

UCI4-FC
DOC-B
R 696
C.1

**ESTUDIOS SOBRE EL PLEGAMIENTO Y LA DINÁMICA DE LAS
SUBUNIDADES DE LA TUBULINA DE CEREBRO DE POLLO**

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

PATRICIO HERNAN RODRIGUEZ NEIRA

Diciembre 2001



Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio Opazo

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

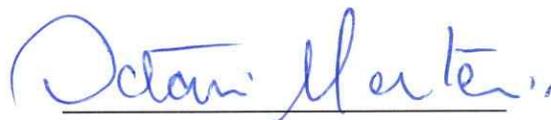
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado Presentada por el candidato.

Patricio Hernán Rodríguez Neira

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido en Diciembre del 2001.

Director de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio O.



Comisión de Evaluación de Tesis

Dra. Cecilia Hidalgo T.



Dr. Juan Brunet P.



Dr. Juan Carlos Slebe T.



FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El trabajo de esta tesis fue posible gracias al financiamiento proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, proyectos 1950556 (al Dr. Octavio Monasterio), 295001 (a Patricio Rodríguez), NIH (Estados Unidos) proyecto GM11223 (a Dr. Gregorio Weber) y una beca de postgrado, otorgada a Patricio Rodríguez por la Comisión Nacional de Investigación y Tecnología (CONICYT).

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en forma muy especial al Dr. Octavio Monasterio, por su paciencia y visión para dirigir esta tesis y por darme la libertad intelectual necesaria para desarrollarla.

También, deseo agradecer al Dr. Gregorio Weber (1916–1997) por su apoyo intelectual y por darme una visión honesta y ejemplar de la ciencia.

Además, deseo agradecer a las siguientes personas por su apoyo intelectual y cariño durante el desarrollo de éste trabajo: Dr. Jorge Babul, Dr. Tito Ureta, Dra. Victoria Guixé, Eduardo Kessi y Juan Carlos Torres

También, agradezco a todos aquellos que hicieron de mi estadía en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular una época memorable y amable de mi vida profesional y académica.

INDICE DE MATERIAS

Fuentes de financiamiento	Pág. ii
Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Lista de abreviaturas	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Genes, proteínas y plegamiento	1
Los microtúbulos	3
La tubulina	5
Estudios sobre el plegamiento de la tubulina	9
Objetivos	12
MATERIALES Y METODOS	13
Reactivos y proteínas	13
Purificación de la tubulina	13
Purificación de dímeros de la tubulina	14
Modificación química de la tubulina con FITC	15
Determinación de la estequiometría de modificación de la tubulina marcada con FITC	15
Ensayos de desnaturación y renaturación	16
Ensayo de renaturación por filtración rápida	16
Medidas de dicroísmo circular	18
Medidas de fluorescencia	18
Estudios de desnaturación y renaturación	
Estudios de intercambio de subunidades	20
Estudios de polarización, presión y tiempos de vida	20

Análisis de los datos de polarización estática de derivado tubulina-FITC	21
RESULTADOS	23
Caracterización de la reacción de renaturación de la tubulina de cerebro de pollo.	23
Estudios de espectroscopia de fluorescencia	23
Estudios de espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	27
Comparación de los cambios en estructura terciaria y secundaria en la reacción de desnaturación y renaturación de la tubulina	31
Estudios de renaturación por filtración molecular rápida	34
Efecto de GTP sobre la reacción de renaturación de la tubulina por filtración rápida	40
Reacción de plegamiento de la tubulina de cerebro de bovino	46
Envejecimiento de la tubulina y especies asociadas por replegamiento en filtración rápida	46
Caracterización de la dinámica del equilibrio químico monómero-dímero de la tubulina	50
Estudios de desnaturación y disociación de la tubulina por medio del aumento en la presión hidrostática	57
Análisis de los valores de polarización y medidas de tiempos de vida para el derivado tubulina-FITC	68
DISCUSIÓN	72
Estudios de desnaturación y renaturación	73
Dinámica de la interacción entre la α y β tubulina	79
Efecto de la presión hidrostática sobre la conformación de la tubulina	80
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	87

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla I	Medidas de tiempos de vida para FITC unido a tubulina, en estado dimérico, intercambiada y disociada	70
Tabla II	Tiempos de correlación rotacional de los derivados de tubulina-FITC	71

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Esquema de la estructura tridimensional del heterodímero de tubulina	7
Figura 2	Modelo para la vía de plegamiento de la tubulina <i>in vivo</i>	11
Figura 3	Procedimiento experimental para realizar los estudios de desnaturación y renaturación	17
Figura 4	Diseño experimental para los experimentos de replegamiento por filtración rápida	19
Figura 5	Disposición de los residuos triptofanos en la estructura de la tubulina de cerebro de bovino	24
Figura 6	Efecto de la concentración de GdmCl sobre los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la tubulina	25
Figura 7	Efecto de GdmCl sobre la emisión de fluorescencia de los triptofanos de la tubulina	26
Figura 8	Efecto de GdmCl sobre la polarización de la emisión de los triptofanos de la tubulina de cerebro de pollo	28
Figura 9	Efecto de GdmCl sobre la estabilidad del complejo tubulina – ácido 1,8 anilino naftaleno (ANS)	29
Figura 10	Espectros de dicroísmo circular en la región UV lejano de tubulina a diferentes concentraciones de GdmCl	30
Figura 11	Desnaturación y renaturación de tubulina seguida por dicroísmo circular en función de la concentración de GdmCl	32
Figura 12	Efecto diferencial de la concentración GdmCl sobre la estructura de la tubulina observada por dicroísmo circular y fluorescencia de triptofanos	33
Figura 13	Caracterización de los productos de renaturación por filtración molecular rápida en HPLC	36
Figura 14	Recromatografía del heterodímero renaturado de tubulina	37
Figura 15	Efecto de la concentración inicial de tubulina sobre el cromatograma de renaturación por filtración molecular rápida	38
Figura 16	Efecto de la concentración inicial de tubulina sobre la distribución de estados de asociación en el ensayo de renaturación por filtración rápida	41

Figura 17	Efecto del flujo de la columna sobre la distribución de estados de asociación en el ensayo de renaturación por filtración molecular rápida	42
Figura 19	Cálculo de la energía de activación para la reacción de polimerización observada por filtración molecular rápida	44
Figura 20	Efecto de GTP sobre la renaturación de la tubulina por filtración molecular rápida	45
Figura 21	Comparación de la renaturación por filtración rápida de las tubulinas de cerebro bovino y de pollo	47
Figura 22	Comparación de las curvas de desnaturación y renaturación de las tubulinas de cerebro bovino y de pollo seguidas por fluorescencia intrínseca	48
Figura 23	Cromatogramas de la tubulina replegada por filtración rápida y envejecida	49
Figura 24	Espectro de excitación con luz polarizada de tubulina marcada con isotiocianato de fluoresceína y de la intercambiada con tubulina sin marca	52
Figura 25	Efecto de la dilución sobre el derivado tubulina-FITC	54
Figura 26	Efecto de la concentración total de dímeros sobre la velocidad de intercambio de monómeros	56
Figura 27	Efecto de la temperatura sobre la velocidad de intercambio de monómeros de tubulina	58
Figura 28	Disociación, deriva conformacional e intercambio de subunidades observados por transferencia de energía homogénea	59
Figura 29	Efecto de la presión hidrostática sobre la emisión de fluorescencia intrínseca de la tubulina	61
Figura 30	Efecto de la concentración de proteína sobre el cambio del centro de masa de la emisión de triptofanos en función de la presión hidrostática	62
Figura 31	Cálculo del cambio de volumen molar producido por el cambio de presión hidrostática	63
Figura 32	Efecto de la presión hidrostática sobre la polarización de la tubulina modificada con FITC e intercambiada	66
Figura 33	Efecto de la presión hidrostática sobre la polarización de la tubulina-FITC parcialmente disociada por dilución	67
Figura 34	Gráficos de fase y modulación para la determinación de los tiempos de vida para FITC unido a tubulina, a alta, baja concentración y con tubulina intercambiada	69

Figura 35	Mecanismo mínimo para la renaturación de la tubulina <i>in vitro</i>	76
Figura 36	Mecanismo para el intercambio de las subunidades de tubulina	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ANS	: Ácido 1,8 anilino naftaleno sulfónico
DTT	: Ditioneitol
FITC	: Isotiocianato de Fluoresceína
GdmCl	: Clorhidrato de Guanidinio
Hepes	: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
Tris	:Tris (hidroximetil) aminometano

Otras abreviaturas se definen en el texto.

RESUMEN

Se caracterizó la desnaturalación por GdmCl y la renaturación de la tubulina, por medio de fluorescencia en estado estacionario, dicroísmo circular y cromatografía rápida de exclusión molecular. Los experimentos de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular mostraron que la tubulina desnaturalada es capaz de renaturarse en una conformación similar a la de la tubulina nativa. La concentración de GdmCl para alcanzar un 50% de desnaturalación ($D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$) o renaturación fue de 1,4 M. Este valor se obtuvo a partir del corrimiento del máximo y del cambio de rendimiento cuántico de los espectros de emisión de triptofanos. La unión de ANS mostró que la tubulina renaturada recupera cerca del 80% de la afinidad de la proteína nativa para esta sonda con un $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ de 1,3 M. La susceptibilidad de la estructura secundaria de la tubulina a GdmCl observada por dicroísmo circular, presenta un $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ de 1,9 M para la desnaturalación y renaturación. Estos resultados indican la existencia de especies intermediarias, tanto para la reacción de desnaturalación como de renaturación. Las características espectrales de los intermediarios son compatibles con la presencia de un "glóbulo fundido" en equilibrio. El proceso de renaturación y las especies renaturadas se caracterizaron antes del equilibrio por cromatografía rápida de exclusión molecular. Los resultados mostraron que los monómeros, α - y β -tubulina, se asocian muy rápido para formar un dímero, el cual polimeriza para formar oligómeros de alto tamaño molecular. La polimerización muestra una fuerte dependencia de la concentración de proteína y la temperatura. Las características de las

especies formadas durante la filtración molecular rápida mostraron ser muy similares a los agregados producidos cuando la tubulina nativa se envejeció por 24 h a 4°C. Estos estudios indican que la tubulina completamente desnaturada es capaz de renaturarse en una conformación similar a la nativa, y se autoasocia en agregados solubles de alto peso molecular. La falta de funcionalidad de la tubulina replegada indica que la estructura del heterodímero no es idéntica a la nativa y favorece una vía rápida de auto asociación de los dímeros que presenta una energía de activación de 11,3 Kcal/mol.

Los resultados, en su conjunto muestran que la estructura terciaria responsable del entorno de los triptofanos se mantiene, al igual que el contenido de estructura secundaria. Sin embargo, la funcionalidad se pierde: esto último se puede explicar ya sea por una incorrecta asociación monómero-monómero o porque las superficies de interacción longitudinal o lateral del monómero han cambiado. Para dilucidar esto, es necesario conocer que ocurre con la asociación/disociación en el heterodímero nativo. Sin embargo, en cuanto a los valores termodinámicos descritos en la literatura para la asociación del heterodímero, no existen acuerdos entre los autores y ha sido fuente de controversias. Por esta razón se caracterizó la disociación y el intercambio de los monómeros de la tubulina, utilizando conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que contenía 1,2 moles de colorante por mol de dímero, y que solo contenía trazas de sonda libre (< 1%). Al realizar experimentos de dilución del derivado tubulina-FITC, se encontró una constante de disociación de 8×10^{-7} M. Para estudiar el

intercambio de los monómeros, la transferencia de energía homogénea entre los fluoróforos de la sonda FITC, en un mismo heterodímero, se midió por el incremento en la polarización observado por la excitación en el borde rojo del espectro del FITC. Se encontró una baja polarización a alta dilución, menor que 0,1, que es inconsistente con la separación de partículas rígidas y se atribuye a la deriva conformacional de las subunidades disociadas. Al diluir la proteína marcada se observaron 2 procesos, con tiempos de relajación de 3 y 60 minutos; estos fueron asignados a la disociación y a la deriva conformacional respectivamente. El intercambio de subunidades fue medida por el incremento de la polarización al mezclar la proteína marcada con un gran exceso de tubulina sin marcar, a alta y baja concentración. El intercambio fue independiente de la concentración total de proteína, lo que muestra que el ciclo de asociación-disociación está determinado por la velocidad de disociación de los dímeros, y se determinó que la dependencia de la disociación de la temperatura tiene una energía de activación de 20 Kcal/mol.

Con el objeto de estudiar las interacciones entre los monómeros de la tubulina se realizaron experimentos en que se varió la presión hidrostática. Los espectros de la tubulina no marcada mostraron un corrimiento progresivo al rojo de los triptofanos, que a 2,4 Kbar alcanza 12 nm. Este corrimiento del máximo de emisión, que es independiente de la concentración de proteína, demuestra que es un proceso de primer orden, debido a la desnaturación de la proteína y que no está relacionado con un proceso de disociación. Al estudiar el efecto de la presión sobre la

tubulina-FITC diluida, en estado parcialmente disociada, se encontró que la presión incrementa el grado de asociación, hecho que no ha sido previamente demostrado para otros dímeros.

ABSTRACT

GdmCl denaturation and renaturation of tubulin was studied by steady state fluorescence, circular dichroism and fast molecular exclusion chromatography. Intrinsic fluorescence and circular dichroism measurements showed that denatured tubulin can renature to a conformation similar to that of native tubulin. The GdmCl concentration required for 50% denaturation ($D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$) or renaturation was 1.4 M. This value was obtained from the maximum shift and the change in quantum yield of the tryptophan emission spectra. ANS binding showed that renatured tubulin recovers close to 80% of the native affinity for this probe, with a $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ of 1.3 M. Secondary structure sensitivity of tubulin to GdmCl, as assessed by CD, had a $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ of 1.9 M for both denaturation and renaturation. These results reveal the existence of intermediate species for both the denaturation and renaturation reactions. The spectral characteristics of the intermediaries are compatible with the presence of a "molten globule" at equilibrium. The renaturation process and the renatured species were characterized before equilibrium by means of fast molecular exclusion chromatography. Results showed that the α - and β -tubulin monomers rapidly associate to form a dimer, which polymerizes into larger oligomers. The polymerization depends strongly on the protein concentration and temperature. The characteristics of the species formed during fast molecular chromatography were very similar to those found in the aggregates produced when native tubulin was aged for 24 h at 4°C. These results show that fully denatured tubulin is capable of renaturing to a

native-like conformation, and that it self-associates into soluble high molecular weight aggregates. The lack of function of the refolded tubulin shows that the heterodimer structure is not identical to the native structure and it favours a fast dimer self-association pathway with a activation energy of 11,3 Kcal/mol.

Results as a whole show that the tertiary structure responsible for the tryptophan surroundings as well as the content of secondary structure are maintained. However, the function is lost, which could be due either to an incorrect monomer-monomer association or to changes in the longitudinal or lateral interaction surfaces of the monomer. In order to clarify this, it is necessary to understand the association/dissociation in the native heterodimer. Since there is no agreement in the literature on the thermodynamic values for the heterodimer association, we characterized the heterodimer dissociation and the monomers exchange for the derivate FITC-tubulin, which contained 1.2 moles of dye per mol of dimer, with only traces of free probe (< 1%). Upon dilution of the FITC-tubulin, we found a dissociation constant of 8×10^{-7} M. To study the exchange of monomers, the homogenous energy transfer between the FITC bound molecules in the same dimer was measured by the increase in polarization upon red edge excitation. At high dilution, the polarization values were low, less than 0.1, which is inconsistent with the separation of rigid particles and can be accounted for by conformational drift of the dissociated subunits. Upon dilution of the labeled protein, two processes were observed, with relaxation times of 3 and 60 minutes, which were assigned to the dissociation and the

conformational drift, respectively. Subunit exchange was shown by the increase in polarization upon mixing the labeled protein with excess unlabeled tubulin at both low and high concentrations. The exchange was independent of the total protein concentration, which shows that the dissociation-association cycle depends on the rate of dimer dissociation. It was found that the dissociation dependence on temperature has an activation energy of 20 Kcal/mol.

In order to study the interactions of the monomers by other methods, heterodimer dissociation by hydrostatic pressure was attempted. The spectra of unlabeled tubulin showed a progressive shift to the red, which at 2.4 Kbar reached 12 nm. This shift, which is independent of the protein concentration, shows that the change in intrinsic fluorescence is a first order process of denaturation and therefore unrelated to the dissociation. When pressure was applied to diluted, partially dissociated tubulin-FITC, it was found that pressure increases the degree of association. This has not been shown before for other dimers.

INTRODUCCIÓN

Genes, proteínas y plegamiento

La información estructural y funcional que caracteriza a los seres vivos está codificada en el DNA. En la mayoría de los casos, para que ésta información se exprese, es necesaria su traducción a una o varias proteínas, que finalmente son las responsables de las características fenotípicas de los organismos vivos. Sin embargo, el mecanismo de cómo la información codificada en un dominio bidimensional (DNA) es traducida a un espacio tridimensional (proteína), es una problema aún no resuelto.

Éste acertijo científico cobra singular importancia, debido al reciente secuenciamiento de la mayor parte de los genes de varios organismos, entre ellos el del humano (Little, 1999; Pennisi, 2000). Una fracción importante de los genes encontrados producen proteínas de estructura desconocida, por lo tanto, falta un segmento importante de conocimiento para que ésta información pueda ser utilizada en forma eficaz.

Por el momento gran parte de la información genómica reunida se *asemeja a las letras y palabras que aparecen en un escrito, en que el lector, solo es capaz de reconocer los signos que allí aparecen y no el significado de las agrupaciones de estos.*

En el presente para generar información estructural a partir de las secuencias génicas, se ha recurrido al uso de nuevas técnicas que permiten construir modelos tridimensionales de los productos de expresión, en función del conocimiento de estructuras previamente determinadas por biólogos estructurales, a través de técnicas de difracción de rayos X y NMR (Sanchez y col., 2000; Sanchez y Sali, 2000). Esta aproximación se basa principalmente en la búsqueda de la similitud de las secuencias

aminoacídicas generadas por los nuevos genes con las secuencias de las proteínas de estructura previamente determinadas. Esto último, promete al menos resolver de un modo operativo la encrucijada de cómo unir secuencias con estructura y función.

Desde que Anfinsen demostró *in vitro*, utilizando como modelo la ribonucleasa, que toda la información necesaria para el plegamiento de las proteínas está contenida en su estructura primaria, (Anfinsen, 1973), un gran caudal de estudios experimentales, teóricos y computacionales, han generado valiosa información acerca de la energética y cinética del problema del plegamiento de las proteínas. Sin embargo, aún no es posible, en forma analítica, predecir la conformación nativa de una proteína utilizando como punto de partida la secuencia aminoacídica (para revisión ver Creighton, 1992).

La falta de éxito en los intentos por obtener un modelo general *ab initio* para el proceso de plegamiento de las proteínas, se debe principalmente al gran número de grados de libertad que poseen las cadenas polipeptídicas y el cómo éstos aumentan en forma exponencial con el largo de la cadena. Desde un punto de vista técnico, la principal dificultad consiste, en obtener una función de energía que sea capaz de dar cuenta de todas las interacciones posibles entre todos los átomos de una cadena polipeptídica en un solvente dado y así poder determinar la conformación con la menor energía que sea compatible con una conformación nativa.

Por otra parte, en gran medida, debido al descubrimiento de Anfinsen, que indica que toda la información para el plegamiento de las proteínas se encuentra contenida en su estructura primaria, los estudios de renaturación se realizaron *in vitro* y se dejó de lado el estudio de éste problema *in vivo* (Gething, 1997).

Las condiciones en que se realizan los experimentos de plegamiento *in vitro*, involucran, ausencia de otras proteínas, altas diluciones, ambientes homogéneos altamente

reductores y que todas las partes de la secuencia tienen la misma posibilidad temporal de plegarse. Sin embargo, en los últimos 20 años surge la pregunta, de cómo se produce *in vivo* el plegamiento, si las condiciones son diferentes a las utilizadas en los experimentos *in vitro*: la proteína *in vivo*, es sintetizada en forma secuencial en el ribosoma, y ésta es liberada en ambientes donde el agua disponible es muy baja (alta concentración de proteína).

Los estudios de renaturación *in vivo* han demostrado, que existe un conjunto de otras proteínas, llamadas chaperonas, que son empleadas por la célula para evitar errores en el plegamiento. El mecanismo básico de acción de éstas es dar un ambiente similar a la alta dilución utilizada en los experimentos *in vitro*, por medio de su unión a las superficies potencialmente susceptibles de interactuar en forma incorrecta con otras proteínas o consigo misma, formando ambientes locales específicos para el plegamiento correcto de las proteínas (Agashe y Hartl, 2000; Ellis y Hartl, 1996; Ellis y Hartl, 1999; Hartl, 1996; Hartl y Martin, 1995).

Los microtúbulos

Los microtúbulos son el producto de la autoasociación de la tubulina y de proteínas asociadas (MAPs), formados por 13 o más protofilamentos, dispuestos paralelamente en forma de cilindro (Monasterio y col., 1995). El proceso de polimerización *in vitro* es dependiente de cationes divalentes como Mg^{2+} , del nucleótido GTP y cosolventes como glicerol (Lee y Timasheff, 1975; Weisenberg, 1972). La formación de microtúbulos se puede dissociar en dos procesos, uno de nucleación y otro de elongación. El proceso de nucleación aún no es bien entendido y se ha propuesto que involucraría primero la formación de estructuras en forma de anillo (42S) inducidas por GDP, las que al linearizarse por interacción con GTP formarían el protofilamento, el que sería

sucesivamente elongado por la adición de otras moléculas de anillos linearizados, en un proceso cooperativo (Howard y Timasheff, 1986; Melki y col., 1989).

Los microtúbulos, tanto *in vitro* como *in vivo*, tienen una dinámica fundamentalmente caracterizada por procesos de catástrofe (rápida despolimerización) y de polimerización lenta, procesos que se distribuyen estocásticamente en la población de microtúbulos, lo cual indica que no existe un estado estacionario microscópico. Este proceso ha sido llamado inestabilidad dinámica (para revisión ver (Erickson y O'Brien, 1992)); la causa de esta inestabilidad ha sido atribuida a la actividad GTPásica de la tubulina. Estas observaciones han conducido a un modelo en que los microtúbulos en estado de crecimiento poseen en su extremo moléculas de tubulina en la forma GTP, y los microtúbulos en proceso de catástrofe son el producto de la hidrólisis de GTP a GDP en las moléculas de tubulina de los extremos. La rápida despolimerización puede ser revertida sólo en el caso en que el extremo del microtúbulo recupere otra molécula de tubulina en la forma GTP. Este modelo para la inestabilidad dinámica de los microtúbulos es apoyado por experimentos en los que se han utilizado análogos de GTP que son hidrolizados lentamente por la tubulina, obteniéndose microtúbulos mucho más estables (Mejillano y col., 1990; O'Brien y Erickson, 1989). La función biológica de este proceso sería la constante redistribución del citoesqueleto, con el propósito de reciclar microtúbulos que no han alcanzado sus organelos o estructuras blanco. Esto puede ejemplificarse en el caso del aparato mitótico, donde los microtúbulos deben crecer desde el centrosoma hacia el cinetocoro del cromosoma; los microtúbulos que no alcanzan el cinetocoro son inestables, desensamblándose rápidamente. Posteriormente las subunidades son recicladas para un nuevo intento de formación del huso mitótico (Erickson y O'Brien, 1992).

La tubulina

La tubulina es una proteína que cumple un papel fundamental en la fisiología de las células eucarióticas, participa en procesos como la división, motilidad y en la determinación de la morfología celular (Roberts y Hyams, 1979; Vale, 1987). La forma funcional de esta proteína son los microtúbulos, homopolímeros cilíndricos de tubulina compuestos por 13 protofilamentos y que pueden alcanzar longitudes superiores a 0,4 μm (Amos, 1979; Andreu y col., 1992).

