

UCH-FC
DOC-BMCN
D872
C.1



**Análisis Estructural y Funcional de las Regiones
de Interacción de γ -tubulina en la Nucleación de
Microtúbulos y el Plegamiento Asistido por la
Chaperonina CCT**

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 Molecular, Celular y
Neurociencias**



Facultad de Ciencias
Por
Luis Alberto Pouchucq Marinkovic
Julio, 2009

Directores de Tesis:
Dr. Octavio Monasterio.
Dr. Juan Fernández.
Dr. Miguel Allende.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DOCTORADO**

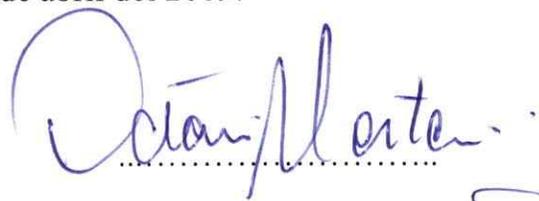
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de doctorado presentada por el candidato

LUIS ALBERTO POUCHUCQ MARINKOVIC

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de abril del 2009.

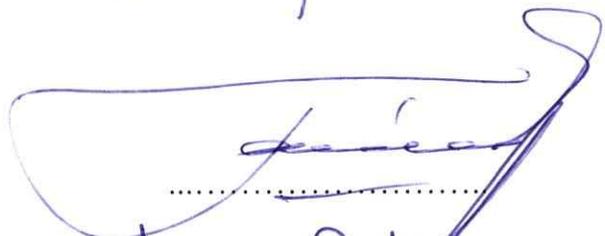
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Octavio Monasterio.

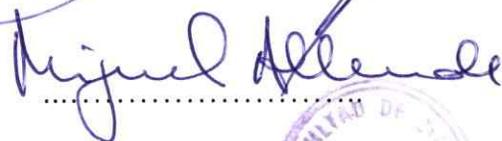


CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Juan Fernández.



Dr. Miguel Allende.



COMISION DE EVALUACION DE LA TESIS

Dr. Jorge Babul.



Dr. Emilio Cardemil



Dr. Mauricio González.





Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



A mis padres.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres les agradezco el cuidado con el que me fui forjando. El cariño y el calor del hogar donde crecí. Donde había mucho sin haber del todo. A mis hermanos y todos los que han hecho mi hogar, mi gratitud y mi cariño más sincero.

A mis amigos agradezco las ideas, el transitar por el mundo, el divagar, el apoyo y la comprensión. Dejando los pies en las calles o ahogándonos en un vaso de licor.

Les agradezco a mis profesores por todas sus enseñanzas, y en especial, a mis tutores que me han apoyado con su experiencia y con su empuje para llevar a cabo esta tarea.

Y un especial agradecimiento a quienes han trabajado conmigo en esto. A la gente del Laboratorio de Biología Estructural del CNB, el Dr. José María Valpuesta y el Dr. Jorge Cuellar, por su ayuda con la microscopía electrónica. A mis colegas del BEM y del CEM, a Ricardo Fuentes, a Gissela Araya y a José Pablo Castro por toda su ayuda y por las tantas horas agradables en el laboratorio.



INDICE.

1.	INTRODUCCION.	1
1.a.	La familia de las tubulinas.	3
1.b.	El heterodímero α/β tubulina, hidrólisis del GTP y la dinámica de polimerización de los microtúbulos.	6
1.c.	La estructura de los microtúbulos.	7
1.d.	La nucleación de microtúbulos.	8
1.e.	La γ -tubulina.	10
1.f.	El plegamiento de las tubulinas y la chaperonina CCT.	14
1.g.	La familia de las chaperoninas.	15
1.h.	Las interacciones proteína-proteína de las tubulinas.	17
2.	HIPOTESIS.	20
3.	OBJETIVO GENERAL.	20
4.	OBJETIVOS.	21
4.a.	Estudiar la expresión, localización celular y formación de complejos de γ -tubulina del embrión temprano del pez cebra.	21
4.b.	Generar mutantes puntuales en el “loop” T7 de γ -tubulina.	21
4.c.	Estudiar la interacción entre la chaperonina CCT y γ -tubulina recombinante.	22
4.d.	Estudiar la incorporación de γ -tubulina recombinante en los γ -TuRC del embrión temprano del pez cebra y el efecto de las mutaciones en la región del “Loop T7” sobre la funcionalidad de la γ -tubulina <i>in vivo</i>	22
5.	MATERIALES.	24
5.a.	Cepas Bacterianas.	24
5.b.	Plásmidos.	24



5.c.	Partidores.	24
5.d.	Anticuerpos.	25
5.e.	Medios de cultivo.	27
5.e.1.	Medio Luria-Bertani (LB).	27
5.e.2.	Medio NZY ⁺	27
5.f.	Soluciones.	27
5.g.	Reactivos.	29
6.	METODOLOGIAS.	31
6.a.	Purificación de γ -tubulina Recombinante.	31
6.b.	Ensayo de renaturación por dilución rápida en GdmHCl.	32
6.c.	Marcaje de tubulina recombinante.	33
6.d.	Ensayos de incorporación de γ -tubulina.	34
6.e.	Inmunofluorescencias.	36
6.f.	Extracción de complejos.	36
6.g.	Purificación de tubulina de cerebro de pollo.	37
6.h.	Ensayo de polimerización de microtúbulos.	38
6.i.	Purificación de CCT.	39
6.j.	Ensayo de interacción por geles.	40
6.k.	Microscopía electrónica de complejos CCT- γ -tubulina.	41
6.l.	Procesamiento de imágenes de microscopía electrónica.	42
6.m.	Mutaciones sitiodirigidas.	43
6.n.	Extracción de RNA de embriones tempranos del pez cebra.	45
6.o.	RT-PCR.	46
6.p.	Ensayos de sobreexpresión.	47
6.q.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	47
6.r.	Electroforesis en gel nativo.	48

6.s.	Preparación de células electrocompetentes y electroporación.	48
6.t.	Inmunoblots.	49
7.	RESULTADOS.	51
7.a.	Expresión de γ -tubulina en embriones tempranos del pez cebra.	51
7.b.	Distribución celular de γ -tubulina endógena en embriones tempranos del pez cebra.	61
7.c.	Los complejos de γ -tubulina y su actividad nucleadora en los embriones tempranos del pez cebra.	67
7.d.	Regiones de interacción de γ -tubulina.	73
7.e.	Interacción de γ -tubulina con la chaperonina CCT.	84
7.f.	Incorporación de γ -tubulina recombinante en los centrosomas de embriones tempranos del pez cebra.	91
7.g.	Importancia del "loop" T7 en la incorporación de γ -tubulina humana en el γ -TuRC y en su funcionalidad.	100
8.	DISCUSION.	109
8.a.	Expresión y silenciamiento de la γ -tubulina endógena en embriones tempranos del pez cebra.	110
8.b.	Interacción de la γ -tubulina con la chaperonina CCT.	114
8.c.	Relación entre la estructura y la función del "loop" T7 de γ -tubulina replegada en el citoplasma de embriones tempranos del pez cebra.	116
9.	BIBLIOGRAFIA.	124



LISTA DE TABLAS.



1. Títulos de los anticuerpos utilizados. 26

LISTA DE FIGURAS

1.	Representación esquemática de la estructura del heterodímero de α/β -tubulina.	5
2.	Representación esquemática del plasmido de sobreexpresión Pet11A- γ -tubulina.	50
3.	Expresión de γ -tubulina en embriones tempranos del pez cebra.	54
4.	Silenciamiento del gen de γ -tubulina en embriones del pez cebra mediante el uso de oligomorfolino antisentido.	58
5.	Inmunofluorescencias del citoesqueleto de microtúbulos, γ -tubulina y núcleo de células de embriones morfantes.	59
6.	Microscopía de fluorescencia de núcleos de embriones morfantes de 24 horas post fecundación.	60
7.	Inmunofluorescencias de células de embriones tempranos de pez cebra. ...	64
8.	Posibles cambios morfológicos del centrosoma durante el ciclo celular de embriones tempranos del pez cebra revelados con γ -tubulina como marcador.	66
9.	Fraccionamiento del extracto que contiene los complejos γ -TuRC de embriones tempranos del pez cebra por centrifugación en gradientes de densidad de glicerol.	71
10.	Nucleación de la polimerización <i>in vitro</i> de microtúbulos por γ -TuRC extraídos desde embriones tempranos del pez cebra.	72
11.	Modelo del homodímero de γ -tubulina.	79
12.	Alineamiento de secuencias entre γ -tubulina y β -tubulina humanas.	80
13.	Expresión de γ -tubulina tipo silvestre (WT), y de las mutantes M249E y T7 β	81
14.	Renaturación al equilibrio de γ -tubulina recombinante.	82
15.	Polimerización <i>in vitro</i> de microtúbulos en presencia de γ -tubulina recombinante renaturada al equilibrio y de un extracto de embrión temprano del pez cebra.	83
16.	Separación y cuantificación de la γ -tubulina unida a la chaperonina CCT. ..	88

17.	Micrografía electrónica de transmisión de complejos CCT- γ -tubulina WT y alineamiento de partículas mediante Xmipp_Mlalign2D.	89
18.	Imágenes promedio complejos CCT- γ -tubulina obtenidas por alineamiento con Xmipp_MLalign2D.	90
19.	Microscopía de fluorescencia y de campo claro de un embrión temprano del pez cebra inyectado con γ -tubulina recombinante marcada rodamina.	96
20.	Micrografías de microscopía de fluorescencia de embriones inyectados con γ -tubulina recombinante marcada con rodamina.	97
21.	Micrografía de fluorescencia de células de un embrión inyectado con γ -tubulina recombinante marcada con rodamina.	98
22.	Fraccionamiento de un extracto de embriones tempranos del pez cebra inyectados con γ -tubulina biotinilada.	99
23.	Microscopía de fluorescencia (E-G y L-N) y de campo claro (A-D y H-K) de embriones inyectados con γ -tubulina recombinante tipo silvestre (WT) y las mutantes M249E y T7 β marcadas con rodamina.	105
24.	Fraccionamiento de extractos de embriones tempranos del pez cebra inyectados con γ -tubulina WT y mutantes M249E y T7 β biotiniladas.	106
25.	Polimerización <i>in vitro</i> de microtúbulos de α/β -tubulina de cerebro de pollo en presencia de extractos de embriones tempranos del pez cebra inyectados con γ -tubulina recombinante WT y las mutantes M249E y T7 β	108
25.	Modelo de la secuencia de interacciones de γ -tubulina en el citoplasma de embriones tempranos del pez cebra.	122

ABREVIATURAS

ABS: Absorbancia

BSA: Albúmina sérica de bovino (Bovine sero albumin).

CCT: Chaperonin containing TCP-1

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: Dimetil sulfoxido

DNTP: Desoxinucleotido trifosfato (Desoxinucleotide triphosphate)

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético (enthilendiamin tetraacetic acid)

GdmHCl: Guanidinium hidrócloride

GCP: Proteína del complejo gama (Gamma complex protein)

GRIP: Proteína del complejo anillo gama (gamma ring protein)

GTP: Guanosin trifosfato (guanosine triphosphate)

HRP: peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)

IgG: Inmuno globulina G.

IPTG: Isopropil tiogalactósido

kb: Kilo base

LB: Luria Broth

MES: Acido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico

MTOC: Centro organizador de microtúbulos (Microtubule organizer center)

PBS: Amortiguado fosfato y sodio (phosphate buffer sodium)

PMG: Amortiguador fosfato magnesio GTP. (Phosphate magnesium GTP)

PMS: Amortiguador fosfato magnesio sacarosa (Phosphate magnesium sucrose)

PSMF: fenilmetano sulfonilfluoruro (phenylmethanesulphonylfluoride)

SDS: Dodecil sulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulphate)

TAMRA: Tetrametil rodamina (5-(and-6)-carboxytetramethylrhodamine)

TEN: Amortiguador TRIS EDTA NaCl

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

γ -TuRC: Complejo anillo de γ -tubulina (γ -tubulin ring complex)

γ -TuSC: Complejo pequeño de γ -tubulina (γ -tubulin ring complex)

RESUMEN.

La γ -tubulina es una proteína del centrosoma encargada de la nucleación de los microtúbulos. Interactúa con el heterodímero α/β -tubulina favoreciendo su polimerización. En el citoplasma se encuentra formando parte de complejos de 2MDa llamados γ -TuRC, en conjunto con un grupo de proteínas acompañantes conocidas como proteínas GRIP. Tanto la γ -tubulina como las proteínas GRIP son muy conservadas entre los organismos eucariontes. Los complejos γ -TuRC se ubican en la matriz pericentrosomal y el aparato de golgi de las células animales e interactúan con el extremo (-) de los microtúbulos durante su nucleación.

La γ -tubulina presenta una elevada similitud estructural con α y β -tubulina, sugiriendo que las superficies de interacción longitudinal y lateral están conservadas. En la superficie de interacción longitudinal del extremo (-) de α/β -tubulina se encuentra una región de la secuencia conocida como "LoopT7". Se ha visto que esta región está involucrada en el proceso de polimerización e hidrólisis de GTP en α/β -tubulina y en la proteína homóloga procarionte FtsZ. La hipótesis de esta tesis plantea que la región del "loop" T7 de γ -tubulina está involucrada directamente en la nucleación de microtúbulos y en la formación de los complejos γ -TuRC.

