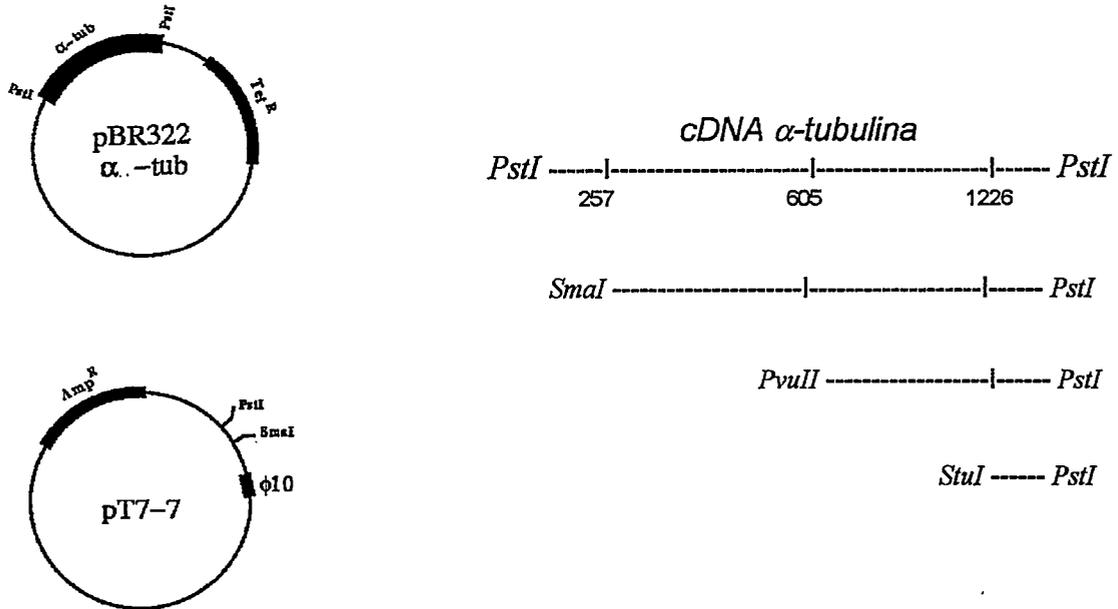
clonadas y expresadas en *E. coli* forman CI (Wu y Yarbrough, 1987; Yaffe y col., 1986). Por esto, para intentar obtener un producto soluble, se diseñó una estrategia que consistió en eliminar un fragmento polipeptídico de tamaño variable a partir del extremo amino terminal (N-terminal) de la proteína. El propósito era generar una familia de polipéptidos de tubulina, carentes de uno o más dominios; pero todos conteniendo el extremo C-terminal. Con esto, se pretendía aumentar la solubilidad de los fragmentos de tubulina expresados, de acuerdo con la proposición de Wilkinson y Harrison (1991).

El razonamiento empleado fue el siguiente: según su secuencia de aminoácidos, la  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina tienen su extremo C-terminal (últimos 20 aminoácidos) con una alta densidad de cargas negativas, pues contiene abundantes residuos de ácido glutámico y ácido aspártico (ver figura 1 en la Introducción). Esta característica debería ser un factor que contribuye a su solubilidad. Por otra parte, el dominio 2, definido para cada una de las tubulinas entre los residuos aminoacídicos 170 al 260 (de la Viña y col., 1988), estaría contribuyendo a que la tubulina se recupere en forma insoluble, porque esta zona es rica en aminoácidos hidrofóbicos (en nuestro estudio hemos calculado un 41 % para ambas tubulinas). Por lo tanto, la remoción de este dominio en la proteína debería contribuir a la solubilidad de los polipéptidos sobreproducidos en *E. coli*.

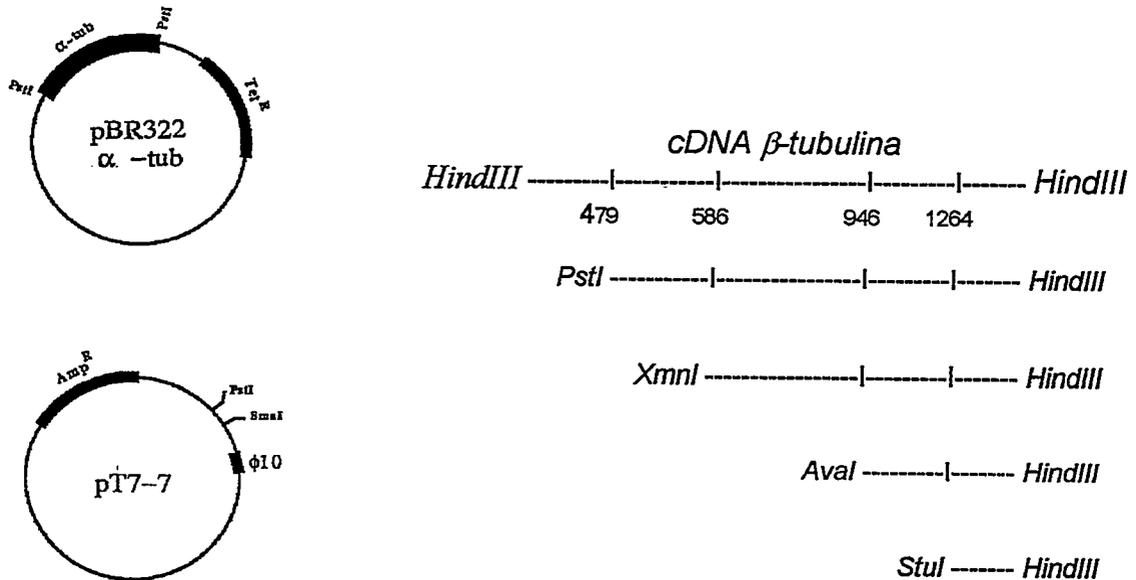
*Construcción de los plasmidios recombinantes.* Se construyeron siete

plasmidios que codifican para polipéptidos que carecen de una porción del extremo N-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. Tres de estos plasmidios (pRL-18 $\alpha$ 8, pRL-11 $\alpha$ 2 y pRL-52 $\alpha$ 3) codifican para polipéptidos de  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano y los otros cuatro plasmidios (pRL-81 $\beta$ 12, pRL-38 $\beta$ 4, pRL-60 $\beta$ 8, pRL-33 $\beta$ 6), para polipéptidos de  $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo. Todos los plasmidios recombinantes, excepto los plasmidios pRL-52 $\alpha$ 3 y pRL-60 $\beta$ 8, se obtuvieron purificando el fragmento deseado a partir del cDNA de la tubulina respectiva y ligándolo al vector de expresión digerido con las enzimas de restricción apropiadas (Tabla 1 de la sección Materiales y Métodos). Los plasmidios pRL-52 $\alpha$ 3 y pRL-60 $\beta$ 8 se subclonaron a partir de los plasmidios pRL-18 $\alpha$ 8 y pRL-81 $\beta$ 12, respectivamente (la estrategia experimental para la construcción de los diversos plasmidios se describió en Materiales y Métodos). En las figuras 2 y 3 se muestran los esquemas abreviados de las contrucciones que codifican para los polipéptidos C-terminal de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, respectivamente, y las enzimas de restricción empleadas en cada caso. Todos los polipéptidos codificados por los plasmidios recombinantes contienen en su extremo N-terminal 5 o 6 residuos de aminoácidos codificados por la región de inserción para DNA foráneos del plasmidio pT7-7, excepto el plasmidio pRL-81 $\beta$ 12 que contiene 12 residuos aminoacídicos.

En la figura 4 se presentan los esquemas para los polipéptidos codificados por los plasmidios recombinantes. Puede observarse que los polipéptidos RL-18 $\alpha$ 8, RL-81 $\beta$ 12 y RL-38 $\beta$ 4 contienen íntegros los dominios 2 y



**FIGURA 2.** Esquema simplificado de los cDNA recombinantes que codifican para polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano. El cDNA que contiene el gen estructural de  $\alpha$ -tubulina en el plasmidio pBR322 insertado en el sitio *PstI* es de aproximadamente 1800 pb. La región codificante se localiza entre las bases 68 y 1420. Los números en el esquema indican la localización del sitio de corte de las endonucleasas *SmaI* (257), *PvuII* (605) y *StuI* (1226), respectivamente, empleadas para construir los polipéptidos C-terminal (pRL-18 $\alpha$ 8, *SmaI/PstI*; pRL-11 $\alpha$ 2, *PvuII/PstI* y pRL-52 $\alpha$ 3, *StuI/PstI*). Se muestra también en la figura el vector de expresión pT7-7 con los sitios de corte únicos (*PstI/SmaI*) donde se subclonaron los polipéptidos.

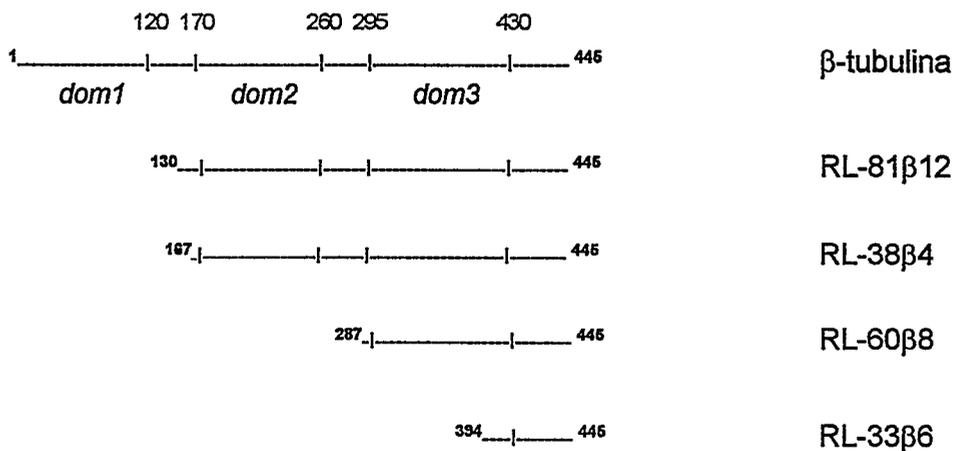


**FIGURA 3.** Esquema simplificado de los cDNA recombinantes que codifican para polipéptidos C-terminal de  $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo. El cDNA que contiene el gen estructural de  $\beta$ -tubulina en el plasmidio pBR322 insertado en el sitio *HindIII* es de aproximadamente 1700 pb. La región codificante se localiza entre las bases 88 y 1422. Los números en el esquema indican la localización del sitio de corte de las endonucleasas *PstI* (479), *XmnI* (586), *AvaI* (946) y *StuI* (1264), respectivamente, empleadas para construir los polipéptidos C-terminal (pRL-81 $\beta$ 12, *PstI/HindIII*; pRL-38 $\beta$ 4, *XmnI/HindIII*; pRL-60 $\beta$ 8, *AvaI/HindIII* y pRL-33 $\beta$ 6, *StuI/HindIII*). Se muestra también en la figura el vector de expresión pT7-7 con los sitios de corte únicos (*PstI/SmaI*) donde se subclonaron los polipéptidos.

(a)



(b)

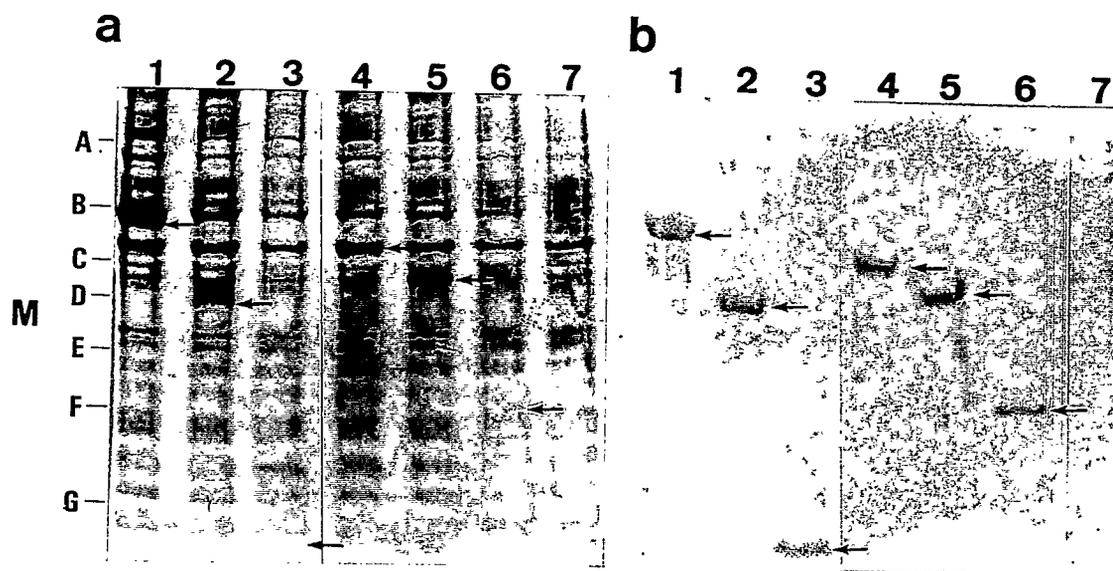


**FIGURA 4.** Representación esquemática de  $\alpha$ - (a) y  $\beta$ -tubulina (b) y sus polipéptidos C-terminal subclonados en *E. coli*. En el esquema de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y de los polipéptidos C-terminal se muestra la posición relativa de los residuos de aminoácidos que definen los tres dominios propuestos para la tubulina. La numeración se hizo desde el extremo amino al carboxilo, de acuerdo a las indicaciones de la IUPAC. Las distancias no están a escala.

3 de la proteína, pero carecen del dominio 1 en forma parcial o total. El polipéptido RL-11 $\alpha$ 2 contiene el dominio 3 y un 88 % del dominio 2. Los polipéptidos RL-52 $\alpha$ 3, RL-60 $\beta$ 8 y RL-33 $\beta$ 6 no presentan el dominio 1 ni el dominio 2 de la proteína.

*Expresión de los plasmidios recombinantes que codifican para los polipéptidos C-terminal.* Los plasmidios construidos se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) para su expresión. El sistema de expresión nos permitió marcar endógenamente con <sup>35</sup>S-metionina, en forma selectiva, los polipéptidos subclonados (ver Materiales y Métodos). Con ello se facilitó su detección una vez separados por SDS-PAGE. Por lo tanto, la visualización de los polipéptidos en el gel se realizó mediante tinción con azul Coomassie R-250 (figura 5a) y por autorradiografía (figura 5b).

En la figura 5a se muestra la separación de los polipéptidos C-terminal de la tubulina sobreproducidos en *E. coli* (excepto RL-33 $\beta$ 6). Los carriles 1 al 3 corresponden a los polipéptidos derivados de  $\alpha$ -tubulina y los carriles 4 al 6, a aquellos polipéptidos derivados de  $\beta$ -tubulina. Puede observarse que todos los clones ensayados sobreproducen un polipéptido con movilidad electroforética similar a la esperada para cada construcción. Se observa, además, que los polipéptidos cuyo peso molecular es igual o inferior a 20000 se tiñen más débilmente con el colorante, lo que dificulta su visualización (carriles 3 y 6). Sin embargo, al detectar los polipéptidos por autorradiografía (figura 5b) se visuali-



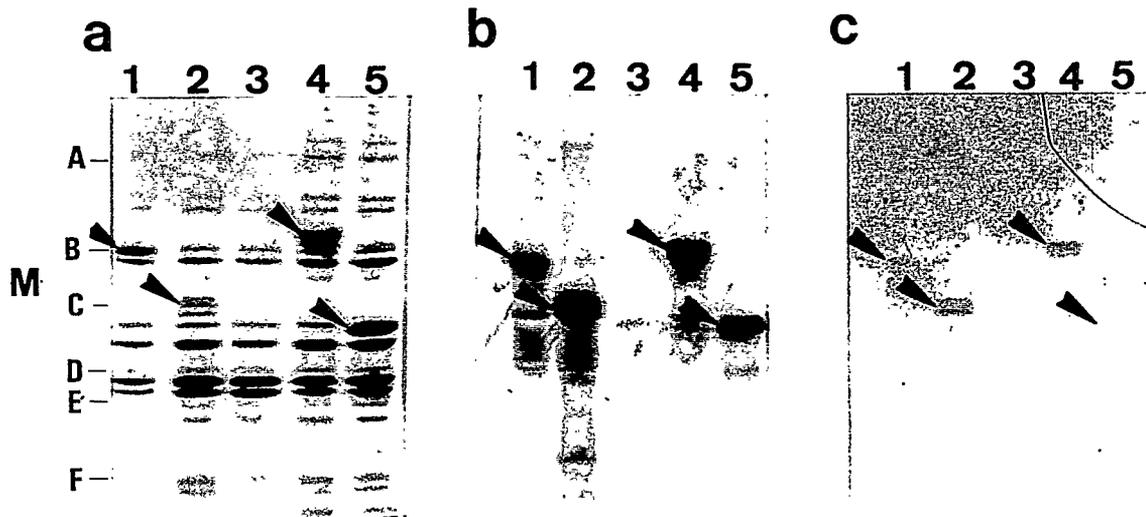
**FIGURA 5.** Electroforesis en SDS-PAGE de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidos en *E. coli* y detectados por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) o autorradiografía (b). Los extractos de los clones que sobreproducen polipéptidos C-terminal  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina en *E. coli* BL21(DE3) se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987). Carril 1, RL-18 $\alpha$ 8; carril 2, RL-11 $\alpha$ 2; carril 3, RL-52 $\alpha$ 3; carril 4, RL-81 $\beta$ 12; carril 5, RL-38 $\beta$ 4; carril 6, RL-60 $\beta$ 8. En el carril 7 se muestra la cepa control que contiene sólo el vector de expresión pT7-7. Las flechas indican la posición donde migran los polipéptidos recombinantes. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

zan todas las bandas y su intensidad es proporcional al contenido de metioninas y muy por sobre la marcación de otras proteínas endógenas. Esto indica que la marcación fue selectiva para los polipéptidos sobreproducidos.

Con el propósito de establecer la identidad de los polipéptidos C-terminal derivados de la tubulina expresados en bacterias, se realizó un Western blot con anticuerpos específicos para el heterodímero de la tubulina de cerebro de pollo. Estos anticuerpos se purificaron por afinidad con una columna de sepharose-heterodímero de tubulina, a partir de un suero inmune obtenido en conejo (disponible en el laboratorio). Se trabajó con los dos polipéptidos de mayor peso molecular de  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina y los resultados de este experimento se muestran en la figura 6.

El análisis de la figura 6 indica que cada clon sobreproduce una banda de proteína, que se encuentra ausente en el control, la cual puede ser detectada por tinción (figura 6a), por autorradiografía (figura 6b) y mediante el uso de anticuerpos policlonales (figura 6c). Como control se usó la cepa huésped transformada con el vector de expresión pT7-7 (carril 3 de las figuras 6a, 6b y 6c).

De acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos, los anticuerpos policlonales usados en el Western blot fueron obtenidos empleando el heterodímero de tubulina de cerebro de pollo como inmunógeno. Puesto que estos anticuerpos dieron reacción positiva en el inmunoblot con los polipéptidos obtenidos en bacterias, es posible suponer que los anticuerpos estarían



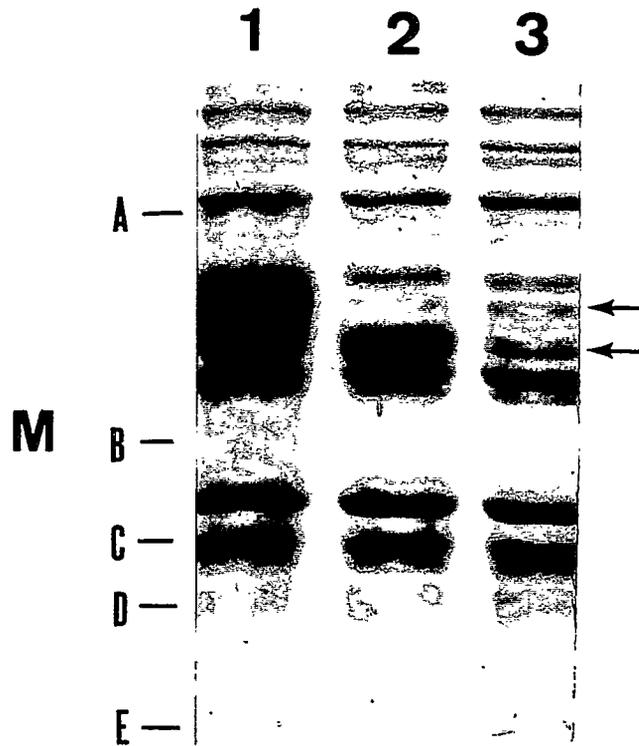
**FIGURA 6.** Electroforesis en SDS-PAGE de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidos en *E. coli* y detectados por tinción con azul de Coomassie R-250 (a), autorradiografía (b) o inmunoblot (c). Los extractos de los clones que sobreproducen polipéptidos C-terminal en *E. coli* K-38/pGP1-2 se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % T (Laemmli, 1970). Carril 1, RL-81 $\beta$ 12; carril 2, RL-38 $\beta$ 4; carril 4, RL-18 $\alpha$ 8; carril 5, RL-11 $\alpha$ 2. En el carril 3 se muestra la cepa control que contiene el vector de expresión pT7-7. Las flechas indican la posición donde migran los polipéptidos recombinantes. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000 y E, 24000 y F, 20100).

reconociendo epítomos dados por la secuencia de la proteína y confirma que los polipéptidos sobreproducidos corresponden a tubulina. La región C-terminal es muy poco inmunogénica para estos anticuerpos, por lo que la identificación de los polipéptidos más pequeños se realizó mediante estudios de competencia en ensayos de ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen la región C-terminal (R. Lagos, J.M. de Pereda, J.M. Andreu y O. Monasterio, resultados no publicados).

*Clonamiento y expresión de los plasmidios que codifican para  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.*

Era deseable, además, tener cada tubulina ( $\alpha$  o  $\beta$ ) completa clonada en el mismo vector de expresión que los polipéptidos C-terminal. Se construyó un plasmidio recombinante (pRL $\beta$ ) que codifica para  $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo, mediante amplificación por PCR (ver Materiales y Métodos). La  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano fue subclonada en un trabajo paralelo a esta Tesis (pRL $\alpha$ ; C. Basso y R. Lagos, resultados no publicados) y el plasmidio fue utilizado para expresarla y caracterizar su estado de agregación.