La tubulina es una proteína de peso molecular 100.000 que posee 2 subunidades, α y β . Medidas hidrodinámicas han mostrado que tiene un coeficiente de sedimentación de 5,8S y estudios por difracción de rayos-X a baja resolución muestran una forma alargada con ejes de 80 y 40 Å (Andreu y col., 1992). Estudios bioquímicos han demostrado que posee una amplia gama de sitios unión para diferentes tipos de ligandos y proteínas (Luduena y col., 1977); en efecto, posee sitios de unión para drogas antimitóticas como colchicina, nocodazol, vimblastina y taxol. Además posee 2 sitios de unión para GTP, uno no intercambiable, conocido como el sitio N, el que no ha sido caracterizado y un sitio intercambiable localizado en la subunidad β (sitio E) (Arai y col., 1975; Jayaram y Haley, 1994; Linse y Mandelkow, 1988; Maccioni y Seeds, 1977; Shivanna y col., 1993); además, un mol de Mg^{2+} se encuentra fuertemente unido por mol de tubulina (Monasterio, 1987). También se ha demostrado que el catión calcio es capaz de interactuar con el heterodímero en un sitio ubicado posiblemente en la región carboxilo terminal de la proteína, probablemente de la subunidad β ((Mejillano y col., 1990; Serrano y col., 1984) y resultados no publicados de nuestro laboratorio). Los ligandos de la tubulina pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a su efecto en la formación de microtúbulos, los que promueven la estabilización de los microtúbulos y los que la

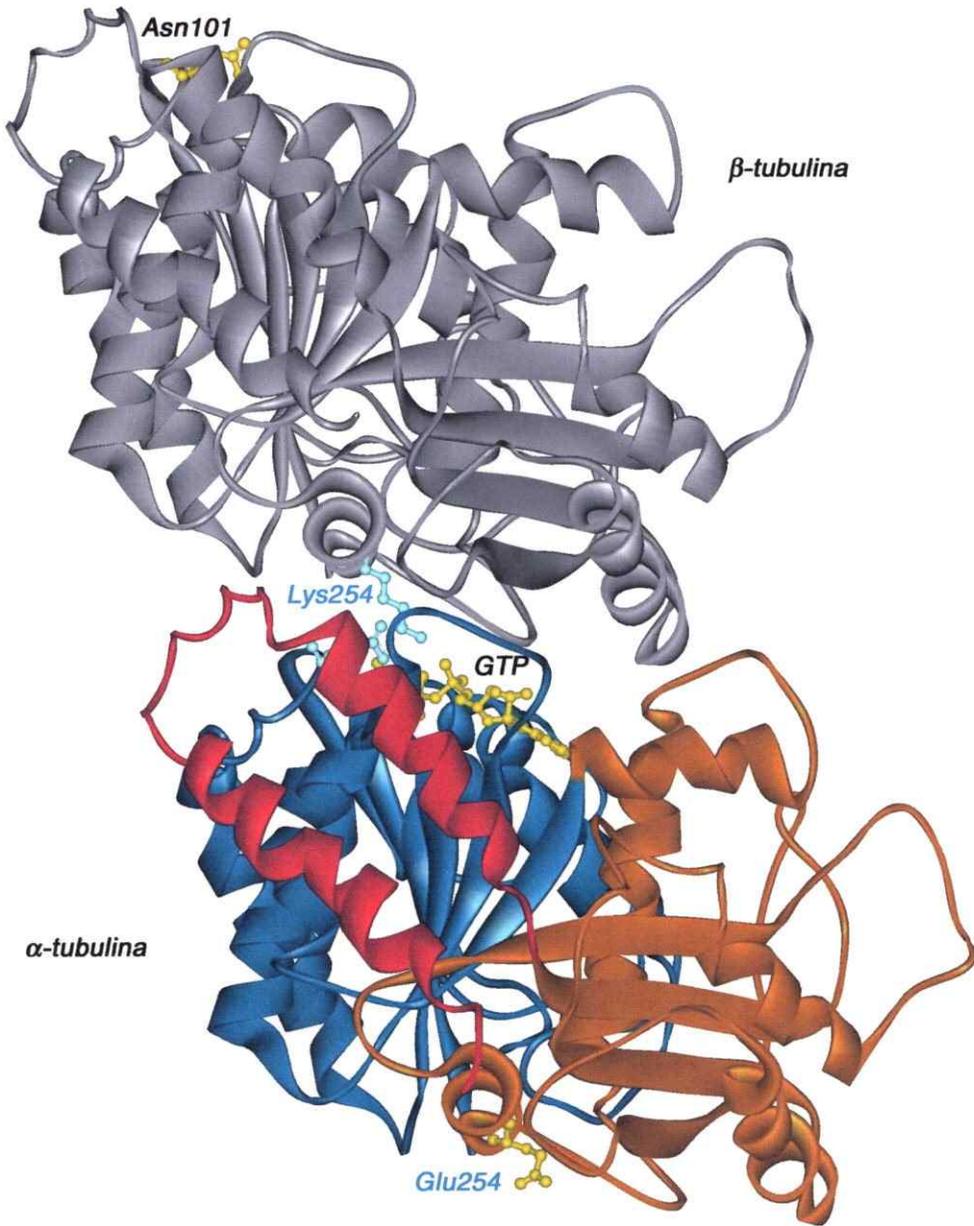
inhiben. En el primer grupo se encuentran el catión divalente Mg^{2+} , el nucleótido GTP y taxol. En el segundo las drogas antimitóticas (diferentes a Taxol) y calcio, que estimulan la actividad GTPásica en el sitio E, desfavoreciendo la formación de los microtúbulos. Las proteínas accesorias conocidas como MAPS, cumplen fundamentalmente una función estabilizadora de los microtúbulos (Lee, 1993).

Para entender las bases estructurales de la unión de los ligandos, así como la formación de homopolímeros de la tubulina fue necesario determinar la estructura terciaria del heterodímero.

En 1998 (Nogales y col., 1998), utilizando cristalografía electrónica a baja temperatura, lograron obtener una estructura de resolución Intermedia (3,7 Å de resolución), Fig 1. Se utilizaron arreglos bidimensionales *cuasi* cristalinos de protofilamentos, orientados en forma antiparalela, de tubulina de cerebro de bovino inducidos por Zinc.

El resultado de estos experimentos muestra que la estructura de las 2 subunidades son prácticamente idénticas, cada una compuesta por tres dominios, uno mayor, aminoácidos 1-205, que posee un motivo clásico del pliegue de Rossman, que en su base posee el sitio de unión para el nucleótido GTP, un dominio intermedio, residuos 206 al 381, que posee el sitio de unión para taxol, y un dominio carboxilo terminal, residuos 382 al 440, donde se postula que se encuentran los sitios de unión para las proteínas asociadas (MAPs) y posiblemente para calcio (Monasterio y col., 1993), y están constituidos por 2 hélices antiparalelas (Jimenez y col., 1999). Utilizando la estructura de las subunidades en las hojas de Zinc, se ha podido construir un modelo para los microtúbulos, donde a diferencia de las hojas de Zinc los protofilamentos están orientados en forma paralela (Nogales y col., 1999).

Figura 1. Esquema de la estructura tridimensional del heterodímero de tubulina. En azul se muestra el dominio amino terminal, en naranja el dominio de unión a taxol y en rojo el dominio carboxilo terminal. También, se muestran los residuos posiblemente involucrados en la regulación de la actividad GTPasica. Para la construcción del esquema se utilizó el programa WebLab Viewer (Molecular Simulation, Inc, San Diego, USA) y las coordenadas depositadas en el Protein Data Bank bajo el código de acceso 1tub.



Desde el punto de vista funcional, el modelo tridimensional permite postular las bases estructurales para la actividad GTPásica en el sitio-E y la razón de la presencia del sitio-N para el nucleótido.

El sitio-N, se encuentra en la interfase de las subunidades protegido del solvente y en la posición más cercana al fosfato γ del nucleótido se encuentra el residuo Lys254 de la subunidad β que no permitiría la hidrólisis del nucleótido. Sin embargo para el sitio-E, se propone que la hidrólisis del nucleótido se produciría por una interacción inter-dimérica, donde participaría el residuo Glu254 de la subunidad α del dímero entrante, que podría participar en forma directa en la hidrólisis del fosfato γ del nucleótido y la estabilización del protofilamento en la forma GDP (Carlier, 1991; Erickson, 1998; Erickson y O'Brien, 1992).

Estudios sobre el plegamiento de la tubulina

La tubulina en su estado dimérico, es una proteína inestable que pierde su funcionalidad dependiendo de la composición del solvente y la temperatura, en lapsos que van de los minutos a las horas (Prakash y Timasheff, 1982; Prakash y Timasheff, 1992a; Prakash y Timasheff, 1992b). Estas características hacen que la tubulina sea un modelo atractivo para el estudio del plegamiento y estabilidad de proteínas. Los estudios *in vitro* (Guha y Bhattacharyya, 1995; Guha y Bhattacharyya, 1997) han mostrado que al utilizar urea como agente desnaturalante es posible observar estados intermedios de desnaturalación que son reversibles, sin embargo, aún no ha sido posible obtener productos de renaturación funcionales a partir de la proteína completamente desnaturalada. Estos resultados pueden ser explicados por los estudios realizados *in vivo*, en que la tubulina, dentro de las proteínas eucarióticas, es una de las que posee uno de los mecanismos

más complejos, figura 2. La vía de plegamiento de la tubulina involucra la participación de la chaperonina dependiente de ATP CCT, que se une a los monómeros de tubulina después de la síntesis y los aísla del solvente, luego cada uno de los monómeros se une a un conjunto diferente de cofactores, en el caso de la α -tubulina se une a los cofactores A y E, la β -tubulina a D y A, luego que los monómeros son plegados en forma parcial se forma un complejo de 5 componentes, tubulina α,β , y los cofactores E, C y D, y en el seno de este complejo se produce la unión de los 2 monómeros y posterior liberación del heterodímero después de la hidrólisis de un mol de GTP (Bhamidipati y col., 2000; Cowan y Lewis, 1999; Tian y col., 1997).

Los antecedentes antes mencionados indican que la tubulina es una proteína altamente compleja tanto en el mecanismo de plegamiento de los monómeros, así como en el ensamblaje de su estructura cuaternaria (dímeros y microtúbulos). Los estudios estructurales, aunque valiosos, no permiten deducir la solución a problemas tales como la dinámica de las interacciones entre las subunidades y el porque la tubulina dimérica sufre cambios conformacionales que inducen la pérdida de la capacidad de auto ensamblarse en microtúbulos.

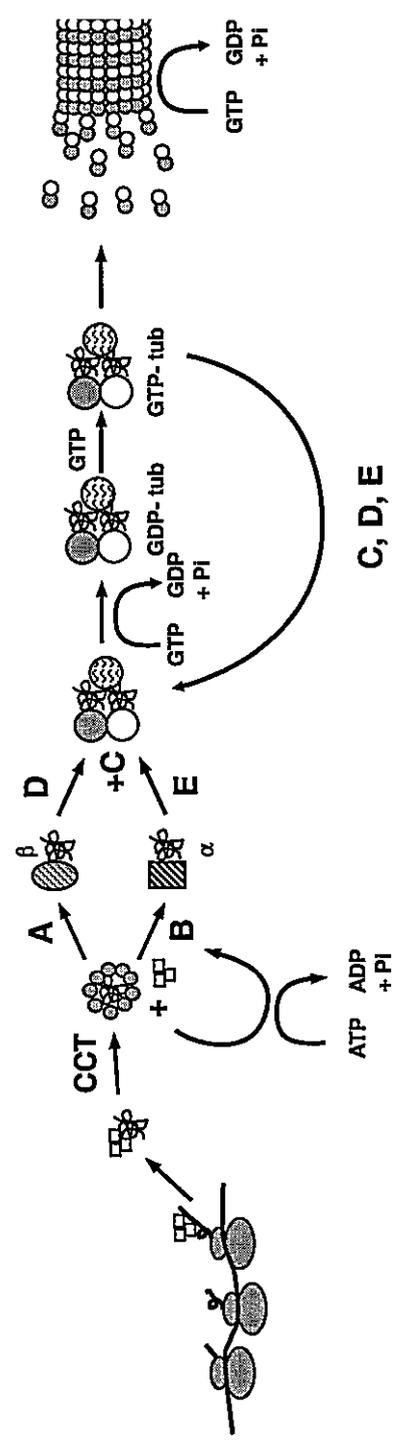


Figura 2. Modelo para la vía de plegamiento de la tubulina *in vivo*. La tubulina α o β naciente se une a la prefoldina (cuadrados) y es transferida a la chaperonina citosólica CCT. Después de uno o más ciclos de hidrólisis de ATP por CCT la tubulina se une a sus cofactores. Los cofactores A y B alimentan con monómeros de tubulina al supercomplejo de factores que contiene C, D, E, α y β tubulina. En el paso siguiente se produce la hidrólisis de GTP, que provoca la liberación de GDP-tubulina. Donde, los cofactores C, D y E, ciclan la tubulina GDP a forma GTP, la que es la única capaz de polimerizar en la forma de microtúbulos (Cowan y Lewis, 1999).

Objetivo General:

Caracterizar las vías de plegamiento de la tubulina y las interacciones entre sus monómeros *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- Desarrollar los ensayos de renaturación y desnaturación apropiados para la tubulina.
- Determinar el grado de reversibilidad de la desnaturación de la tubulina *in vitro*.
- Caracterizar las propiedades de las interacciones monómero-monómero en el heterodímero de la tubulina por medio de estudios de intercambio de subunidades.
- Caracterizar las propiedades del heterodímero y de los monómeros de la tubulina bajo condiciones de alta presión hidrostática.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos y proteínas

Todos los reactivos fueron comprados a Sigma. La tubulina de cerebro de pollo se purificó por el método de Weisenberg modificado por Timasheff (Weisenberg y col., 1968; Weisenberg y Timasheff, 1970). La tubulina de cerebro de bovino fue preparada por el Dr. Octavio Monasterio y el Dr. José Manuel Andreu en Madrid, España. Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) se compró a Molecular Probes Inc.

Purificación de la tubulina

La tubulina fue purificada a partir de cerebros de pollos recién sacrificados, utilizando el procedimiento previamente descrito por Weisenberg (Weisenberg y col., 1968; Weisenberg y Timasheff, 1970).

Los cerebros se limpiaron de meninges y vasos sanguíneos, luego el tejido se lavó con un volumen de amortiguador PMS (fosfato 10 mM, sacarosa 0,24 M $MgCl_2$ 0,5 mM, pH 7,0), al menos 2 veces. El tejido se homogeneizó en un volumen de PMS en una juguera comercial a máxima velocidad por 30 s. La suspensión se centrifugó en una centrifuga Sorvall RC 2B a 12.000 rpm en un rotor GSA por 30 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante, al que se agregó 17,7 g de sulfato de amonio por cada 100 mL; bajo agitación suave y continua. La mezcla se dejó precipitar por 10 min y se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas. Se colectó el sobrenadante y se agregó 7,1 g de sulfato de amonio por cada 100 mL de solución, se dejó precipitar por 10 min y se centrifugó en un rotor GSA a 12.000 rpm por 30 min. Se descartó el sobrenadante y el

precipitado se disolvió en el mínimo volumen posible de amortiguador PMG (fosfato 10 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, GTP 0,1 mM, pH 7,0); se utilizó un homogenizador Potter de 20 mL. La suspensión se agregó a 50 mL de volumen húmedo de DEAE-Sephadex previamente equilibrada en PMG. La mezcla se dejó reposar por 5 min y se lavó 2 veces, en un embudo Büchner, con amortiguador PMG que contenía adicionalmente KCl 0,4 M. Las proteínas fueron eluidas de la resina utilizando amortiguador PMG que contenía KCl 0,8 M. Al eluido se agregó 24,8 g de sulfato de amonio por cada 100 mL, se dejó reposar por 10 min y se centrifugó en un rotor SS-34 a 12.000 rpm por 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en un mínimo volumen de PMG e inmediatamente fue aplicado a una columna de Sephadex G-25M (3 x 50 cm), equilibrada en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 2 mL. Para identificar las fracciones que contenían la tubulina, se agregó a cada fracción 2 a 3 gotas de una solución de $MgCl_2$ 0,5 M. Las fracciones que presentaron turbidez se aislaron y fueron centrifugadas en un rotor SS-34 a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. El precipitado de tubulina se disolvió en el mínimo volumen de amortiguador de almacenamiento (PMG que contenía 1 M sacarosa) y se dializó contra el mismo amortiguador por toda la noche a 4°C. En la mañana del día siguiente, la muestra dializada fue alicuotada en volúmenes de 100 a 200 μ L y las alícuotas se almacenaron a -80°C, hasta su posterior uso experimental. El rendimiento promedio de cada purificación, utilizando como material de partida 500 mL de tejido, fue entre 190 a 250 mg de tubulina pura.

Purificación de dímeros de la tubulina

Parte de la tubulina cuando es purificada de acuerdo al método anteriormente descrito se encuentra agregada en especies de bajo tamaño molecular. Los dímeros de tubulina se separaron de los agregados por medio de una cromatografía de exclusión molecular

en una columna de Sephacryl S-300 (0,5 x 25 cm) a un flujo de 0,5 mL/min a 4°C. La proteína se detectó por absorbancia a 278 nm. Para todos los experimentos se utilizaron solo las fracciones en el máximo del pico correspondiente a los dímeros de la tubulina. La determinación de las concentraciones de cada especie en los cromatogramas fue realizada por deconvolución del cromatograma usando el programa SpectraCalc. Los picos componentes de cada experimento fueron ajustados a una mezcla de curvas gaussianas y lorencianas, a las que se les determinó el área y se comparó con los cromatogramas de concentraciones conocidas de tubulina.

Modificación química de la tubulina con FITC

La tubulina se modificó covalentemente con isotiocianato de fluoresceína. El medio de modificación contenía Hepes 25 mM, pH 7,5, tubulina 10 μ M y la reacción se inició por adición de una solución concentrada del reactivo modificador de modo de obtener una concentración final de 40 μ M. La reacción de modificación se incubó por 30 min a 4°C y se detuvo por cromatografía rápida en columnas de 1 mL de Sephadex G-25; éste paso se repitió 2 veces. Para controlar que todo el reactivo no unido covalentemente a la proteína fuera removido se realizó cromatografía en capa fina en placas de sílica, usando etanol 80% como solvente. Este experimento demostró que más del 95% de la sonda no unida era eliminado por el procedimiento antes descrito.

Determinación de la estequiometría de modificación de la tubulina marcada con FITC

La concentración de proteína del derivado tubulina-FITC se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para determinar la concentración de FITC unido, se midió la

absorbancia a 499 nm y se utilizó un coeficiente de extinción molar de $70.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (McKay y Jameson, 1991).

Ensayos de desnaturación y renaturación

La reacción de desnaturación se inició diluyendo rápidamente (60 veces) la tubulina nativa en amortiguador de plegamiento (Hepes 50 mM, pH 7,5, DTT 5 mM) con diferentes concentraciones de GdmCl (Fig. 3). En el caso de la reacción de renaturación se procedió del mismo modo anterior, sólo que la muestra de tubulina fue previamente incubada en amortiguador de plegamiento con GdmCl 5M por 5 h en hielo. Después de diluir las muestras se incubaron por 60 min en hielo, antes de tomar las medidas de fluorescencia y dicroísmo circular.

En el caso de la unión del colorante 1,8 ANS, las muestras replegadas del modo antes descrito, fueron incubadas con 1,8 ANS $50 \mu\text{M}$, por una hora adicional antes de la determinación fluorométrica.

Ensayo de renaturación por filtración rápida

Los experimentos de renaturación por filtración rápida se realizaron utilizando un sistema de cromatografía de alta presión Beckman System Gold modelo 127 y una columna de filtración molecular con matriz de sílice, TSK3000sw, que posee un intervalo de fraccionamiento entre 5K y 600K de peso molecular para partículas globulares. El ensayo de renaturación se realizó inyectando $20 \mu\text{L}$ de solución de proteína desnaturada en amortiguador de plegamiento, ya indicado, más NaCl 0,2 M y GdmCl 5 M a la columna equilibrada en amortiguador de plegamiento sin desnaturalante. El flujo utilizado para todos los experimentos fue 1 mL/min, a no ser que se especifique de otro modo. La

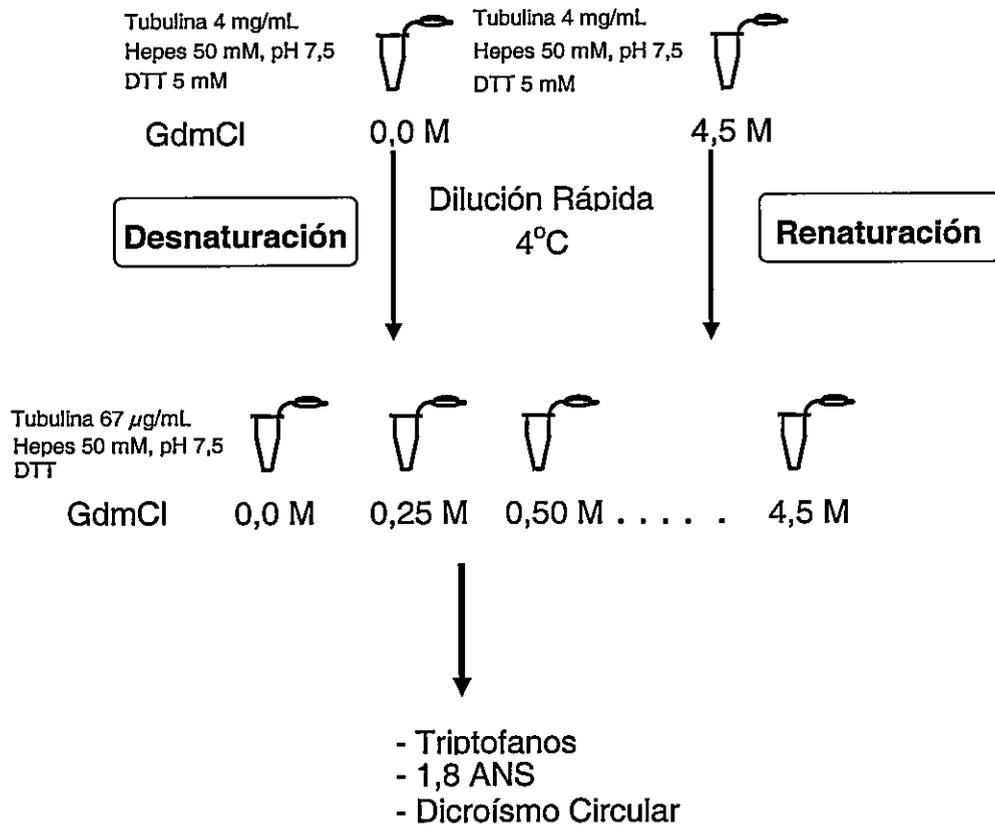


Figura 3. Procedimiento experimental para realizar los estudios de desnaturación y renaturación

temperatura se controló utilizando un baño termorregulado Haake modelo G que recirculaba agua a una camisa de vidrio que contenía la columna. El volumen muerto entre la muestra y la columna fue de 35 μL , por lo que la máxima dilución posible de la muestra desnaturada fue de 1,5. La salida de la cromatografía fue registrada con un detector UV dispersivo marca Beckman, modelo 118 (Fig. 4).

Medidas de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron tomados en un espectropolarímetro Jasco 720 (Japón). Los cambios en estructura secundaria fueron registrados en el intervalo de 210 a 250 nm de longitud de onda, se utilizaron cubetas de sílice fundido de 0,1 cm de paso óptico. El ancho de banda utilizado para todas las determinaciones fue 2 nm con una constante de tiempo de 2 s. Cada espectro tomado representa el promedio de 3 barridos realizados por el instrumento. Durante las mediciones la temperatura se mantuvo constante a 23°C. Las contribuciones originadas por el solvente fueron sustraídas en cada una de las mediciones.

Medidas de fluorescencia

Estudios de desnaturación y renaturación

Para las mediciones de fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-50 conectado a un computador personal IBM compatible. Los datos se adquirieron usando el programa suministrado por la compañía fabricante del instrumento. El análisis de los espectros se realizó utilizando el programa SpectraCalc (Galactica Corporation, USA). Los espectros de emisión de triptofanos se colectaron

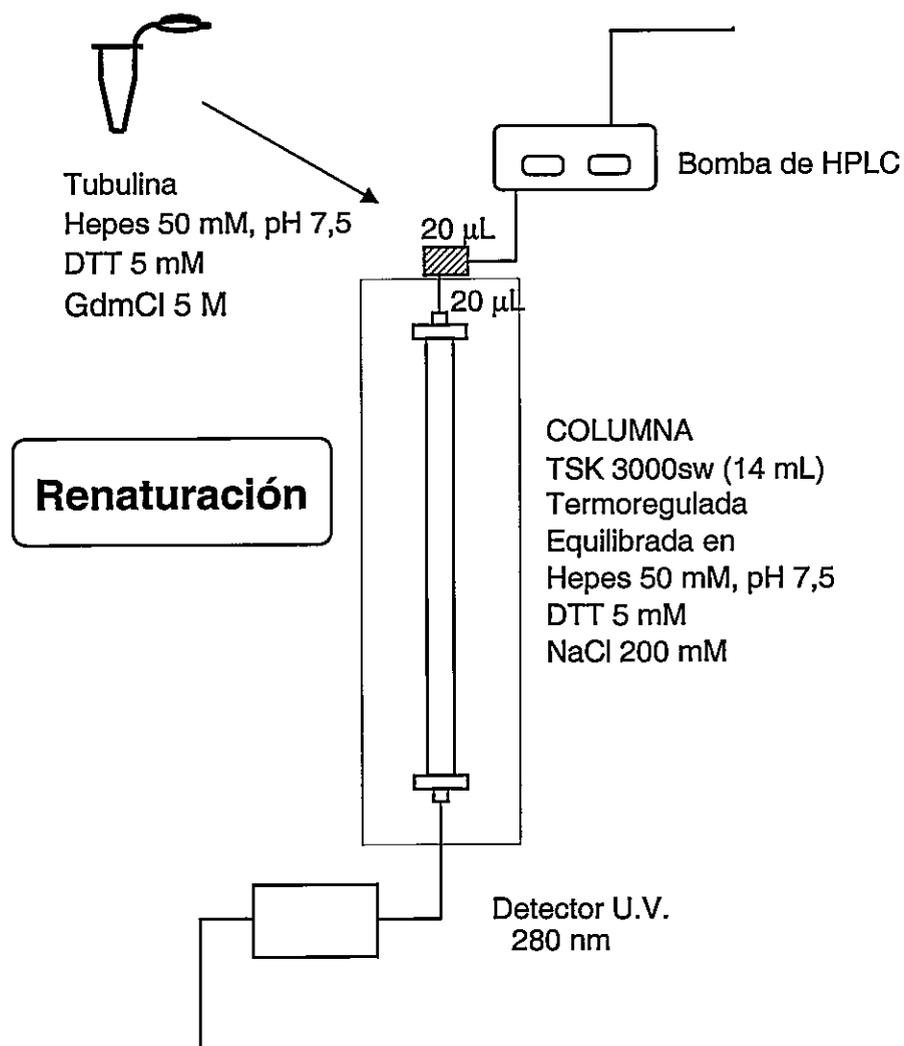


Figura 4. Diseño experimental para los experimentos de replegamiento por filtración rápida

excitando a 295 nm y registrando la fluorescencia emitida entre 300 y 500 nm. En los experimentos de unión de ANS, se excitó a 372 nm y se registró la fluorescencia emitida a 478 nm. Las ranuras utilizadas en todas las determinaciones fueron de 5 nm, tanto para el monocromador de excitación como de emisión. La emisión residual del solvente fue sustraída para cada espectro.