Existe muy poca información sobre los detalles estructurales de las interacciones que participan en la nucleación de microtúbulos. Esto último es consecuencia de la inestabilidad estructural intrínseca de las tubulinas, lo cual dificulta la obtención de proteína recombinante correctamente plegada y funcional para estudios bioquímicos. En el desarrollo de esta tesis se diseñó una metodología *ad-hoc* que permite hacer estudios con γ -tubulina recombinante. Esta consiste en la purificación de proteína de γ -tubulina humana producida en bacteria, la que es marcada con biotina o rodamina y microinyectada en el citoplasma de ovocitos del pez cebra (*Danio rerio*). Dentro del citoplasma del embrión la maquinaria citoplasmática se encarga de su plegamiento y su funcionalidad. Posteriormente se analiza mediante microscopía de fluorescencia y por métodos bioquímicos si la proteína microinyectada es incorporada al centrosoma y a los complejos γ -TuRC del embrión.

Con la finalidad de establecer qué aminoácidos del "loopT7" podrían ser

relevantes en la interacción longitudinal de γ -tubulina se utilizó la bioinformática. A partir de sus resultados se diseñaron dos proteínas mutantes en el "Loop" T7, la γ -tubulina M249E, en la cual se reemplazó un aminoácido hidrófobo por uno cargado y la γ -tubulina T7 β que posee parte de la secuencia del "loopT7" de β -tubulina. Estas proteínas se expresaron y purificaron como proteínas recombinantes en *E. coli*, se marcaron con una sonda fluorescente o bien con biotina y se microinyectaron en ovocitos del pez cebra. La localización de las proteínas recombinantes en los centrosomas de los embriones se determinó por microscopía de fluorescencia. De la misma forma se determinó la distribución celular de la γ -tubulina endógena por inmunofluorescencia. La incorporación de las proteínas recombinantes en los complejos γ -TuRC nativos en los embriones se determinó mediante fraccionamiento en gradientes de glicerol, revelando la presencia de la proteína marcada con biotina. También se determinó el efecto de las mutaciones en el "loop" T7 sobre la interacción de la γ -tubulina con la chaperonina CCT.

Los experimentos de incorporación al γ -TuRC demostraron que γ -tubulina humana recombinante es capaz de incorporarse en los centrosomas y en los complejos γ -TuRC de los blastómeros de embriones inyectados. Mediante la misma metodología se demostró que las mutaciones puntuales en el "loop"-T7 alteran la capacidad de γ -tubulina de incorporarse al γ -TuRC pero no su capacidad de interactuar con α/β -tubulina, sugiriendo que las interacciones longitudinales son importantes para mantener la integridad de los complejos γ -TuRC. Por otra parte, los ensayos de interacción con la chaperonina CCT demostraron que las tres proteínas recombinantes de γ -tubulina son capaces de interactuar con ella, sin embargo, las mutaciones en el "Loop" T7 inducen una disminución en la interacción, siendo mayor el efecto en la mutante M249E, lo que demuestra que la región del "Loop" T7 participa en la interacción de γ -tubulina con la chaperonina CCT.

ABSTRACT.

γ -tubulin is a protein responsible of centrosomal microtubule nucleation, that interacts with the α/β -tubulin heterodimer to promote its polymerization. Into the cytoplasm, γ -tubulin is found as part of 2MDa complex called γ -TuRC, also with an accompanying group of proteins known as GRIP proteins. Both, the γ -tubulin and the GRIP proteins are highly conserved among eukaryotic organisms. γ -TuRC complexes are located in the pericentrosomal matrix and golgi apparatus of animal cells and interact with the minus end of tubulin to induce microtubule nucleation.

γ -tubulin has a high structural similarity with α and β -tubulin, suggesting that the surfaces of longitudinal and lateral interactions are conserved. Within the longitudinal interaction area of the minus end of α/β -tubulin is found a sequence region known as T7 loop. It has been determine that this region is involved in the polymerization and GTP hydrolysis in α/β -tubulin and in the prokaryotic homolog of tubulin, FtsZ. The hypothesis of this thesis proposes that this region of γ -tubulin is directly involved in the microtubule nucleation or in the formation of γ -TuRC complexes.

There is little information about the structural details of the interactions involved in microtubule nucleation, due to the intrinsic structural instability of tubulins, which makes difficult to obtain correctly folded recombinant protein for functional and biochemical studies. During the development of this thesis an *ad-hoc* methodology was designed that allowed to make studies with recombinant γ -tubulin. This consisted in the purification of human γ -tubulin protein produced in bacteria, which was labeled with biotin or rhodamine and microinjected into the zebrafish (*Danio rerio*) oocytes cytoplasm, where the cytoplasmatic folding machinery was responsible of its functionality. Subsequently the incorporation of the labeled γ -tubulin into the centrosome and γ -TuRC of the embryo was analyzed by fluorescence microscopy and biochemical methods.

Bioinformatic methods were used in order to determine which amino acids of the T7 loop could be relevant for the γ -tubulin longitudinal interactions. The results allowed to design two mutants protein in the T7 loop, the M249E γ -tubulin mutant where methionine, a hydrophobic aminoacid was replaced by a charged aminoacid,

and the T7 β γ -tubulin, that contains part of the β -tubulin T7 loop sequence. The proteins was expressed and purified as recombinant proteins in *E. coli* and then microinjected into zebrafish embryos. The location of recombinant proteins into the centrosome was determined by fluorescence microscopy. In the same way we determined the cellular distribution of endogenous γ -tubulin of the zebrafish embryo. The incorporation of recombinant γ -tubulin into the native γ -TuRC complexes of the embryos was determined using glycerol gradient. Fractionation of the embryo cytoplasm revealed the presence of the protein labeled with biotin in the fraction corresponding to the γ -TuRC density. It was also determined the effect of mutations in the T7 loop over the interaction of γ -tubulin with the CCT chaperonin.

The incorporation experiments showed that the recombinant human γ -tubulin was incorporated into the centrosome and into the γ -TuRC complexes of the blastomeres of the injected embryos. Using the same methodology it was demonstrated that punctual mutations in the T7 loop alter the ability of the γ -tubulin to incorporate into the γ -TuRC complexes but not its ability to interact with α/β -tubulin, suggesting that the longitudinal interactions are important to maintain the γ -TuRC complex integrity. Moreover, the interaction assays between γ -tubulin and the CCT chaperonin showed that all the three recombinant proteins were able to interact with it, however, mutations in the T7 loop decreased the interaction, being the most pronounced effect with the M249E mutant, demonstrating that the region of T7 loop is involved in the interaction of γ -tubulin with the CCT chaperonin.

1. INTRODUCCION.

El citoesqueleto de microtúbulos consiste en un entramado de polímeros cilíndricos de 25 nm de diámetro externo (microtúbulo) formados por subunidades de una proteína conocida como tubulina. Las subunidades de tubulina son en si un heterodímero de dos proteínas globulares muy cercanamente relacionadas, llamadas α -tubulina y β -tubulina. Estas tubulinas polimerizan mediante interacciones no covalentes para formar polímeros lineales (protofilamentos) que a su vez interactúan lateralmente formando los microtúbulos. Las tubulinas poseen un dominio de unión a GTP, y la hidrólisis de éste se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de polimerización (Anders y Botstein, 2001).

La estructura a alta resolución del heterodímero de α/β -tubulina (Nogales y col., 1998) y del microtúbulo (Nogales y col., 1999; Li y col., 2002) muestra varias regiones de las tubulinas que podrían ser importantes tanto para la hidrólisis del GTP como para las interacciones tubulina-tubulina durante la polimerización. La similitud estructural con proteínas relacionadas, como la proteína FtsZ del citoesqueleto bacteriano (Löwe y Amos, 1998; Oliva y col., 2004), mostró que muchas de estas estructuras son conservadas y probablemente fundamentales para la función de todas las proteínas de la familia de las tubulinas. Se ha demostrado experimentalmente la importancia de algunas de estas regiones en FtsZ, como por ejemplo la participación del ácido aspártico 212 de la región del "loopT7" en la catálisis del GTP (Mukherjee y col., 2001). Se identificaron los posibles residuos homólogos en tubulina y por medio de experimentos genéticos en levaduras se demostró la importancia de los residuos ácido aspártico 252 y ácido glutámico 255 del loopT7 de α -tubulina en la dinámica de los microtúbulos *in vivo* (Anders y Botstein, 2001). Las mutaciones de

estos residuos producen fenotipos letales en levaduras debido a una aparente inhibición de la dinámica de los microtúbulos. Sin embargo, no ha sido posible demostrar esta hipótesis *in vitro*, pues las mutaciones en tubulina, al ser letales, impiden su purificación desde células eucariontes. La aparición el año 2005 de la estructura resuelta a 1,4 Å de la γ -tubulina (Aldaz y col., 2005), que participa en la nucleación de los microtúbulos, planteó nuevos desafíos. Esta proteína conserva las mismas regiones de interacción de α y β -tubulina en el microtúbulo a pesar de cumplir otra función en la célula. Las bases estructurales de los mecanismos de interacción tubulina-tubulina y de la catálisis del GTP de las tubulinas permanecen aun desconocidas por la dificultad técnica de purificar tubulinas mutantes en cantidad suficiente para realizar experimentos *in vitro*, debido a que la compleja vía de plegamiento de las tubulinas impide la producción de proteína recombinante funcional en bacteria. (Goulin y col., 1996; Lopez-Fanarraga y col., 2001)

En el presente trabajo de tesis se desarrollo una metodología *ad hoc* para el estudio de mutantes de tubulina, en la cual se utilizó como proteína modelo a la γ -tubulina y su función nucleadora de microtúbulos. Esta metodología comprendió la síntesis de γ -tubulina recombinante en bacteria, la inyección de ésta en el citoplasma de células eucariontes vivas y el análisis de las vías de plegamiento y funcionalidad de la proteína. Esto permitió combinar el análisis *in vivo* con la construcción y caracterización *in vitro* de las mutantes de γ -tubulina. Por varios motivos que se describen mas adelante, escogimos como modelo de célula eucarionte los ovocitos del pez cebra, lo cual nos obligó a explorar la biología celular del la γ -tubulina del pez.

A continuación se describirá la biología estructural de las tubulinas, la

polimerización, estructura y nucleación de los microtúbulos, la biología celular de la γ -tubulina y su función como nucleador de microtúbulos, y de las vías de plegamiento de las tubulinas. Con estos antecedentes se planteará el problema que nos conduce a la hipótesis de este trabajo.

1. a. La familia de las tubulinas es un extenso grupo de proteínas que poseen la propiedad de polimerizar e inducir la actividad GTPasa. Esta familia de proteínas está representada en todos los tipos de organismos conocidos, tanto eucariontes como procariontes, desempeñando diversas funciones, como la mantención de la estructura celular, la formación del huso mitótico y el haz del huso, los cuerpos basales de los flagelos, los centriolos y el transporte citoplasmático en células eucariontes. En células procariontes las proteínas de esta familia están involucradas en la formación del anillo de división que acompaña a la división celular. Los representantes conocidos de esta familia son α -tubulina, β -tubulina, γ -tubulina, ε -tubulina, ζ -tubulina y η -tubulina en eucariontes y en procariontes, FtsZ (McKean y col., 2001) y las recientemente descubiertas BtubAB (Jenkins y col., 2002). Se ha observado que todos los miembros de la familia de las tubulinas poseen una estructura común (Nogales y col., 1998). Como se aprecia en la Figura 1, esta estructura se divide en tres dominios (Nogales y col., 1998; Löwe y Amos, 1998; Aldaz Y col., 2005). Un dominio N-terminal (magenta en la representación gráfica, Figuras 1B y C), que en β -tubulina comprende los residuos 1 al 205 y consiste en cinco hélices- α y seis hojas- β paralelas, que forman un plegamiento tipo Rossman clásico, donde se encuentra el sitio de unión de GTP. Un dominio intermedio que comprende los residuos 206 al 381 (azul en la representación gráfica) que en β -tubulina está

formado por 4 hélices- α y 7 hojas- β , es aquí donde se encuentra el sitio de unión a taxol en β -tubulina. Por último, un dominio C-terminal predominantemente helicoidal que comprende desde el residuo 382 al 454 (azul verdoso en la representación gráfica) que en β -tubulina, se orienta hacia la parte exterior de los microtúbulos y puede participar como sitio de unión a proteínas motoras moleculares y otras como las MAPs, Tau, etc.