En la figura 7 (carriles 1 y 2) se muestran los resultados de los experimentos de expresión de los plasmidios pRL $\alpha$  y pRL $\beta$  transformados en *E. coli* BL21(DE3), respectivamente. Puede observarse que ellos codifican proteínas con la movilidad electroforética esperada para cada tubulina (PM calculado a partir de la secuencia: 50041 para la  $\alpha$ -tubulina y 49828 para la  $\beta$ -tubulina). En el sistema de geles de poliacrilamida descrito por Laemmli (1970),



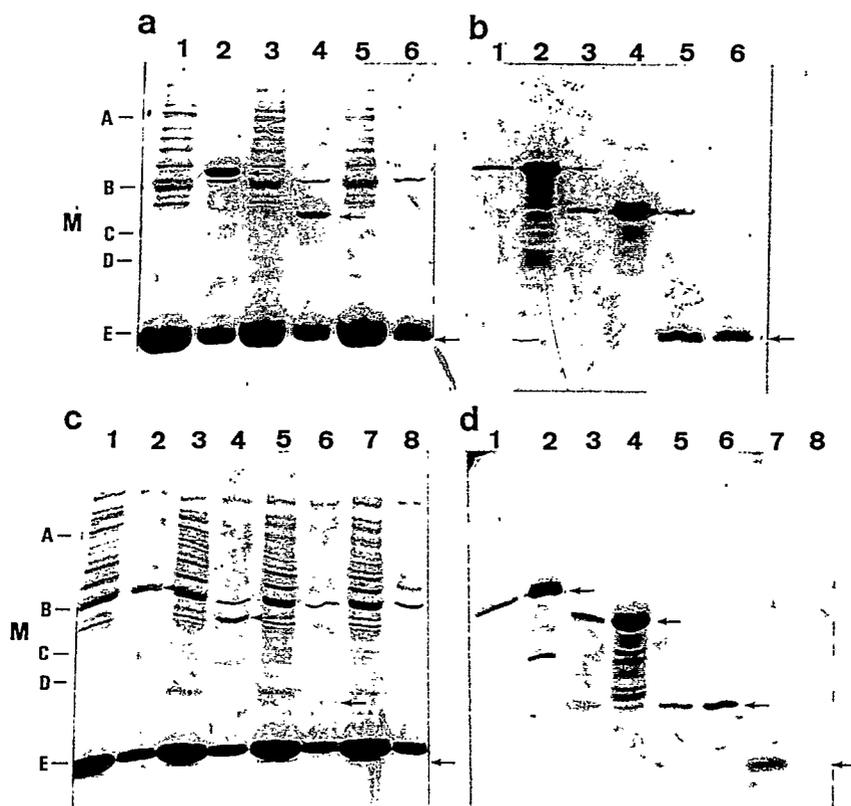
**FIGURA 7. Expresión de los plasmidios pRL $\alpha$  y pRL $\beta$ , que codifican para  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.** Los extractos de los clones que sobreproducen  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina en *E. coli* BL21(DE3) se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 %T (Laemmli, 1970). Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie R-250. Carril 1,  $\alpha$ -tubulina; carril 2,  $\beta$ -tubulina. En el carril 3 se muestra la cepa control que contiene el vector de expresión pT7-7. Las flechas indican la posición donde migran  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000 y E, 24000).

ambas tubulinas en el heterodímero purificado desde su fuente natural muestran un comportamiento anómalo, migrando como proteínas que presentan una mayor diferencia en el peso molecular, con migración más rápida de  $\beta$ -tubulina que  $\alpha$ -tubulina. Este comportamiento se mantuvo en las tubulinas clonadas y sobreproducidas en *E. coli*.

### ***Solubilidad de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina y de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en *E. coli*.***

Para determinar si los polipéptidos C-terminal de tubulina se sobreproducían en estado soluble o insoluble, se realizaron experimentos en los cuales se investigó en qué fracción se recuperaban dichos polipéptidos. Para ello, se cuantificó a partir de las bandas separadas por SDS-PAGE, la proporción de cada uno de los polipéptidos recuperados en la fracción sobrenadante y en la fracción sedimentada de una centrifugación a 15000g.

Los resultados obtenidos con los polipéptidos pertenecientes a la  $\alpha$ -tubulina se presentan en las figuras 8a y 8b y los correspondientes a los polipéptidos pertenecientes a la  $\beta$ -tubulina, en las figuras 8c y 8d. Se observa que los polipéptidos de las dos tubulinas, cuyo peso molecular es superior a 20000, se sobreprodujeron formando mayoritariamente agregados insolubles (carriles 1 al 4 de las figuras 8a, 8b, 8c y 8d). El polipéptido RL-33 $\beta$ 6 se expresó en forma soluble (carriles 7 y 8 de las figuras 8c y 8d), mientras que los



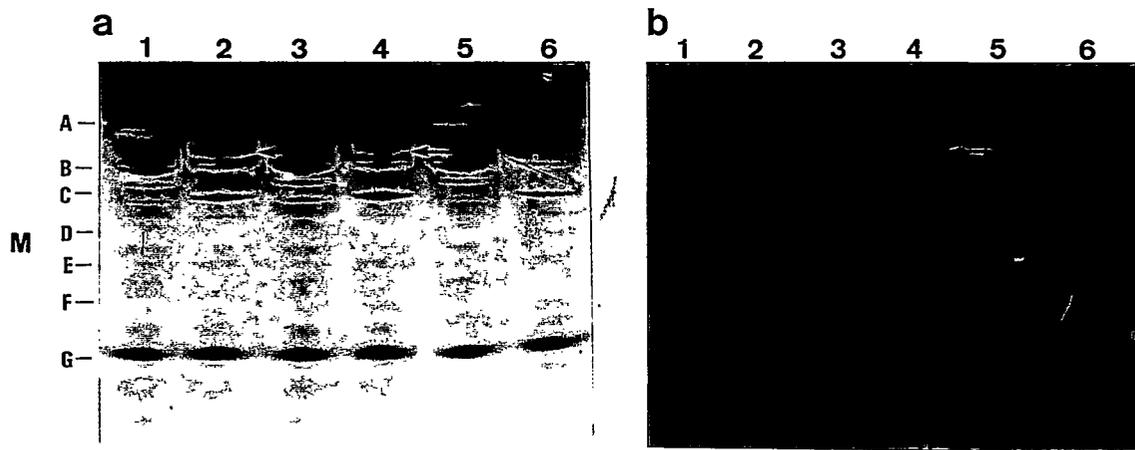
**FIGURA 8. Determinación de la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidos en *E. coli*.** La fracción soluble e insoluble de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en *E. coli* BL21(DE3) se determinó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Laemmli, 1970), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de los polipéptidos se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a y c) y autorradiografía (b y d). En las figuras 8a y 8b: carriles 1 y 2, RL-18 $\alpha$ 8; carriles 3 y 4, RL-11 $\alpha$ 2; carriles 5 y 6, RL-52 $\alpha$ 3. En las figuras 8c y 8d: carriles 1 y 2, RL-81 $\beta$ 12; carriles 3 y 4, RL-38 $\beta$ 4; carriles 5 y 6, RL-60 $\beta$ 8; carriles 7 y 8, RL-33 $\beta$ 6. Carriles impares, fracción sobrenadante; carriles pares, fracción sedimentada. Las flechas indican la posición donde migran los polipéptidos. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000 y E, 14200).

polipéptidos RL-52 $\alpha$ 3 y RL-60 $\beta$ 8 se sobreprodujeron parcialmente solubles (carriles 5 y 6 de las figuras 8a y 8b, 8c y 8d).

Los controles de la solubilidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina clonadas en el vector de expresión pT7-7 se muestran en las figuras 9a y 9b. Los carriles 1 y 2 de estas figuras corresponden a  $\alpha$ -tubulina y los carriles 3 y 4, a  $\beta$ -tubulina, respectivamente. Puede observarse que, de acuerdo a lo esperado, ambas tubulinas se recuperaron en la fracción sedimentada (carriles 2 y 4, figuras 9a y 9b), debido a que se sobreprodujeron en forma insoluble en *E. coli*. La cuantificación de todos los resultados se presenta en la tabla 2.

**TABLA 2. Cuantificación de la solubilidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en *E. coli* BL21(DE3).**

Tubulina ( $\alpha$ o $\beta$ ) o polipéptido	fracción soluble (%)
RL $\alpha$	< 5
RL-18 $\alpha$ 8	< 5
RL-11 $\alpha$ 2	< 5
RL-52 $\alpha$ 3	30-40
RL $\beta$	< 5
RL-81 $\beta$ 12	< 5
RL-38 $\beta$ 4	< 5
RL-60 $\beta$ 8	20-30
RL-33 $\beta$ 6	> 95



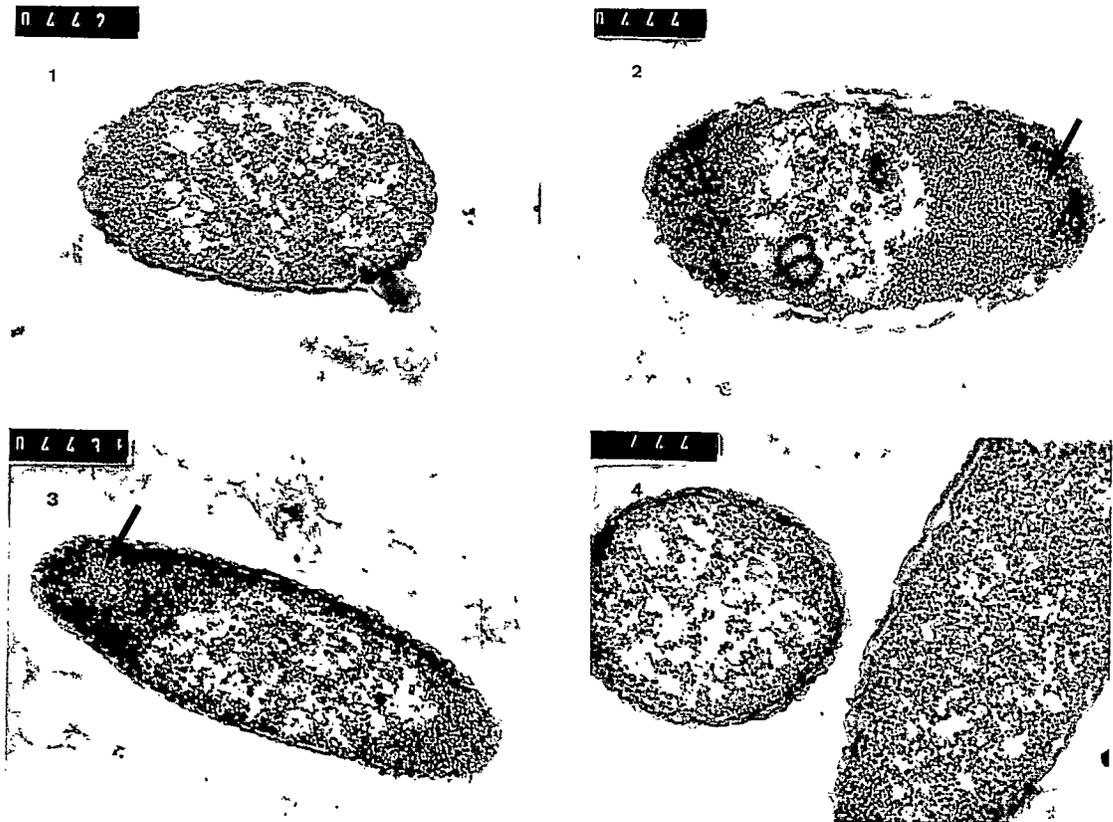
**FIGURA 9. Determinación de la solubilidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidas en *E. coli* BL21(DE3).** La fracción soluble e insoluble de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidas en *E. coli* BL21(DE3) se determinó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y autorradiografía (b). Carriles 1 y 2,  $\alpha$ -tubulina; carriles 3 y 4:  $\beta$ -tubulina; carriles 5 y 6, polipéptido RL-52 $\alpha$ 3. Carriles impares, fracción sobrenadante; carriles pares, fracción sedimentada. Las flechas indican la posición donde migran  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

Tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -tubulina y la mayoría de los polipéptidos C-terminal se sobreprodujeron en forma insoluble (< 5 % de solubilidad); el polipéptido RL-52 $\alpha$ 3 se sobreprodujo parcialmente soluble (30 % - 40 %) de igual modo que el polipéptido RL-60 $\beta$ 8 (20 % - 30 %). El polipéptido RL-33 $\beta$ 6 se sobreprodujo sobre un 95 % en forma soluble.

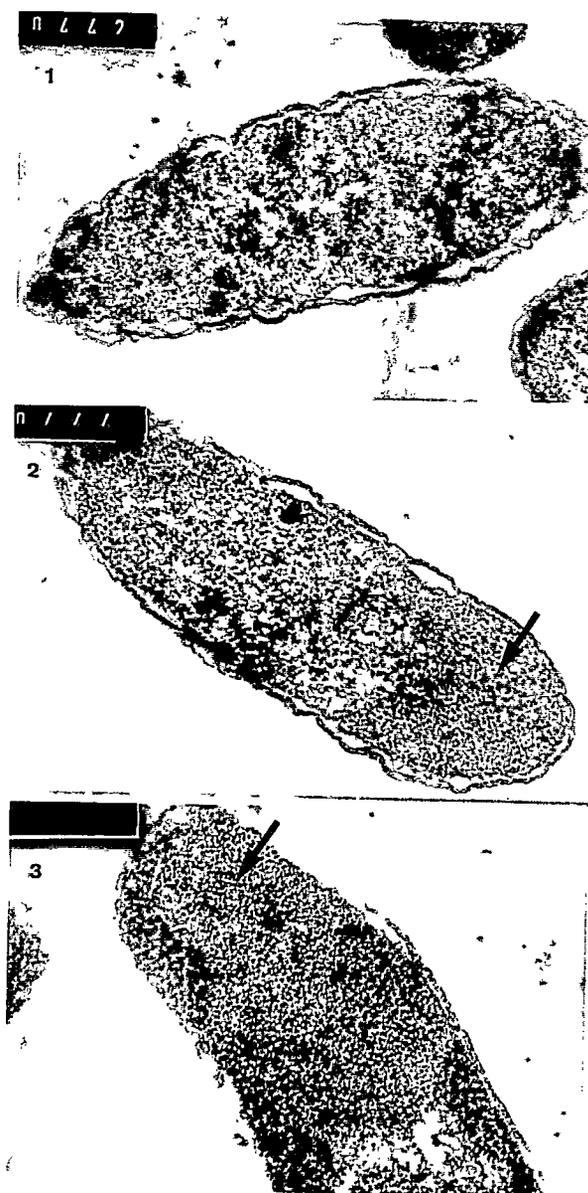
*Formación de CI por los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli.*

Puesto que la mayoría de los polipéptidos C-terminal subclonados y sobreproducidos en *E. coli* se recuperaban en forma insoluble, se concluyó que estos polipéptidos se encontraban formando CI, de acuerdo a los criterios empleados para señalar que una proteína forma CI. Usando algunos clones con diferentes solubilidades, se investigó la presencia de CI en el citoplasma bacteriano por microscopía electrónica de transmisión (MET), por microscopía confocal y por microscopía de epifluorescencia. Los resultados de estos estudios se muestran en las figuras 10, 11 y 12, respectivamente.

Los resultados del estudio por MET (figuras 10a y 10b) de los clones que expresan polipéptidos C-terminal pertenecientes a  $\beta$ -tubulina, que son insolubles (RL-81 $\beta$ 12 y RL-38 $\beta$ 4) o parcialmente solubles (RL-60 $\beta$ 8), muestran una gran cantidad de corpúsculos opacos a los electrones (zonas negras) concentrados en los polos de la célula bacteriana (indicadas por las flechas). La proporción de células que presentan estas zonas opacas a los electrones en las preparaciones de clones que expresan polipéptidos insolubles osciló entre



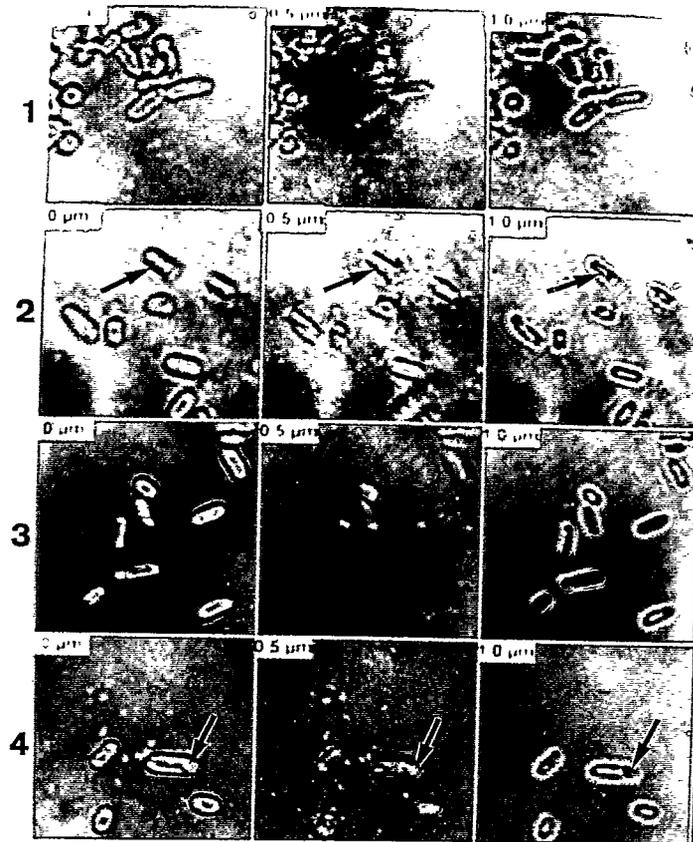
**FIGURA 10a. Microscopía electrónica de transmisión de células de *E. coli* BL21(DE3) que expresan polipéptidos de  $\beta$ -tubulina.** Las muestras para microscopía electrónica de transmisión se prepararon de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Para la expresión de los clones se usó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), transformada con los siguientes plasmidios: 1, pT7-7 (aumento 55400X); 2, pRL-38 $\beta$ 4 (aumento 55400X); 3, pRL-60 $\beta$ 8 (aumento 44800X); 4, pRL-33 $\beta$ 6 (aumento 55400X). Las flechas indican las zonas opacas a los electrones, de localización polar.



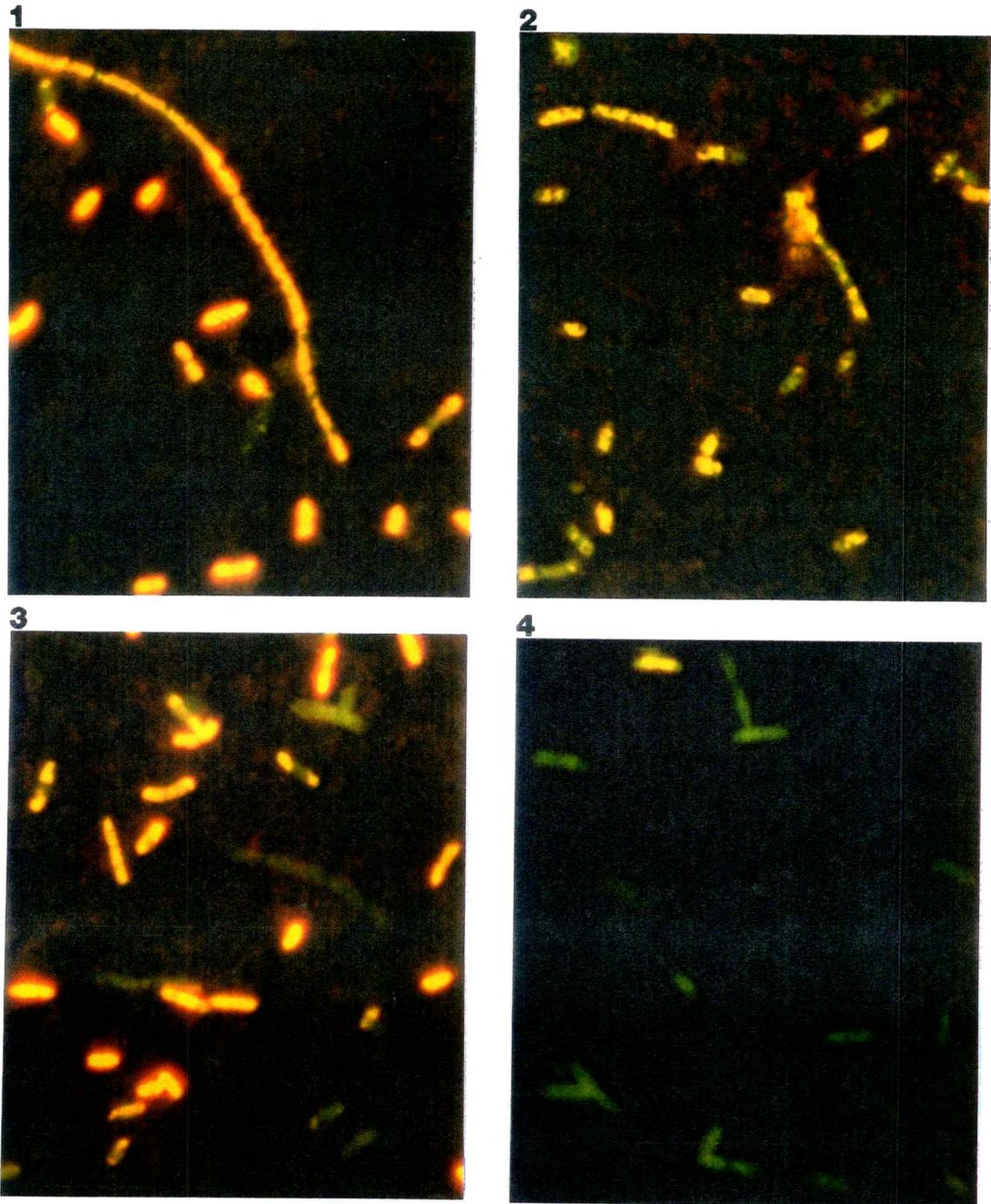
**FIGURA 10b.** Microscopía electrónica de transmisión de células de *E. coli* BL21(DE3) que expresan el polipéptido RL-81 $\beta$ 12. Las muestras para microscopía electrónica de transmisión se prepararon de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Para la expresión de los clones se usó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), transformada con los siguientes plasmidios: 1, pT7-7 (aumento 55400X); 2, pRL-81 $\beta$ 12 (aumento 55400X); 3, pRL-81 $\beta$ 12 (aumento 69000X). Las flechas indican las zonas opacas a los electrones, de localización polar.