Estudios de intercambio de monómeros

La tubulina fue marcada con FITC de acuerdo al procedimiento descrito previamente. La reacción de intercambio se comenzó al agregar tubulina no marcada a tubulina marcada con FITC y se midió por el aumento de la polarización producido por la pérdida de la transferencia de energía homogénea por la cercanía de los fluoróforos en la proteína marcada (Erijman y Weber, 1993).

Estudios de polarización, presión y tiempos de vida

Las medidas de fluorescencia intrínseca se realizaron en un espectrofluorímetro ISS-PC1 (ISS Inc, Champaign, IL). Las determinaciones de polarización de fluorescencia para FITC como para tubulina-FITC se realizaron en un espectrofluorímetro SLM-Aminco modificado en el Laboratorio para Fluorescencia Dinámica de la Universidad de Illinois Urbana-Champaign. Se utilizó como fuente de excitación un láser de argón ionizado sintonizado en una línea de emisión a 488 nm. Para coleccionar la emisión de fluorescencia se utilizaron los filtros ópticos apropiados (057 y 058 Hoya, Japon). En todas las determinaciones se utilizaron cubetas de cuarzo con 4 caras transparentes con un paso óptico para excitación de 5 mm y para emisión de 10 mm. Para los experimentos en que se realizaron determinaciones a presiones mayores

que la atmosférica se utilizó una celda de alta presión y las correcciones para la polarización descritas por Paladini y Weber (Paladini y Weber, 1981b).

Las medidas de los tiempos de vida para el derivado de tubulina-FITC se realizaron en un espectrofluorímetro de correlación cruzada SLM modificado, en el Laboratorio de Fluorescencia Dinámica de la Universidad de Illinois Urbana-Champaign (Spencer y Weber, 1969). Se utilizó como fuente de excitación un láser de argón ionizado utilizando la línea a 488 nm y la emisión se colectó utilizando un filtro de paso alto Hoya 4-52. Los valores de los tiempos de vida fueron calculados utilizando el programa computacional Global Analysis (Global Unlimited Inc., Urbana, Illinois, USA).

Análisis de los datos de polarización estática del derivado tubulina-FITC

Los valores de polarización estática encontrados para el derivado tubulina-FITC fueron analizados utilizando la ecuación de Perrin, como se indica a continuación.

Para el cálculo de los tiempos de correlación rotacional (ϕ), los valores de polarización (P) fueron transformados a valores de anisotropía (r) utilizando la relación (1) (ver próxima página). Se utilizó un valor de polarización límite para el fluoróforo FITC de 0,47 (valor aceptado para el rango de excitación). El cálculo del tiempo de correlación rotacional (ϕ , en nseg) se realizó utilizando la ecuación de Perrin (2) en la forma despejada para ϕ . Los valores de los tiempos de correlación teóricos para el dímero de tubulina, así como para el monómero, fueron determinados utilizando la ecuación (3) en que se utilizó un peso molecular de 100.000 y 50.000 para el dímero y el monómero, respectivamente, para la hidratación (h) se utilizó un valor de 0,22 cm³ de agua por gramo de proteína y para el volumen específico parcial (∇) un valor promedio de 0,75

cm³/g de proteína. Una viscosidad (η) de 0,89 cP y una temperatura (T) de 23°C. El R utilizado fue $8,314 \times 10^7$ dinas cm mol⁻¹ K⁻¹

$$r = \frac{2P}{3-P} \quad (1)$$

$$\phi = \frac{\tau}{\left(\frac{r_0}{r}\right)^{-1}} \quad (2)$$

$$\phi = \frac{\eta V}{RT} \approx \frac{\eta M}{RT} (v+h) \quad (3)$$

RESULTADOS

Caracterización de la reacción de renaturación de la tubulina de cerebro de pollo

Estudios de espectroscopia de fluorescencia

La tubulina de cerebro de pollo posee 4 residuos triptofano en cada monómero (Figura 5), que están ubicados, en el caso de la α -tubulina, en las posiciones 21, 346, 388 y 407, y en la β -tubulina, en las posiciones 21, 101, 344 y 397. Esta sonda fluorescente intrínseca es muy sensible a los cambios en la estructura terciaria e indica cambios en la polaridad del entorno en el interior de la proteína.

Se estudió el efecto del agente caotrópico GdmCl sobre la emisión de fluorescencia de los triptofanos de la tubulina en el proceso de desnaturación y renaturación. En la figura 6 se muestran los espectros de emisión de la tubulina a diferentes concentraciones del agente caotrópico, tanto para la desnaturación (Fig. 6 A) como para el proceso de renaturación (Fig. 6 B). En ambos casos se observa que a altas concentraciones de GdmCl el máximo de emisión se corre hacia la parte roja del espectro, con una disminución de la intensidad de emisión. Al analizar los cambios producidos (figura 7), se observó que las curvas se superponen para el corrimiento del máximo y para el cambio de la intensidad de emisión, indicando que los procesos de desnaturación como de renaturación siguen una secuencia similar de eventos. En el caso de la curva de cambio de corrimiento del máximo (Fig. 7 A) se puede observar una transición sigmoidea, con un $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ de 1,5 M GdmCl, y para la intensidad se observa una caída de la emisión, donde el $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ es de 1,4 M.

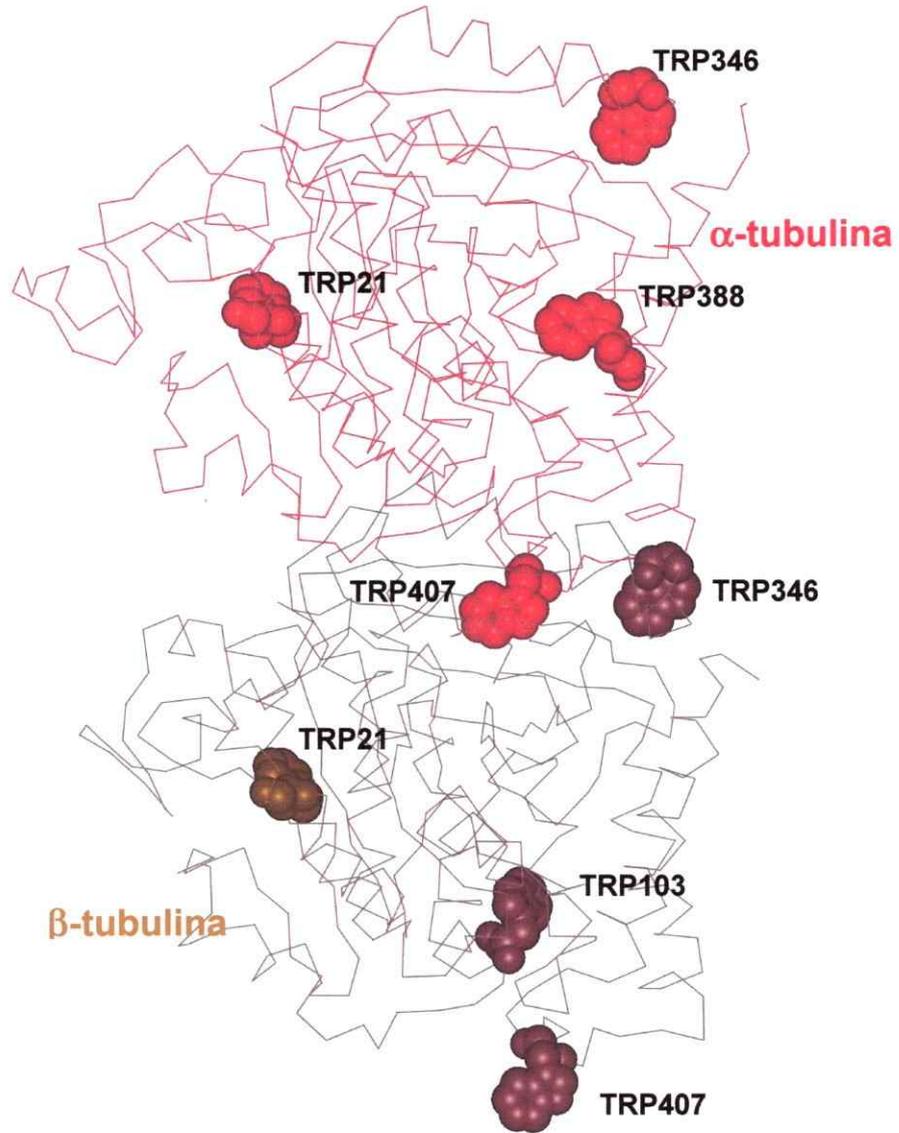


Figura 5. Disposición de los residuos triptofanos en la estructura de la tubulina de cerebro de bovino. Los residuos equivalentes en la tubulina de cerebro de pollo son: α -tubulina; 21, 346, 388 y 407, y en la β -tubulina; 21, 101, 344 y 397.

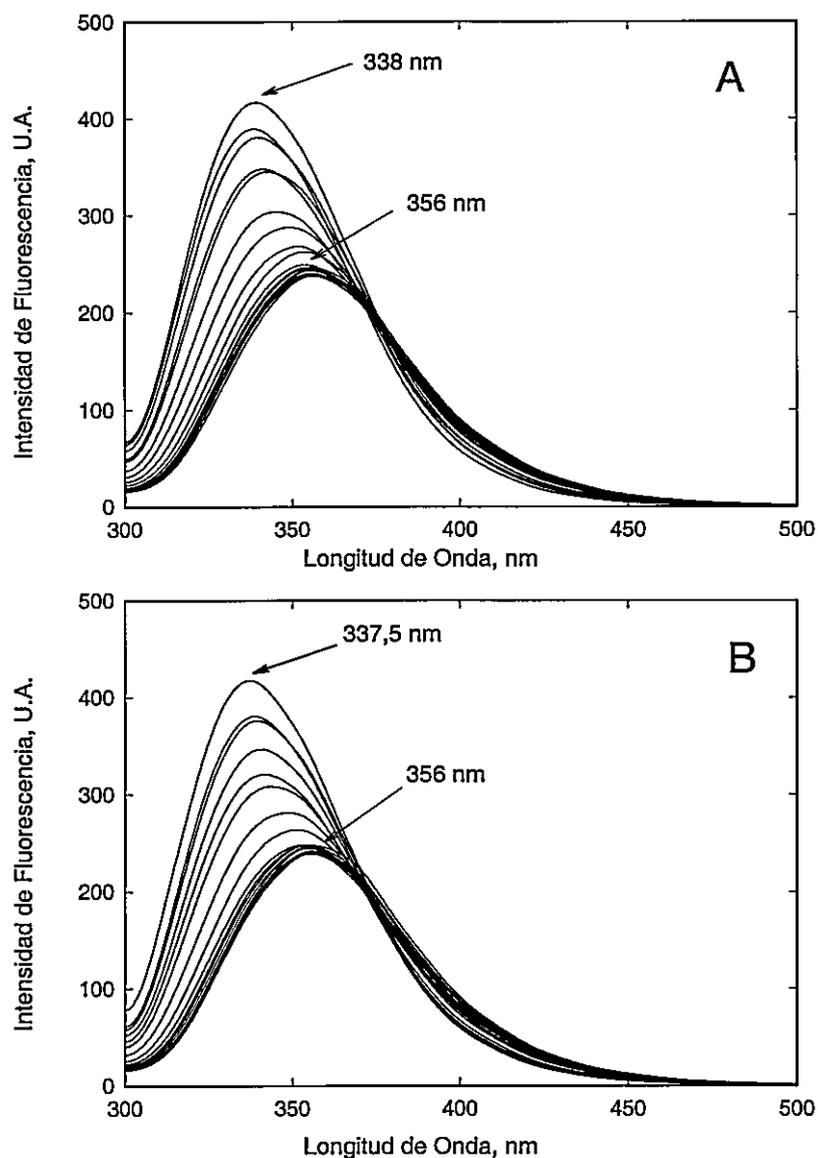


Figura 6. Efecto de la concentración de GdmCl sobre los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la tubulina. A) La tubulina nativa fue desnaturalada en soluciones de amortiguador Hepes 50 mM, pH 7,5, DTT 5 mM que contenían concentraciones crecientes de agente caotrópico (0 a 4,5 M), se incubó por 1 h a temperatura ambiente y se registraron los espectros de emisión de triptofanos. B) La tubulina desnaturalada en 4,5 M GdmCl, fue renaturada en las mismas condiciones descritas antes. La concentración final de tubulina fue 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los casos.

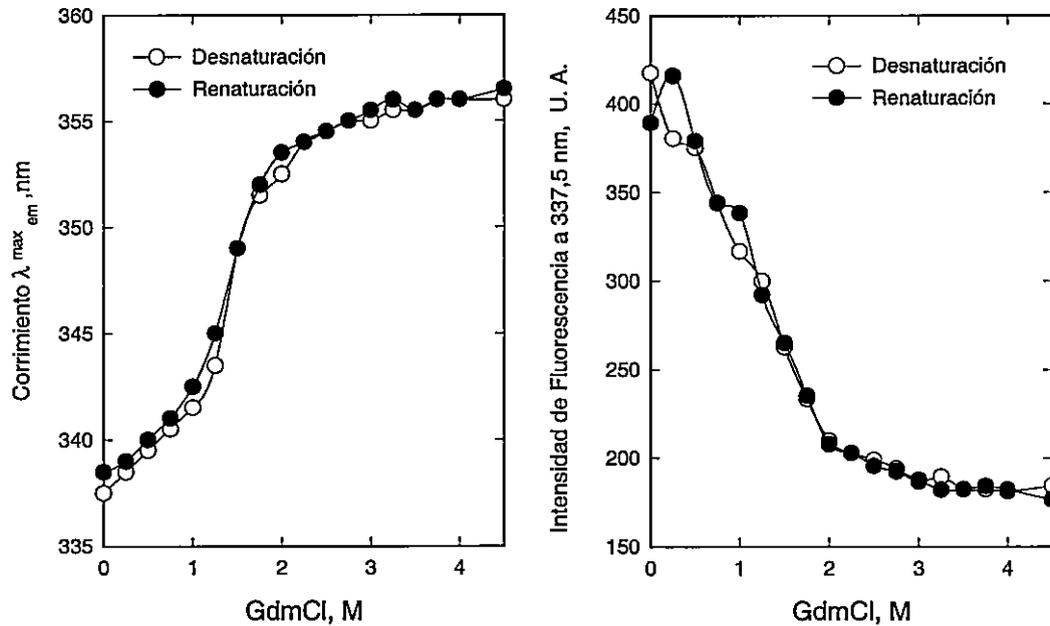


Figura 7. Efecto de GdmCl sobre la emisión de fluorescencia de los triptofanos de la tubulina. Los espectros mostrados en la figura 1 fueron analizados para determinar los cambios en las principales propiedades espectroscópicas, en el sentido de desnaturación y renaturación en función de la concentración de GdmCl, como se indica en la figura. A) Corrimiento en el máximo de emisión, B) Cambio de la intensidad en el máximo de emisión. Los espectros fueron tomados a temperatura ambiente a una concentración de tubulina de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador Hepes 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5, a las concentraciones de GdmCl mostradas.

Para estudiar el grado de pérdida de la rigidez de los residuos triptofanos en la estructura que puede ser el reflejo del cambio en el movimiento, tiempo de vida o ambos, se determinó el cambio de la polarización de la emisión de los triptofanos al desnaturar como renaturar la tubulina. En la figura 8 se muestra que la polarización disminuye al aumentar la concentración de GdmCl. Sin embargo, la curva de desnaturación posee un $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ de 1,7 M contra 1,6 M para la curva de renaturación; esto indica que existe algún grado de histéresis, donde los cambios de polarización asociados con el proceso de renaturación difieren levemente de los producidos en la desnaturación.

Para estudiar en forma independiente la integridad de la estructura terciaria de la tubulina, se determinaron las propiedades fluorescentes de la sonda ANS unida a la tubulina nativa en el proceso de desnaturación y renaturación. Esta sonda se une a la tubulina nativa, en una región con un ambiente hidrofóbico que aumenta significativamente su rendimiento cuántico. En el caso de la reacción de desnaturación, se determinó que el sitio de unión se pierde en una transición cooperativa con un $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ de 1,3 M y que es capaz de recuperarse en aproximadamente un 80% en la reacción de renaturación (Fig. 9).

Estudios de espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Para determinar el efecto de GdmCl sobre la estructura secundaria de la tubulina en el ensayo de desnaturación y renaturación, se tomaron los espectros de dicroísmo circular en la región UV lejana a diferentes concentraciones de GdmCl (Fig. 10). Esta región del espectro es la mas sensible a los cambios en la actividad óptica del enlace peptídico y

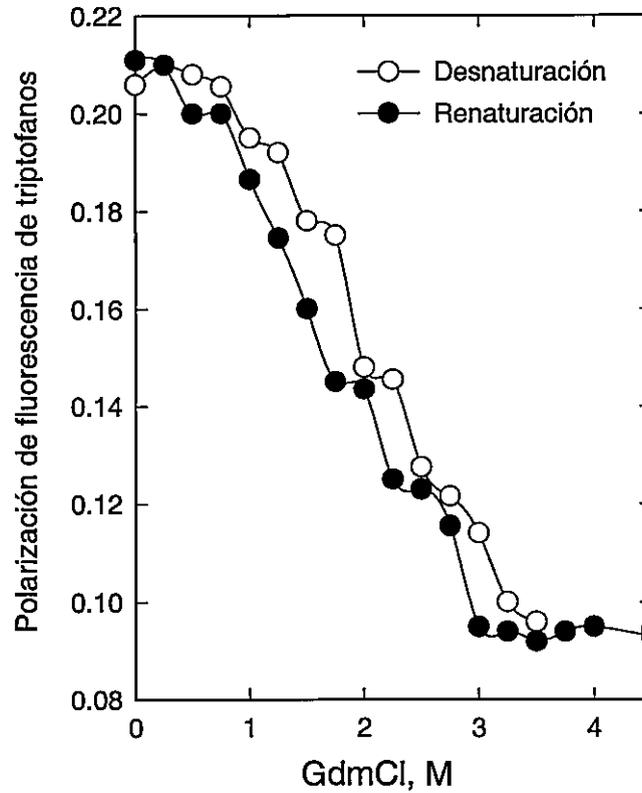


Figura 8. Efecto de GdmCl sobre la polarización de la emisión de los triptofanos de la tubulina de cerebro de pollo. Después de realizar la reacción de desnaturalación o de renaturación a las distintas concentraciones de GdmCl indicadas en la figura se midió la polarización de la fluorescencia de los triptofanos de la tubulina. La concentración de tubulina fue 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador Hepes 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5 a las concentraciones de GdmCl mostradas. Las medidas fueron hechas a temperatura ambiente, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

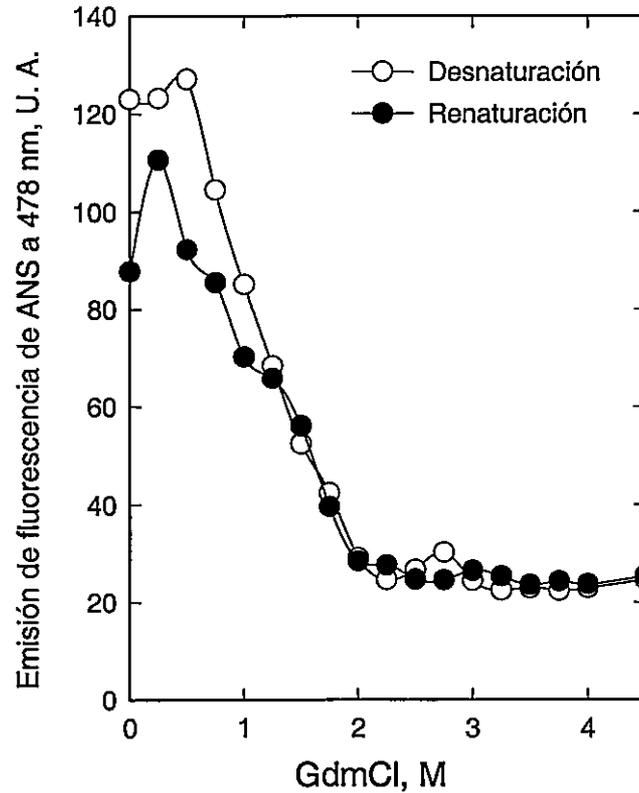


Figura 9. Efecto de GdmCl sobre la estabilidad del complejo tubulina - ácido 1,8 anilino naftaleno sulfonato (ANS). A soluciones de tubulina previamente desnaturalada o renaturada a las concentraciones de GdmCl indicadas se agregó ANS a una concentración final de 50 μ M, se incubó por 1 h a temperatura ambiente y se midió la emisión de la sonda. El solvente utilizado fue Hepes 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5 y GdmCl, a las concentraciones indicadas.

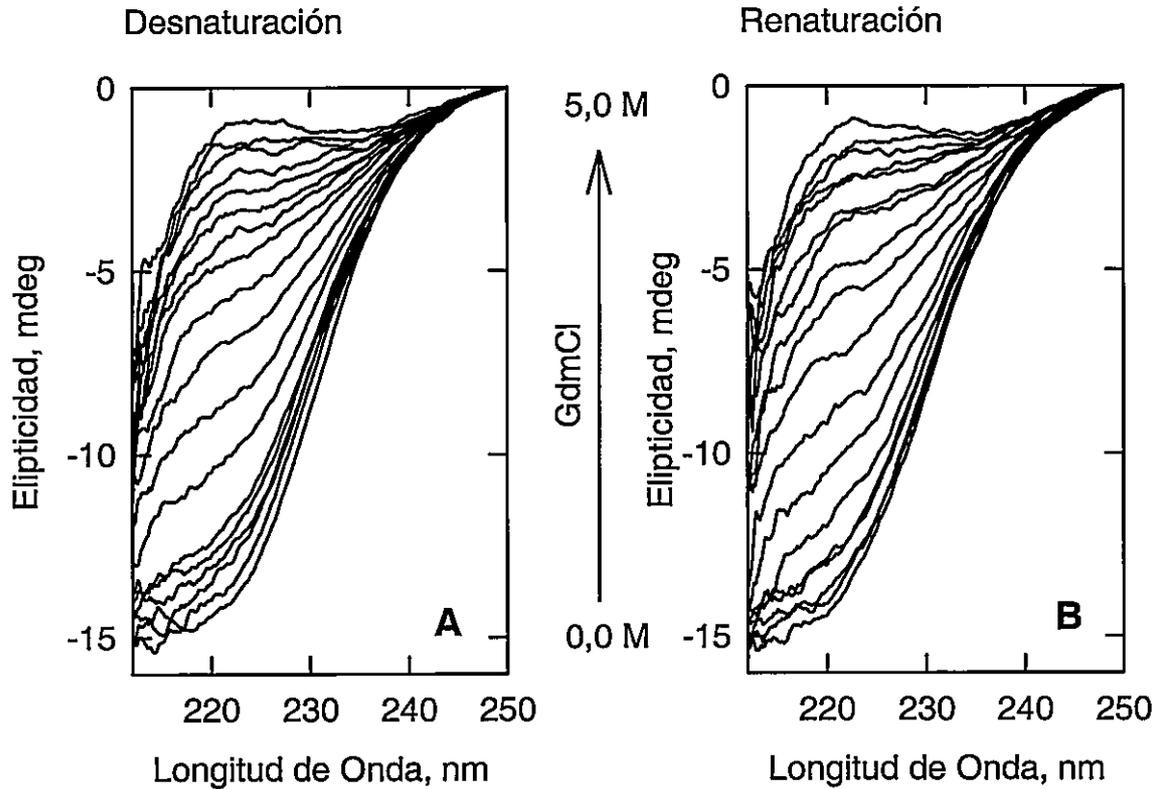


Figura 10. Espectros de dicroísmo circular en la región UV lejano de tubulina a diferentes concentraciones de GdmCl. Tubulina a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue desnaturalada (A) o renaturada (B) a diferentes concentraciones de GdmCl en HEPES 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5. Los espectros fueron tomados en atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 23°C.

por lo tanto a cambios conformacionales. La figura 10 A muestra el efecto del aumento de la concentración del agente desnaturalante sobre la estructura de la tubulina nativa, donde la señal mas negativa indica la proteína en estado nativo. La figura 10 B muestra la recuperación de la elipticidad al renaturar la tubulina completamente desplegada a las diferentes concentraciones de GdmCl. Los espectros de CD a la máxima concentración de GdmCl en ambos casos (5 M), son los que corresponden a la tubulina en una conformación de ovillo estadístico (Lee y col., 1978). En la figura 11 se muestra la integral de la señal de CD entre 210 y 250 nm en función de la concentración de GdmCl, donde el valor más negativo corresponde a un mayor grado de estructura secundaria. Las curvas para la desnaturalación y renaturación se superponen, dentro del error experimental, donde el $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ para la desnaturalación (o renaturación) es 1,9 M.