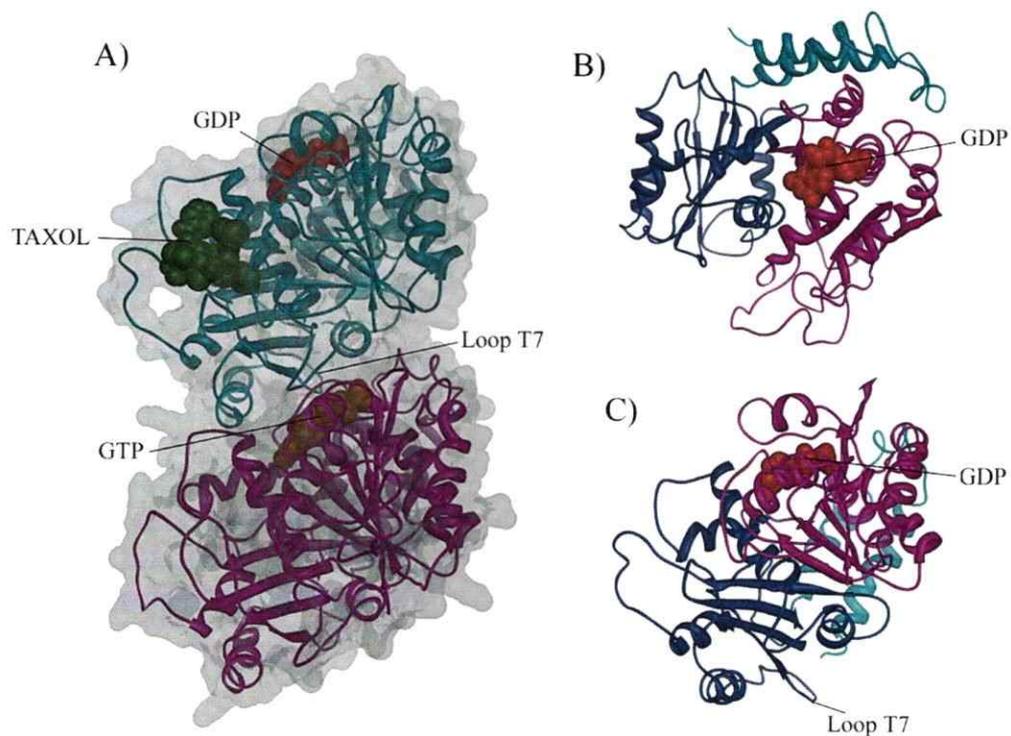


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del heterodímero de α/β -tubulina resuelto a 2,8 Å mediante difracción de electrones (TUB1) a partir de hojas inducidas por Zn^{2+} en presencia de taxol (Nogales y col., 1998). En **A**, se muestra una representación de la estructura 3D en cintas de la cadena polipeptídica y de la superficie de los aminoácidos del heterodímero. Los monómeros a y b se muestran en verde y violeta, respectivamente. En rojo y sepia los nucleótidos GDP y GTP respectivamente y el taxol en verde. En **B** y **C** se muestran dos vistas de la estructura de la β -tubulina, resaltando la presencia del nucleótido y el “loop T7”. La estructura de la β -tubulina se muestra en tres colores, los cuales representan las regiones aminoterminal en magenta, el dominio central en azul y el dominio carboxilo terminal en azul verdoso.

1. b. El heterodímero α/β tubulina, hidrólisis del GTP y la dinámica de polimerización de los microtúbulos. α y β -tubulina se encuentran formando un heterodímero permanente dentro de la célula. Este heterodímero puede formar parte de estructuras mayores como los microtúbulos o simplemente formar parte de un conjunto soluble de tubulina no polimerizada. La estructura del heterodímero α/β tubulina se resolvió a 2,8 Å, mediante difracción de electrones, en hojas inducidas por Zn^{2+} (Nogales y col., 1998). En el modelo estructural del heterodímero que se muestra en la Figura 1A, se observa que dentro de la región de interacción de los monómeros (interacción intradímero) queda oculto el sitio de unión a GTP de α -tubulina (Mingorance y col., 2001). El nucleótido que contiene este sitio es no intercambiable (conocido como sitio N) y permanece como GTP sin ser hidrolizado. En cambio, el sitio de unión a nucleótido de la β -tubulina (sitio E) se ubica en la región de interacción interdímero y el GTP unido es susceptible de ser hidrolizado durante la polimerización. El producto GDP se intercambia por GTP una vez que el heterodímero es liberado del polímero, pudiendo reiniciar un nuevo ciclo de polimerización. Normalmente las tasas de hidrólisis de GTP de tubulina en solución son muy bajas, aumentando sólo durante la polimerización (Wang y col., 2007). Se piensa que la hidrólisis del GTP intercambiable o la liberación del Pi resultante luego de la hidrólisis inducen una curvatura del heterodímero (Nogales y col., 1998), que produce una desestabilización de la estructura del polímero favoreciendo la despolimerización (Desai y Mitchison, 1997).

La dinámica de polimerización de los microtúbulos se caracteriza por periodos de polimerización y despolimerización prolongados de los extremos de los microtúbulos (Mitchison y Kirschner, 1984). Este fenómeno ha sido descrito como

inestabilidad dinámica en base a cuatro parámetros: las tasas de polimerización y despolimerización y las frecuencias de rescate (transiciones desde despolimerización a polimerización) y de catástrofe (transición desde polimerización a despolimerización) (Mitchison y Kirschner, 1984). La alternancia entre periodos de catástrofe y recuperación es estocástica, de modo que los polímeros individuales nunca llegan a alcanzar un tamaño uniforme en un régimen estacionario, esto a pesar de que la población de microtúbulos en solución exhibe un régimen estacionario.

1. c. La estructura de los microtúbulos. La polimerización del heterodímero α/β involucra la formación de dos tipos de contactos, conservados entre los miembros de la familia de las tubulinas; contactos longitudinales (*head-to-tail*) entre heterodímeros, los cuales llevan a la formación de polímeros lineales conocidos como protofilamentos (Nogales y col., 1999). Este ensamblaje longitudinal de α/β -tubulina determina una polaridad a lo largo de la estructura, donde cada extremo del microtúbulo tiene una cinética de polimerización y despolimerización diferentes: el extremo (+), coronado por β -tubulina, posee una cinética mayor que el polo (-), coronado por α -tubulina (Mitchison y col., 1993). Este tipo de interacción longitudinal se observa también en los polímeros lineales de FtsZ (Oliva y col., 2004) y Btub AB (Sontag y col., 2005). El otro tipo de contacto corresponde a contactos laterales entre protofilamentos adyacentes, los cuales llevan a la formación de las paredes de los microtúbulos y las hojas inducidas por Zn^{2+} . En general las interacciones longitudinales son heterólogas (α - β) en tanto que las laterales son homólogas (α - α , β - β) en la mayor parte del microtúbulo, y heterólogas sólo en el cierre de la pared, al menos en los microtúbulos de 13 protofilamentos (Nogales y

col., 1999). Los modelos a alta resolución de microtúbulos hechos por Nogales y col., (1999) y Li y col., (2002) muestran claramente las estructuras involucradas en los contactos laterales. La región de los aminoácidos entre la hebra β B7 y la hélice α H9 conocida como "Loop" M interactúa con gran parte de la superficie de unión del monómero adyacente, donde la hélice H3 y el "loop" H1-S2 son sus principales contrapartes. En la interacción longitudinal participan principalmente el "loop T7" que se encuentra entre las hélices H7 y H8 y la hélice H8. Esta región penetra en la cavidad donde se aloja el nucleótido en el dominio N-terminal del siguiente monómero, tomando contacto con el nucleótido y probablemente activando su hidrólisis (Figura 1). Se especula que en α -tubulina, el residuo E254 puede tener el papel de residuo catalítico (Nogales y col., 1998), pues este residuo se encuentra en el comienzo de la hélice H8, y es homólogo al residuo D212 de FtsZ que posee tal función catalítica (Löwe y Amos, 1998). Además, se ha demostrado que mutaciones en este residuo en α -tubulina de levadura generan fenotipos letales, que se relacionan con una detención de la dinámica de los microtúbulos dentro de la célula (Anders y Botstein, 2001).

1. d. La nucleación de microtúbulos. Normalmente los microtúbulos se ensamblan espontáneamente *in vitro* a altas concentraciones del heterodímero α/β en presencia de GTP y Mg^{2+} . El proceso ocurre en dos fases; una fase lenta donde ocurre la formación de pequeños protofilamentos a modo de núcleos (Volter y Ericsson, 1984). Esta fase es conocida como fase de nucleación y es generalmente la fase limitante del proceso. La siguiente fase es de crecimiento rápido o elongación, donde los microtúbulos crecen lateral y longitudinalmente a partir de los pequeños núcleos

formados en la fase de nucleación (Moritz y Agard, 2001).

Se cree que la nucleación de microtúbulos *in vivo* es asistida por componentes celulares anexos (Archer y Solomon, 1994). Estos componentes son conocidos como centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), entre los cuales se incluyen los centrosomas de las células animales y el cuerpo del huso de las levaduras. Varias líneas de evidencia implican a la proteína centrosomal γ -tubulina como uno de los componentes importantes en este proceso (Moritz y Agard, 2001; Joshi y col., 1992; Schiebel, 2000; Job y col., 2003). Durante la mitosis, la γ -tubulina se acumula en la matriz pericentrosomal de las células animales y los cuerpos basales de las levaduras, intercambiándose constantemente con un conjunto de γ -tubulina no centrosomal que es mayoritario en células que no se encuentran en división (Wiese y Zheng, 2006; Renaud-Messina y Mercedes 2006). En todos los casos, incluyendo a las plantas, que carecen de centros organizadores de microtúbulos (Murata y col., 2005), la γ -tubulina participa asistiendo a la nucleación y organización del arreglo de microtúbulos. Incluso, se ha demostrado *in vitro* que γ -tubulina purificada es capaz de nuclear microtúbulos aún en forma monomérica (Zheng y col., 1995; Leguy y col., 2000).



1. e. La γ -tubulina. Al igual que α y β -tubulina, γ -tubulina es una proteína altamente conservada entre las especies. Presenta alrededor del 30% de identidad de secuencia con α y β -tubulina (Moritz y Agard, 2001; McKean y col., 2001). Es una proteína citosólica que forma parte de los MTOC (Zeng y col., 1991). Al menos en animales y levaduras forma dos tipos de complejos: los complejos anillo de γ -tubulina (γ -TuRC)

y los complejos pequeños de γ -tubulina (γ -TuSC) (Wiese y Zheng, 2006). El primer tipo de complejo, visto bajo microscopía electrónica sugiere una estructura flexible en forma de anillo abierto de aproximadamente 25 nm de diámetro que se asocia al extremo (-) del microtúbulo (Moritz y col., 2000). Los γ -TuRC se han aislado de huevos de *Xenopus* (Zheng y col., 1995), *Drosophila* (Gunawardane y col., 2000; Moritz y col., 2000; Oregama y col., 1999) y humano (Murphy y col., 2001). Contienen de 10 a 14 moléculas de γ -tubulina y al menos seis proteínas adicionales, resultando en un complejo de una masa cercana a los 2 MDa (Moritz y Agard, 2001). Las proteínas adicionales toman el nombre de Grip (Gamma ring protein) en *Drosophila* y *Xenopus*, GCP (Gamma complex protein) en humanos (Murphy S. y col. 2001) y Spc en levaduras (Gunawardane y col., 2000). Estas, al igual que la γ -tubulina son muy conservadas entre los distintos organismos. Los complejos γ -TuSC consisten en dos moléculas de γ -tubulina y dos moléculas de proteínas Grip; Dgrip 97 y Dgrip98 en *Drosophila*, Xgrip 109 y Xgrip110 en *Xenopus* y Spc97 y Spc98 en levaduras (McKean y col., 2001; Gunawardane y col., 2000; Wiese y Zheng, 2006). Se ha sugerido que estos pequeños complejos constituyen los bloques de construcción de los complejos γ -TuRC (Job y col., 2003) y que probablemente se encuentran formando parte de las paredes del anillo (Moritz y col., 2000). Ambos complejos γ -TuRC y γ -TuSC son capaces de nuclear microtúbulos *in vitro* y modular la dinámica del extremo (-) (Moritz y col., 2000).

Existe evidencia de mecanismos de nucleación independientes de γ -tubulina (Job y col., 2003; Hannak y col., 2002; Popov y col., 2002). Se ha visto que al alterar la función o eliminar γ -tubulina la nucleación de microtúbulos en la célula no

desaparece por completo. Sin embargo, la falta de la función produce serias alteraciones tanto en el ciclo celular como en la formación de arreglos de microtúbulos. Por ejemplo, el desarrollo de embriones de ratón deficientes en una isoforma de γ -tubulina (*Tubg1*^{-/-}) se manifiesta en una detención en estado de mórula/blastocisto, mediante un arresto mitótico característico (Yuba-Kubo y col., 2005). En las células de estos embriones se observan microtúbulos, sin embargo dejan de dividirse. Algo semejante se observa al silenciar γ -tubulina en embriones de *C. elegans* (Hannak y col., 2002). En todos los casos, a pesar de la carencia de la actividad nucleadora de microtúbulos de γ -tubulina, los microtúbulos continúan creciendo. También se ha observado que la ausencia de la formación de los complejos γ -TuRC por el silenciamiento de la expresión de la proteína Dgrip75 en *Drosophila* parece no influir en la destinación de γ -tubulina al centrosoma ni en la nucleación de microtúbulos (Vérollet y col., 2005).