50 y 60 %. Por el contrario, sólo el una fracción inferior al 10 % de las células control, sin plasmidios o que contenían el vector de expresión pT7-7, presentaron estas zonas opacas a los electrones y su aspecto era menos denso. Estos agregados pueden observarse con más detalle a mayor aumento en la figura 10b, en bacterias que contienen el plasmidio que codifica para el polipéptido RL-81 $\beta$ 12. El diámetro de los agregados intracelulares es inferior a 50 nm. El clon que expresa el polipéptido soluble (RL-33 $\beta$ 6) y las células control, que contienen sólo el plasmidio vector de expresión pT7-7, presentan una densidad mucho menor de estas condensaciones de granulaciones negruzcas.

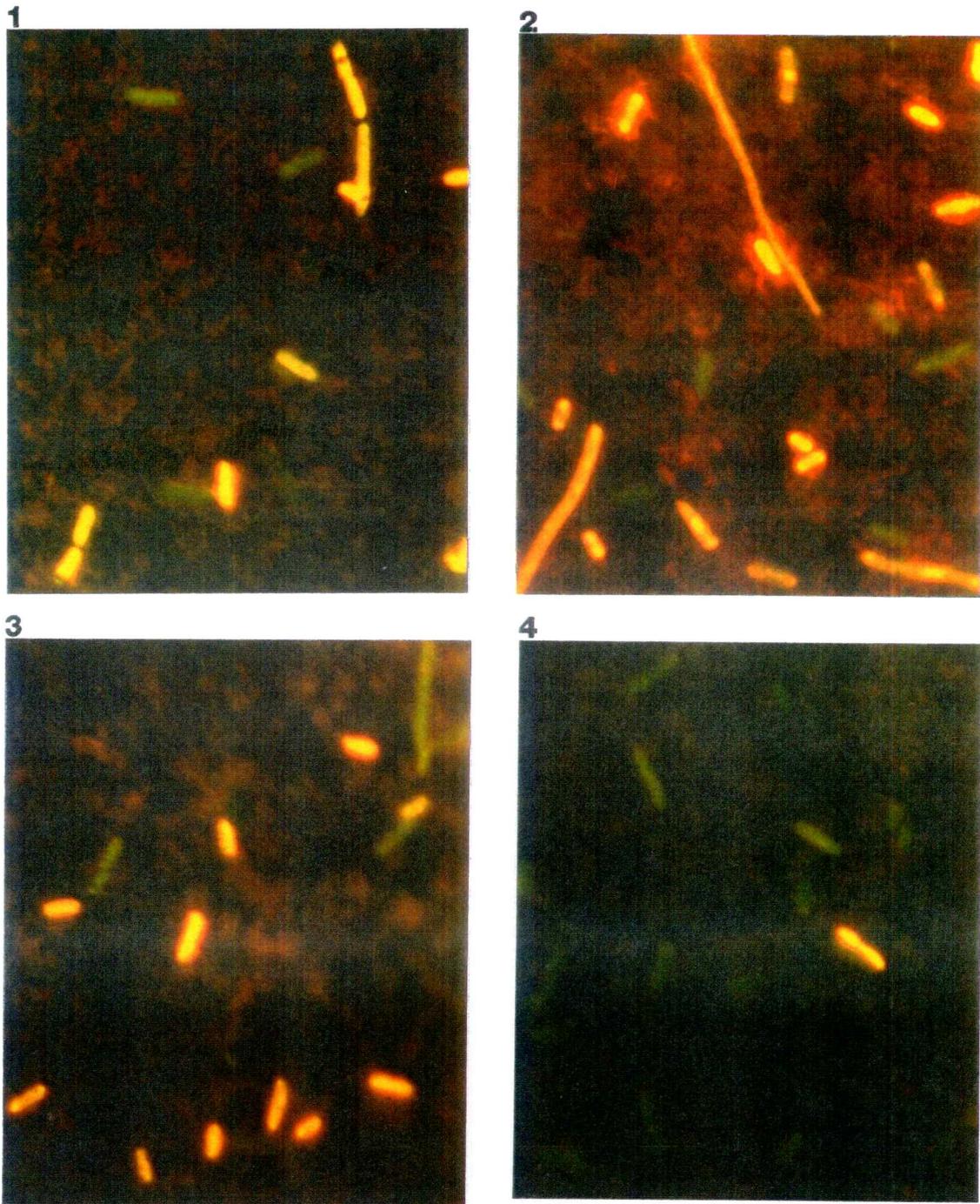
Los estudios por microscopía confocal (figura 11) confirmaron estos hallazgos, pues las células bacterianas que expresaban el polipéptido RL-81 $\beta$ 12 o la  $\beta$ -tubulina, que son insolubles, presentaron condensaciones citoplasmáticas de localización polar y subpolar (líneas 3 y 4, respectivamente, indicadas por las flechas), las cuales estaban ausentes en las células bacterianas que sobreproducen el polipéptido soluble RL-33 $\beta$ 6 (línea 1). El clon que expresa el polipéptido parcialmente soluble RL-60 $\beta$ 8 (línea 2) también presenta estas condensaciones (indicadas por las flechas), aunque en menor proporción. Los agregados de mayor tamaño se observaron en la preparación que contiene el clon que expresa la  $\beta$ -tubulina completa (línea 4), donde las células se encuentran más deformadas que aquéllas que expresan los otros clones.



**FIGURA 11.** Microscopía confocal de células de *E. coli* BL21(DE3) que expresan  $\beta$ -tubulina y algunos polipéptidos C-terminal de  $\beta$ -tubulina. Las muestras para microscopía confocal se prepararon en forma similar a lo descrito para realizar las observaciones por microscopía electrónica de transmisión (ver Materiales y Métodos). La cepa de *E. coli* BL21(DE3) fue transformada con los siguientes plasmidios: 1, pRL-33 $\beta$ 6; 2, pRL-60 $\beta$ 8, 3, pRL-81 $\beta$ 12; 4, pRL $\beta$ . En los recuadros se muestra la profundidad relativa de las observaciones. Las flechas indican los CI en células representativas de cada clon.



**FIGURA 12a.** Microscopía de epifluorescencia de células de *E. coli* BL21(DE3) que expresan polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ -tubulina. Las muestras para microscopía epifluorescente se prepararon en forma similar a lo descrito para realizar las observaciones por microscopía electrónica de transmisión (ver Materiales y Métodos). La cepa de *E. coli* BL21(DE3) fue transformada con los siguientes plasmidios: 1, pRL-18 $\alpha$ 12; 2, pRL-11 $\alpha$ 2; 3, pRL-52 $\alpha$ 3; 4, vector de expresión pT7-7.



**FIGURA 12b. Microscopía de epifluorescencia de células de *E. coli* BL21(DE3) que expresan polipéptidos C-terminal de  $\beta$ -tubulina.** Las muestras para microscopía de epifluorescencia se prepararon en forma similar a lo descrito para realizar las observaciones por microscopía electrónica de transmisión (ver Materiales y Métodos). La cepa de *E. coli* BL21(DE3) fue transformada con los siguientes plasmidios: 1, pRL-81 $\beta$ 12; 2, pRL-38 $\beta$ 4; 3, pRL-60 $\beta$ 8; 4, pRL-33 $\beta$ 6.

Al analizar los resultados de los estudios por microscopía de epifluorescencia (figura 12a y 12b), se observó que las células que sobreproducen el polipéptido RL-33 $\beta$ 6 (figura 12b, 4) y las células control se encuentran en una fase de crecimiento diferente al completarse el período de inducción de la expresión con IPTG, respecto de los otros clones. Esta conclusión se obtiene del análisis de la coloración de las células teñidas con naranja de acridina, debido a que un color anaranjado indica células que se encuentran en fase de crecimiento exponencial, en tanto que la coloración verde se presenta en las células que se encuentran en fase estacionaria (McFeters y col., 1991). Las células que sobreproducen el polipéptido RL-33 $\beta$ 6 (figura 12b, 4) y las células control, que contienen el vector de expresión pT7-7 (figura 12a, 4), presentan mayoritariamente una coloración verde. Esto indicaría que se encuentran en fase estacionaria al final de la inducción con IPTG.

De acuerdo con los resultados presentados hasta aquí, se puede concluir que las células de *E. coli* sobreproducen  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y sus correspondientes polipéptidos C-terminal. Se observa que hay una correspondencia entre el tamaño y la carga de los polipéptidos con la solubilidad. Así, los productos sobreproducidos se recuperan en forma soluble, parcialmente soluble y, la mayoría insolubles, formando Cl.

***Factores que influyen sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli.***

Las proteínas que se sobreproducen en *E. coli* pueden verse afectadas en su solubilidad por una variedad de factores, que dependen tanto de la célula bacteriana como de las propiedades intrínsecas de cada proteína en particular. No parece existir un factor único o principal que de cuenta del estado de agregación presentado por una proteína sobreproducida en *E. coli*. Por lo tanto, es imprescindible caracterizar cada caso en particular para encontrar las condiciones óptimas de su expresión y producción.

Puesto que se encontró que algunos polipéptidos de  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina se sobreproducían con diferente solubilidad, se analizaron diversos aspectos relacionados tanto con los polipéptidos sobreproducidos como con la cepa bacteriana usada para expresar los plasmidios recombinantes. Nuestro propósito fue conocer si existía alguna correlación entre el estado de agregación de la proteína y un factor que dependiese de la célula bacteriana o de la proteína *per se*. De este modo, se podrían diseñar estrategias para evitar la formación de CI y aumentar la recuperación de las proteínas en estado soluble.

*Propiedades de la proteína.* Se determinaron las siguientes características de los polipéptidos sobreproducidos, de acuerdo con su secuencia aminoacídica:

peso molecular, carga neta promedio, número de residuos de aminoácidos formadores de vuelta, fracción de residuos de prolina, fracción de residuos de cisteína y número de aminoácidos pertenecientes al vector y a la tubulina. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 3. Los pesos moleculares de los polipéptidos fueron estimados a partir de los geles de poliacrilamida-SDS, de acuerdo con su movilidad electroforética. Los pesos moleculares experimentales de los polipéptidos pertenecientes a  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina fueron los esperados cuando se usó la técnica de Schägger y von Jagow (1987). Sin embargo, éstos fueron levemente superiores al peso molecular teórico esperado cuando se usó la técnica de SDS-PAGE según Laemmli (1970), para la estimación del peso molecular. Esto fue consistente con la estimación del PM de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina purificadas de cerebro de pollo, pues ambas tubulinas presentan un peso molecular superior en 2000 a 4000 al esperado teóricamente.

Wilkinson y Harrison (1991), analizando el estado de agregación en que se expresaban diversas proteínas heterólogas en *E. coli*, observaron que existe correlación entre su carga neta promedio, la fracción de residuos formadores de vuelta y su tamaño con la solubilidad de dichas proteínas. Tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -tubulina y sus polipéptidos C-terminal resultan ser un modelo más homogéneo para este tipo de análisis, pues teóricamente los factores necesarios para su plegamiento debieran ser los mismos. Por lo tanto, se procedió a analizar si existía una correlación entre la solubilidad de los diferentes polipéptidos

**TABLA 3. Algunas propiedades fisicoquímicas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en *E. coli*.**

Tubulina ( $\alpha$ o $\beta$ ) o polipéptido C-terminal	aminoácidos del vector	aminoácidos de la tubulina	PM teórico <sup>a</sup>	PM experimental <sup>b</sup>	Fración de residuos de cisteína	Fración de residuos de prolina	Fración de residuos formadores de vuelta <sup>c</sup>	Carga neta promedio
RL $\alpha$	0	451	50041	N.D.	0,027	0,044	0,208	- 0,053
RL-18 $\alpha$ 8	5	388	44018	43251	0,023	0,043	0,191	- 0,043
RL-11 $\alpha$ 2	6	271	31049	30903	0,029	0,050	0,188	- 0,061
RL-52 $\alpha$ 3	6	64	8148	N.D.	0	0,014	0,143	- 0,181
RL $\beta$	0	445	49828	N.D.	0,018	0,045	0,240	- 0,056
RL-81 $\beta$ 12	12	316	37078	38019	0,015	0,046	0,226	- 0,036
RL-38 $\beta$ 4	6	279	32454	32359	0,018	0,052	0,210	- 0,046
RL-60 $\beta$ 8	5	159	18970	19953	0,012	0,030	0,189	- 0,073
RL-33 $\beta$ 6	6	52	6771	N.D.	0	0,017	0,155	- 0,293

<sup>a</sup>, peso molecular calculado a partir de la secuencia de aminoácidos; <sup>b</sup>, peso molecular calculado a partir de los geles SDS-PAGE (Schägger y von Jagow, 1987); <sup>c</sup>, fracción combinada de residuos de asparragina, glicina, prolina y serina; N.D., no determinado

sobreproducidos y los parámetros mencionados.

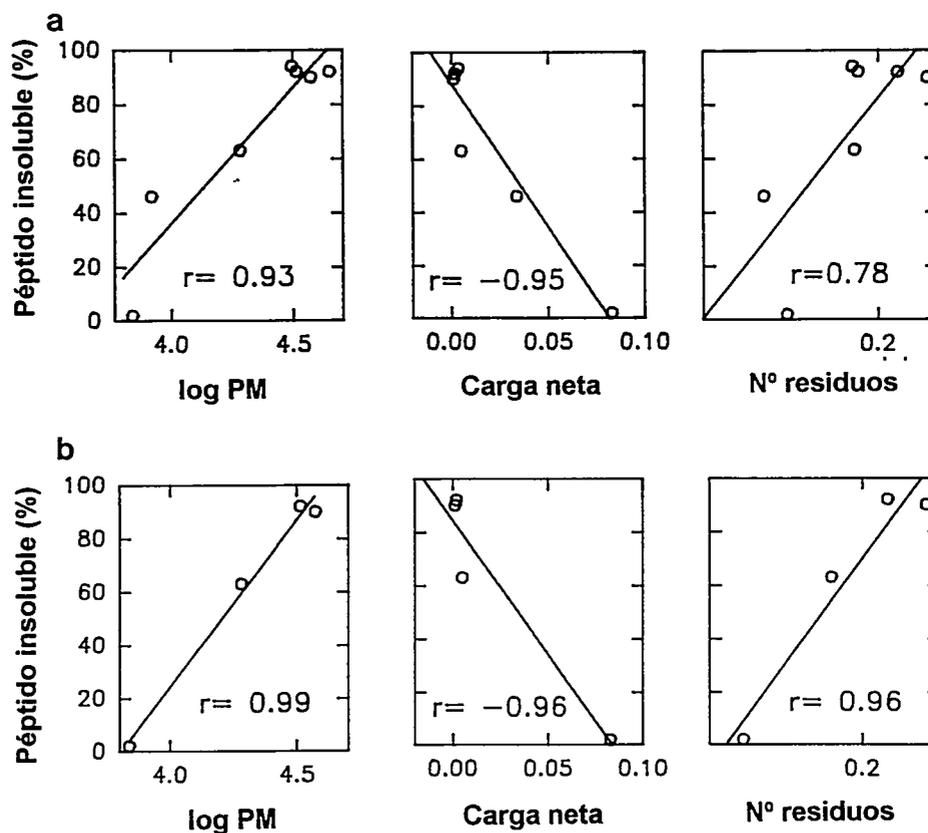
La comparación de los resultados presentados en las tablas 2 y 3 permite concluir que existe una relación directa entre la mayor carga neta negativa promedio y la solubilidad del polipéptido. Cuanto mayor es su carga neta negativa promedio mayor es su solubilidad. Por otra parte, la fracción de residuos de prolina no parece correlacionarse con la solubilidad de los polipéptidos, pues los polipéptidos RL-52 $\alpha$ 3 y RL-33 $\beta$ 6 se sobreproducen en distinto estado de agregación aunque contienen un residuo de prolina cada uno (fracción de residuos de prolina 0,014 y 0,017, respectivamente). Por otro lado, la fracción de residuos de cisteína tampoco parece tener correlación con la solubilidad de los polipéptidos C-terminal, porque el polipéptido RL-60 $\beta$ 8 se sobreproduce parcialmente soluble (fracción de cisteína 0,012), en tanto que el polipéptido RL-81 $\beta$ 12 se sobreproduce insoluble (fracción de cisteína 0,015). También muestran distinta solubilidad los polipéptidos RL-52 $\alpha$ 3 y RL-33 $\beta$ 6, aunque ambos carecen de residuos de cisteína. Se observa, además, una relación inversa entre la solubilidad de los polipéptidos y la fracción de residuos aminoacídicos que tienen tendencia a formar vueltas (serina, glicina, asparragina y prolina), pues cuanto mayor es la fracción de estos residuos en la molécula, menor es su solubilidad, lo que coincide con lo propuesto por Wilkinson y Harrison (1991).

Para establecer con más detalle la correlación entre las propiedades mencionadas y la solubilidad, se procedió a graficar los resultados y determinar

los coeficientes de correlación. En la figura 13 se muestra la correlación entre la solubilidad y tres propiedades de los polipéptidos C-terminal: el tamaño, la carga neta promedio y la fracción de residuos formadores de vuelta.

En la figura 13 se observa una muy buena correlación entre la solubilidad y el tamaño de los polipéptidos. Sin embargo, todos los polipéptidos de la  $\alpha$ -tubulina son más insolubles que los de la  $\beta$ -tubulina, indicando que la composición y secuencia de aminoácidos influyen sobre la solubilidad. Además, se observó correlación entre la carga neta promedio, que depende de la composición de aminoácidos del polipéptido, y su solubilidad, tanto cuando se analizaron los polipéptidos pertenecientes a  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina en su conjunto (figura 13a) como al estudiar sólo aquéllos pertenecientes a  $\beta$ -tubulina en forma independiente (figura 13b). Los coeficientes de regresión lineal determinados fueron -0,95 y -0,96, respectivamente.

Los polipéptidos de menor tamaño RL-52 $\alpha$ 3 (70aa) y RL-33 $\beta$ 6 (59aa) con una carga negativa neta promedio de 0,181 y 0,293, respectivamente, presentan una muy buena correlación con su solubilidad (tabla 3). Llama la atención que aunque ambos polipéptidos tengan un número similar de cargas negativas presenten diferente solubilidad. Este hecho implica que la presencia de cargas positivas, responsables de la diferencia en carga neta promedio, induciría la agregación. Por lo tanto, para probar esta hipótesis, se construyó un polipéptido a partir del polipéptido parcialmente soluble RL-60 $\beta$ 8. El nuevo polipéptido, de peso molecular teórico 13094, estaría constituido por los amino-



**FIGURA 13.** Relación entre algunos parámetros fisicoquímicos y la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidos en *E. coli*. PM, peso molecular; carga neta, carga neta promedio; fracción aa, fracción de residuos de aminoácidos formadores de vuelta (asparragina + serina + glicina + prolina). (a): polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, (b): polipéptidos C-terminal de  $\beta$ -tubulina.

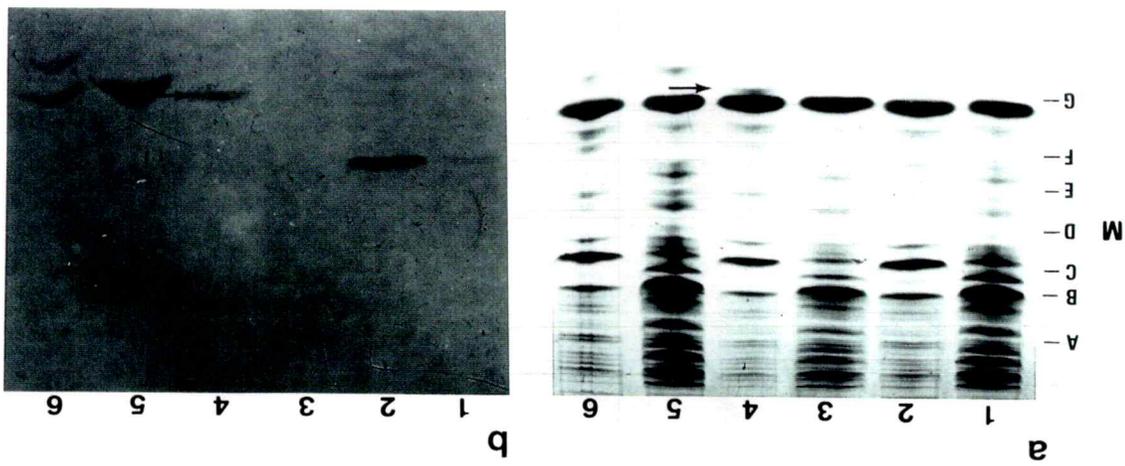
ácidos 287 al 393 de  $\beta$ -tubulina correspondientes al extremo N-terminal del polipéptido soluble RL-33 $\beta$ . A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido RL-03 $\beta$ 2 y se indica el número de los aminoácidos N- y C-terminal de la secuencia de  $\beta$ -tubulina:

287  
 A R R A P E L T Q G M F D S K N M M A A C P F H G R Y L T V A I F R G R M S M K E V D E Q M L N V Q N K N  
 S S Y F V E W I P N N V K T A V C D I P P R G L K M S A T F I G N S T A I Q E L F K R I S E Q F T A M F R R K A V L 393

En verde se indican los residuos de aminoácidos ácidos y en rojo, los residuos de aminoácidos básicos. La carga neta promedio de este polipéptido es +0,061.