Comparación de los cambios en estructura terciaria y secundaria en la reacción de desnaturalación y renaturación de la tubulina

Para comparar las propiedades medidas por espectroscopía de fluorescencia de triptofanos, que representan cambios en estructura terciaria, y los cambios producidos en la estructura secundaria medidos por dicroísmo circular, se determinó la fracción de cambio (ver Materiales y Métodos) de las propiedades medidas en función de la concentración de GdmCl (Fig. 12). Se encontró que la estabilidad de la estructura secundaria es mayor que la de la terciaria y que está dada por una diferencia de estabilidad de aproximadamente 0,5 M GdmCl. Ésto indica que existen concentraciones de GdmCl en que existen intermediarios de plegamiento o múltiples formas que poseen un bajo grado de estructura terciaria mientras mantienen un alto grado de estructura secundaria. Por ejemplo, cuando la tubulina ha perdido un 50% de su estructura terciaria

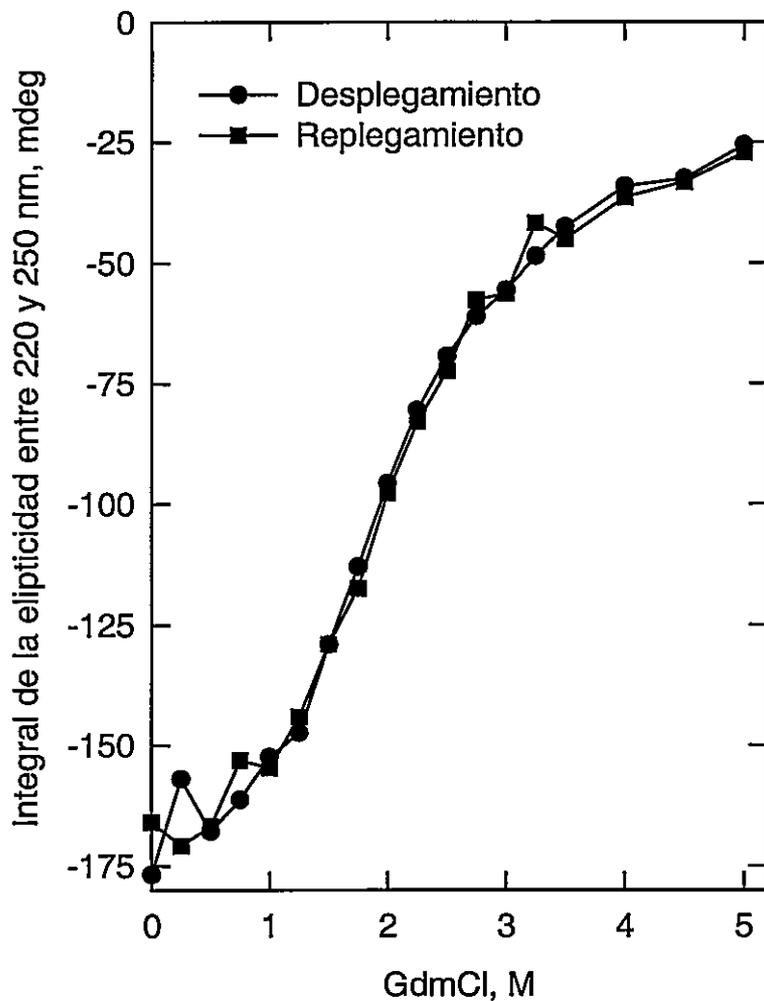


Figura 11. Desnaturalización y renaturalización de tubulina seguida por dicroísmo circular en función de la concentración de GdmCl. Tubulina a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue renaturada o desnaturalizada a diferentes concentraciones de GdmCl en HEPES 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5. Las medidas fueron tomadas en atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 23°C.

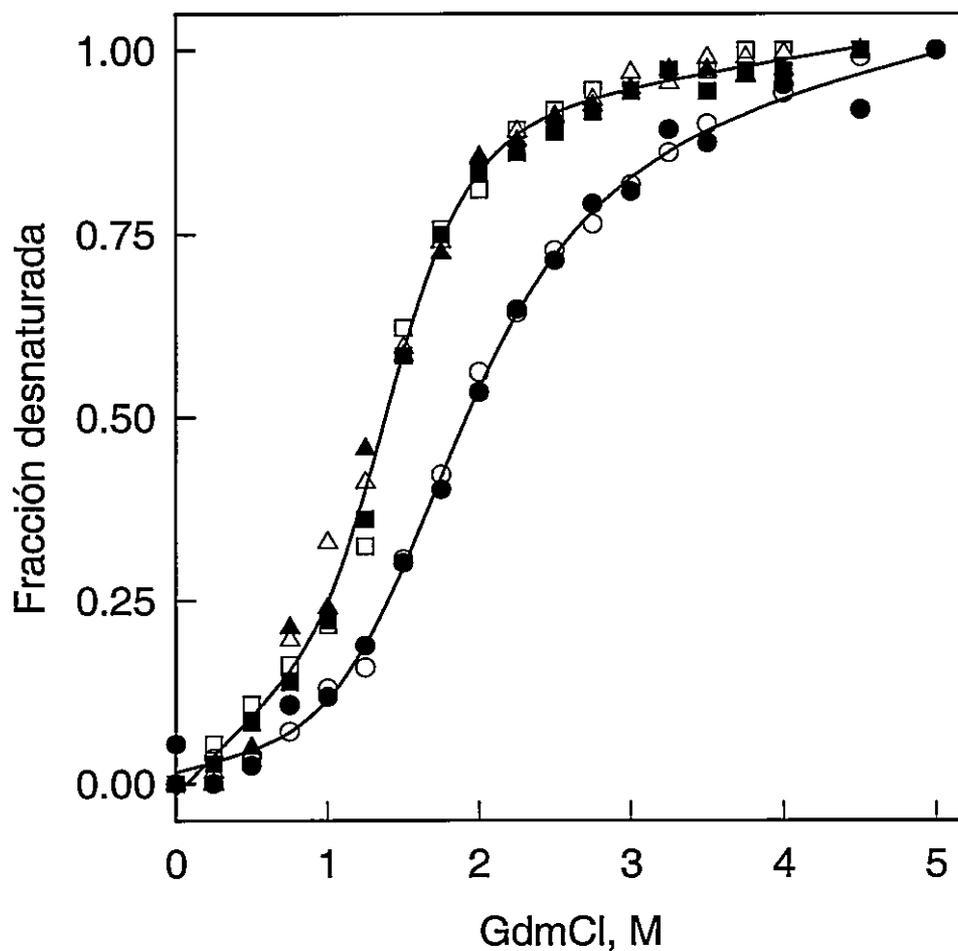


Figura 12. Efecto diferencial de la concentración GdmCl sobre la estructura de la tubulina observada por dicroísmo circular y fluorescencia de triptofanos. Los experimentos fueron realizados en las mismas condiciones descritas anteriormente (figuras 1 y 5). La desnaturación y la renaturación fue seguida por el cambio en intensidad del máximo de emisión a 338 nm (\square, \blacksquare); corrimiento de el máximo de emisión de triptofanos (Δ, \blacktriangle) y cambio en la integral de la elipticidad entre 220 y 250 nm de los espectros de dicroísmo circular (\bullet, \circ).

aún posee un 80% de su estructura secundaria. Estos resultados sugieren la formación de intermediarios en equilibrio con las características de un "glóbulo fundido".

Cabe destacar que los cambios en las propiedades espectroscópicas observados corresponden principalmente a efectos producidos sobre las subunidades disociadas, pues, en estudios de desnaturación en columnas de filtración molecular (Suphrose 12/HR, Pharmacia, Suiza), en condiciones de equilibrio, se encontró que la disociación del heterodímero se producía a concentraciones de GdmCl menores a 0,5 M (resultados no mostrados).

Estudios de renaturación por filtración molecular rápida

Los intentos de replegamiento de proteínas *in vitro*, generalmente se realizan diluyendo rápidamente la proteína desnaturada en un medio de replegamiento adecuado, de modo de disminuir la concentración de agente caotrópico (GdmCl o urea) a niveles en que no tiene propiedades desnaturantes (< 0,1 M en la mayoría de los casos). Además, se utilizan concentraciones de proteína muy bajas de modo de favorecer sólo las interacciones específicas, evitando favorecer las vías cinéticas de agregación. La cromatografía de filtración molecular ofrece ventajas similares para la obtención de proteínas replegadas. Con un sistema de cromatografía de alta presión y una columna de alta resolución, es posible separar en forma rápida y eficiente el agente desnaturante de la proteína desnaturada y a su vez ofrecer un ambiente de mayor dilución (matriz de la columna) para la reacción de renaturación. Este método de renaturación ofrece ventajas en el caso de proteínas oligoméricas, donde la formación de la estructura terciaria es rápida y la asociación entre subunidades es más lenta.

La tubulina es una proteína que tiene la propiedad intrínseca de autoasociarse y formar polímeros de alto peso molecular. Al analizar la reacción de replegamiento de esta proteína por filtración rápida, se obtiene un cromatograma complejo (Fig. 13 A) en que se observan varias especies discretas de agregación y formas de alto peso molecular que son excluidas de la matriz (V_0). Al comparar el volumen de elución de las formas originadas en la reacción, con proteínas de masa molecular conocida (Fig. 13 B), se determinó que las especies asociadas eran múltiplos de la masa molecular del dímero de tubulina, lo que muestra que la tubulina al replegarse es capaz de asociarse en forma muy rápida como dímero, a partir del cual, se generan en forma discreta una serie de oligómeros. El análisis de la composición de los oligómeros, así como de la especie dimérica, por electroforesis en condiciones desnaturantes, muestra que existen iguales proporciones tanto de α como de β tubulina en los picos analizados, y no se detecta la presencia de otros contaminantes (resultados no mostrados). La secuencia de la formación de las especies de tamaño molecular mayor al dímero, por vías paralelas a la de formación del dímero, se investigó por recromatografía de la especie que posee la masa del dímero. Estos experimentos mostraron que el dímero replegado es capaz de formar las especies de alto peso molecular lo que sugiere un mecanismo secuencial (Fig. 14). Cabe destacar que el proceso de polimerización del dímero es dependiente de la temperatura, pues el cromatograma de la muestra incubada a 25°C y filtrada presenta sólo la especie que es excluida de la matriz, no así la muestra incubada a baja temperatura (10°C), que después de 1 o 2 horas muestra cantidades significativas de la especie dimérica (Fig. 14 B).

Para demostrar que el precursor de las especies de alto tamaño molecular era el dímero, se realizaron estudios a concentraciones variables de proteína (Fig. 15) y se analizó el

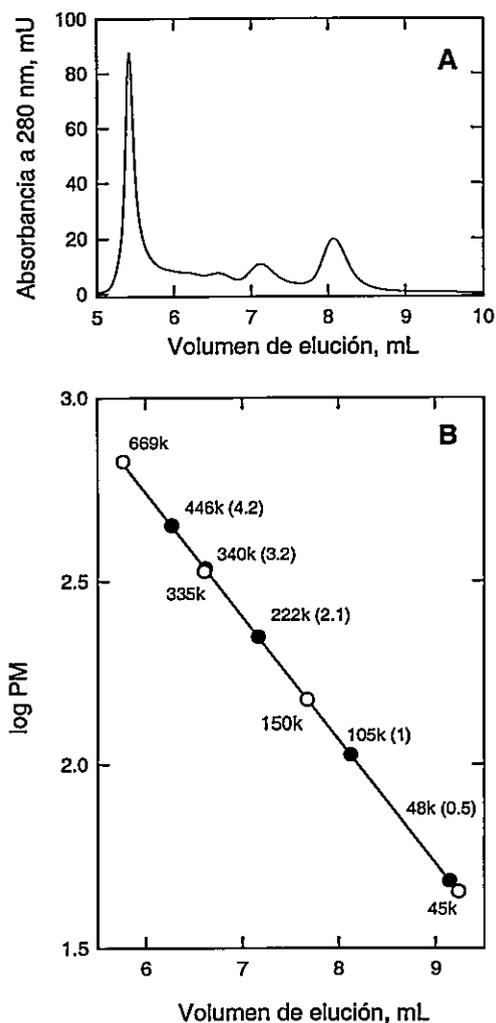


Figura 13. Caracterización de los productos de renaturación por filtración molecular rápida en HPLC. Tubulina desnaturalada en amortiguador Hepes 50 mM, DTT 5 mM, GdmCl 5 M, pH 7,5 fue inyectada en una columna de filtración molecular de alta presión equilibrada en el mismo amortiguador en ausencia de GdmCl a 25°C a un flujo de 1 mL/min. (A) Cromatograma de las especies presentes en el ensayo. (B) Determinación de las masas moleculares de los productos de renaturación por filtración rápida. (●) Especies presentes en A, (○) Estándares de peso molecular detalles en Materiales y Métodos. Los números entre paréntesis indican la razón entre la masa molecular encontrada y la masa molecular del heterodímero de tubulina (100.000).

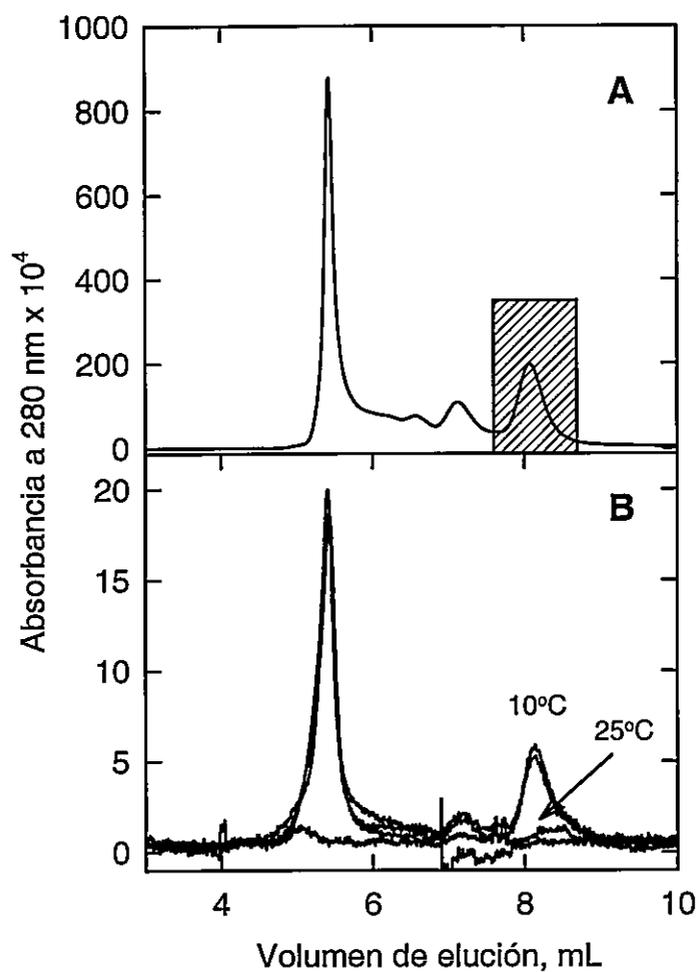


Figura 14. Recromatografía del heterodímero renaturado de tubulina. (A) Se renaturó tubulina (2,8 mg/mL) completamente desplegada por filtración rápida a 10°C, se colectó la proteína mostrada en la región achurada. Una parte de la muestra colectada fue mantenida a 10°C y otra fue incubada a 25°C. (B) Ambas muestras fueron recromatografiadas a las temperaturas indicadas.

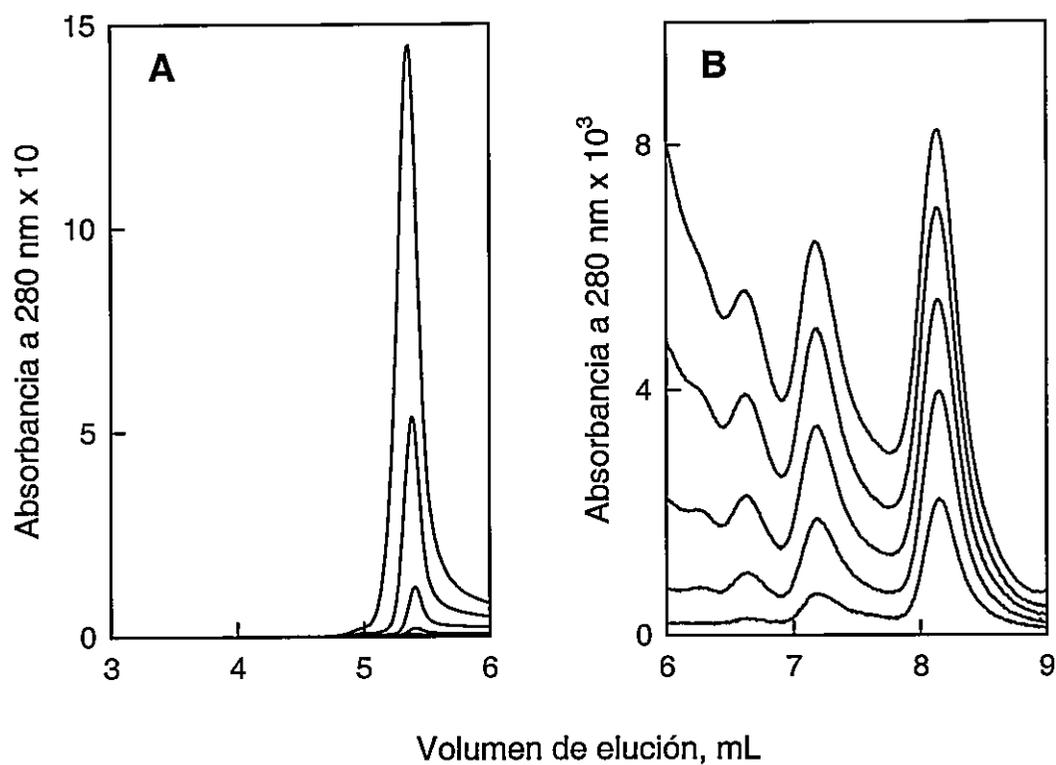


Figura 15. Efecto de la concentración inicial de tubulina sobre el cromatograma de renaturación por filtración molecular rápida. Tubulina desnaturada en 5 M GdmCl fue renaturada por filtración molecular rápida en concentraciones que variaron entre 1,75 y 28 μ M dímero, donde la absorbancia es proporcional a la concentración de proteína. El cromatograma se separó en las partes A y B para mostrar las especies de menor absorbancia. El ensayo se realizó en amortiguador Hepes 50 mM, DTT 5 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,5. a 25°C a un flujo de 1 mL/min.

efecto sobre la proporción de las especies agregadas (Fig. 16A). Los cromatogramas muestran que al aumentar la concentración de proteína se favorece la formación de agregados y la proporción de la especie dimérica decae exponencialmente junto con el aumento de la proporción de las especies de alto peso molecular. Estos resultados sugieren que el dímero es el precursor de los oligómeros.

Para evaluar el efecto de la velocidad en que el GdmCl se separa de los monómeros sobre la velocidad de formación de los agregados, se varió la velocidad de flujo de la columna, de 0,125 mL/min a 1 mL/min. La figura 17 muestra que la cantidad de especies agregadas en el volumen de exclusión decrecen en forma proporcional con el aumento del flujo, la forma dimérica de la tubulina y los otros agregados incluidos se incrementan al aumentar el flujo. Estos resultados indican que la formación del dímero es muy rápida, y por lo tanto, se favorecería la formación de las especies de mayor tamaño molecular. También se analizó el efecto del tiempo de residencia del solvente en la columna y su efecto sobre la distribución de especies (Figura 17 B). Se encontró que los valores de relajación (vidas medias) para las especies estudiadas fueron similares: 1,2 min para el dímero, 1,4 min para las especies incluidas y 1,3 min para el agregado excluido. Además, se puede observar que a tiempo cero de residencia en la columna (flujo infinito), la proporción de dímeros y agregados incluidos son similares (43% cada uno) y de agregado excluido, 14%. Estos resultados indican que los procesos de renaturación y asociación del dímero y su posterior polimerización son mucho más rápidos que la escala de tiempo observada en los experimentos (min). A tiempos de residencia muy largos (mayores que 6 min/mL), se observó que el progreso de la polimerización en la práctica se detiene, alcanzando el equilibrio.

Se estudió en detalle el efecto de la temperatura sobre la formación de agregados. Se realizaron los ensayos de renaturación a distintas temperaturas (Fig. 18). Estos cromatogramas mostraron que la formación de agregados depende directamente de la temperatura (Fig. 18 B), donde al mantener la concentración de tubulina constante y realizar el ensayo a 4°C la proporción de la especie dimérica es aproximadamente 60% de la proteína total, mientras que a 32°C es menos de 20%. Debido a que la reacción de polimerización se encuentra alejada de las condiciones de equilibrio, figura 17 B, se realizó un análisis de Arrhenius, figura 19, en que se encontró una energía de activación de 11,3 Kcal/mol, lo que indica que la reacción de formación de los productos (agregados excluidos) requiere solo una pequeña cantidad de energía para impulsar la reacción a través de los intermediarios.

Efecto de GTP sobre la reacción de renaturación de la tubulina por filtración rápida

En la figura 20 se muestra la diferencia entre los cromatogramas en presencia y ausencia de GTP 56 μ M a 24°C. Este experimento muestra que GTP, en las condiciones de replegamiento usadas, es capaz de estabilizar en aproximadamente 10% la especie dimérica (calculado de la diferencia entre ambos cromatogramas). Estos resultados indican que el nucleótido GTP no tiene un papel fundamental en la vía de renaturación *in vitro* de la tubulina y no es un factor preponderante en la formación de la especie dimérica y su posterior asociación en especies de alto tamaño molecular.

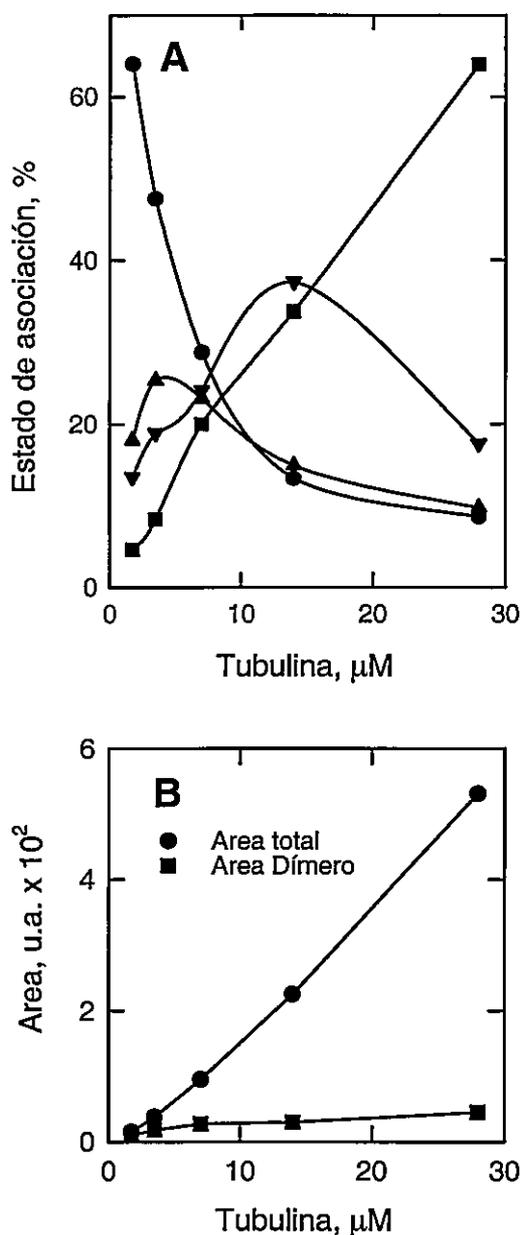


Figura 16. Efecto de la concentración inicial de tubulina sobre la distribución de estados de asociación en el ensayo de renaturación por filtración rápida. (A) Porcentaje de cada especie en función de la concentración inicial de tubulina: (●) dímeros, (▲) 2 veces dímero, (▼) otros agregados incluidos en la columna y (■) estados excluidos. (B) Análisis de la cantidad de dímero y proteína total en el ensayo. Los volúmenes de elución de cada especie fueron determinados por análisis de segunda derivada de los cromatogramas. La cantidad de proteína en cada especie fue determinada por deconvolución de los cromatogramas en los picos que los componen. La función utilizada para sintetizar las curvas a ser utilizadas en el ajuste, fue una mezcla: 50% gaussiana y 50% lorenziana. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la figura 15.