γ -tubulina es un blanco para la regulación del ciclo celular pues la nucleación es la etapa limitante en la polimerización de microtúbulos. La fosforilación de γ -tubulina es importante para el control del ensamblaje y del número de microtúbulos ensamblados, ya que afecta la organización y función de los microtúbulos durante el ciclo celular de levadura (Voguel y col., 2001)

Las interacciones de γ -tubulina con los componentes del γ -TuRC y con el heterodímero $\alpha\beta$ que llevan a la nucleación de MT son desconocidas a nivel estructural. En la actualidad no existen modelos de la estructura de los complejos γ -TuRC de suficiente resolución como para observar el detalle molecular de las interacciones. Sin embargo, basados en la elevada similitud estructural y de

secuencia con α y β tubulina, es posible esperar que las regiones de interacción correspondan a las mismas regiones observadas en el modelo de alta resolución del microtúbulo (Nogales y col., 1999), es decir que γ -tubulina poseería los mismos ejes de interacción longitudinal y lateral que α y β tubulina. En base a esto, se han planteado dos modelos para dar una explicación estructural al proceso de nucleación. El primero es conocido como el modelo del templado, sugerido a partir de la estructura de los γ -TuRC observada por microscopía electrónica (Moritz y Agard, 2001). Según los autores, su estructura es semejante al corte transversal de un microtúbulo. El modelo indica que γ -tubulina puede actuar como una base helicoidal donde los microtúbulos crecen, como si hubiese un extremo (+) de microtúbulo preexistente (Job y col., 2003; Weise y Zheng, 2000; Keating y Borisy, 2000; Moritz y col., 2000). En este modelo la γ -tubulina debiera formar un pequeño polímero mediante interacciones laterales e interactuar mediante interacciones longitudinales con α -tubulina durante la nucleación. Extensa evidencia habla a favor de este modelo. La localización restringida de γ -tubulina en el extremo (-) del microtúbulo (Keating y Borisy, 2000), la función del γ -TuRC como “capping” del extremo (-) para modular su dinámica (Weise y Zheng, 2000), la ultraestructura del γ -TuRC en forma de tapa en el extremo (-) del microtúbulo (Moritz y col., 2000) y el hecho que el tipo de contactos que muestra γ -tubulina en el cristal donde se resolvió su estructura (Aldaz y col., 2005), son laterales y muy semejantes a los observados en la ultraestructura del microtúbulo de Nogales y col. (1999). El modelo alternativo, llamado “del protofilamento” (Erickson y Stoffler, 1996) se basa en la observación de la posición de los complejos anillo, que aparentemente no se encuentran en una posición adecuada para servir como templado. Según estos autores, el plano del

anillo del γ -TuRC es paralelo al eje longitudinal del microtúbulo y no perpendicular a él como se espera para el modelo del templado. Esta estructuración es similar a lo que ocurre durante la despolimerización de los microtúbulos, donde se desprenden protofilamentos que forman fibras enroscadas en el extremo del microtúbulo (Nogales y col., 2003), que se parecen a la estructura del γ -TuRC (Erickson y Stoffler., 1996). En este modelo, las moléculas de γ -tubulina se asocian entre sí mediante interacciones longitudinales. De este modo, el γ -TuRC correspondería a un protofilamento enroscado y la nucleación de microtúbulos estaría dada principalmente por interacciones laterales entre γ -tubulina y el heterodímero $\alpha\beta$, las que darían origen a la formación de hojas que posteriormente se plegarían en un tubo, dando lugar al microtúbulo. Una evidencia que habla a favor de este modelo es la determinación de regiones de interacción por medio de la técnica de péptidos SPOT la cual indica que las regiones de γ -tubulina que poseen afinidad por el heterodímero corresponden a las superficies laterales de la proteína (Llanos y col., 1999). Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias inequívocas a favor o en contra de uno u otro modelo. El estudio de las superficies de interacción mediante mutagénesis podría entregar datos importantes en este sentido. No obstante, como ya se mencionó, hasta el momento no ha sido posible detectar funcionalidad en alguna de las tubulinas eucariontes recombinantes sintetizadas en bacteria (Bhattacharyya y col., 1997; Sánchez y col., 2004; Andreu y col., 2002) y el uso de líneas celulares es muy complicado, pues una deficiencia en alguna tubulina es letal para células eucariontes. Esto ha dificultado enormemente el estudio de las tubulinas a nivel estructural.

1. f. El plegamiento de las tubulinas y la chaperonina CCT. El hecho que las tubulinas no puedan ser sintetizadas en bacterias se debe a que las proteínas de la familia de las tubulinas son incapaces de plegarse por sí mismas espontáneamente. Su plegamiento depende o es facilitado vía interacciones con una serie de factores citosólicos de plegamiento exclusivos de las células eucariontes (Goulin y col., 1996; Lopez-Fanarraga y col., 2001). La vía de plegamiento de β -tubulina incluye 5 factores, entre los cuales se encuentran la prefoldina y la chaperonina citosólica CCT (Chaperonin containing TCP-1, también llamada TriC o c-cpn). Se ha demostrado que γ -tubulina necesita únicamente la interacción con la chaperonina CCT para alcanzar el correcto plegamiento (Melki y col., 1993).

1. g. La familia de las chaperoninas. Las proteínas de esta familia poseen una estructura común; todas son grandes oligómeros constituidos por subunidades de alrededor a 60 kDa dispuestos en una forma toroidal. Usualmente están compuestos por dos anillos que interactúan por un lado común, opuesto a la cavidad de entrada de la proteína sustrato. Cada subunidad oligomérica posee una estructura similar de tres dominios; un dominio ecuatorial, un dominio intermedio y un dominio apical, donde se encuentran los sitios de unión al sustrato (Gomez-Puertas y col., 2004; Llorca y col., 2001a; Spiess y col., 2004). Las chaperoninas del grupo I (en eubacterias y organelos como mitocondrias y cloroplastos) están constituidas por siete subunidades idénticas, a diferencia de las chaperoninas de tipo II (en arqueobacterias y el citosol eucarionte), que están construidas por 8 a 9 subunidades de dos, tres o incluso ocho tipos distintos (Gomez-Puertas y col., 2004, Llorca y col., 2001a; Llorca y col. 2001b, Ritco-Vonsovici y Willison, 2000). La chaperonina CCT

posee ocho subunidades distintas, dispuestas en un arreglo preciso (Tian y col., 1995). Presenta especificidad para un limitado número de proteínas, dentro de las cuales destacan las tubulinas y actinas (Spiess y col., 2004). Esta especificidad de sustrato es inexistente en las chaperoninas del grupo I, como GroEL-GroES. Varios grupos de investigación se han abocado a la búsqueda de los determinantes estructurales del reconocimiento entre la chaperonina y sus sustratos. Se ha demostrado que CCT une proteínas en un estado cuasi-nativo (Tian y col., 1995) y no en estructura completamente al azar. Es decir que la chaperonina no reconoce una proteína por que está desplegada, sino que posee especificidad por determinadas estructuras (Llorca y col., 2001a). Los modelos provenientes de la reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de complejos CCT-tubulina muestran regiones bien acotadas de la estructura de tubulina que interactúan con la chaperonina (Llorca y col., 2001a). Las regiones involucradas en la interacción entre la tubulina-CCT podrían corresponder mayormente a “loops” que están ausentes en su homólogo procarionte FtsZ. Esta observación ha dado pie a la hipótesis de que las proteínas del citoesqueleto han co-evolucionado junto con los factores que ayudan a su plegamiento (Huang y col., 1996; Llorca y col., 2001a; Llorca y col., 2001b; Bertrand y col., 2005), lo que podría explicar la especificidad de sustrato de CCT. Las regiones de interacción definidas por Llorca y col. (2001b) corresponden a su vez, a algunas regiones que participan en la interacción longitudinal (ej. “loop” T7) y lateral (ej. “loop” M) en la estructura de los microtúbulos (Gomez-Puertas y col., 2004, Andreu y col., 2002). La proteína FtsZ es capaz de plegarse espontáneamente y no es reconocida por la chaperonina aun en su estado desplegado. Se ha visto que proteínas quiméricas de FtsZ a las cuales se le han insertado estos “loops” de

tubulina son capaces de interactuar con CCT, y además pierden su capacidad de plegarse espontáneamente (Bertrand y col., 2005), apoyando las observaciones de Llorca y col. en el modelo de la interacción. Sin embargo, han sido encontradas proteínas homólogas a α y β tubulinas, en bacterias del género *Prostecobacter* (31 a 35% y 34 a 37% de identidad de secuencia con α y β -tubulina respectivamente) (Jenkins y col., 2002) que poseen estos “loops” y al parecer son capaces de plegarse espontáneamente dentro del citoplasma de *E. coli* en ausencia de la actividad de la chaperonina CCT (Sontag y col., 2005). Es decir que la presencia de estos “loops” podría no ser un determinante para la carencia de plegamiento de las tubulinas.

1. h. Las interacciones proteína-proteína de las tubulinas. La tubulina participa en gran cantidad de interacciones con otras proteínas. Durante su existencia, no solo deben interactuar con otras moléculas de tubulina para construir microtúbulos, sino que deben interactuar también con una serie de moléculas de factores de plegamiento, prefoldinas y chaperoninas para llegar a ser funcionales (Tian y col., 1996). Una vez incorporada al microtúbulo debe interactuar con otros tipos de proteínas, como los motores moleculares y las proteínas MAPs. En el caso de γ -tubulina, esta debe interactuar al menos con otras moléculas de γ -tubulina, con la chaperonina CCT, algunas proteínas Grip del γ -TuRC y α/β -tubulina.

La naturaleza molecular de las interacciones proteína-proteína que generan las tubulinas para sus diversas funciones permanece poco explorada, debido mayormente a la dificultad de producir proteína recombinante para estudios de estructura-función. En la práctica, al expresar tubulina en un sistema bacteriano, la

proteína producida tiende a formar cuerpos de inclusión, que sólo pueden ser solubilizados en presencia de altas concentraciones de agentes desnaturantes . Y por otro lado, hasta el momento el replegamiento al equilibrio no ha dado buenos resultados (Andreu y col., 2002; Ghua y Bhattacharyya, 1997). En la actualidad no existe metodología alguna que permita obtener tubulina recombinante en cantidad suficiente para analizar su función *in vitro*. Es posible hacer estudios genéticos como los efectuados en levadura, mediante “scanning” de alanina, donde se ha intentado definir regiones importantes para la función de tubulina (Anders y Botstein, 2001). Sin embargo, los datos obtenidos no son suficientes para ahondar en la naturaleza molecular de las interacciones. Por otro lado, las mutaciones importantes en α , β y γ -tubulina generan fenotipos letales en células eucariontes, lo cual dificulta la síntesis de proteínas en sistemas de expresión eucarionte.

El principal escollo para conocer la naturaleza molecular de la funcionalidad de γ -tubulina y de otras tubulinas es la falta de una metodología experimental. Ya que las tubulinas son proteínas fundamentales para las funciones celulares, resulta indispensable tener mayor cantidad de información acerca de los detalles estructurales relacionados a su funcionalidad. Esto hace necesaria la exploración de nuevas técnicas que permitan hacer estudios estructura-función con estas proteínas.

Uno de los objetivos que se abordó en esta tesis fue diseñar una metodología experimental que permitiera el estudio de las superficies de interacción proteína-proteína de γ -tubulina. Se decidió enmarcar nuestra investigación en una parte de la región de interacción longitudinal de γ -tubulina, el “loop” T7, bajo la hipótesis de que esta región es un componente importante para las interacciones proteína-proteína en que γ -tubulina participa al formar el γ -TuRC y al interactuar con la chaperonina

CCT. La metodología que se propuso está basada en la idea de que el plegamiento correcto de γ -tubulina requiere de la presencia de chaperoninas, prefoldinas y otras proteínas que se encuentran en el interior del citoplasma eucarionte. Esto nos obliga a trabajar *in vivo* o en sistemas de traducción *in vitro*. De este modo, se propuso sintetizar γ -tubulina en bacteria, purificarla desde los cuerpos de inclusión y posteriormente introducirla por microinyección en una célula eucarionte viva. En el citoplasma de la célula la proteína recombinante debería ser plegada e incorporada en las estructuras celulares correspondientes, que en el caso de γ -tubulina corresponderían al γ -TuRC y al centrosoma.

La ventaja de la metodología propuesta radica en que al sintetizar la proteína en bacterias de modo recombinante, se pueden introducir fácilmente mutaciones que permitirán estudiar las regiones de interacción de γ -tubulina. Además, al poder purificarla es posible marcar con una sonda fluorescente o de cualquier otro tipo para seguir el comportamiento de la proteína una vez inyectada dentro del citoplasma de la célula. Se eligió como modelo experimental eucarionte al los cigotos y embriones tempranos del pez cebra (*Danio rerio*) por su gran tamaño, lo que facilita la microinyección y la manipulación y por la transparencia de su citoplasma, lo cual favorece la observación con microscopia de fluorescencia y confocal (Fernández y col., 2006; Solnica-Krezel y Driever., 1994). El uso del embrión temprano en desarrollo permitió acrecentar el conocimiento sobre la biología celular de la γ -tubulina del pez cebra, en cuanto a su expresión y localización subcelular durante los primeros estadios del desarrollo.

La metodología que se planteó para el desarrollo experimental de esta tesis puede eventualmente abrir caminos alternativos para el estudio de la biología

estructural de otras proteínas que no son funcionales cuando se expresan como recombinantes.

2. HIPOTESIS.

Basados en la similitud estructural y de secuencia entre la familia de las tubulinas, es posible esperar que las regiones de interacción lateral y longitudinal de sus miembros sean conservadas. De modo que nos planteamos la siguiente hipótesis: **al igual que α y β -tubulina, la región del "loop" T7 de γ -tubulina debería formar parte de la superficie de interacción longitudinal y por lo tanto, sería importante en la formación del γ -TuRC, la nucleación de microtúbulos y la interacción con la chaperonina CCT.**

3. OBJETIVO GENERAL.

Hacer un estudio estructura-función de la región del "loop" T7 de γ -tubulina, observando cómo alteraciones en su secuencia afectan las interacciones que llevan a la formación del γ -TuRC, la nucleación de microtúbulos y la interacción con la chaperonina CCT.

