

UCH-FC

DOC-B

5718

**MECANISMO DE INHIBICION DE LA POLIMERIZACION DE TUBULINA
Y DESPOLIMERIZACION DE MICROTUBULOS POR CALCIO**

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

Claudio Alex Soto Jara

Marzo de 1993

Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo.

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Claudio Alex Soto Jara

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para la obtención del grado de Doctor en Ciencias.

Director de Tesis

Dr. Octavio Monasterio

Octavio Monasterio

Comisión Informante de Tesis

Dra. Catherine Connelly

Dra. Cecilia Hidalgo

Dr. Jorge Babul

Dr. Emilio Cardemil

Catherine Connelly
Cecilia Hidalgo
Jorge Babul
Emilio Cardemil

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Octavio Monasterio.

Dedico esta tesis a la
persona más importante
de mi vida: Dios

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a algunas personas que generosamente me brindaron su ayuda y que contribuyeron de una u otra manera a mi crecimiento como persona y como profesional.

En primer término, deseo agradecer al Dr. Octavio Monasterio por su valioso aporte a mi formación como científico, pues su gran creatividad, rigurosidad y perseverancia fueron un ejemplo permanente y un motivo de superación personal.

Deseo también reconocer muy especialmente la enorme importancia de mis padres en todos los logros que hasta ahora he podido obtener. Sin duda la enseñanza y el amor que ellos me han entregado es uno de los pilares fundamentales sobre los que siempre me he apoyado. Así mismo quiero agradecer a mi esposa y a mi hija por ser mi refugio y mi inspiración y porque siempre he contado con su ayuda en los momentos difíciles.

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Herman Niemeyer F. porque su destacada personalidad y vocación marcaron de manera importante mi formación profesional. Así también no puedo dejar de agradecer a los Dres. Jorge Babul, Tito Ureta, Rosalba Lagos y Mario Roseblatt, porque gracias a sus comentarios y críticas, siempre constructivas, contribuyeron al enriquecimiento de esta tesis.

Deseo también agradecer a Fundación Andes, no sólo por su importante ayuda económica, sino también por haberme

otorgado el orgullo de ser un becario de esta prestigiosa institución.

Finalmente quisiera expresar mi agradecimiento a Marcelo Antonelli, Eliana Rabajille, Carlos González, Juan Carlos Torres, Roberto Sanchez y Paula Schimdt, por la valiosa amistad que me entregaron y porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme desinteresadamente.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	10
I MATERIALES.....	10
Reactivos.....	10
Material Cromatográfico.....	10
Material Biológico.....	11
II METODOS.....	11
Preparación de la tubulina.....	11
Determinación de la concentración de proteínas y péptidos.....	14
Preparación de [γ - ³² P]-GTP.....	15
Medición de la actividad GTPásica de la tubulina.....	15
Ensayos de polimerización.....	16
Estudios de unión de Ca ²⁺	17
Análisis de los datos de unión.....	18
Preparación de los cloruros de lantánidos.....	18
Resonancia paramagnética electrónica.....	19
Espectroscopía ultravioleta diferencial.....	19
Aislación y caracterización de los fragmentos de tubulina que unen calcio con alta afinidad.....	20
Resonancia magnética nuclear.....	26

	Pág.
RESULTADOS.....	27
RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD GTPásica DE TUBULINA INDUCIDA POR CALCIO Y LA POLIMERIZACION Y DESPOLIMERIZACION DE MICROTUBULOS.....	27
Efecto de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica de la tubulina.....	27
Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica y sobre la inhibición de la polimerización....	32
Ca^{2+} inhibe la polimerización de tubulina en presencia de análogos no hidrolizables de GTP.....	36
Relación entre el mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina por Ca^{2+} y la actividad GTPásica inducida por el catión.....	38
Efecto de Ca^{2+} sobre microtúbulos incubados con un análogo de P_i	41
CARACTERIZACION DE LOS SITIOS DE UNION DE Ca^{2+} EN LA TUBULINA.....	44
Unión de Ca^{2+} a la tubulina.....	44
Influencia de Ca^{2+} sobre la formación de agregados de tubulina.....	51
Correlación entre la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad y la inhibición de la polimerización.....	59
Efecto de la unión de Ca^{2+} sobre la conformación de la tubulina.....	61
Sondas análogas de Ca^{2+} para estudiar las características de los sitios de unión de Ca^{2+}	64
DISCUSION.....	92
ANEXO 1. Procedimiento para asignar las señales en un espectro de 1H -NMR.....	108
LISTA DE REFERENCIAS.....	113

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Composición de aminoácidos de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina obtenidos mediante digestión con subtilisina.....	25
Tabla II. Comparación de los valores de los parámetros de unión y de ajuste obtenidos al ajustar a los puntos experimentales a curvas con o sin cooperatividad positiva.....	49
Tabla III. Parámetros de unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad en la tubulina obtenidos a través de dos métodos alternativos.....	53
Tabla IV. Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la formación de agregados de tubulina.....	56
Tabla V. Efecto de la concentración de tubulina sobre el coeficiente de Hill para la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad en la tubulina.....	58
Tabla VI. Constantes de semisaturación para distintas funciones del calcio en la tubulina.....	60
Tabla VII. Efecto de europio, gadolinio, neodimio y terbio sobre la despolimerización de microtúbulos preformados.....	67
Tabla VIII. Valores de la constante de disociación aparente (K_d), el número de sitios (n) y el coeficiente de Hill (h) para Ca^{2+} y Gd^{3+} determinado por diferentes métodos.....	76
Tabla IX. Posición en que aparecen los diferentes protones provenientes de los distintos aminoácidos en solución, en un espectro de $^1\text{H-NMR}$	109

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modelos de la estructura de la tubulina.....	2
Figura 2. Representación esquemática del extremo de un microtúbulo en presencia de GTP.....	5
Figura 3. Filtración en Fractogel TSK HW40 de las fracciones eluidas con NaCl 0,5 M de una columna de DEAE-celulosa, proveniente de una digestión con subtilisina libre.....	23
Figura 4. Actividad GTPásica asociada a cada una de las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-300....	28
Figura 5. Estimulación de la actividad GTPásica de tubulina por Ca^{2+}	30
Figura 6. Efecto de la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la velocidad de hidrólisis de GTP asociada a tubulina.....	31
Figura 7. Influencia de la concentración de tubulina sobre la hidrólisis de GTP.....	33
Figura 8. Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica (A), sobre la inhibición de la polimerización (B) y sobre la despolimerización (C) de microtúbulos.....	35
Figura 9. Efecto de Ca^{2+} sobre la polimerización de tubulina en presencia de GTP(τ S).....	37
Figura 10. Efecto del agente quelante EGTA sobre la reversión de la inhibición de la polimerización de tubulina por Ca^{2+}	40
Figura 11. Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la despolimerización de microtúbulos incubados con AlF_4^- , un análogo estructural de P_i	45
Figura 12. Curva de saturación de la tubulina con Ca^{2+} , determinada por el método de micropartición.....	46
Figura 13. Gráfica de Scatchard para los resultados mostrados en la figura 12.....	47
Figura 14. Curva de saturación de la tubulina con Ca^{2+} obtenida a través del método de Penefsky.....	52
Figura 15. Perfil de elución de tubulina desde una columna de Fractogel TSK HW 55 en ausencia o en presencia de Ca^{2+}	55

	Pág.
Figura 16. Espectros ultravioleta diferenciales de tubulina en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+}	62
Figura 17. Efecto de europio, gadolinio, neodimio y terbio sobre la polimerización de tubulina.....	65
Figura 18. Efecto de la concentración de Gd^{3+} y Tb^{3+} sobre la actividad GTPásica de tubulina.....	69
Figura 19. Efecto de gadolinio sobre la actividad GTPásica.....	71
Figura 20. Espectro de EPR de gadolinio en ausencia y en presencia de distintas cantidades de tubulina.....	72
Figura 21. Curva de saturación para la unión de Gd^{3+} a tubulina.....	74
Figura 22. Desplazamiento de Gd^{3+} unido a tubulina por Ca^{2+}	77
Figura 23. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para la tubulina en ausencia y en presencia de Gd^{3+} 50 μM	80
Figura 24. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina.....	83
Figura 25. Región alifática del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina.....	84
Figura 26. Región aromática del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina.....	86
Figura 27. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina en presencia de Gd^{3+}	87
Figura 28. Comparación entre los espectros de NMR de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina, en ausencia y en presencia de Gd^{3+}	89
Figura 29. Efecto de calcio sobre el espectro de NMR del complejo péptidos- Gd^{3+}	90
Figura 30. Estructura primaria y secundaria de los últimos 40 aminoácidos de las subunidades alfa y beta de tubulina de cerebro de pollo.....	102
Figura 31. Modelo de trabajo para explicar la acción de calcio sobre la tubulina y sobre los microtúbulos...	103

Figura 32. Distribución de los corrimientos químicos para los diferentes protones de los 20 aminoácidos más comunes, en 70 proteínas.....	111
Figura 33. Distribución de los corrimientos químicos para el protón unido al carbono α de los distintos aminoácidos en α -hélices y láminas β	112

Lista de Abreviaturas

Arsenazo III,	ácido arsónico 2,2'-[1,8-Dihidroxi-3,6-disulfo-2,7-naftaleno-bis(azo)dibenceno]
DMSO,	dimetil sulfóxido
EDTA,	ácido (etilendinitrilo) tetra acético
EGTA,	ácido etilenbis (oxietilenenitrilo) tetra acético
EPR,	resonancia paramagnética electrónica
GTP(γ S),	guanosina 5'-(γ -tiotri-fosfato)
MAPs,	proteínas asociadas a microtúbulos
MES,	ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico
NMR,	resonancia magnética nuclear
PIPES,	piperazina-N,N'-bis-(ácido 2-etanosulfónico)
P _i ,	fosfato inorgánico
PMSF,	Fenilmetilsulfonilfluoruro
SDS,	dodecil sulfato de sodio
Tris,	Tris (hidroximetil) aminometano

RESUMEN

La regulación de la polimerización de la tubulina para dar origen a los microtúbulos ha sido extensivamente estudiada, tanto in vivo como in vitro. Sin embargo, aún no se conoce este proceso completamente. Diversos agentes han sido involucrados en esta regulación, entre ellos el ión bivalente calcio, el cual inhibe la polimerización de la tubulina e induce la despolimerización de los microtúbulos previamente formados, in vitro. El mecanismo de acción del Ca^{2+} no se conoce a nivel molecular. En este trabajo se descubrió que la unión de Ca^{2+} a la tubulina induce su actividad GTPásica y el objetivo de esta tesis fue investigar la participación de la hidrólisis del GTP en el mecanismo de regulación de la polimerización de tubulina y despolimerización de microtúbulos, inducida por Ca^{2+} . Con este propósito se analizó específicamente la relación entre la hidrólisis del GTP unido a tubulina y la inhibición de la polimerización de tubulina y despolimerización de microtúbulos por Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que Ca^{2+} estimula significativamente la actividad GTPásica de tubulina en solución, medida por la liberación de P_i radiactivo desde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$. Esta estimulación es específica para Ca^{2+} , pues otros iones no presentaron este efecto, el cual tampoco es debido a la agregación de la proteína. La estimulación de la actividad GTPásica de la tubulina ocurre en el mismo intervalo de concentraciones

(entre 0,1 y 3,0 mM) en que Ca^{2+} inhibe la polimerización de tubulina y ambos procesos son debidos, probablemente, a la unión del catión a 2 sitios de alta afinidad en la tubulina. La unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad provocaría un cambio conformacional en la molécula de tubulina, el cual se manifiesta como un cambio en las propiedades espectrales de la tubulina en la región UV. En este estado conformacional, inducido por la unión de Ca^{2+} , se induce la hidrólisis del GTP de la tubulina y ésta es incapaz de formar microtúbulos.

Con respecto al efecto de Ca^{2+} sobre la despolimerización de los microtúbulos, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren una estrecha relación entre la liberación de P_i desde los extremos de los microtúbulos y su despolimerización. Lo anterior, debido a que microtúbulos incubados en presencia de AlF_4^- , que actúa como análogo estructural de P_i y que se une con mayor afinidad a su sitio en la tubulina, son menos sensibles al efecto despolimerizante de Ca^{2+} .

Para investigar la naturaleza del cambio conformacional inducido por la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad en la tubulina, se realizaron estudios de NMR de péptidos correspondientes a las regiones carboxilo-terminales de ambas subunidades de la tubulina, pues se ha descrito que en esta zona se ubicarían los sitios de alta afinidad para Ca^{2+} . Para estos estudios se utilizó el lantánido paramagnético gadolinio, el cual se demostró en esta tesis que actúa como análogo estructural y funcional de Ca^{2+} ,

pues inhibe la polimerización de la tubulina, despolimeriza los microtúbulos y estimula la actividad GTPásica de tubulina de manera similar a Ca^{2+} . Por otra parte, estudios de unión de Gd^{3+} a tubulina realizados a través de resonancia paramagnética electrónica, indican que Gd^{3+} , al igual que Ca^{2+} , se une cooperativamente a 2 sitios de alta afinidad y aproximadamente a 10 sitios de baja afinidad. Además, ambos iones compiten por la unión a los sitios de alta y de baja afinidad en la tubulina. A pesar de las limitaciones que tiene el uso de una población heterogénea de péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina, los estudios de NMR permiten concluir que los sitios de unión de alta afinidad para Gd^{3+} , y eventualmente para Ca^{2+} , se encontrarían en las regiones carboxilo-terminales de tubulina.

Los resultados obtenidos en esta tesis, permiten proponer un modelo para el mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina y despolimerización de los microtúbulos por Ca^{2+} . El modelo sugiere que Ca^{2+} inhibe la polimerización de la tubulina uniéndose cooperativamente a dos sitios de alta afinidad ubicados en las regiones carboxilo-terminales de la tubulina. Esta unión provoca un cambio conformacional en la molécula de tubulina. La tubulina en este nuevo estado conformacional, hidroliza GTP y es incapaz de formar microtúbulos. Por otra parte, la despolimerización de los microtúbulos inducida por Ca^{2+} se debería a la unión del catión a los extremos de los

microtúbulos, provocando la liberación de P_i desde las unidades de tubulina-GDP- P_i que contribuyen a dar estabilidad al microtúbulo. En estas condiciones el microtúbulo sería muy inestable y se rompería rápidamente.

ABSTRACT

The regulation of tubulin polymerization to form microtubules has been extensively studied, as much in vivo as in vitro. However, this process is not well known at the present time. Several agents has been associated at this regulation, as the divalent ion calcium (Ca^{2+}), which inhibits tubulin polymerization and induces depolymerization of preformed microtubules, in vitro. The Ca^{2+} action mechanism is not known to a molecular level. In this work was demonstrated that the Ca^{2+} binding to tubulin induces its GTPase activity and the aim of this thesis was to investigate the role of the GTP hydrolysis in the regulation of tubulin polymerization and microtubule depolymerization induced by Ca^{2+} . With this purpose, the relation among the hydrolysis of the GTP bound to tubulin, the polymerization inhibition and the microtubule depolymerization by Ca^{2+} , was analyzed.

The results obtained in this thesis indicate that Ca^{2+} stimulates significantly the GTPase activity of tubulin in solution, measured by the radioactive P_i liberation from [γ - ^{32}P]-GTP. This stimulation was specific for Ca^{2+} , because other ions not shown this effect, which neither is due to the protein aggregation. The stimulation of the tubulin GTPase activity occurs in the same concentration range where Ca^{2+} inhibit the polymerization and both process are due to the Ca^{2+} binding to 2 high-affinity binding sites in tubulin.

The Ca^{2+} binding to the high-affinity sites would induce a conformational change in the tubulin molecule, which appear as a change in U.V. spectral properties of tubulin. In this conformational state, induced by Ca^{2+} binding, tubulin hydrolyzes GTP and it is unable to form microtubules.

With regard to the effect of Ca^{2+} on microtubule depolymerization, the results obtained in this thesis suggest a strong relation between the P_i liberation from the ends of microtubules and their depolymerization. This conclusion was obtained incubating microtubules with AlF_4^- , a structural analog of P_i which binds to tubulin 3-fold more strongly than phosphate. Under this condition, microtubules were less affected to the Ca^{2+} depolymerization.

To investigate the nature of the conformational change induced by Ca^{2+} binding to tubulin high-affinity binding sites, NMR studies were realized, using peptides corresponding to the carboxy-terminal region of tubulin subunits, because it has been proposed previously that the Ca^{2+} high-affinity binding sites should be localized in this region. For this studies, the paramagnetic lanthanide gadolinium was used, which behave as analog of Ca^{2+} , as was demonstrated in this thesis. Gd^{3+} inhibits tubulin polymerization, induces microtubule depolymerization and stimulates the GTPase activity of tubulin, in a similar manner that Ca^{2+} . On the other hand, studies of Gd^{3+} binding to tubulin, through electron paramagnetic resonance indicate that Gd^{3+} , as Ca^{2+} , bind cooperatively to 2 high-affinity

sites and approximately to 10 low-affinity binding sites. In addition, both ions compete for the binding to the high- and low-affinity sites in tubulin. In spite of the limitation that have the use of a heterogeneous sample of carboxy-terminal peptides of tubulin, the NMR studies allow us to conclude that the Gd^{3+} high-affinity binding sites, and eventually for Ca^{2+} , are located in the tubulin carboxy-terminal region.

The results obtained in this thesis, allow us to propose a model for the mechanism of tubulin polymerization inhibition and microtubule depolymerization by Ca^{2+} . The model suggest that Ca^{2+} inhibits tubulin polymerization by cooperative binding of the cation to two high-affinity sites, located in the tubulin carboxy-terminal region. This binding induce a conformational change in the tubulin molecule. Tubulin at this new conformational state, hydrolyze GTP and is unable to form microtubules. On the other hand, microtubule depolymerization by Ca^{2+} , could be due to the binding of cation at the ends of microtubules, determining the P_i liberation from tubulin-GDP- P_i units that stabilize the microtubule. Under this condition the microtubules should be very unstable and they rapidly become broken.

INTRODUCCION

Los microtúbulos se encuentran en todas las células eucarióticas y participan en varios eventos celulares. Así, entre otras funciones, juegan un papel importante en la mitosis, en la mantención de la arquitectura celular y en el movimiento de organelos (Correia y col., 1983; Kirschner y col., 1986). Los microtúbulos están formados principalmente por una proteína globular llamada tubulina y se forman espontáneamente *in vitro*, a temperaturas superiores a 21 °C, a partir de una solución que contenga una concentración de tubulina superior a la concentración mínima para polimerizar (concentración crítica). La polimerización de la tubulina requiere GTP, Mg^{2+} y glicerol (Olmsted y Borisy, 1975). La despolimerización es inducida por bajas temperaturas, Ca^{2+} y GDP.

La tubulina es un heterodímero de masa molecular 110.000 Da, compuesto de dos subunidades denominadas alfa y beta, ambas de masa molecular 55.000 Da y con una secuencia de aminoácidos conocida para la proteína proveniente de varias especies (Ludueña y col., 1977). En base a los patrones de digestión con enzimas proteolíticas, se ha propuesto que ambas subunidades de la tubulina tendrían tres dominios principales, uno ubicado en el extremo amino terminal, otro en la parte media y el tercero en el extremo carboxilo, como se muestra en la figura 1 (De La Viña y col., 1988). Este modelo concuerda con los resultados obtenidos por difracción de rayos X de microtúbulos

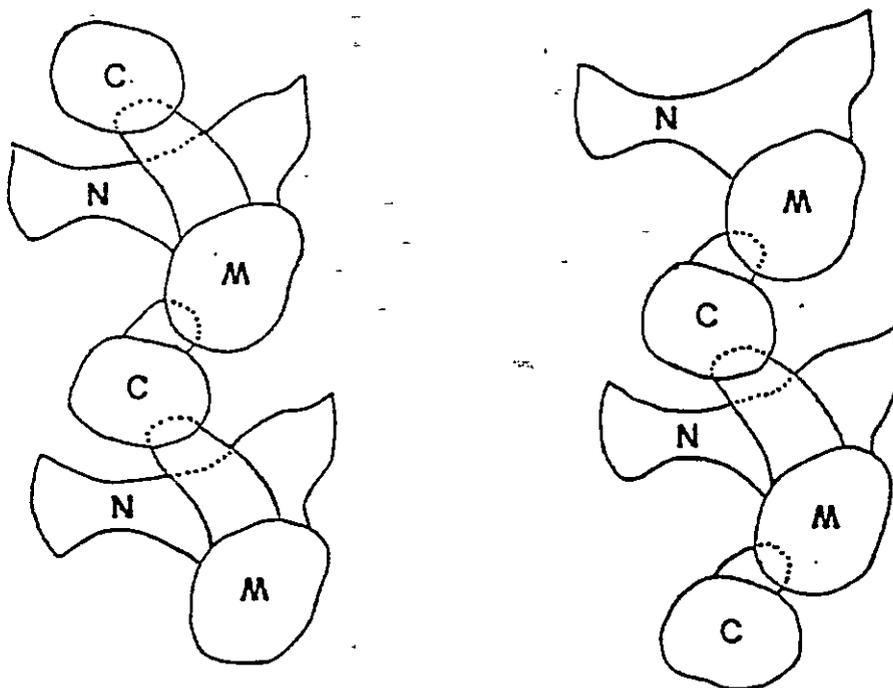


Figura 1: Modelos de la estructura de la tubulina. Las regiones fueron definidas por estudios de proteólisis controlada y asignadas a los dominios estructurales obtenidos a partir de estudios de difracción de rayos X en microtúbulos hidratados. (N) dominio amino-terminal, (M) dominio medio, (C) dominio carboxilo-terminal. En estos modelos se supone que la estructura del dímero de tubulina no es muy distinta entre los estados soluble y polimerizado. Esquema tomado de De La Viña y col. (1988).

hidratados (Beese y col., 1987), en que se detectan tres regiones de alta densidad electrónica por cada subunidad de la tubulina, que se han interpretado como tres dominios estructurales. El dominio carboxilo terminal de cada subunidad finaliza con un pequeño trozo, que puede ser removido en una digestión controlada con subtilisina u otras enzimas proteolíticas. Estos fragmentos de aproximadamente 40 aminoácidos poseen un alto contenido de ácido glutámico y se ha sugerido que tienen un papel fundamental en la regulación de la polimerización de la tubulina (Sacket y col., 1985). En esta región se ubicarían los sitios de unión para las proteínas asociadas a los microtúbulos (Serrano y col., 1984a; Rodionov y col., 1990) y para los motores microtubulares kinesina y dineina (Paschal y col., 1989).

Generalmente se ha supuesto que la tubulina posee dos sitios donde los nucleótidos de guanina interactúan no covalentemente. Uno de esos sitios (el sitio N) une GTP con alta afinidad y no lo intercambia con los nucleótidos que están en solución, mientras que el otro sitio (el sitio E) une tanto GTP como GDP y se caracteriza porque el nucleótido se intercambia rápidamente con los nucleótidos de la solución (como referencia general ver Carlier, 1982). Para que tubulina se incorpore al microtúbulo es necesario que el sitio E esté ocupado por una molécula de GTP, en forma de Mg^{2+} -GTP (Monasterio, 1987), el cual se hidroliza liberando el fosforilo inorgánico al medio y manteniéndose el GDP unido a la macromolécula. El papel de la unión e hidrólisis del GTP en el proceso de polimerización y despolimerización

de los microtúbulos ha sido largamente estudiado, encontrándose muchas veces resultados contradictorios (Carlier, 1982). Sin embargo, lo que actualmente se considera más válido es el modelo propuesto por Carlier y Pantaloni (Carlier y Pantaloni, 1981; Carlier y col., 1984), quienes, sobre la base de varios argumentos teóricos y experimentales, postulan que la hidrólisis del GTP ocurriría en una etapa posterior a la polimerización y sólo en la parte intermedia de los microtúbulos. De manera que esta hipótesis plantea que los microtúbulos estables serían aquellos en los cuales los extremos se conservarían como tubulina-GTP y la parte media como tubulina-GDP. Recientemente este mismo grupo ha encontrado pruebas que indican que la hidrólisis del fosforilo gama del GTP también ocurriría en los extremos de los microtúbulos, pero en este caso el P_i se mantendría unido por interacciones no covalentes al sitio del nucleótido, formándose el complejo tubulina-GDP- P_i (Carlier y col., 1988; Carlier y col., 1989). Vale decir, los microtúbulos estables serían aquellos que contienen en sus extremos unidades de tubulina-GTP y tubulina-GDP- P_i (denominadas en inglés caps) y en su parte media, tubulina-GDP, como se muestra en la figura 2. Lo anterior significa que sería la liberación del fosforilo inorgánico desde los extremos y no la hidrólisis del GTP, el proceso que controla la desestabilización de la estructura de los microtúbulos.

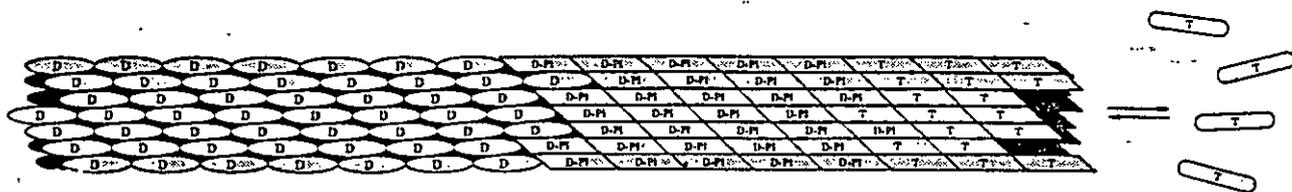


Figura 2: Representación diagramática del extremo de un microtúbulo en presencia de GTP. El complejo tubulina-GTP en solución y formando parte del microtúbulo se indica con una T, el complejo tubulina-GDP-P_i se indica con D-P_i y el complejo tubulina-GDP con una D. Esquema tomado de Melki y col., 1990.

La polimerización de tubulina in vitro es dependiente de la presencia de metales bivalentes; es así como al agregar Mg²⁺, Mn²⁺ y bajas concentraciones de Co²⁺, la tubulina polimeriza formando microtúbulos, en tanto que en presencia de Zn²⁺ y altas concentraciones de Co²⁺ se originan estructuras laminares o microtúbulos de mayor diámetro (Gaskin, 1981; Olmsted y Borisy, 1975).

Se ha atribuido al ión calcio un papel fundamental en la regulación del proceso de polimerización de la tubulina in vivo (Weisenberg, 1972; Schliwa, 1976) lo que ha contribuido aún más a validar la idea de que este ión tiene una importancia vital para la regulación del funcionamiento celular, participando en forma activa y determinante en varios procesos celulares (Berridge, 1975). Esta importante función del calcio, sobre la polimerización de la tubulina,

no fué descubierta sino hasta 1972 gracias al trabajo pionero de Weisenberg, quien demostró que hasta ese momento la polimerización de tubulina in vitro no había sido posible debido a la presencia en el medio de concentraciones micromolares de calcio, lo que era suficiente para impedir la formación de microtúbulos (Weisenberg, 1972). Después de la aparición de este resultado en la literatura, muchos grupos se han dedicado a analizar el problema, encontrándose, entre otras cosas, que el Ca^{2+} impide tanto la polimerización de tubulina y también despolimeriza los microtúbulos preformados (Kirschner y col., 1974).

En relación al mecanismo de acción del Ca^{2+} se han planteado varias hipótesis sobre su modo de acción, que se pueden agrupar en dos tipos: un efecto indirecto mediante calmodulina y las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) y un efecto directo de interacción del Ca^{2+} con la tubulina (Berkowitz y Wolff, 1981; Job y col., 1981; Lee y Wolff, 1984; Sobue y col., 1981; Yamamoto y col., 1983; Solomon, 1977; Lee y Timasheff, 1977).

Para explicar el modo directo de acción del Ca^{2+} sobre la tubulina, se ha descrito que la zona de la tubulina en que el Ca^{2+} interactúa con alta afinidad sería la región carboxilo-terminal de ambas subunidades, y que esta interacción sería la responsable del efecto despolimerizante del ión (Serrano y col., 1986). Más aún, se ha sugerido recientemente que los últimos 8 aminoácidos del extremo carboxilo de cada subunidad participarían en la unión de calcio (Vera y col., 1989). Resulta difícil

explicar la unión de Ca^{2+} a ambos extremos carboxilo terminal de la tubulina, si se consideran los resultados de Solomon (1977) y Mejillano y Himes, (1991), quienes después de estudiar la unión de iones calcio radiactivo a la tubulina intacta han descrito que habría solamente un sitio de unión de alta afinidad para calcio por cada molécula de tubulina. Sin embargo, los resultados de Grisham y col. (1980) publicados en un resumen, concuerdan con los resultados de Serrano y col. (1986), pues encuentran dos sitios de unión de alta afinidad por molécula de tubulina.

El objetivo global de este trabajo fue investigar el mecanismo por medio del cual el Ca^{2+} , en forma directa, induce la despolimerización de microtúbulos e inhibe la polimerización de la tubulina.

Los objetivos específicos de esta tesis fueron:

1. Determinar el efecto de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica intrínseca de la tubulina.
2. Analizar la relación entre la hidrólisis del GTP inducido por Ca^{2+} y la inhibición de la polimerización de tubulina y la despolimerización de microtúbulos provocada por este catión.
3. Estudiar las características de la interacción de calcio con la tubulina.
4. Analizar las características de los sitios de unión de calcio responsables de su efecto sobre la polimerización y despolimerización de microtúbulos y los eventuales cambios conformacionales derivados de la unión del catión.

Como hipótesis de trabajo para esta tesis, se planteó la existencia de una estrecha relación entre la hidrólisis del GTP unido al sitio E de la tubulina y el mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina por calcio. Por otra parte, planteamos que la capacidad de calcio para despolimerizar los microtúbulos estaría mediada por la desestabilización de los "caps" de tubulina-GDP-P_i, producto de la liberación del P_i desde este complejo.

Los sugerencias experimentales en que se basa esta hipótesis son los siguientes:

a) La hidrólisis de GTP provoca un cambio conformacional que es esencial para la despolimerización de los microtúbulos (Weisenberg y col., 1976).

b) Tubulina-GDP, que en solución posee una conformación distinta de la tubulina-GTP (Howard y Timasheff, 1986), es incapaz de incorporarse a los microtúbulos (Carlier, 1982).

c) En la mayoría de las proteínas que unen Ca²⁺ se ha podido comprobar que la unión de este catión induce un cambio conformacional en la cadena polipeptídica (Strynadka y James, 1989; da Silva y Reinach, 1991).

d) La tubulina, en ausencia de calcio, tiene una muy baja actividad GTPásica (Carlier, 1982).

e) La tubulina es capaz de polimerizar en presencia de análogos no hidrolizables de GTP y los polímeros formados son idénticos en su morfología a los producidos por tubulina-GTP, sin embargo no son despolimerizados por calcio (Weisenberg y Deery, 1976; Arai y Kaziro, 1976).

f) Calcio induce la despolimerización de los microtúbulos desde los extremos (Karr y col., 1980).

g) La colchicina es una droga que inhibe la polimerización de tubulina (Arai y Kaziro, 1977). Se ha demostrado que la colchicina induce la hidrólisis del GTP del sitio intercambiable de la tubulina (David-Pfeuty y col., 1979). Además, se ha observado que la unión de colchicina a tubulina es fuertemente alterada al remover los extremos carboxilo-terminales de la proteína. Por esto, se ha propuesto que esta región sería importante para la regulación de la interacción tubulina-colchicina (Mukhopahyay y col., 1990). Cabe señalar que es en esta región donde se ha propuesto que se une Ca^{2+} (Serrano y col., 1986).

MATERIALES Y METODOS

I MATERIALES

Reactivos.

Los reactivos MES, GTP, PIPES, EDTA, EGTA, glicerol, PMSF, SDS, subtilisina libre y unida a Agarosa, Tris, hidroclorehidrato de guanidina, cloruro de terbio, cloruro de europio, óxido de gadolinio, óxido de neodimio, azida de sodio, Azul de Coomassie R-250, persulfato de amonio, sacarosa y sulfato de amonio, fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.-USA).

Los reactivos cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, DMSO, carbón activado, cloruro de potasio, arsenazo III, fluoruro de sodio y nitrato de aluminio, fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania Federal).

[^{14}C]-tirosina, ^{45}Ca y $^{32}\text{P}_i$, fueron adquiridos de Amersham/Searle (Illinois, USA).

El sistema de micropartición MPS-1, con membranas YMT 500 y 10.000, fue comprado en Amicon, Grace Company (USA).

Metanol, acetona y ácido acético de calidad pro-análisis, fueron adquiridos de Sudelab S. A.