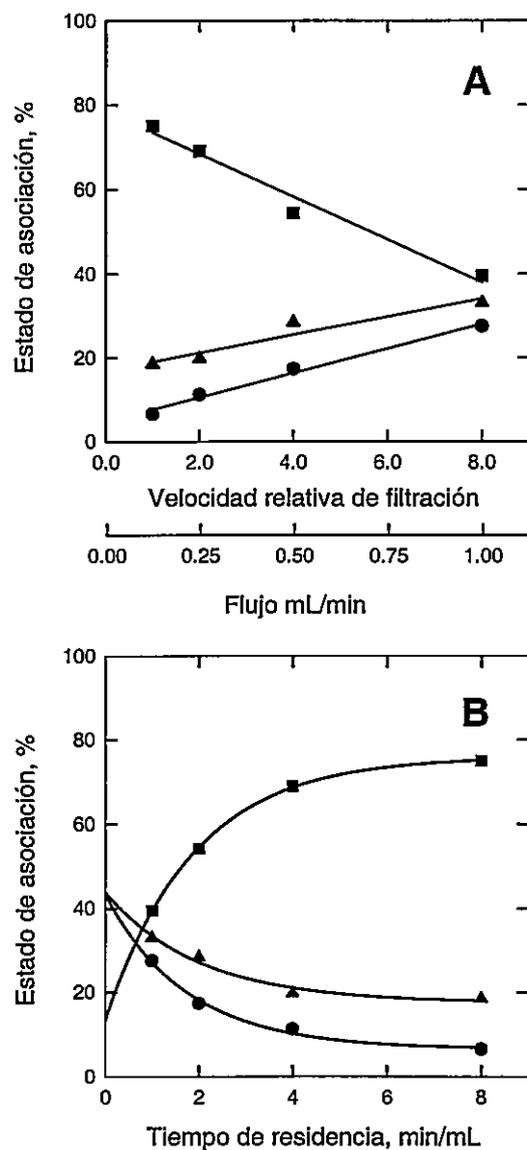


Figura 17. Efecto del flujo de solvente en la columna sobre la distribución de estados de asociación en el ensayo de renaturación por filtración molecular rápida. (●) Dímeros, (▲) otras especies incluidas y (■) agregado excluido. La concentración inicial de tubulina utilizada fue 2 mg/mL a 25°C. Los porcentajes de las especies fueron calculados como se describió en la figura 16. En B se muestran los valores de flujo transformados a tiempos de residencia.

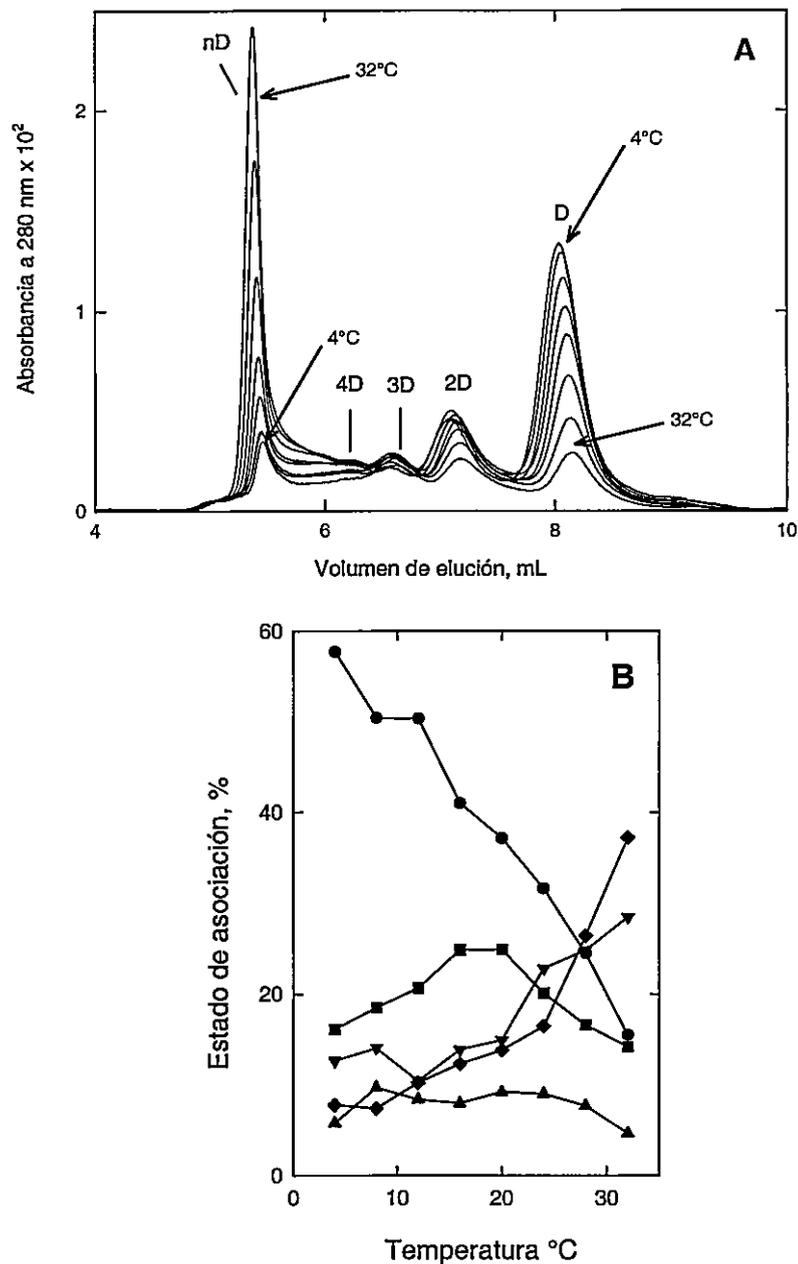


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la distribución de estados de asociación en el ensayo de renaturación por filtración rápida. (A) 20 μ L de tubulina, 0,56 mg/mL, desnaturalada en Hepes 50 mM, DTT 5 mM, NaCl 0,2 M, GdmCl 5 M, pH 7,5 fue inyectada a una columna TSK-3000 de filtración molecular equilibrada en Hepes 50 mM, DTT 5 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,5 a un flujo de 1 mL/min. (B) Cuantificación del efecto de la temperatura sobre la distribución de estados de agregación en el ensayo de renaturación por filtración rápida: (●) dímeros, (■) 2 veces el dímero, (▲) 3 veces el dímero, (▼) otras especies incluidas por la columna y (◆) agregados excluidos. Las proporciones de cada componente en el cromatograma fueron determinadas utilizando el método descrito en la figura 16.

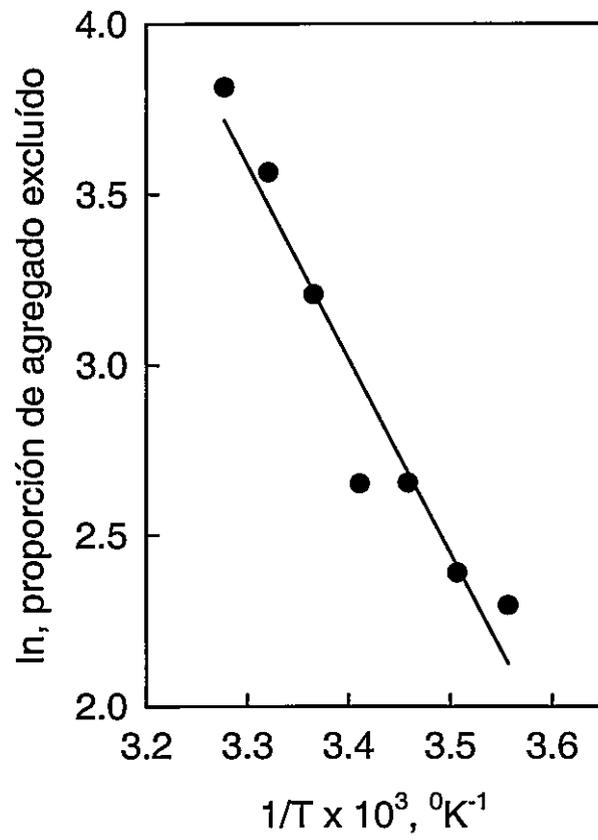


Figura 19. Cálculo de la energía de activación para la reacción de polimerización observada por filtración molecular rápida.

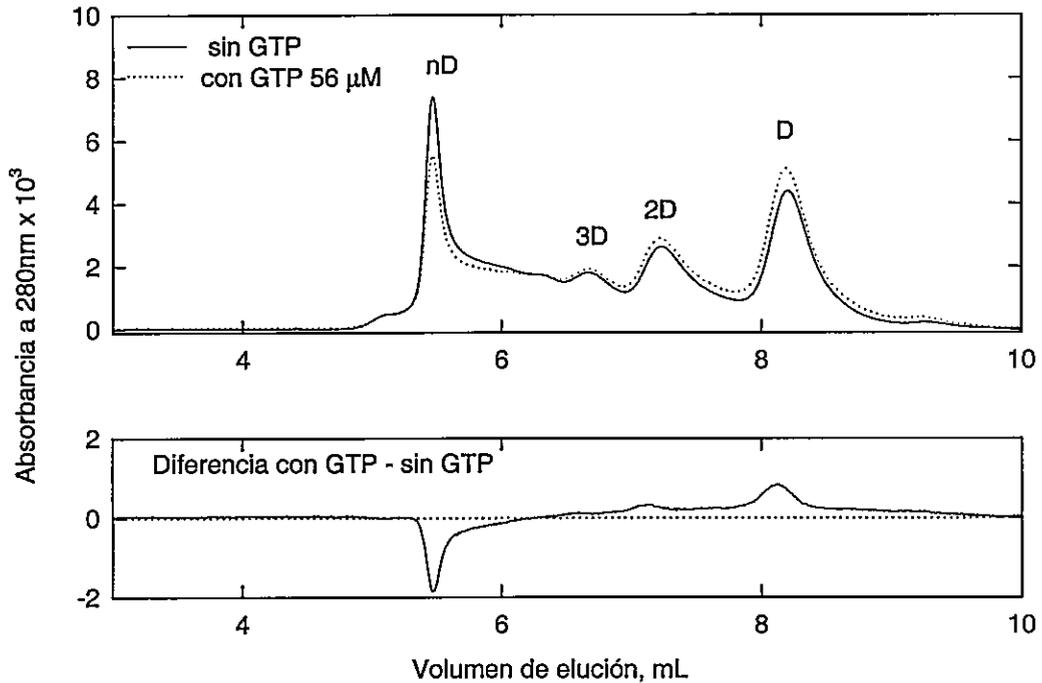


Figura 20. Efecto de GTP sobre la renaturación de la tubulina por filtración molecular rápida. La tubulina fue desnaturalada en amortiguador de renaturación en presencia de GdmCl 5 M y cromatografiada en una columna de filtración molecular Sephacryl S-300 (40 cm x 3 cm) equilibrada en el mismo amortiguador. Las fracciones que contenían la proteína fueron colectadas, concentradas en Centricon 30 (Amicon) a 0,6 mg/mL y se realizó el ensayo de renaturación por filtración rápida a 24°C. Para el ensayo en presencia de GTP, tanto la proteína en medio de desnaturalación así como la columna, contenían la misma concentración de nucleótido.

Reacción de plegamiento de la tubulina de cerebro de bovino

Para comparar la reacción de renaturación de la tubulina de cerebro de pollo con tubulina de otra fuente, se realizaron los experimentos de filtración rápida y fluorescencia con la tubulina de cerebro de bovino. Se determinó que por filtración rápida la tubulina de cerebro de bovino exhibe las mismas características que la de pollo: el mismo tipo de patrón de autoasociación y una dependencia similar con la temperatura (Fig. 21). Ésto indica que no existen variaciones significativas de la reacción de plegamiento por filtración rápida para ambas tubulinas. Al comparar el efecto de GdmCl sobre la emisión de fluorescencia de los triptofanos de la tubulina de cerebro de bovino con la de cerebro de pollo, se encontró el mismo efecto sobre los espectros de emisión, tanto para el cambio en intensidad como corrimiento. El $D^{50\%}_{\text{GdmCl}}$ para la desnaturación de tubulina de cerebro de bovino fue a 1,4 M, tanto para las transiciones en la desnaturación y renaturación (Fig. 22). Estos estudios permiten afirmar que la características de renaturación de la tubulina de pollo estudiada por fluorescencia y filtración rápida, son comunes a tubulinas de otras fuentes y por ésto se constituye en una herramienta de caracterización apropiada.

Envejecimiento de la tubulina y especies asociadas por replegamiento en filtración rápida.

La tubulina posee la característica de ser una proteína muy inestable y tener un tiempo de vida funcional muy corto, en relación a otras proteínas. La relación entre el envejecimiento y agregación fue analizada por filtración rápida. En la figura 23 se muestra la comparación entre los cromatogramas de la tubulina de cerebro de pollo renaturada por filtración rápida y la que fue envejecida por 24 h a 4°C. Los resultados

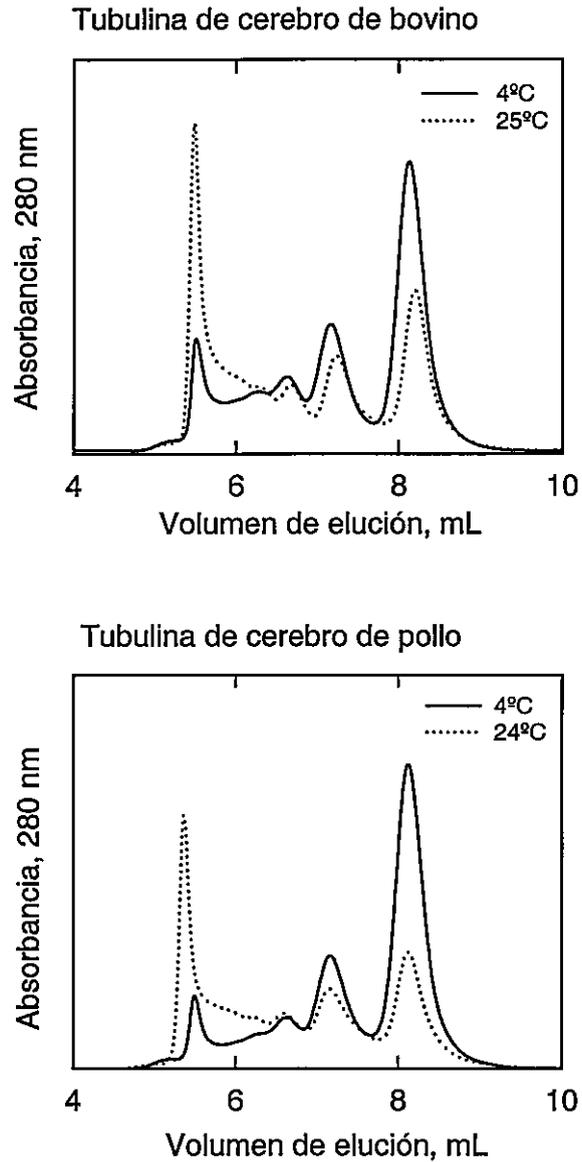


Figura 21. Comparación de la renaturación por filtración rápida de las tubulinas de cerebro de bovino y de pollo. Las tubulinas fueron desnaturaladas en amortiguador de renaturación en presencia de GdmCl 5 M. La concentración de proteína en ambos casos fue 0,7 mg/mL.

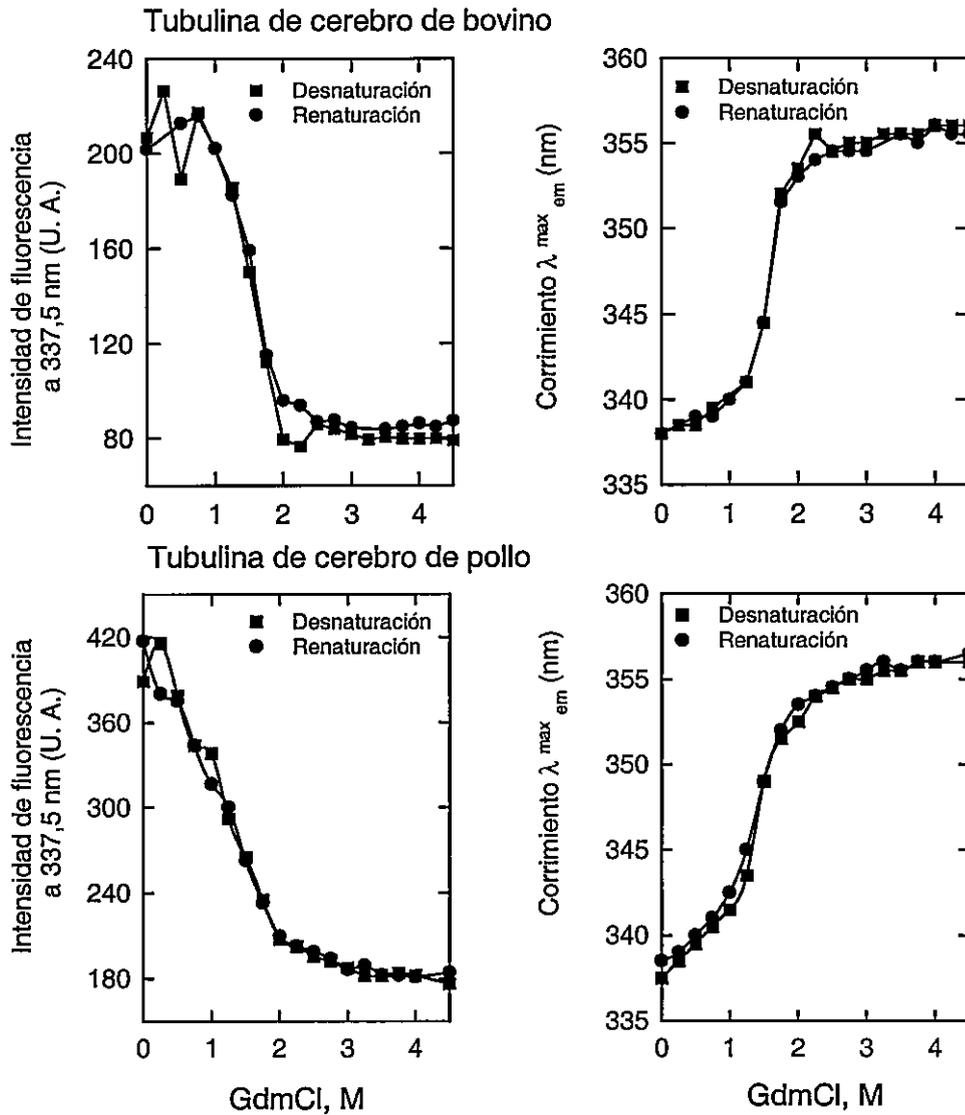


Figura 22. Comparación de las curvas de desnaturalación y renaturación de las tubulinas de cerebro de bovino y de pollo seguidas por fluorescencia intrínseca. Las condiciones de ensayos fueron las indicadas en la figura 7 y explicadas en Materiales y Métodos. La concentración de tubulina utilizada fue 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tubulina de bovino y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la de cerebro de pollo.

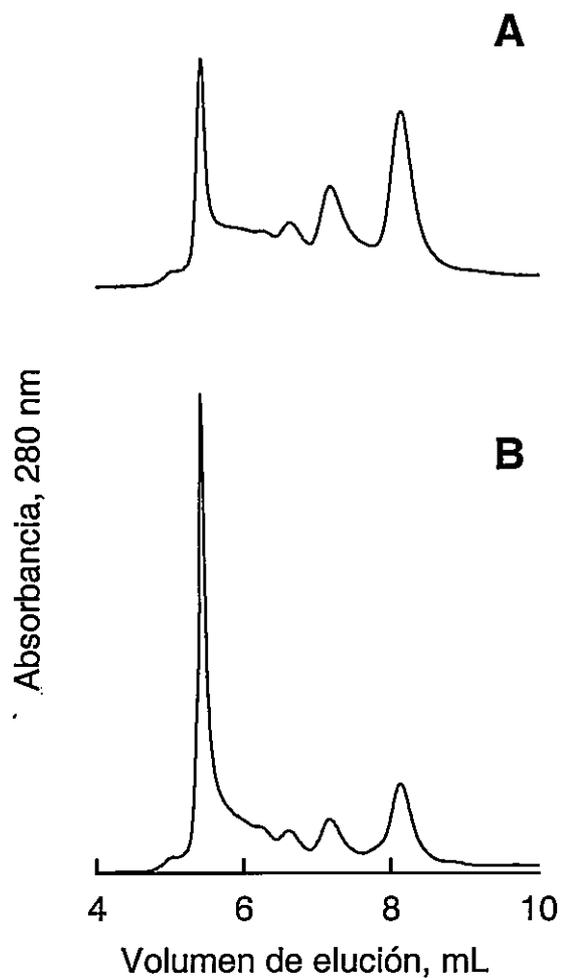


Figura 23. Cromatogramas de la tubulina replegada por filtración rápida y envejecida. (A) La tubulina fue replegada a una concentración de 0,6 mg/mL en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. (B) El envejecimiento de la tubulina se realizó en amortiguador fosfato 10 mM, pH 7.0, $MgCl_2$ 10 mM, EGTA 0,1 mM y GTP 0,1 mM por 24h a 4°C y posteriormente se cromatografió en la columna TSK-3000 equilibrada en amortiguador de replegamiento.

muestran que la tubulina envejecida es capaz de formar el mismo tipo de especies agregadas que la tubulina replegada por filtración rápida (Fig. 23 A), lo que sugiere que el dímero en ambos casos adquiere una conformación común que da origen a los mismos oligómeros.

Caracterización de la dinámica del equilibrio químico monómero-dímero de la tubulina

La tubulina es una proteína heterodimérica de masa molecular 100.000 compuesta de α - y β -tubulina en una estequiometría 1:1 en el heterodímero funcional. Nuestro interés se centró en el estudio del intercambio de los monómeros en condiciones de equilibrio por medio de la técnica de transferencia electrónica de energía homogénea entre fluoróforos. El principio de esta técnica se basa en la pérdida de la polarización de fluoróforos idénticos debido a su proximidad en el espacio. La tubulina fue marcada al azar con isotiocianato de fluoresceína, que es un reactivo que modifica químicamente los residuos con grupos aminos en las cadenas laterales (Arg y Lys).

El heterodímero fue marcado en el estado dimérico (concentración de dímero mucho mayor que su constante de disociación) y la incorporación, medida de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, fue de $1,2 \pm 0,1$ moles de FITC por mol de heterodímero de tubulina. No se intentó disminuir el grado de marcación, pues se detectó que la proteína a estos niveles de marcación era mucho más estable que la proteína nativa en el tiempo. Se supuso que la marca se distribuye al azar en los heterodímeros y se calculó la distribución de la marca utilizando una función de Poisson, que se caracteriza por presentar valores bajo la media más a menudo que sobre ésta, del modo que se explica a continuación.

$$P(x) = \frac{e^{-\mu} \mu^x}{x!}$$

En que X representa el evento al que se quiere calcular la probabilidad y μ es el promedio de la ocurrencia del evento al que se desea calcular la probabilidad (1,2 moles de FITC por mol de tubulina). En el caso de la incorporación, se determinó que para un X de 2 moles de marca por heterodímero, la probabilidad era de 22% y para 1 mol de marca era de 36%.

La proteína marcada de este modo no pierde sus propiedades de ensamblaje y se determinó que poseía una concentración crítica de 1,2 mg/mL, levemente mayor que la proteína no modificada, que usualmente es 1 mg/mL (Gaskin y col., 1974) (resultados no mostrados).