4. OBJETIVOS.

4. a. **Estudiar la expresión, localización celular y formación de complejos de γ -tubulina del embrión temprano del pez cebra.** Se localizó el mensajero de γ -tubulina mediante RT-PCR utilizando la única secuencia de γ -tubulina disponible en las bases de datos de genoma del pez cebra (NM_200908).

Mediante inmunoblot se observaron los niveles de expresión de γ -tubulina durante el desarrollo temprano del pez y si es que éstos sufren alguna variación. Mediante inmunofluorescencia se localizó la γ -tubulina endógena de los embriones tempranos del pez cebra y observar como cambia su localización durante los distintos estadios del ciclo celular y por medio de una adaptación de la metodología planteada por Oregama y col. (1999), se observó por fraccionamiento en gradientes de densidad si la γ -tubulina del pez cebra forma complejos γ -TuRC y si éstos son capaces de interactuar con microtúbulos *in vitro* y además nuclear su polimerización.

4. b. **Generar mutantes puntuales en el "loop" T7 de γ -tubulina.** Mediante análisis bioinformático de alineamiento de secuencia, alineamiento estructural y modelamiento por homología se decidió qué aminoácidos son buenos blancos para mutar dentro de la región del "loop" T7. Se cuenta con un plásmido de expresión pET11A, que contiene clonado el gen de la tubulina humana tubg1 (NM_001070). El plásmido pET11A-tubg1 se muestra detallado en sus componentes en la Figura 2. Las mutantes fueron hechas mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR. Los plásmidos resultantes fueron analizados mediante ensayos de restricción y ensayos de expresión, inmunoblot y secuenciación. Las proteínas mutantes fueron caracterizadas estructuralmente mediante renaturación al equilibrio, observando la

fluorescencia intrínseca de los triptófanos y dicroísmo circular.

4. c. Estudiar la interacción entre la chaperonina CCT y γ -tubulina recombinante para observar como las mutaciones en “loop” T7 afectan la interacción. La interacción entre γ -tubulina y CCT fue estudiada mediante un ensayo de interacción por electroforesis en geles de poliacrilamida. Además, se realizó microscopía electrónica de transmisión de los complejos .CCT- γ -tubulina, con la finalidad de observar la interacción entre estas moléculas a alta resolución utilizando el refinamiento de imágenes de partículas únicas con el programa Xmipp (Soriano y col., 2004).

4. d Estudiar la incorporación de γ -tubulina recombinante en los γ -TuRC del embrión temprano del pez cebra y el efecto de las mutaciones en la región del “loop” T7 sobre la funcionalidad de la γ -tubulina *in vivo*. Para esto se microinyectó γ -tubulina recombinante marcada fluorescentemente o biotinilada, en ovocitos del pez cebra. Los ovocitos inyectados con γ -tubulina fluorescente fueron observados por microscopía de fluorescencia, en embriones vivos y fijados. El comportamiento de las proteínas fluorescentes fue utilizado como indicador de funcionalidad, de modo de comparar si la función de las proteínas se altera por las mutaciones introducidas en el “loop” T7. Se observó cómo la inyección de γ -tubulina recombinante afecta el desarrollo de los embriones.

La γ -tubulina recombinante biotinilada fue microinyectada en los embriones para posteriormente hacer una extracción del γ -TuRC mediante gradientes de glicerol. Las diferentes fracciones de los gradientes se analizaron por inmunoblot

contra γ -tubulina y contra biotina utilizando estreptavidina conjugada con HRP. De este modo se observó si la proteína exógena biotinilada se incorpora en los γ -TuRC y si las mutaciones en el "loop" T7 alteran su incorporación. Por último, se realizó un ensayo de polimerización de microtúbulos *in vitro* en presencia de cantidades de citoplasma de embriones microinyectados con γ -tubulina recombinante. Esto, con la finalidad de observar si la proteína exógena microinyectada es capaz de interactuar con los microtúbulos y cómo las mutaciones en el "loop" T7 alteran la interacción γ -tubulina-heterodímero α/β .

5. MATERIALES.

5. a. Cepas Bacterianas.

Para la síntesis de la proteína recombinante se utilizó la cepa de *E. coli* (DE3) (F⁻ ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) ga dcm (DE3) que posee en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa del fago T7 inducible por IPTG.

Para la transformación de los plásmidos producto de la mutagénesis sitio-específica se utilizó la cepa *E. coli* XL10-Blue (reaA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn 10 (tet^r)] que forma parte del kit de mutagenesis sitio-específica QuikChange de Stratagen® (La Jolla, CA, USA).

Para propagar y mantener los plásmidos fue utilizada la cepa de *E. coli* DH5α (DlacU169 recA1 endA1 gyrA96 relA1 hsdR17 thi-1 supE44).

5. b. Plásmidos.

El gen de γ -tubulina humana Tubg1 (NM_001070) se encuentra clonado en un vector pET11a de Novagen (Madison, WI, USA) resultando en el plásmido pET11a-Tubg1, el cual se muestra esquemáticamente en la Figura 2.

5. c. Partidores.

Los partidores utilizados para introducir las mutaciones en el gen de γ -tubulina humana (tubg1) fueron los siguientes:

Para la mutante M249E.

Reverso: 5'-GATGAGGTCATTGTTCTCGTAGCCAGGGTAGCG,

Delantero: 5'-CGCTACCCTGGCTACGAGAACAATGACCTCATC.

Para la mutante T7 β .

Mutación M249L:

Reverso 5'-GAGGTCATTGTTTCAGCTAGCCAGGAAAGC

Delantero: 5'-GCTTTCCTGGCTACCTGAACAATGACCTC

Mutación Y245F:

Reverso 5'-GTTTCATGTAGCCAGGAAAGCGCAGGGTGGTG

Delantero 5'-CACACCCTGCGCTTTCCTGGCTACATGAAC

Mutación Y248Q:

Reverso 5'-GAGGTCATTGTTTCAGCTGGCCAGGAAAGCGCAG

Delantero 5'-CTGCGCTTTCCTGGCCAGCTGAACAATGACCTC

Los partidores utilizados para detectar la presencia del mensajero de γ -tubulina endógena del pez cebra mediante RT-PCR fueron llamados tubg11 y sus secuencias son:

Reverso 5'-GGAGAGTCTTATGGACCTGT

Delantero 5'-GCAGACTGTGTGGTTGTGCT

Todos lo partidores fueron sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

5. d. Anticuerpos.

El anticuerpo utilizado para detectar γ -tubulina en inmunoblot e inmunofluorescencia fue el anticuerpo monoclonal hecho en ratón: anti-gamma-tubulin clone GTU-88 producido por SIGMA-ALDRICH® (Madison, WI., USA.).

El anticuerpo utilizado para detectar α -tubulina en inmunoblot e inmunofluorescencia fue el anticuerpo monoclonal hecho en ratón: anti-alpha-tubulin clone B-5-1-2 producido por SIGMA-ALDRICH® (Madison, WI., USA.).

Para detectar actina en inmunoblot fue utilizado el anticuerpo policlonal hecho en conejo: Actin (H-196):sc-7210 producido por Santa Cruz Biotechnology (USA).

Como anticuerpo secundario para inmunoblot fueron utilizados los anticuerpos policlonales hechos en cabra fusionados con HRP para sistema de revelado con quimioluminiscencia: Goat Anti Rabbit IgG-HRP sc 2004 y el Goat Anti Mouse IgG-HRP sc 2005 producidos por Santa Cruz Biotechnology (USA).

El anticuerpo secundario utilizado para inmunofluorescencia fue el anticuerpo policlonal hecho en cabra fusionado con alexa fluor 488: Alexa Fluor 488, Goat-Anti-Mouse IgG (H+L). Producido por Invitrogene Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

Tabla 1. Titulo de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Inmunoblot	Inmunofluorescencia
anti-gamma-tubulin clone GTU-88	1:10.000	1:100
anti-alpha-tubulin clone B-5-1-2	1:10.000	1:100
Actin (H-196):sc-7210	1:1.000	X
Goat Anti Rabbit IgG-HRP sc 2004	1:10.000	X
Goat Anti Mouse IgG-HRP sc 2005	1:10.000	X
Alexa Fluor 488, Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	X	1:100

5. e. Medios de cultivo.

5. e. 1. Medio Luria-Bertani (LB)

Se preparó un litro de LB utilizando 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, ajustando el pH a 7,5 con NaOH 1N. El medio LB se esterilizó mediante autoclave. En el momento de usar se agrega el antibiótico ampicilina (amp) 100 µg/ml

5. e. 2. Medio NZY⁺.

Para preparar un litro de este medio se utilizó NZ amina 10 g (hidrolizado de caseína), extracto de levadura 5 g. NaCl 5 g y se ajustó a pH 7,5 con una solución de NaOH 1N. Se esterilizó mediante autoclave. En el momento de usar se suplementó con 12,5 ml de MgCl₂ 1M estéril y 10 ml de glucosa 20% (p/v) estéril.

5. f. Soluciones.

TEN: Amortiguador TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM

Lisis 2: Amortiguador TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 100 mM; Tritón-X100 1% (v/v).

Solución urea 8 M: Amortiguador TRIS-HCl 20 mM, pH 8,0; bisulfito de Na 10 mM DTT 5 mM; urea 8 M.

PBS: amortiguador fosfato de Na 50 mM, pH 7,5.

Solución de bloqueo inmunofluorescencia: solución PBS; Albumina de bovino al 5%; Tween20 al 0,2%.

Solución PMS: Amortiguador fosfato de Na 10 mM, pH 7; MgCl₂ 0,5 mM; 0,24 M sacarosa.

Solución PMG: Amortiguador fosfato de Na 10 mM, pH 7; MgCl₂ 0,5 mM; 0,24 M sacarosa; GTP 0,1 mM.

Solución de extracción γ -TuRC: Amortiguador K-Hepes 50 mM, pH 7,6; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM; KCl 100 mM glicerol 10%; cóctel de inhibidores de proteasas.

Solución de extracción 2 γ -TuRC: Amortiguador K-Hepes 50 mM, pH 7,6; MgCl₂ 1 mM; EGTA 1 mM; cóctel de inhibidores de proteasas.

Solución de polimerización: Amortiguador MES 50 mM pH 6,8; EGTA 0,5 mM; MgCl₂ 6 mM; GTP 0,1 mM; Glicerol 10%.

Solución H: Amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,2; NaCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM. DTT 1 mM; PMSF 1 mM. Cóctel de inhibidores de Proteasa.

Solución A: Amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; NaCl 150 mM; Glicerol 10% (v/v); PMSF 1 mM; DTT 1 mM.

Solución B: Amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; NaCl 1,15 M; Glicerol 10% (v/v); PMSF 1 mM; DTT 1 mM.

Solución de carga (SDS): amortiguador Tris-HCl 75 mM, pH 6,8; glicerol 10%; SDS 2,5% (p/v). 2-mercaptoetanol 10 mM; azul de bromofenol 0,01% (p/v).

Solución gel concentrador (SDS): Amortiguador Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; SDS 0,1% (p/v).

Solución gel separador (SDS): Amortiguador Tris-HCl 138 mM, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v).

Solución tinción Azul de Coomassie: Azul de Coomassie-R-250 2,5% (p/v); metanol 50% (v/v); Acido acético 10% (v/v).

Solución de destinción: Metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v).

Solución bloqueo immunoblot: Amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150

mM; leche en polvo descremada comercial al 5%.

TBS-tween: Amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1%

Solución de transferencia: Amortiguador Tris 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%.

Solución de revelado immunoblot: Amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; ácido cumárico 0,225 mM; luminol 1,25 mM.

5. g. Reactivos.

Los reactivos bisulfito de sodio, urea, azul de bromofenol, etanol, sacarosa, sulfato de amonio, cloruro de potasio, hidróxido de sodio, Azul de Coomassie R250 y cloruro de magnesio fueron adquiridos de Merck S.A. El material cromatográfico Sephadex G25 y DEAE-Sephadex A50 y los reactivos, EGTA, la lisozima, DNAsa, DMSO, ácido cumárico y GTP fueron adquiridos de SIGMA-ALDRICH® (Madison, WI., USA.). La Q-sepharosa fue adquirida de GE Helthcare Bio-Sciences AB. La StreptavidinaHRP de Biosource Tagoinmunologica TM. (Ca. USA). Los reactivos ácido deoxicólico, GndHCl, Tween 20, agarosa, seroalbúmina de bovino, glicerol, acrilamida y Tritón X100 fueron adquiridos de Winckler Ltda (Santiago, Chile). El cóctel de inhibidores de proteas "Complete" fue adquirido de ROCHE Chile Ltda. El Coomasie Biosafe fue adquirido de BioRad Laboratories. Las columnas de Superosa 12 fueron obtenidas de Pharmacia. El reactivo MES fue adquirido de Phytotechnology Labs TM. La ampicilina, glicina, tris. DTT, IPTG y Hepes fueron adquiridos de UsBiological (Swanpcott, Ma, USA). El metanol y ácido acético fueron adquiridos de TCL Tecnologia y Ciencia ltda. (Santiago. Chile). El luminol fue obtenido de Fluka (SIGMA-Aldrich). La polimerasa PFU Turbo fue obtenida de

Promega Corporation (Madison USA). Los sistemas de filtración Centricon fueron adquiridos desde Millipore Corporation (Billerica, MA USA). La enzima de restricción *EcoRI* fue obtenida de New England BioLabs Inc. La enzima retrotranscriptasa fue adquirida de Promega Corporation. La DNAPolimerasa *Taq* fue adquirida de Fermentas Life Sciences. La sonda de marcaje fluorescente TAMRA fue adquirida de Molecular Probes (Sigma-Aldrich). La biotina para el marcaje de proteínas (Sulfo-NHS-Biotina) fue adquirida de PIERCE Biotechnology, (Rockford, IL, US). Los DNTP fueron adquiridos de Omega. El SDS y el DAPI fueron adquiridos de Apolichem Biotechnology Inc. El hidrolizado de caseína y la triptona se obtuvieron de BD (Becton, Dickinson and Company). El extracto de levadura se adquirió de MoBio Laboratories Inc.