Material Cromatográfico

Sephadex G-25 fino y medio, Sephacryl S-300 y DEAE-Sephadex se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA). DEAE-celulosa microgranular se adquirió en Whatman (Maidstone, Inglaterra). Fractogel TSK HW 40 se adquirió en Merck (Darmstadt, Alemania Federal).

Material Biológico

Se utilizaron cerebros de pollo provenientes de Agrícola Ariztia Ltda. El órgano se extrajo entre 60 a 90 minutos después de sacrificado el animal y se mantuvo sumergido en hielo hasta su homogeneización, la cual se realizó después de un tiempo no superior a 1 hora después de la extracción del órgano.

II METODOS

Preparación de la tubulina

1. Purificación de tubulina. La tubulina de cerebro de pollo fue purificada por el procedimiento de Weisenberg (Weisenberg y col., 1968; Weisenberg y Timasheff, 1970; Lee y Frigon, 1973), que consta de los siguientes pasos:

- a. Remover las meninges y vasos sanguíneos superficiales.
- b. Lavar dos veces con un volumen de amortiguador PMS (fosfato 10 mM, sacarosa 0,24 M, $MgCl_2$ 0,5 mM, pH 7,0).
- c. Homogeneizar el tejido en un volumen de PMS en juguera u homogeneizador DMNI-MIXER Sorvall a alta velocidad por 30 s.
- d. Centrifugar el homogeneizado a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall, rotor GSA.
- e. Descartar el precipitado y al líquido sobrenadante añadir 17,7 g por 100 ml de sulfato de amonio sólido con agitación continua.
- f. Dejar en reposo por 10 min y centrifugar a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C, en centrifuga Sorvall, rotor GSA.
- g. Descartar el precipitado y al líquido sobrenadante añadir

7,1 g por 100 ml de sulfato de amonio sólido con agitación continua.

h. Dejar en reposo por 10 min y centrifugar a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C, en centrifuga Sorvall, rotor GSA.

i. Descartar el líquido sobrenadante y resuspender el precipitado por homogeneización suave con homogeneizador Roter en un volumen suficiente de PMG (fosfato 10 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, GTP 0,1 mM, pH 7,0), para solubilizar el precipitado.

j. Mezclar la solución con medio volumen de DEAE-Sephadex equilibrado con PMG.

k. Dejar en reposo por 5 min y lavar 2 veces con un volumen de amortiguador PMG y 0,4 M KCl, remover el amortiguador por filtración en un embudo Büchner.

l. Eluir la proteína desde el DEAE-Sephadex con un volumen de PMG y 0,8 M KCl y lavar con otro volumen igual, esperar 5 min en cada elución antes de filtrar en un embudo Büchner.

m. Añadir 24,8 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de solución, con agitación continua. Dejar en reposo por 10 min y centrifugar a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C en rotor GSA.

n. Resuspender el precipitado en el mínimo volumen de PMG y aplicar la solución de proteína a una columna (3,0 x 40 cm) de Sephadex G-25 medio, equilibrada con PMG y coleccionar 2 ml por tubo.

o. Agregar 2 a 3 gotas de $MgCl_2$ 0,5 M a cada tubo para precipitar la tubulina.

p. Combinar las fracciones con precipitado y centrifugar a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C en Sorvall, rotor SS-34.

q. Resuspender el precipitado en 6 a 8 ml de PMG y sacarosa 1,0 M por homogeneización suave. Poner la solución en una bolsa de diálisis y dializar toda la noche contra 250 ml de PMG y sacarosa 1,0 M a 4 °C.

r. Determinar la concentración de tubulina, distribuir en alícuotas de 100 µL y almacenar a -80 °C.

2. Procedimiento para intercambiar el amortiguador experimental a la solución de tubulina. Al momento de usar, la tubulina se descongeló, manteniéndola a 4°C y se filtró a través de una mini columna (0,5 x 5,0- cm) empacada con Sephadex G-25 fino en amortiguador experimental y centrifugada a 3.000 rpm por 4- min en una centrífuga Sorvall, rotor SS34. La muestra de tubulina, en un volumen no mayor que 0,1 ml por ml de gel, se cargó en la columna y se dejó reposar por 5 min. Para eluir la tubulina desde la columna se procedió a centrifugar por 4 min a 3.000 rpm en una centrífuga Sorvall, rotor SS-34. Enseguida se realizó un segundo proceso de filtración, utilizando una columna refrigerada (0,8 x 25 cm) empacada con Sephadex G-25 fino, equilibrada con el amortiguador experimental y conectada a una bomba peristáltica Zero-Max, modelo E1. Las proteínas se eluyeron a un flujo controlado de $25 \text{ ml cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, se colectaron fracciones de 1 ml y se midió la concentración de proteína.

3. Extracción de agregados de tubulina. En la mayoría de los experimentos era deseable contar con una preparación de tubulina libre de agregados, lo cual se consiguió

reemplazando la filtración en la columna de Sephadex G-25 por una filtración a través de una columna (0,8 x 25 cm) empacada con Sephacryl S-300, equilibrada con el amortiguador experimental. Como resultado de esta cromatografía, se obtuvieron dos picos (ver figura 4); el primero que aparece en el volumen de exclusión de la columna, y por tanto contiene moléculas de una masa superior a 300 kDa, corresponde a agregados de tubulina provenientes de la última etapa de la purificación de la proteína. El segundo pico, que aparece en el volumen interno de la columna, contiene tubulina libre de agregados, lo cual se ha verificado a través de experimentos de centrifugación diferencial, utilizando una ultracentrífuga Beckman impulsada por aire.

Determinación de la concentración de proteínas y péptidos

La concentración de tubulina fue determinada espectrofotométricamente en soluciones de hidroclorehidrato de guanidina 6 M, utilizando un coeficiente de extinción de 1,03 l/g cm a 275 nm (Na y Timasheff, 1981; Lee y Frigon, 1973).

La concentración de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina digerida con subtilisina, se determinó por el método de la fluorescamina. El método se basa en la propiedad de la fluorescamina de interactuar con los grupos amino-terminales libres de proteínas o péptidos. En este estado la fluorescamina emite luz de longitud de onda 475 nm cuando es excitada a 390 nm, en forma proporcional a la

cantidad de fluorescamina unida. Alícuotas de 10 - 250 μ l de la solución de péptidos se completaron a 1,5 ml con amortiguador fosfato 50 mM, pH 8,0. Las muestras se agitaron vigorosamente y se les agregó 0,5 ml de fluorescamina disuelta en dioxano (0,3 mg/ml). Luego de 2 min se midió la emisión a 475 nm excitando a 390 nm. Es importante destacar que la solución de fluorescamina debe prepararse en el momento de usar, pues este reactivo se hidroliza rápidamente a temperatura ambiente. Para la determinación de la concentración se requiere, en primer término, realizar una curva de calibración con proteínas estándares de concentración conocida.

Preparación de [τ -³²P]-GTP

El GTP radiactivo marcado en la posición τ , fue gentilmente sintetizado por M. Antonelli, utilizando el procedimiento descrito por Walseth y Johnson (1979).

Medición de la actividad GTPásica de tubulina

El procedimiento experimental para medir la hidrólisis de GTP, consistió en extraer en primer término los posibles agregados que contenía la preparación de tubulina, los cuales mostraron poseer una alta actividad GTPásica (Fig. 4), filtrando la solución en una columna de Sephacryl S-300 (Monasterio y Timasheff, 1987) equilibrada en amortiguador C (MES 0,1 M, pH 6,4, MgCl₂ 0,5 mM, GTP 0,1 mM). A la solución de tubulina, libre de agregados, se adicionó [τ -³²P]-GTP y se incubó a 37 °C en un volumen de reacción de 0,1 ml. La reacción se detuvo añadiendo un volumen de una suspensión

de carbón activado (100 mg/ml) en KCl 0,2 M, pH 1,8 (Nieto y col., 1975). El carbón activado fue removido por centrifugación, en un centrífuga Ependorff, a 15.000 rpm por 6 min y al líquido sobrenadante se le determinó la radiactividad, la cual provenía exclusivamente del fosfato inorgánico liberado como producto de la hidrólisis de GTP, el que se cuantificó considerando el valor conocido de la radiactividad específica.

Ensayos de polimerización

El método turbidimétrico (Gaskin y col., 1974) fue empleado para registrar la cinética de polimerización utilizando un espectrofotómetro Gildford 2000 equipado con un registrador y una celda termorregulada. La polimerización de la tubulina se indujo aumentando la temperatura a 37 °C en amortiguador A (MES 0,1 M, pH 6,4, MgCl₂ 15 mM, glicerol 25 % y GTP 0,1 mM) y a concentraciones de tubulina superiores a la concentración crítica. El curso de la polimerización se registró midiendo el incremento en la absorbancia a 350 nm en el tiempo. Los polímeros formados fueron analizados por microscopía electrónica. Además, en cada experimento se comprobó que los polímeros formados presentaran las características típicas de los microtúbulos, vale decir, la capacidad de despolimerizar al bajar la temperatura a 10 °C y al agregar Ca²⁺.

Estudios de unión de Ca^{2+}

Para seguir la unión de Ca^{2+} a la tubulina se utilizó su isótopo radiactivo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$). El procedimiento experimental consistió en equilibrar la tubulina libre de agregados en amortiguador B (Pipes, 50 mM, pH 6,0). En este amortiguador se minimiza la unión inespecífica y la formación de hidróxidos del metal (Snyder y col., 1990). Luego se incubó la tubulina con distintas concentraciones de CaCl_2 , y pequeñas alícuotas de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por 15 min a 25 °C. Para separar el Ca^{2+} unido del libre, se usaron dos métodos alternativos. El primer método que se usó consiste en filtrar la solución a través del sistema de micropartición MPS-1 de Amicon, utilizando membranas YMT que permiten obtener en el filtrado las moléculas de peso molecular inferior a 10.000, de manera que solo el Ca^{2+} libre aparece en el filtrado, el cual se puede cuantificar contando la radiactividad. El segundo método usado fue el procedimiento descrito por Penefsky (1977), que consiste en filtrar la muestra a través de mini-columnas (0,5 x 5,0 cm) empacadas con Sephadex G-25 fino, equilibrada en amortiguador B. (Este procedimiento es igual al que se describió anteriormente para equilibrar la tubulina con el amortiguador experimental). El eluido, que contiene solo el ión unido a macromolécula, se colecta por centrifugación y se procede enseguida a contar la radiactividad proveniente del Ca^{2+} unido.

Análisis de los datos de unión

La ecuación utilizada para el cálculo de los parámetros de unión a ambos tipos de sitios fue la siguiente:

$$v = \frac{n_1 [Ca^{2+}]^h}{K_{d1} + [Ca^{2+}]^h} + \frac{n_2 [Ca^{2+}]}{K_{d2} + [Ca^{2+}]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde v es el cociente molar entre el Ca^{2+} unido y la tubulina total utilizada; n_1 y n_2 corresponden al número de sitios de unión de alta y baja afinidad para Ca^{2+} en la tubulina, respectivamente; K_{d1} y K_{d2} son las constantes de disociación para ambos tipos de sitios; h es el coeficiente de Hill para la unión del catión a los sitios de alta afinidad y $[Ca^{2+}]$ es la concentración de Ca^{2+} libre.

Los valores para cada uno de los parámetros de unión de Ca^{2+} a la tubulina, fueron obtenidos mediante el mejor ajuste computacional de los puntos experimentales a la curva teórica, para lo cual se utilizó el programa computacional ENZFITTER.

Preparación de los cloruros de lantánidos

Soluciones patrón de $GdCl_3$ y $NdCl_3$ 0,1 M fueron preparadas disolviendo los óxidos respectivos en HCl 0,6 M (Abbot y col., 1975).

La concentración de las soluciones patrón de cada uno de los lantánidos fue determinada titulando con EDTA y usando arsenazo III como indicador (Fritz y col., 1958). El procedimiento experimental consistió en poner un volumen

conocido de la solución a determinar en un vaso de precipitado con agua, enseguida se agregó 2 a 3 gotas de piridina y se verificó el pH, el cual debía estar entre 5,5 y 6,5. Se agregó 2 a 4 gotas de arsenazo III (5 mg/ml) y se tituló con EDTA titrisol, midiendo el volumen necesario para observar el cambio de color de violeta a rosado.

Por su parte, la concentración de CaCl_2 fue determinada a través de espectroscopía de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 360, con una mezcla de aire-acetileno para la llama. Previamente se realizó una curva de calibración con Ca^{2+} de concentración conocida.

Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

El espectro de EPR de gadolinio fue tomado en un espectrofotómetro Varian E-109 a 9,1 GHz (banda X), 20 mW de potencia y 10 G de amplitud de modulación. La velocidad de barrido fue 400 G/min y la temperatura -196°C .

Espectroscopía ultravioleta diferencial.

El instrumento utilizado fue un espectrofotómetro Hewlett Packard con arreglo de diodos y una resolución de 2 nm, acoplado a un computador Hewlett Packard. Los espectros diferenciales fueron obtenidos restando, a través de un programa computacional, los espectros de tubulina en presencia y ausencia de Ca^{2+} . Previamente se comprobó que en la región en que se registró el espectro, el amortiguador utilizado (PIPES 50 mM, pH 6,0), no presentaba absorción significativa de radiación.

Aislación y caracterización de los fragmentos de tubulina que unen calcio con alta afinidad.

Como se detalla en la introducción, se ha atribuido a la región carboxilo terminal de ambas subunidades de la tubulina mucha importancia en el control de la formación y ruptura de los microtúbulos. Se ha informado (Serrano y col., 1984b) que en esta zona estarían los sitios de interacción de la tubulina con las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) y los sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} (Serrano y col., 1986).

El objetivo de esta parte del trabajo fue purificar los péptidos del extremo carboxilo de ambas subunidades obtenidos a partir de la digestión con subtilisina. Este trabajo fue realizado en conjunto con la tesista de pregrado Soledad De La Cerda. Se presentará un breve resumen de los resultados obtenidos (Para un mayor detalle de los métodos consultar De La Cerda, 1990).

1. Digestión de tubulina con subtilisina.

Se diseñaron dos métodos de digestión de tubulina con subtilisina, que dependían del estado en que se encontraba la enzima, ya sea libre en solución o inmovilizada en una matriz sólida de Agarose. El procedimiento de digestión con subtilisina libre consistió en incubar la tubulina a una concentración de 2 mg/ml en amortiguador D (MES 0,1 M, pH 6,4, MgCl_2 0,5 mM, EGTA 2 mM) con subtilisina al 1 % p/p a 30 °C. Luego de un tiempo determinado, la reacción se detuvo agregando PMSF, disuelto en DMSO, 1 mM final. El procedimiento de digestión con subtilisina unida a Agarose

consistió en incubar una solución de tubulina (2 mg/ml) con 0,1 unidades de enzima unida a Agarose por mg de tubulina, en amortiguador D a 30 °C con agitación continua. Después de un tiempo determinado se removi6 la subtilisina unida a Agarose por centrifugación a 3.000 rpm, en una centrífuga Sorvall, rotor SS34. Se pudo comprobar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de ambas digestiones que al usar la enzima unida a Agarose se obtuvo un mejor rendimiento en la obtención de péptidos carboxilo-terminales, pues en este estado la enzima corta preferentemente en el sitio que da origen a estos péptidos.

2. Purificación de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina digerida con subtilisina.

Se diseñaron dos métodos de purificación. El primer método, que consiste en una modificación del procedimiento descrito por Serrano y col. (1986), contempló las siguientes etapas:

a. La mezcla de digestión, con enzima inmovilizada o libre, se indujo a polimerizar agregando GTP 1mM, 25% de glicerol e incubando por 30 min a 37 °C. Luego se centrifugó a 30.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman, rotor 50Ti por 15 min a 37 °C.

b. El sobrenadante de la centrifugación se sembró en una columna de DEAE-celulosa (0,8 x 1 ml) equilibrada con Tris HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M y se eluyó añadiendo soluciones de NaCl 0,2 M y 0,5 M, preparadas en Tris HCl 10 mM, pH 7,5.

c. El eluido con NaCl 0,5 M se filtró a través de una

columna (2,5 x 45 ml) de Fractogel TSK-HW-40 equilibrada con acetato de amonio 0,1 M pH 6,0, la cual estaba instalada en un aparato de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La figura 3 muestra el perfil de elución obtenido al filtrar por la columna de Fractogel el eluido de DEAE-celulosa con NaCl 0,5 M, proveniente de una digestión con subtilisina libre.

Como resultado de este procedimiento se obtuvieron dos fracciones que absorbían a 280 nm en la región donde, por su masa molecular, deberían eluir los péptidos (Fig. 3), lo que sugería que los péptidos correspondientes a cada una de las subunidades podrían estar separados.

Cuando los requerimientos de purificación no fueron tan estrictos, se diseñó un método más sencillo, para purificar los péptidos de los extremos carboxilo resultantes de la digestión con subtilisina. Este método consistió en filtrar la mezcla de digestión a través de un sistema de ultrafiltración Amicon usando membranas de límite de exclusión 10.000 Da, de manera que en el eluido se podía separar los péptidos de los productos de digestión de masa molecular superior a 10.000 Da. Esta muestra se sometió a cromatografía en DEAE-celulosa, de la misma manera que en el método anterior y los péptidos carboxilo-terminales de ambas subunidades de tubulina se eluyeron con NaCl 0,5 M.

3. Caracterización de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina.

La caracterización de los péptidos purificados por el primer método, se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 20 % en

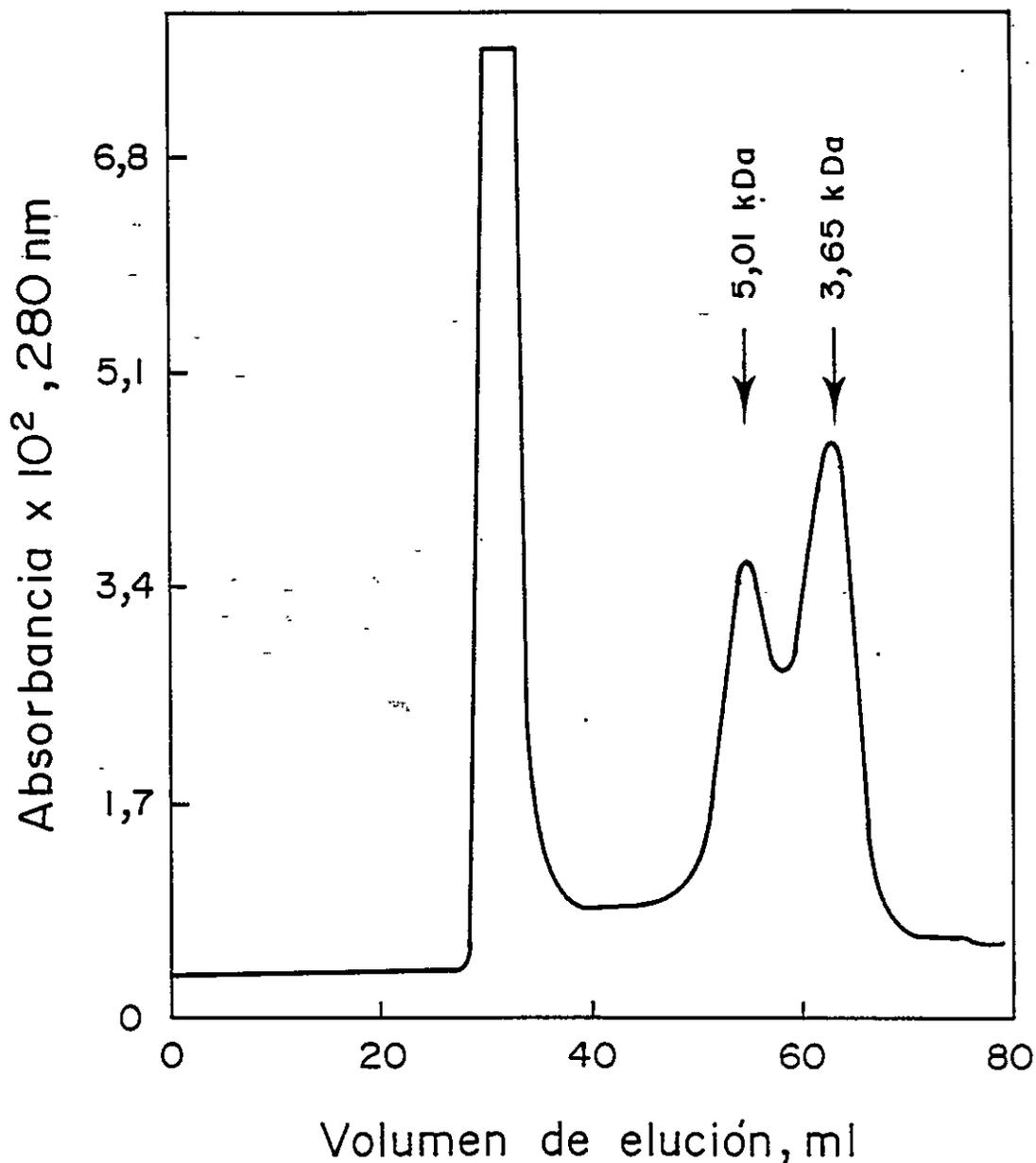


Figura 3. Filtración en Fractogel TSK HW 40 de las fracciones eluidas con NaCl 0,5 M de una columna de DEAE-celulosa, proveniente de una digestión con subtilisina libre. Se muestra el espectro continuo de absorbancia a 280 nm en función del volumen de elución. Se indica la masa molecular relativa de cada uno de los picos. El primer pico apareció en el volumen de exclusión de la columna, vale decir tiene una masa molecular superior a los 10 kDa y corresponde a una mezcla de S-tubulina y los productos de masa molecular intermedia.

condiciones desnaturalantes. El resultado de este experimento mostró una sola banda para cada uno de ellos (resultados no mostrados), cuyas masas moleculares fueron 4,3 y 3,8 kDa. Estos valores son similares a los reportados por Serrano y col (1986).

Resultados de estudios de la fluorescencia intrínseca y determinación de la composición de aminoácidos (tabla I) mostraron que los péptidos purificados presentan las características típicas de la región carboxilo terminal, como es una alta cantidad de glutamatos y glicina y la ausencia de aminoácidos como triptofano y cisteína. Sin embargo, no fue posible utilizar estos datos para identificar a cual subunidad de la tubulina correspondía cada péptido. Las diferencias entre lo teórico y lo experimental se pueden deber, por un lado, a que cada pico de absorbancia corresponda a una mezcla de los péptidos provenientes de ambas subunidades de tubulina y por otro lado, es posible que la subtilisina no corte en un solo lugar en el extremo C-terminal, de manera que cada pico corresponda a una mezcla heterogénea de péptidos de distinto tamaño y composición. Una tercera posibilidad para explicar la diferencia entre la composición aminoacídica experimental y teórica la constituye el hecho de que los péptidos purificados provienen de la digestión de una familia de isoformas de tubulina (George y col 1981).

Tabla I. Composición de aminoácidos de los péptidos carboxilo terminales de ^atubulina obtenidos mediante digestión con subtilisina.

Aminoácidos	% molar teórico ^b		% molar experimental	
	péptido α	péptido β	pico 1	pico 2
Asp + Asn	8,8	15,8	4,7	9,2
Glu + Gln	35,3	39,5	28,7	39,7
Ser	5,9	5,3	6,1	5,6
Gly	11,8	5,3	16,3	13,9
His	0,0	0,0	2,2	0,8
Arg	2,9	0,0	2,9	1,4
Thr	0,0	5,3	4,6	3,0
Ala	8,8	10,5	7,3	7,1
Pro	0,0	0,0	2,6	2,4
Tyr	5,9	2,6	4,6	3,0
Val	8,8	2,6	5,9	4,7
Met	2,9	2,6	2,6	0,7
Ile	0,0	0,0	3,6	1,3
Leu	2,9	2,6	3,6	2,4
Phe	2,9	5,3	2,8	2,5
Lys	2,9	0,0	2,1	2,1
Trp	0,0	0,0	0,0	0,0
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0

^a La digestión de tubulina se hizo con subtilisina unida a Agarose y los péptidos fueron purificados por el método 1.

^b El % molar teórico fue calculado considerando la secuencia predicha a partir del cDNA de tubulina mayoritario en cerebro de pollo y considerando que la subtilisina corta a la tubulina en los sitios informados por Serrano y col. (1986).

Resonancia magnética nuclear (NMR).

Los espectros de NMR de ^1H fueron registrados a 300,13 MHz en un espectrómetro Bruker WH-300, operando en el modo con transformada de Fourier y con desacoplamiento de la señal del agua. La muestra de tubulina o de péptidos C-terminal fue sometida a centrifugación a 90.000 x g, en una centrifuga impulsada por aire Beckman, para eliminar eventuales agregados. Enseguida se realizó una cromatografía en una columna (0,2 x 1,0 cm) de Chelex-100 equilibrada con amortiguador bicarbonato (NaHCO_3 10 mM, pH 6,5, MgCl_2 0,5 mM), con el propósito de eliminar metales pesados que pudiesen alterar el espectro. En algunos experimentos la muestra fue liofilizada y resuspendida en $^2\text{H}_2\text{O}$, para disminuir la señal del agua. Alicuotas de 0,5 ml de muestra en agua deuterada o solución acuosa (80 % $^1\text{H}_2\text{O}$, 20 % $^2\text{H}_2\text{O}$) de amortiguador bicarbonato, fueron depositadas en un tubo de 0,5 cm de diámetro y se midió el espectro a 16 °C. Las siguientes condiciones fueron usadas: Amplitud del pulso, 9,8 $\mu\text{seg.}$; amplitud espectral, 6024,1 Hz; como estándar interno se usó tetrametil silano.

RESULTADOS

RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD GTPásica DE TUBULINA INDUCIDA POR CALCIO Y LA POLIMERIZACION Y DESPOLIMERIZACION DE MICROTUBULOS

Efecto de calcio sobre la actividad GTPásica de la tubulina.

Con el objetivo de evaluar la relación que existe entre la inhibición de la polimerización de tubulina por Ca^{2+} y la hidrólisis de GTP, se estudió el efecto de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica de la tubulina.

La tubulina purificada por el método de Weisenberg y Timasheff (1968) presenta una cierta contaminación con agregados de tubulina, después que se ha almacenado a -80°C . Esta proporción varía con la preparación y con el envejecimiento de la proteína. La actividad GTPásica endógena de la tubulina se ve aumentada por la actividad GTPásica de los agregados y varía de acuerdo a la cantidad de agregados presentes. La separación de estos agregados se logró filtrando la preparación a través de una columna de Sephacryl S-300 (Andreu y Timasheff, 1981). La figura 4 muestra la hidrólisis de GTP asociada a cada una de las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-300. El primer pico, que apareció en el volumen de exclusión de la columna, corresponde a agregados de tubulina que tienen una masa molecular superior a 300 kDa y una alta actividad GTPásica. En tanto, el segundo pico, que corresponde a tubulina, tuvo una actividad GTPásica mucho menor. Ca^{2+}

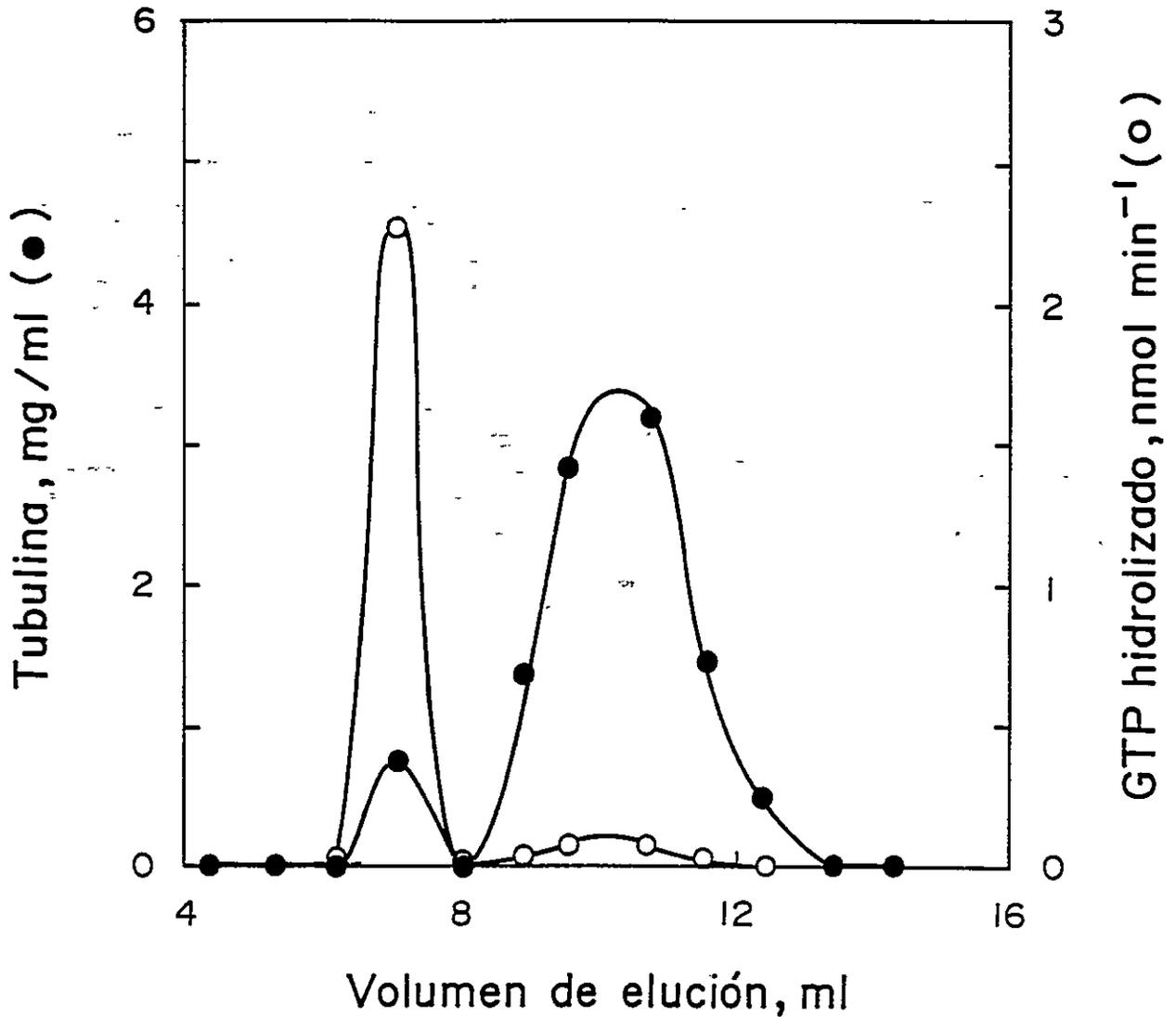


Figura 4: Actividad GTPásica asociada a cada uno de las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-300. La mezcla de reacción contenía $[r-^{32}P]GTP$ a una radiactividad específica de 16.120 cpm/nmol de GTP. El tiempo de incubación fue 10 min. Se muestra la concentración de proteína (mg/ml) (●) y los nmoles de GTP hidrolizados/min (○).

estimuló la actividad GTPásica sólo de la fracción correspondiente a tubulina (Fig. 4), por esto para ensayar el efecto de calcio sobre esta actividad, se utilizó la fracción proveniente del segundo pico de Sephacryl S-300. La figura 5 muestra la curva de progreso para la hidrólisis de GTP asociada a tubulina en ausencia y en presencia de Ca^{2+} 2 mM. Las pendientes en la parte lineal de la curva (a tiempos de incubación inferiores a 20 min) corresponden a la velocidad inicial de hidrólisis de GTP, cuyo valor en ausencia y en presencia de Ca^{2+} fue 0,018 y 0,26 nmoles de GTP hidrolizados por mg de tubulina x min, respectivamente. Esto significa que a una concentración de Ca^{2+} de 2 mM, la estimulación de la actividad GTPásica asociada a la tubulina en solución fue de 14 veces. Esta estimulación no fue debida a que Ca^{2+} indujo la formación de agregados con actividad GTPásica, pues la absorbancia durante el tiempo de incubación con Ca^{2+} se mantuvo constante y cercana a cero y experimentos de centrifugación a alta velocidad de soluciones de tubulina en presencia y ausencia de calcio no mostraron la existencia de agregados (resultados no mostrados).