Para demostrar la pérdida de polarización por transferencia de energía homogénea, se midió el espectro de excitación con luz polarizada tanto para la proteína marcada, como para la tubulina intercambiada. En la figura 24 se muestra el aumento de la polarización en la proteína marcada con FITC cuando la excitación alcanza el lado rojo del espectro de emisión del fluoróforo (FITC). De una polarización de 0,24 a 485 nm se alcanza una polarización de 0,33 a 520 nm, siendo éste el lado rojo del espectro de emisión. Este resultado demuestra la transferencia de energía homogénea por cercanía de fluoróforos (Weber y Anderson, 1969). Además, se muestra el espectro de excitación con luz polarizada de tubulina marcada con FITC incubada por 1 h a 25°C, con un gran exceso de tubulina no marcada. Este espectro no muestra el efecto antes mencionado lo que indica que no existe despolarización por cercanía de fluoróforos debido a que la marca se ha diluido entre los monómeros no marcados, fenómeno conocido como intercambio. Sin embargo, cabe destacar que usualmente en este tipo de experimentos se observa

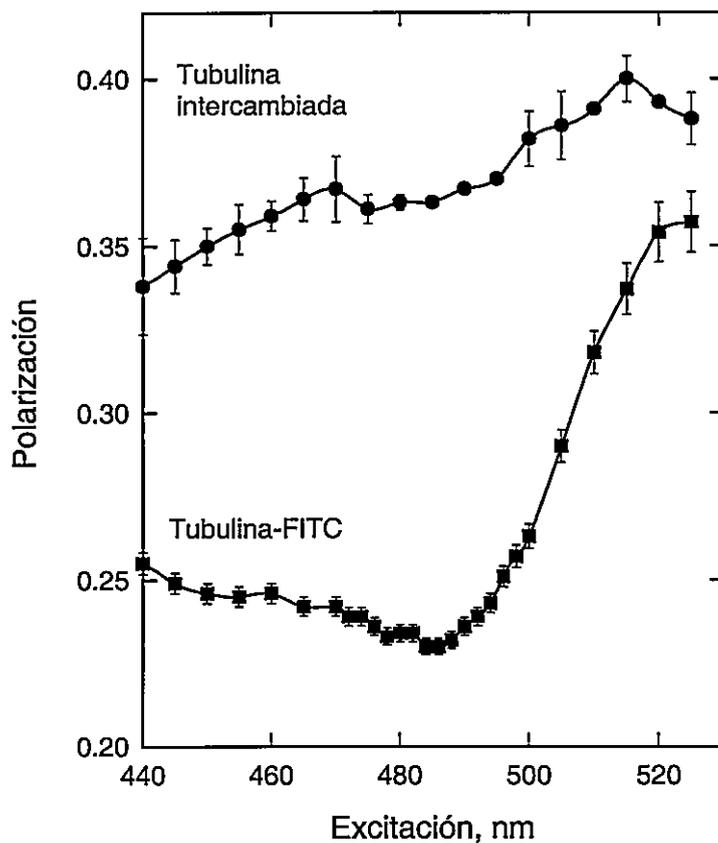


Figura 24. Espectro de excitación con luz polarizada de tubulina marcada con isotiocianato de fluoresceína y de la intercambiada con tubulina sin marca. (●) Espectros de excitación con luz polarizada para tubulina marcada con FITC (1,2 moles/mol de dímero) a una concentración de $4,7 \mu\text{M}$ en amortiguador Hepes 25 mM, DTT 5 mM, pH 7,5 a 25°C (■). La misma muestra se diluyó con tubulina no marcada a una concentración final de tubulina-FITC de $0,16 \mu\text{M}$ y tubulina no marcada de $5 \mu\text{M}$. Las muestras se incubaron por 1 h a 25°C y se midió el espectro de excitación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 medidas.

que ambos espectros de polarización poseen un punto isosbético en el lado rojo, en este caso esta característica no es observada, y la razón para esta diferencia podría deberse a una interferencia producida por luz dispersada por la solución de proteína, lo que produciría un valor anómalo de polarización.

También se decidió estudiar las propiedades del derivado tubulina-FITC frente a la dilución, pues, esto nos permitiría determinar la constante de disociación de la tubulina marcada, así como, el comportamiento de la pérdida de la polarización en función de la dilución comparado con un proceso clásico de disociación. Se determinó el efecto de la dilución sobre los valores de la polarización del derivado tubulina-FITC intercambiado y se observó una disminución de la polarización desde 0,31 a 0,05 en un intervalo de concentraciones desde 1×10^{-5} a $5,2 \times 10^{-8}$ M (figura 25A). Estos valores de polarización fueron convertidos a grado de disociación (α), figura 25B, y se encontró que 50% de disociación ocurre a 8×10^{-7} M. Este valor corresponde al de la constante de disociación del dímero, y está en buen acuerdo con los valores encontrados en la literatura (Detrich y Williams, 1978; Mejillano y Himes, 1989; Panda y col., 1992; Sackett y col., 1989). Sin embargo, de acuerdo al tratamiento de un equilibrio clásico dímero-monómero el 80% central (desde 10 a 90%) del grado de disociación se debe expandir en un número cercano a las 2,86 unidades logarítmicas (Weber, 1992). En nuestro caso se encontró que este valor correspondía a 1,5 unidades logarítmicas, lo que de acuerdo a Weber corresponde a un fenómeno de deriva conformacional, que implica que las subunidades tienen una conformación diferente en el estado disociado que en el estado dimérico. Un punto que es importante mencionar es el de las magnitudes de los cambios en polarización encontrados al disociar al dímero de tubulina: cambios en polarización de 0,26 entre el estado asociado y el estado disociado del dímero son incompatibles con

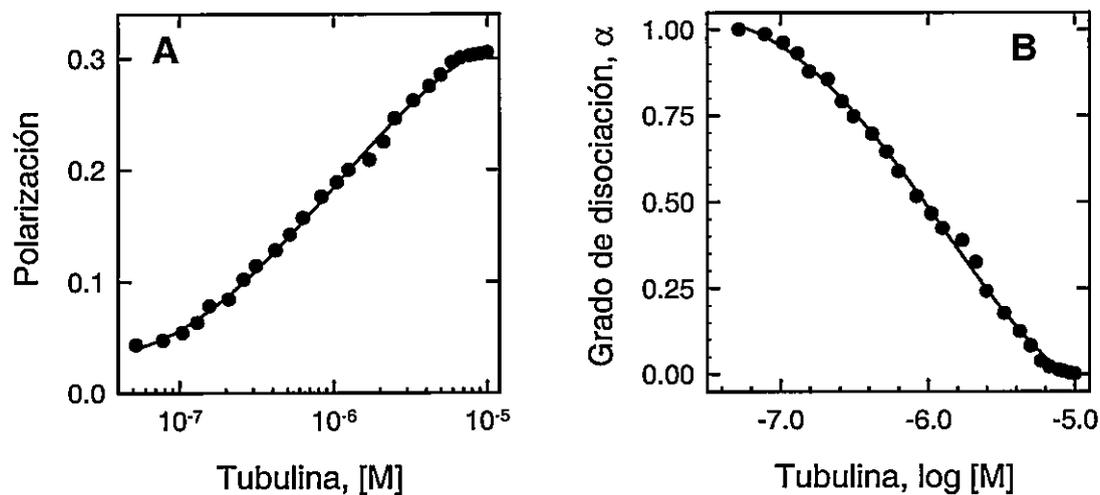


Figura 25. Efecto de la dilución sobre el derivado tubulina-FITC. (A) Efecto de la dilución sobre la polarización del derivado tubulina-FITC. (B) Los valores obtenidos en A fueron transformados a grado de disociación, utilizando la relación $\alpha = [1 + Q(r_{\text{monómero}}/r_{\text{dímero}} - r)]^{-1}$, donde r corresponde a la anisotropía y Q a la razón entre el rendimiento cuántico del Dímero y el Monómero; en éste caso se utilizó un valor de 1. El derivado utilizado fue incubado a 23°C por 2 h. La temperatura fue controlada a 23°C.

una disociación de partículas rígidas del tamaño del monómero y mas bien indican que la dilución produce un cambio muy grande en la movilidad local de fluoróforo (esto se analizará en detalle más adelante en la sección **Análisis de los valores de polarización y medidas de tiempos de vida para el derivado tubulina-FITC**), lo que también sugiere que al disociarse los monómeros cambian a una conformación diferente a la que poseen cuando forman el dímero, conformación que sería más flexible y permitiría el aumento de la movilidad del fluoróforo.

La determinación de la cinética de intercambio de monómeros y su dependencia de la concentración total de dímeros es importante, pues permite dilucidar si el intercambio de éstos depende del estado de asociación de la proteína. La figura 26 muestra que la reacción de intercambio es independiente de la concentración de dímeros, pues las constantes cinéticas de intercambio no son significativamente diferentes cuando la reacción de intercambio se realiza con la proteína disociada (baja concentración de tubulina) o con proteína en estado dimérico: las constantes de velocidad medidas fueron $0,12 \text{ min}^{-1}$ para el intercambio utilizando proteína marcada disociada y $0,13 \text{ min}^{-1}$, cuando se utilizó tubulina marcada a alta concentración (estado dimérico). Estos resultados sugieren que la etapa limitante de la reacción de intercambio es la velocidad de disociación del dímero, y que la velocidad de asociación es mucho mayor que la velocidad de intercambio. Por lo tanto cuando se mide el intercambio se está midiendo en forma directa la velocidad de salida de monómeros del dímero (disociación). Esto concuerda con la rápida formación del heterodímero en los experimentos de renaturación.

Otro parámetro que es importante determinar en la dinámica del equilibrio monómero-dímero es la dependencia de la temperatura de la velocidad de intercambio,

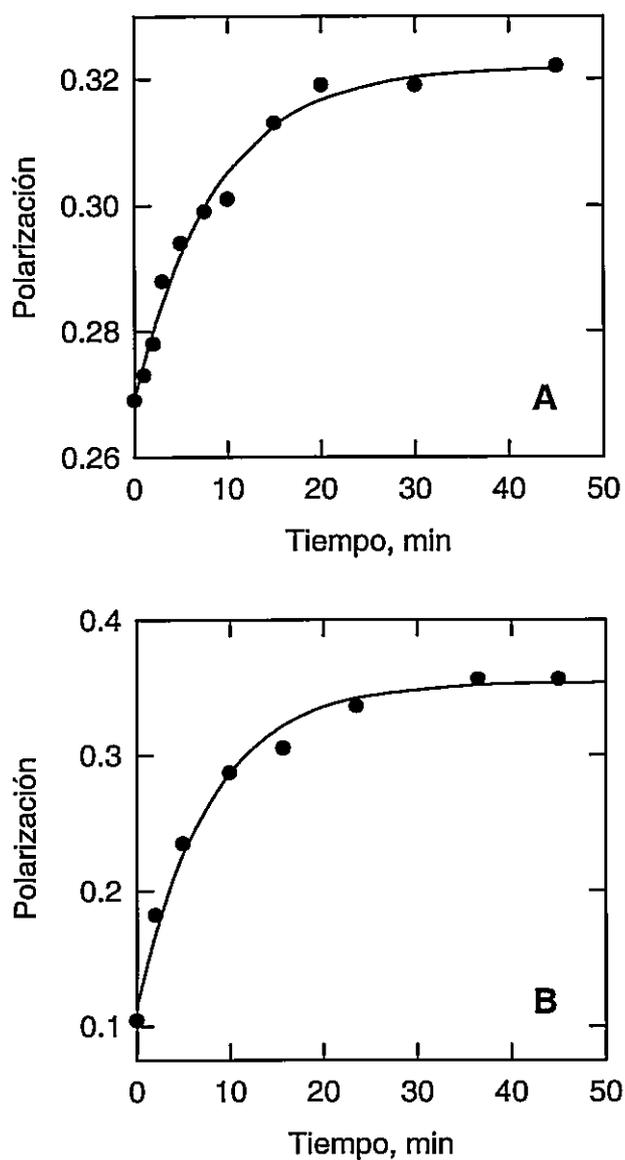


Figura 26. Efecto de la concentración total de dímeros sobre la velocidad de intercambio de monómeros. Se determinó el intercambio de monómeros a 25°C en amortiguador Hepes 25 mM, DTT 5 mM, pH 7,5. (A) Tubulina-FITC 5 μ M, tubulina no marcada 10 μ M. (B) Tubulina-FITC 0,2 μ M, tubulina no marcada 4,6 μ M. La concentraciones son las finales en el ensayo.

pues esto permite medir cuantitativamente la magnitud de la barrera de energía de activación que presenta el proceso de intercambio. La figura 27A muestra las cinéticas de intercambio en el intervalo de temperatura entre 3,5°C a 27,4°C donde la variación en tiempos de relajación para el intercambio varían de aproximadamente 25 min a 3,5°C a 5 min a 27,4°C, lo que indica que la reacción tiene una fuerte dependencia de la temperatura. En la figura 27B se muestra el gráfico de Arrhenius en que se obtiene un valor de 20 Kcal/mol para la barrera de energía de activación para el intercambio. El valor corresponde a la cantidad de energía necesaria para separar los monómeros del heterodímero de tubulina en el solvente empleado.

En la figura 28 se muestra la cinética de la pérdida de polarización del dímero al diluirlo desde una concentración de 5 μM a 0,15 μM . La cinética se caracteriza por un progreso bifásico con tiempos de relajación de 3 y 60 min, lo que hemos interpretado como las fases de disociación y deriva conformacional, respectivamente. Al agregar una alta concentración de dímeros (2,4 μM) se restablece la polarización del dímero intercambiado con un tiempo de relajación de 12 min, lo que se interpreta como la suma entre la velocidad de asociación e intercambio.

Estudios de desnaturación y disociación de la tubulina por medio del aumento en la presión hidrostática

El objetivo de estos experimentos fue caracterizar el efecto de la presión hidrostática sobre el equilibrio dímero-monómero en la tubulina con el objeto de determinar el grado de acceso que el solvente tiene a las interfases del heterodímero. La presión hidrostática ha sido utilizada desde hace largo tiempo en la determinación de las constantes de disociación de un gran número de proteínas oligoméricas y agregados supramoleculares (Gross y Jaenicke, 1994; Silva y col., 1996; Silva y Weber, 1993). Las metodologías

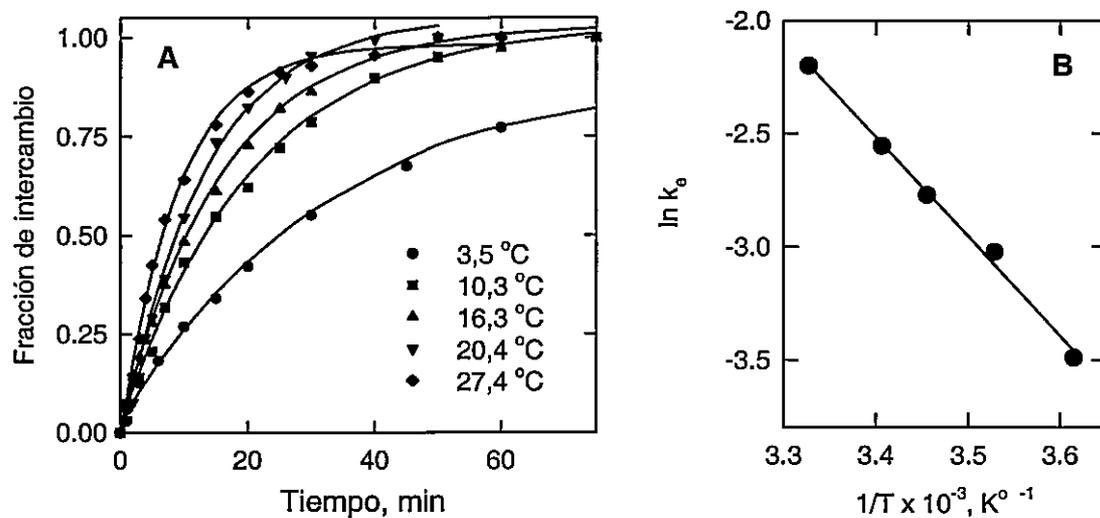


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de intercambio de monómeros de tubulina. (A) Curvas de progreso para el intercambio de monómeros a las temperaturas indicadas. (B) Gráfico de Arrhenius para el cálculo de la energía de activación involucrada en el intercambio. Las concentraciones utilizadas fueron; para tubulina-FITC 0,2 μM y 4,0 μM para tubulina no marcada.

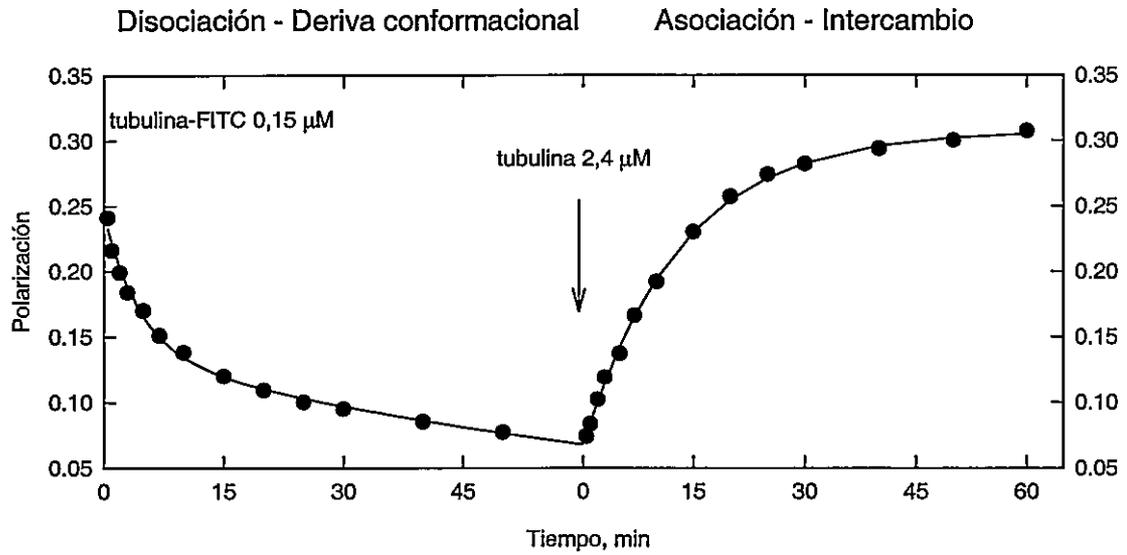


Figura 28. Disociación, deriva conformacional e intercambio de monómeros observados por transferencia de energía homogénea. Tubulina-FITC 5 μM fue diluída a 0,15 μM y se siguió el cambio en polarización por 1 h, luego al mismo ensayo se agregó tubulina no marcada a la concentración indicada y el proceso de intercambio se siguió por 1 h. El experimento se realizó a 25°C.

usualmente empleadas para determinar el grado de disociación de una proteína en función de la presión son: determinación del grado de corrimiento al rojo de la fluorescencia intrínseca de la proteína, principalmente la debida a residuos triptofanos y determinación del cambio de polarización de alguna sonda covalentemente unida a la proteína dimérica bajo estudio (Paladini y Weber, 1981a).

La figura 29 muestra el efecto de la presión sobre la fluorescencia intrínseca de la tubulina. Una solución 3,6 μM de dímero fue excitada a 295 nm y los espectros de emisión se registraron a diferentes presiones en el intervalo entre presión atmosférica y 2,6 kbar (aproximadamente 2500 atmósferas), la figura 29 A muestra el efecto sobre los espectros de emisión de la tubulina. El espectro a 2,6 kbars se caracteriza por un corrimiento de aproximadamente 12 nm hacia el rojo y una pérdida del rendimiento cuántico de aproximadamente 30%. Al restablecer la presión atmosférica se recupera el máximo de emisión original pero el rendimiento cuántico permanece bajo y no se recupera. La figura 30 muestra de modo cuantitativo los cambios en el máximo de emisión (en la forma de centro de masa, que es una forma más exacta de determinar la energía promedio de la emisión de un fluoróforo (da Poian y col., 1995)). Para determinar si los cambios en los centros de masa en función de la presión son el producto de la disociación del dímero de la tubulina, fue necesario analizar el efecto de la concentración sobre esta tendencia. Al disminuir 10 veces la concentración de proteína, el cambio del centro de masa producido al aumentar la presión mostró la misma tendencia aunque la proteína disociada presenta un centro de masa menor; la diferencia se mantiene al disminuir la presión a 1 atmósfera (figuras 30A y 30B). Los resultados indican que el cambio espectroscópico observado es independiente de la concentración y por lo tanto es consistente con la desnaturación de la tubulina inducida por presión, mas que con un

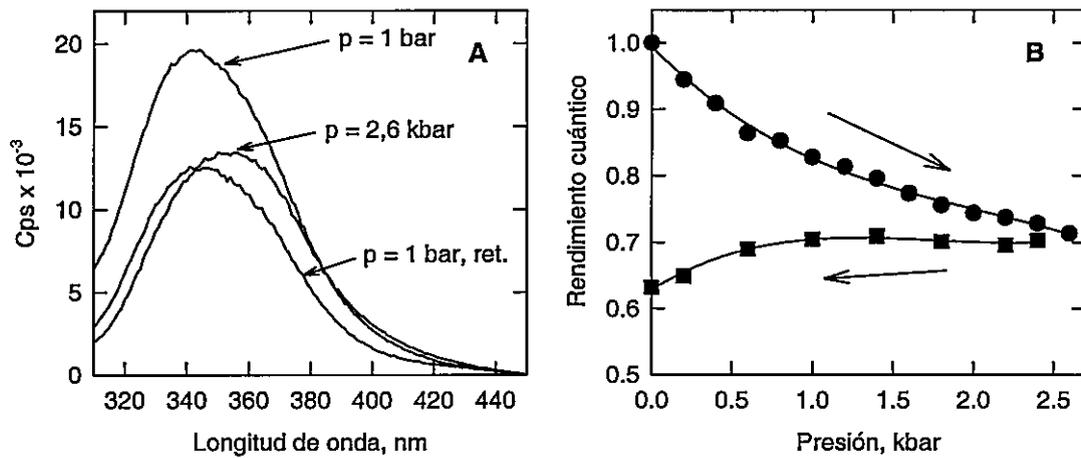


Figura 29. Efecto de la presión hidrostática sobre la emisión de fluorescencia intrínseca de la tubulina. (A) Espectros de emisión de la tubulina en estado nativo, comprimida a 2,6 kbar y a presión atmosférica después del ciclo de compresión (ret). (B) Cambio del rendimiento cuántico de la emisión intrínseca de la tubulina en función de la presión hidrostática. Las flechas indican el sentido del cambio de presión. La concentración de proteína fue 3,6 μ M en amortiguador Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5. a 23°C.

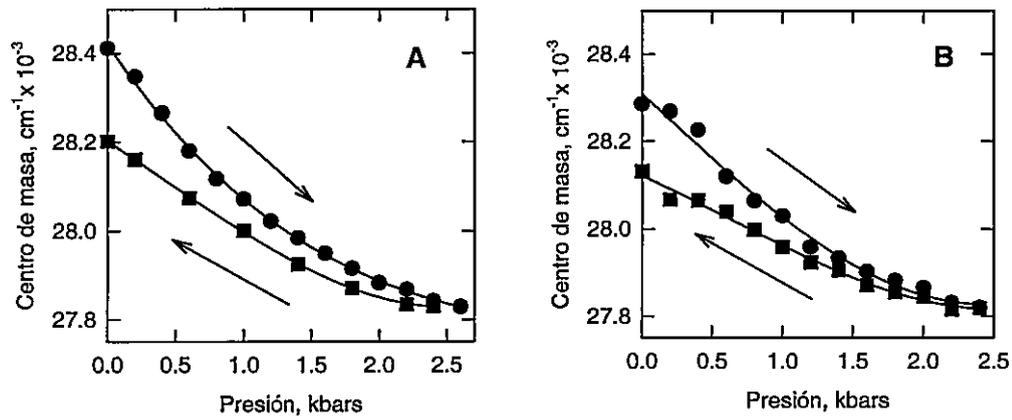


Figura 30. Efecto de la concentración de proteína sobre el cambio del centro de masa de la emisión de triptofanos en función de la presión hidrostática. (A) Tubulina 3,6 μM . (B) Tubulina 0,36 μM . Las condiciones experimentales se describen en la figura anterior.

proceso de disociación. En la figura 31 se muestran los gráficos para la determinación del cambio de volumen molar de la reacción de desnaturación por presión. Se analizó el cambio espectroscópico como un fenómeno de primer orden, asociado a la desnaturación de la proteína y se determinó el cambio de volumen molar producido (ΔV), el valor obtenido fue de 40 mL/mol de dímero.