6. METODOLOGIAS

6. a. Purificación de γ -tubulina recombinante. Cepas de *E. coli* BL21 fueron electroporadas con el plásmido de expresión pET11a-Tubg1, portador del gen de la tubulina humana Tubg1 (NM_001070). En la Figura 2 se muestra un esquema del plásmido. Las bacterias transformantes se hicieron crecer en medio LB-ampicilina bajo agitación a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0,6. Al alcanzar la D.O. requerida, se indujo la expresión del gen, mediante la adición de 0,1 mM de IPTG al medio dejando incubar en agitación durante 3 h. Posteriormente las bacterias inducidas fueron colectadas por centrifugación en una centrifuga Sorval RC-3B (para volúmenes de un litro) a 5.000 rpm. Los precipitados de bacteria resultantes fueron lavados dos veces con 20 ml de solución TEN por litro de medio, mediante centrifugación a 5.000 xg. El precipitado resultante fue resuspendido en 10 ml de solución TEN. A esta suspensión se le agregó 10 mM de bisulfito de sodio, 5 mM de DTT, 300 μ l de lisozima (10 mg/ml), 10 mM de MgCl₂ y cóctel de inhibidores de proteasa y se incubó en hielo durante una hora con agitaciones recurrentes. Posteriormente se agregaron 200 μ l de ácido deoxicólico (10% p/v) y se incubó a 37 °C hasta que la solución se tornara viscosa. Posteriormente se agregaron 250 μ l de DNAsa (4 mg/ml) y se incubó una hora a temperatura ambiente. La solución de lisis fue sometida a 6 ciclos de 20 seg de sonicación a 9 watts de potencia. La muestra fue precipitada por centrifugación a 7.000 xg durante 10 min a 4 °C. El precipitado resultante fue lavado por centrifugación tres veces con 10 ml de solución de lisis 2 y posteriormente lavado por centrifugación dos veces en 10 ml de agua nanopure. El precipitado obtenido fue resuspendido en 1 a 2 ml de solución urea 8 M. La resuspensión fue centrifugada durante una hora a 12.000 rpm en una

microfuga y el sobrenadante fue cargado en una columna de Q-Sepharose preequilibrada con buffer urea 8 M. Posteriormente la proteína fue eluida con un gradiente continuo de KCl de 0 a 1 M. Las fracciones obtenidas de la cromatografía fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS teñidos con Azul de Coomassie.

La concentración de γ -tubulina recombinante fue estimada a partir de la absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción teórico de $0,896 \text{ mg}^{-1}\text{ml cm}^{-1}$. Los coeficientes de extinción teóricos fueron calculados utilizando el programa PROTPARAM (Gasteiger y col. 2005) disponible en el servidor de proteómica ExPASy (<http://www.expasy.org>). La absorbancia a 280 nm fue medida usando diluciones de γ -tubulina en solución de medición (amortiguador fosfato 20 mM, pH 6,5, GdmHCl 6 M) en cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y en un espectrofotómetro de arreglo de diodo Hewlet-Packard modelo 8452A.

6. b. Ensayo de renaturación por dilución rápida en GdmHCl. γ -tubulina recombinante fue dializada toda la noche contra 100 volúmenes de una solución de amortiguador Tris 50 mM pH 7,5, GdmHCl 6 M, DTT 1mM. 0,2 mg de proteína fueron diluidos por dilución rápida en tubos de microfuga que contenían 1 ml de concentraciones decrecientes de GndHCl (de 0 a 6 molar en el mismo amortiguador) e incubadas durante una hora en hielo. Posteriormente se obtuvo el espectro de fluorescencia de 350 a 450 nm excitando a 280 nm en espectrofluorímetro PerkinElmer (Luminisence Spectrometer LS50) para observar la fluorescencia intrínseca de los triptófanos. Se midió además la dispersión de luz a 350 nm, excitando a 350 nm. Se utilizó el corrimiento del máximo de emisión como indicador

de cambio de estado. Las curvas fueron ajustadas a una curva sigmoidea cuadrática de dos estados utilizando el programa SigmaPlot® (Systat Software, Inc, Alemania). Las mediciones de dicroísmo circular fueron hechas en un espectro polarímetro JASCO J-600 en cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 mm. La concentración de proteína fue de 0,01 mg/ml. Cada curva corresponde al promedio de 5 mediciones. Se graficó la elipticidad residuo promedio vs. la concentración de desnaturante. Las curvas fueron suavizadas utilizando la función "smoother 2D" del programa SigmaPlot®.

6. c. Marcaje de tubulina recombinante. Se diluyeron 5 mg de tubulina recombinante purificada según el protocolo descrito en la sección (6.a) por dilución rápida en vortex en un tubo que contiene 0,5 mg de TAMRA o BIOTINA, en 1 ml de solución de marcaje (Hepes 25 mM, pH 7,5, Urea 1 M). Se dejó incubando durante una hora en hielo con agitaciones recurrentes. Con la finalidad de separar la sonda no unida de la sonda unida, se cargó la proteína marcada en una columna de Sephadex G25 previamente equilibrada en solución de marcaje y posteriormente se eluyó con el mismo amortiguador. Las fracciones que presentaron proteína fueron separadas y concentradas en sistema Centricon con un corte de 30 kDa (Amicon) hasta llegar al volumen inicial. La proteína marcada y concentrada fue cargada nuevamente en una columna de Sephadex G25 en las mismas condiciones de la cromatografía anterior y eluída con solución de marcaje. Las fracciones de la cromatografía que presentaron proteína fueron concentradas nuevamente en Centricon. Para las proteínas marcadas con TAMRA se procedió a estimar el grado de marcaje espectrofotométricamente utilizando la siguiente fórmula recomendada por el fabricante.

$$ABS_{\text{proteína}} = ABS_{280\text{nm}} - ABS_{555\text{nm}} (0.3)$$

$$\text{Grado de Marcaje} = (ABS_{555\text{nm}} * 51169 \text{ (gr/mol)}) / ([\gamma\text{-tubulina g}] * 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

La fórmula del grado de marcaje es una relación entre la cantidad de moléculas de sonda y la cantidad de moléculas de proteína, de modo que un índice de 1 significa que existe una molécula de sonda por una de proteína. Se trabajó con proteínas que presentaron un grado de marcaje cercano a 1. La concentración de γ -tubulina se obtiene según el método descrito en la sección 6. a utilizando el valor de $ABS_{\text{proteína}}$.

Las proteínas marcadas con biotina fueron analizadas por un ensayo semejante a un inmunoblot, utilizando estreptavidina conjugada con HRP (peroxidasa de rábano) en vez de anticuerpos, revelando por quimioluminiscencia.

6. d. Ensayos de incorporación de γ -tubulina. Para este tipo de ensayos se utilizó γ -tubulina recombinante purificada según el protocolo descrito en la sección (6. a). La proteína recombinante fue marcada con TetraAminoMetil Rodamina (TAMRA) o Biotinilada según el protocolo descrito en la sección (6.c). La proteína recombinante mantenida en solución urea 1 M antes de la inyección, se centrifugó en microfuga a 14,000 rpm por 10 min para evitar agregados. Los embriones tempranos fueron inyectados en estado de una célula con 5 nl de una solución que contenía 1 mg/ml de proteína, utilizando un microinyector con microagujas hechas con capilares de borosilicato de 1,2 mm de diámetro externo, 0,69 mm de diámetro interno y 10 cm de largo (Sutter Instruments. Novato. CA.) en un "puller" (NARISHIGE modelo PC-

10) en dos pulsos de calor (a 88.3 °C y 99,2 °C), micromanipulador y lupa. Los embriones inyectados con γ -tubulina TAMRA fueron llevados de inmediato al microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 135 equipado con cámara CCD Hamamatzu refrigerada modelo C5985; motor en Z (Prior); objetivos Achroplan para bajas magnificaciones (X 10 a 40) y optovar (X 1,6 – 2,5)) para ser observados *in vivo*. O bien, luego de una incubación de 2 h a 28 °C, los embriones fueron decorionados y fijados en solución formalina-ácido acético durante 4 h. Posteriormente lavados 3 veces por 30 min con PBS. Durante el primer lavado se adicionó DAPI 0,01 mM a la solución. Los embriones así tratados fueron montados en solución de montaje y llevados al microscopio de fluorescencia.

La proteína biotinilada se trató del mismo modo que la marcada con TAMRA. Los embriones fueron microinyectados con gotas de 5 nl en estado de 1 célula, se inyectaron alrededor de 300 embriones por experimento, y se incubaron durante 4 h a 28 °C para permitir que continúen con su desarrollo. Posteriormente los embriones fueron tratados con el protocolo de extracción de complejos γ -TURC descrito en la sección (6. f). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por inmunoblot utilizando anticuerpos anti- γ -tubulina y estreptavidina conjugada con HRP, a modo de inmunoblot para poder detectar la proteína biotinilada (ver títulos en Tabla 1).

6. e. Inmunofluorescencias. Los embriones tempranos de pez cebra previamente decorionados fueron fijados en paraformaldehído al 4% v/v en solución PBS durante 4 h, sin agitar, cuidando preservar su integridad. Posteriormente se lavaron 3 veces por 10 min en PBS con ligeras agitaciones manuales de vez en cuando. Los embriones fueron incubados en solución de bloqueo (BSA 0,2%, tween 20 al 0,01%,

DMSO al 1% en PBS) durante 24 h a 4 °C y posteriormente incubados con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en solución de bloqueo (ver títulos en Tabla 1). Al tercer día, se hicieron 3 lavados de una hora en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Posteriormente, los embriones fueron incubados con el anticuerpo secundario durante 4 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (ver título en Tabla 1). El anticuerpo fue lavado por incubación de los embriones en PBS durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4 °C. Al siguiente día los embriones fueron incubados con DAPI 0,01 mM en PBS durante 30 min y posteriormente lavados dos veces por una hora en PBS. En este estado los embriones están listos para montar en solución de montaje (Glicerol:PBS 9:1).

6. f. Extracción de complejos γ -TURC. Se maceraron en homogeneizador (vidrio-teflón) de 5 ml alrededor de 100 embriones sin decorionar en 1 volumen de solución de extracción. El macerado fue centrifugado a 14.000 rpm en microfuga a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante fue cargado en gradientes discontinuos de glicerol (5%, 10%, 20%, 40%) preparados en solución de extracción 2. Los gradientes son preparados la noche anterior en un volumen total de 4 ml. Los gradientes cargados con la muestra fueron centrifugados en un rotor sorval AH650 Sorval a 40.000 rpm durante 4 h a 4 °C. Posteriormente, los gradientes fueron separados de arriba hacia abajo en fracciones de 200 μ l. Las fracciones resultantes fueron analizadas por geles de poliacrilamida-SDS e inmunoblot utilizando anticuerpos anti- γ -tubulina, anti- α -tubulina. Las fracciones que contienen señal de γ -tubulina fueron utilizadas para ensayos de polimerización de microtúbulos *in vitro*.

6. g. Purificación de tubulina de cerebro de pollo. Se extrajeron cerebros de alrededor de 400 cabezas de pollo frescas, tratadas en hielo. Alrededor de 600 ml de cerebros fueron lavados dos veces con un volumen de solución PMS, es importante que esta solución sea mantenida en hielo antes de usar. Posteriormente se agregaron 1,5 volúmenes de PMS a los cerebros para ser homogeneizados en una juguera durante 45 seg. El homogeneizado fue centrifugado durante 40 min a 10.000 rpm en rotor GSA Sorvall previamente enfriado. Posteriormente al líquido sobrenadante se le agrega lentamente 32% de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en hielo y agitación continua. Se deja reposar por 10 min. La solución se centrifuga a 10.000 rpm en rotor GSA Sorvall durante 40 minutos. El precipitado resultante es descartado y al sobrenadante se le adiciona $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ lentamente hasta alcanzar el 43% de saturación, en hielo y agitación continua. Se deja reposar por 10 min y posteriormente se centrifuga a 10.000 rpm en un rotor GSA Sorvall. El precipitado fue resuspendido en PMG utilizando un homogeneizador vidrio-teflón, hasta alcanzar un volumen de alrededor de 50 ml. Los 50 ml se mezclan con alrededor de 300 ml de DEAE-Sephadex A50 previamente equilibrada en PMG. El material cromatográfico fue lavado dos veces con un volumen de PMG-KCl 0,4 M y posteriormente eluido dos veces con 250 ml de PMG-KCl 0,8M. Al total del eluido se le agregó lentamente 43% de saturación de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y se centrifugó durante 40 min a 10,000 rpm en un rotor GSA Sorvall. El precipitado fue disuelto en alrededor de 5 ml de PMG y posteriormente cromatografiado en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 preequilibrada y eluida con PMG a un flujo no menor a 1 ml/minuto. Las fracciones se analizaron induciendo la polimerización de MT por adición de MgCl_2 . Las fracciones que presentaron precipitado blanco fueron centrifugadas a 5.000 xg

durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 2 ml de solución PMG-sacarosa y se dejó dializando contra esta misma solución durante toda la noche a 4 °C. La concentración de tubulina fue estimada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando un coeficiente de extinción de $1,03 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ (Na y Timashef, 1980). La proteína fue congelada en nitrógeno líquido y guardada a -80 °C.