En la figura 6 se muestra la velocidad de hidrólisis de GTP obtenida al incubar la tubulina por un tiempo fijo de 10 min, respecto de la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Para descartar la existencia de un efecto inespecífico de la fuerza iónica se hicieron en forma simultánea incubaciones con Na^+ (no mostrado). Como se observa en la figura, la estimulación de la actividad GTPásica de la tubulina por

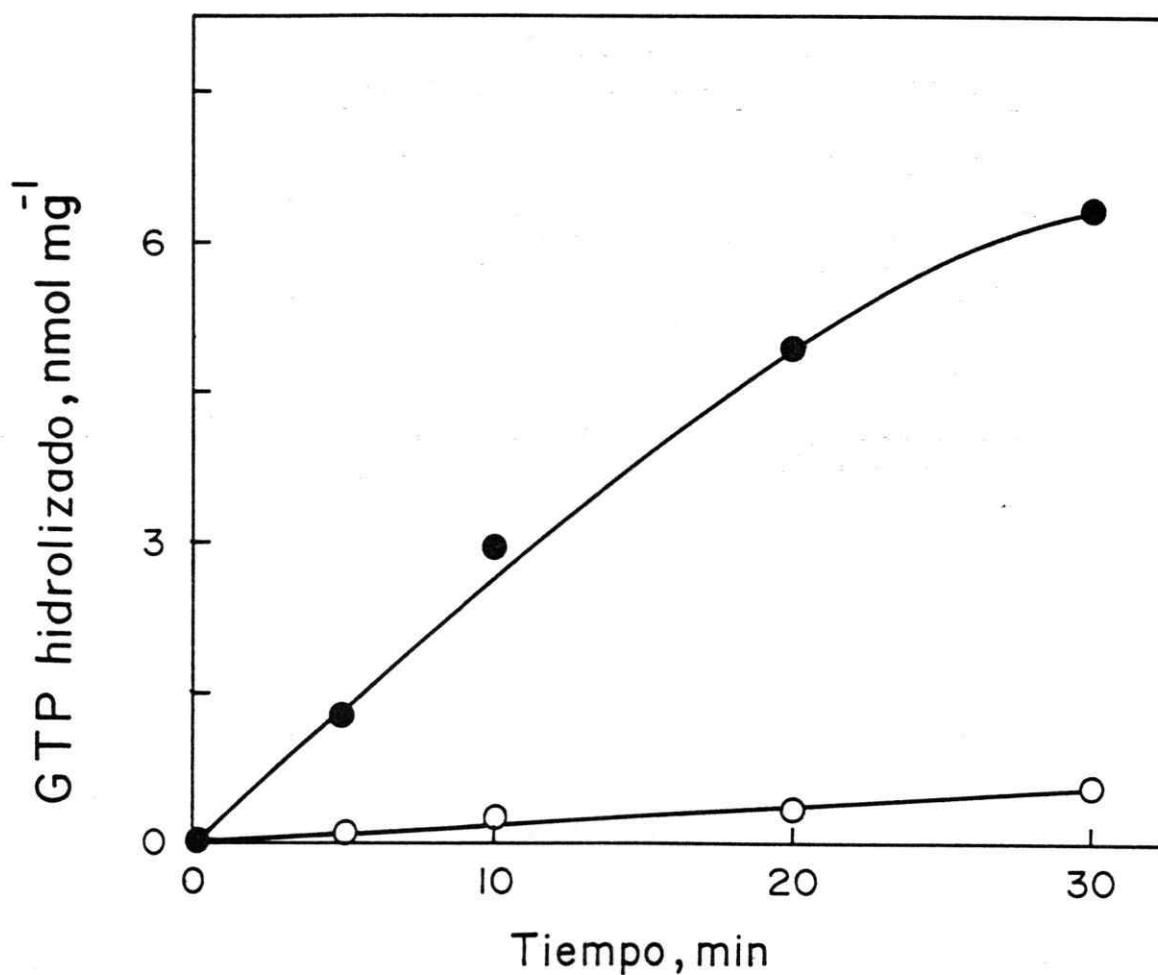


Figura 5. Estimulación de la actividad GTPásica de tubulina por Ca^{2+} . Tubulina (1,7 mg/ml) libre de agregados, fue incubada a 37 °C en una mezcla que contenía MES 0,1 M, pH 6,4, MgCl_2 0,5 mM, [γ - ^{32}P]-GTP (radiactividad específica 15.570 cpm/nmol) con (●) o sin (○) CaCl_2 2 mM, en un volumen final de 0,1 ml. La actividad GTPásica fue determinada como se describe en Métodos.

calcio siguió una conducta de saturación sigmoidea alcanzando un máximo en alrededor de 2,0 mM. Por su parte, Mg^{2+} no afectó la actividad GTPásica de tubulina en todo el intervalo de concentraciones estudiadas.

La figura 7 muestra el efecto de la concentración de tubulina sobre la hidrólisis de GTP en ausencia y en presencia de Ca^{2+} 2,0 mM. De la pendiente de estas rectas se obtuvo un valor para la velocidad de hidrólisis de GTP de 0,02 y 0,26 nmoles de GTP hidrolizados por mg de tubulina x min, en ausencia y en presencia de Ca^{2+} 2 mM respectivamente. La linealidad de la relación obtenida entre la actividad GTPásica y la concentración de tubulina, indica que el efecto observado no es dependiente de la agregación de la tubulina.

La conclusión de estos resultados es que Ca^{2+} , en concentraciones que fluctúan entre 0,1 y 2,0 mM, es capaz de estimular significativamente la hidrólisis del GTP unido a la tubulina. Esta estimulación es específica, pues Mg^{2+} y Na^+ no producen este efecto.

Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica y sobre la inhibición de la polimerización.

Para investigar si la estimulación de la actividad GTPásica de la tubulina por Ca^{2+} , ocurre en el mismo intervalo de concentraciones en el cual calcio inhibe la polimerización de la tubulina y despolimeriza los microtúbulos, estudiamos el comportamiento de estos tres procesos en función de la concentración de calcio. La figura

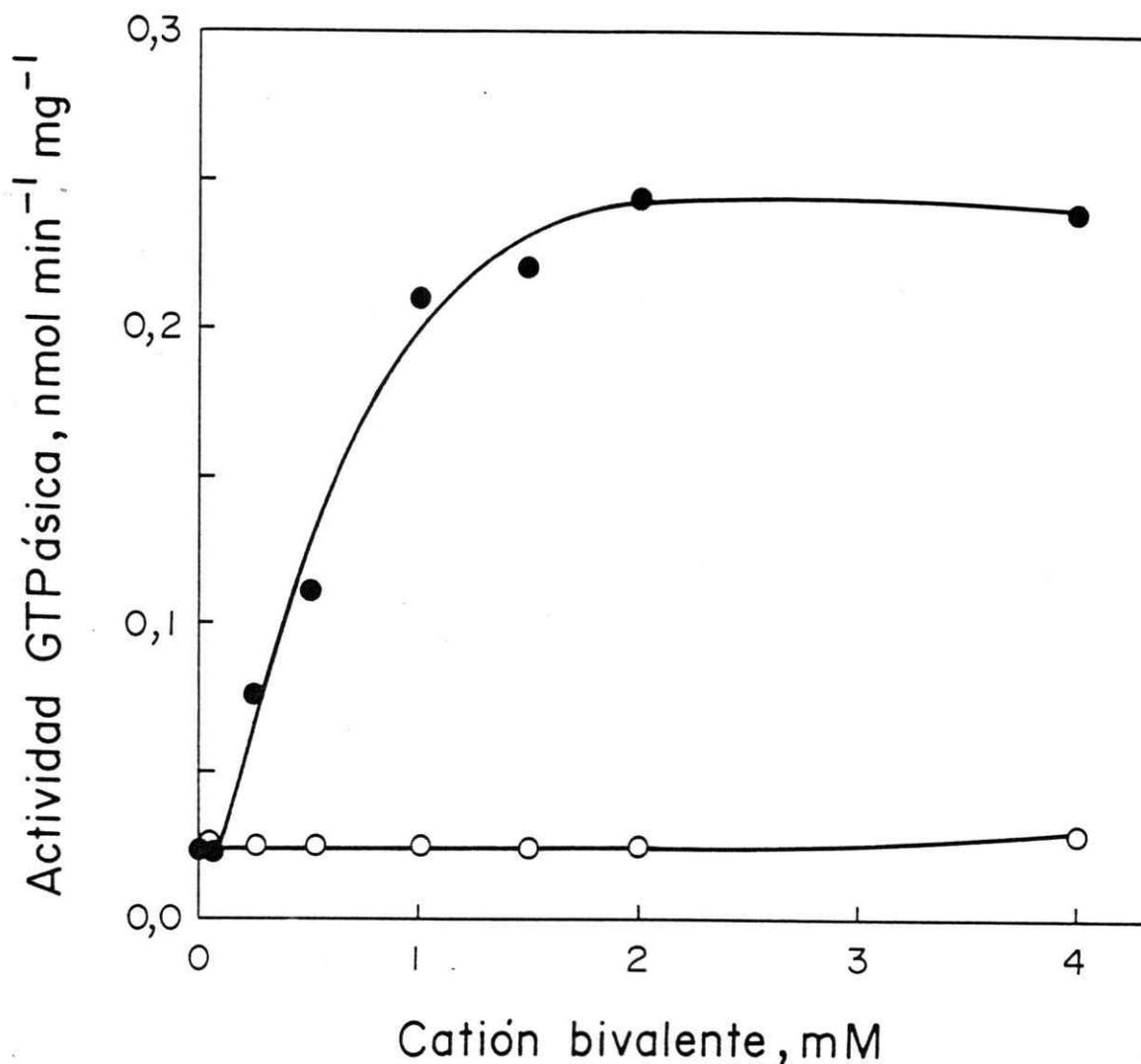


Figura 6: Efecto de la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la velocidad de hidrólisis de GTP asociada a tubulina. Tubulina (2,4 mg/ml) en presencia de 0,1 mM [γ - ^{32}P]-GTP (radiactividad específica 10.253 cpm/nmol) fue incubada a 37°C por 10 min con Ca^{2+} (●) o Mg^{2+} (○), en un volumen final de 0,1 ml. La actividad GTPásica fue determinada como se describe en Materiales y Metodos.

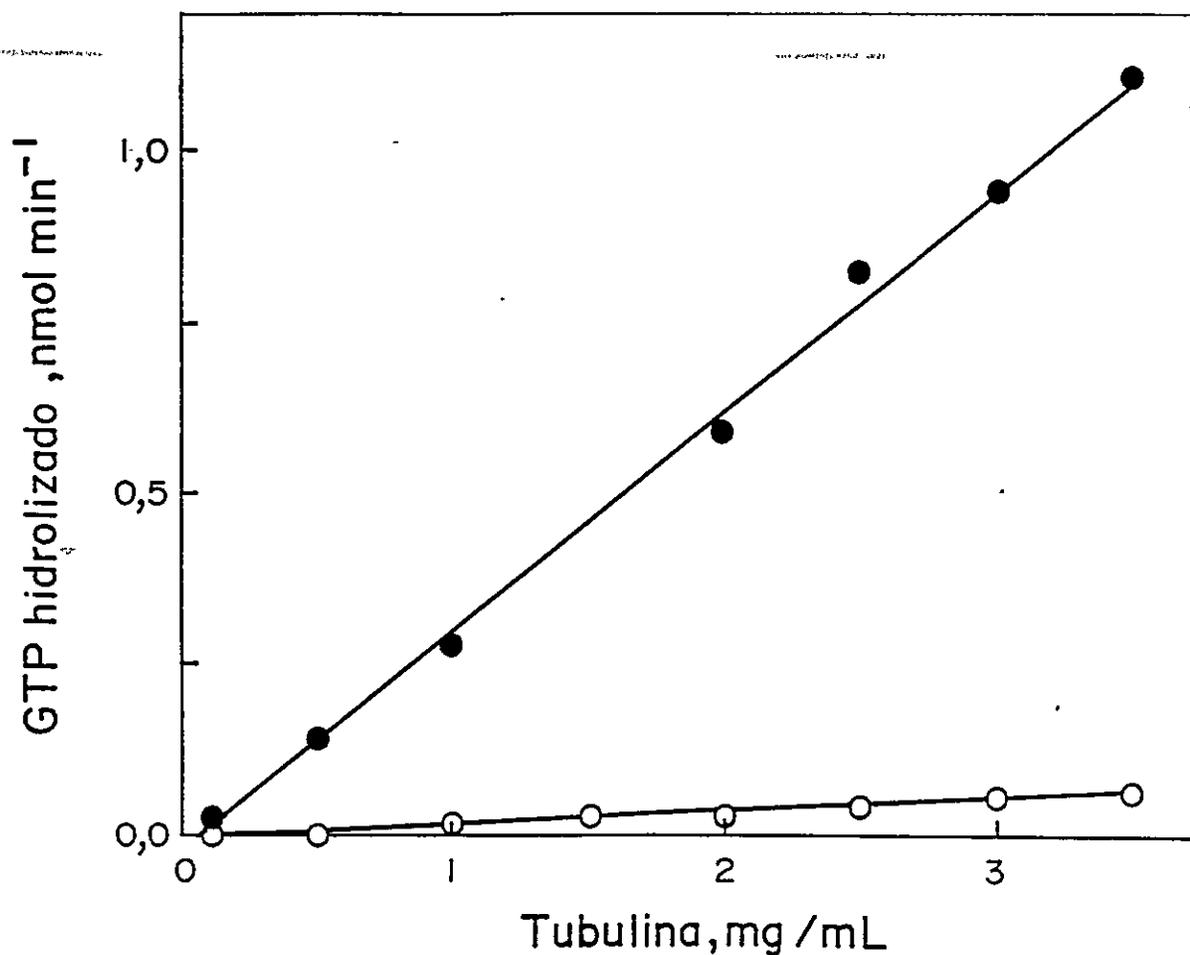


Figura 7: Influencia de la concentración de tubulina sobre la hidrólisis de GTP. Soluciones de diferente concentración de tubulina, en un volumen final de 0,08 ml, fueron incubadas a 37 °C por 15 min bajo las mismas condiciones descritas en la figura 5, con (●) o sin (○) CaCl_2 2 mM. La actividad GTPásica fue determinada como se describe en Metodos.

8 muestra los resultados obtenidos en este experimento. Las tres curvas siguen una conducta de saturación similar, pero el intervalo de concentración de calcio para alcanzar la saturación es distinto en el caso de la despolimerización de microtúbulos, en comparación con los procesos de inhibición de la polimerización y estimulación de la actividad GTPásica de la tubulina, los cuales exhiben una dependencia de calcio muy similar y por lo tanto se podría presumir que son procesos estrechamente ligados. Los valores de $K_{0,5}$ para la estimulación de la actividad GTPásica, la inhibición de la polimerización y la despolimerización de microtúbulos, fueron 0,47, 0,62 y 0,047 mM, respectivamente.

La menor concentración de calcio requerida para despolimerizar los microtúbulos previamente formados en comparación con el intervalo de concentración de Ca^{2+} requerido para inhibir la polimerización e inducir la actividad GTPásica de la tubulina, es esperable, debido a que según la hipótesis propuesta en este proyecto, el ión Ca^{2+} despolimerizaría los microtúbulos preformados uniéndose a las subunidades de tubulina ubicadas al extremo de los microtúbulos y provocando la liberación del fosforilo inorgánico desde los "caps" de tubulina-GDP- P_i . De esta manera, el resultado obtenido, se podría explicar considerando que calcio solo se uniría a las unidades de tubulina del extremo de los microtúbulos.

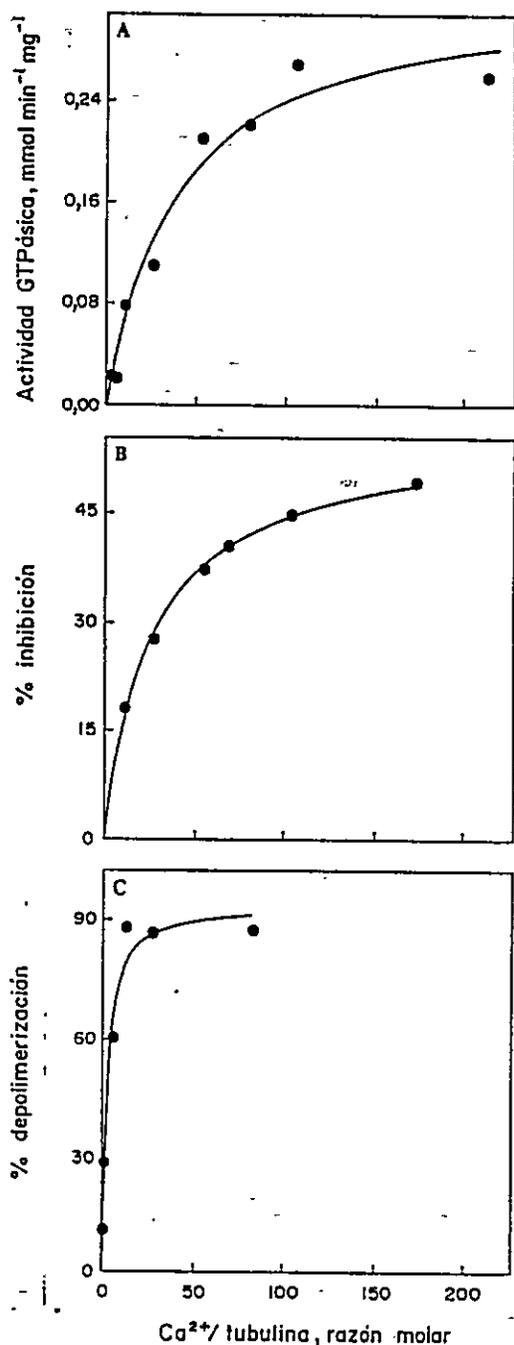


Figura 8: Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la actividad GTPásica de tubulina (A), sobre la inhibición de la polimerización (B) y sobre la despolimerización de microtúbulos (C). Los resultados mostrados en A fueron obtenidos como se describe en la figura 6. En B, la tubulina (2,8 mg/ml) fue incubada a 0 °C por 15 min en amortiguador de polimerización, con las concentraciones de Ca^{2+} indicadas en la figura. La reacción de polimerización fue inducida aumentando la temperatura a 37 °C. El porcentaje de inhibición corresponde a 1 menos el valor máximo de la absorbancia (expresado como la fracción del valor en ausencia de Ca^{2+}) para cada concentración de Ca^{2+} , multiplicado por 100. En C, los microtúbulos fueron polimerizados incubando tubulina (2,3 mg/ml) a 37 °C por 20 min en amortiguador de polimerización. Enseguida se añadió Ca^{2+} en las concentraciones indicadas en la figura y se registró el cambio en la absorbancia a 350 nm. El porcentaje de despolimerización corresponde a la disminución en la absorbancia -medido 5 min después de la adición de Ca^{2+} , dividido por el valor de la absorbancia en ausencia de Ca^{2+} y multiplicado por 100.

Ca^{2+} inhibe la polimerización de tubulina en presencia de análogos no hidrolizables de GTP.

Si la inhibición de la polimerización de tubulina por calcio está relacionada con la hidrólisis de GTP, entonces es esperable que en presencia de un análogo no hidrolizable de GTP, la polimerización no sea afectada por la presencia de concentraciones inhibitorias de Ca^{2+} . El resultado obtenido al analizar el efecto de Ca^{2+} sobre la despolimerización de microtúbulos formados en presencia de GTP(τ S), se muestra en la figura 9. Tubulina en presencia de GTP y en ausencia de Ca^{2+} , polimeriza formando microtúbulos, lo cual se observa mediante el aumento de la absorbancia a 350 nm. En presencia de Ca^{2+} 2 mM, la absorbancia aumenta muy poco, en comparación con el control, lo que indica que los microtúbulos no se forman en estas condiciones. Cuando el GTP ha sido reemplazado por su análogo no hidrolizable GTP(τ S), la tubulina polimeriza siguiendo una conducta cinética distinta a la obtenida en el experimento control, sin embargo los microtúbulos formados son idénticos a los obtenidos en presencia de GTP. Cuando la tubulina-GTP(τ S) fue incubada con Ca^{2+} 2 mM, no se observó ninguna diferencia en la cinética de polimerización en comparación con el experimento realizado en ausencia de Ca^{2+} . Este resultado indica que Ca^{2+} no fue capaz de inhibir la polimerización de tubulina-GTP(τ S).

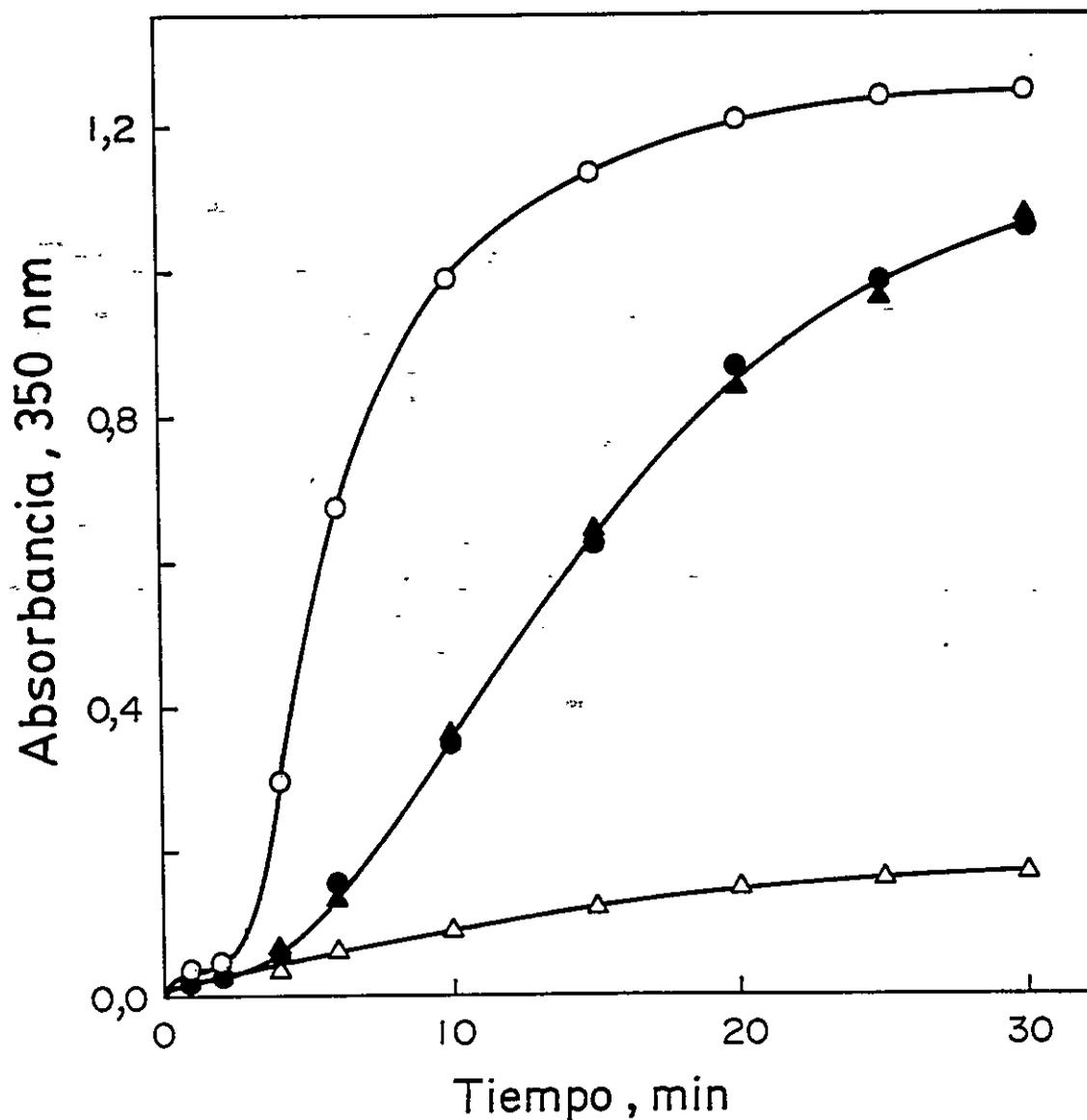


Figura 9. Efecto de Ca^{2+} sobre la polimerización de tubulina en presencia de GTP(γ S). Tubulina (2,5 mg/ml) fue incubada a 0°C por 15 min en la siguiente mezcla de reacción: MES 0,1 M, pH 6,4, MgCl_2 15 mM, glicerol 3,8 M y 1 mM de nucleótido: GTP sin (\circ) y con CaCl_2 (Δ) o GTP(γ S) sin (\bullet) y con CaCl_2 (\blacktriangle). Después de la incubación, se indujo la polimerización aumentando la temperatura a 37°C y se registró la absorbancia a 350 nm. El GTP fue reemplazado por GTP(γ S), mediante filtración en una columna de Sephadex G-25, equilibrada en la mezcla de reacción indicada más arriba.

Relación entre el mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina por Ca^{2+} y la actividad GTPásica inducida por el catión.

En relación al mecanismo de inhibición de la polimerización de la tubulina por calcio, los resultados encontrados en este trabajo indican que existe una estrecha relación entre la inhibición de la polimerización y la hidrólisis del GTP unido a la tubulina. Surgen, entonces, las siguientes preguntas: ¿De qué tipo es esta relación? ¿Es la inhibición de la polimerización de la tubulina por Ca^{2+} una consecuencia de la hidrólisis del GTP?. Los resultados obtenidos se pueden explicar, al menos, de dos maneras. En primer término, que la inhibición de la polimerización de la tubulina por calcio, sea mediada por la hidrólisis del GTP, vale decir, que la unión de Ca^{2+} a la tubulina determine que toda la tubulina-GTP se convierta a tubulina-GDP y que sea este hecho el que impida la formación de microtúbulos. La otra posibilidad es que la inhibición de la polimerización de la tubulina y la inducción de su actividad GTPásica sean procesos que ocurran en forma paralela y ambos sean el producto de un cambio conformacional producido por la unión de Ca^{2+} , vale decir, según esta explicación, la unión de Ca^{2+} llevaría a la tubulina a un estado conformacional que induciría la hidrólisis del GTP y que sería incapaz de formar microtúbulos.

Para distinguir entre estas dos posibilidades, se estudió la reversibilidad en el tiempo de la inhibición de

la polimerización de la tubulina por Ca^{2+} . Esto se realizó complejando el Ca^{2+} del sistema con el agente quelante EGTA. Si la inhibición de la polimerización es producto de un cambio conformacional dependiente de la unión de calcio a la tubulina, entonces al remover el ión, la tubulina debiera recuperar su capacidad de polimerizar. Si por el contrario, la inhibición de la polimerización fuese dependiente de la hidrólisis del GTP unido a la tubulina, entonces sería esperable que al complejar el calcio no se restaurara la capacidad de la tubulina para polimerizar, a menos que se agregase GTP adicional, pues la hidrólisis del GTP es un proceso irreversible. Los resultados (figura 10) indican que en aquellos casos en que se preincubó con Ca^{2+} por 5 y 10 min antes de agregar el agente quelante, la adición de EGTA revirtió la capacidad de la tubulina para formar microtúbulos. Se concluye de este resultado que el mecanismo de inhibición de la polimerización de tubulina por calcio sería mediado por un cambio conformacional producto de la unión del catión, el cual en forma paralela provocaría también la inducción de la actividad GTPásica de la tubulina. Es decir, la hidrólisis del GTP no sería requisito para la inhibición de la polimerización de la tubulina. Pese a lo anterior, es interesante señalar que cuando se preincubó con Ca^{2+} por 20 min antes de la adición de EGTA, la remoción del calcio no revirtió la capacidad de la tubulina para formar microtúbulos. Esto se puede explicar por la conversión de tubulina-GTP a tubulina-GDP a tiempos

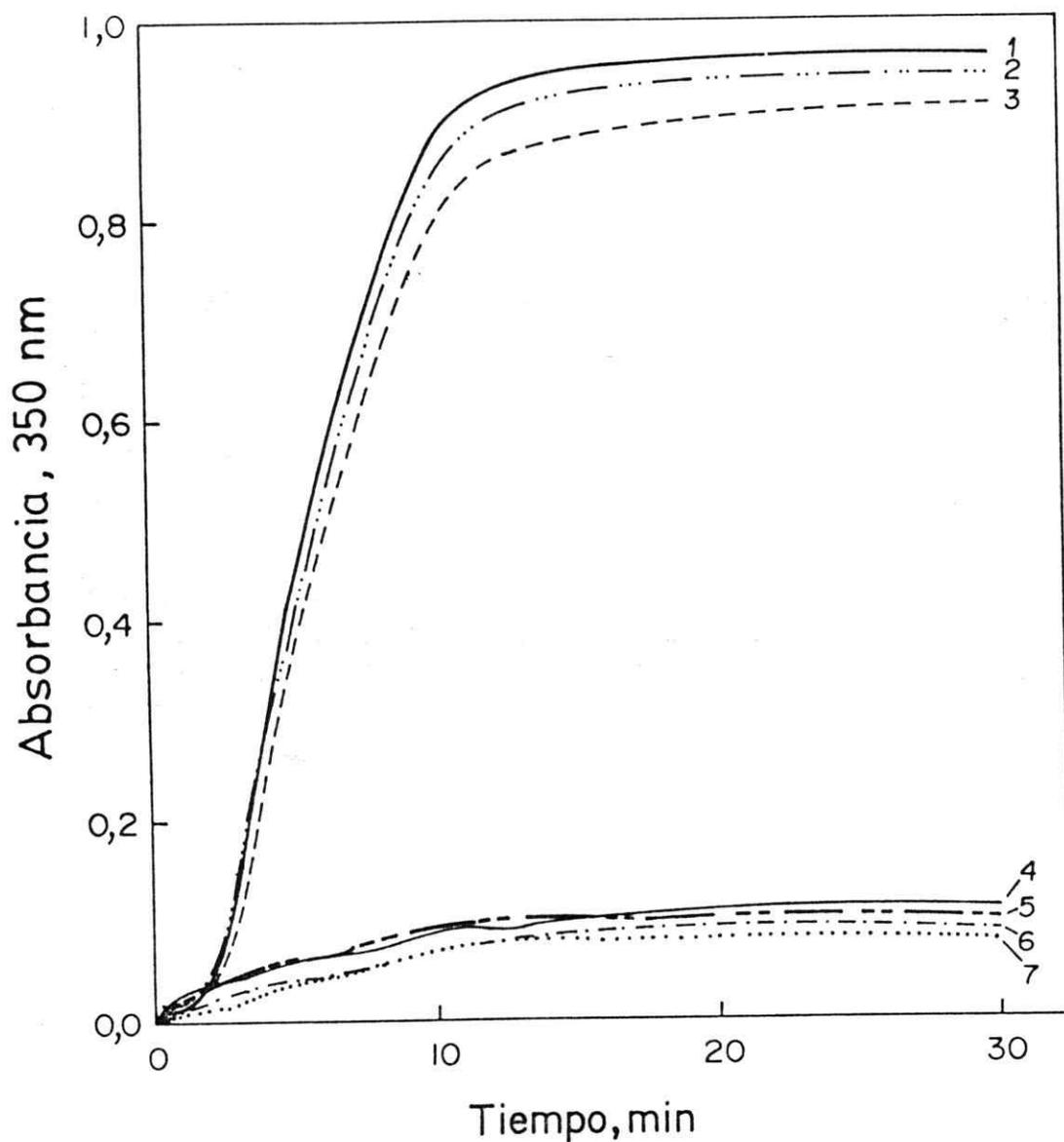


Figura 10. Efecto del agente quelante EGTA en la reversión de la inhibición de la polimerización de tubulina por Ca^{2+} . Tubulina (2,5 mg/ml) en amortiguador de polimerización fue incubada por distintos tiempos (5, 10 y 20 minutos) con CaCl_2 2 mM a 4 °C. Enseguida una parte de cada muestra fue inducida a polimerizar, aumentando la temperatura a 37 °C y se registró la absorbancia. La otra parte fue incubada por 5 minutos con EGTA 3 mM, antes de inducir la polimerización. (línea 1) control sin calcio. Incubado por 5 min (línea 5), 10 min (línea 6) y 20 min (línea 7) con CaCl_2 2 mM. Incubado por 5 min (línea 2), 10 min (línea 3) y 20 min (línea 4) con CaCl_2 2 mM y luego con EGTA 3 mM.

de incubación con Ca^{2+} superiores a 20 min. Así, aunque la hidrólisis del GTP no sería un requisito para la inhibición de la polimerización de la tubulina, cuando todo el GTP se convierte a GDP, la tubulina es incapaz de polimerizar.

Efecto de Ca^{2+} sobre microtúbulos incubados con un análogo de P_i .