La relación empleada en este caso es:

$$K_p = \frac{n^n \alpha^n C^n}{1 - \alpha} \quad (1)$$

$$K_p = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (2)$$

$$K_p = K_{atm} e^{\frac{p\Delta V}{RT}} \quad (3)$$

$$\ln K_p = \ln K_{atm} + \frac{p\Delta V}{RT} \quad (4)$$

donde K_p es la constante de equilibrio dependiente de la presión. En la ecuación (1) se muestra la relación con respecto al grado de disociación α (o de desnaturación) y la concentración de proteína C para un polímero de orden n . En este estudio, se observó un proceso independiente de la concentración de proteína, por lo tanto el parámetro n es igual a 1 y la ecuación (1) se transforma en la ecuación (2). En la ecuación (3) se muestra la relación entre K_p , la constante de equilibrio a presión atmosférica K_{atm} , el cambio estándar de volumen de la reacción ΔV y la temperatura T . Al linearizar la ecuación (3)

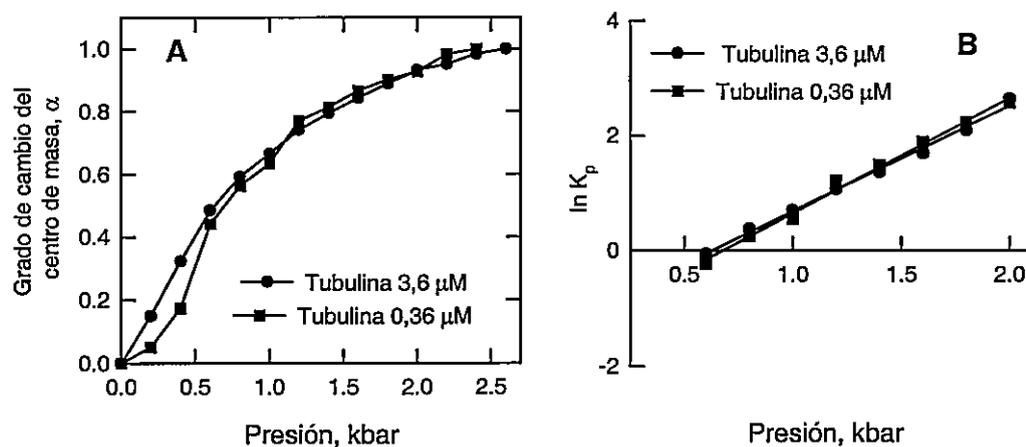


Figura 31. Cálculo del cambio de volumen molar producido por el cambio de presión hidrostática. (A) Fracción de cambio del centro de masa de la emisión intrínseca de fluorescencia de la tubulina a las concentraciones indicadas. (B) Gráfica secundaria para la determinación del cambio de volumen molar producido por la compresión. Se utilizó un modelo de desnaturación, debido a que la propiedad medida durante el ciclo de compresión es independiente de la concentración de proteína. Las condiciones experimentales se describen en la figura 29.

se obtiene la ecuación (4) donde al graficar $\ln K_p$, v/s p , se obtiene una línea recta con una pendiente igual a $\Delta V/RT$ (Weber, 1986).

Para determinar la posibilidad de disociar a la tubulina sin la interferencia del proceso de desnaturalación observado por la fluorescencia de los triptofanos, se utilizó el derivado tubulina-FITC en que es posible determinar el grado de disociación por medio de cambios de polarización de la sonda. En la figura 32 se muestran las curvas de presión para tubulina marcada con FITC a dos temperaturas, y en estado dímérico (alta concentración) no se observaron cambios en la polarización en función del incremento de presión hidrostática, lo que se controló incluso con proteína intercambiada (Fig. 32A). Estos estudios indican que la tubulina no es un dímero susceptible a disociación por presión. Para confirmar si este efecto (favorable para la asociación), al contrario de lo encontrado para la generalidad de las proteínas, se realizó el mismo tipo de experimento con la tubulina FITC, solo que esta vez la proteína se encontraba parcialmente disociada (concentración de $0,5 \mu\text{M}$). La figura 33 muestra que al incrementar la presión la polarización aumenta. En el recuadro se muestra la cinética de recuperación de la polarización al retornar a presión atmosférica, dónde se alcanza la polarización inicial, revelando la reversibilidad del efecto de la presión. Los resultados pueden explicarse por dos conclusiones complementarias, 1) La tubulina se asocia al incrementar la presión hidrostática; 2) La conformación derivada por dilución es desfavorecida por el incremento en la presión hidrostática y por lo tanto se estabiliza la conformación más rígida del monómero. Este es el primer caso conocido de una proteína en que la presión hidrostática promueve la asociación de un dímero.

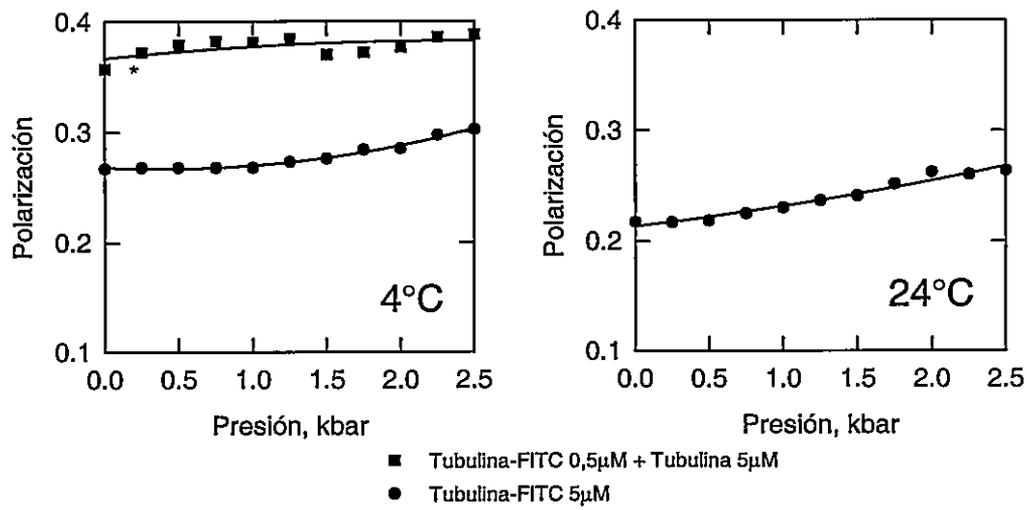


Figura 32. Efecto de la presión hidrostática sobre la polarización de la tubulina modificada con FITC e intercambiada. El experimento se realizó en amortiguador Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

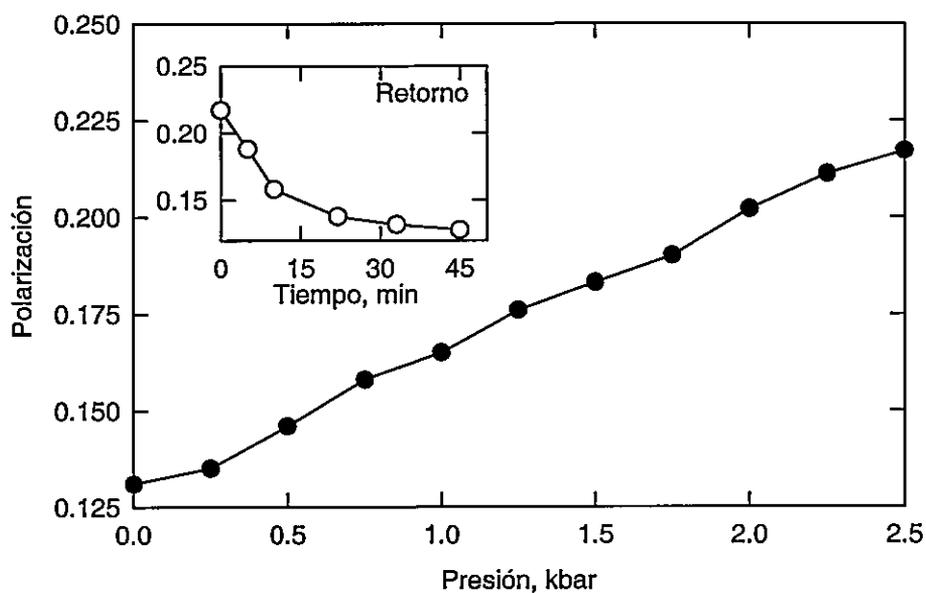


Figura 33. Efecto de la presión hidrostática sobre la polarización de la tubulina-FITC parcialmente disociada por dilución. En el inserto se muestra la cinética del retorno sobre la polarización del derivado a presión atmosférica. La tubulina fue previamente intercambiada y fue utilizada a una concentración de $0,15 \mu\text{M}$ en amortiguador Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, pH 7,5, a 24°C .

Análisis de los valores de polarización y medidas de tiempos de vida para el derivado tubulina-FITC.

La polarización de fluorescencia es una propiedad que depende del tiempo de vida de la emisión de la sonda empleada. Por lo tanto, fue necesario averiguar si los cambios en polarización solo eran función del estado de proximidad de los fluoróforos y no de variaciones en los tiempos de vida de la sonda FITC. Se determinaron los tiempos de vida de FITC unido a la tubulina: en la forma modificada no intercambiada ($P = 0,24$), modificada intercambiada con tubulina no marcada ($P = 0,33$) y la forma intercambiada diluida ($P = 0,08$). Se utilizó fluorometría de fase y desmodulación. La Figura 34 muestra la gráfica para las mediciones de cambio de fase y cambio de modulación de la emisión para los distintos estados de la tubulina-FITC; las curvas que unen los puntos representan el mejor ajuste a los componentes de los tiempos de vida mostrados en la Tabla I. Como se muestra en la tabla no existen diferencias significativas en los tiempos de vida de las distintas formas de tubulina-FITC, confirmando que todos los resultados de estudios de polarización son el resultado de cambios de movilidad del fluoróforo.

Sin embargo, el análisis de los valores de polarización observados utilizando la ecuación de Perrin y calcular los tiempos de correlación rotacionales, mostró que los valores fueron menores que los calculados teóricamente (ver Tabla II). La explicación mas plausible en este caso, es que la menor polarización observada se debe a la existencia de al menos 2 rotores: uno que corresponde a una región de baja movilidad y otro a la sonda rotando libremente, en que ésta última provoca la disminución en la polarización observada. Esta explicación podría ser confirmada a través de experimentos de polarización dinámica, en que es posible medir la contribución de diferentes rotores a la polarización observada.

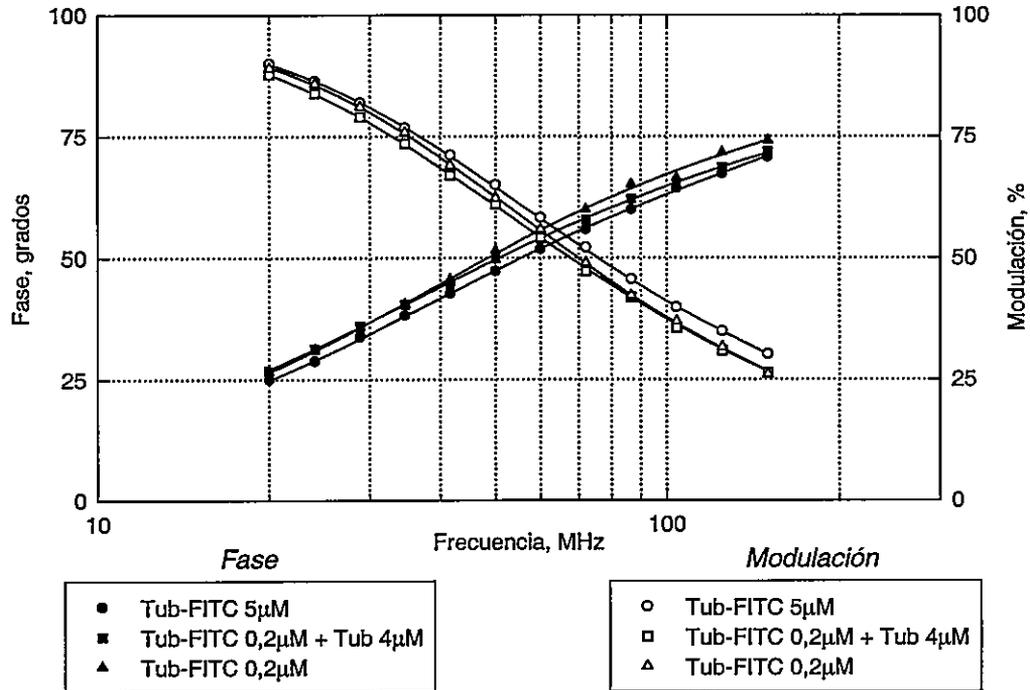


Figura 34. Gráficos de fase y modulación para la determinación de los tiempos de vida para FITC unido a tubulina, a alta, baja concentración y con tubulina intercambiada. Las concentraciones de proteína se indican en la figura. Las medidas se realizaron a 23°C.

Tabla I

	$\langle \tau \rangle$	τ_1	τ_2
Tubulina-FITC 5,0 μM	3,7 nseg	(90%) 4,0 nseg	(10%) 1,0 nseg
Tubulina-FITC 0,2 μM + Tubulina 4 μM	4,2 nseg	(84%) 4,6 nseg	(16%) 1,9 nseg
Tubulina-FITC 0,2 μM	3,9 nseg	(98%) 4,0 nseg	(2%) 0,7 nseg

Medidas de tiempos de vida para FITC unido a tubulina, en estado dimérico, intercambiada y disociada. Las medidas se realizaron utilizando el método de fase y modulación. Se muestra $\langle \tau \rangle$, tiempo de vida promedio y τ_1 y τ_2 representan los componentes. Entre paréntesis se indica la contribución de cada componente al total de tiempo de vida. Las medidas se realizaron a 23°C.

Tabla II

	P	Ø
Tubulina-FITC 5,0 µM	0,24	3,25 nseg
Tubulina-FITC 0,2 µM + Tubulina 4 µM	0,33	7,30 nseg
Tubulina-FITC 0,2 µM	0,08	0,57 nseg
Dímero deTubulina, valores esperados teóricamente	0,43	35,10 nseg
Monómero deTubulina, , valores esperados teóricamente	0,39	17,50 nseg

Tiempos de correlación rotacional de los derivados de Tubulina-FITC. Los valores experimentales y teóricos fueron calculados utilizando las ecuaciones descritas en Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio, donde se ha caracterizado la reacción de desnaturación y renaturación, aportan información relevante al campo de la estructura de la tubulina. Aunque la tubulina renaturada no sea funcional, utilizando las pruebas convencionales (i.e, unión de colchicina). Estos resultados aportan información valiosa acerca de los intermediarios que son generados en la reacción de renaturación *in vitro*, pues ellos tienen la capacidad de formar oligómeros de alto tamaño molecular, similares a los encontrados en la tubulina envejecida. Estos resultados permiten explicar la inestabilidad de la proteína como heterodímero y su aumento de estabilidad cuando está en estado agregado, ya sea como microtúbulo u hojas producidas por zinc. Cabe destacar que la actina, proteína que también participa en la organización del citoesqueleto celular, no es posible de renaturar a su estado nativo *in vitro*. Sin embargo es posible obtener información de los estados intermedios de plegamiento a partir de estudios de desnaturación *in vitro* (Turoverov y col., 1999).

Los resultados, en su conjunto, muestran que la estructura terciaria responsable del entorno de los triptofanos se mantiene, al igual que el contenido de estructura secundaria. Sin embargo, la funcionalidad se pierde, lo que se puede explicar ya sea por una incorrecta asociación monómero-monómero o porque las superficies de interacción longitudinal o lateral del monómero han cambiado. Para dilucidar ésto, es necesario conocer que ocurre con la asociación/disociación en el heterodímero nativo. Desafortunadamente, en la literatura hay controversia respecto a los valores termodinámicos para la asociación del heterodímero. Por lo tanto, se caracterizó el

intercambio de los monómeros de la tubulina, lo que permitió determinar los parámetros termodinámicos de la unión de los monómeros y la cinética de la interacción entre la α y β tubulina. Además, se determinó que los monómeros disociados sufren el fenómeno de deriva conformacional, lo que complementa la información acerca de la inestabilidad del heterodímero.

El aumento de la presión hidrostática sobre el heterodímero o sobre los monómeros mostró que la tubulina presenta un comportamiento diferente a muchas de las proteínas, pues la presión induce la asociación de los monómeros, lo que indica un volumen mayor de los monómeros en el estado disociado y confirma los resultados de disociación que muestran la deriva conformacional de los monómeros.

Estudios de desnaturación y renaturación

La interacción de la tubulina con agentes caotrópicos a bajas concentraciones ha sido estudiada previamente (Sackett y col., 1994; Wolff y col., 1996). Se encontró que bajas concentraciones de urea poseen un efecto inhibitorio sobre la polimerización de la tubulina en microtúbulos lo que fue explicado por desplegamiento local de algunos dominios en el heterodímero, mientras que bajas concentraciones de GdmCl inducen un aumento en la velocidad y duración de la polimerización de la tubulina en los microtúbulos. Este efecto paradójico fue explicado por un apantallamiento de las cargas y cambios en los puentes de hidrógenos en la región C-terminal de la proteína (Wolff y col., 1996). Estudios de desplegamiento completo de la tubulina con urea (Guha y Bhattacharyya, 1995), muestran que el desplegamiento sigue un proceso bifásico, que sugiere la existencia de un intermediario del tipo "glóbulo fundido" que es estable a concentraciones menores a 2 M Urea. Los mismos autores intentaron replegar sin éxito la tubulina a partir de la proteína completamente desnaturada con urea (Guha y

Bhattacharyya, 1997). Sin embargo, cuando se intentó replegar tubulina parcialmente desplegada a concentraciones de Urea menores a 1,2 M, se obtuvo una proteína capaz de unir colchicina. Estos resultados fueron interpretados como el atrapamiento de un intermediario. Este se hace irreversible a concentraciones de urea mayores que 1,2 M y al bajar la concentración del agente desnaturante no sería capaz de alcanzar el estado nativo funcional.

Nuestros resultados de fluorescencia y dicroísmo circular muestran que la tubulina completamente desnaturada en GdmCl, al renaturarla por el método de dilución rápida, es capaz de recuperar más del 95% de las propiedades espectroscópicas de la proteína nativa y mantiene su solubilidad. Además, la unión del colorante fluorescente ANS se recupera en aproximadamente 80%. Al analizar los resultados de la renaturación de la estructura secundaria por medio de experimentos de dicroísmo circular, y de estructura terciaria por fluorescencia intrínseca, se encontró que en el intervalo de concentraciones entre 1 y 2 M GdmCl, el contenido de estructura secundaria era mucho mayor que la cantidad remanente de estructura terciaria, estos resultados sugieren que se forma un intermediario con las características de un "glóbulo fundido" (Ptitsyn, 1992) o se producen múltiples formas, entre las cuales están los monómeros disociados y el probable glóbulo fundido.

Los experimentos de renaturación por filtración rápida, mostraron que la tubulina es capaz de formar monómeros en forma muy rápida los que se asocian en un dímero que posee la misma composición del heterodímero α - y β -tubulina nativo. El heterodímero formado es capaz de autoasociarse para producir agregados discretos de mayor tamaño molecular. Los polímeros formados son el producto de la asociación de la especie dimérica, pues, las otras especies resueltas por la columna son múltiplos de su masa

molecular. La tubulina en estado nativo es *per se* una proteína con una tendencia intrínseca a la agregación y capaz de formar un gran conjunto de tipos de agregados polimórficos, dependiendo del efecto de metales, solventes y drogas antimitóticas. Por ejemplo, la tubulina forma anillos a altas concentraciones de magnesio y terbio (Frigon y Timasheff, 1975; Monasterio y col., 1993), en presencia de zinc la tubulina forma hojas de protofilamentos antiparalelos agregados lateralmente (Gaskin y col., 1976; Larsson y col., 1976). La droga antimitótica colchicina induce la formación de agregados de alto peso molecular donde la tubulina mantiene intacta su estructura secundaria (Andreu y Timasheff, 1982a; Andreu y Timasheff, 1982b). En presencia de vinblastina se forman polímeros en forma de espiral que se autoasocian en agregados de alto peso molecular, a través, de un mecanismo isodésmico (Lobert y col., 1996). El proceso de autoasociación observado en nuestro ensayo de renaturación rápida, es un proceso dependiente de la concentración de proteína, que es fuertemente favorecido por la temperatura y que es explicada por la energía de activación encontrada de 11,3 Kcal/mol. Estos resultados, tomados como un todo, sugieren que el producto más estable del replegamiento de la tubulina son los agregados de más alto tamaño molecular (especie excluida de la columna). La agregación del heterodímero para formar los polímeros fue irreversible en todas las condiciones ensayadas, por lo que no fue posible formar microtúbulos con el heterodímero renaturado, aunque este posee una estructura secundaria y terciaria similar a la del heterodímero nativo. Con estos resultados se puede postular un mecanismo mínimo para la renaturación del heterodímero de la tubulina *in vitro*, donde las etapas de la formación de la estructura secundaria y terciaria para los monómeros y su asociación en dímeros son mucho más rápidas que la asociación de los dímeros en oligómeros (Fig. 35). La imposibilidad de

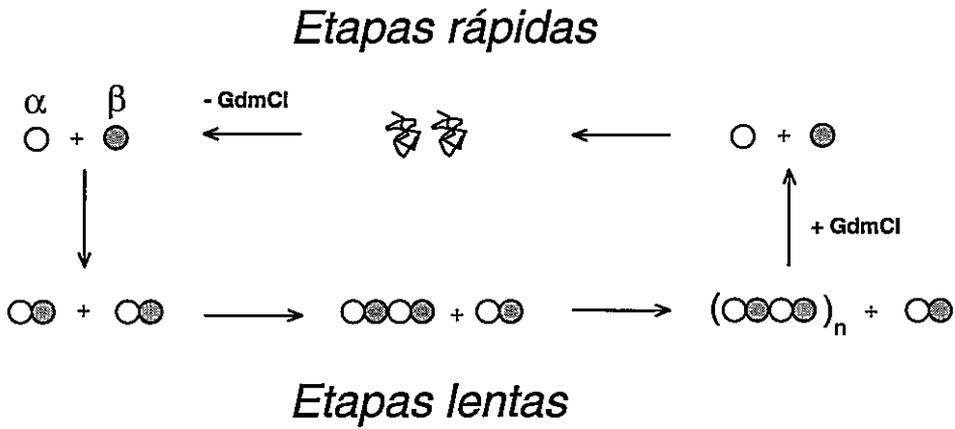


Figura 35. Mecanismo mínimo para la renaturación de la tubulina *in vitro*.

obtener tubulina funcional a partir de proteína completamente desplegada, podría ser explicada considerando el gran caudal de información que se ha obtenido en los estudios de plegamiento *in vivo*, donde los monómeros desde su síntesis en el ribosoma, son mantenidos separados por medio de cofactores de plegamiento hasta que estos se ensamblan como heterodímeros en el microtúbulo. Posiblemente el ambiente celular, en donde el heterodímero de la tubulina se ensambla, estabiliza la formación de estos por la unión a otras proteínas, hasta que es requerido para formar el microtúbulo (Bhamidipati y col., 2000; Cowan y Lewis, 1999; Tian y col., 1997) (ver figura 2).

Se ha postulado que el residuo glutámico 254 de la α -tubulina es esencial para estimular la actividad GTPásica una vez que el heterodímero se asocia al microtúbulo durante su elongación (Nogales y col., 1999). La interacción de este residuo en el sitio del GTP, con la asparragina 101 es de tipo electroestático, con una contribución de al menos 3 Kcal/mol para la estabilización de la unión longitudinal en el protofilamento. Postulamos que otro papel para este residuo sería localizar de manera correcta la interacción entre los dímeros para constituir el protofilamento, generando así los sitios de interacción lateral que principalmente conducirían a la formación del microtúbulo. Esta hipótesis se basa en lo siguiente: 1) La tubulina renaturada aunque posee casi toda la estructura secundaria y terciaria del heterodímero nativo no es capaz de formar microtúbulos. 2) El sitio de GTP no es funcional en el heterodímero renaturado. Esto sugiere que es probable que se formen protofilamentos no funcionales de distinto largo, los cuales son incapaces de formar anillos y microtúbulos. Resultados de microscopía electrónica de los oligómeros después de la renaturación refuerzan esta idea (resultados no mostrados). Por otro lado, la formación de protofilamentos, donde solo existen

interacciones de tipo longitudinal. En este caso las interacciones de tipo lateral serían tan débiles que impedirían el crecimiento lateral del protofilamento aunque éste es el que termodinámicamente sería más favorecido en la polimerización de la tubulina nativa. Pensamos que la β -tubulina es responsable del mal plegamiento. Resultados no publicados del Laboratorio de Biología Estructural y Molecular (D. Loayza, Tesis de pregrado) muestran que las estabilidades relativas a GdmCl son α -tubulina > heterodímero > β -tubulina.