6. h. Ensayo de polimerización de microtúbulos. Para la polimerización de MT fue utilizada tubulina purificada desde cerebro de pollo según el protocolo descrito en la sección (6. g). La tubulina libre de sacarosa fue inducida a polimerizar por temperatura (pasando de 4 a 37 °C) en solución de polimerización. Para la polimerización seguida en espectrofotómetro (observando en el tiempo como cambia la absorbancia a 350 nm durante la reacción) se utilizó una cubeta de cuarzo con camisa interna para lograr cambios rápidos de temperatura. Las curvas obtenidas fueron ajustadas a un modelo sigmoideo de dos variables (SigmaPlot). El punto medio fue graficado como tiempo medio de latencia versus cantidad de extracto de γ -TURC adicionado (Figura 8). Para los ensayos seguidos por inmunoblot se indujo la polimerización por temperatura pasando de 4 a 37 °C en solución de polimerización, las muestras fueron tomadas a los 0, 5 y 15 min de reacción y precipitadas por Airfuge BECKMAN a 100.000 xg durante 5 minutos. Los líquidos sobrenadantes y los precipitados fueron separados y analizados por geles de acrilamida-SDS teñidos con Azul de Coomasie y por inmunoblot utilizando anticuerpos anti- γ -tubulina.

6. i. Purificación de CCT. 100 g de testículos de toro fueron macerados en batidora

en presencia de 1 volumen de solución H (al cual se le agrega PMSF 1 mM, DTT 1 mM e inhibidores de proteasa en el momento de usar). El homogeneizado fue filtrado por 3 a 4 capas de gasa. Posteriormente el filtrado fue vuelto a lisar en un homogeneizador (vidrio-teflón) y filtrado nuevamente por 3 a 4 capas de gasa. El filtrado fue centrifugado durante 30 min a 9.000 rpm en rotor Sorvall SS34 a 4 °C. El sobrenadante resultante fue ultracentrifugado en un rotor Beckman 50.2Ti durante una hora a 34.000 rpm. El sobrenadante que contiene la fracción citosólica fue vuelto a filtrar por gasa. Al filtrado se le añade lentamente $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hasta llegar al 30% de saturación en hielo. Se dejó incubar 30 min y posteriormente se centrifugó durante 30 min en rotor Sorvall SS34 a 10.000 rpm a 4 °C. Al sobrenadante se le volvió a añadir $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hasta alcanzar el 50% de saturación. Después de 30 min de incubación, fue centrifugado en rotor sorval SS34 a 10.000 rpm durante una hora a 4 °C. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en 10 ml de solución A (a la cual se le agrega PMSF 1mM, DTT 1mM e inhibidores de proteasa en el momento de usar) y puesto a dializar contra 1 l de esta misma durante 2 h. Posteriormente la muestra dializada fue cargada en gradientes discontinuos de sacarosa (preparados del siguiente modo; 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27.5%, 30%, 32.5%, 35%, 37.5% y 40% de sacarosa preparados en solución A) y centrifugados en un rotor Beckman SW28 a 23,500 rpm durante 17 h a 4 °C. Los gradientes una vez centrifugados fueron separados en fracciones y éstas analizadas por geles de electroforesis en geles de acrilamida-SDS. Las fracciones que presentan mayor enriquecimiento de CCT fueron dializadas contra 1 l de solución A toda la noche a 4 °C. La muestra dializada fue cargada en una columna de afinidad Heparin-Sepharose (5ml) preequilibrada con solución A y posteriormente eluida mediante un gradiente

de elusión entre las soluciones A y B (1. del 0 al 15% de B en 4 vol de columna. 2. de 15 al 100% de B en 7 vol de columna 3. 100% de B en 1 vol de columna). Las fracciones procedentes del cromatograma fueron analizadas mediante electroforesis en geles de acrilamida-SDS (10%). Las fracciones mas enriquecidas en CCT fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80 °C.

6. j. Ensayo de interacción por geles. Se hicieron reaccionar 14,5 µg CCT purificada según la metodología descrita en la sección 6. i y 22 µg de γ -tubulina recombinante en una relación molar de 1:30 en 50 µl de solución A. La reacción fue incubada a 30 °C durante 30 min para permitir la interacción. Posteriormente las muestras se cargan en un gel nativo de poliacrilamida (10%) que es corrido al menos durante 6 h a 4 °C (1ª dimensión). Utilizando la tinción Coomassie Biosafe (Biorad) es posible teñir parte del gel para observar donde se encuentra el complejo CCT- γ -tubulina. Se escindieron pequeños fragmentos de los carriles a la altura del complejo CCT- γ -tubulina visto por Coomassie Biosafe. Los pequeños fragmentos de gel fueron incubados a 95 °C durante 5 min con solución de carga (SDS) para ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 10% (2ª dimensión) tiñendo posteriormente con Azul de Coomasie. Cuando existe interacción aparece γ -tubulina junto con CCT en la 2ª dimensión. Los carriles fueron analizados por densitometría utilizando el programa LABWORKS (Perkin Elmer. Inc), para estimar las cantidades relativas de interacción.

6.k. Microscopía electrónica de complejos CCT- γ -tubulina. Se hicieron reaccionar 87 µg de CCT purificada de testículos de bovino (metodología sección 6. i) con 16

μg de γ -tubulina recombinante (sección 6. a) en una relación molar de 1:3,5, mediante dilución rápida en vortex en un volumen de 300 μl de solución A. La reacción fue incubada a 30 °C durante 30 min. Los complejos CCT- γ -tubulina fueron separados de la proteína no unida mediante cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna de Superosa 12 (Pharmacia) preequilibrada en bufer A. Las fracciones obtenidas de la cromatografía fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de coomassie. La fracción con mayor cantidad de CCT fue utilizada para preparar las grillas de microscopía de fluorescencia. Las grillas de Cobre-Rodio fueron preparadas según la metodología de tinción negativa en acetato de uranilo: las grillas fueron incubadas 2 min con la muestra sin diluir, lavadas rápidamente en agua nanopura y posteriormente incubadas durante 1 min en acetato de uranilo 2 mg/ml. Las grillas fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transferencia Geol 100, utilizando 80 Watts de potencia. Las fotografías de microscopía fueron tomadas todas a 20.000 aumentos utilizando la metodología de enfoque de dosis baja (low dose).

6. I. Procesamiento de imágenes de microscopía electrónica. Para el mejoramiento de la resolución de las partículas de complejos γ -tubulina-CCT en las micrografías de microscopía electrónica de transmisión (según la metodología descrita en la sección 6. k.), se utilizó el procedimiento de alineamiento por máxima probabilidad (maximum likelihood alignment) del paquete de programas XMIPP desarrollado en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, Madrid-España (<http://xmipp.cnb.csic.es>).

Para esto se seleccionaron a mano partículas individuales desde las micrografías de

microscopía electrónica tomadas según la sección 6.k previamente digitalizadas en un digitalizador Zeiss. La selección se realizó utilizando el programa Xmipp_Mark. Posteriormente las partículas seleccionadas fueron cortadas mediante el programa Xmipp_scissor en imágenes de 100 x 100 píxeles. Todas las imágenes de partículas seleccionadas fueron normalizadas utilizando el método Ramp del programa Xmipp_normalize. Las imágenes de partículas únicas seleccionadas y normalizadas se alinearon para mejorar su resolución utilizando la metodología de alineamiento rápido por máxima probabilidad del programa Xmipp_MLalign2D (Fast maximum likelihood 2D Alignment) (Scheres y col., 2005a; Scheres y col., 2005b) del paquete de programas Xmipp. Se consideró oportuno correr un MLalign2D de siete referencias con un total de 3.980 partículas. Se tomaron todas las partículas de las referencias que mostraban la cavidad de CCT llena. Estas partículas se juntaron en un solo grupo y se realizó con ellas varios pasos de alineamientos rotacionales y traslacionales. Lo mismo para las partículas vacías. Luego del alineamiento se utilizó el programa xmipp_classify_kernersom para clasificarlas según heterogeneidades. Posteriormente fueron seleccionadas el grupo de partículas del mejor alineamiento para ser alineadas nuevamente mediante el programa Xmipp_MLalign2D, con lo cual se generó la imagen promedio de partículas de CCT vacías, partículas de CCT- γ -tubulina y complejos ternarios CCT- γ -tubulina-anticuerpo.

6. m. Mutaciones sitio-dirigidas. Las mutaciones sitio-dirigidas fueron realizadas utilizando el kit de mutagénesis por PCR Quickexchange de Stratagene (La Jolla, CA, USA). El plásmido utilizado como templado fue para todos los casos el pET11a-

Tubg1 descrito en la Figura 2. Los partidores utilizados para la mutación M249E fueron; Reverso 3'GAT GAG GTC ATT GTT CTC GTA GCC AGG GTA GCG5'; delantero 3'CGC TAC CCT GGC TAC GAG AAC AAT GAC CTC ATC5'. La proteína quimérica del Loop T7 fue lograda con tres mutaciones secuenciales utilizando las siguientes parejas de partidores, Mutación M249L; Reverso: 3'GAG GTC ATT GTT CAG CTA GCC AGG AAA GC5'; delantero: 3'GCT TTC CTG GCT ACC TGA ACA ATG ACC TC5'; Mutación Y245F: Reverso 3'GTT CAT GTA GCC AGG AAA GCG CAG GGT GGT G5'; delantero 3'CAC CAC CCT GCG CTT TCC TGG CTA CAT GAA C5'; Mutación Y248Q: Reverso 3'GAG GTC ATT GTT CAG CTG GCC AGG AAA GCG CAG5'; delantero 3'CTG CGC TTT CCT GGC CAG CTG AAC AAT GAC CTC5'.

Todas las reacciones de PCR para mutagénesis se realizaron utilizando la enzima PFU-turbo de Stratagene (La Jolla, CA. USA) en las siguientes condiciones; 10 ng de DNA templado; 125 ng de cada partidore; 0,5 mM de DNTP (ATP, GTP, CTP y TTP) y amortiguador específico del enzima. EL ciclo de PCR utilizado fue el que sigue; paso 1) 95 °C por un minuto; paso 2) 95 °C por 50 seg; paso 3) 60 °C por 50 seg; paso 4) 68°C durante un minuto por cada kb del plásmido templado (para el caso de pET11a-Tubg1 se utilizó 7 min) después de este paso se vuelve al paso 2) 18 veces, completando 19 ciclos. Posteriormente se da un último paso de elongación a 68 °C durante 7 min. Los productos de las reacciones de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción Dpn1 (Stratagene) incubando la reacción durante una hora a 37 °C.

Los plásmidos resultantes fueron introducidos mediante transformación en cepas ultra-competentes de *E. coli* XL10-Gold (Invitrogene). La transformación se

hizo por choque térmico a 42 °C durante 30 seg de una solución que contenía las cepa bacteriana y 2 ml del plásmido producto de la reacción de mutagénesis previamente digerido con DnpI. Luego, las bacterias fueron incubadas en medio NZY⁺ broth durante 1 h a 37 °C y posteriormente fueron plaqueadas en medio restrictivo, LB-Ampicilina. De las colonias resultantes se seleccionaron tres clones para cada mutación, a estos se les extrajo el DNA plasmidial utilizando el kit E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit II de Omega Bio-Tek (Doraville, GA, USA). Los plásmidos fueron analizados por digestión con enzimas de restricción utilizando las enzimas *Eco*R1 y *Hind*III (Fermentas), que poseen sitios únicos de restricción dentro del plásmido. Los plásmidos se analizaron en cuanto a su capacidad de sobreexpresar γ -tubulina (sección 6.p) y su secuencia fue confirmada por secuenciación en la empresa MACROGENE (Seúl, Korea). Los plásmidos seleccionados fueron llamados pET11a-Tubg-M249E y pET11a-Tubg-T7 β dependiendo de la mutación que portan.