Antes de describir los resultados obtenidos con el análogo de P_i , explicaremos las causas que nos llevaron a realizar estos experimentos. Para investigar la importancia de la liberación de P_i desde los extremos de los microtúbulos, en el mecanismo de despolimerización inducido por Ca^{2+} , nos propusimos correlacionar la despolimerización inducida por calcio, medida por la disminución de la absorbancia a 350 nm, con la liberación de fosforilo inorgánico radiactivo de microtúbulos ensamblados en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$. Como resultado de este experimento se observó que la sensibilidad del método utilizado no era suficiente para detectar los pequeños cambios en la concentración de P_i producidos por la hidrólisis de GTP, inducida por Ca^{2+} . Debido a esto no pudimos evaluar el efecto de Ca^{2+} sobre la liberación de fosforilo inorgánico. La imposibilidad de detectar el P_i liberado durante la despolimerización de microtúbulos por calcio, se puede explicar considerando, por una parte, que la cinética de hidrólisis de GTP que acompaña a la polimerización de tubulina pasa por dos fases: una fase inicial de rápida liberación de fosforilo inorgánico y una segunda fase en que se establece un estado estacionario de lenta liberación de

fosforilo al medio (Carlier, 1982). De esta manera, los microtúbulos en todo momento exhiben una actividad GTPásica basal. Por otra parte, según el modelo propuesto por Carlier y Pantaloni (Carlier y col., 1988; 1989; Melki y col., 1990), los microtúbulos estables serían aquellos en los cuales los extremos se conservan como tubulina-GDP- P_i y la parte intermedia como tubulina-GDP. Considerando este modelo, la liberación de fosforilo inorgánico inducida por calcio sólo afectaría a la tubulina ubicada en los extremos de los microtúbulos, la cual es poca en cantidad y por lo tanto, la eventual liberación de P_i desde los extremos, inducida por calcio, estaría enmascarada.

Para evitar el problema experimental señalado y como alternativa para estudiar el papel de la liberación de P_i en la despolimerización de microtúbulos por calcio, se realizaron estudios basados en los hallazgos del grupo de Pantaloni (Carlier y col., 1988), quienes han descrito que dos compuestos fluorados, el AlF_4^- y BeF_3^- , se comportan como análogos de P_i y son capaces de desplazarlo de su sitio de unión en la tubulina ubicada en los extremos de los microtúbulos, formándose los complejos tubulina-GDP- BeF_3^- o tubulina-GDP- AlF_4^- , según sea el caso. La afinidad de estos compuestos por el sitio de unión del fosfato en la tubulina es 3 veces mayor que la afinidad del P_i (Carlier y col., 1988). Considerando lo anterior, si la hipótesis propuesta en esta tesis es correcta, vale decir si la unión de Ca^{2+} a la tubulina del extremo de los microtúbulos induce la

liberación del P_i y con ello la desestabilización de los microtúbulos, se esperaría que los microtúbulos que contienen en sus extremos los análogos fluorados fueran menos sensibles al efecto despolimerizante de calcio. La figura 11 muestra el efecto de distintas concentraciones de calcio sobre microtúbulos control y sobre microtúbulos que contienen en sus extremos tubulina-GDP- AlF_4^- . En microtúbulos control el porcentaje de despolimerización máximo (90%) se logró con concentraciones de Ca^{2+} iguales o superiores a 0,5 mM. En tanto que en microtúbulos incubados con AlF_4^- , con esta concentración de Ca^{2+} solamente se obtuvo alrededor de un 15% de despolimerización. Se concluye que los microtúbulos en donde el P_i ha sido reemplazado por su analogo estructural AlF_4^- , son considerablemente menos afectados por Ca^{2+} que los microtúbulos control.

Los resultados mostrados permiten concluir que existe una estrecha relación entre la hidrólisis de GTP y el mecanismo de regulación de la polimerización de tubulina por Ca^{2+} . Como se discute en detalle en la sección Discusión, esta relación se debe a que al unir Ca^{2+} con alta afinidad la tubulina sufre un cambio conformacional, que determina la presencia de un estado conformacional distinto, que se caracteriza por ser incapaz de formar microtúbulos y por ser muy activo en la hidrólisis de GTP. Con el propósito de investigar la naturaleza del cambio estructural provocado por la unión de calcio, se procedió a estudiar las características moleculares de los sitios de unión de Ca^{2+} en la tubulina.

CARACTERIZACION DE LOS SITIOS DE UNION DE CALCIO EN LA TUBULINA

Unión de Ca^{2+} a la tubulina.

Como se explicó en la Introducción, en la literatura existen resultados contradictorios con respecto al número de sitios de unión de alta afinidad de Ca^{2+} en la tubulina. Por una parte Solomon (1977) y Mejillano y Himes (1991) señalan que habría un sitio de alta afinidad por cada molécula de tubulina, mientras que otros (Serrano y col., 1986; Grisham y col., 1980) han descrito que estos sitios serían dos. Para clarificar este punto se realizaron experimentos de titulación de tubulina con el isótopo radiactivo $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

La figura 12 muestra los resultados de la titulación con Ca^{2+} , utilizando el procedimiento de microparticón en membranas de Amicon, como se describe en Métodos. Este método consiste en filtrar la muestra a través de membranas que tienen un tamaño de poro adecuado para excluir moléculas de masa molecular superior a 10.000 Da, de manera que solo los iones libres serán colectados en el eluido de la centrifugación. Los resultados mostrados en la figura 12, que corresponden a experimentos realizados con varias preparaciones de tubulina, sugieren que Ca^{2+} se uniría al menos a dos tipos de sitios en la molécula de tubulina, los cuales difieren en su afinidad por ella. Esto se observa más claramente al graficar los resultados mediante una transformación conocida como gráfica de Scatchard (Fig. 13).

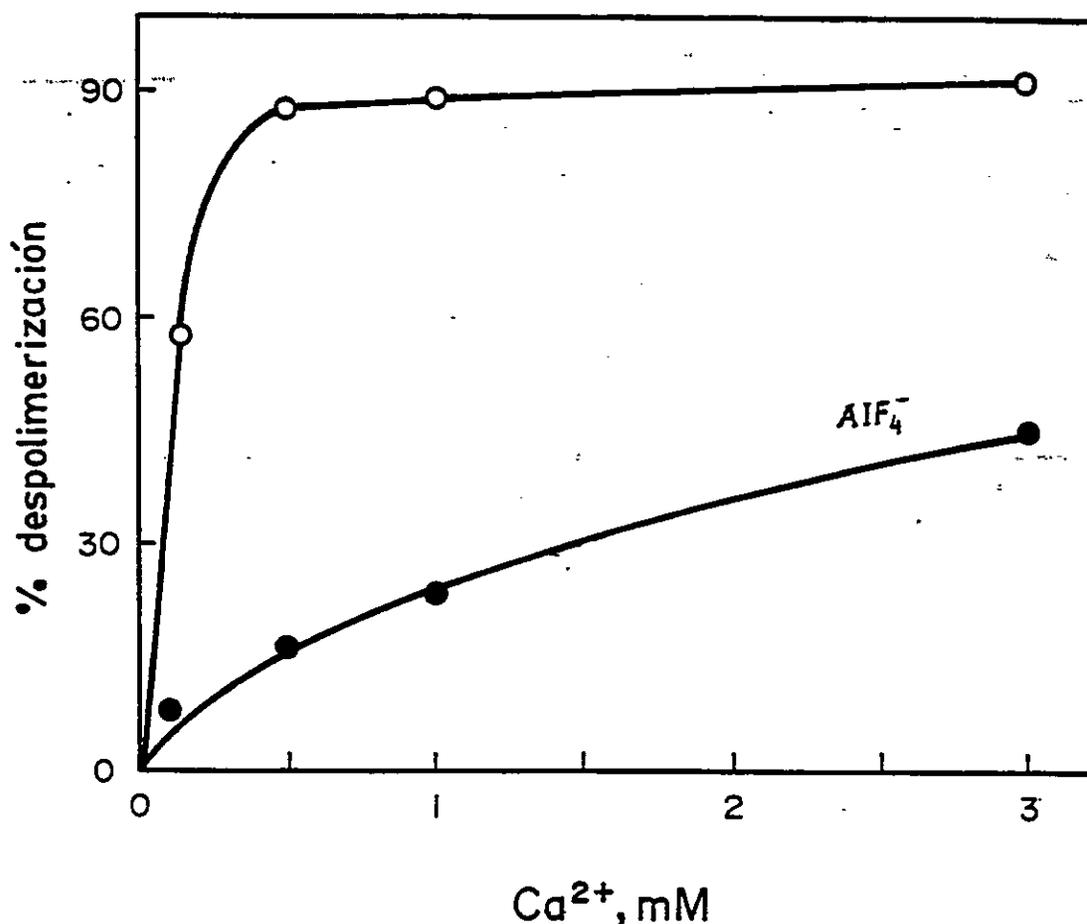


Figura 11. Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la despolimerización de microtúbulos incubados con AlF_4^- , un análogo estructural de P_i . Dos muestras de tubulina (2,7 mg/ml) en amortiguador de polimerización fueron inducidas a polimerizar aumentando la temperatura desde 0 a 37 °C. Después de 20 min, AlF_4^- (NaF 2 mM, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 10 μM) fue añadida a una de las muestras y amortiguador de polimerización a la otra. Luego, se agregaron diferentes concentraciones de Ca^{2+} a alícuotas de 0,7 ml de cada muestra y después de 5 min la absorbancia fue registrada a 350 nm. El porcentaje de despolimerización fue obtenido como se describe en la figura 8C.

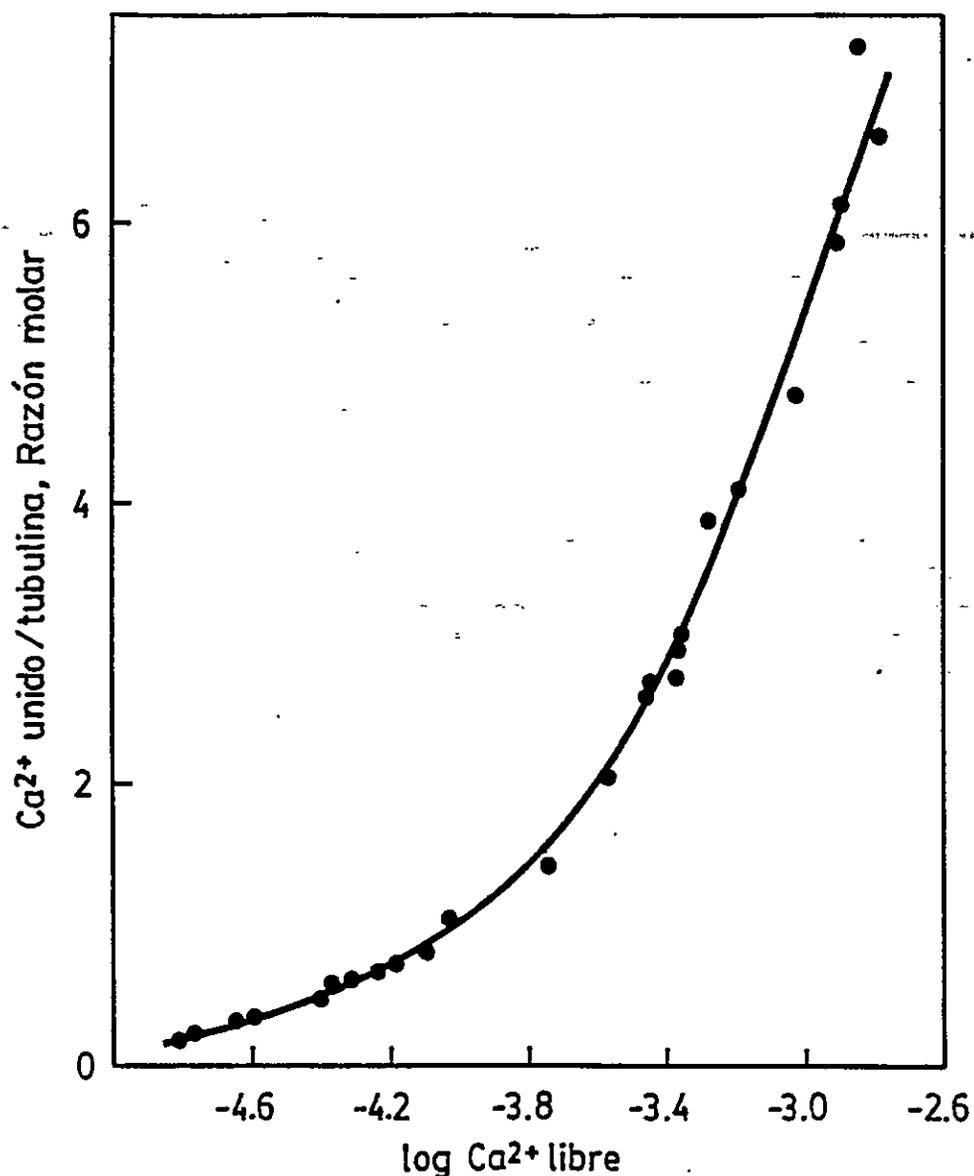


Figura 12: Curva de saturación de la tubulina con Ca^{2+} , determinada por el método de ultrafiltración. Tubulina (1,2 mg/ml) en amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,0, se incubó con distintas concentraciones de CaCl_2 por 15 min a 25 °C. La concentración de Ca^{2+} libre se determinó midiendo la radiactividad del eluido y la concentración de Ca^{2+} unido se calculó mediante la diferencia entre la concentración de Ca^{2+} total y del Ca^{2+} libre.

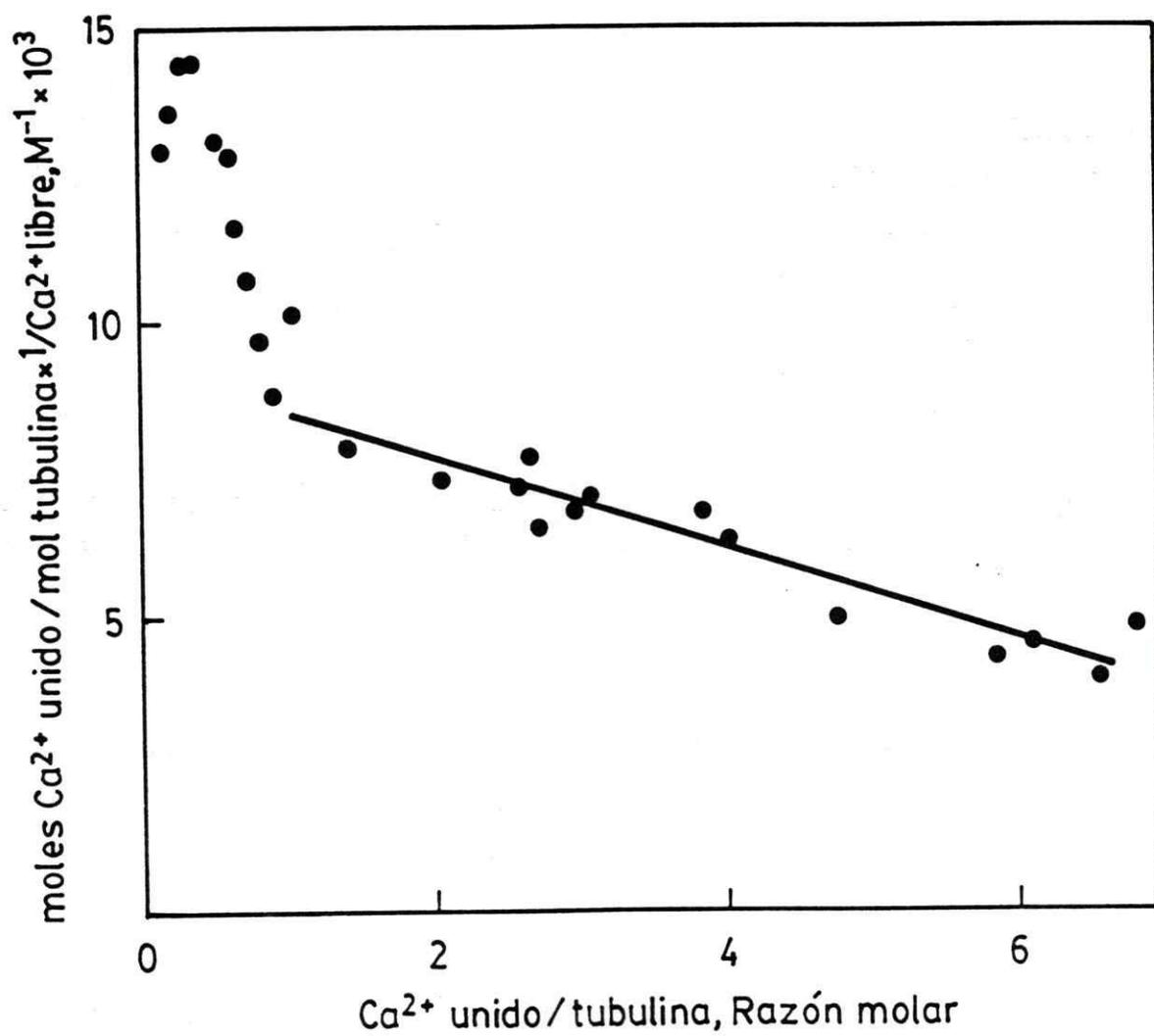


Figura 13: Gráfica de Scatchard para los resultados mostrados en la figura 12. La recta que se dibuja corresponden a las líneas de regresión.

Con un programa de ajuste computacional se estimó que habrían $1,83 \pm 0,26$ sitios de unión de alta afinidad por molécula de tubulina, los cuales presentan una constante de disociación de $2,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M y un coeficiente de Hill de $1,42 \pm 0,07$, y $10,2 \pm 2,9$ sitios de unión de baja afinidad ($K_d = 1,54 \pm 0,41 \times 10^{-3}$ M). Es decir estos resultados concuerdan con aquellos que mostraban la existencia de 2 sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} en la molécula de tubulina. Por otra parte estos resultados indican que la unión de calcio a los sitios de alta afinidad presentaría cooperatividad positiva.

La tabla II muestra la comparación entre los parámetros de unión y de ajuste obtenidos al ajustar los resultados experimentales a una curva de saturación sigmoidea (con cooperatividad positiva, vale decir índice de Hill mayor que 1,0) o a una curva de saturación hiperbólica (sin cooperatividad, es decir con índice de Hill igual a 1,0). Los parámetros de unión obtenidos considerando un índice de Hill igual a 1,0, presentan un error estándar alto, productos del ajuste computacional. El porcentaje de error para los parámetros ajustados considerando un índice de Hill igual a 1,0, varía entre 47 y 88%, en tanto que este porcentaje para los parámetros obtenidos utilizando un índice de Hill igual a 1,42, varía entre 14 y 40%. El error estándar asociado a los parámetros de unión, es uno de los criterios que se utiliza para discriminar entre dos ajustes posibles a los mismos datos. Por esta razón, se concluye que los resultados se ajustan mejor a una curva sigmoidea para

Tabla II. Comparación de los valores de los parámetros de unión y de ajuste obtenidos al ajustar los puntos experimentales a curvas con o sin cooperatividad positiva ^a.

Parámetro ^b	CON COOPERATIVIDAD			SIN COOPERATIVIDAD		
	valor	error estándar ^c	% de error ^d	valor	error estándar	% de error
n1	1,83	0,26	14,2	2,09	1,84	88,0
n2	10,2	2,90	28,4	9,13	4,31	47,2
Kd1 (μM)	27,6	11,10	40,2	870,0	652,4	75,0
Kd2 (mM)	1,54	0,41	26,6	1,14	0,73	64,1

^a La unión de calcio a tubulina fue estudiada como se describe en la tabla III, utilizando el método de micropartición en membranas YMT. Los parámetros de unión fueron obtenidos mediante ajuste computacional a los puntos experimentales, usando el programa ENZFITTER. Los datos que se muestran en la parte izquierda de la tabla (CON COOPERATIVIDAD), se obtuvieron ajustando los puntos a una ecuación que considera un índice de Hill igual a 1,42 y los datos que se muestran en la parte derecha de la tabla (SIN COOPERATIVIDAD), se obtuvieron ajustando a una ecuación con índice de Hill igual a 1,0.

^b n1 y n2, corresponden al número de sitios de unión de Ca²⁺ de alta y de baja afinidad, respectivamente. Kd1 y Kd2, corresponden a las constantes de disociación aparentes para la unión de Ca²⁺ a los sitios de alta y baja afinidad, respectivamente.

^c El error estándar mostrado corresponde al alejamiento de los puntos experimentales con la curva teórica.

^d El % de error se obtuvo multiplicando el error estándar por 100 y dividiendo por el valor del respectivo parámetro.

la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad. Esta conclusión es reforzada utilizando la prueba del cociente de la suma de los primeros y de los últimos residuales elevados al cuadrado (Endrenyi y Kwong, 1981). Esta prueba mide el alejamiento de los puntos experimentales de la curva teórica. El significado estadístico del valor calculado para este cociente puede ser evaluado, en un nivel de probabilidad determinado, comparándolo con los valores de la distribución F, con el mismo número de grados de libertad que el número de puntos utilizados para calcular el cociente. El cociente calculado, considerando los primeros y los últimos cuatro residuales, fue de 40,4 y 76,9 para el ajuste a una curva sigmoidea e hiperbólica, respectivamente. Comparando con los valores de la distribución F, se concluye que los resultados se ajustan a una curva sigmoidea para la unión de Ca^{2+} con alta afinidad, con una probabilidad mayor que 0,85.

Estos resultados indican que la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad, sería cooperativa. Esto no había sido descrito anteriormente, de modo que para descartar errores experimentales debidos al método utilizado en la titulación, se decidió repetir los experimentos utilizando un método alternativo, que separa a los cationes libres de los cationes unidos mediante un principio distinto. El método que se escogió fue el descrito en el año 1977 por Penefsky (para detalles del procedimiento experimental, ver "Métodos"), que se basa en filtrar la muestra a través de

una mini columna empacada con Sephadex G 25. Los iones libres interactúan con las esferas de Sephadex siendo retenidos por la columna, mientras que los iones unidos a la macromolécula son colectados en el eluido de la columna. La figura 14 muestra los resultados encontrados al titular tubulina con $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mediante este procedimiento. La tabla III muestra los valores de los parámetros de unión de calcio a la tubulina obtenidos por ambos métodos. De los resultados obtenidos se concluye que el ión Ca^{2+} interactuaría cooperativamente con aproximadamente dos sitios de unión de alta afinidad en la molécula de tubulina y alrededor de 10 sitios de baja afinidad.

Influencia de Ca^{2+} sobre la formación de agregados de tubulina.

La unión de ciertos ligandos es capaz de inducir la agregación de la proteína. En este caso las curvas de saturación muestran la forma típica de una conducta de unión que presenta cooperatividad positiva o negativa, aunque la unión del ligando se produzca a sitios independientes y no interactuantes. Esta aparente cooperatividad es debida a la agregación de la proteína y ha sido descrita en detalle por Timasheff y col. (1991).

Con el propósito de investigar si calcio es capaz de inducir la agregación de la tubulina bajo las condiciones empleadas en los experimentos y por esto introducir una cooperatividad artificial en la unión del catión, se evaluó el efecto de diversas concentraciones de calcio sobre la

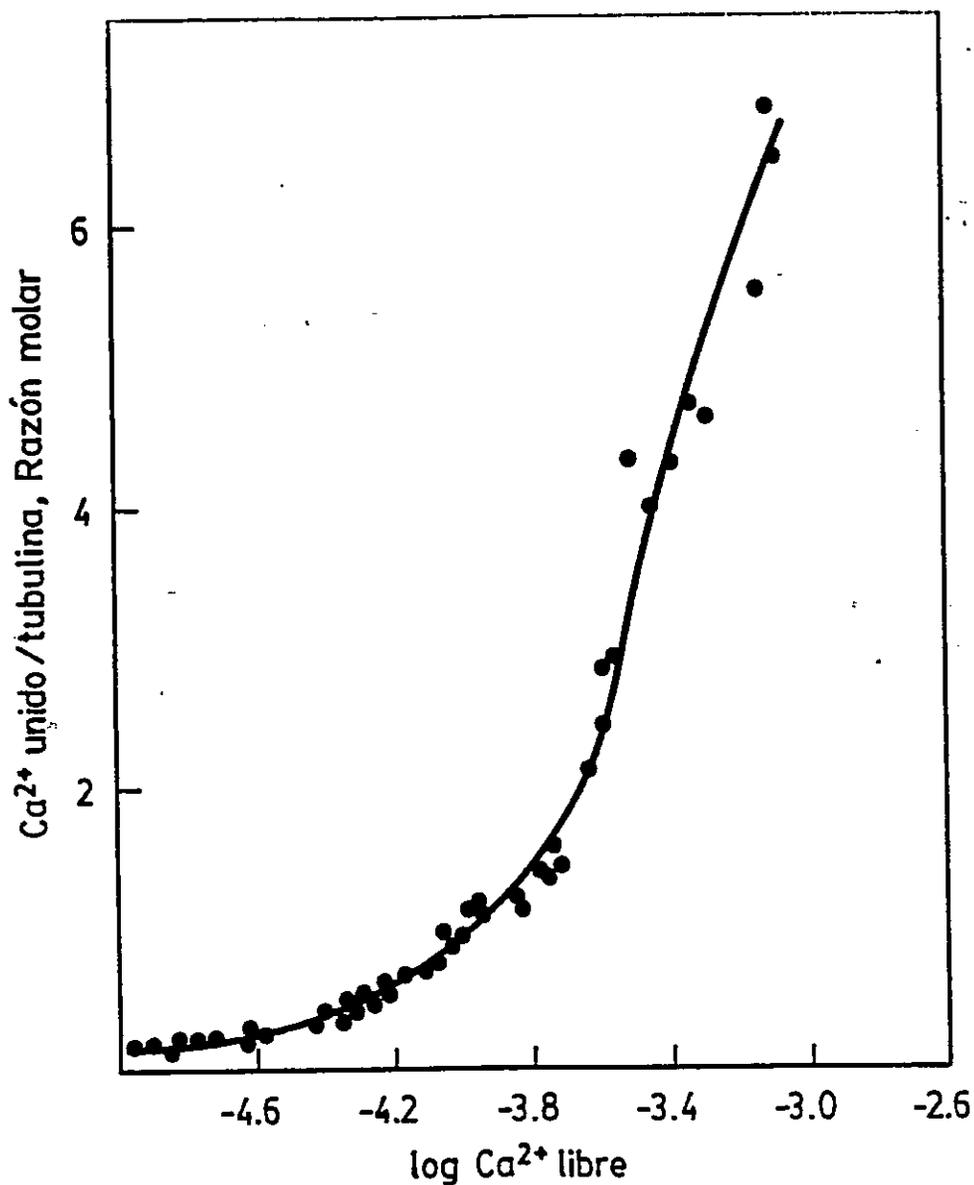


Figura 14: Curva de saturación de la tubulina con Ca^{2+} obtenida a través del método de Penefsky. La tubulina (2,0 mg/ml) en amortiguador PIPES 50 mM pH 6,0, se incubó con diferentes concentraciones de CaCl_2 por 15 min a 25 °C. Enseguida se separaron los iones unidos a tubulina mediante filtración en mini columnas de Sephadex G 25 y se midió la radiactividad del eluido. La concentración de Ca^{2+} libre fue determinada como la diferencia entre la radiactividad total y la del complejo Ca^{2+} -tubulina una vez separado el calcio libre.

Tabla III. Parámetros de unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad en la tubulina obtenidos a través de dos métodos alternativos ^a.

Método	Número de sitios	Kd (M)	Indice de Hill
Micropartición	1,83 ± 0,26	2,76 ± 1,11 x 10 ⁻⁵	1,42 ± 0,07
Filtración	2,56 ± 0,54	1,53 ± 0,65 x 10 ⁻⁵	1,44 ± 0,05

^a La unión de calcio a tubulina fue estudiada como se describe en Métodos, es decir usando el isótopo radiactivo de Ca^{2+} y separando los iones no unidos a proteína por el método de filtración en minicolumnas descrito por Penefski (1977) o el método de ultrafiltración en membranas YMT, utilizando el sistema de micropartición MPS-1 de Amicon. Los parámetros de unión fueron obtenidos mediante ajuste computacional a los puntos experimentales, usando el programa ENZFITTER y el error estándar mostrado corresponde al alejamiento de dichos puntos con la curva teórica.

aparición de agregados de tubulina. El experimento consistió en incubar tubulina con distintas concentraciones de calcio por 15 min a 25 °C. Enseguida se procedió a separar la tubulina de los eventuales agregados, para lo cual se utilizaron dos métodos alternativos: ultracentrifugación a 120.000 x g por 40 min (tabla IV) que permite la separación de agregados amorfos de masa molecular mayor que aproximadamente 10.000 kDa y filtración en una columna de Fractogel TSK HW 55 que excluye moléculas de masa molecular mayor de 300 kDa (Fig. 15). Los resultados presentados en la tabla IV muestran que hasta una concentración de Ca^{2+} de 2 mM, la concentración de la proteína en el líquido sobrenadante de la centrifugación permaneció constante, dentro del error experimental. Para analizar la posible inducción de agregados de menor masa molecular, se filtraron dos muestras idénticas en presencia y en ausencia de Ca^{2+} , a través de Fractogel TSK HW 55. La figura 15 muestra que los perfiles de elución obtenidos en presencia y en ausencia de Ca^{2+} 0,1 mM, donde se encuentran saturados aproximadamente el 60% de los sitios de alta afinidad, fueron idénticos. La aparición del pequeño pico (6%) en el volumen de exclusión de la columna se atribuye a la manipulación de la muestra en ausencia de GTP y glicerol, pues tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} este pico está presente y no varía. Los resultados de ambos experimentos sugieren que la saturación con Ca^{2+} de los sitios de alta afinidad no induce la formación de agregados detectables por alguno de los métodos señalados.

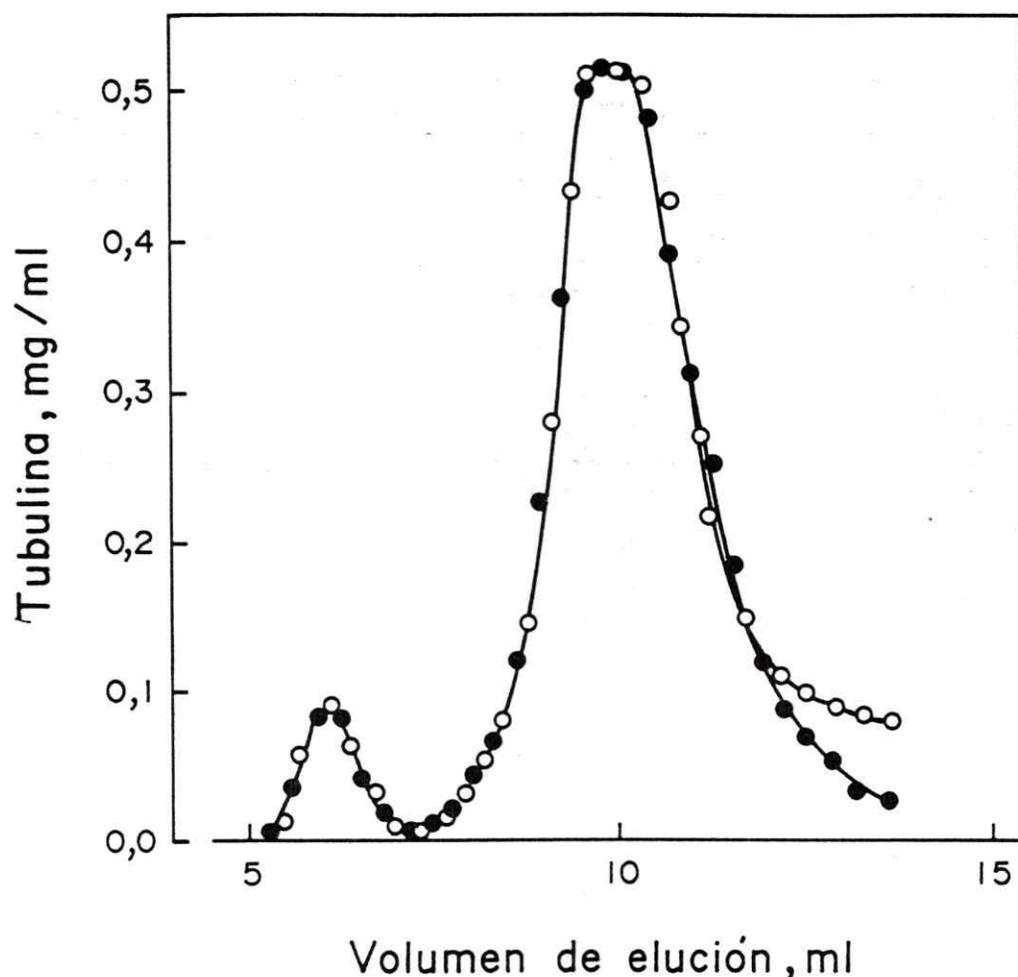


Figura 15. Perfil de elución de tubulina desde una columna de Fractogel TSK HW 55 en ausencia (●) o en presencia (○) de Ca^{2+} . Tubulina, libre de agregados, fue concentrada mediante centrifugación en el Sistema de Micropartición Amicon MPS-1 hasta lograr una concentración de 5,0 mg/ml. Enseguida la muestra se separó en dos alícuotas de 0,3 ml, una de las cuales fue incubada en presencia de CaCl_2 0,1 mM y la otra en un volumen igual de amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,0, por 15 min a 25°C. Enseguida ambas muestras fueron filtradas a través de dos columnas iguales (0,8 x 25 cm) empacadas con Fractogel TSK HW 55 y equilibradas con amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,0, con o sin CaCl_2 0,1 mM, según si la muestra fue incubada con o sin el catión, respectivamente. Se colectaron fracciones de 0,6 ml cada una y se determinó la concentración de tubulina como se describe en Métodos.