En las figuras 14a y 14b (carriles 3 y 4) se observa el resultado de los estudios de expresión del plasmidio que lo codifica y de la solubilidad del nuevo polipéptido sobreproducido. Puede observarse que el polipéptido se obtuvo en forma insoluble, pues se recuperó en la fracción sedimentada de la centrifugación a 15000 g (carril 4). Este resultado demuestra que el porcentaje de solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 se pierde al eliminar la región C-terminal y es independiente del tamaño. Por lo tanto, es posible concluir que la carga neta dada por la región C-terminal de la proteína, correspondiente al polipéptido soluble RL-33 $\beta$ , es un factor que contribuye en forma importante a

**FIGURA 14. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-03β2 sobreproducido en *E. coli*.** La fracción soluble e insoluble del polipéptido RL-03β2 sobreproducido en *E. coli* BL21(DE3) se determinó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en *Materiales y Métodos*. La visualización del polipéptido se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y autorradiografía (b). Carriles 1 y 2, polipéptido RL-60β8, carriles 3 y 4, polipéptido RL-03β2 y carriles 5 y 6, RL-33β6. Carriles impares, fracción sobrenadante; carriles pares, fracción sedimentada. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

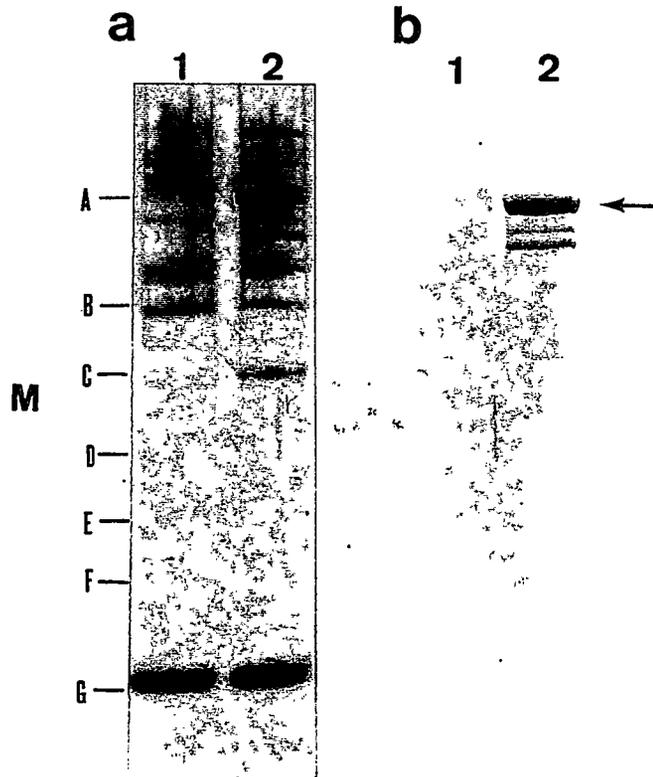


la solubilidad de la proteína.

La fracción de residuos formadores de vuelta fue la propiedad estudiada que presentó la menor correlación con la solubilidad de los polipéptidos C-terminal. El coeficiente de regresión lineal obtenido cuando se analizaron todos los polipéptidos C-terminal en su conjunto fue de 0,78. Este coeficiente mejoró a 0,96 cuando se analizaron sólo los polipéptidos C-terminal de la  $\beta$ -tubulina.

*Influencia del sistema de expresión y de la secuencia de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.* Para conocer si el sistema de expresión tenía influencia sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de la tubulina sobreproducidos en *E. coli*, se investigó la solubilidad del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 subclonado en el vector pT7-7/GT, el cual permite expresar proteínas recombinantes fusionadas con la enzima glutatión transferasa (A. Salas y R. Lagos, datos no publicados). El resultado de este experimento se muestra en la figura 15. Puede observarse que el estado de agregación del polipéptido C-terminal es independiente del vector de expresión empleado para subclonarlo, pues presenta la misma solubilidad que cuando se expresa a partir del vector pT7-7 (carriles 1 y 2 de las figuras 8a y b).

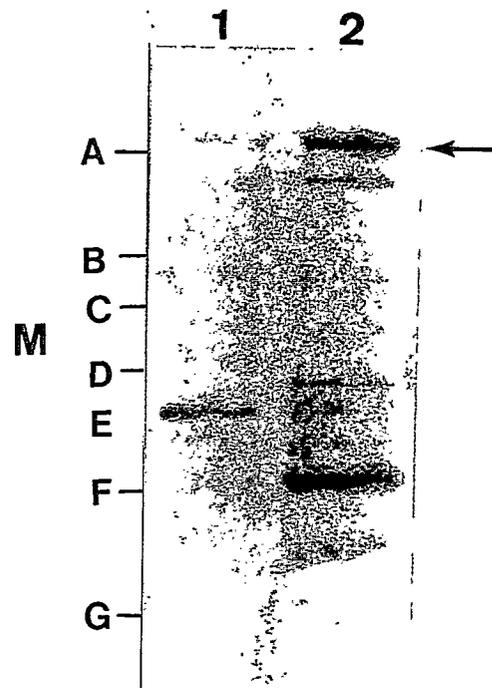
Para estudiar el efecto de la secuencia de la tubulina sobre su solubilidad se utilizó la de *Entamoeba histolytica*. Se investigó la solubilidad del producto de expresión de  $\alpha$ -tubulina de *E. histolytica* subclonada en el vector pGEX-1 $\lambda$ T, que gentilmente nos proporcionó la Dra. Ester Orozco, CINVESTAV I.P.N., México). Esta tubulina es la más distante filogenéticamente de las otras



**FIGURA 15. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 subclonado en el vector pT7-7/GT.** La fracción soluble e insoluble del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8/GT sobreproducido en *E. coli* BL21(DE3) se determinó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y autorradiografía (b). Carril 1, fracción sobrenadante; carril 2, fracción sedimentada. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-18 $\alpha$ 8/GT. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

tubulinas y sólo presenta un 55 % de similitud con ellas, de acuerdo con lo informado por Mena y col. (1995), resultados originales que fueron confirmados con posterioridad por Doolittle (Keeling y Doolittle, 1996). En la figura 16 se muestran los resultados de la solubilidad del producto de expresión. Se observa una serie de bandas radiactivas donde se destaca una en la fracción soluble y al menos tres en el sedimento. La inespecificidad de la marcación se explica, porque no se usó rifampicina para inhibir las RNA polimerasas endógenas. Se observa, además, en el carril 2 de la figura 16 que la proteína recombinante glutatión transferasa- $\alpha$ -tubulina de ameba, cuyo peso molecular teórico es de 71000, se sobreproduce en forma insoluble de igual forma que lo observado con la  $\alpha$ -tubulina de queratocito humano (resultados mostrados en la figura 9, carriles 1 y 2) y  $\beta$ -tubulina de *T. brucei* clonada en *E. coli* (Wu y Yarbrough, 1987), sugiriendo que esta propiedad es común a la tubulina de diversas especies.

*Influencia de la cepa bacteriana.* Como ya se mencionó en la Introducción, existe controversia respecto la participación de algunas proteínas bacterianas en la formación de los CI. Por ejemplo, se había descrito que las proteínas porinas OmpC y OmpF así como la proteína estructural OmpA eran componentes de los CI. Para verificar este punto, se decidió expresar los polipéptidos C-terminal en una cepa carente de las proteínas mencionadas. Se trabajó con los polipéptidos de mayor tamaño pertenecientes a  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.



**FIGURA 16. Determinación de la solubilidad de  $\alpha$ -tubulina de *Entamoeba histolytica* sobreproducida en *E. coli*.** La fracción soluble e insoluble de  $\alpha$ -tubulina de ameba clonada en el vector de expresión pGEX y sobreproducida en *E. coli* BL21(DE3) se determinó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de las proteínas se realizó por autorradiografía. Carril 1, fracción sobrenadante; carril 2, fracción sedimentada. La flecha indica la posición donde migra la proteína de fusión entre glutatión transferasa y la  $\alpha$ -tubulina de ameba. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

Los plasmidios que los codifican fueron transformados en las diferentes cepas de *E. coli* que se describieron en Materiales y Métodos.

Los polipéptidos RL-18 $\alpha$ 8 y RL-81 $\beta$ 12 se sobreprodujeron en forma insoluble en todas las cepas ensayadas, de manera independiente de la presencia o ausencia de las proteínas bacterianas mencionadas. Cabe recordar que la cepa de *E. coli* UH302 es una cepa mutante, que no produce las porinas OmpC y OmpF ni la proteína OmpA (Cole y col., 1982). Por lo tanto, la hipótesis que supone la participación de las mencionadas proteínas bacterianas en la formación de CI con los polipéptidos estudiados perdió consistencia.

*Cinética de formación de los CI.* Con el propósito de aumentar el conocimiento sobre el mecanismo de formación de los CI, se decidió realizar algunos experimentos que mostraran la cinética de formación de dichos agregados insolubles. Se trabajó con el polipéptido RL-60 $\beta$ 8, sobreproducido en la cepa de *E. coli* K38, pues el sistema de dos plasmidios (ver Materiales y Métodos) permitía un mejor control del nivel basal del polipéptido sintetizado. El diseño experimental fue el siguiente: El cultivo se hizo en medio LB a 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 100 UK, se transfirió a medio M9 y se incubó por 40 minutos. Este cultivo se indujo a 42 °C durante 20 minutos para la expresión del plasmidio pRL-60 $\beta$ 8 y se incubó a 30 °C hasta 8 horas después de la inducción, para permitir la sobreproducción del polipéptido. Se tomaron muestras del cultivo a 1, 4 y 8 horas después de la inducción, las cuales se

trataron de la siguiente manera. A cada muestra se le agregó rifampicina y se continuó la incubación por 20 minutos, se dio un pulso radiactivo con  $^{35}\text{S}$ -metionina durante 10 minutos y se determinó la solubilidad del polipéptido por el método estándar. A continuación se presenta un esquema que resume el experimento:

### Cultivo:

LB 30 °C      M9 30 °C      Shock a 42 °C      30 °C

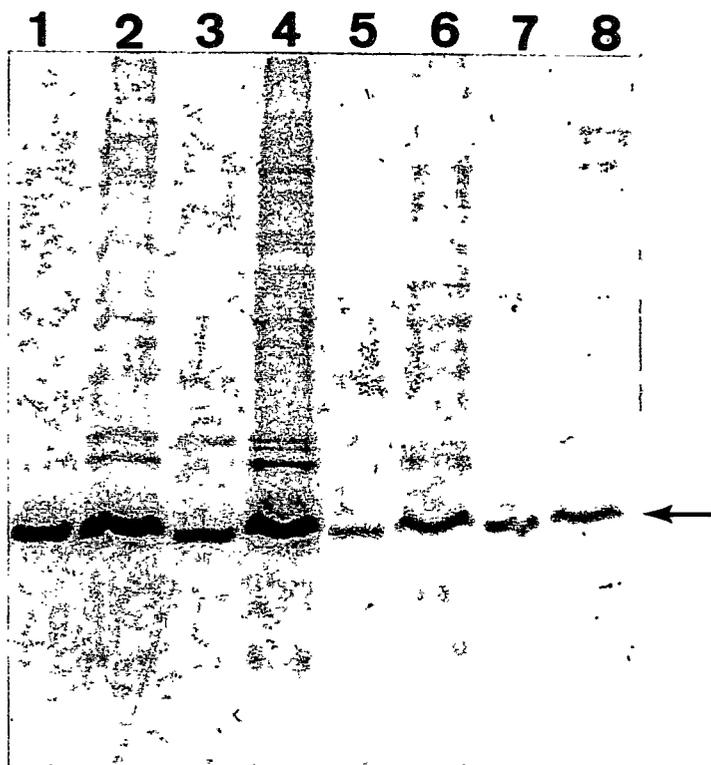
| 100 UK | 40 min | 20 minutos | **incubación hasta 8 horas**

(toma de muestra a 1, 4 y 8 horas después de la inducción)

### Muestra:

Rifampicina	$^{35}\text{S}$ -metionina	<b>Determinación de la solubilidad</b>
20 minutos		10 minutos

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 17. Puede observarse que durante los primeros estadios de la expresión (tiempo cero), la proporción de polipéptido insoluble (indicado por la flecha en la figura 17) es levemente mayor que la fracción soluble (carriles 1 y 2 en la figura 17). Sin

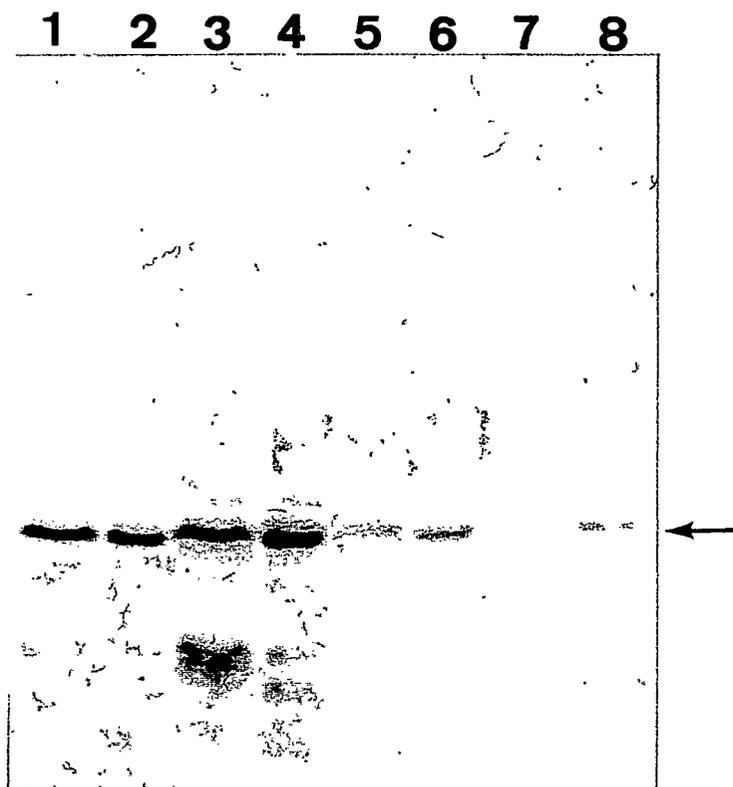


**FIGURA 17. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 a diversos tiempos después de la inducción.** Las células de *E. coli* K-38/pGP1-2 que contienen el plasmidio pRL-60 $\beta$ 8 se indujeron para la expresión del polipéptido durante 30 minutos y se incubaron hasta 8 horas después de la inducción, para permitir la sobreproducción del polipéptido. Fracciones del cultivo obtenidas a distintos tiempos se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina durante 10 minutos y se determinó la proporción de polipéptido soluble e insoluble (ver Materiales y Métodos). Las fracciones soluble e insoluble del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 se determinaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987). Las proteínas se visualizaron por autorradiografía. Carriles impares, fracción soluble; carriles pares, fracción insoluble. Carriles 1 y 2, tiempo cero; carriles 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, tiempo una, cuatro y ocho horas después de la inducción, respectivamente. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-60 $\beta$ 8.

embargo, después de una hora de producida la inducción, la diferencia aumenta, pues se obtiene aproximadamente 30 % de proteína soluble y 70 % de proteína insoluble. Sorprendentemente, luego de transcurridas 8 horas después de la inducción (carriles 7 y 8) la fracción insoluble disminuye a valores similares a lo observado en los primeros estadios de la experiencia. Estos resultados apoyan la hipótesis que la formación de los CI está favorecida por un aumento de la concentración intracelular de la proteína recombinante.

La permanencia del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 en los CI se muestra en la figura 18. En este caso, se dio un pulso radiactivo al inicio del experimento y se detectó el polipéptido marcado a diferentes tiempos después de la marcación. Se esperaba que la marca incorporada en los CI se mantuviese constante, lo que indicaría que los CI son estables, pues el polipéptido no se pierde. Sin embargo, se observó que el polipéptido marcado prácticamente desaparecía luego de transcurridas 4 horas desde su inducción (carriles 5 y 6). Por otra parte, se observó que el polipéptido RL-60 $\beta$ 8 sufría degradación, lo que se demuestra por la aparición de bandas radiactivas de menor peso molecular (carriles 3 y 4). Estos resultados indican que los polipéptidos de la tubulina podrían ser inestables y estar siendo degradados proteolíticamente en el CI, pero no podemos descartar que aunque los CI sean estables haya recambio de los polipéptidos.

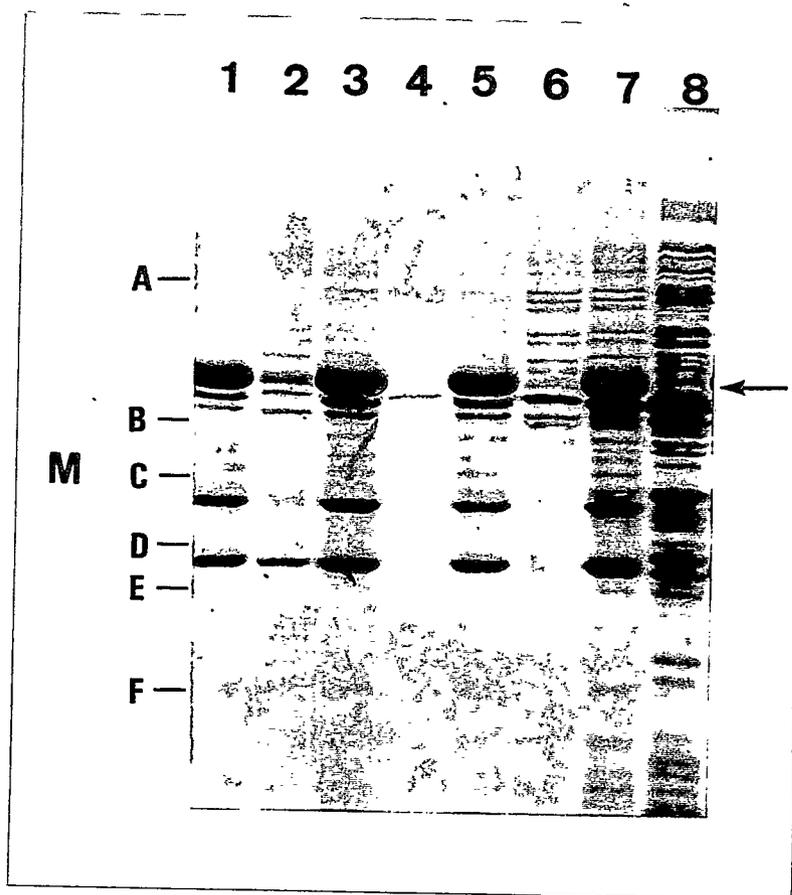
*Efecto de detergentes sobre la estabilidad de los CI.* En el proceso de ruptura



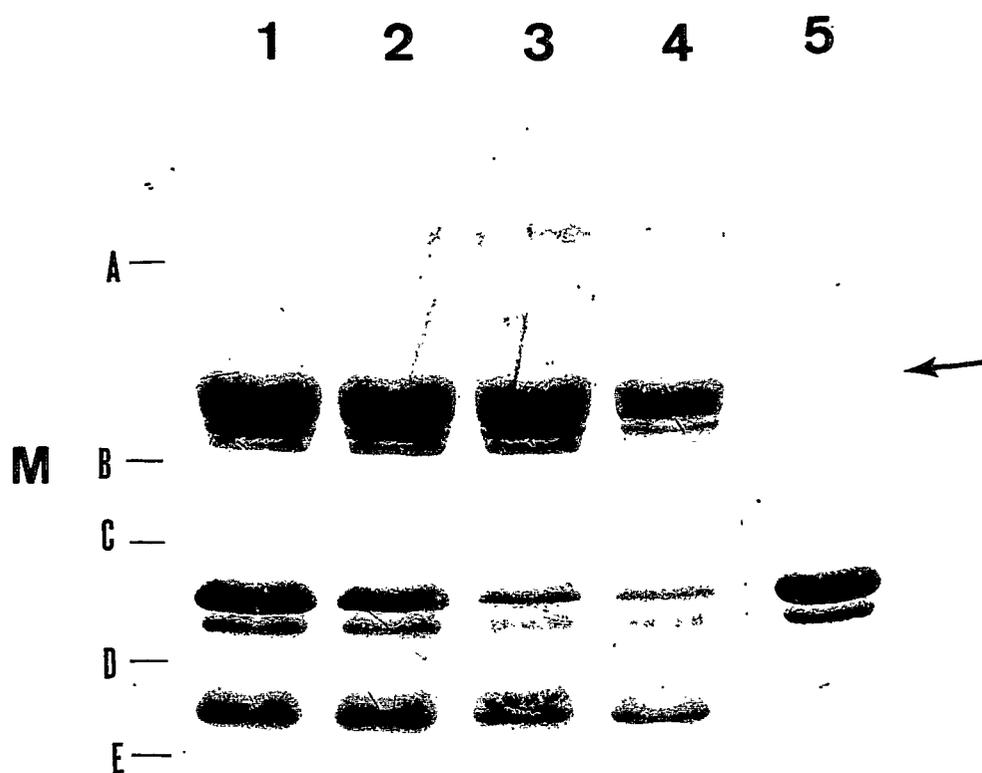
**FIGURA 18. Estabilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 en los CI.** Las células de *E. coli* K-38/pGP1-2 que contienen el plasmidio pRL-60 $\beta$ 8 se indujeron para la expresión del polipéptido durante 30 minutos y se incubaron otros 30 minutos para permitir la sobreproducción del polipéptido RL-60 $\beta$ 8. Las células se marcaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina durante 10 minutos y se tomaron muestras a los tiempos indicados, para determinar la proporción de polipéptido soluble e insoluble (ver Materiales y Métodos). Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, usando geles al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987). Las proteínas se visualizaron por autorradiografía. Carriles impares, fracción soluble; carriles pares, fracción insoluble. Carriles 1 y 2, tiempo cero; carriles 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, tiempo una, cuatro y ocho horas después de la inducción, respectivamente. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-60 $\beta$ 8.

celular se usan detergentes, pues rompen las membranas bacterianas. Por esta razón, se estudió el efecto de los detergentes más comúnmente usados sobre la estabilidad de los CI. La estabilidad del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 no se modificó frente a lauril sarcosinato 1,5 %, desoxicolato 2 % y Tritón X-100 2% como se muestra en la figura 19. En la fracción sedimentada se observa que los CI fueron estables y que a lo menos dos proteínas de peso molecular 27000 y 34000 siempre acompañaron en la misma cantidad al polipéptido recombinante (indicado por la flecha). Una tercera proteína que también acompañó al polipéptido RL-18 $\alpha$ 8, de peso molecular levemente inferior, fue parcialmente soluble con Tritón X-100.