La inestabilidad intrínseca de los dímeros de tubulina purificados, también conocida como envejecimiento, ha sido objeto de muchos estudios y siempre el envejecimiento de la proteína ha sido relacionada con el aumento de los estados de autoasociación, principalmente agregados amorfos (Lee y col., 1978; Prakash y Timasheff, 1982; Prakash y Timasheff, 1992a; Prakash y Timasheff, 1992b). En nuestros estudios, al comparar la tubulina envejecida a pH neutro por 24 h a 4 °C con el patrón de especies producidas en el ensayo de replegamiento por filtración molecular, se puede apreciar un alto grado de similitud en cuanto a la calidad y cantidad de agregados, lo que podría indicar que el estado de más baja energía para la conformación de la tubulina es la especie envejecida, lo que junto a los estudios de plegamiento *in vivo*, sugieren que los heterodímeros purificados de la tubulina podrían ser considerados, más un intermediario de plegamiento que un estado nativo estable. Quizá podría sugerirse que el verdadero estado nativo de la tubulina es el heterodímero incorporado al microtúbulo, donde se mantiene estable por largos períodos de almacenamiento. Este nuevo concepto es muy interesante, pues por un lado se tiene a la proteína estable mientras cumple su función y por otro lado, si permanece sin polimerizar su conformación cambiaría, haciéndola no funcional y susceptible al sistema de proteasas para su recambio. Este podría ser otro

mecanismo de regulación de la concentración de tubulina intracelular que sería complementario al mecanismo propuesto por Cleveland (Cleveland y col., 1983), en que al despolimerizar microtúbulos en cultivos celulares, utilizando drogas atimitóticas, los niveles de los mRNA disminuyen dramáticamente, evitando así la acumulación de los monómeros en el citoplasma.

Dinámica de la interacción entre la α y β tubulina.

Conocer lo que ocurre después de que se forman los monómeros es esencial para entender a nivel molecular el mecanismo de plegamiento y formación del heterodímero. En la literatura se encuentran varios estudios respecto a la disociación del heterodímero de la tubulina, sin embargo hay pequeñas discrepancias entre ellos en cuanto a sus parámetros termodinámicos. La mayoría de los estudios realizados para evaluar la interacción de las subunidades de la tubulina se han centrado en la medición de la constante de disociación del heterodímero (Detrich y Williams, 1978; Mejillano y Himes, 1989; Panda y col., 1992; Sackett y col., 1989). Los valores medidos oscilan entre $1,5 \times 10^{-7}$ M y $8,4 \times 10^{-7}$ M. También, se ha demostrado que la constante de disociación es influenciada por la unión del catión Mg^{2+} (Shearwin y col., 1994).

Por esto, consideramos necesario hacer un estudio mas riguroso donde se tomaran en cuenta la diferencia en estabilidad de la α - y β -tubulina que podría ser responsable de alguna variación en la constante de interacción entre los monómeros. Este punto ha sido largamente discutido por Weber, quien utilizó el concepto de deriva conformacional, el que ha explicado muchas discrepancias en los parámetros de asociación de proteínas multiméricas (Weber, 1986).

En éste estudio, se analizó la cinética del intercambio de los monómeros de la tubulina, y se encontró que el intercambio de estos es independiente de la concentración total de

dímeros, por lo tanto es principalmente dirigido por su disociación. Se determinó que la disociación de los monómeros posee una fuerte dependencia de la temperatura, con una energía de activación de 20 Kcal/mol y que los monómeros de la tubulina a bajas concentraciones tienen un alto grado de relajación conformacional, lo que sugiere que en el estado disociado, estos no poseen la misma conformación que en el heterodímero, lo que ha sido caracterizado en otras proteínas como el fenómeno de deriva conformacional (Weber, 1986). En estudios previos, realizados utilizando la expresión de la β -tubulina en lisados de reticulocitos (Yaffe y col., 1989), también se encontró un proceso de intercambio independiente de la concentración, con una barrera de energía de activación de 22,5 Kcal/mol, similar a la informada en este estudio. Sin embargo, los autores interpretaron la independencia de la concentración del intercambio como una contribución producida por un cambio conformacional durante el proceso de traducción. Nuestros estudios sugieren que la etapa limitante del proceso de intercambio está fundamentalmente dirigida por el proceso de deriva conformacional inducido por la disociación (figura 36). Esta deriva conformacional en la célula estaría impedida por las interacciones de los monómeros con otras proteínas que actúan como chaperonas durante el plegamiento de la tubulina (Cowan y Lewis, 1999) (ver Fig. 2).

Efecto de la presión hidrostática sobre la conformación de la tubulina

Para evitar el efecto de la deriva conformacional producida por la dilución y disociación del heterodímero, se empleó el aumento de la presión hidrostática que ha sido utilizado para disociar proteínas multiméricas y que presenta ventajas comparativas con respecto a otros métodos utilizados para medir estabilidad de las proteínas.

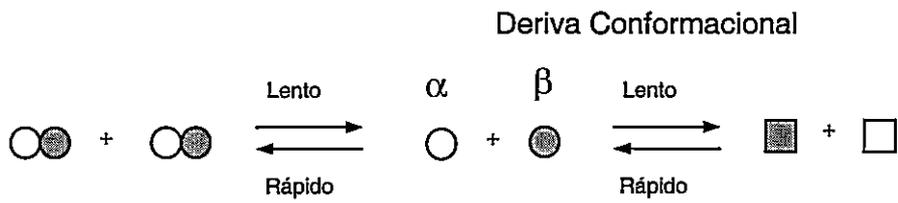


Figura 36. Mecanismo para el intercambio de los monómeros de la tubulina.

El principal método utilizado para medir las propiedades termodinámicas de la estabilidad de las proteínas ha sido la observación de alguna propiedad en función de un cambio en la temperatura. Sin embargo, un método menos difundido que ofrece ventajas sobre los efectos de la temperatura, es la medición de propiedades que reflejan la integridad estructural de una proteína en función del cambio de presión hidrostática. Cuando se realizan mediciones variando la temperatura se producen cambios tanto en el contenido de energía del sistema como en el volumen del sistema. Esto tiene una gran desventaja cuando se trabaja con proteínas, que son polímeros flexibles que tienen estructura, secundaria, terciaria y cuaternaria, que son estabilizadas por enlaces cuyas energías no son mucho mayores que la energía térmica suministrada. Así, el efecto de la temperatura produce efectos sobre la estructura interna de las proteínas que no son fácilmente controlables. Por otra parte, la aplicación de presión sobre una proteína afecta las interacciones internas solo por cambio en las distancias de las interacciones (volumen), mientras la energía total del sistema permanece casi constante (Silva y Weber, 1993).

Las técnicas de aumento de presión hidrostática han sido fundamentalmente utilizadas para estudiar la energética de las interacciones entre proteínas oligoméricas (Paladini y Weber, 1981a; Royer y col., 1986; Ruan y Weber, 1988; Ruan y Weber, 1993). Esto se debe a que un aumento de la presión induce al sistema a disminuir el volumen que ocupan sus componentes al disociarse. En el caso de las proteínas oligoméricas un aumento en la presión hidrostática induce en la mayoría de los casos la disociación, pues el sistema busca el menor volumen y éste en la mayoría de los casos se encuentra en el oligómero disociado.

Los únicos estudios previos de efecto de la presión sobre la tubulina han sido realizados con microtúbulos (Engelborghs y col., 1976; Salmon, 1975), e indican que la presión en un intervalo que va de 13 a 680 bar disocia los microtúbulos en forma reversible. El segundo estudio demostró que al incrementar la temperatura el efecto de la presión disminuye y que a 37°C y 700 bar no existe efecto disociador de la presión. Sin embargo, en la época en que fueron realizados estos experimentos, las celdas para altas presiones (> a 2000 bar) aún no eran ampliamente conocidas.

Nuestros estudios pretendían determinar los parámetros involucrados en la disociación de las interfaces de los monómeros del heterodímero de la tubulina. Sin embargo, se encontró que la tubulina en el estado dimérico no se disocia con el aumento de la presión. Al observar el cambio en las propiedades de la fluorescencia intrínseca, cuando se varía la presión solo ocurren cambios independientes de la concentración de proteína, lo que indica que la tubulina a las presiones estudiadas, presentaba un proceso de desnaturación parcial. Esto no es habitual, pues para denaturar una proteína, las presiones utilizadas superan los 7.000 bar, lo que sugiere que la tubulina en su estado nativo posee un bajo nivel de compactación estructural. Con estos estudios solo pudimos determinar un cambio de volumen de 40 mL/mol de dímero. Corroboramos estos resultados utilizando proteína marcada con FITC. Más aún, cuando se utilizó proteína a baja concentración, parcialmente disociada se observó un aumento en el grado de asociación, lo que indica que en el heterodímero en estado asociado los monómeros poseen conformaciones más compactas que en el estado monomérico. Esto es compatible con el efecto de deriva conformacional encontrado en los experimentos de intercambio. Además, las determinaciones de los tiempos de vida confirman que los efectos observados en las medidas de polarización tienen como

principal origen los cambios generales de la proteína, como intercambio y deriva conformacional.

Los estudios aquí presentados de desnaturación y renaturación de la tubulina, indican que la tubulina es una proteína cuya inestabilidad principalmente está dada por cambios generales en la estructura, muy pequeños y que caen dentro del error experimental de las técnicas utilizadas. Estos pequeños cambios en conformación posiblemente son los responsables de la pérdida de las interacciones que conducen a la formación del microtúbulo y lleva a la formación de los oligómeros discretos. Esto se ve respaldado por los estudios de replegamiento por dilución rápida y renaturación por filtración molecular rápida. Los resultados también indican que la formación del heterodímero es muy rápida y que es el precursor de la formación de los agregados de mayor orden, lo cual es consistente con los estudios de replegamiento *in vivo* en que los monómeros de tubulina solo son liberados cuando están en la forma GTP y listos para formar el heterodímero que ensambla en microtúbulos. La protección de la estructura de los monómeros mediante chaperonas hasta la formación del heterodímero se ve justificada por el envejecimiento del heterodímero, lo que muestra un comportamiento similar al encontrado en los experimentos de renaturación por filtración molecular rápida.

Los resultados de intercambio de monómeros marcados con FITC permitieron medir la barrera de energía de activación para el proceso de disociación y además, se pudo medir directamente la velocidad de disociación y que los monómeros sufren deriva conformacional.

Los estudios de presión hidrostática permitieron confirmar que el volumen del heterodímero es menor que el de las especies disociadas, y muestra que los monómeros

en el estado disociado poseen una conformación más relajada y de mayor volumen que cuando son parte del heterodímero.

Estos resultados sugieren que la estructura de la tubulina es una estructura altamente dinámica y flexible, lo que complementa la visión estática producida por la reciente resolución de la estructura tridimensional (Nogales y col., 1998). Posiblemente la estructura de la tubulina resuelta utilizando hojas inducidas por zinc es solo uno de los posibles conformeros de la tubulina.

CONCLUSIONES

- La tubulina de acuerdo a los parámetros espectroscópicos estudiados se renatura en un proceso reversible, en que los productos no son capaces de ensamblarse en microtúbulos ordenados.
- La reacción de plegamiento de la tubulina involucra al menos la participación de un intermediario tipo globulo fundido.
- La tubulina se renatura formando especies intermediarias oligoméricas que poseen como precursor al dímero.
- En el replegamiento, la formación de la estructura secundaria y terciaria es mucho más rápida que la formación de las especies oligoméricas.
- Las especies observadas por filtración rápida poseen características similares a las de la tubulina nativa envejecida por 24 horas a 4°C.
- La etapa limitante en el intercambio de las subunidades de la tubulina es la disociación del dímero, y éste proceso tiene una barrera de energía de activación de 20 kcal/mol.
- La presión hidroestática induce la asociación de las subunidades parcialmente disociadas de la tubulina.

BIBLIOGRAFÍA

- Agashe, V. R., y Hartl, F. U. 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding, *Semin Cell Dev Biol* **11**: 15-25.
- Amos, L. A. 1979. Structure of microtubules. in microtubules, K. Roberts, y J. S. Hyams, eds. (New York, Academic Press), pp. 1-64.
- Andreu, J. M., Bordas, J., Diaz, J. F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F. J., Nogales, E., Pantos, E., y Towns-Andrews, E. 1992. Low resolution structure of microtubules in solution. synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol and map-induced microtubules, *Journal of Molecular Biology* **226**: 169-184.
- Andreu, J. M., y Timasheff, S. N. 1982a. Conformational states of tubulin liganded to colchicine, tropolone methyl ether, and podophyllotoxin, *Biochemistry* **21**: 6465-6476.
- Andreu, J. M., y Timasheff, S. N. 1982b. Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 6753-6756.
- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains, *Science* **181**: 223-230.
- Arai, T., Ihara, Y., Arai, K., y Kaziro, Y. 1975. Purification of tubulin from bovine brain and its interaction with guanine nucleotides, *Journal of Biochemistry* **77**: 647-658.
- Bhamidipati, A., Lewis, S. A., y Cowan, N. J. 2000. ADP Ribosylation factor-like Protein 2 (Arl2) regulates the interaction of Tubulin-Folding Cofactor D with native Tubulin, *J Cell Biol* **149**: 1087-1096.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Carlier, M. F. 1991. Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly, *Curr Opin Cell Biol* **3**, 12-17.
- Cleveland, D. W., Pittenger, M. F., y Feramisco, J. R. 1983. Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis, *Nature* **305**: 738-740.
- Cowan, N. J., y Lewis, S. A. 1999. A chaperone with a hydrophilic surface, *Nat Struct Biol* **6**: 990-991.
- Creighton, T. E., ed. 1992. *Protein folding* (New York, W. H. Freeman and Company).
- da Poian, A. T., Oliveira, A. C., y Silva, J. L. 1995. Cold denaturation of an icosahedral virus. The role of entropy in virus assembly, *Biochemistry* **34**: 2672-2677.
- Detrich, H. W. d., y Williams, R. C. 1978. Reversible dissociation of the alpha beta dimer of tubulin from bovine brain, *Biochemistry* **17**: 3900-3907.
- Ellis, R. J., y Hartl, F. U. 1996. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function, *Faseb J* **10**: 20-26.
- Ellis, R. J., y Hartl, F. U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment, *Curr Opin Struct Biol* **9**: 102-110.
- Engelborghs, Y., Heremans, K. A., De Maeyer, L. C., y Hoebeke, J. 1976. Effect of temperature and pressure on polymerisation equilibrium of neuronal microtubules, *Nature* **259**: 686-689.

- Erickson, H. P. 1998. Atomic structures of tubulin and Ftsz, *Trends Cell Biol* **8**: 133-137.
- Erickson, H. P., y O'Brien, E. T. 1992. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 145-166.
- Erijman, L., y Weber, G. 1993. Use of sensitized fluorescence for the study of the exchange of subunits in protein aggregates, *Photochem Photobiol* **57**: 411-415.
- Frigon, R. P., y Timasheff, S. N. 1975. Magnesium-induced self-association of calf brain tubulin. I. stoichiometry, *Biochemistry* **14**: 4559-4566.
- Gaskin, F., Cantor, C. R., y Shelanski, M. 1974. Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules, *J Mol Biol* **89**: 737-758.
- Gaskin, F., Gethner, J. S., y Kress, Y. 1976. The characterization of tubulin preparations using laser light scattering and tubulin assembly in the presence of zinc ions. pp. 179-90, En: Perry SV, et al, ed. *Contractile systems in non muscle tissues* Amsterdam, North Holland Publ **647**.
- Gething, M. J. 1997. Protein folding. The difference with prokaryotes, *Nature* **388**: 329, 331.
- Gross, M., y Jaenicke, R. 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes, *Eur J Biochem* **221**: 617-630.
- Guha, S., y Bhattacharyya, B. 1995. A partially folded intermediate during tubulin unfolding: its detection and spectroscopic characterization, *Biochemistry* **34**: 6925-6931.
- Guha, S., y Bhattacharyya, B. 1997. Refolding of urea-denatured tubulin: recovery of natively like structure and cochicine binding activity from partly unfolded states, *Biochemistry* **36**: 13208-13213.
- Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature* **381**: 571-579.
- Hartl, F. U., y Martin, J. 1995. Molecular chaperones in cellular protein folding, *Curr Opin Struct Biol* **5**: 92-102.
- Howard, W. D., y Timasheff, S. N. 1986. GDP state of tubulin: stabilization of double rings, *Biochemistry* **25**: 8292-8300.
- Jayaram, B., y Haley, B. E. 1994. Identification of Peptides within the Base Binding Domains of the Gtp- and ATP-Specific Binding Sites of Tubulin, *Journal of Biological Chemistry* **269**: 3233-3242.
- Jimenez, M. A., Evangelio, J. A., Aranda, C., Lopez-Brauet, A., Andreu, D., Rico, M., Lagos, R., Andreu, J. M., y Monasterio, O. 1999. Helicity of alpha(404-451) and beta(394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides, *Protein Sci* **8**: 788-799.
- Larsson, H., Wallin, M., y Edstrom, A. 1976. Induction of a sheet polymer of tubulin by Zn^{2+} , *Exp Cell Res* **100**: 104-110.
- Lee, G. 1993. Non-motor microtubule-associated proteins, *Curr Opin Cell Biol* **5**: 88-94.
- Lee, J. C., Corfman, D., Frigon, R. P., y Timasheff, S. N. 1978. Conformational study of calf brain tubulin, *Archives of Biochemistry & Biophysics* **185**: 4-14.
- Lee, J. C., y Timasheff, S. N. 1975. The Reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin, *Biochemistry* **14**: 5183-5187.

- Linse, K., y Mandelkow, E. M. 1988. The GTP-binding peptide of beta-tubulin. Localization by direct photoaffinity labeling and comparison with nucleotide-binding proteins, *Journal of Biological Chemistry* **263**: 15205-15210.
- Little, P. 1999. The book of genes, *Nature* **402**: 467-468.
- Lobert, S., Vulevic, B., y Correia, J. J. 1996. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine, *Biochemistry* **35**: 6806-6814.
- Luduena, R. F., Shooter, E. M., y Wilson, L. 1977. Structure of the tubulin dimer, *Journal of Biological Chemistry* **252**: 7006-7014.
- Maccioni, R., y Seeds, N. W. 1977. Stoichiometry of GTP hydrolysis and tubulin polymerization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 462-466.
- McKay, R. H., y Jameson, D. M. 1991. Fluorescence investigation on mitochondrial malate dehydrogenase subunit interactions, *Biophys J* **59**: 204A.
- Mejillano, M. R., Barton, J. S., Nath, J. P., y Himes, R. H. 1990. GTP analogues interact with the tubulin exchangeable site during assembly and upon binding, *Biochemistry* **29**: 1208-1216.
- Mejillano, M. R., y Himes, R. H. 1989. Tubulin dimer dissociation detected by fluorescence anisotropy, *Biochemistry* **28**: 6518-6524.
- Melki, R., Carlier, M. F., Pantaloni, D., y Timasheff, S. N. 1989. Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies, *Biochemistry* **28**: 9143-9152.
- Monasterio, O. 1987. 19f Nuclear magnetic resonance measurement of the distance between the E-site GTP and the high-affinity Mg^{2+} in tubulin, *Biochemistry* **26**: 6099-6106.
- Monasterio, O., Acoria, M., Diaz, M. A., y Lagos, R. 1993. The binding of terbium ions to tubulin induces ring formation, *Archives of Biochemistry & Biophysics* **300**: 582-587.
- Monasterio, O., Andreu, J. M., y Lagos, R. 1995. Tubulin structure and function, *Comments on Molecular and Cellular Biophysics* **8**: 273-306.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., y Downing, K. H. 1999. High-resolution model of the microtubule, *Cell* **96**: 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S. G., y Downing, K. H. 1998. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography, *Nature* **391**: 199-203.
- O'Brien, E., y Erickson, H. P. 1989. Assembly of pure tubulin in the absence of free GTP: effect of magnesium, glycerol, ATP, and the nonhydrolyzable GTP analogues, *Biochemistry* **28**: 1413-1422.
- Paladini, A. A., Jr., y Weber, G. 1981a. Pressure-induced reversible dissociation of enolase, *Biochemistry* **20**: 2587-2593.
- Paladini, A. A., y Weber, G. 1981b. Absolute Measurements of fluorescence polarization at high pressures, *Rev Sci Instrum* **52**: 419-427.
- Panda, D., Roy, S., y Bhattacharyya, B. 1992. Reversible dimer dissociation of tubulin S and tubulin detected by fluorescence anisotropy, *Biochemistry* **31**: 9709-9716.
- Pennisi, E. 2000. Breakthrough of the year: genomics comes of age, *Science* **290**: 2220-2221.
- Prakash, V., y Timasheff, S. N. 1982. Aging of tubulin at neutral pH, *Journal of Molecular Biology* **160**: 499-515.

- Prakash, V., y Timasheff, S. N. 1992a. Aging of tubulin at neutral pH: stabilization by colchicine and its analogues, *Archives of Biochemistry & Biophysics* **295**: 146-152.
- Prakash, V., y Timasheff, S. N. 1992b. Aging of tubulin at neutral pH: the destabilizing effect of vinca alkaloids, *Archives of Biochemistry & Biophysics* **295**: 137-145.
- Ptitsyn, O. B. 1992. The molten globule state. in *Protein folding*, T. E. Creighton, ed. (New York, W.H. Freeman and Company), pp. 243-300.
- Roberts, K., y Hyams, J. S., eds. 1979. *Microtubules* (New York, Academic Press).
- Royer, C. A., Weber, G., Daly, T. J., y Matthews, K. S. 1986. Dissociation of the lactose repressor protein tetramer using high hydrostatic pressure, *Biochemistry* **25**: 8308-8315.
- Ruan, K., y Weber, G. 1988. Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure, *Biochemistry* **27**: 3295-3301.
- Ruan, K., y Weber, G. 1993. Physical heterogeneity of muscle glycogen phosphorylase revealed by hydrostatic pressure dissociation, *Biochemistry* **32**: 6295-6301.
- Sackett, D. L., Bhattacharyya, B., y Wolff, J. 1994. Local unfolding and the stepwise loss of the functional properties of tubulin, *Biochemistry* **33**: 12868-12878.
- Sackett, D. L., Zimmerman, D. A., y Wolff, J. 1989. Tubulin dimer dissociation and proteolytic accessibility, *Biochemistry* **28**: 2662-2667.
- Salmon, E. D. 1975. Pressure-induced depolymerization of brain microtubules *in vitro*, *Science* **189**: 884-886.
- Sanchez, R., Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Mirkovic, N., y Sali, A. 2000. Protein structure modeling for structural genomics, *Nat Struct Biol* **7**: 986-990.
- Sanchez, R., y Sali, A. 2000. Comparative protein structure modeling. introduction and practical examples with Modeller, *Methods Mol Biol* **143**: 97-129.
- Serrano, L., de la Torre, J., Maccioni, R. B., y Avila, J. 1984. Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 5989-5993.
- Shearwin, K. E., Perez-Ramirez, B., y Timasheff, S. N. 1994. Linkages between the dissociation of alpha beta tubulin into subunits and ligand binding: the ground state of tubulin is the GDP conformation, *Biochemistry* **33**: 885-893.
- Shivanna, B. D., Mejillano, M. R., Williams, T. D., y Himes, R. H. 1993. Exchangeable GTP binding site of beta-tubulin. identification of cysteine 12 as the major site of cross-linking by direct photoaffinity labeling, *Journal of Biological Chemistry* **268**: 127-132.
- Silva, J. L., Foguel, D., Da Poian, A. T., y Prevelige, P. E. 1996. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages, *Curr Opin Struct Biol* **6**: 166-175.
- Silva, J. L., y Weber, G. 1993. Pressure stability of proteins, *Annu Rev Phys Chem* **44**: 89-113.
- Spencer, R. D., y Weber, G. 1969. Measurement of subnanosecond fluorescence lifetime with a cross-correlation phase fluorometer, *Ann NY Acad Sci* **158**: 361-376.
- Tian, G., Lewis, S. A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C., y Cowan, N. J. 1997. Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors, *J Cell Biol* **138**: 821-832.

- Turoverov, K. K., Biktashev, A. G., Khaitlina, S. Y., y Kuznetsova, I. M. 1999. The structure and dynamics of partially folded actin, *Biochemistry* **38**: 6261-6269.
- Vale, R. D. 1987. Intracellular transport using microtubule-based motors, *Ann Rev Cell Biol* **3**: 347-378.
- Weber, G. 1986. Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. effects of dilution and of hydrostatic pressure, *Biochemistry* **25**: 3626-3631.
- Weber, G. 1992. Protein interactions (New York, Chapman and Hall).
- Weber, G., y Anderson, S. R. 1969. The effects of energy transfer and rotational diffusion upon the fluorescence polarization of macromolecules, *Biochemistry* **8**: 361-371.
- Weisenberg, R. C. 1972. Microtubule Formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations, *Science* **177**: 1104-1105.
- Weisenberg, R. C., Borisy, G. G., y Taylor, E. W. 1968. The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules, *Biochemistry* **7**: 4466-4479.
- Weisenberg, R. C., y Timasheff, S. N. 1970. Aggregation of microtubule subunit protein. Effects of divalent cations, colchicine and vinblastine, *Biochemistry* **9**: 4110-4116.
- Wolff, J., Knipling, L., y Sackett, D. L. 1996. Charge-shielding and the "paradoxical" stimulation of tubulin polymerization by guanidine hydrochloride, *Biochemistry* **35**: 5910-5920.
- Yaffe, M. B., Farr, G. W., y Sternlicht, H. 1989. Kinetics of beta-tubulin exchange following translation. evidence for a slow conformational change in beta-tubulin necessary for incorporation into heterodimers, *Journal of Biological Chemistry* **264**: 19045-19051.