Tabla IV. Efecto de la concentración de Ca^{2+} sobre la formación de agregados de tubulina.

Ca^{2+} total (mM)	tubulina en el sobrenadante (mg/ml)
0,0	1,09
0,2	1,03
0,5	0,98
1,0	1,08
2,0	1,12

Tubulina libre de agregados en amortiguador C, se incubó por 15 min a 37 °C en presencia de las concentraciones de calcio indicadas en la tabla y enseguida se centrifugó cada muestra a 120.000 x g por 40 min, en una centrífuga impulsada por aire Beckman. La concentración de tubulina del líquido sobrenadante fue determinada como se indica en la sección Métodos.

Con el fin de analizar si la cooperatividad positiva encontrada en la unión de calcio a la tubulina es dependiente de la concentración de proteína, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de tubulina sobre el coeficiente de Hill de la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad. La tabla V muestra los resultados obtenidos en un experimento en el cual se titularon soluciones de tubulina de diferente concentración con dos concentraciones de calcio, por el método de ultrafiltración en membranas de Amicon. El índice de Hill fue calculado utilizando en la ecuación 2 los valores conocidos de la concentración de calcio (C_1 y C_2), y el valor de la constante de disociación aparente (K_D), y los valores determinados experimentalmente de la unión de calcio para cada condición (ν_1 y ν_2).

De acuerdo a la ecuación, definida en Métodos, y considerando solo los sitios de alta afinidad, la razón de unión para dos concentraciones diferentes de Ca^{2+} , a una concentración fija de tubulina, queda expresada de la siguiente forma:

$$\frac{\nu_1}{\nu_2} = \frac{[C_1]^h (K_D + [C_2]^h)}{(K_D + [C_1]^h) [C_2]^h} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Los resultados mostrados en la tabla IV indican que el coeficiente de Hill y por tanto la conducta cooperativa de la unión de calcio a la tubulina, no fue afectada por la concentración de proteína.

Tabla V. Efecto de la concentración de tubulina sobre el coeficiente de Hill para la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad en la tubulina.^a

Concentración de tubulina (mg/ml)	Indice de Hill
0,5	1,42
1,0	1,45
2,0	1,44
3,0	1,44

^a La titulación de tubulina con calcio fue realizada a través del sistema de micropartición MPS-1 Amicon, como se describe en la sección Métodos.

Los resultados mostrados en las tablas IV y V y en la figura 15, sugieren que la cooperatividad positiva obtenida en los estudios de unión de calcio a la tubulina no es producto de la agregación de la proteína.

Correlación entre la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad y la inhibición de la polimerización.

De los resultados de la unión de calcio a la tubulina, se concluye que existen aproximadamente 2 sitios de alta afinidad y entre 9 a 10 sitios de baja afinidad para Ca^{2+} por cada molécula de tubulina. Surge, entonces, la pregunta ¿cuáles de estos sitios son los responsables del efecto inhibitorio de calcio sobre la polimerización de la tubulina?. Para responder esta pregunta, se estudió la dependencia de la inhibición de la polimerización y de la unión de Ca^{2+} con respecto a la concentración del ión.

La tabla VI muestra los valores de la concentración de Ca^{2+} , necesarios para lograr la semisaturación ($K_{0,5}$) de distintas funciones de la tubulina afectadas por el ión. Al comparar estos valores, se puede concluir que la inducción de la actividad GTPásica y la inhibición de la polimerización de la tubulina por calcio, ocurren por la unión del catión a los sitios de alta afinidad de la tubulina, principalmente. El valor más pequeño de $K_{0,5}$ para el proceso de despolimerización de los microtúbulos, sugiere que la tubulina tiene mayor afinidad por Ca^{2+} cuando está incorporada a los microtúbulos que cuando ella se encuentra libre en solución.

Tabla VI. Constantes de semisaturación para distintas funciones de calcio en la tubulina.^a

FUNCION	$K_{0,5}$ ($\times 10^{-4}$ M)
Unión a sitios de alta afinidad	5,5 \pm 2,8
Unión a sitios de baja afinidad	19,8 \pm 5,5
Inhibición de la polimerización	6,2 \pm 0,5
Despolimerización de microtúbulos	0,5 \pm 0,015
Inducción de la actividad GTPásica	4,7 \pm 1,2

^a Los valores de $K_{0,5}$ para la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta y baja afinidad fueron obtenidos de los resultados descritos en las Tablas II y III, considerando que $K_{0,5} = K_d^{1/2}$. Los valores de la constante para la inhibición de la polimerización de la tubulina, despolimerización de los microtúbulos y estimulación de la hidrólisis del GTP por Ca^{2+} fueron obtenidos desde los resultados descritos en la figura 8.

^b $K_{0,5}$ corresponde a la concentración de Ca^{2+} necesaria para alcanzar el 50 % de la saturación de cada función.

Efecto de la unión de Ca^{2+} sobre la conformación de la tubulina.

La influencia de la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad sobre la conformación de la tubulina, se determinó mediante espectroscopía ultravioleta diferencial de la tubulina en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} , siguiendo el método descrito por Andreu y Timasheff (1982). La figura 16 muestra el espectro UV diferencial de la tubulina en presencia de distintas concentraciones de Ca^{2+} . Los datos indican que Ca^{2+} altera el espectro de la tubulina, alrededor de 290 nm, región donde absorben energía los residuos de los aminoácidos tirosina y principalmente triptofano. La alteración espectral consiste en un aumento de la intensidad de la señal y un corrimiento hacia el azul en el máximo de absorción, el cual fue proporcional a la concentración de calcio. Este tipo de alteración espectral, normalmente se asocia con un desplazamiento de uno o más de los cromóforos hacia ambientes más polares.

La perturbación del espectro UV de la tubulina es debida a la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad, pues el efecto ocurre a las concentraciones donde el catión se une a estos sitios (ver recuadro de la figura 16). El valor de $K_{0,5}$ en este caso fue de $0,8 \times 10^{-4}$ M, que resulta ser 7 veces menor que el valor de $K_{0,5}$ para la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad (ver tabla VI). A concentraciones de Ca^{2+} saturantes para los sitios de unión de alta afinidad y en donde el catión se uniría a los sitios

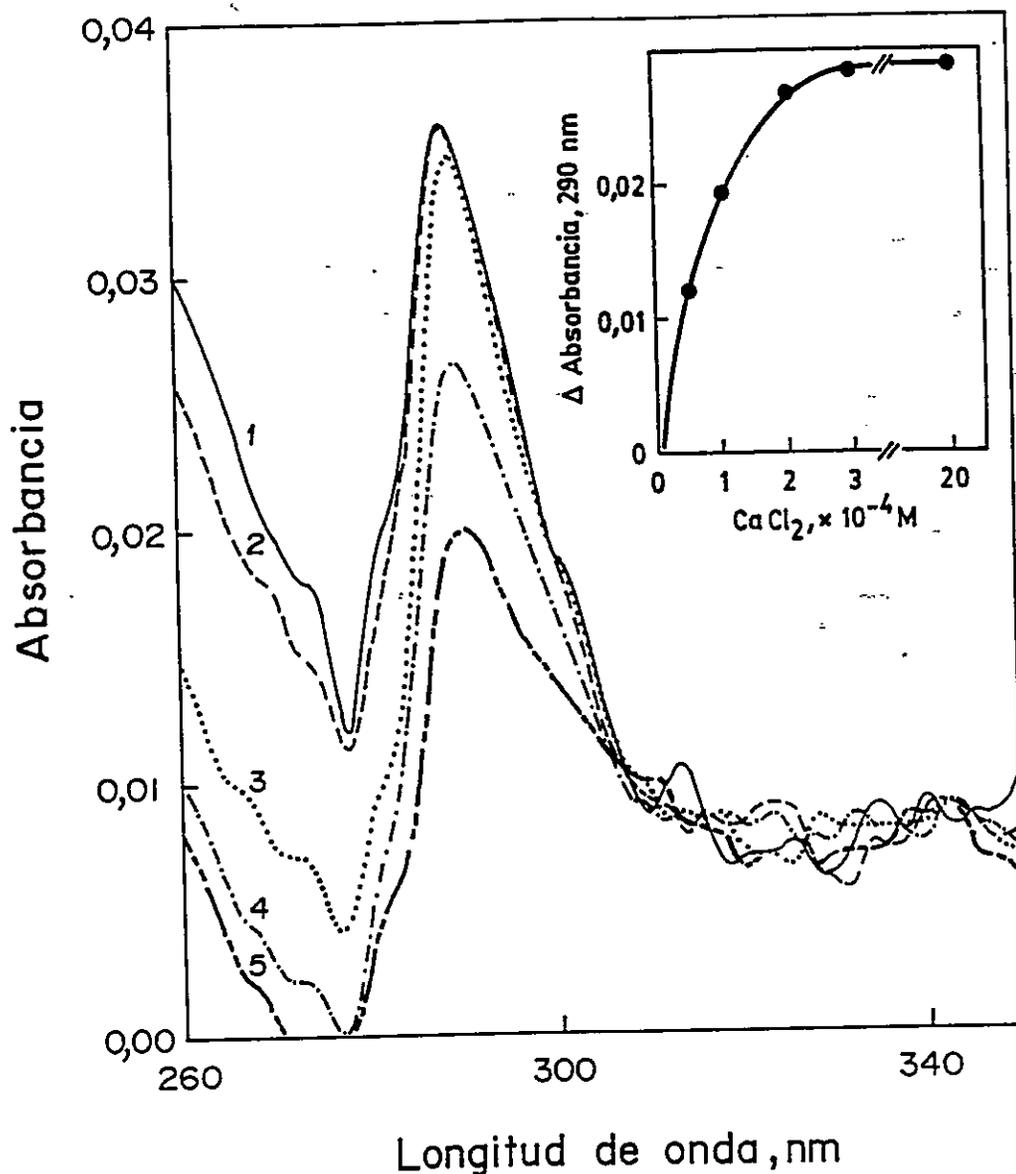


Figura 16. Espectros ultravioleta diferencial de tubulina en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Se incubó tubulina (3,5 mg/ml), libre de agregados, en amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,0, por 15 min a 25°C en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} y luego se registró el espectro UV entre 250 y 360 nm. La figura muestra los espectros diferenciales obtenidos al restar al espectro de la tubulina en ausencia de Ca^{2+} , los espectros de la tubulina en presencia de las siguientes concentraciones de Ca^{2+} : 0,05 mM (línea 5); 0,1 mM (línea 4); 0,2 mM (línea 3); 0,3 mM (línea 2); 2,0 mM (línea 1). En el recuadro se muestra la relación entre la absorbancia a 290 nm obtenida en cada espectro diferencial y la concentración de Ca^{2+} total utilizada para medir el espectro.

de baja afinidad, no es posible apreciar perturbación adicional del espectro UV (Fig. 16, línea 1 y recuadro Fig. 16).

Para analizar si la perturbación del espectro UV provocada por Ca^{2+} fue específica, se agregó a una solución de tubulina idéntica a la usada para los experimentos con Ca^{2+} , volúmenes iguales de amortiguador, no lográndose apreciar ningún tipo de perturbación del espectro UV de la tubulina (no mostrado). Este resultado indica que la variación del espectro de tubulina en presencia de Ca^{2+} no fue debida a simple dilución por la adición de Ca^{2+} .

Experimentos preliminares de apagamiento por acrilamida de la fluorescencia intrínseca de la tubulina en presencia y en ausencia de Ca^{2+} , apoyan la hipótesis de que la unión de este catión induce un cambio conformacional en la tubulina. El experimento consistió en medir el efecto de diferentes concentraciones de acrilamida sobre la emisión de fluorescencia de la tubulina a 336 nm, excitando a 290 nm, en presencia y en ausencia de Ca^{2+} 2 mM (Rodríguez y Monasterio, comunicación personal). Al graficar la magnitud de la fluorescencia en función de la concentración del apagador, se pudo observar que, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} , la emisión de fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de acrilamida. Sin embargo, la pendiente de las rectas en estas dos condiciones (con y sin Ca^{2+}), es diferente, lo cual indica que la tubulina en presencia y en ausencia de Ca^{2+} responde de manera distinta al apagamiento por acrilamida. Lo

anterior sugiere que la conformación de la tubulina es diferente en presencia de Ca^{2+} .

Sondas análogas de Ca^{2+} para estudiar las características de los sitios de unión de Ca^{2+} .

Los elementos del grupo de los lantánidos han sido usados en varios sistemas biológicos como análogos de metales bivalentes, principalmente de Ca^{2+} (Dwek y Richards, 1971; Abbot y col., 1975; Stephen y Grisham, 1979; Barden y Dos Remedios, 1984), pues poseen características fisicoquímicas similares a las de estos iones (Evans, 1983), pero, a diferencia de ellos, algunos poseen propiedades que los hacen útiles para estudios espectroscópicos. El objetivo de esta parte fue investigar si alguno de los lantánidos actuaba de manera análoga a calcio en su acción sobre la tubulina.

1. Efecto de los lantánidos europio, gadolinio, neodimio y terbio sobre la polimerización de tubulina.

Al estudiar el efecto de estos cuatro lantánidos sobre la inhibición de la polimerización de tubulina, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 17. Gd^{3+} y Nd^{3+} mostraron un efecto inhibitor de la polimerización muy similar a Ca^{2+} . La inhibición provocada por estos iones fue revertida completamente con EGTA, que actúa como agente quelante. Estos resultados indican que la inhibición es provocada por el lantánido, pues el efecto inhibitor de éste es abolido por EGTA. Este resultado también indica que la estructura de la proteína no se altera

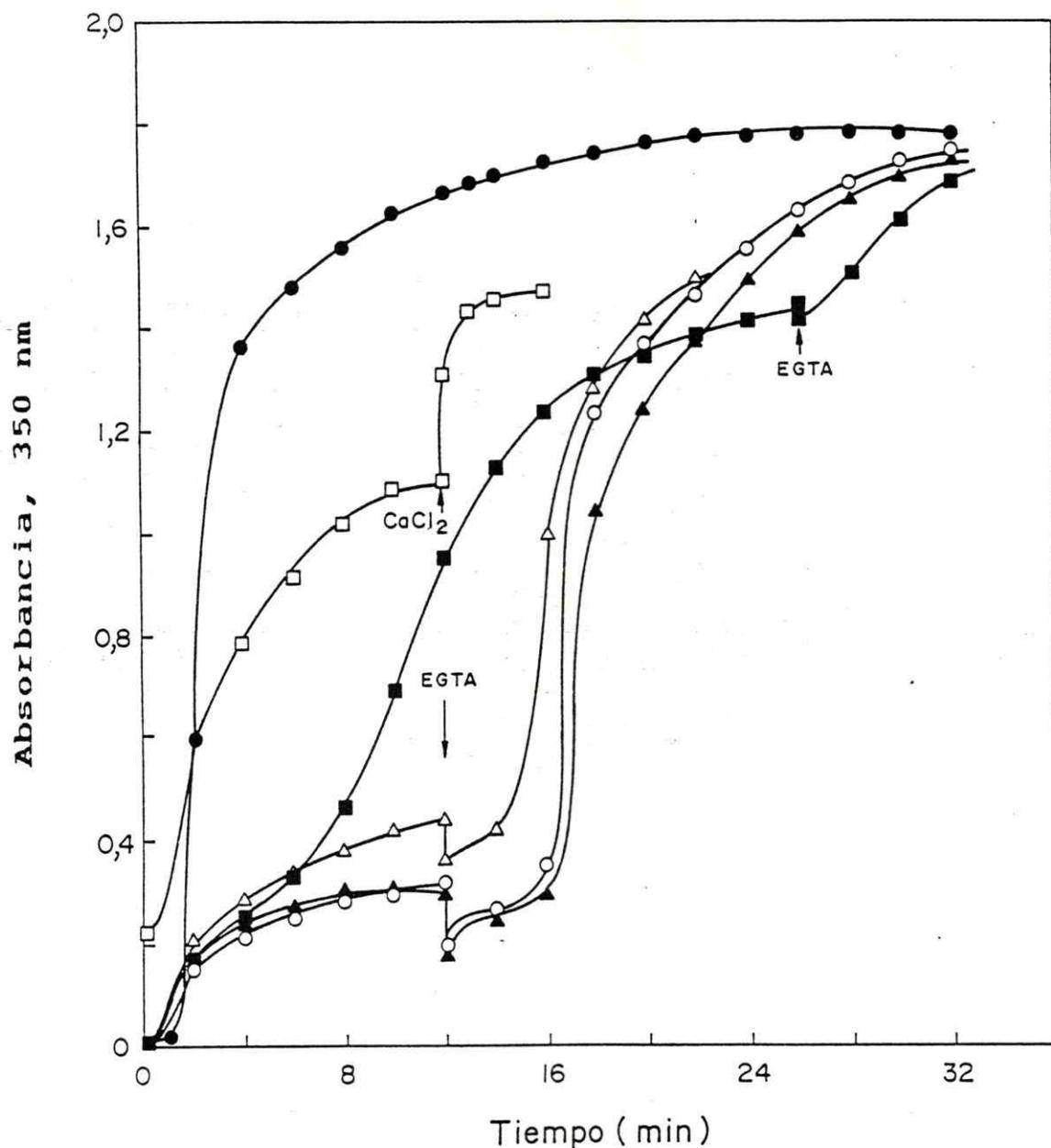


Figura 17: Efecto de europio, gadolinio, neodimio y terbio sobre la polimerización de tubulina. Tubulina (2,5 mg/ml) en amortiguador A, en presencia de 1,4 mM de cada uno de los lantánidos y de Ca^{2+} , se incubó a 4 °C por 15 min. Luego se indujo la polimerización aumentando la temperatura a 37 °C y se registró la absorbancia a 350 nm en el tiempo. Donde se indica, se adicionó EGTA 2 mM o CaCl_2 1 mM. (●) tubulina incubada con amortiguador, (▲) tubulina incubada con Ca^{2+} , (□) tubulina incubada con Tb^{3+} , (■) tubulina incubada con Eu^{3+} , (△) tubulina incubada con Nd^{3+} y (○) tubulina incubada con Gd^{3+} .

en forma irreversible, pues se alcanzaron niveles de polimerización semejantes al control una vez complejados los lantánidos o el calcio. Europio y terbio mostraron un comportamiento distinto al de gadolinio y neodimio. Eu^{3+} tuvo un menor efecto inhibitor que Ca^{2+} , Gd^{3+} y Nd^{3+} a las mismas concentraciones. Tb^{3+} aumentó la absorbancia a baja temperatura, pues a tiempo cero se tenía una mayor absorbancia que con los otros iones. Al aumentar la temperatura a 37 °C se produjo un incremento en la absorbancia que siguió una cinética diferente a la del control. Al agregar calcio hubo un aumento en la absorbancia, lo cual es opuesto a lo observado con los microtúbulos, pues en presencia de Ca^{2+} se produce su despolimerización. La absorbancia inducida por terbio no fue afectada, tampoco, por la disminución de la temperatura. Estos resultados se pueden explicar considerando que Tb^{3+} induce la formación de anillos y agregados de estos (Monasterio y col., 1993).

Al estudiar el efecto de los cuatro lantánidos sobre la despolimerización de los microtúbulos, se encontró que sólo neodimio y gadolinio actuaban como Ca^{2+} . La cuantificación del efecto despolimerizante de los microtúbulos de los distintos lantánidos en relación a calcio, se muestra en la tabla VII. De estos resultados se puede concluir que tanto Nd^{3+} como Gd^{3+} inducen la despolimerización de microtúbulos, de manera similar a Ca^{2+} . Por su parte Tb^{3+} y Eu^{3+} , a estas concentraciones, no presentaron ningún efecto

Tabla VII: Efecto de europio, gadolinio, neodimio y terbio sobre la despolimerización de microtúbulos preformados.^a

Adición	% despolimerización ^b relativo a Ca ²⁺ 1 mM	% despolimerización relativo a Ca ²⁺ 0,1 mM
Nada	0	0
Ca ²⁺ 1,0 mM	100	
Ca ²⁺ 0,1 mM	12	100
Eu ³⁺ 0,1 mM	1	8
Tb ³⁺ 0,1 mM	1	7
Gd ³⁺ 0,1 mM	13	111
Nd ³⁺ 0,1 mM	9	72

^a Se siguió la polimerización de tubulina (3,0 mg/ml) en amortiguador A, determinando la absorbancia a 350 nm, hasta alcanzar el estado estacionario y se agregó a diferentes muestras cada uno de los lantánidos o calcio, a las concentraciones que se indican. Luego de agregado el catión se midió la disminución de la absorbancia en el tiempo.

^b El porcentaje de despolimerización corresponde a la diferencia en absorbancia entre el estado estacionario en ausencia y en presencia de cada ión, dividida por la diferencia producida por Ca²⁺ 1,0 mM o 0,1 mM y multiplicada por 100.

sobre la despolimerización de los microtúbulos.

De estos resultados, en conjunto, se puede concluir que neodimio y principalmente gadolinio se comportan, por lo menos en base a un criterio funcional, como buenos análogos de calcio.

2. Influencia de gadolinio y terbio sobre la actividad GTPásica de tubulina.

Dado que el objetivo del uso de los lantánidos fue caracterizar la estructura del sitio de unión de Ca^{2+} , se continuó caracterizando a Gd^{3+} como análogo de Ca^{2+} , pues es un ión paramagnético a diferencia de Nd^{3+} que es diamagnético. Esta propiedad de Gd^{3+} hace posible determinar distancias a ciertos núcleos de interés (como referencia general ver Mildvan y Cohn, 1970).

A continuación se decidió probar si gadolinio era capaz de asemejarse a calcio en su capacidad de inducir la actividad GTPásica de tubulina. Como control se utilizó terbio, el cual, como se demostró, no produce inhibición de la polimerización de la tubulina. La figura 18 muestra el efecto de la concentración de Gd^{3+} y Tb^{3+} sobre la velocidad de hidrólisis de GTP asociada a tubulina. Gd^{3+} , en una concentración superior a $1 \mu\text{M}$ estimula la actividad GTPásica de la tubulina. Esta estimulación llega a un máximo en $10 \mu\text{M}$ decayendo - por encima de esta concentración. Esto último se debe, probablemente, a que Gd^{3+} en concentraciones sobre $10 \mu\text{M}$ induce la formación de agregados de muy alta masa molecular, inactivos en la hidrólisis de GTP, en estas

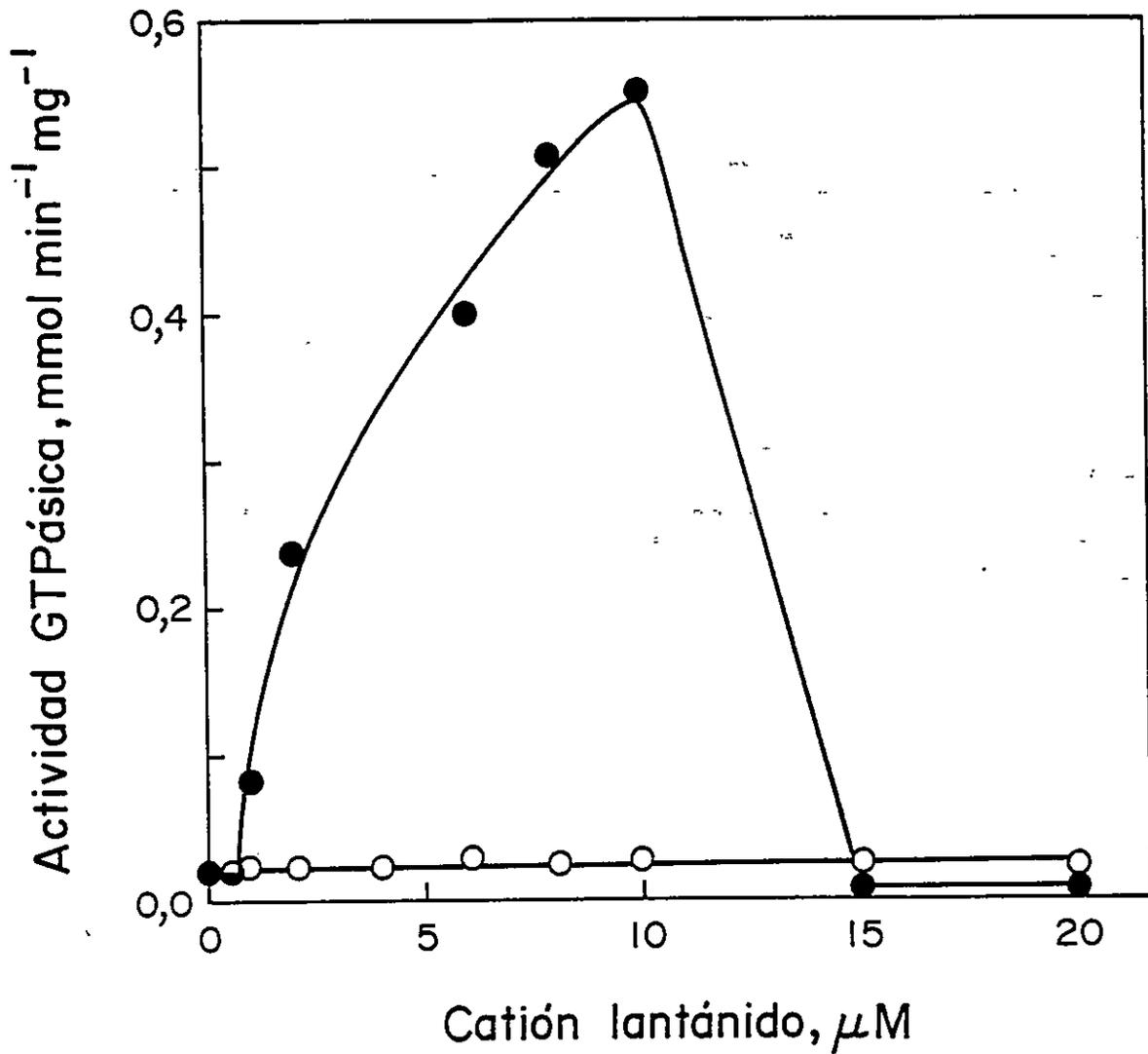


Figura 18: Efecto de la concentración de Gd^{3+} y Tb^{3+} sobre la actividad GTPásica de tubulina. Tubulina (1,1 mg/ml) en la misma mezcla de reacción utilizada en la figura 5, fue incubada a 37 °C por 20 min con Gd^{3+} (●) o Tb^{3+} (○). La actividad GTPásica fue determinada como se describe en Métodos.

condiciones experimentales. El hecho que Gd^{3+} reprodujera el efecto de Ca^{2+} en concentraciones menores era esperable debido a que gadolinio se une con mayor afinidad que calcio a la tubulina. El efecto de gadolinio es específico, pues Tb^{3+} , utilizado como control, no presentó ningún tipo de estimulación de la actividad GTPásica.

La figura 19 muestra las curvas de progreso de la hidrólisis de GTP producida por tubulina en ausencia y en presencia de Gd^{3+} 8 μM . El valor de la pendiente, vale decir la velocidad inicial de hidrólisis de GTP, fue 0,022 y 0,53 nmoles de GTP hidrolizados por mg de tubulina x min en ausencia y en presencia de Gd^{3+} , respectivamente. Esto significa que gadolinio 8 μM estimuló 24 veces la actividad GTPásica de la tubulina.

3. Unión de gadolinio a la tubulina.

Para caracterizar la unión del ión gadolinio a tubulina, se aprovechó el hecho que Gd^{3+} es un ión paramagnético y por lo tanto capaz de absorber energía en el intervalo espectral de las microondas y dar una señal observable a través de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Estos estudios fueron realizados en el laboratorio del Dr. Otaciro Nascimento, en la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

La figura 20 muestra el espectro de EPR de gadolinio en ausencia y en presencia de distintas cantidades de tubulina. Gadolinio da una señal ancha alrededor de 3250 Gauss. Según la teoría de EPR, el área bajo la curva en un

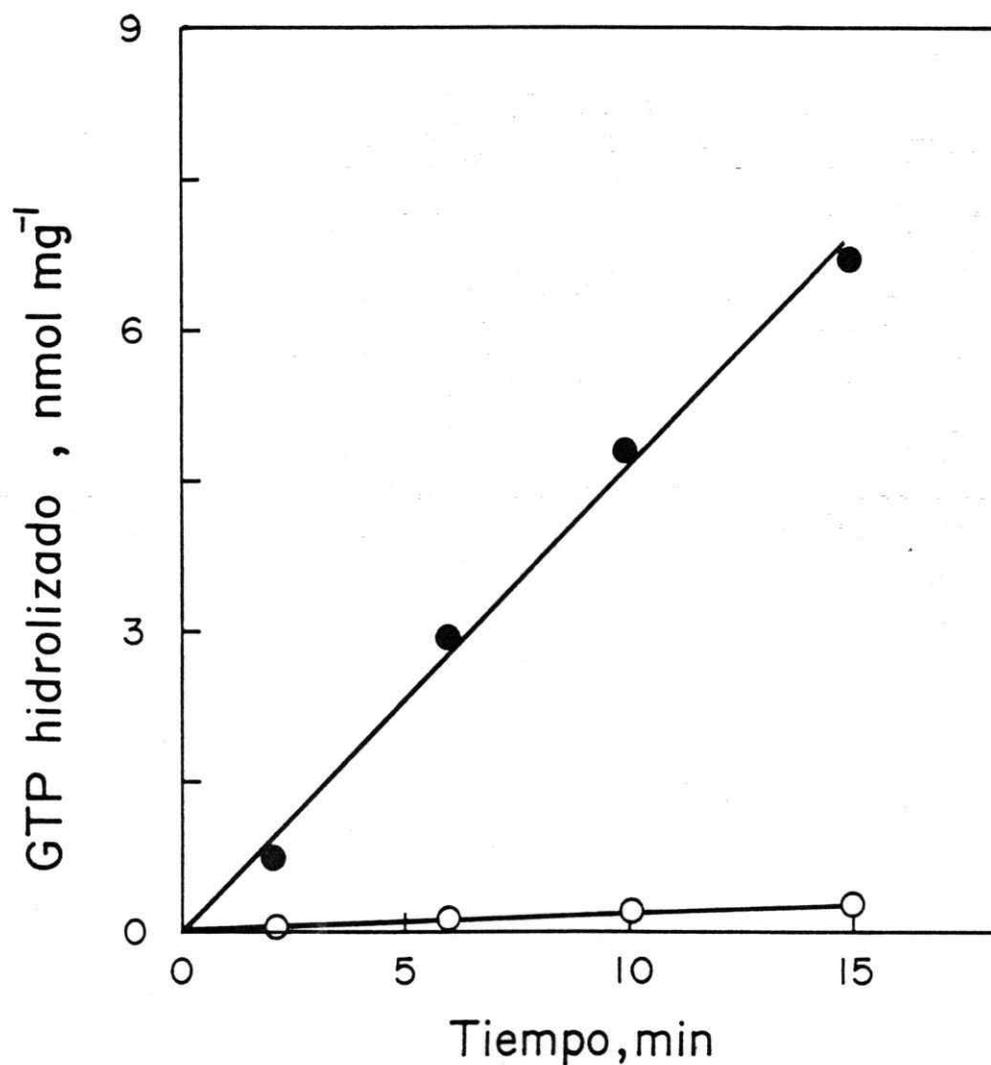


Figura 19: Efecto de gadolinio sobre la actividad GTPásica. Tubulina (2,2 mg/ml) libre de agregados, en una mezcla de reacción idéntica a la de la figura 5 y en un volumen final de 0,07 ml, fue incubada a 37 °C en presencia (●) o ausencia (○) de GdCl₃ 8 μM. La actividad GTPásica fue determinada como se describe en Métodos.