En la figura 20 se muestra la separación de las proteínas que se recuperan en la fracción soluble del tratamiento de los CI del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 con SDS, a concentraciones 2 %, 1 %, 0,5 % y 0,1 % (carriles 1 al 4, respectivamente). Puede observarse que el tratamiento de los CI con SDS a concentraciones iguales o mayores que 0,5 % solubilizan al polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 (indicado por la flecha en la figura 20), en tanto que SDS 0,1 % sólo lo disuelve parcialmente. Las proteínas que acompañan a los CI, descritas en la figura 19, presentan un comportamiento similar al del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 frente a SDS, pues se solubilizan con SDS 1 o 2 %. Sin embargo, a 0,5 % de SDS la proteína de peso molecular 34000 tiene un comportamiento diferente, pues se solubiliza muy poco en comparación con el polipéptido de la tubulina y las otras proteínas acompañantes. La proteína de peso molecular 27000, en



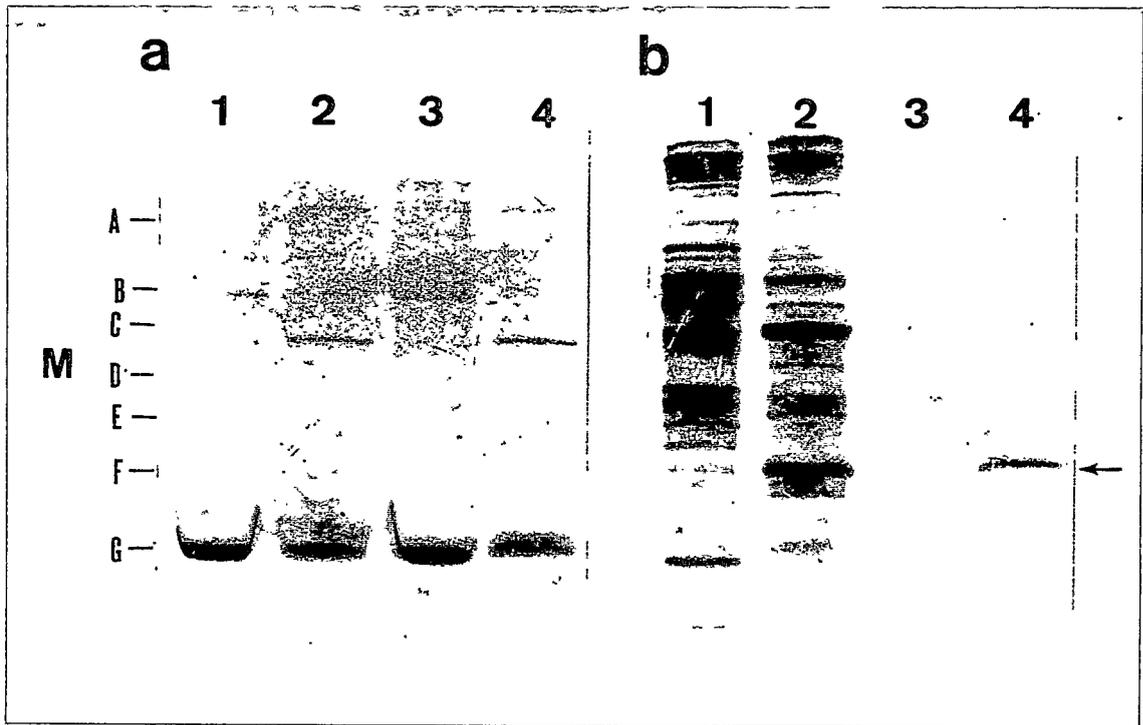
**FIGURA 19. Tratamiento de los CI del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 con detergentes.** Los CI obtenidos por ruptura celular mediante ciclos de congelamiento/ descongelamiento en *E. coli* UH302 (carriles 7 y 8) se trataron con lauril sarcosinato 1,5 % (carriles 1 y 2), desoxicolato de sodio 2 % (carriles 3 y 4 ) y Tritón X-100 2 % (carriles 5 y 6), en la forma descrita en Materiales y Métodos. Las muestras se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 %T (Laemmli, 1970). Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie R-250. Carriles impares, fracción insoluble; carriles pares, fracción soluble. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-18 $\alpha$ 8. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000 y F, 20100).



**FIGURA 20.** Tratamiento de los CI del polipéptido RL-18 $\alpha$ 8 con diferentes concentraciones de SDS. Los CI obtenidos en *E. coli* UH302 por ruptura celular mediante ciclos de congelamiento/descongelamiento, se trataron con varias concentraciones de SDS. Las muestras se separaron por SDS-PAGE, usando geles al 10 % T (Laemmli, 1970). Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie R-250. Carriles 1 al 4, fracción soluble del tratamiento con 2, 1, 0,5 y 0,1 % de SDS, respectivamente; carril 5, fracción insoluble del tratamiento con 0,5 % de SDS. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-18 $\alpha$ 8. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000).

tanto, presenta un comportamiento casi idéntico al del polipéptido recombinante.

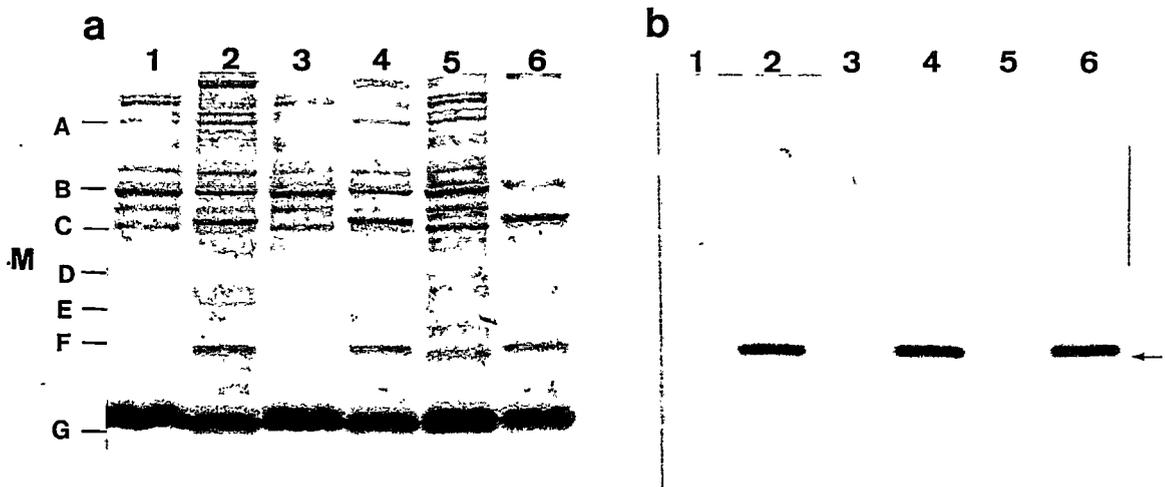
*Influencia de la temperatura de inducción sobre la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8.* La temperatura a la cual se induce la expresión de los plasmidios recombinantes en *E. coli* ha demostrado ser importante en algunos casos específicos. Por esto, se decidió estudiar el efecto de este parámetro sobre la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 que, como se mencionó antes, es en parte sobreproducido en forma soluble al igual que el polipéptido RL-52 $\alpha$ 3. Las figuras 21a (tinción con azul de Coomassie R-250) y 21b (autorradiografía) muestran la separación electroforética de las fracciones soluble e insoluble del polipéptido sobreproducido a 15 °C (carriles 1 y 2) y a 30°C (carriles 3 y 4). Puede observarse que la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 fue independiente de la temperatura a la cual se indujo su expresión (carriles 2 y 4 en la figura 21b). La flecha en la figura muestra la posición donde migra el polipéptido, de acuerdo a su peso molecular. En la autorradiografía (figura 21b) se observa que las células inducidas a 15 °C (carriles 1 y 2) presentan una mayor marca en comparación con las células inducidas a 30 °C (carriles 3 y 4). Sin embargo, esta mayor marca no se traduce en mayor cantidad de proteínas, pues el gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie R-250 (figura 21a) muestra que todos los carriles tienen cantidades similares de proteínas.



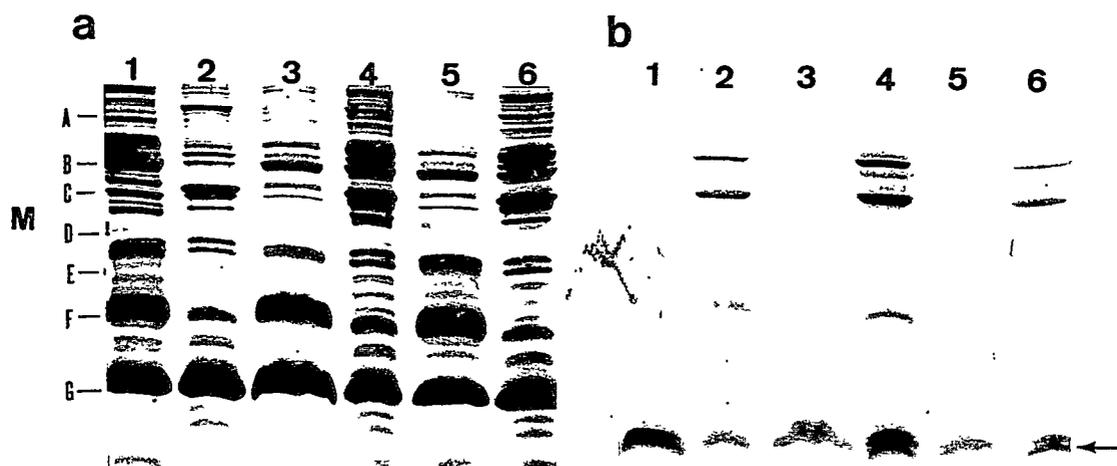
**FIGURA 21. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 sobreproducido a baja temperatura.** La fracción soluble e insoluble del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 sobreproducido a 15 °C o 30 °C en *E. coli* BL21(DE3) se determinó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y autorradiografía (b). Carriles 1 y 2, expresión a 15 °C; carriles 3 y 4, expresión a 30 °C. Carriles 1 y 3, fracción sobrenadante; carriles 2 y 4, fracción sedimentada. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-60 $\beta$ 8. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

*Efecto de las condiciones de ruptura celular sobre la solubilidad de los polipéptidos RL-60 $\beta$ 8 y RL-33 $\beta$ 6.* De acuerdo con la hipótesis planteada originalmente, los polipéptidos de la tubulina se estarían agregando en el citoplasma bacteriano. Por lo tanto, las condiciones de ruptura celular que se empleen para recuperarlos a partir de la suspensión bacteriana, podrían afectar su solubilidad.

Usando como modelo experimental el polipéptido RL-60 $\beta$ 8 que se sobreproduce parcialmente soluble, se ensayaron diversas condiciones de ruptura celular para su recuperación. Interesaba encontrar alguna condición que permitiese desplazar el equilibrio hacia la forma soluble. Como control se usó el polipéptido RL-33 $\beta$ 6, el cual se sobreproduce prácticamente 100 % soluble. En la figura 22 se muestra el efecto que tiene el empleo de detergentes apolares sobre el estado, soluble o insoluble, en que se recupera el polipéptido RL-60 $\beta$ 8. Puede observarse que con Nonidet P-40 (carriles 1 y 2 en las figuras 22a y b) o Tritón X-100 (carriles 3 y 4 en las figuras 22a y b) el polipéptido recombinante se recuperó insoluble. Confirmando la influencia de los detergentes apolares sobre el aumento de la insolubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8. El polipéptido soluble RL-33 $\beta$ 6 obtenido por ciclos de congelamiento/descongelamiento también se recuperó en mayor proporción en la fracción insoluble cuando se usó para la ruptura celular Tritón X-100 (carriles 3 y 4 en las figuras 23a y b) o Nonidet P-40 (carriles 5 y 6 en las figuras 23a y b). Por lo tanto, Nonidet P-40 y Triton X-100 favorecen la agregación. Por esta razón, el



**FIGURA 22. Determinación de la solubilidad del polipéptido RL-60β8 en presencia de detergentes no iónicos usados en el proceso de ruptura celular.** La fracción soluble e insoluble del polipéptido RL-60β8 sobreproducido en *E. coli* BL21(DE3) se determinó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y autorradiografía (b). La ruptura celular se realizó por tres métodos diferentes. Carriles 1 y 2, ruptura con Nonidet P-40 1%; carriles 3 y 4, ruptura celular con Triton X-100 2 %; carriles 5 y 6, ruptura celular celular por 4 ciclos de congelamiento/ descongelamiento. Carriles impares, fracción soluble; carriles pares, fracción insoluble. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-60β8. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).



**FIGURA 23. Efecto del uso de detergentes no iónicos en el proceso de ruptura celular sobre la solubilidad del polipéptido RL-33 $\beta$ 6.** La fracción soluble e insoluble del polipéptido RL-33 $\beta$ 6 sobreproducido en *E. coli* BL21(DE3) se determinó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y autorradiografía (b). La ruptura celular se realizó por tres métodos diferentes. Carriles 1 y 2, ruptura celular por 4 ciclos de congelamiento/descongelamiento; carriles 3 y 4, ruptura celular con Triton X-100 2 %; carriles 5 y 6, ruptura celular con Nonidet P-40 1%. Carriles impares, fracción soluble; carriles pares, fracción insoluble. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-33 $\beta$ 6. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

método de ruptura utilizado fue congelamiento/descongelamiento. Se observó, además, que el efecto de los detergentes se revirtió cuando la ruptura celular se hizo con células resuspendidas en el mismo medio más NaCl 1 M (Tabla 4), indicando que la polaridad del medio tiene una fuerte influencia sobre la solubilidad de aquellos polipéptidos altamente polares.

**TABLA 4. Efecto de las condiciones de lisis sobre la solubilidad de los polipéptidos RL-33β6 y RL-60β8 sobreproducidos en *E. coli* BL21(DE3).**

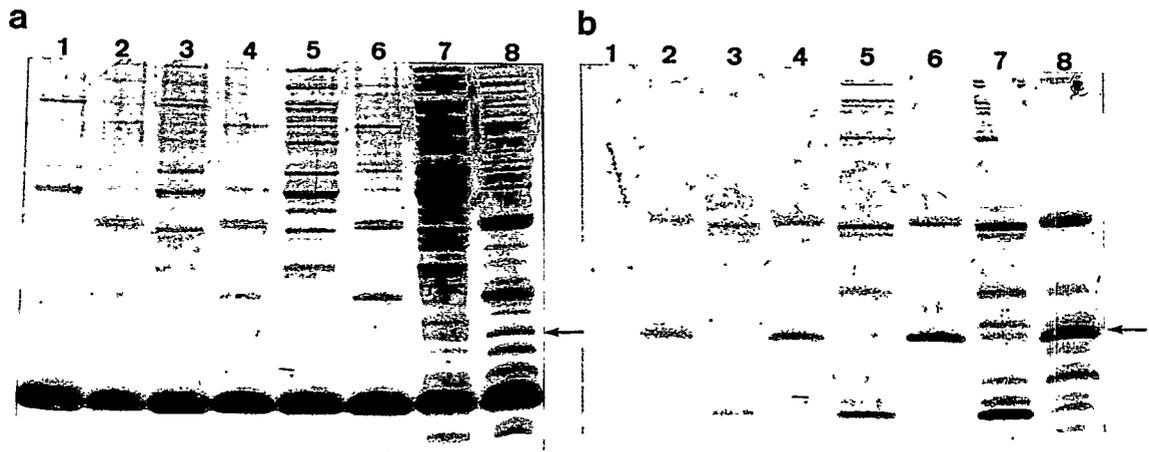
Procedimiento de lisis	proteína soluble (%)	
	RL-33β6	RL-60β8
Triton X-100	20	<10
Triton X-100 + NaCl 1M	80	30
cong./descong. <sup>a</sup>	>95	30
cong./descong. + NaCl 1M	>95	35

<sup>a</sup>: 4 ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento a temperatura ambiente.

Considerando que el polipéptido RL-60β8 contiene 2 residuos de cisteína y se expresa parcialmente soluble, en tanto que el polipéptido RL-33β6 no contiene residuos de cisteína y se expresa soluble, fue razonable suponer

que las cisteínas podrían estar afectando la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8. Por lo tanto, se incluyó  $\beta$ ME en el amortiguador usado para la ruptura celular. De este modo se pretendía evitar que las condiciones oxidantes del medio favorecieran la formación de puentes disulfuro, lo que desplazaría el equilibrio hacia la agregación favoreciendo el estado insoluble. Los resultados observados indican que la presencia de  $\beta$ ME en el medio de ruptura celular no afecta la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 (González y col., 1996).

*Influencia de la concentración de proteínas y otros componentes bacterianos sobre la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8.* Para comprobar si la baja solubilidad observada con el polipéptido RL-60 $\beta$ 8 se debía a la elevada concentración de proteínas y de otros componentes bacterianos que se producen durante el proceso de ruptura celular, se procedió a realizar la ruptura usando suspensiones bacterianas con distinta concentración de células. En las figuras 24a y b se presentan los resultados de los experimentos de ruptura celular cuando se emplean suspensiones concentradas entre 2 y 20 veces respecto del cultivo inicial. Al comparar la intensidad del par de bandas, fracciones soluble e insoluble, para cada concentración de bacterias usadas (por ejemplo, carriles 1 y 2 con carriles 3 y 4), sólo se observa un aumento proporcional de las intensidades de las bandas con la concentración de células. Las bandas correspondientes al polipéptido siguen el mismo comportamiento. Este resultado indica que la concentración de proteínas y otros componentes



**FIGURA 24. Efecto de la concentración de células bacterianas sobre la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8.** La fracción soluble e insoluble del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 sobreproducido en *E. coli* BL21(DE3) se determinó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Schägger y von Jagow, 1987), como se describió en Materiales y Métodos. Se emplearon varias densidades de células en la suspensión bacteriana, las que se obtuvieron por dilución de la suspensión bacteriana más concentrada (20x) previo a la ruptura celular. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie R-250 (a) y por autorradiografía (b). Carriles impares, fracción soluble; carriles pares, fracción insoluble. Carriles 1 y 2, concentración 2x; carriles 3 y 4, concentración 4x; carriles 5 y 6, concentración 10x; carriles 7 y 8, concentración 20x. La flecha indica la posición donde migra el polipéptido RL-60 $\beta$ 8.

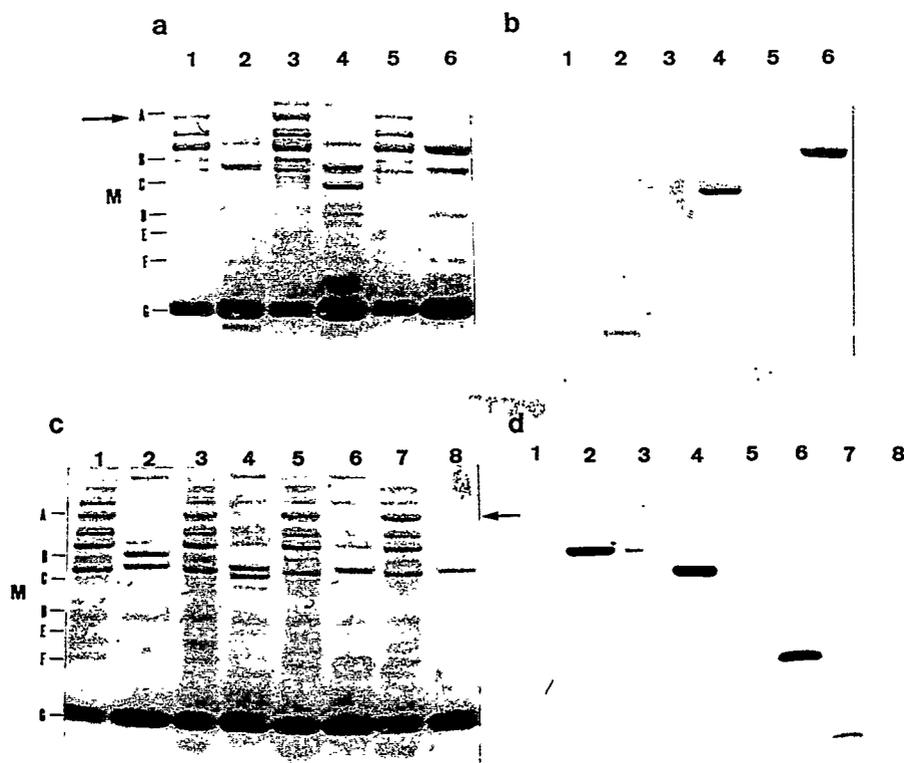
celulares no afectan la solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 en el rango analizado. El elevado número de proteínas que se marcó en forma inespecífica en este experimento (figura 24b) se debe a que las bacterias se incubaron sólo 30 minutos en lugar de una hora (tiempo habitual) con la rifampicina, que inhibe las RNA polimerasas endógenas sin afectar a la RNA polimerasa T7.

*Co-expresión de polipéptidos C-terminal y chaperoninas GroEL/GroES.* De acuerdo con los antecedentes bibliográficos disponibles, era posible suponer que la masiva producción de proteínas foráneas en *E. coli* podría estar disminuyendo la capacidad de asistencia de las chaperonas moleculares al plegamiento de las proteínas intracelulares y ser ésta, por lo tanto, una causa de la agregación observada en los polipéptidos derivados de la tubulina. Por ello, se decidió coexpresar las chaperoninas GroEL/GroES y los polipéptidos derivados de la tubulina.

En primer lugar, se transformó el plasmidio pOF39K, que codifica para las chaperoninas GroEL y GroES, en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), verificándose que la cepa transformada sobreprodujera ambas chaperoninas. Posteriormente, la cepa bacteriana, que contenía el plasmidio pOF39K, se transformó con cada uno de los plasmidios recombinantes de los polipéptidos y se investigó la solubilidad de éstos. Se trabajó con todos los polipéptidos construidos, para descartar un efecto derivado del tamaño y la secuencia de los polipéptidos sobre las chaperoninas, que pudiese ser la consecuencia de la

pérdida probable de los sitios de interacción entre los polipéptidos de menor tamaño y las chaperoninas. En este experimento, los polipéptidos parcialmente solubles son los más interesantes de considerar, pues permiten cuantificar mejor el efecto de las chaperoninas sobre la solubilidad de éstos. Por otra parte, el polipéptido que se expresa completamente soluble sirve de control para verificar que no se están produciendo agregados insolubles debido a la sobreproducción de chaperoninas. Los resultados de este experimento se muestran en las figuras 25 a, b, c y d. La flecha en la figura muestra el lugar donde migra la chaperonina GroEL, de acuerdo con su peso molecular. La chaperonina GroES no se observa en el gel, pues co-migra con la banda de lisozima (banda más gruesa en todos los carriles). Puede observarse que todos los polipéptidos conservaron su solubilidad en presencia de las chaperoninas, mientras que las chaperoninas permanecieron siempre en la fracción soluble. La cuantificación de la marca en ambas fracciones confirmó que la presencia de chaperoninas no modificaba la solubilidad de los polipéptidos derivados de la tubulina (Tabla 5), excepto por un leve aumento de la fracción insoluble del polipéptido RL-52 $\alpha$ 3.