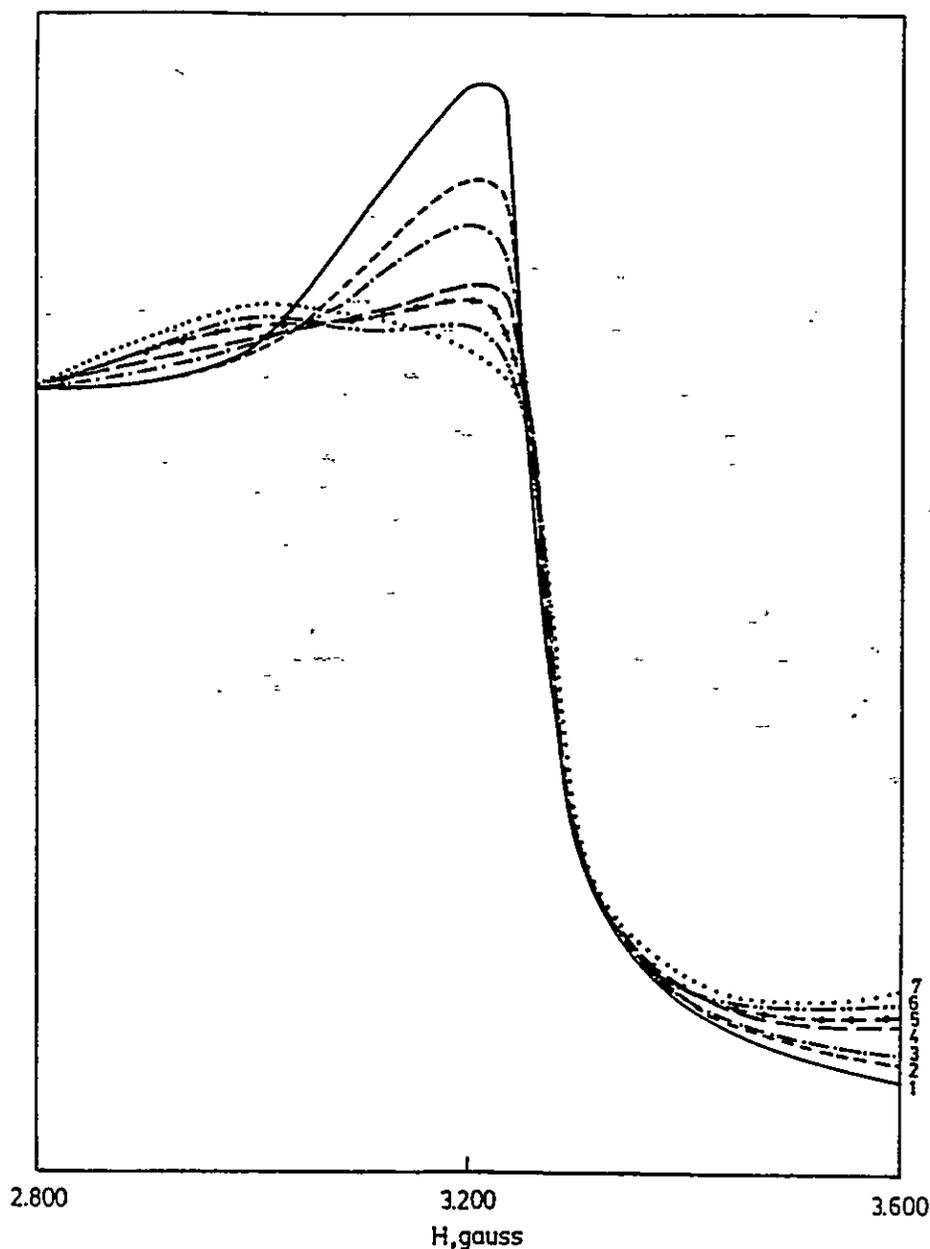


Figura 20: Espectro de EPR de gadolinio en ausencia y en presencia de distintas cantidades de tubulina. A una solución compuesta de 50 nmoles de $GdCl_3$ se le registró el espectro de EPR, en la región correspondiente a la banda X (línea 1), como se describe en Métodos. Enseguida a esta solución se fueron agregando cantidades crecientes de tubulina y luego de incubar por 5 min a $25^\circ C$ se registró un espectro para cada condición. Las cantidades de tubulina utilizadas fueron las siguientes: 1,1 (espectro 2), 2,2 (espectro 3), 4,4 (espectro 4), 6,6 (espectro 5), 11 (espectro 6) y 17,6 (espectro 7).

espectro depende del número de átomos presentes y el ancho de la señal depende de un parámetro que normalmente está dominado por la velocidad de rotación del ión donde se encuentra el electrón desapareado, de manera que mientras más rápido rote el ión, más angosta será su señal en un espectro de EPR. Si este es el caso, es esperable que cuando un ión interactúe con una macromolécula, su velocidad de rotación disminuya considerablemente y por ello el ancho de su señal sea tan grande que prácticamente se confunda con la línea base, de manera que el espectro corresponderá solamente a los iones libres. Este fenómeno, sin embargo, no se apreció para el caso de la unión de gadolinio a tubulina, pues en este sistema el gadolinio unido aparece dando una señal ancha observable a más bajo campo que la señal del gadolinio libre (Fig. 20), la cual es proporcional a la cantidad de tubulina presente.

Para obtener el número de moles de gadolinio unido a tubulina, fue necesario restar, mediante un programa computacional, al espectro de gadolinio en presencia de tubulina el espectro de gadolinio en ausencia de tubulina. La figura 21 muestra la relación entre los moles de Gd^{3+} unido por mol de tubulina versus el logaritmo de la concentración de Gd^{3+} libre. Los puntos experimentales se ajustaron a una curva bifásica, indicando que Gd^{3+} se uniría a dos tipos de sitios con diferente afinidad. No fue posible, mediante este método, obtener puntos a concentraciones más bajas de Gd^{3+} libre, debido a problemas en la determinación, pues hubiese sido necesario usar

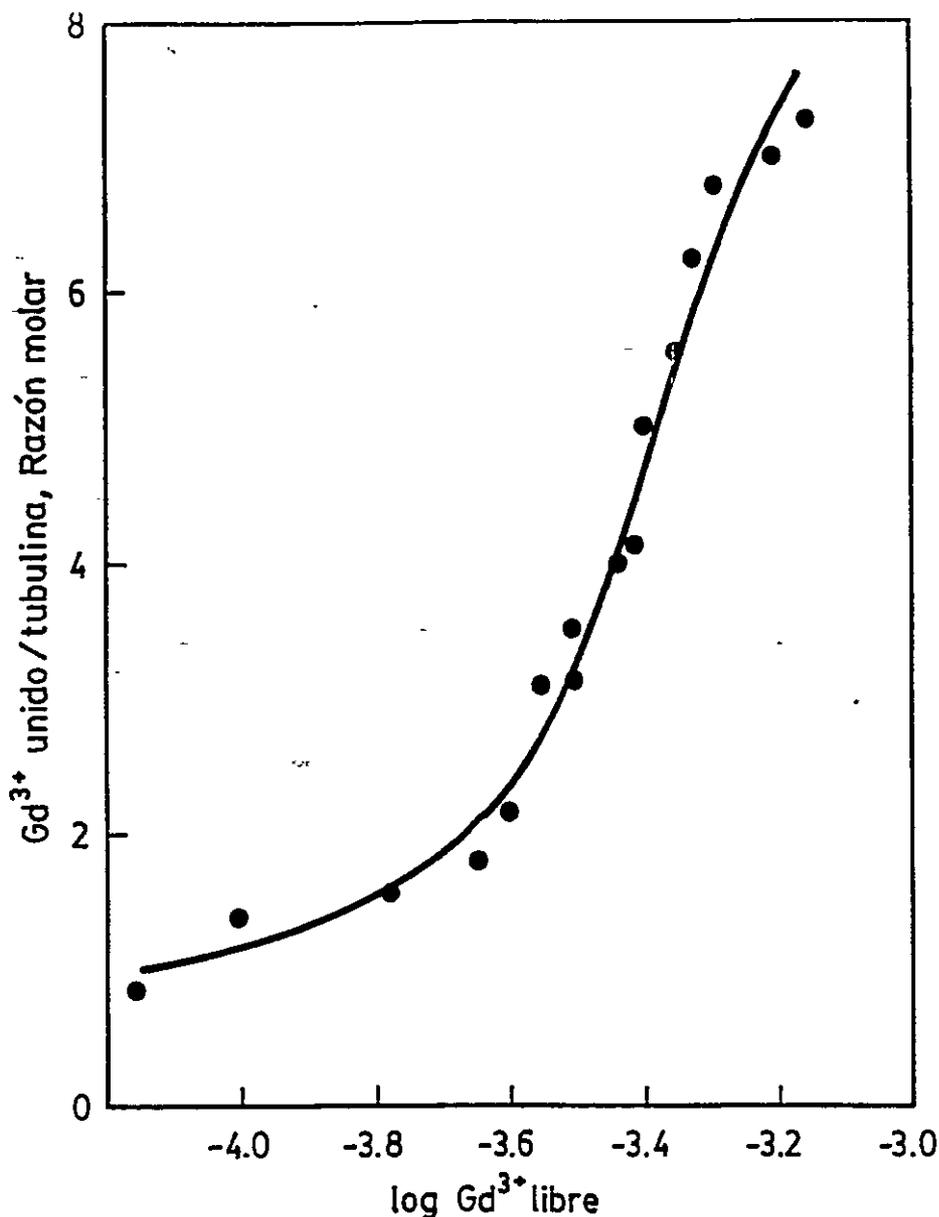


Figura 21. Curva de saturación para la unión de Gd^{3+} a tubulina. A una solución de Gd^{3+} 1 mM en amortiguador PIPES 50 mM, pH 6,0, se le registró el espectro de EPR como se describe en la sección Métodos. Enseguida se fueron agregando concentraciones crecientes de tubulina y previa incubación de 5 min a $25^{\circ}C$ se midió el espectro de EPR. La concentración de Gd^{3+} libre se determinó restando, mediante un programa computacional, al espectro de Gd^{3+} en ausencia de tubulina, los espectros obtenidos en presencia de las diferentes concentraciones de tubulina.

concentraciones demasiado elevadas de tubulina, las cuales no son posibles de obtener. La falta de puntos en la parte inicial de la curva afectaría principalmente al valor obtenido para el coeficiente de Hill y en menor grado a la constante de disociación aparente, pero no el número de sitios de unión del lantánido en la tubulina.

Los resultados indican que habría 2 sitios de alta afinidad (K_D en el orden de 10^{-6} M), que presentaron cooperatividad positiva en la unión y alrededor de 9 sitios de baja afinidad (K_D en el orden de 10^{-4} M). Estos resultados son muy similares a los obtenidos en la titulación con calcio (ver tabla VIII), excepto que las constantes de disociación aparentes son menores para el lantánido, es decir Gd^{3+} se uniría más fuertemente a la tubulina que calcio. Esto último, sin embargo, es explicable debido a la trivalencia de los iones lantánidos, pues presentan una relación carga/volumen mucho mayor que los iones bivalentes a quienes reemplazan y por ello normalmente se unen con mayor afinidad a los sitios de unión (Evans, 1983).

Para precisar el lugar de unión del lantánido en la tubulina, se analizó, a través de EPR, el desplazamiento de Gd^{3+} por Ca^{2+} como una manera adicional de comprobar que ambos iones se estuvieran uniendo al mismo sitio en la tubulina. La figura 22 muestra la relación entre los moles de Gd^{3+} unido por mol de tubulina y la razón molar Ca^{2+}/Gd^{3+} . A medida que esta razón aumenta, la unión de

Tabla VIII. Valores para la constante de disociación aparente (K_d), el número de sitios (n) y coeficiente de Hill (h) para Ca^{2+} y Gd^{3+} determinado por diferentes métodos^a.

Ión	n_1	K_{d1} (μM)	h_1	n_2	K_{d2} (μM)	h_2 ^b
Ca^{2+}	1,83	27,6	1,42	10,2	1540,0	1,04
Gd^{3+}	2,27	5,7	1,50	9,8	630,4	1,12

^a Los valores de los parámetros de unión para Ca^{2+} fueron determinados por el método de ultrafiltración en membranas de Amicon y para Gd^{3+} los valores fueron obtenidos mediante titulación con tubulina de la señal de EPR de gadolinio.

^b n_1 , K_{d1} y h_2 corresponden a los parámetros de unión para los sitios de alta afinidad y n_2 , K_{d2} y h_2 representan los valores para los sitios de baja afinidad, definidos en la ecuación 1.

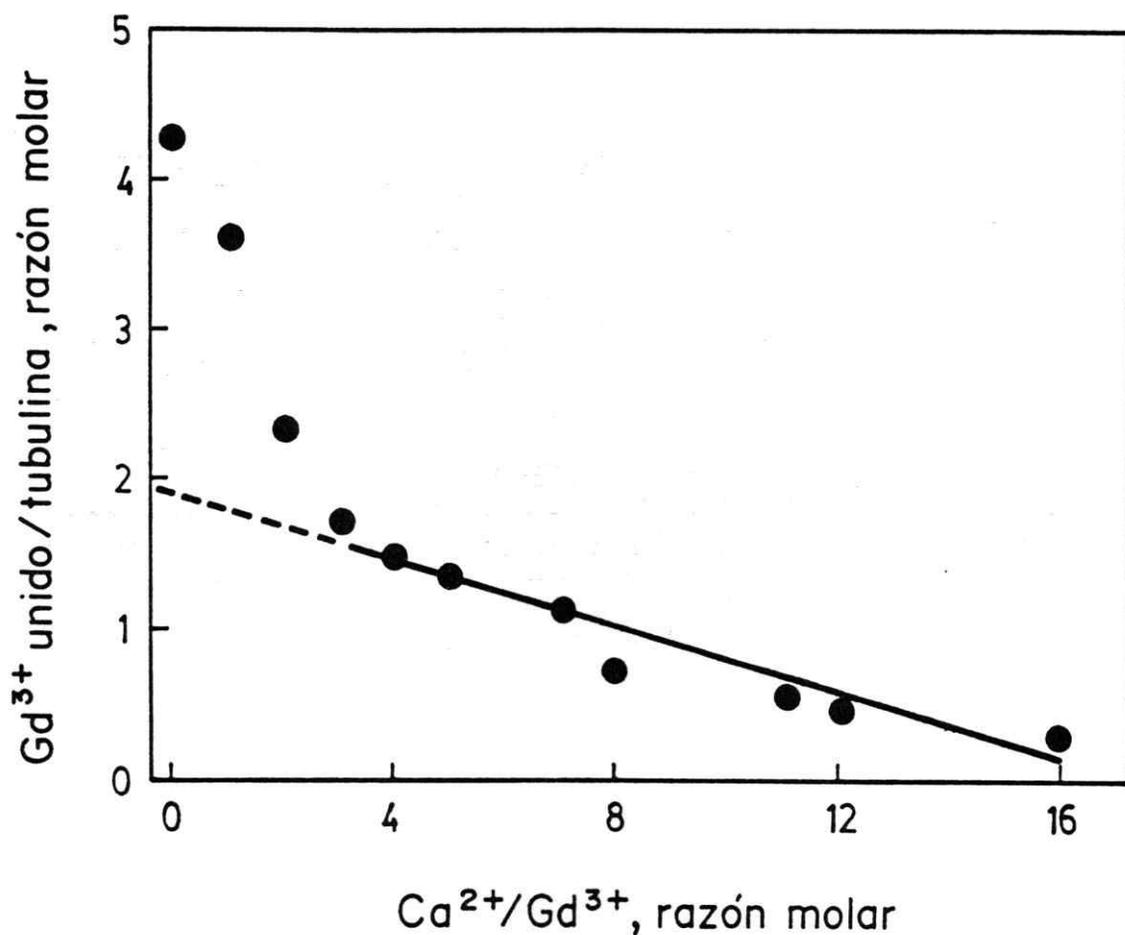


Figura 22. Desplazamiento de Gd^{3+} unido a tubulina por Ca^{2+} . Tubulina ($55 \mu M$) se incubó en amortiguador PIPES $50 mM$ pH $6,0$ con una concentración fija de gadolinio ($0,75 mM$), por $5 min$ a $25 ^\circ C$. Enseguida se tomó un espectro de EPR y luego se agregaron cantidades crecientes de calcio, según se indica en la tabla y después de $5 min$ de incubación se volvió a registrar el espectro de EPR a $77 ^\circ K$. Los moles de gadolinio unido se determinaron como se describe en el texto.

gadolinio a tubulina disminuye, lo que indica que Ca^{2+} es capaz de desplazar a Gd^{3+} desde su sitio de unión en la tubulina. Este desplazamiento sigue una conducta bifásica. En la primera fase, Ca^{2+} desplazaría a los iones Gd^{3+} unidos a los sitios de baja afinidad en la tubulina y en la segunda fase desplazaría a Gd^{3+} unido a los sitios de alta afinidad. Este resultado indica que Ca^{2+} y Gd^{3+} comparten tanto los sitios de alta como de baja afinidad en la tubulina. Al prolongar la línea recta de la segunda fase hacia la ordenada, se obtuvo un valor de 2 moles de Gd^{3+} unido por mol de tubulina. Este valor corresponde al desplazamiento de los iones unidos a los sitios de alta afinidad. Esto comprueba que existen dos sitios de unión de alta afinidad para gadolinio y serían los mismos que ocupa calcio en la molécula de tubulina.

En conclusión, Gd^{3+} es una sonda paramagnética análoga de calcio, la cual permitirá estudiar la estructura de los sitios de unión de Ca^{2+} en la tubulina.

4. Efecto de Gd^{3+} sobre el espectro de ^1H -NMR de tubulina y de los péptidos carboxilo-terminales.

Con el propósito de investigar las características estructurales de los sitios de unión de alta afinidad para calcio en la molécula de tubulina, se ha comenzado a realizar estudios de NMR de protones.

Para una mayor comprensión de los estudios de la influencia de sondas paramagnéticas sobre el espectro de Resonancia Magnética Nuclear, haremos una breve revisión de

la teoría al respecto.

La adición de iones paramagnéticos a una solución usualmente tiene profundos efectos en el espectro de NMR de tanto el soluto como el solvente, los cuales se manifiestan como grandes corrimientos y significativos ensanchamientos de las líneas espectrales. Ambos efectos reflejan la respuesta del dipolo nuclear al campo magnético local producido por el spin del electrón desapareado. Puesto que la relación carga/masa para el electrón es 1836 veces más grande que para el protón, el momento dipolar magnético del electrón y el campo magnético asociado a él son más grandes por el mismo factor que el momento y el campo del protón. Por dicha razón los efectos provocados por iones paramagnéticos son fácilmente medibles. Además, debido a que la magnitud del campo magnético que afecta al núcleo, depende tanto de la distancia entre el núcleo y el electrón como del ángulo que se forma entre los momentos dipolares electrónicos y nucleares, es posible obtener información geométrica a partir de las perturbaciones espectrales producidas por el ión paramagnético (Para un mayor detalle de la teoría general de perturbaciones paramagnéticas, consultar Mildvan y Cohn, 1970).

La figura 23 muestra un espectro de $^1\text{H-NMR}$ a 300 MHz de la preparación de tubulina de cerebro de pollo, equilibrada a través de filtración en Sephadex G-25, en amortiguador bicarbonato. Los agregados de tubulina y los metales pesados fueron removidos por centrifugación a alta velocidad y filtración a través de una columna de Chelex

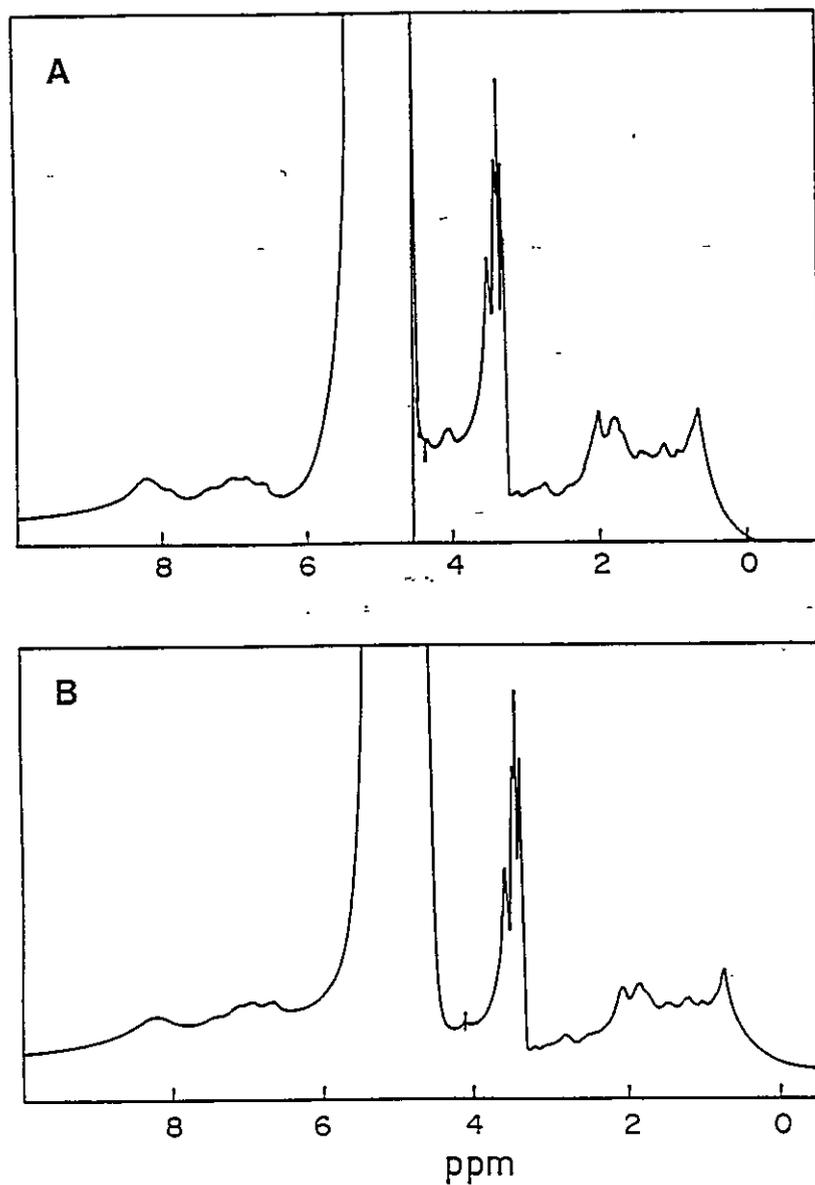


Figura 23. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para la tubulina en ausencia (A) y en presencia de Gd^{3+} $50\ \mu\text{M}$ (B). El espectro de tubulina ($22\ \text{mg/ml}$) equilibrada en amortiguador bicarbonato (NaHCO_3 $10\ \text{mM}$, pH $6,5$, MgCl_2 $0,5\ \text{mM}$ y $20\ \%$ de D_2O), libre de agregados y metales pesados fue registrado bajo las condiciones que se describen en Métodos. El número de registros promediados en ambos casos fue de 1000.

100.

La adjudicación de los picos en el espectro se hizo comparando la posición de ellos, con la posición en que dan señales los protones de los distintos aminoácidos en diversas proteínas, lo que se explica en más detalle en el anexo I. En la región alifática del espectro, entre 0,5 y 3,0 ppm, que se muestra en la figura 23A, se aprecian al menos 7 señales separadas y en la región aromática, entre 6 y 9 ppm, se observan al menos 4 picos separados. Es posible apreciar también, a alrededor de 4,6 ppm, la señal intensa de los protones del agua y a más alto campo (alrededor de 3,5 ppm), un grupo de señales que por su intensidad es difícil identificarlas como pertenecientes a la tubulina. En la figura 23B se muestra la influencia de la sonda paramagnética gadolinio sobre el espectro de NMR de tubulina. La comparación de ambos espectros, muestra que no se producen corrimientos químicos, pero si hay una disminución del área de la señal que aparece en 8,3 ppm y de casi todas las señales de la región alifática del espectro. El análisis del efecto de gadolinio se hace difícil, pues ocurre ensanchamiento en más de una señal y cada una de estas a su vez puede provenir de protones de aminoácidos con diferente localización dentro de la proteína. Por esto, se procedió a analizar por medio de NMR los péptidos carboxilo-terminales de tubulina, obtenidos a partir de una digestión controlada con subtilisina. A primera vista estos péptidos son ideales para un estudio de sus protones por NMR, pues

presentan una baja proporción de residuos aromáticos y en general solamente contienen alrededor de 30 aminoácidos.

La figura 24 muestra un espectro de NMR de protones para la preparación de péptidos carboxilo-terminales de tubulina digerida con subtilisina unida a Agarose, purificados por el método 2. En el espectro se observan señales tanto en la región alifática como aromática. Para el análisis espectral se tomarán zonas del espectro con mayor amplificación, las cuales serán analizadas a continuación.

La figura 25 muestra más detalladamente la región alifática del espectro, vale decir la zona en que aparecen las señales correspondientes a los protones asociados con grupos metilos y metilenos. Con el propósito de asignar las señales se estableció una comparación con los espectros de los aminoácidos individuales, como se explica detalladamente en el anexo I. Es así como es posible identificar la señal centrada en aproximadamente 0,9 ppm como derivada de los protones unidos al carbono τ de los aminoácidos leucina y valina. Por su parte los protones unidos al carbono β de los residuos de ácido glutámico y glutamina aparecen como un multiplete centrado en 2,0 ppm y los protones unidos al carbono τ de estos mismos residuos de aminoácidos aparecen en 2,25 ppm. Entre 3,2 y 4,5 ppm se observan varias señales difíciles de asignar debido, por una parte, a que aparecen muy juntas y a que en esta región del campo magnético absorben energía los protones unidos al carbono α de los distintos aminoácidos. Para asignar las señales en este caso se hace necesaria la aplicación de otros procedimientos como

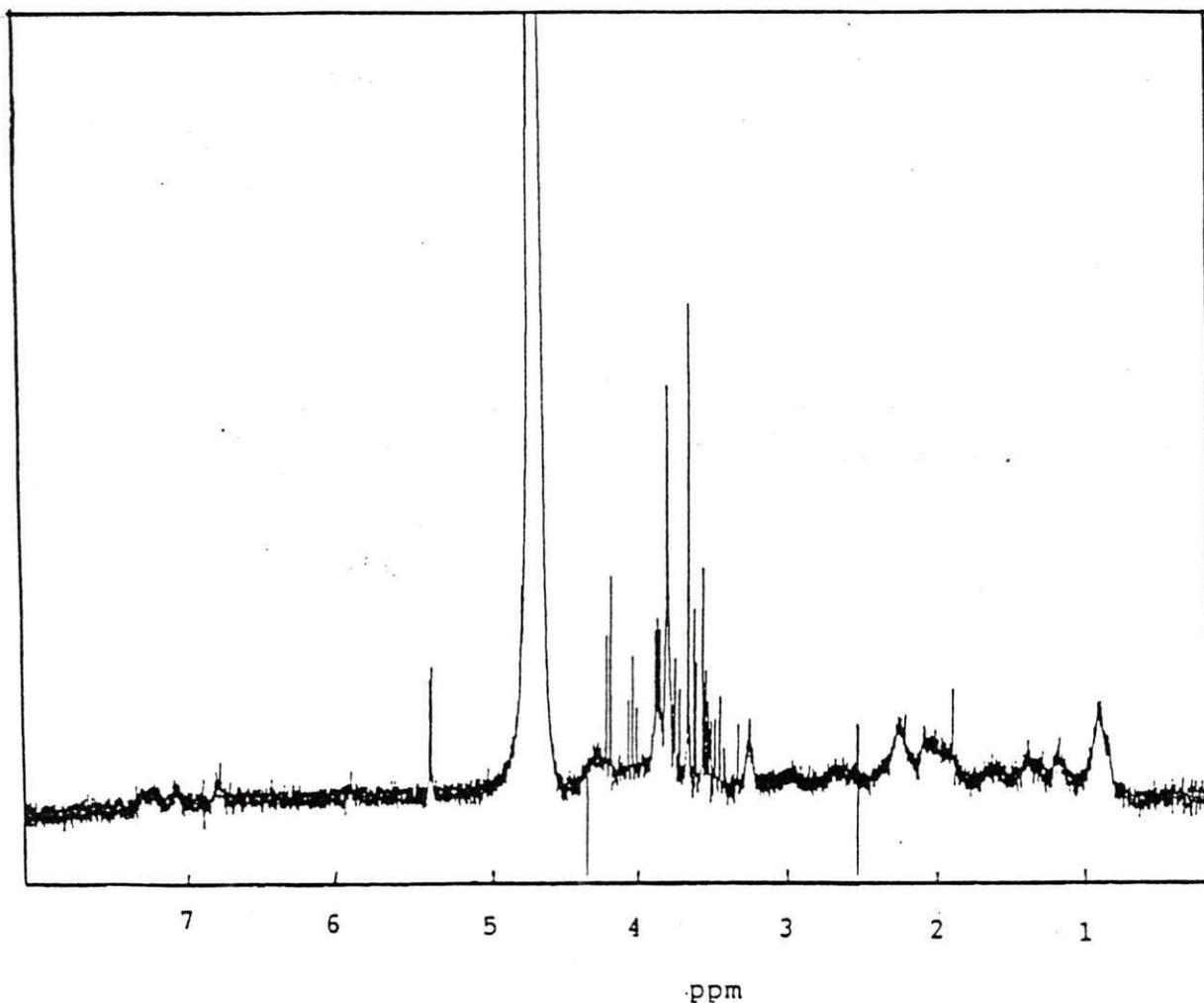


Figura 24. Espectro de ^1H -NMR de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina. Péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina en concentración final de 0,5 mM, fueron obtenidos mediante la digestión de tubulina con subtilisina unida a Agarose y posterior purificación por el método 2 (ver texto, sección aislación y caracterización de los fragmentos de tubulina que unen calcio con alta afinidad). El eluido con NaCl 0,5 M fue filtrado a través de una columna de Chelex 100 para eliminar metales pesados y posteriormente fue liofilizado a sequedad y resuspendido en D_2O . El espectro de NMR fue obtenido usando las condiciones señaladas en Métodos. El número de registros promediados fue de 300. La señal que aparece en 4,7 ppm corresponde a protones procedentes de H_2O .

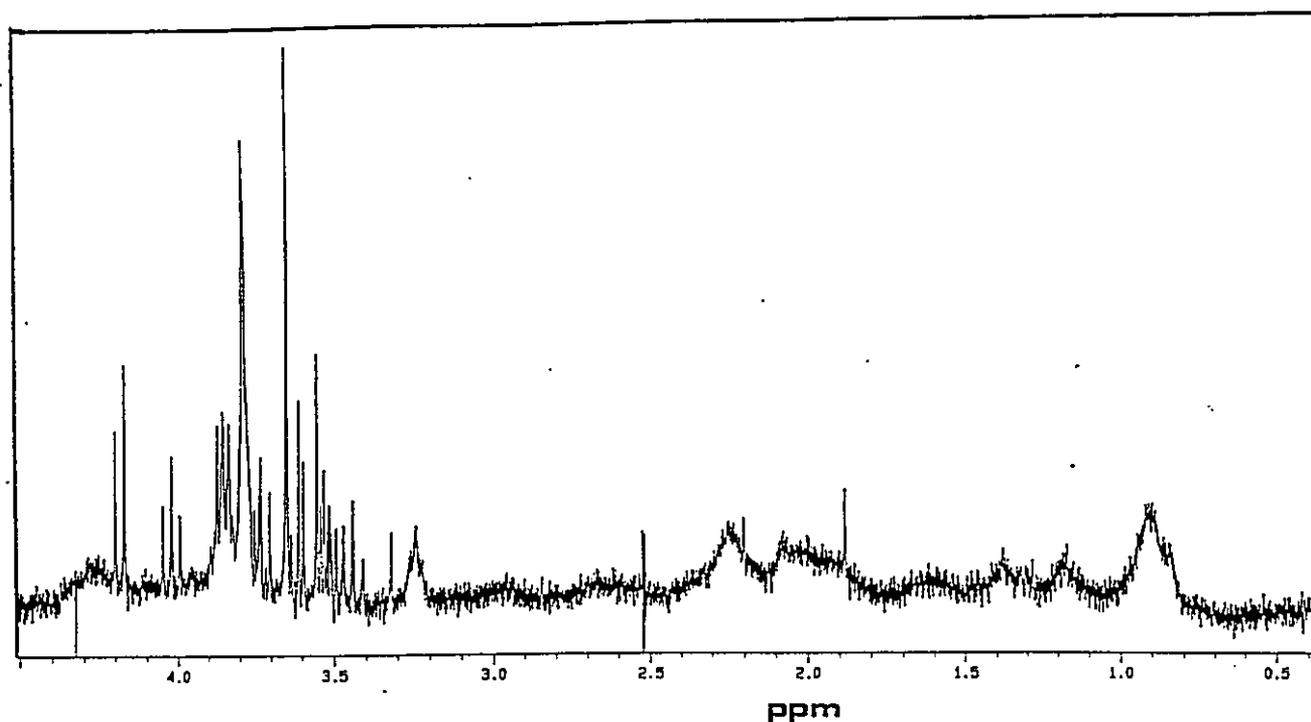


Figura 25. Región alifática del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina. La zona comprendida entre 0,5 y 4,5 ppm del espectro mostrado en la figura 24 fue extendida para apreciar más claramente la posición y forma de acoplamiento de las líneas espectrales.

digestiones con enzimas proteolíticas de especificidad conocida o refinadas técnicas de NMR como por ejemplo el llamado efecto nuclear Overhauser. Sin embargo, para obtener conclusiones acertadas con estas técnicas es necesario disponer de péptidos puros.