La ausencia de efecto de GroEL y GroES fue independiente del orden en que se transformaron los plasmidios que codifican para las chaperoninas y para los polipéptidos (datos no mostrados). Este resultado sugiere que, *in vivo*, la agregación de los polipéptidos derivados de la tubulina no parece ser la consecuencia de una carencia de chaperoninas.



**FIGURA 25. Determinación del efecto de la expresión de chaperoninas GroEL/GroES sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal.** La fracción soluble e insoluble de los polipéptidos sobreproducidos en una cepa de *E. coli* BL21(DE3) que expresa las chaperoninas GroEL/GroES se determinaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Laemmli, 1970), como se describió en Materiales y Métodos. La visualización de las proteínas se realizó por tinción con azul de Coomassie R-250 (a y c) y por autorradiografía (b y d). En a y b: carriles 1 y 2, RL-52 $\alpha$ 3; carriles 3 y 4, RL-11 $\alpha$ 2; carriles 5 y 6, RL-18 $\alpha$ 8. En c y d: carriles 1 y 2, RL-33 $\beta$ 6; carriles 3 y 4, RL-60 $\beta$ 8; carriles 5 y 6, RL-38 $\beta$ 4; carriles 7 y 8, RL-81 $\beta$ 12. Carriles impares, fracción sobrenadante; carriles pares, fracción sedimentada. Las flechas muestran la posición donde migra la chaperonina GroEL. M, marcadores de peso molecular (A, 66000; B, 45000; C, 36000; D, 29000; E, 24000; F, 20100 y G, 14200).

**TABLA 5. Efecto de la co-expresión de chaperoninas GroEL/GroES sobre la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de la tubulina sobreproducidos en *E. coli* BL21(DE3).**

Polipéptido	sin chaperoninas		con chaperoninas	
	soluble (%)	insoluble (%)	soluble (%)	insoluble (%)
RL-18 $\alpha$ 8	4	96	4	96
RL-11 $\alpha$ 2	0	100	4	96
RL-52 $\alpha$ 3	39	61	24	76
RL-81 $\beta$ 12	3	97	3	97
RL-38 $\beta$ 4	4	96	2	98
RL-60 $\beta$ 8	15	85	16	84
RL-33 $\beta$ 6	96	4	96	4

Se sabía que las chaperoninas GroEL/GroES asisten al plegamiento de proteínas cuando éstas tienen cierto grado de estructuración y que su actividad se manifiesta en una etapa del plegamiento posterior a la asistencia dada por las chaperonas DnaK/DnaJ, las cuales se unen a los polipéptidos en el momento que están siendo traducidos. Por ello, se intentó co-expresar un plasmidio que codifica para DnaK/DnaJ con los plasmidios recombinantes que codifican para los polipéptidos C-terminal. Esto no fue posible, pues siempre se perdió uno de los plasmidios al subcultivar las cepas co-transformadas.

El análisis de los resultados presentados, en su conjunto, indica que los CI de polipéptidos C-terminal de la tubulina se producen dentro de la célula y su formación depende del tamaño y secuencia de los polipéptidos más bien que

de un aumento inespecífico de la concentración de proteínas intracelulares. Su formación y solubilidad no se debería a una carencia de chaperoninas GroEL/GroES. La estabilidad de los polipéptidos en los CI es baja, pues sufren degradación después de transcurrida 1 hora desde su formación.

***Características funcionales y estructurales de los polipéptidos C-terminal sobreproducidos en E. coli.***

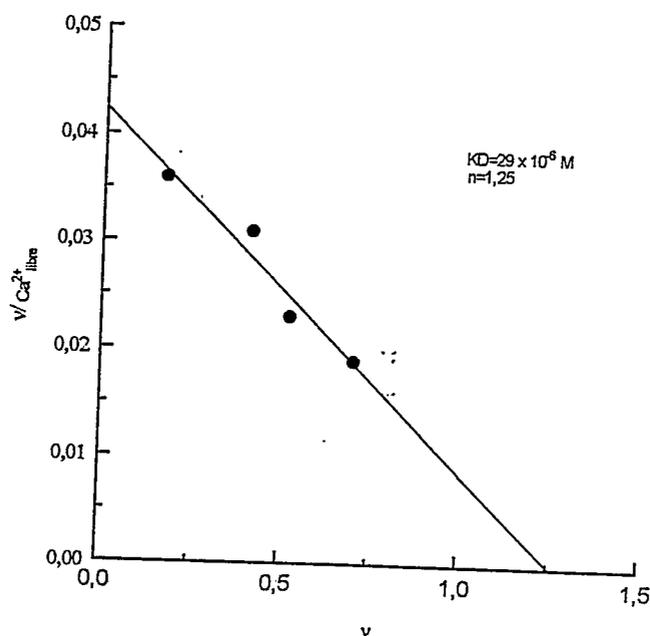
Con el propósito de caracterizar los polipéptidos de la tubulina sobreproducidos en *E. coli*, se analizaron algunos aspectos estructurales y funcionales de ellos utilizando como control la tubulina purificada de cerebro de pollo.

*Sitios de unión para calcio en los polipéptidos de la tubulina.* Se sabe que la tubulina tiene sitios de unión para metales; entre ellos, para el ión calcio (Monasterio y col., 1995). La determinación del número de sitios de unión para este metal y su localización en la molécula de tubulina ha sido tema de controversia y aún no existe consenso respecto de este punto. El disponer de una familia de polipéptidos derivados de la misma iso especie de la tubulina que difieren sólo en su tamaño, pero que todos contienen la región putativa donde se uniría el calcio, permite aportar valiosa información para dilucidar la

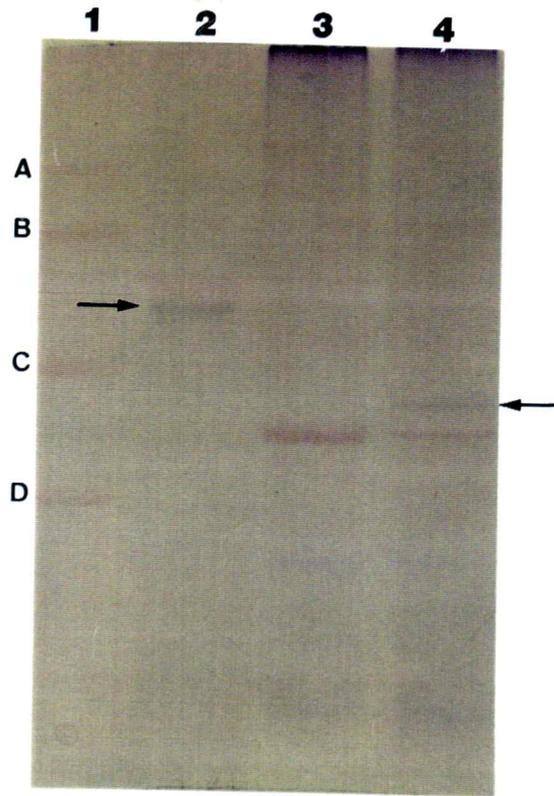
localización del sitio de unión de calcio a tubulina. ¿Se une a  $\alpha$ -tubulina o a  $\beta$ -tubulina?

Los polipéptidos C-terminal de la  $\beta$ -tubulina estudiados en esta Tesis, tienen la secuencia nucleotídica de la isoforma  $\beta 2$  de  $\beta$ -tubulina de cerebro de pollo. La unión de calcio a esta proteína no ha sido determinada. Por este motivo se investigó la unión de calcio a tubulina de cerebro de pollo. Este estudio también permitiría dilucidar el problema del número de sitios de unión para calcio en la tubulina. La figura 26 muestra que la unión sigue un comportamiento lineal en un gráfico de Scatchard, indicando que no hay cooperatividad. El análisis de estos resultados muestra la presencia de un sitio de unión para el metal con una constante de afinidad de 29  $\mu$ M. Los resultados de unión de calcio a los polipéptidos RL-52 $\alpha$ 3 y RL-33- $\beta$ 6 purificados mostraron que no unían calcio (C. Aranda, A. López, R. Lagos y O. Monasterio, resultados no publicados).

En vista que los polipéptidos más grandes no han sido purificados, se usó un método indirecto para visualizar la unión de calcio en muestras no purificadas, que se separan en geles de poliacrilamida. Utilizando el reactivo Stains all, que detecta la presencia de motivos de unión de ión calcio por la coloración azul que presenta la proteína (Campbell y col., 1983), se comprobó que los polipéptidos sobreproducidos presentan un comportamiento similar al observado con la tubulina purificada desde su fuente de origen natural. En la figura 27 se muestran los resultados de estos experimentos, para clones repre-



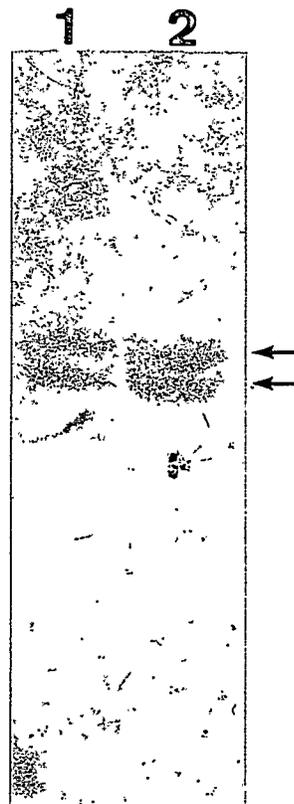
**FIGURA 26. Gráfico de Scatchard para la unión de calcio al heterodímero de tubulina de cerebro de pollo.** El heterodímero libre de agregados sedimentables por ultracentrifugación (Soto, 1993), se equilibró en amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,8, y se purificó de los agregados no sedimentables por cromatografía en una columna de Sephacryl S300 (ver Materiales y Métodos). El ensayo de unión se realizó mediante el sistema de micropartición MPS-1 (AMICON) con un volumen de 500  $\mu$ l de muestra, utilizando una membrana YMT de límite de exclusión 30 kDa. Los resultados de la unión del metal se analizaron usando el programa SigmaPlot 5.0.  $K_D$ , constante de disociación del complejo calcio-heterodímero de tubulina;  $n$ , moles de calcio unido por mol de heterodímero. El coeficiente de regresión lineal  $r$  fue de 0,96.



**FIGURA 27. Detección de motivos de unión de calcio en los polipéptidos RL-11 $\alpha$ 2 y RL-38 $\beta$ 4.** Los polipéptidos C-terminal RL-11 $\alpha$ 2 y RL-38 $\beta$ 4 sobreproducidos en *E. coli* BL21(DE3) se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % T (Laemmli, 1970). Las proteínas se visualizaron por tinción con Stains all, para determinar la presencia de motivos de unión de calcio (ver Materiales y Métodos). Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, tubulina de cerebro de pollo purificada; carril 3, polipéptido RL-11 $\alpha$ 2; carril 4, polipéptido RL-38 $\beta$ 4. Las flechas muestran la posición donde migran la  $\beta$ -tubulina y el polipéptido RL-38 $\beta$ 4, respectivamente. M, marcadores de peso molecular (A, 94000; B, 67000; C, 43000; D, 30000).

sentativos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. Se observa que la  $\alpha$ -tubulina (carril 2 en la figura 27, banda superior) presentó una coloración rojiza con el reactivo; mientras que la  $\beta$ -tubulina (carril 2 en la figura 27, banda inferior) se tiñó de color azul, lo que sugiere la posibilidad de la presencia de uno o más sitios de unión de calcio en la  $\beta$ -tubulina. Del mismo modo, el polipéptido perteneciente a  $\alpha$ -tubulina (carril 3 en la figura 27, banda de mayor intensidad) se mostró con una coloración rojiza y el polipéptido perteneciente a  $\beta$ -tubulina, una coloración azul (carril 4 en la figura 27, indicado por la flecha). Los resultados obtenidos con los polipéptidos C-terminal confirman la presencia de motivos de unión de calcio en  $\beta$ -tubulina.

La coloración azul en sus diferentes intensidades, asociada con la presencia de motivos de unión de calcio en la proteína, ha sido cuestionada, pues se ha encontrado que un alto contenido de residuos ácidos (glutámico y aspártico) interfieren en la formación del color (Campbell y col., 1983). Por lo tanto, se intentó verificar la presencia de sitios de unión para calcio mediante un método directo descrito por Serrano y col. (1986). Con este propósito se hizo una electroforesis (SDS-PAGE) de los polipéptidos sobreproducidos en *E. coli* y del heterodímero de tubulina purificado de cerebro de pollo. Las bandas del gel fueron transferidas a nitrocelulosa e incubadas con una solución que contenía calcio radiactivo (ver Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos muestran que sólo la tubulina fue capaz de captar calcio en las condiciones experimentales empleadas. El ión se unió tanto a  $\alpha$ -tubulina como a  $\beta$ -tubulina



**FIGURA 28. Unión de calcio a tubulina de cerebro de pollo.** El heterodímero de tubulina purificado desde cerebro de pollo se separó por SDS-PAGE, usando geles de poliacrilamida al 10 % T (Laemmli, 1970). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa por Western blot y se procesó para estudiar la unión de calcio, usando  $^{41}\text{Ca}$  (ver Materiales y Métodos). La visualización de la unión de calcio radiactivo se realizó mediante autorradiografía. Las flechas muestran la posición donde migran  $\alpha$ - (banda superior) y  $\beta$ -tubulina (banda inferior).

(figura 28), lo que estaría indicando la presencia de sitios de unión para calcio en  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. Contrariamente a lo esperado, los polipéptidos C-terminal no fueron capaces de unir calcio bajo las mismas condiciones experimentales, lo que podría indicar que no poseen el sitio de unión para el ión o que se requiere de las modificaciones postraduccionales presentes en la tubulina nativa para que se produzca la unión. Sin embargo, estudios paralelos a esta Tesis realizados con la tubulina purificada desde eritrocitos de pollo, mostraron que la proteína completa y los péptidos C-terminal, derivados de ella por tratamiento con subtilisina, unían calcio (O. Monasterio, R. Lagos y A. López, datos no publicados). Esta tubulina se asemeja más a los polipéptidos sobreproducidos en *E. coli*, pues no se encuentra poliglutamilada, la cual es una de las modificaciones post traduccionales de la tubulina de cerebro de pollo (Monasterio y col., 1995). Por otro lado, los ensayos de unión de calcio a los polipéptidos recombinantes RL-52 $\alpha$ 3 y RL-33 $\beta$ 6 purificados, hechos en un trabajo paralelo a esta tesis (C. Aranda, R. Lagos, O. Monasterio, datos no publicados), dieron resultados negativos para la unión de calcio, confirmando los hallazgos observados mediante Western blot.

*Secuencia aminoacídica y estructura de algunos polipéptidos C-terminal.* Los dos polipéptidos de menor tamaño de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina fueron enviados a España para su secuenciación (Laboratorio del Dr. J.M. Andreu, CSIC, España). La secuencia informada corresponde exactamente a la secuencia publicada para

los extremos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina (datos no publicados). Los estudios de estructura secundaria mediante dicroísmo circular mostraron que ambos polipéptidos estaban muy poco estructurados en solución, presentando menos de un 5 % de  $\alpha$ -hélice. Sin embargo, el empleo de trifluor-etanol al 60 % como solvente o la disminución del pH a 2 produjo un aumento del porcentaje de estructura  $\alpha$ -hélice a un 20 % para el polipéptido RL-52 $\alpha$ 3 y a un 30 % en el polipéptido RL-33 $\beta$ 6 (Evangelio, 1995). Por lo tanto, los polipéptidos subclonados y expresados en *E. coli* tienen el potencial de adquirir estructura secundaria en solución. La estructura de estos polipéptidos recombinantes se obtuvo por NMR bidimensional (M.A. Jiménez, R. Lagos, J.M. Andreu y O. Monasterio, manuscrito en preparación).

## DISCUSION

Los resultados presentados en esta Tesis muestran que  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina y los polipéptidos C-terminal RL-18 $\alpha$ 8, RL-11 $\alpha$ 2, RL-52 $\alpha$ 3, RL-81 $\beta$ 12, RL-38 $\beta$ 4 y RL-60 $\beta$ 8, sobreproducidos en *E. coli*, forman agregados insolubles intracelulares (CI) cuya formación depende de las condiciones de inducción del cultivo y de las características físico-químicas de la proteína sobreproducida. También influyen en la solubilidad con que se recuperan los polipéptidos C-terminal las condiciones del medio de ruptura celular. Se demostró que la formación de CI responde en forma inversa a la concentración intracelular de la proteína que se sobreproduce. Así, cuanto menor es su concentración intracelular mayor es la probabilidad de recuperarla soluble. En relación con las propiedades de la proteína, se demostró que la solubilidad depende de la carga y es independiente de su tamaño. Con respecto a las condiciones de ruptura, se demostró que la polaridad del medio de ruptura celular influye sobre la solubilidad de la proteína sobreproducida.

También se observó que, a diferencia de otras proteínas, la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidos en *E. coli* no se afecta por la temperatura a la cual se realiza la expresión, ni por la co-expresión de los polipéptidos de tubulina con las chaperoninas GroEL/GroES.

Tampoco influyen en su solubilidad la cepa bacteriana utilizada para sobreproducir los polipéptidos ni el vector de expresión en el cual están subclonados los cDNA que los codifican. Todos los CI de los polipéptidos C-terminal son estables frente a detergentes apolares, tales como Tritón X-100 o Nonidet P-40, y se solubilizan con detergentes polares, como por ejemplo SDS, o con un agente caotrópico como clorhidrato de guanidina.

El clonamiento y expresión de  $\alpha$ - como  $\beta$ -tubulina muestra que estas proteínas se recuperan en forma insoluble cuando se sobreproducen en *E. coli.*, lo que confirma los resultados de Wu y Yarbrough, (1987) y Yaffe y col., (1988b). Por otra parte, la traducción *in vitro* permite obtener  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina solubles (Yaffe y col., 1988a). En consecuencia, cabe preguntarse ¿Por qué la solubilidad de una misma proteína depende del sistema de expresión que se emplea? La formación de agregados proteicos insolubles en el citoplasma bacteriano puede deberse a factores que dependen del sistema de expresión, de la proteína que se está expresando *per se* o bien, de la estrategia experimental usada para recuperarla a partir del cultivo bacteriano que la produce. Por ejemplo, cuando se emplea traducción *in vitro* la concentración de proteínas obtenida no supera los 4  $\mu\text{g/ml}$  (Yaffe y col., 1988), en tanto que en bacterias, la concentración generalmente es superior a 1  $\text{mg/ml}$  (Marston, 1986). Es decir, existen numerosos factores que pueden estar influyendo sobre el estado, soluble o insoluble, con que se recuperan las proteínas clonadas y expresadas en bacterias. Por lo tanto, para abordar este tipo de problema fue

necesario realizar un estudio sistemático en que se consideraron la influencia de estos factores tanto por separado como en su conjunto. Por esto discutiremos secuencialmente los resultados obtenidos en relación a las condiciones de ruptura celular, formación de CI y solubilidad del producto de expresión.

*Condiciones de ruptura celular.* La polaridad del medio donde se realiza la ruptura celular influye sobre la solubilidad que presentan las proteínas que se recuperan desde *E. coli*. Tal es el caso del polipéptido RL-33β6, el cual se recupera insoluble si se emplean detergentes apolares para la ruptura celular; pero se obtiene en forma soluble cuando se utilizan ciclos de congelamiento/descongelamiento (González y col., 1996). La supresión del efecto de los detergentes apolares cuando se adiciona NaCl 1M al medio de ruptura celular, confirma que la formación de agregados insolubles del polipéptido RL-33β6 se debe a una disminución de la polaridad del medio causada por estos detergentes. Resultados similares fueron informados por Dunderdale y col. (1994), quienes observaron, empíricamente, que se requería de la presencia de NaCl 1 M en el medio para evitar que la resolvasa RuvC expresada en *E. coli* precipitara durante la ruptura celular que se realizaba en presencia de Tritón X-100. La baja polaridad del medio en estos casos podría favorecer la interacción de las proteínas sobreproducidas con proteínas bacterianas que se liberan durante el proceso de ruptura celular, como ha sido observado por Darby y

Creighton (1990) para los CI del inhibidor de tripsina de páncreas bovino. Se debe recordar que el polipéptido RL-33 $\beta$ 6 es altamente cargado, pues contiene 32,8 % de residuos de aminoácidos ácidos y 5,2 % de residuos aminoácidos básicos, lo cual permitiría su interacción electrostática con proteínas de la bacteria.

Se puede concluir que el uso de detergentes en el amortiguador donde se rompen las células bacterianas que sobreproducen proteínas clonadas influye sobre la solubilidad de la macromolécula que se recupera desde *E. coli*.

*Formación de CI.* Existe controversia con respecto al sitio donde se producirían los agregados insolubles, por lo tanto, fue importante preguntarse ¿Dónde se forman los CI?, ¿en el citoplasma bacteriano o extracelularmente, durante el proceso de ruptura celular? La morfología y contenido celular analizados a través de microscopía muestran la presencia de CI en todas las cepas que sobreproducen  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina o polipéptidos C-terminal, excepto en aquellas cepas que sobreproducen el polipéptido soluble RL-33 $\beta$ 6 o que contienen el vector de expresión pT7-7. Estos hallazgos difieren de lo descrito por Frankel y col. (1991), quienes observaron por microscopía electrónica agregados opacos, denominados por ellos CI, tanto en las células que sobreproducen una proteína insoluble como en aquellas células que expresan la proteína soluble. Esto demuestra que la presencia de estos agregados en la célula bacteriana no es un criterio para determinar la solubilidad o insolubilidad de una determinada

proteína sobreproducida en *E. coli*. La ausencia de agregados sí es un criterio de solubilidad, pues al sobreproducir el polipéptido RL-33 $\beta$ 6 no se observan agregados y el producto es soluble.

Si la formación de CI de polipéptidos C-terminal ocurre en el citoplasma bacteriano como consecuencia de su elevada concentración, los factores que la disminuyan, como por ejemplo una menor transcripción o una menor traducción, deberían favorecer la obtención de los polipéptidos en forma soluble. Alternativamente, si los CI se producen durante el proceso de ruptura celular, la concentración de los polipéptidos en el citoplasma bacteriano no debería afectar su solubilidad.