La figura 26 muestra parte de la región aromática del espectro, en donde se pueden observar las señales correspondientes a los protones unidos a los carbonos 3 y 5 (6,8 ppm) y 2 y 6 (7,1 ppm) del anillo aromático del aminoácido tirosina y los protones del anillo aromático de la fenilalanina (7,25 ppm), asignados como se establece en el anexo I.

Con el propósito de estudiar las características de los sitios de unión de alta afinidad para calcio en la tubulina, se analizó la influencia del ión paramagnético Gd^{3+} , análogo de Ca^{2+} , sobre el espectro de NMR de los péptidos carboxilo-terminales de tubulina.

La figura 27 muestra el espectro de 1H -NMR de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina en presencia de $GdCl_3$ 50 μM . Si se compara este espectro con el espectro de los péptidos en ausencia del ión paramagnético (Fig. 24), se observan varias diferencias, tanto en el ancho de las señales como en la posición relativa de ellas. Estas diferencias no son debidas a efectos de variaciones en la concentración de los péptidos o alteraciones derivadas de la purificación de ellos, pues ambos espectros fueron tomados en las mismas condiciones, utilizando la misma preparación

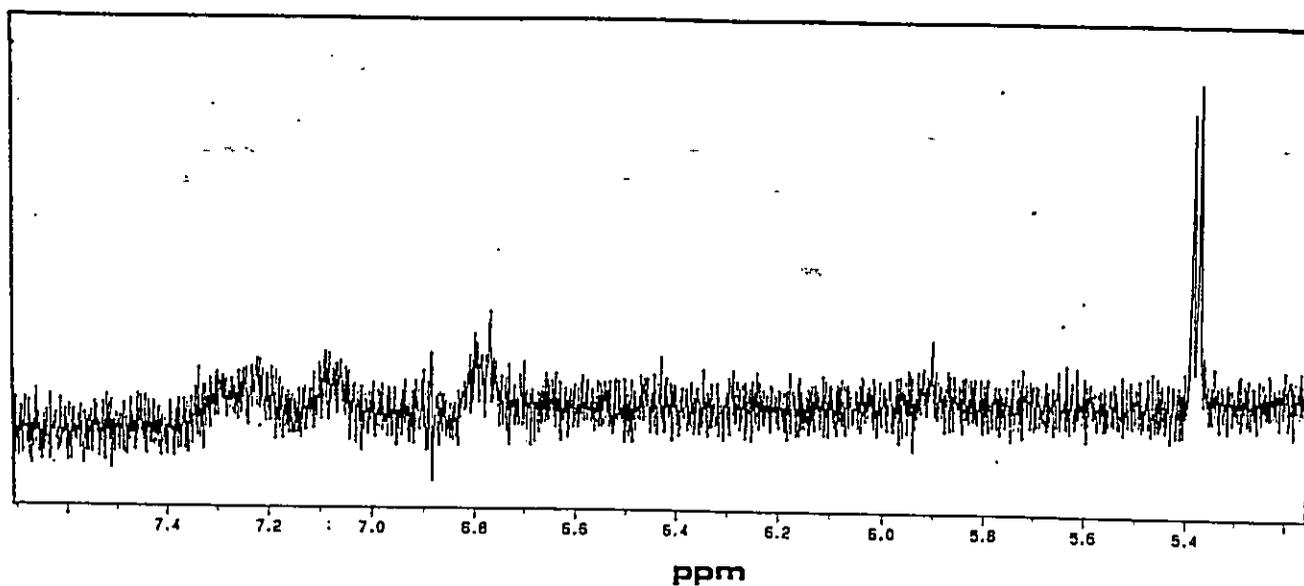


Figura 26. Región aromática del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos del extremo carboxilo-terminal de tubulina. La zona comprendida entre 5,2 y 7,7 ppm del espectro mostrado en la figura 24 fue extendida para apreciar más claramente la posición y forma de acoplamiento de las señales.

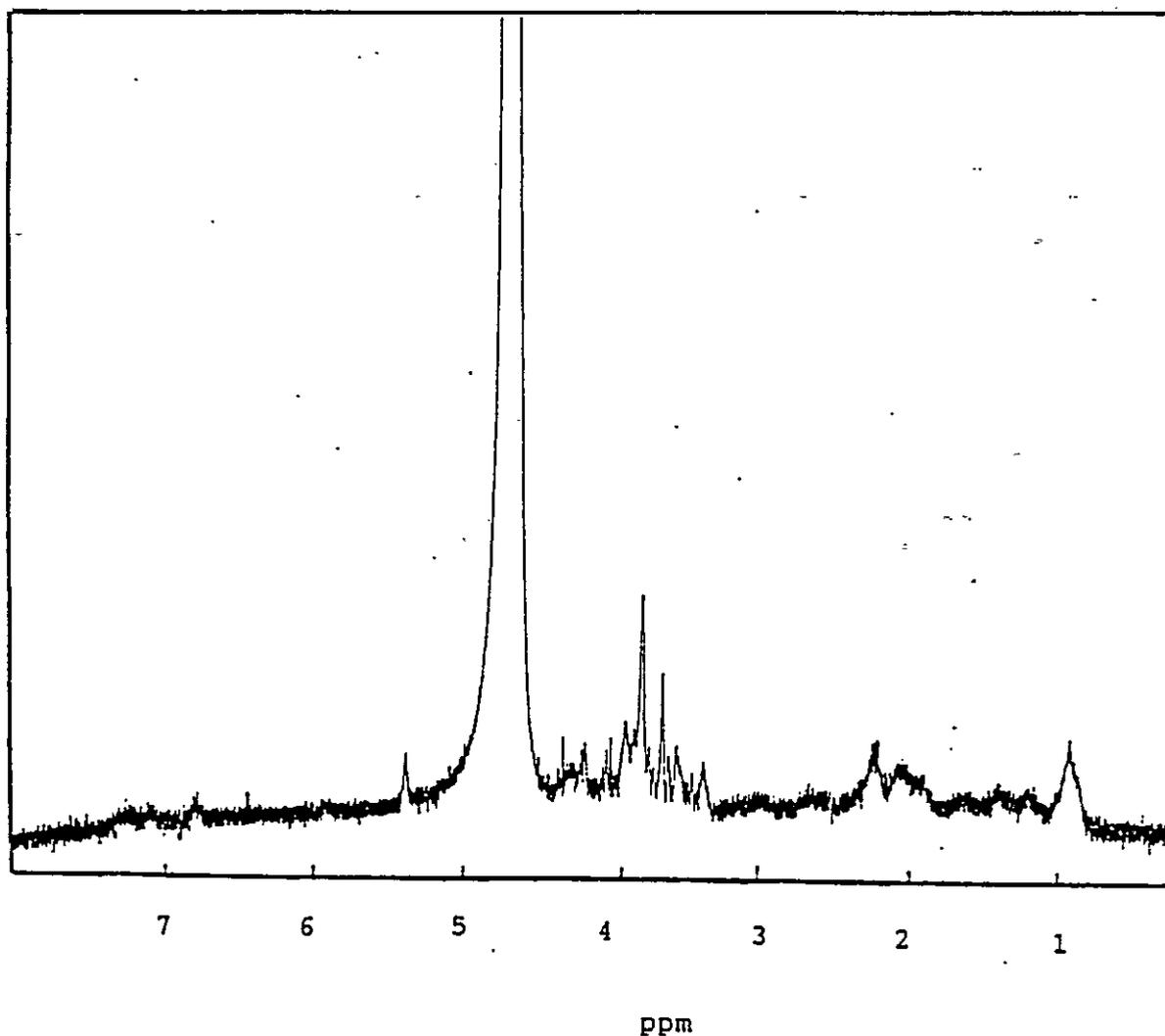


Figura 27. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina en presencia de gadolinio. A la misma preparación de péptidos de tubulina descrita en la figura 24, se le adicionó GdCl_3 50 μM , se incubó por 15 min a 25 $^\circ\text{C}$ y enseguida se registró el espectro, utilizando las condiciones señaladas en Métodos. El número de registros promediados fue de 300.

de péptidos.

Las principales diferencias entre ambos espectros se aprecian en la zona entre 3,0 y 4,5 ppm, vale decir la región en donde aparecen las señales procedentes del carbono α de los distintos aminoácidos y algunas señales derivadas de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como ácido aspártico, asparragina, arginina, fenilalanina, serina y tirosina. La figura 28 muestra la comparación de ambos espectros en esta región del campo magnético. La presencia de gadolinio provoca un ensanchamiento de prácticamente la totalidad de las señales, algunos picos desaparecen y se aprecia el corrimiento químico de algunas señales.

Al adicionar Ca^{2+} en un exceso de 20 veces sobre la concentración de Gd^{3+} , con el objeto de desplazar al Gd^{3+} desde los péptidos, no se apreció una mayor modificación de las características espectrales descritas para el espectro de NMR de los péptidos en presencia de gadolinio (Fig. 29 y recuadro). La única señal clara que se observa al restar el espectro de NMR obtenido en presencia y en ausencia de Ca^{2+} (recuadro de la figura 29), aparece en 4,8 ppm y corresponde al exceso de agua añadida al agregar el Ca^{2+} . Lo anterior indica que Ca^{2+} no fue capaz de desplazar a gadolinio desde los péptidos.

El hecho que Ca^{2+} fuese capaz de desplazar a Gd^{3+} desde la tubulina (Fig. 22) pero no desde los péptidos carboxilo-terminales, sugiere que las características de unión de estos iones a los fragmentos de los extremos carboxilo de tubulina son diferentes si los fragmentos están incorporados

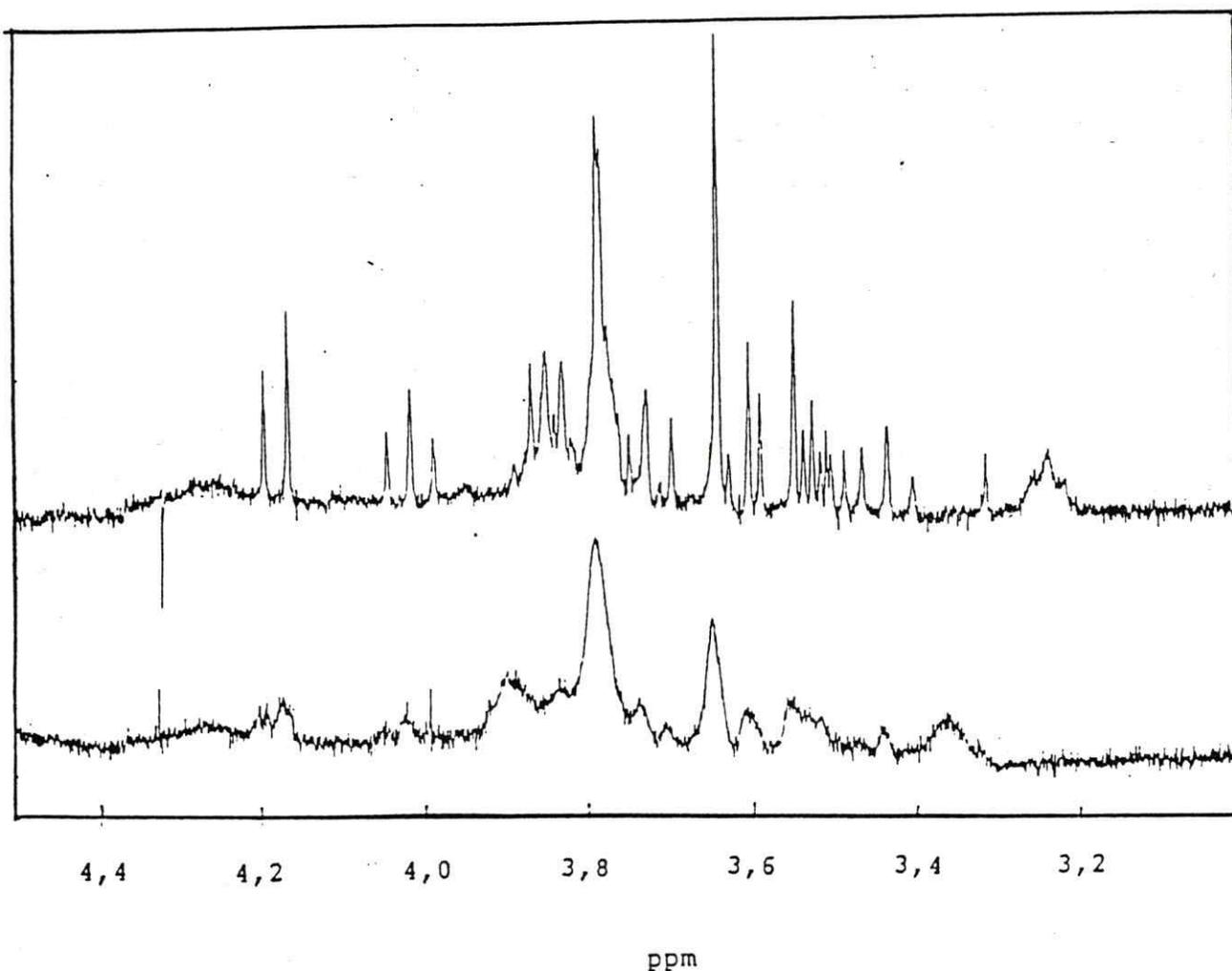


Figura 28. Comparación entre los espectros de NMR de los péptidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina, en ausencia y en presencia de Gd^{3+} . El espectro superior corresponde a la región comprendida entre 3,0 y 4,5 ppm del espectro mostrado en la figura 24, vale decir, en ausencia de Gd^{3+} , en tanto que el espectro inferior presenta esta misma región del espectro mostrado en la figura 27, es decir, en presencia de Gd^{3+} 50 μ M.

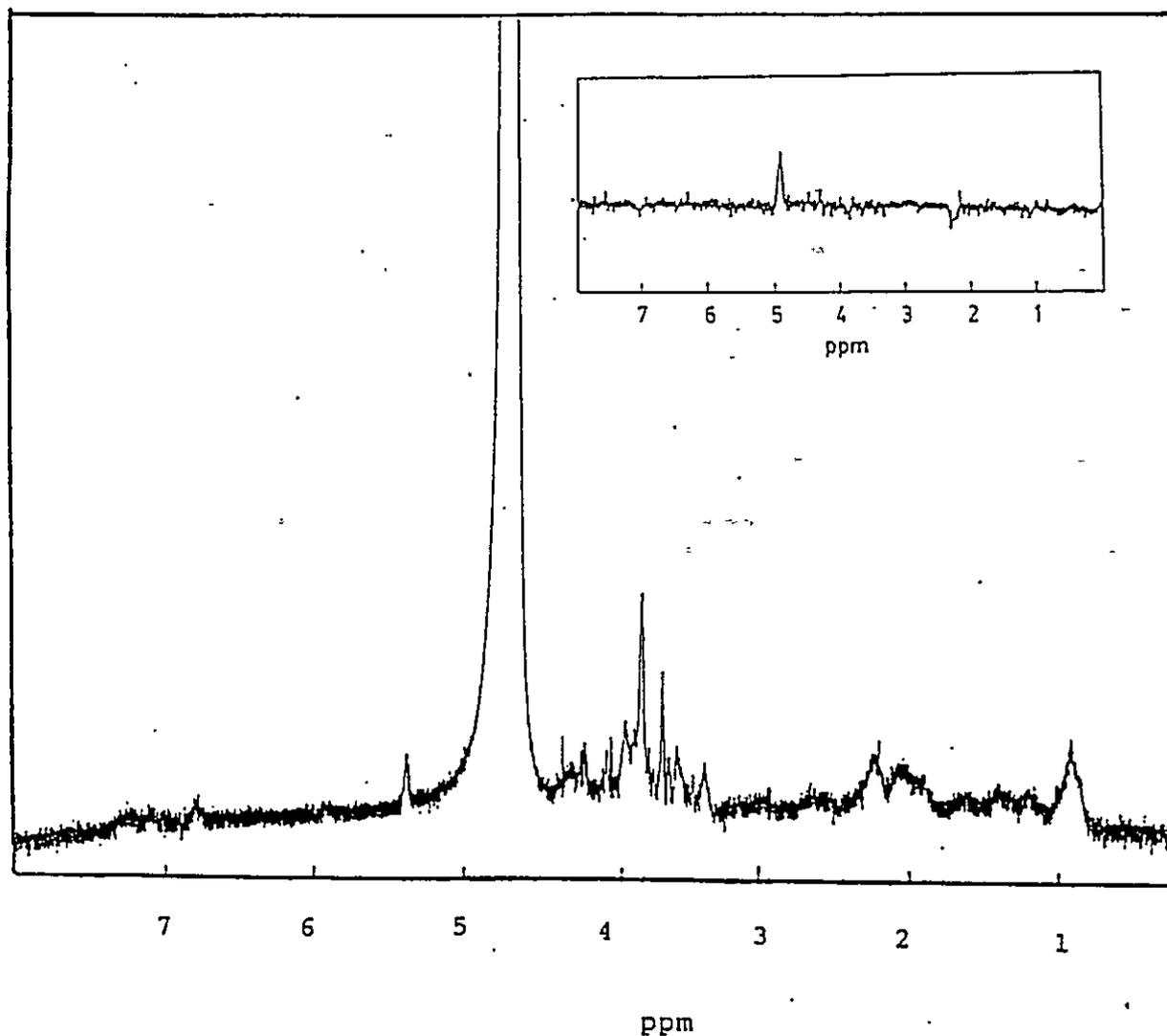


Figura 29. Efecto de calcio sobre el espectro de NMR del complejo péptidos- Gd^{3+} . A la muestra utilizada para obtener el espectro que se muestra en la figura 27 se le adicionó CaCl_2 1 mM final, se incubó por 15 minutos a 25°C y se registró el espectro utilizando las condiciones señaladas en la sección Métodos. El número de registros promediados fue de 300. En el recuadro se muestra la diferencia entre el espectro mostrado en esta figura y el que se muestra en la figura 27, vale decir en presencia y en ausencia de Ca^{2+} .

a la proteína o aislados de ella. Lo anterior podría indicar que la conformación de esta región es alterada cuando es separada del resto de la proteína. Esta conclusión es reforzada por estudios, realizados en nuestro grupo, respecto a la caracterización de la interacción de las regiones carboxilo-terminales de tubulina con el resto de las cadenas polipeptídicas, mediante una sonda fluorescente extrínseca. (Ortiz y col, 1993).

DISCUSION

En este trabajo se descubrió que la unión de Ca^{2+} a la tubulina induce su actividad GTPásica y que esta actividad está asociada a la inhibición de la polimerización de la tubulina y despolimerización de microtúbulos por Ca^{2+} . Otro hallazgo importante fue la conducta sigmoidea de la unión de Ca^{2+} a dos sitios de alta afinidad para el catión en la tubulina.

La influencia de la hidrólisis del GTP en el mecanismo de polimerización de la tubulina ha sido extensamente estudiado, estableciéndose que la hidrólisis del fosforilo γ del GTP no es necesaria para la formación del microtúbulo, pues la polimerización puede realizarse en presencia de análogos no hidrolizables de GTP (Weisenberg y col., 1976; Arai y Kaziro, 1976; Purich y Mac Neal, 1978), pero dicha reacción no puede iniciarse en presencia solamente de GDP (Carlier y Panataloni, 1978). Horward y Timasheff (1986) han sugerido que en la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura por debajo de los $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se formarían anillos a partir de subunidades de tubulina-GDP generadas directamente de protofilamentos de microtúbulos, sin previa disociación en los dímeros. Otros reportes sugieren la existencia de un equilibrio entre dos conformaciones de tubulina, una llamada recta, que se caracteriza por ser la conformación que tendría la tubulina cuando está formando parte del microtúbulo y la otra llamada curva, que sería la conformación que induciría la formación de anillos (Melki y col. 1989). Debido a que las

conformaciones antes señaladas estarían reguladas por el estado del nucleótido, es posible que la actividad GTPásica inducida por Ca^{2+} fuese responsable de un cambio conformacional de la tubulina desde el estado recto al curvo, pero sin agregarse en anillos. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que Ca^{2+} efectivamente induce un cambio conformacional en la molécula de tubulina que provoca un cambio en las propiedades espectrales de la tubulina en la región UV, de manera similar a lo que ocurre con la droga mitótica colchicina (Andreu y Timasheff, 1982).

Los agentes que inhiben la polimerización de tubulina y despolimerizan los microtúbulos, han sido clasificados en dos categorías: inhibidores que actúan de manera semejante a la colchicina y los que actúan como la vinblastina (David-Pfeuty y col., 1979). Los inhibidores del tipo de la colchicina, inducen la actividad GTPásica de tubulina en solución no así los inhibidores del tipo de la vinblastina. Dentro del primer grupo de agentes se puede contar, además de la colchicina, a la griseofulvina y daunorubicina; en tanto que dentro del grupo de inhibidores tipo vinblastina se encuentran todos los vinca-alcaloides y la podofilotoxina (David-Pfeuty y col., 1979). En el presente trabajo, ha sido demostrado que el ión bivalente calcio es capaz de inducir una actividad GTPásica de la tubulina no asociada a la reacción de polimerización. Por esto desde un punto de vista funcional Ca^{2+} puede ser clasificado dentro del grupo de inhibidores que actúan de modo similar a la droga mitótica

colchicina. Resulta, entonces, interesante discutir acerca de la relación que existe entre Ca^{2+} y colchicina, desde un punto de vista estructural. Colchicina se une a tubulina de manera prácticamente irreversible y a razón de 1 mol por mol de tubulina (Wilson y col., 1974). Estudios de proteólisis controlada de tubulina con tripsina (Serrano y col., 1984c) y de apagamiento de la fluorescencia de tubulina por colchicina (Maccioni y Seeds, 1982), han permitido concluir que el sitio de unión para colchicina estaría entre los aminoácidos 340 y 380 de la subunidad α de la tubulina. Al remover los últimos 40 aminoácidos de los extremos carboxilo-terminales de tubulina, por medio de digestión controlada con subtilisina, la colchicina retiene su capacidad de unirse a tubulina, pero varias propiedades del complejo tubulina-colchicina resultan afectadas (Mukhopadhyay y col., 1990). Entre ellas se puede señalar el cambio en la sensibilidad al pH del complejo tubulina-colchicina, la variación en el valor de las constantes de velocidad de formación y disociación del complejo y la modificación de las características de estabilidad de la unión frente a la temperatura (Mukhopadhyay y col., 1990). Estos resultados sugieren que los extremos carboxilo-terminales de tubulina regulan la interacción de tubulina con colchicina. Lo anterior es muy interesante si se considera que los resultados de esta tesis y los resultados informados por Serrano y col. (1986), demuestran que los sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} estarían en los extremos carboxilo-terminales de la tubulina.

La similitud en la dependencia de la concentración de Ca^{2+} de los procesos de inhibición de la polimerización y de estimulación de la actividad GTPásica de tubulina, indica que dichos procesos están estrechamente ligados y que probablemente son debidos a la unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad, aunque con los resultados presentados en esta tesis no se puede descartar que los efectos señalados sean debidos en parte a la saturación de los sitios de baja afinidad. Los valores de $K_{0,5}$ para los procesos de estimulación de la actividad GTPásica, inhibición de la polimerización de la tubulina y unión a los sitios de alta afinidad, son similares y varían entre 0,47 y 0,62 mM. Si se considera que las concentraciones de Ca^{2+} descritas para el citoplasma de células de mamífero varían entre 0,05 a 0,2 μM (Campbell, 1983), surge la duda acerca de la significado de estos resultados in vivo. Con el desarrollo de modernas técnicas fluorescentes para la cuantificación in vivo de Ca^{2+} , ha quedado de manifiesto que este catión presenta concentraciones locales, dentro de una misma célula, muy heterogéneas, observándose gradientes espaciales y sorprendentes oscilaciones temporales en la concentración de este ión, que determinan que en un lugar y en un momento determinado, la concentración de Ca^{2+} alcance valores entre 1000 y 5000 veces más altos que los informados anteriormente (Tsien y Poenie, 1986). Estas técnicas de cuantificación del Ca^{2+} interno se basan en la interacción específica de este catión con moléculas fluorescentes que son microinyectadas

al citoplasma (Grynkiewicz y col., 1985). La sonda fluorescente cambia su espectro de excitación y emisión al interactuar con Ca^{2+} y este cambio es proporcional a la cantidad de complejos formados (Tsien, 1989). Con estas técnicas de cuantificación del Ca^{2+} interno se ha podido determinar, en diversas células, cambios en la concentración de Ca^{2+} asociados a procesos en los cuales participa como regulador el ión Ca^{2+} . Así por ejemplo, se ha descrito que durante la fertilización de huevos de erizo de mar, la concentración de Ca^{2+} interna sufre importantes oscilaciones, llegando en algunos momentos a concentraciones cercanas a 0,3 mM (Tsien y Poenie, 1986). Por otra parte, se han descrito elevados niveles de Ca^{2+} libre en células que se desplazan hacia regiones dañadas de la piel en el proceso de inflamación (Hahn y col., 1992). Estos gradientes de Ca^{2+} libre han sido involucrados en el ensamblaje de la actina y miosina II en el frente y en la parte posterior de la célula migratoria (Hahn y col., 1992). Más interesante aún resultan los gradientes en la concentración de Ca^{2+} observados en células PtK1, asociados a ciertas etapas de la mitosis (Tsien y Poenie, 1986). En estas células se ha descrito que la concentración de Ca^{2+} alcanza un valor máximo en la región del huso mitótico durante la anafase. Si se considera que durante la anafase los cromosomas se mueven hacia los polos de la célula y que, desde hace varios años se ha demostrado, que este movimiento es dependiente de la despolimerización de los microtúbulos del huso mitótico (Inoué, 1981; Cande y col., 1981), es posible proponer que

Ca^{2+} jugaría un papel importante en la regulación del movimiento de los cromosomas, mediando la despolimerización de los microtúbulos del huso mitótico. Esta hipótesis es apoyada por experimentos de microinyección de Ca^{2+} al citoplasma de células durante la mitosis, los cuales resultan en alteraciones del ciclo celular (Ratan y Shelanski, 1986). Además, resultados de estudios de microinyección de anticuerpos contra una proteína que participa en el transporte de Ca^{2+} desde los reservorios internos, detienen la mitosis a nivel de la metafase (Ratan y Shelanski, 1986). Además, en células epiteliales se ha descrito que microtúbulos no unidos al centrómero se rompen casi instantáneamente cuando ocurre el incremento en la concentración de Ca^{2+} , a nivel de la anafase (Kaprelyants, 1988). El hecho de que microtúbulos que tienen un extremo libre sean más susceptibles a la despolimerización por Ca^{2+} , apoya la hipótesis propuesta en esta tesis, que sugiere que la despolimerización de microtúbulos por Ca^{2+} se debe a la eliminación de los "caps" estabilizantes ubicados en los extremos de los microtúbulos. Lo anteriormente descrito permite pensar que Ca^{2+} sería un importante agente regulador de la polimerización y despolimerización de microtúbulos in vivo.

Calcio interactúa cooperativamente con 2 sitios de unión de alta afinidad en la tubulina de cerebro de pollo. Este resultado, obtenido por dos métodos diferentes, concuerda con los informes de Serrano y col. (1986) y

Grisham y col. (1980) para la unión de Ca^{2+} a la tubulina de cerebro de cerdo y de ternero, respectivamente. Sin embargo, Solomon (1977) y Mejillano y Himes (1991), usando tubulina obtenida de cerebro de rata y de bovino, respectivamente, han descrito solo un sitio de unión de calcio de alta afinidad por cada molécula de tubulina. Una posible explicación de las diferencias encontradas, podría ser la utilización de distintas fuentes para la extracción del cerebro, pues todos los resultados publicados fueron hechos con tubulina proveniente de distintas especies (pollo, cerdo, gato, ternero y bovino).

Ninguno de los reportes señalados, indica la existencia de unión cooperativa de calcio a los sitios de alta afinidad en la tubulina. Pese a lo anterior, la conducta cooperativa para la interacción del calcio con la tubulina, encontrada en esta tesis, no es extraña si se considera que las proteínas que unen Ca^{2+} generalmente exhiben cooperatividad positiva en la unión de este catión con alta afinidad (Strynadka y James, 1989) y podría ser importante en la regulación in vivo del eventual efecto de Ca^{2+} sobre los procesos de polimerización y despolimerización de los microtúbulos. Esta conducta cooperativa no fue debida a la agregación de la tubulina, mediada por el catión, pues en este trabajo se demuestra que, en las condiciones utilizadas en los experimentos de unión de Ca^{2+} , este no induce la formación de agregados de tubulina y además el coeficiente de Hill no depende de la concentración de tubulina utilizada en el ensayo.

Un hallazgo importante de este trabajo es que el ión lantánido gadolinio es capaz, al igual que calcio, de inhibir la polimerización de la tubulina y despolimerizar los microtúbulos. Además, Gd^{3+} presenta características de unión muy similares a las de Ca^{2+} y compite con este ión por la unión a los sitios de alta y baja afinidad en la tubulina. Estos resultados permitirán utilizar a Gd^{3+} como una sonda paramagnética extrínseca para estudiar en detalle las características moleculares de los sitios de alta afinidad para Ca^{2+} en la molécula de tubulina, lo cual posibilitará no solo la determinación de las alteraciones estructurales provocadas por la unión del Ca^{2+} a la tubulina, sino que también contribuirá al avance del conocimiento del fenómeno general de modulación de la actividad proteica por la interacción de ciertos iones.

Mediante estudios de NMR, utilizando Gd^{3+} y péptidos correspondientes a los extremos carboxilo-terminales de tubulina, purificados luego de digestión controlada con subtilisina, se ha podido comprobar que los sitios de unión de alta afinidad para Gd^{3+} , y por consiguiente para Ca^{2+} , están ubicados en las regiones carboxilo-terminales de la tubulina. Lo anterior se concluye de experimentos de unión de Gd^{3+} a los péptidos, cuyos resultados son modificaciones en el espectro de NMR de los péptidos al adicionar Gd^{3+} en concentraciones en que están saturados en un 50 % los sitios de alta afinidad. Las perturbaciones del espectro de NMR de los péptidos en presencia de Gd^{3+} son las modificaciones

características que provoca la unión de centros paramagnéticos.

Un aspecto interesante de discutir es la localización de los sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} en la molécula de tubulina. Los resultados obtenidos en esta tesis y resultados previos provenientes de experimentos de digestión proteolítica de tubulina (Bhattacharyya y col., 1985; Serrano y col., 1986; Vera y col., 1989) y de experimentos de modificación química de aminoácidos ácidos (Mejillano y Himes, 1991), indican que los sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} se ubicarían en los extremos carboxilo terminales de la tubulina. Sin embargo, no ha sido demostrado a cuál de las dos subunidades de tubulina se estaría uniendo el Ca^{2+} . La conducta sigmoidea de la unión de Ca^{2+} a la tubulina, puede ser explicada tanto considerando que el catión se une a una de las subunidades o a ambas. En el primer caso, los dos moles de Ca^{2+} se unirían al extremo carboxilo-terminal de una misma subunidad, lo cual resultaría de la presencia de un típico dominio "EF hand", descrito ampliamente para las proteínas que unen Ca^{2+} , las cuales normalmente presentan cooperatividad positiva en la unión de Ca^{2+} (Strynadka y James, 1989). Por su parte, si los sitios de alta afinidad para Ca^{2+} se encuentran en distintas subunidades de la tubulina, la cooperatividad se puede explicar por la inducción de un cambio conformacional producto de la unión de Ca^{2+} al primer sitio, que resulta en una conformación en la cual se facilita la entrada de Ca^{2+} al segundo sitio.