Se sabe que la expresión de algunas proteínas a temperaturas iguales o superiores a 37 °C produce la formación de CI en *E. coli* y que esto no ocurre cuando la expresión se realiza a temperaturas menores o iguales a 30°C. El mismo efecto se obtiene al incubar la proteína soluble, purificada, con extractos de *E. coli* crecidos a 37 °C o 30°C, respectivamente (Schein y Noteborn, 1988). Este efecto puede explicarse suponiendo que a 37 °C se producen factores bacterianos que promueven la formación de agregados o bien, que a temperaturas iguales o superiores a 37 °C se produce desnaturalización térmica de la proteína (Schein, 1989). Alternativamente, se puede suponer que a bajas temperaturas hay una transcripción y traducción reducida.

La solubilidad del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 no se modificó al expresar el plasmidio que lo codifica a 15 °C. Esto significa que en nuestro modelo la

transcripción sigue siendo elevada a esta temperatura. Por lo tanto, para confirmar nuestra suposición que una menor expresión favorece la obtención de polipéptido soluble, se realizó el estudio de la cinética de formación de los CI. Se suponía que en los primeros estadios de la inducción génica la cantidad de mRNA debería ser baja y, por lo tanto, se tendría una baja cantidad de proteína traducida, que favorecería su recuperación en forma soluble. Los resultados confirmaron la hipótesis, pues la fracción de polipéptido RL-60 $\beta$ 8 soluble aumentó en los primeros instantes posteriores a la inducción.

También se observó un aumento en la fracción soluble del polipéptido RL-60 $\beta$ 8 luego de transcurridas 4 horas desde la inducción de las células, en presencia de rifampicina. En estas condiciones la síntesis del polipéptido es baja, lo cual apoya la hipótesis que una menor concentración intracelular de proteínas evita la formación de CI. La disminución de la síntesis de proteínas se puede deber a una disminución de la concentración de mRNA como consecuencia de la ausencia del estímulo inductor para la transcripción o a la probable degradación de los mRNA existentes. Además, se sabe que las células de *E. coli* pierden sus ribosomas después de 4 horas de inducidas para sobreproducir proteínas clonadas (Dong y col., 1995), lo cual nos permite suponer que en nuestro sistema se produjo una disminución del contenido de ribosomas, con la consecuente disminución de la traducción del polipéptido RL-60 $\beta$ 8. La baja concentración del polipéptido permitiría su correcto plegamiento y la obtención de una mayor cantidad en la fracción soluble, en comparación con

el rendimiento que se obtiene cuando la transcripción y la traducción están en su máxima capacidad.

Los resultados discutidos hasta aquí, en su conjunto, indican que la agregación de los polipéptidos que forman CI se produce intracelularmente, debido a un aumento de su concentración en el citoplasma bacteriano, y no durante el proceso de ruptura celular. Los agregados serían segregados hacia los polos de las células, donde se acumulan.

¿Que ocurre con las proteínas sobreproducidas luego de formados los CI? Ya discutimos la influencia de la velocidad de síntesis y degradación de los CI. Por lo tanto, analizaremos su estabilidad intracelular y como influyen las condiciones de rompimiento celular y purificación.

El hecho que las proteínas incluidas en los CI se encuentren más bien en fase sólida nos hizo suponer que éstos serían estables frente a la actividad proteolítica celular. Contrariamente a lo supuesto, los resultados indican que el polipéptido RL-60β8 se degrada en los CI o en una forma soluble producto del intercambio entre el polipéptido que se encuentra en los CI y su forma soluble. Si bien la proteólisis del polipéptido podría ocurrir en la fase soluble, durante cualquiera de los estadios del plegamiento, o cuando el polipéptido se encuentra formando CI, los resultados presentados sugieren que ésta ocurre en los CI, pues la purificación de los CI no elimina la proteólisis. Así, los productos de degradación que se observan en la fracción soluble del polipéptido RL-60β8 en el experimento de estabilidad de los CI podrían provenir de la proteólisis de

los CI. Sin embargo, en un trabajo paralelo a esta Tesis, se observó que existía una actividad proteolítica asociada al polipéptido RL-52 $\alpha$ 3, la cual se activaba en la fase soluble y sólo después que el polipéptido era purificado por cromatografía en una columna de DEAE-celulosa (C. Gómez, R. Lagos y O. Monasterio, datos no publicados). La proteasa parece ser específica para los polipéptidos C-terminal de la tubulina y corta la cadena polipeptídica cuando la secuencia es **Ala-Phe**. Esta secuencia de aminoácidos también se encuentra presente en los polipéptidos C-terminal de  $\beta$ -tubulina que forman CI y cuyo peso molecular es superior a 10000. Por lo tanto, si existe un equilibrio intracelular entre el CI y la forma soluble, ésta última puede sufrir degradación enzimática. Resultados similares se han encontrado para la creatina quinasa que se recupera a partir de los CI en *E. coli*, pues durante el proceso de desnaturalización y renaturalización de la proteína se activa una proteasa que promueve la obtención de la creatina quinasa inactiva (Babbit y col., 1990).

En general, la información sobre actividades proteolíticas asociadas con los CI es escasa, aunque su detección es importante, pues puede ser una complicación para la obtención de algunas proteínas recombinantes en bacterias. Para el caso particular de las tubulinas y sus polipéptidos C-terminal sobreproducidos, es fundamental emplear inhibidores de proteasas en los amortiguadores que se utilizan y no sólo en el amortiguador de lisis inicial, para evitar la proteolisis durante su purificación.

Los resultados mostrados en esta Tesis indican que los CI son estables

frente a detergentes apolares, pero pueden solubilizarse con SDS. La solubilización es diferencial con respecto a algunas proteínas que acompañan al polipéptido C-terminal sobreproducido, lo que indica que los CI no son homogéneos en su composición y que algunas proteínas contaminantes se incorporan a los CI una vez que están formados, confirmando lo señalado por algunos autores para otras proteínas (Hart y col., 1990).

Por último es interesante discutir acerca del criterio de solubilidad de los CI que hemos empleado. Como se dijo anteriormente, la presencia de agregados intracelulares no permite predecir la solubilidad del producto expresado. Por esto, fue necesario analizar con más detalle las células que sobreproducían los polipéptidos expresados. Con este fin, se utilizó microscopía de epifluorescencia, pues la coloración de las células con esta técnica se relaciona con su estado metabólico. Los resultados indican que todas las células que forman CI tienen un estado metabólico distinto al de las células que sobreproducen las proteínas en forma soluble, pues su coloración es diferente. La coloración naranja de las células que forman CI de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina y de polipéptidos C-terminal indica que dichas células están metabólicamente activas; la coloración verde de las células que sobreproducen el polipéptido soluble RL-33 $\beta$ 6, por el contrario, indica que están metabólicamente poco activas (McFeters y col., 1991). Por lo tanto, la consecuencia inmediata de la formación de los CI puede ser la recuperación metabólica de la célula bacteriana, a través de la recuperación parcial de su

homeostasis, debido a que el producto expresado es parte de otra fase (sólida) en el citoplasma bacteriano. Aquellas células que sobreproducen la proteína soluble (por ejemplo, el polipéptido RL-33β6) pueden caer en un estado de inhibición de su crecimiento por interacción inespecífica de los productos expresados con los componentes de la célula. Esto puede llevar, por ejemplo, a una pérdida de los ribosomas (Dong y col., 1995; Kurland y Dong, 1996), situaciones en la cuales el metabolismo es mínimo.

El hecho que las células que sobreproducen polipéptidos con distinto estado de solubilidad adquieran diferente coloración cuando se observan por epifluorescencia permite disponer de un nuevo método, no descrito antes, para conocer la solubilidad de una determinada proteína sobreproducida en *E. coli*. Esta metodología es mucho más rápida (se requieren aproximadamente 10 min. para completar el procedimiento) y da mayor seguridad para el usuario que el empleo de radioactividad, utilizada habitualmente con este propósito.

*Solubilidad de los productos expresados.* Si la agregación de los polipéptidos que forman CI se produce intracelularmente, debido a un aumento de su concentración en el citoplasma bacteriano, y no durante el proceso de ruptura celular, al inhibir la agregación intracelular debería producirse un aumento en la solubilidad. Por esta razón, probamos el efecto de la co-expresión de las chaperoninas GroEL/GroES, que podrían ser limitantes por su baja concentración en la célula, pues se sabe que estas proteínas evitan la

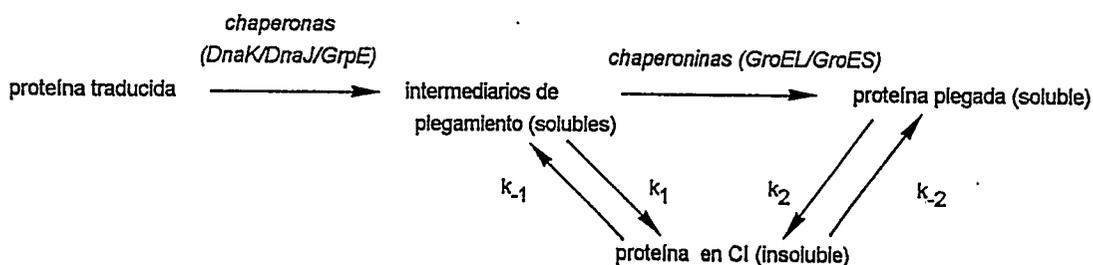
agregación al permitir el plegamiento correcto de la proteína sobreproducida. Nuestros resultados indican que la formación de CI de polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina no parece ser la consecuencia de una carencia de chaperoninas GroEL/GroES, porque la sobreproducción de estas proteínas solubles no modificó la solubilidad de los polipéptidos. Por lo tanto, la alta concentración local de los polipéptidos que se produce durante su traducción masiva, favorece la interacción entre ellos e impide, de este modo, la interacción con GroEL/GroES. Así, la elevada concentración temporal de los polipéptidos C-terminal sería la responsable de la formación de los agregados. Esta afirmación se sustenta en que *in vitro* la tubulina desnaturalizada, a bajas concentraciones, se asocia a GroEL cuando esta chaperonina se encuentra presente en el amortiguador de replegamiento (Phadtare y col., 1994). En dicho estudio, el complejo tubulina-GroEL se retuvo en una columna de afinidad que tenía inmovilizados anticuerpos anti chaperonina GroEL y la tubulina se liberó del complejo al agregar GroES y ATP a la columna.

Se sabe que, *in vivo*, la secuencia natural de asistencia para el plegamiento de proteínas requiere primero de las chaperonas DnaK/DnaJ y luego, de las chaperoninas GroEL/GroES (Hartl y col., 1994). Este hecho permitió a Blum y col., (1992) evitar la formación de CI de la hormona del crecimiento humano sobreproducida en *E. coli* al coexpresar las chaperonas DnaK/DnaJ. Por lo tanto, la carencia de efecto de la co-expresión de los polipéptidos con las chaperoninas GroEL/GroES se puede explicar por la falta

de chaperonas DnaK/DnaJ, pues en ausencia de estas chaperonas, a altas concentraciones del polipéptido, la agregación estaría favorecida con respecto a la interacción proteína-chaperonina GroEL.

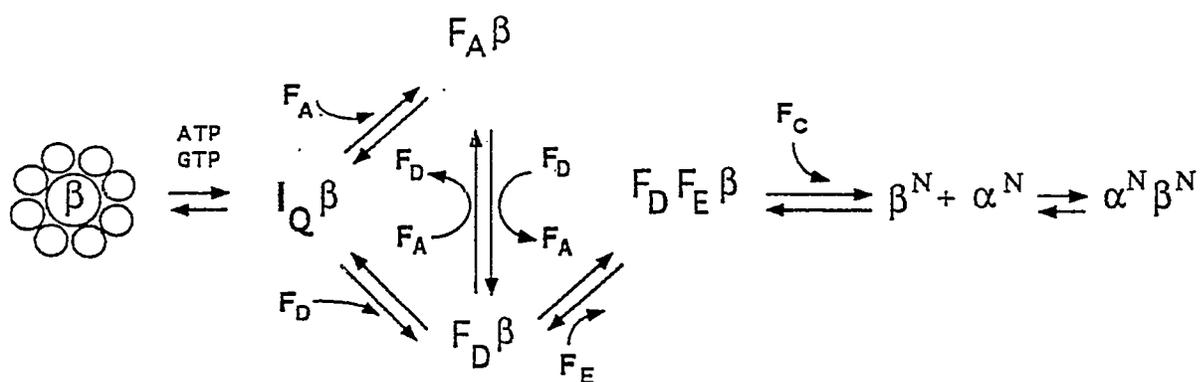
La co-expresión de las chaperonas DnaK/DnaJ no se pudo realizar, pues invariablemente se perdió el plasmidio que codifica para las chaperonas o aquél que codifica para el polipéptido, a pesar que este último plasmidio se modificó por la introducción de un gen que codifica resistencia a kanamicina (L. Barros y R. Lagos, resultados no publicados). Para sobrellevar este problema, se usó el sistema de doble plasmidio que se induce por estrés térmico, pues el aumento de temperatura también induce la expresión de DnaK/DnaJ. Bajo estas condiciones no se produjo un aumento de la fracción soluble de los polipéptidos C-terminal ensayados. De acuerdo con el análisis anterior, se puede concluir que la formación de CI de polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina es independiente de la presencia de chaperoninas GroEL/GroES o de chaperonas DnaK/DnaJ en *E. coli*, bajo nuestras condiciones de ensayo.

En el esquema que se presenta a continuación se resume lo que se ha discutido antes con respecto a la formación de CI de polipéptidos C-terminal de la tubulina en *E. coli*:



De acuerdo con la secuencia de eventos mostrada en el esquema, podemos concluir que los polipéptidos expresados serán insolubles si las constantes  $k_1$  y  $k_2$  son mucho mayores que las constantes inversas  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$ , y viceversa. En el caso de aquellos polipéptidos que se expresan parcialmente solubles, las constantes  $k_1$  y  $k_2$  pueden ser mayores, iguales o menores que las constantes inversas  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$ .

La formación de los CI con los polipéptidos de tubulina se debería a la ausencia en *E. coli* de los factores que participan en su plegamiento en la célula eucarionte, los cuales además son exclusivos para esta proteína. La secuencia de eventos para el plegamiento de  $\beta$ -tubulina en reticulocitos de conejo, tomada del trabajo del grupo de Cowan (Tian y col., 1996), se muestra a continuación:



Donde, IQ $\beta$  es un intermediario de plegamiento, proveniente de la chaperona c-cpn, que inicia la secuencia de eventos de interacción con los factores F hasta interactuar con el monómero de  $\alpha$ -tubulina.

De acuerdo a la hipótesis de Anfinsen (1973), toda la información para el plegamiento correcto de una proteína reside en su secuencia. Por lo tanto, toda proteína debería plegarse en su forma correcta si se encuentra en equilibrio entre la forma desnaturalizada y nativa. Sin embargo, se ha visto que la cinética de plegamiento es fundamental, pues se producen intermediarios que pueden desviar el plegamiento hacia conformaciones no funcionales y con capacidad de agregarse. La formación de agregados sería dependiente del tamaño y de la secuencia de la proteína (Creighton, 1992). Por esto, nos pareció necesario conocer otros factores propios de los polipéptidos C-terminal que pueden contribuir en la formación de los CI. Con este propósito, se analizaron algunos parámetros físico-químicos que tendrían la misma influencia sobre la agregación de proteínas, de acuerdo a lo descrito por Wilkinson y Harrison (1991). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la carga neta promedio, en especial cargas negativas, se correlaciona mejor con la solubilidad de los polipéptidos sobreproducidos en *E. coli* que la fracción de residuos formadores de vuelta, la fracción de residuos de cisteína o la fracción de residuos de prolina. Si bien este resultado es claro, su interpretación debe ser cuidadosa, pues otros investigadores han observado que la composición y secuencia de aminoácidos es más importante que la carga neta promedio. Por

ejemplo, Izard y col. (1995) encontraron que la sustitución del triptofano 140 por fenilalanina, en el extremo C-terminal de la proteína, aumenta la forma insoluble de la colicina A sobreproducida en *E. coli* de un 20 % a un 50 %. Con esta sustitución la carga neta promedio continúa siendo la misma y sólo se ha reemplazado un aminoácido hidrofóbico por otro de similares características. Por lo tanto, en este caso la presencia de un aminoácido en una posición específica resulta ser más importante que la carga, pues al sustituir los residuos de triptofanos 86 o 130 por fenilalanina no se observa ningún efecto sobre la solubilidad de la colicina A (80% soluble). Por otra parte, la sustitución del triptofano 140 por lisina conduce a la agregación casi total de la colicina A (96% insoluble); pero una segunda mutación de la lisina 113 por fenilalanina restituye la solubilidad de la proteína recombinante a niveles cercanos a los de la proteína nativa (83 % soluble), indicando que el triptofano 140 y la lisina 113 son importantes para el plegamiento correcto de la colicina A.

Los resultados anteriores nos permiten concluir que la presencia de chaperonas bacterianas no tiene influencia sobre la solubilidad de los polipéptidos sobreproducidos. La solubilidad depende mayoritariamente de la carga neta de la proteína y en especial de la presencia de cargas negativas.

*Funcionalidad de los productos de expresión.* De acuerdo a uno de los criterios de dominio de una proteína éste debiera ser una región de la cadena peptídica que se pliega de manera independiente del resto de la proteína y conserva sus

propiedades en forma aislada (Creighton, 1992). Los polipéptidos expresados fueron diseñados de acuerdo a los dominios que existirían en la tubulina, definidos por cortes de enzimas proteolíticas, como se explicó en la introducción (de Pereda, 1996). Por esto, si el polipéptido expresado forma un dominio o módulo en la tubulina, éste debiera conservar su función al replegarse. El subclonamiento y expresión en *E. coli* de fragmentos del cDNA de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina nos permitió obtener sólo un polipéptido soluble de la  $\beta$ -tubulina y uno parcialmente soluble de  $\alpha$ -tubulina. Estos polipéptidos resultaron apropiados para estudiar su función y definir su condición de módulo o dominio, pues se estableció un método de purificación a homogeneidad y se les caracterizó como producto de expresión (Aranda, 1994). Estudios de resonancia magnética nuclear bidimensional, proteólisis parcial y dicroísmo circular, muestran que estos polipéptidos C-terminal tendrían la misma estructura secundaria que poseen en el heterodímero (Evangelio, Aranda, Lagos, Andreu y Monasterio, resultados no publicados).

En el heterodímero se han estudiado las características de los extremos C-terminal de tubulina y se sabe que estos participan en la unión de calcio y de las proteínas MAPs (Weisenberg, 1972; Serrano y col., 1986; Mejillano y Himes, 1991). Se ha determinado también que estas interacciones tienen un papel fundamental en la regulación de la formación de los microtúbulos y en su inestabilidad dinámica (para revisión ver Monasterio y col., 1995). En el laboratorio se ha determinado que  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Gd}^{2+}$ , inhiben la polimerización de la

tubulina por inducción de la actividad GTPásica (Soto y col., 1996). No obstante, aún no ha sido posible dilucidar el número de sitios para calcio en el heterodímero y a cual tubulina,  $\alpha$  o  $\beta$ , se une (Monasterio y col., 1995), pues estos estudios se han visto complicados por la presencia de varias isoformas y la imposibilidad de obtener ambos extremos C-terminal, producto de proteólisis parcial del heterodímero, en forma separada.

El uso de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina sobreproducidos en *E. coli*, permitieron contribuir a aclarar esta situación, pues la presencia de sitios de unión de calcio se detectó sólo en polipéptidos de la  $\beta$ -tubulina por tinción con Stains all, hecho que fue coincidente con la presencia de la secuencia aminoacídica de consenso putativa para la unión del metal (Sánchez, 1992). Esta conclusión se vio reforzada por resultados no publicados de nuestro laboratorio (E. Nova y O. Monasterio), que indican que el ión calcio no es capaz de inhibir la actividad GTPásica en el heterodímero  $\alpha\beta$  de tubulina cuando se ha eliminado el extremo C-terminal de  $\beta$ -tubulina mediante tratamiento de la proteína con subtilisina.

La unión del colorante Stains all, sólo a la  $\beta$ -tubulina del heterodímero de cerebro de pollo, confirmó la especificidad de este reactivo por el motivo encontrado para unir calcio en el péptido  $\beta$ . Este resultado necesariamente implica la presencia de un solo sitio de unión en el heterodímero. Por lo tanto, para comprobar esta hipótesis se determinó el número de sitios de unión de calcio en el heterodímero, dada la enorme controversia respecto al número de

sitios de unión de alta afinidad en la tubulina. Nuestros resultados muestran que se unen 1,25 moles de calcio por mol de heterodímero con una constante de afinidad de  $29 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ , muy de acuerdo con lo encontrado por Mejillano y Himes (1991) para tubulina de cerebro de cerdo. Estos resultados son congruentes con la presencia de un solo motivo de unión de calcio de alta afinidad en  $\beta$ -tubulina.

Al repetir los experimentos de Western blot, con calcio radiactivo, realizados por Serrano y col. (1986), también encontramos que tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -tubulina unían calcio, sin embargo, los péptidos C-terminales no unieron calcio. Pensamos que estos resultados se encuentran alterados por un artefacto experimental, producido por la presencia de SDS, pues las proteínas y los péptidos transferidos a membranas de nitrocelulosa fueron separados en geles SDS-PAGE. El efecto se produciría, porque los monómeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina contienen SDS lo que les confiere una elevada carga negativa. Esta carga negativa adicional podría estar uniendo calcio en forma inespecífica. Por otra parte, la falta de unión del metal en los polipéptidos C-terminal, que también han sido tratados con SDS, puede explicarse por un menor contenido de detergente debido a su alta carga negativa intrínseca. En consecuencia, estos polipéptidos tienen disminuida su capacidad de unión inespecífica y, debido a su baja afinidad por calcio, no unirían el catión en el Western blot.

Es interesante mencionar que el polipéptido C-terminal RL-33 $\beta$ 6 unió calcio con muy baja afinidad en experimentos de unión por filtración en geles.

Este resultado nos permite postular que las modificaciones postraduccionales que ocurren en el extremo C-terminal deberían estar involucradas en la unión del catión, pues calcio no se une aunque la cadena peptídica tenga una conformación similar a la que tiene en el heterodímero. Además, los estudios con estos polipéptidos han permitido concluir que existe diferencia entre ellos por su afinidad a proteínas MAPs.