Análisis de predicción de estructura secundaria de los últimos 40 aminoácidos de la tubulina, utilizando el método descrito por Chou y Fasman (1974), mostraron que la subunidad β poseería una estructura secundaria compuesta de dos α -hélices separadas por una vuelta (Fig. 30). Este tipo de estructuración es conocido como HLH y es típica de las proteínas que unen Ca^{2+} (Strynadka y James, 1989). En estas proteínas, Ca^{2+} se une por medio de la formación de enlaces de coordinación con los aminoácidos que componen la región entre las hélices. Al analizar esta secuencia en busca de posibles sitios de unión de Ca^{2+} , se pudo observar que dicha región presenta fuerte similitud con los sitios de unión de Ca^{2+} descritos para diversas proteínas que integran la familia de la troponina C (Sánchez, 1993). Este hecho y resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Gonzalez y Monasterio, resultados no publicados), por tinción de la tubulina y de péptidos del extremo carboxilo sintetizados en bacterias, con el colorante Stains All, que tiñe específicamente las cadenas polipeptídicas que unen Ca^{2+} , sugieren que los dos sitios de unión de alta afinidad para Ca^{2+} se encontrarían en el extremo carboxilo terminal de la subunidad β .

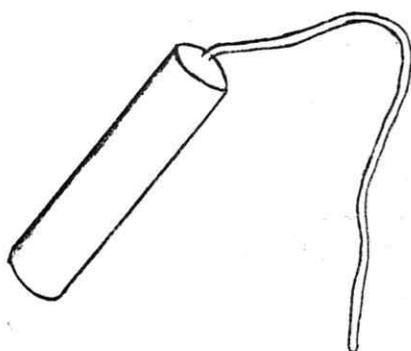
Considerando todos los resultados obtenidos en esta tesis, es posible proponer un modelo para explicar el mecanismo de acción del calcio sobre la inhibición de la polimerización de la tubulina y sobre la despolimerización de los microtúbulos (Fig. 31). Tubulina-GTP, representada

A Subunidad alfa

Estructura primaria

410
 Glu Gly Met Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Glu Asp Met
 425
 Ala Ala Leu Glu Lys Asp Tyr Glu Glu Val Gly Val Asp Ser Val
 440
 Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Gly Glu Glu Tyr 450

Estructura secundaria



B Subunidad Beta

Estructura primaria

405
 Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn Asp Leu Val
 420
 Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Asp Glu Gln Gly
 435
 Glu Phe Glu Glu Glu Gly Glu Glu Asp Glu Ala 445

Estructura secundaria

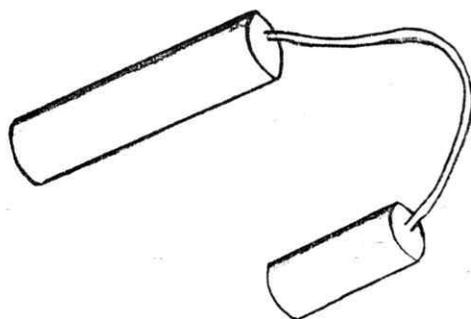


Figura 30. Estructura primaria y secundaria de los últimos 40 aminoácidos de la subunidad alfa (A) y beta (B) de la tubulina de cerebro de pollo. La secuencia de aminoácidos fue obtenida de Valenzuela y col. (1981) y corresponde a la secuencia derivada del cDNA para las subunidades α y β de tubulina, mayoritarias en cerebro de pollo. El modelo de estructura secundaria fue obtenido utilizando el procedimiento descrito por Chou y Fasman (1974).

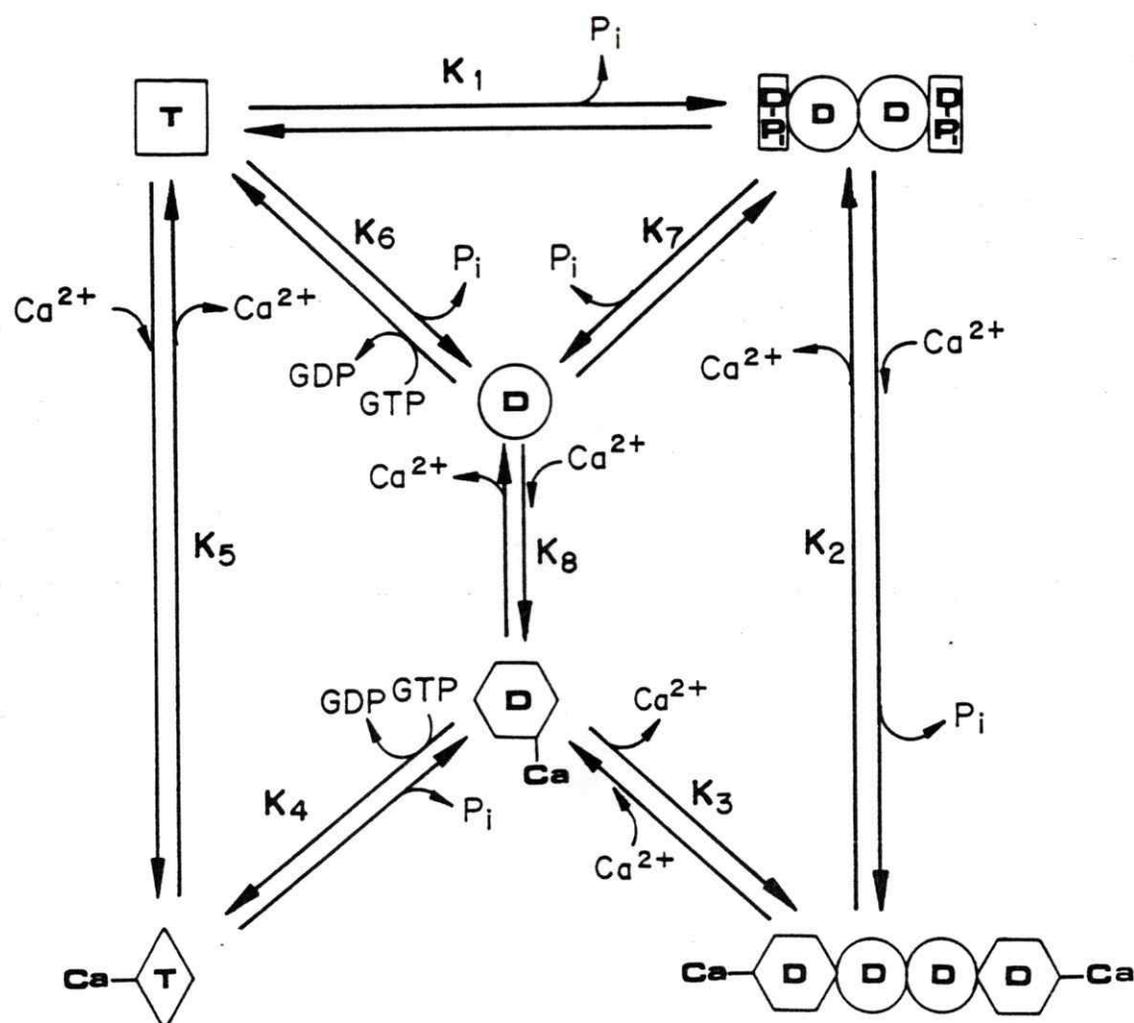


Figura 31. Modelo de trabajo para explicar la acción del calcio sobre la tubulina y sobre los microtúbulos. Los diferentes estados conformacionales de tubulina-nucleótido con y sin calcio, son representados por los siguientes símbolos: cuadrado, tubulina-GTP; rombo, tubulina-GTP-Ca²⁺; hexágono, tubulina-GDP-Ca²⁺; círculo, tubulina-GDP; rectángulo, tubulina-GDP-P_i. El equilibrio podría contemplar más pasos que los indicados en el esquema. Por simplicidad, solo se asigna una constante de equilibrio para cada paso.

por el cuadrado, es capaz de polimerizar formando microtúbulos, proceso en que gran parte del GTP se hidroliza a GDP, lo cual va acompañado por un cambio conformacional en el que GDP, unido al sitio E, queda ocluido. La hidrólisis del GTP ocurre solo en la parte intermedia de los microtúbulos, en tanto que los extremos (denominados en inglés "caps") se conservan como tubulina-GTP o tubulina-GDP-P_i, lo cual genera una estructura que estabiliza los microtúbulos. Este estado de los microtúbulos es representado en la figura 31 por dos círculos entre dos rectángulos. En el proceso de despolimerización de los microtúbulos, la tubulina retorna a una conformación (círculo) en la cual el GDP puede ser reemplazado por GTP, para reiniciar el ciclo. La tubulina-GTP al unir Ca²⁺ sufre un cambio conformacional (representado por el rombo), para originar un estado incapaz de incorporarse a los microtúbulos y activo en la hidrólisis de GTP, originando tubulina-GDP-Ca²⁺ (hexágono). Durante la despolimerización de los microtúbulos por calcio, la unión del catión, provoca la liberación del P_i desde los "caps" de tubulina-GDP-P_i, dejando un microtúbulo inestable, pues contiene dímeros de tubulina-GDP en toda su estructura (representado por dos círculos entre dos hexágonos en la figura 31), lo que determina su inmediata ruptura.

El modelo propuesto en la figura 31 es apoyado por las siguientes evidencias:

1. Calcio y su análogo gadolinio, inducen la actividad GTPásica de la tubulina en solución. Este efecto es

específico, pues no se encontró con otros iones y no es debido a agregación de la tubulina.

2. La inducción por calcio de la actividad GTPásica de la tubulina ocurre en el mismo intervalo de concentración en que Ca^{2+} inhibe la polimerización y ambos procesos probablemente son debidos a la unión del catión a los sitios de alta afinidad en la tubulina.

3. La unión de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad, provoca un cambio conformacional en la tubulina, que se observa por una perturbación en el espectro UV de la tubulina en presencia de Ca^{2+} y por apagamientos de la fluorescencia intrínseca de la tubulina por acrilamida, en presencia y en ausencia de Ca^{2+} .

4. La hipótesis que plantea que la inhibición de la polimerización de tubulina por Ca^{2+} es causada por la inducción de un estado conformacional incapaz de formar microtúbulos, es también apoyada por los experimentos donde se probó la cinética de reversión de la inhibición provocada por Ca^{2+} con EGTA. EGTA revierte la inhibición de la polimerización cuando es añadido en un tiempo no superior a 20 min luego de la adición de Ca^{2+} . En tiempos de incubación con Ca^{2+} superiores a 20 min, gran parte del GTP es hidrolizado a GDP y la tubulina es incapaz de formar microtúbulos, aún después de extraer el Ca^{2+} , por complejamiento con EGTA.

5. La actividad GTPásica inducida por Ca^{2+} está relacionada con la inhibición de la polimerización de la tubulina, pues

la polimerización de la tubulina no fue afectada por la presencia de un análogo no hidrolizable de GTP y, por su parte, los microtúbulos formados en presencia de análogos, no son afectados por Ca^{2+} (Arai y Kaziro, 1976; Weisenberg y Deery, 1976). La insensibilidad de la tubulina y de los microtúbulos a Ca^{2+} , en presencia de un análogo no hidrolizable, podría ser explicada si Ca^{2+} no se uniera a tubulina-GTP(τ S), como ha sido sugerido por Arai y Kaziro (1976), o bien si el catión provocara un estado conformacional, en presencia del análogo no hidrolizable, compatible con la polimerización.

6. Microtúbulos incubados con AlF_4^- , un análogo estructural de P_i , que tiene una afinidad 3 veces mayor que el fosforilo a su sitio en la tubulina, fueron menos sensibles al efecto de Ca^{2+} que los microtúbulos control. Este hecho indica que la liberación del P_i desde los "caps" de tubulina-GDP- P_i , estaría envuelta en el mecanismo de despolimerización de los microtúbulos por Ca^{2+} .

7. El valor más bajo de la constante de semisaturación para la despolimerización de microtúbulos inducido por Ca^{2+} , con respecto a las constantes obtenidas para la inhibición de la polimerización y la unión a los sitios de alta afinidad, sugiere que no es necesaria la unión de Ca^{2+} a todas las moléculas de tubulina dentro del microtúbulo. Este hecho concuerda con los resultados descritos por Karr y col., (1980) quienes demuestran que en microtúbulos de cerebro de bovino, calcio induce la despolimerización a partir de los extremos y también con los reportes de Carlier y col., (1988

y 1989) y Melki y col., 1990, que indican que solamente los extremos de los microtúbulos contienen tubulina-GDP-P_i.

ANEXO I

Procedimiento para asignar las señales en un espectro de $^1\text{H-NMR}$

Ha sido habitual establecer una relación entre la distribución de las señales en un espectro de $^1\text{H-NMR}$ de una proteína con los espectros de NMR de los aminoácidos individuales, libres en solución, para asignar las diferentes señales. Es así como se ha establecido que los protones provenientes de los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina, triptofano e histidina) dan señales entre 6 y 8 ppm, con excepción del protón unido al carbono 2 del grupo imidazol de la histidina que comunmente da una señal entre 8 y 9 ppm. Por otra parte, las resonancias de los protones unidos covalentemente al carbono α de los distintos aminoácidos, aparecen entre 4 y 5 ppm, y son la mayor parte de las veces enmascaradas por la gran señal de los protones del agua. Entre aproximadamente 1,5 y 4,5 ppm aparecen una diversidad de señales procedentes de protones de grupos metilenos. Finalmente, a más alto campo, bajo 1,6 ppm, se ubican las señales correspondientes a las resonancias de los protones ubicados en los grupos metilos. La posición exacta en que aparecen las señales para los diversos protones de los distintos aminoácidos libres en solución, se resume en la tabla IX.

Debido a que la posición en que aparecen las señales es fuertemente influenciada por las características del ambiente y la conformación de la macromolécula, para asignar correctamente los picos de un espectro es necesario considerar estas variables. Un reciente estudio realizado

Tabla IX. Posición en que aparecen los diferentes protones provenientes de los distintos aminoácidos en solución, en un espectro de $^1\text{H-NMR}$.^a

Aminoácidos	$\alpha\text{-H}$	$\beta\text{-H}$	$\tau\text{-H}$	$\delta\text{-H}$	Otros
Asp	4,77	2,75			
Glu	4,30	1,97	2,28		
Ser	4,50	3,89			
Gly	3,97				
His	4,63	3,20			7,14 (C4H) 8,12 (C2H)
Arg	4,40	1,80	1,72	3,31	
Thr	4,35	4,22	1,23		
Ala	4,35	1,40			
Pro	4,71	1,98	2,30	3,65	
Tyr	4,60	2,92			7,15 (C2,6) 6,86 (C3,5)
Val	4,18	2,13	0,94		
Met	4,51	2,00	2,63		
Ile	4,22	1,89	1,19	0,89	
Leu	4,39	1,65	1,65	0,94	
Phe	4,66	2,99			
Lys	4,36	1,75	1,47	1,71	3,02 ($\epsilon\text{-H}$)
Trp	4,70	3,20	[7,24 (C2H); 7,65 (C4H); 7,17 (C5H); 7,24 (C6H); 7,50 (C7H)]		
Cys	4,69	2,96 3,28			
Asn	4,76	2,76			
Gln	4,37	2,01			

^a Los valores del corrimiento químico fueron obtenidos de Bundi y Wuthrich (1979).

por Wishart y col. (1991), en el cual se analizó la posición en que aparecen las señales correspondientes a los diversos protones de los distintos aminoácidos en más de 70 proteínas distintas, mostró un efecto significativo sobre el corrimiento químico que experimentan las señales de la estructura secundaria en que se encuentran formando parte los aminoácidos. La figura 32 muestra el intervalo de ppm (partes por millón) en que puede aparecer un protón dependiendo de las características del ambiente que lo rodea, indicando que hay un corrimiento químico importante de algunas señales con respecto a la posición en que aparecen en los aminoácidos libres en solución. Este corrimiento químico está relacionado con el tipo de estructura secundaria que presenta la región en que se encuentra inmerso un determinado aminoácido (Wishart y col., 1991). Es así como la señal correspondiente al protón unido al carbono α experimenta un corrimiento promedio de 0.39 ppm hacia alto campo cuando el aminoácido está formando parte de una hélice y se corre en promedio 0.37 ppm hacia bajo campo cuando el aminoácido está formando parte de una lámina β . La figura 33 ilustra la distribución de los corrimientos químicos del protón unido al carbono α de los distintos aminoácidos, en α -hélices o láminas β .

En conclusión, para asignar correctamente las señales en un espectro de NMR es necesario tener presente que la posición donde estas aparecen está influenciada por varias variables, que deben ser consideradas.

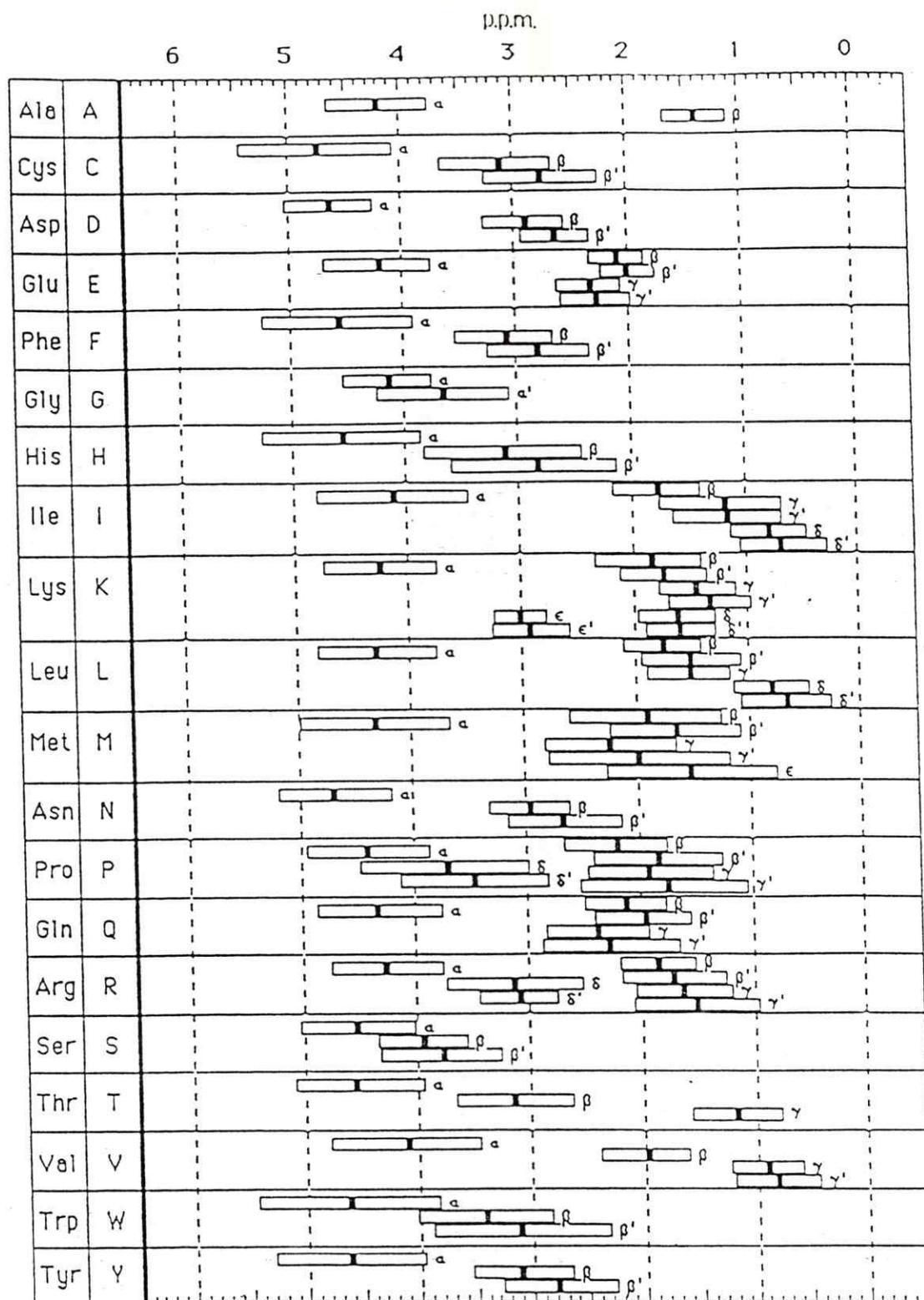


Figura 32. Distribución de los corrimientos químicos para los diferentes protones de los 20 aminoácidos más comunes, en 70 proteínas distintas. La longitud de cada barra horizontal corresponde al intervalo de corrimientos químicos en que cada señal apareció en las distintas proteínas. La barra vertical en el medio de cada barra horizontal, muestra el valor promedio del corrimiento químico para cada señal. Obtenido de Wishart y col., 1991.

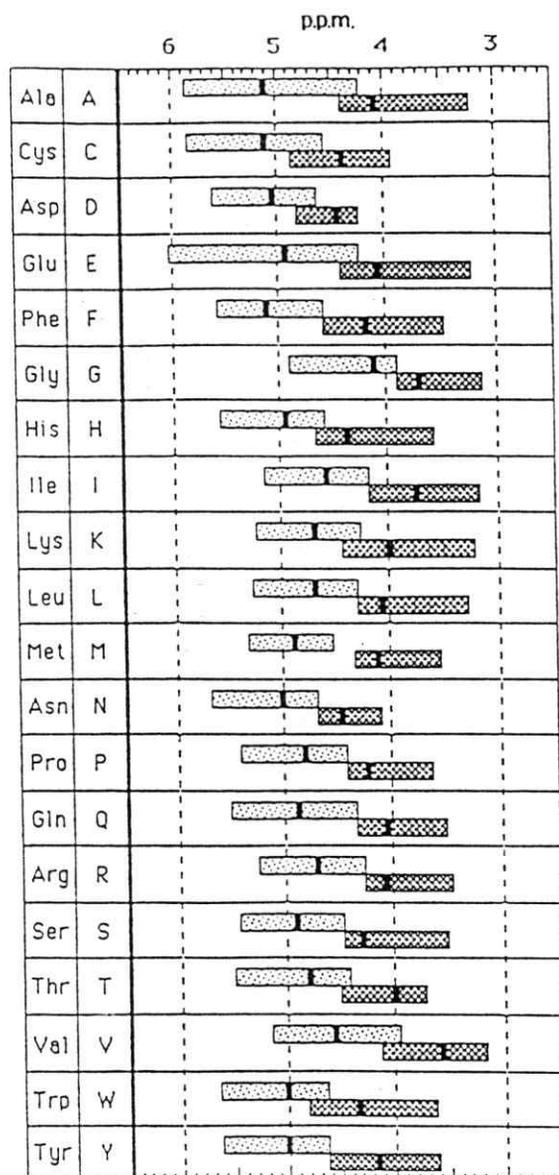


Figura 33. Distribución de los corrimientos químicos para el protón unido al carbono α de los distintos aminoácidos, en α -hélices y láminas β . La barra horizontal más oscura representa el intervalo de corrimientos químicos en que aparecen las señales del protón unido al carbono α cuando el aminoácido se encuentra formando parte de una α -hélice y las barras horizontales más claras corresponden a estas mismas señales cuando el aminoácido está formando parte de un lámina β . La barra vertical negra indica el valor de la mediana de los corrimientos químicos.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abbott, F., Darnall, D. y Birnbaum, E. 1975. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 241 - 247.
- Andreu, J. y Timasheff, S. 1981. Arch. Biochem. Biophys. 211, 151 - 157.
- Andreu, J. y Timasheff, S. 1982. Biochemistry 24, 6465 - 6476.
- Arai, T. y Kaziro, Y. 1976. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 369 - 376.
- Arai, T. y Kaziro, Y. 1977. J. Biochem. (Tokyo) 82, 1063 - 1071.
- Barden, J. y Dos Remedios, C. 1984. J. Biochem. 96, 913 - 921.
- Beese, L., Stubbs, G. y Cohen, C. 1987. J. Mol. Biol. 189, 367 - 370.
- Bhattacharyya, B., Sacket, D y Wolff, D. 1985. J. Biol. Chem. 260, 10208 - 10216.
- Berkowitz, S. y Wolff, J. 1981. J. Biol. Chem. 256, 11216 - 11223.
- Berridge, M. 1975. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6, 1 - 98.
- Bundi, A. y Wuthrich, K. 1979. Biopolymers 18, 285 - 292.
- Campbell, A. 1983. Intracellular Calcium. John Wiley.
- Cande, W., Meusen, R. y McDonald, K. 1981. J. Cell Biol. 88, 618 - 629.
- Carlier, M. F. 1982. Mol. Cell. Biochemistry 47, 97 - 113.
- Carlier, M. F. y Pantaloni, D. 1978. Biochemistry 17, 1908 - 1915
- Carlier, M. F. y Pantaloni, D. 1981. Biochemistry 20, 1918 - 1924.
- Carlier, M. F., Hill, T. L. y Chen, Y. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 771 - 775.
- Carlier, M. F., Didry, D., Melki, R., Chabre, M. y Pantaloni, D. 1988. Biochemistry 27, 3555 - 3559.

- Carlier, M. F., Didry, D., Simon, C. y Pantaloni, D. 1989. Biochemistry 28, 1783 - 1791.
- Chou, P. y Fasman, G. 1974. Biochemistry 13, 222 - 245.
- Correia, J. J. y Williams, R. C. 1983. Annu. Rev. Biophys. Bioengineer 12, 211 - 235.
- da Silva, A. y Reinach, F. 1991. Trends Biochem. Sci. 16, 53 - 57.
- David-Pfeuty, T., Simon, C. y Pantaloni, D. 1979. J. Biol. Chem. 254, 11696 - 11702.
- De La Cerda, M. 1990. Memoria para optar al título de profesor de Química y Ciencias Naturales. Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.
- De La Viña, S., Andreu, D., Medrano, F., Nieto, J. y Andreu, J. 1988. Biochemistry 27, 5352 - 5367.
- Dwek, R. y Richards, R. 1971. Eur. J. Biochem. 21, 204 - 209.
- Endrenyi, L. y Kwong, F. 1981. En Kinetic data analysis. Design and analysis of enzyme and pharmacokinetic experiments. Edited by L. Endrenyi. Plenum press. New York and London. pag. 89 - 104.
- Evans, C. H. 1983. Trends Biochem. Sci. 8, 445 - 449.
- Fritz, J., Oliver, R. y Pietrzyk, D. 1958. Anal. Chem. 30, 1111 - 1114.
- Gaskin, F., Cantor, C. y Shelanski, M. 1974. J. Mol. Biol. 89, 737 - 758.
- Gaskin, F. 1981. Biochemistry 20, 1318 - 1322.
- George, H., Misra, L. Field, D. y Lee, J. 1981. Biochemistry 20, 2402 - 2409.
- Grisham, L., Gorbunoff, M. y Timasheff, S. 1980. Federation Proceedings 39, 2162a.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R. 1985. J. Biol. Chem. 260, 3440 - 3450.
- Hahn, K., DeBiasio, R. y Taylor, D. 1992. Nature 359, 736 - 738.
- Howard, W. y Timasheff, S. 1986. Biochemistry 25, 8292 - 8300.
- Inoué, S. 1981. J. Cell Biol. 91, 131S - 147S.

Job, D., Fischer, E. y Margolis, R. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 4679 - 4682.

Kaprelyants, A. 1988. Trens Biochem. Sci. 13, 43 - 46.

Karr, T., Kristofferson, D. y Purich, D. 1980. J. Biol. Chem. 255, 11853 - 11856.

Kirschner, M., Williams, R. Weingarten, M y Gerhart, J. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci USA 71, 1159 - 1163.

Kirschner, M. y Mitchinson, T. 1986. Cell 45, 329 - 342.

Lee, J. y Frigon, R. 1973 J. Biol. Chem. 248, 7253 - 7262.

Lee, J. y Timasheff, S. 1977. Biochemistry 16, 1754 - 1763.

Lee, Y. y Wolff, J. 1984. J. Biol. Chem. 259, 1226 - 1230.

Ludueña, R. 1979. Biochemistry of tubulin. En Microtubules. roberts, K. y Hyams, J. eds. Academic press, London, pag. 65 - 116.

Maccioni, R. y Seeds, N. 1982. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 896 - 903.

Mejillano, M. y Himes, R. 1991. J. Biol. Chem. 266, 657-664.

Melki, R., Carlier, M. y Pantaloni, D. 1989. Biochemistry 28, 9143 - 9152.

Melki, R, Carlier, M. y Pantaloni, D. 1990 Biochemistry 29, 8921 - 8932.

Mildvan, A. y Cohn, M. 1970. Adv. enzymol. 33, 1 - 67.

Monasterio, D. 1987. Biochemistry 26, 6099 - 6106.

Monasterio, D. y Timasheff, S. 1987. Biochemistry 26, 6091 - 6099.

Monasterio, D., Acoria, M., Diaz, M. y Lagos, R. (1993). Arch. Biochem. Biophys. (En prensa).

Mukhopadhyay, K., Parrack, P. y Bhattacharyya, B. 1990. Biochemistry 29, 6845-6850.

Na, G. y Timasheff, S. 1981. J. Mol. Biol. 151, 165 - 178.

Nieto, M., Muñoz, E., Carreira, J. y Andreu, J. 1975. Biochim. Biophys. Acta 413, 394 - 414.

Olmsted, J. y Borisy, G. 1975. Biochemistry 14, 2996 - 3001.

- Ortiz, M., Lagos, R y Monasterio, O. 1993. Arch. Biochem. Biophys. (En prensa).
- Penefsky, H. 1977. J. Biol. Chem. 252, 2891 - 2899.
- Purich, D. y Mac Neal, R. 1978. FEBS Lett. 96, 83 - 86.
- Ratan, R. y Shelanski, M. 1986. Trends Biochem. Sci. 11, 456 - 459.
- Rodionov, V., Gyoeva, F., Kashina, A., Kuznetsov, S. y Gelfand, V. 1990. J. Biol. Chem. 265, 5702 - 5707.
- Sacket, D., Bhattacharyya, B. y Wolff, J. 1985. J. Biol. Chem. 260, 43 - 45.
- Sanchez, R. 1993. Tesis para optar al título de bioquímico. Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción.
- Serrano, L., Avila, J. y Maccioni, R. 1984a. Biochemistry 23, 4675 - 4681.
- Serrano, L., De La Torre, J., Maccioni, R. y Avila, J. 1984b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5989 - 5993.
- Serrano, L., Avila, J. y Maccioni, R. 1984c. J. Biol. Chem. 259, 6607 - 6611.
- Serrano, L., Valencia, A., Caballero, R. y Avila, J. 1986. J. Biol. Chem. 261, 7076 - 7081.
- Schliwa, M. 1976. J. Cell Biol. 70, 527 - 540.
- Stephens, E. y Grisham, C. 1979. Biochemistry 18, 4866 - 4875.
- Snyder, E., Buoscio, B. y Falke, J. 1990. Biochemistry 29, 3937 - 3943.
- Sobue, K., Fujita, M., Muramoto, Y. y Kakuichi, S. 1981. Febs Letters 132, 137 - 140.
- Solomon, F. 1977. Biochemistry 16, 358 - 363.
- Strynadka, N. y James, M. 1989. Ann. Rev. Biochem. 58, 951 - 958.
- Timasheff, S., Andreu, J. y Na, G. 1991. Pharmac. Ther. 52, 191 - 210.
- Tsien, R. y Poenie, M. 1986. Trends Biochem. Sci. 11, 450 - 455.
- Tsien, R. 1989. Meth. Cell Biol. 30, 127- 153.

Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Rutter, W., Kirschner, M. y Cleveland, D. 1981. Nature 289, 650-655.

Vera, J., Rivas, C. y Maccioni, R. 1989. Biochemistry 28, 333 - 339.

Walseth, T. y Johnson, R. 1979. Biochim. Biophys. Acta 562, 11 - 31.

Weisenberg, R., Borisy, G. y Taylor, E. 1968. Biochemistry 7, 4466 - 4479.

Weisenberg, R. y Timasheff S. 1970. Biochemistry 9, 4110 - 4116.

Weisenberg, R. 1972. Science 177, 1104 - 1105.

Weisenberg, R. y Deery, W. 1976. Nature 263, 792 - 793.

Weisenberg, R., Deery, W. y Dickinson, P. 1976. Biochemistry 15, 4248 - 4254.

Wilson, L., Bamburg, J., Mizel, S., Grisham, L. y Creswell, K. 1974. Fed. Proc. 33, 158 - 166.

Wishart, D., Sykes, B. y Richards, F. 1991. J. Mol. Biol. 222, 311 - 333.

Yamamoto, H., Fukunaga, K., Tanaka, E. y Miyamoto, E. 1983. J. Neurochemistry 41, 1119 - 1125.