## CONCLUSIONES

1. La formación de CI de  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina y de sus polipéptidos C-terminal sobreproducidos en *E. coli* depende en forma directa de su carga neta negativa promedio y, en forma inversa, de su concentración intracelular.
2. La utilización de Triton X-100 o Nonidet P-40 en el amortiguador de ruptura celular, con concentraciones normales de sales (100 mM), disminuye la solubilidad de los polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina. La adición de NaCl 1 M en el amortiguador de ruptura suprime el efecto de estos detergentes.
3. La formación de CI de polipéptidos C-terminal de  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina no se modifica por la co-expresión *in vivo* de los polipéptidos con chaperoninas GroEL/GroES, la inducción de chaperonas moleculares DnaK/DnaJ, el empleo de bajas temperaturas para la expresión de los polipéptidos o el uso de diferentes cepas bacterianas.

## PROYECCIONES

Los resultados presentados indican que es posible clonar y expresar, en forma soluble o parcialmente soluble, dominios de una sola iso-especie de  $\alpha$ - o  $\beta$ -tubulina en *E. coli*. Los polipéptidos obtenidos han permitido iniciar estudios para dilucidar el papel que pueden cumplir la  $\alpha$ - o la  $\beta$ -tubulina en el proceso de polimerización del heterodímero  $\alpha\beta$  en microtúbulos. Estos polipéptidos también permitirán establecer la localización del sitio de unión de la molécula de GTP intercambiable a la tubulina, una vez que se optimicen los métodos para su replegamiento y poder contar con preparaciones purificadas (Patricio Rodríguez, Tesis de Doctorado). Por otra parte, el disponer de una batería de polipéptidos de la tubulina purificados a homogeneidad, permite proyectar estudios de competencia *in vivo*, por microinyección de los polipéptidos a células en cultivo, lo que dará información sobre el papel que puede tener la proteína en los diversos procesos fisiológicos. Otro aspecto que se puede abordar es el estudio de la influencia de algunos aminoácidos en su estructura y función, por mutagenesis sitio dirigida.

En síntesis, el clonamiento y expresión de una iso-especie de tubulina en *E. coli* es una contribución importante para el estudio de esta proteína, pues permitirá precisar la información disponible en relación con la estructura y función de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen, S.P.; Polazzi, J.O.; Gierse, J.K. y Easton, A.M. 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 6938-6947.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Aranda, C. 1994. Síntesis en *Escherichia coli*, purificación, caracterización estructural y funcional de un péptido carboxilo terminal de  $\beta$ -tubulina de pollo. Tesis para optar al Título de Bioquímico, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción.
- Babbitt, P.C.; West, B.L.; Buechter, D.D.; Kuntz, I.D. y Kenyon, G.L. 1990. Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in *Escherichia coli* leads to improved recovery of active enzyme. *Bio/Technology* **8**: 945-949.
- Basu, M.; Dharm, E.; Levine, J.F.; Kramer, R.A.; Crowl, R.M. y Campbell, R.M. 1991. Expression of growth hormone-releasing factor analog Leu<sup>27</sup>(1-44) OH in *Escherichia coli*: purification and characterization of the expressed protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 638-644.
- Beese, L.; Stubbs, G. y Cohen, C. 1987. Microtubule structure at 18 Å

- resolution. *J. Mol. Biol.* **194**: 257-264.
- Bell, A.; Wernli, B. y Franklin, R.M. 1995. Expression and secretion of malarial parasite  $\beta$ -tubulin in *Bacillus brevis*. *Biochimie* **77**: 256-261.
- Blum, P.; Velligan, M.; Lin, N. y Matin, A. 1992. DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Bio/technology* **10**: 301-304.
- Buchner, J. y Rudolph, R. 1991. Renaturation, purification and characterization of recombinant F<sub>ab</sub>-fragments produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **9**: 157-162.
- Campbell, K.P.; MacLennan, D.H. y Jorgensen, A.O. 1983. Staining of the Ca<sup>++</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains all". *J. Biol. Chem.* **258**: 11267-11273.
- Chalmers, J.J.; Kim, E.; Telford, J.N.; Wong, E.Y.; Tacon, W.C.; Shuler, M.L. y Wilson, D.B. 1990. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing  $\beta$ -lactamase or human epidermal growth factor. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**: 104-111.
- Chrnyk, B.A.; Evans, J.; Lillquist, J.; Young, P. y Wetzel, R. 1993. Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin-1 beta. *J. Biol. Chem.* **268**: 18053-18061.
- Cole, S.T.; Sonntag, I. y Henning, U. 1982. Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein

- OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **149**: 145-150.
- Cowan, N.; Dobner, P.; Fuchs, E. y Cleveland, D. 1983. Expression of human  $\alpha$ -tubulin genes: interspecies conservation of 3'-untranslated regions. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1738-1745.
- Craig, E.A.; Gambill, B.D. y Nelson, R.J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 402-414.
- Creighton, T.E. (ed.). 1992. *Folding Protein*. W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A.
- Darby, N.J. y Creighton, T.E. 1990. Folding proteins. *Nature* **344**: 715-716.
- De la Viña, S.; Andreu, D.; Medrano, F.J.; Nieto, J.M. y Andreu, J.M. 1988. Tubulin structure probed with antibodies to synthetic peptides. Mapping of three major types of limited proteolysis fragments. *Biochemistry* **27**: 5352-5365.
- De Pereda, J.M. y Andreu, J.M. 1996a. Mapping surface sequences of the tubulin dimer and taxol-induced microtubules with limited proteolysis. *Biochemistry* **35**: 14184-14202.
- De Pereda, J.M.; Leynadier, D.; Evangelio, J.A.; Chacón, P. y Andreu, J.M. 1996b. Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites, and homology to FtsZ. *Biochemistry* **35**: 14203-14215.
- Dong, H.; Nilsson, L. y Kurland, C.G. 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J.*

- Bacteriol. **177**: 1497-1504.
- Dunderdale, H.J., Sharples, G.J., Lloyd, R.G. y West, S.C. 1994. Cloning, overexpression, purification y characterization of the *Escherichia coli* Ruv holliday junction resolvase. J. Biol. Chem. **269**: 5187-5194.
- Erickson, H.P. 1995. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin?. Cell **80**: 367-370.
- Erickson, H.P. y O'Brien, E.T. 1992. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **21**: 145-166.
- Ellis, J. 1992. Cytosolic chaperonin confirmed. Nature **358**: 191-192.
- Evangelio, J.A. 1995. Características físico-químicas y potencial alfa-hélicoidal de fragmentos C-terminales de  $\alpha$  y  $\beta$  -tubulina. Tesis de grado de licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Ewbank, J.J. y Creighton, T.E. 1992. Protein folding by stages. Curr. Biol. **7**: 347-349.
- Fernández-Patrón, C.; Castellanos-Serra, L. y Rodríguez, P. 1992. Reverse staining of Sodium Dodecyl Sulphate polyacrylamide gels by Imidazole-Zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. Bio/Techniques **12**: 564-573.
- Frankel, S.; Sohn, R. y Leinwand, L. 1991. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 1192-1196.
- George, H.J.; Misra, L; Field, D.J. y Lee, J.C. 1981. Polymorphism of brain

- tubulin. *Biochemistry* **20**: 2402-2409.
- Georgopoulos, C. 1992. The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem. Sc.* **17**: 295-299.
- Goloubinoff, P.; Gatenby, A.A. y Lorimer, G.H. 1989. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337**: 44-47.
- González, C.; Lagos, R. y Monasterio, O. 1996. Recovery of soluble protein after expression in *Escherichia coli* depends on cellular disruption conditions. *Microbios* **85**: 205-212.
- Graham, L.L.; Harris, R.; Villiger, W. y Beveridge, T.J. 1991. Freeze-substitution of Gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J. Bacteriol.* **173**: 1623-1633.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. **En** DNA cloning: a practical approach, vol. I. Glover, D.M. (ed.), pp. 109-135. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Hart, R.A.; Rinas, U. y Bailey, J. 1990. Protein composition of the *Vitreoscilla* hemoglobin inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 12728-12733.
- Hartl, F.-U.; Hlodan, R. y Langer, T. 1994. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sc.* **19**: 20-25.
- Hartl, F.U. y Martin, J. 1992. Protein folding in the cell: the role of molecular

- chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 293-322.
- Hemmingsen, S.M.; Woolford, C.; van der Vies, S.M.; Tilly, K.; Dennis, D.T.; Georgopoulos, C.P.; Hendrix, R.G. y Ellis, R.J. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**: 330-334.
- Holland, I.B.; Kenny, B., Steipe, B. y Plückthun, A. 1990. Secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **182**: 132-143.
- Horwich, A.L.; Low, K.B.; Fenton, W.A.; Hirshfield, I.N. y Furtak, K. 1993. Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* **74**: 909-917.
- Howell, M.L. y Blumenthal, K.M. 1989. Cloning and expression of a synthetic gene for *Cerebratulus lacteus* neurotoxin B-IV. *J. Biol. Chem.* **264**: 15268-15273.
- Hubbard, M.J. 1993. Rapid purification and direct microassay of calbinding 9 kDa utilizing its solubility in perchloric acid. *Biochem. J.* **293**: 223-227.
- Izard, J.; Parker, M.W., Chartier, M.; Duché, D. y Baty, D. 1994. A single amino acid substitution can restore the solubility of aggregated colicin A mutants in *Escherichia coli*. *Prot. Engineer.* **7**: 1495-1500.
- Keeling, P.J. y Doolittle, W. Ford. 1996. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.* **13**:

1297-1305.

- King, D.J.; Byron, O.D.; Mountain, A.; Weir, N.; Harvey, A.; Lawson, A.D.G.; Proudfoot, K.A.; Baldock, D.; Harding, S.E.; Yarranton, G.T. y Owens, R.J. 1993. Expression, purification and characterization of B72.3 Fv fragments. *Biochem. J.* **290**: 723-729.
- Kleid, D.G.; Yansura, D.; Small, B.; Dowbenko, D.; Moore, D.M.; Grubman, M.J.; McKercher, P.D.; Morgan, D.O.; Robertson, B.H. y Bachrach, H.L. 1981. Cloned viral protein vaccine for foot and mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* **214**: 1125-1129.
- Knappik, A. y Plückthun, A. 1995. Engineered turns of a recombinant antibodies improve its *in vivo* folding. *Prot. Engineer.* **8**: 81-89.
- Kronheim, S.R.; Cantrell, M.A.; Deeley, M.C.; March, C.J.; Glackin, P.J.; Anderson, D.M.; Hemenway, T.; Merriam, J.E.; Cosman, D y Hopp, P. 1986. Purification and characterization of human interleukin-1 expressed in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **4**: 1078-1082.
- Kurland, C.G. y Dong, H. 1996. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Mol. Microbiol.* **21**: 1-4.
- La Valle, E.R.; Di Blasio, E.A.; Kovacic, S.; Grant, K.L.; Schendel, P.F. y McCoy, J.M. 1994. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvent inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* **11**: 187-193.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the

- head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Lagos, R.A. 1985. Propagación del bacteriofago P4 como un plasmidio. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.
- Langridge, J.; Langridge, P. y Bergquist, P.L. 1980. Extraction of nucleic acids from agarose gels. *Anal. Biochem.* **103**: 264-271.
- Lewis, S.A.; Gu, W. y Cowan, N.J. 1987. Free intermingling of mammalian  $\beta$ -tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* **49**: 539-548.
- Lewis, V.A.; Hynes, G.M.; Zheng, D.; Saibil, H. y Willison, K. 1992. T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heterodimeric particle in the eukaryotic cytosol. *Nature* **358**: 249-252.
- Liao, H.H. 1991. Effect of temperature on the expression of wild-type and thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Pur.* **2**: 43-50.
- Liu, S.-Y.; Wiegel, J. y Gherardini, F.C. 1996. Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489. *J. Bacteriol.* **178**: 5938-5945.
- Ludueña, R., Banerjee, A. y Khan, I.A. 1992. Tubulin structure and biochemistry. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 53-57.
- Makrides, S. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in

- Escherichia coli*. Microbiol. Rev. **60**: 512-538.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (eds.). 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Marks, C.B.; Vasser, M.; Ng, P.; Henzel, W. y Anderson, S. 1986. Production of native correctly folded bovine pancreatic trypsin inhibitor by *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **261**: 7115-7118.
- Martin, J.; Mayhew, M.; Langer, T. y Hartl, U. 1993. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. Nature **366**: 228-233.
- Marston, F.A.O. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem. J. **240**: 1-12.
- McFeters, G.A.; Singh, A.; Byun, S.; Callis, P.R. y Williams, S. 1991. Acridine orange staining as an index of physiological activity in *Escherichia coli*. J. Microbiol. Methods **13**: 87-97.
- Mejillano, M.R. y Himes, R. 1991. Assembly properties of tubulin after carboxyl group modification. J. Biol. Chem. **266**: 657-664.
- Mena, M.; Morales, D.; Medina, C. y Monasterio, O. 1995. Abstract 68, XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Viña del Mar.
- Miller, C.G. 1987. Protein degradation and proteolytic modification. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology, vol 1. Neidhardt, F.C.; Ingraham, J.L.; Brooks, L.; Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, E. (eds.). Pp. 680-691. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Mitraki, A.; Fane, B.; Haase-Pettingell, C.; Sturtevant, J. y King, J. 1991. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* **253**: 54-58.
- Mitraki, A. y King, J. 1989. Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio/Technology* **7**: 690-697.
- Monasterio, O.; Andreu, J.M. y Lagos, R. 1995. Tubulin structure and function. *Comm. Mol. Cell. Biophys.* **8**: 273-306.
- Monasterio, O. y Soto, C. 1990. Mecanismo de la depolimerización de microtúbulos por calcio. *Arch. Biol. Med. Exp.* **23** R-391.
- Nogales, E.; Wolf, S.G.; Khan, I.A.; Ludueña, R.F. y Downing, K.H. 1995. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* **375**: 424-427.
- Orsini, G.; Brandazza, A.; Sarmientos, P.; Molinari, A.; Larsen, J. y Cauet, G. 1991. Efficient renaturation and fibrinolytic properties of prourokinase and a deletion mutant expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* **195**: 691-697.
- Ostermann, J.; Horwich, A.L.; Neupert, W. y Hartl, F.-U. 1989. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* **341**: 125-130.
- Paciucci, R. 1994. Role of 300 KDa complexes as intermediates in tubulin folding and dimerization: characterization of a 25 KDa cytosolic protein involved in the GTP-dependent release of monomeric tubulin. *Biochem.*

J. **301**: 105-110.

- Penefsky, H. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **252**: 2891-2899.
- Penque, D.; Galego, L. y Rodrigues-Pousada, C. 1991. Multiple  $\alpha$ -tubulin isoforms in cilia and cytoskeleton of *Tetrahymena pyriformis* generated by post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **195**: 487-494.
- Phadtare, S.; Fisher, M.T. y Yarbrough, L.R. 1994. Refolding and release of tubulins by a functional immobilized groEL column. *Biochim. Biophys. Acta* **1208**: 189-192.
- Power, R.F.; Conneely, O.M.; McDonnell, D.P.; Clark, J.H.; Butt, T.R.; Schrader, W.T. y O'Malley, B.W. 1990. High level expression of truncated chicken progesterone receptor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 1419-1424.
- Prouty, W.F.; Karnovsky, M.J. y Goldberg, A.L. 1975. Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**: 1112-1122.
- Puri, N.K.; Crivelli, E.; Cardamone, M.; Fiddes, R.; Bertolini, J.; Ninham, B. y Brandon, M.R. 1992. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *Biochem. J.* **285**: 871-879.
- Rinas, U.; Tsai, L.B.; Lyons, D.; Fox, G.M.; Stearns, G.; Fieschko, J.; Fenton, D. y Bailey, J.E. 1992. Cysteine to serine substitutions in basic fibroblast growth factor: effect on inclusion body formation and proteolytic susceptibility during *in vitro* refolding. *Bio/Technology* **10**: 435-440.

- Rodríguez, P.H.; Monasterio, O. y Weber, G. 1996. Use of homogeneous electronic energy transfer to observe dissociation and subunit exchange in the  $\alpha\beta$  tubulin dimer. VIII Congreso PABMB, Abstract 217. Pucón, Chile.
- Sánchez, R. 1992. Clonamiento, síntesis en *Escherichia coli*, purificación y caracterización de un péptido carboxilo terminal de la subunidad alfa de tubulina humana. Tesis para optar al Título de Bioquímico, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción.
- Sánchez, M.A., Peattie, D.A., Wirth, D. y Orozco, E. 1994. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica*  $\alpha$ -tubulin-encoding gene. *Gene* **146**: 239-244.
- Schägger, H. y von Jagow, G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schein, C.H. 1989. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**: 1141-1147.
- Schein, C.H. 1990. Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Bio/Technology* **8**: 308-317.
- Schein, C.H. y Noteborn, M.H. 1988. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* **6**: 291-294.
- Schmidt, M. y Buchner, J. 1992. Interaction of GroE with all- $\beta$ -protein. *J. Biol.*

- Chem. **267**: 16829-16833.
- Serrano, L.; Valencia, A.; Caballero, R. y Avila, J. 1986. Localization of the high affinity calcium-binding site on tubulin molecule. J. Biol. Chem. **261**: 7076-7081.
- Sivaprasadarao, A. y Findlay, J.B. 1993. Expression of functional human retinol-binding protein in *Escherichia coli* using a secretion vector. Eur. J. Biochem. **296**: 209-215.
- Soto, C.A. 1993. Mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina y despolimerización de microtúbulos por calcio. Tesis de Doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Soto, C.; Rodríguez, P. y Monasterio, O. 1996. Calcium and Gadolinium ions stimulate the GTPase activity of purified chicken brain tubulin through a conformational change. Biochemistry **35**: 6337-6344.
- Stader, J.A. y Silhavy, T.J. 1990. Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. Methods Ezymol. **185**: 166-187.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189**: 113-130.
- Sturtevant, J.M.; Yu, M.; Haase-Pettingell, C. y King, J. 1989. Thermostability of temperature-sensitive folding mutants of the P22 tailspike protein. J. Biol. Chem. **264**: 10693-10698.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/

- promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 1074-1078.
- Takamatsu, H.; Itoh, M.; Kimura, M.; Gospodarowicz, D. y Amann, E. 1992. Expression and purification of biologically active human OSF-1 in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **185**: 224-230.
- Thomas, J.G. y Baneyx, F. 1996. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. J. Biol. Chem. **271**: 11141-11147.
- Tian, G.; Huang, Y.; Rommelaere, H.; Vandekerckhove, J.; Ampe, C. y Cowan, N.J. 1996. Pathway leading to correctly folded  $\beta$ -tubulin. Cell **86**: 287-296.
- Tian, G.; Vainberg, I.E.; Tap, W.D.; Lewis, S.A. y Cowan, N.J. 1995a. Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. J. Biol. Chem. **270**: 23910-23913.
- Tian, G.; Vainberg, I.E.; Tap, W.D.; Lewis, S.A. y Cowan, N.J. 1995b. Specificity in chaperonin-mediated protein folding. Nature **375**: 250-253.
- Tilly, K.; Murialdo, H. y Georgopoulos, C. 1981. Identification of a second *Escherichia coli groE* gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. Proc. Ntl. Acad. Sc. USA **78**: 1629-1633.
- Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.

- Travers, A.A.; Ner, S.S. y Churchill, E.A. 1994. DNA chaperones: a solution to persistence problem?. *Cell* **77**: 167-169.
- Trent, J.D.; Nimmegern, E.; Wall, J.S.; Hartl, F.-U. y Horwich, A.L. 1991. A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature* **354**: 490-493.
- Valenzuela, P.; Quiroga, M.; Zaldivar, J.; Rutter, W.J.; Kirschner, M.W. y Cleveland, D.W. 1981. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin mRNAs. *Nature* **289**: 650-655.
- Veeraragavan, K. 1989. Studies on two major contaminating proteins of the cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**: 149-152.
- Viitanen, P.V.; Gatenby, A.A. y Lorimer, G.H. 1992. Purified chaperonin 60 (GroE) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Prot. Sc.* **1**: 363-369.
- Wang, P.; Denoya, C.D.; Morgenstern, M.R.; Skinner, D.D.; Wallace, K.K.; Digate, R.; Patton, S.; Banavall, N.; Schuler, G., Speedie, M.K. y Reynolds, K.A. 1996. Cloning and characterization of the gene encoding 1-cyclohexenylcarbonyl coenzyme A reductase from *Streptomyces collinus*. *J. Bacteriol.* **178**: 6873-6881.
- Weisenberg, R.C. 1972. Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentration. *Science* **177**: 1104-1105.
- Wilkinson, D.L. y Harrison, R.G. 1991. Predicting the solubility of recombinant

- proteins in *Escherichia coli*. *BioTechnology* **9**: 443-448.
- Wingender, E.; Bercz, G.; Blöcker, H.; Frank, R. y Mayer, H. 1989. Expression of human parathyroid hormone in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 4367-4373.
- Wu, J. y Yarbrough, L.R. 1987. Expression of the alpha and beta tubulin genes of the African trypanosome in *Escherichia coli*. *Gene* **61**: 51-62.
- Yaffe, M.B.; Farr, G.W.; Miklos, D.; Horwich, A.L.; Sternlicht, M.L. y Sternlicht, H. 1992. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* **358**: 245-248.
- Yaffe, M.B.; Farr, G.W. y Sternlicht, H. 1988a. Translation of  $\beta$ -tubulin mRNA *in vitro* generates multiple molecular forms. *J. Biol. Chem.* **263**: 16023-16031.
- Yaffe, M.B.; Farr, G.W. y Sternlicht, H. 1989. Kinetics of  $\beta$ -tubulin exchange following translation. *J. Biol. Chem.* **264**: 19045-19051.
- Yaffe, M.B.; Levison, B.S.; Szasz, J. y Sternlicht, H. 1988b. Expression of human  $\alpha$ -tubulin: properties of the isolated subunit. *Biochemistry* **27**: 1869-1880.
- Yaffe, M.B.; Szasz, J. y Sternlicht, H. 1986. Expression of a human  $\alpha$  tubulin gene in *E. coli*. *J. Cell. Biol.* **103**: 103a.
- Yamada, K.; Sakane, F.; Matsushima, N. y Kanoh, H. 1997. EF-hand motifs of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms of diacylglycerol kinase bind calcium with different affinities and conformational changes. *Biochem. J.* **321**: 59-64.