6. n. Extracción de RNA de embriones tempranos del pez cebra y RT PCR. Se lizaron al rededor de 100 embriones tempranos del pez cebra utilizando 200 μ l de TRIZOL y se agitó fuertemente mediante vortex para lograr un lisado completo. Posteriormente el homogenizado se separó en dos fases adicionando 40 μ l de cloroformo (CHCl_3), agitando manualmente durante 15 seg y luego de una breve incubación de 3 min, se centrifugó a 12.000 rpm en una microfuga durante 15 min a 4 °C. Se separó manualmente la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa fue traspasada a un tubo de microfuga nuevo al cual se le agregaron 100 μ l de isopropanol y se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm en microfuga a 4 °C. El precipitado fue lavado con 200 ml de etanol al 75% mediante centrifugación a 12.000 rpm en microfuga a 4 °C. El precipitado resultante fue resuspendido en agua nanopura esteril. Todo el procedimiento fue hecho en condición libre de RNAsas. La concentración de RNA fue estimada espectrofotométricamente midiendo la absorción a 260 nm utilizando la siguiente relación:

$$1 \text{ D.O. } 260 \text{ nm} = 40 \text{ mg RNA/ml}$$

6. o. RT-PCR. La retrotranscripción fue hecha utilizando la retrotranscriptasa M-MLV Reverse Transcriptase de Promega (Madison, WI. U.S). Para ello se utilizaron 2 µg de RNA; 2 pmoles del partidor específico tubg11 reverso; 0,5 mM de DNTP y 200 unidades totales de retrotranscriptasa más el amortiguador específico del enzima. El programa de termociclador que se utilizó para la reacción fue: 70 °C durante 5 min antes de agregar la enzima y el amortiguador. La reacción se transfiere rápidamente a hielo y se incuba un minuto. Se agrega el amortiguador específico del enzima, se mezcla y posteriormente se agrega el enzima. Luego se transfiere nuevamente al termociclador donde se continúa con el siguiente programa: 25 °C durante 10 min. 42 °C durante 50 min y posteriormente a 70 °C por 15 min. El cDNA generado se utiliza directamente en la reacción de amplificación por PCR.

Para la amplificación por PCR se utilizó la *Taq*-polimeraza de Invitrogene (Carlsbad, CA, U.S.). La reacción se realizó como sigue: 0,4 mM de DNTP; 0,15 mM de MgCl₂ (Invitrogene), 0,5 µM de ambos partidores tubg11 (delantero y reverso), 2 µl del cDNA resultante de la retrotranscripción, amortiguador específico de la polimerasa (sin MgCl₂) y 100 unidades totales de *Taq*-polimerasa.

El programa de termociclador utilizado para la reacción fue el siguiente; Paso 1) 95 °C durante 1 min. Paso 2) 95 °C durante 1 min. Paso 3) 65 °C durante 30 seg. Paso 4) 72 °C durante 1 min, el programa regresa 28 veces al paso 2). Luego del ultimo ciclo se agregó un paso de elongación, paso 5) de 72 °C durante 10 min. El resultante de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, tiñendo con bromuro de etidio.

6. p. Ensayos de sobreexpresión. Se transformaron por electroporación cepas de *E. coli* BL21 con los plásmidos pET11a-Tubg, pET11a-Tubg-M249E y pET11a-Tubg-T7 β . Las transformantes fueron plaqueadas en medio restrictivo LB-ampicilina. Se seleccionó una colonia de cada cepa portadora de plásmido para hacer un preinóculo. Posteriormente se crecieron las bacterias de cada cepa por separado a partir de los preinóculos en medio LB-ampicilina a 37 °C en agitación hasta alcanzar una D.O. A 600 nm de 0,6. En este punto se separaron los cultivos en 5, a cuatro de éstos se les adicionó 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 mM de IPTG respectivamente y se dejó uno sin IPTG. Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C en agitación durante 3 h. Posteriormente 1 ml de los cultivos fue precipitado por centrifugación y lavado tres veces por centrifugación con agua nanopura de modo de eliminar todo el medio de cultivo. Posteriormente los precipitados de bacteria fueron lisados directamente en solución de carga (SDS) por incubación a 95 °C. durante 10 min.

6. q. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se realizaron según Laemmli (1970). Se utilizó acrilamida al 10% en el gel separador y 4% en el gel concentrador, preparados en las

soluciones de gel separador y de gel concentrador respectivamente. Las muestras fueron disueltas en solución de carga e incubadas a 95 °C durante 5 min y posteriormente fueron cargadas en los pocillos. La electroforesis se hizo a corriente eléctrica constante de 25 mA hasta que el frente de corrida esté cercano a caer. Los geles fueron o bien teñidos con solución de tinción de azul de Coomassie y desteñidos posteriormente con solución de distinción. O bien fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar immunoblots.

6. r. Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones nativas. Los análisis de complejos CCT- γ -tubulina hechos por electroforesis en gel de acrilamida en condiciones nativas, fueron realizados en geles de dos fases, la primera, a modo de gel concentrador fue preparada al 3% de acrilamida en amortiguador TRIS 30 mM pH 6,8 y la segunda fue preparada al 6% de acrilamida en amortiguador TRIS 375 mM pH 8,8. Las muestras fueron preparadas en solución de carga (gel nativo) y cargadas en los pocillos. Los geles fueron corridos a corriente eléctrica constante de 100 mA durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se escindió una región del gel para ser teñida con solución de azul de Coomassie BioSafe (BioRad) y ser usada como testigo para con el resto del gel continuar con el experimento de interacción (sección 6. j)

6. s. Preparación de células electrocompetentes y electroporación. Las células fueron crecidas en medio LB hasta alcanzar una D.O. de 0,6 a 600 nm. Luego fueron colectadas por centrifugación en tubos de microfuga fríos y posteriormente lavadas tres veces por centrifugación en glicerol al 10% estéril y frío. Las células

electrocompetentes quedaron concentradas alrededor de 10 veces en comparación al volumen del cultivo inicial. Para electroporar se mezclaron 30 μ l de células electrocompetentes con 2 a 5 μ l de DNA. La electroporación se realizó en un equipo Bio-Rad Gene Pulser acoplado a un controlador de pulso. El voltaje utilizado fue de 2500 V, la resistencia de 200 Ohms y la capacitancia de 25 μ Fd. Una vez dado el pulso las células fueron incubadas durante una hora a 37 °C en un ml de medio LB. Posteriormente fueron plaqueadas en medio restrictivo LB-ampicilina.

6. t. Inmunoblots. Se realizó la transferencia de las proteínas directamente desde el gel de poliacrilamida-SDS a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante electrotransferencia, en solución de transferencia. La electrotransferencia fue realizada a un voltaje fijo de 100 V y amperaje variable, durante 90 min a -20 °C. Posteriormente las membranas fueron incubadas durante toda la noche en solución de bloqueo (inmunoblot) a 4 °C. Las membranas bloqueadas fueron incubadas en anticuerpo primario (ver títulos en Tabla 1) disuelto en 5 ml de solución de bloqueo con agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces con 20 ml de solución TBS-Tween20 al 0,1% . Las membranas ya lavadas fueron incubadas con anticuerpo secundario fusionado a la peroxidasa de rábano (HRP) disuelto en solución de bloqueo durante una hora con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces en solución TBS-tween20 al 0,1%.

El revelado de las membranas fue realizado por el método de quimioluminiscencia. Para esto las membranas fueron incubadas en solución de revelado por tres minutos a temperatura ambiente en cuarto oscuro. Posteriormente

se expuso la membrana a una película fotográfica (Fuji Medical X-Ray Film. FUJIFILM. Tokio, Japón) durante el tiempo necesario para que la señal aparezca. Los films fueron desarrollados en maquina de revelado automática marca AGFA modelo Curix60.

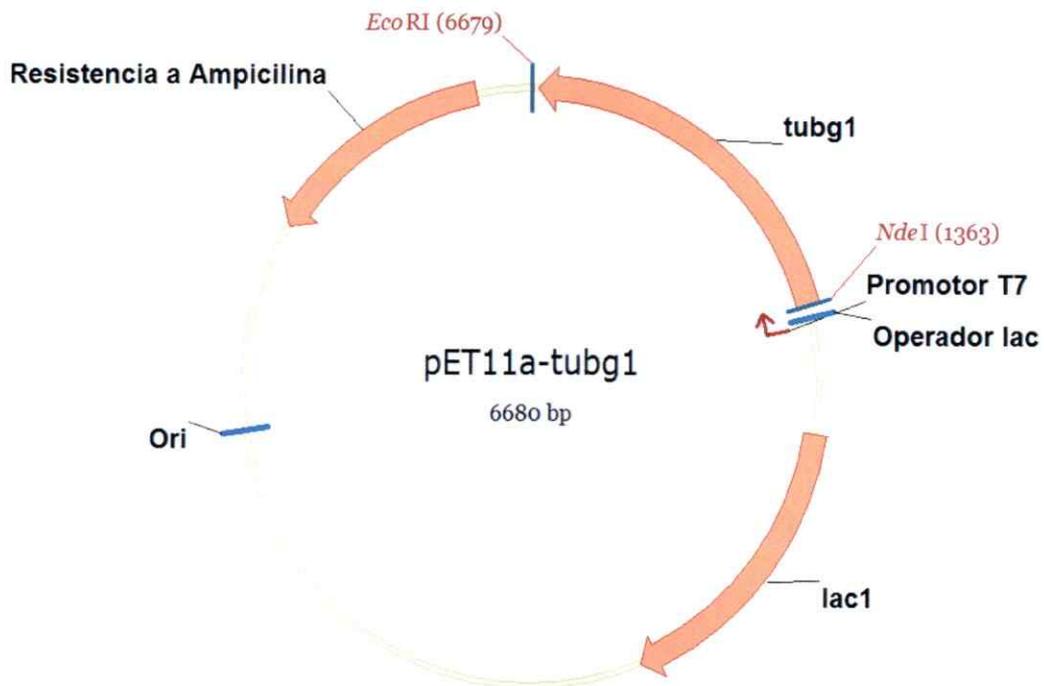


Figura 2. Representación esquemática del plásmido de sobreexpresión Pet11A- γ -tubulina. El plásmido posee clonado el gen de la γ -tubulina humana (AAF34188.1) corriente abajo del promotor T7 del vector. Las flechas anaranjadas representan el gen *lac1*, el gen que confiere resistencia a ampicilina y el gen de γ -tubulina. Se resaltan los sitios de corte con enzima de restricción con los cuales fue clonado el gen (*EcoRI* y *NdeI*). El promotor del fago T7, el operador *lac* y el origen de replicación (*ori*).

7. RESULTADOS.

7. a. Expresión de γ -tubulina en embriones tempranos del pez cebra. No hay mucha información acerca de la expresión de γ -tubulina en el pez cebra. De hecho, no se sabe si la γ -tubulina se sintetiza durante los estadios más tempranos del desarrollo. Es sabido que los embriones no expresan su genoma hasta el estadio de blástula intermedia (Kane y Kimmel, 1993; Pellegrini, 2003). Por ende la función de la γ -tubulina puede depender de un conjunto preexistente de proteína depositada en el ovocito durante la ovogénesis, como un producto materno y por ende la vía de síntesis de γ -tubulina puede no estar operativa en los embriones. Esto es fundamental para la metodología que se propuso implementar, pues implica que la proteína recombinante micro-inyectada en los embriones podría no llegar a ser plegada correctamente. Para determinar que la vía de síntesis y plegamiento de las tubulinas está operativa en los embriones tempranos del pez cebra, se hicieron experimentos tendientes a detectar la presencia del mensajero de γ -tubulina y determinar los niveles de expresión de la proteína en distintos estadios del desarrollo temprano.

Se analizó mediante inmunoblot los niveles de expresión de la γ -tubulina durante el desarrollo temprano del pez cebra. En la Figura 3A se muestra un inmunoblot anti- γ -tubulina y anti-actina (a modo de control de carga) de lisados crudos de embriones de 1 a 11 h de desarrollo. Se observa en el inmunoblot de la Figura 3A que los extractos de embriones muestran una sola banda de γ -tubulina. Entre las 8 y 11 h del desarrollo hay una disminución de la proteína. Al normalizar las densitometrías por la señal de actina y aplicar un análisis estadístico mediante un test de Student, observamos que no hay diferencias significativas en cuanto a la expresión de γ -tubulina durante el desarrollo temprano del pez cebra entre los

estadios analizados.

Los experimentos anteriores no permitieron discriminar si existe síntesis *de novo* y degradación de γ -tubulina en los embriones, pues los niveles de proteína se mantienen constantes. Por tanto, para dilucidar si existe síntesis y degradación de la γ -tubulina en el embrión, se abordó el problema mediante la siguiente estrategia: Si el mensajero de γ -tubulina se encuentra en los estadios tempranos del embrión, es posible que se esté traduciendo, de modo que puede ser silenciado, así, cuando se bloquea la traducción, la cantidad de γ -tubulina disminuirá en función de su tiempo de recambio. Con este propósito se detectó el mensajero de la única secuencia de cDNA de γ -tubulina disponible en la base de datos del pez cebra ZFIN (www.zfin.org), el gen *tubg1l* (NM_200908.1). En la Figura 3B se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR hecho con cDNA preparado por retrotranscripción desde extractos de RNA de cigotos. Los partidores se diseñaron para flanquear el sexto intrón en la secuencia cromosómica (Ensemble Zebrafish: ENSDARG00000015610) de modo que cualquier amplificado desde DNA cromosómico tendrá un tamaño mucho mayor. El producto de PCR que se observa en el gel de la Figura 3B tiene el tamaño esperado de 400 pb y su identidad se confirmó mediante secuenciación. Este resultado asegura que el mRNA del gen de γ -tubulina del pez cebra está presente en los estadios más tempranos del desarrollo y por ende es susceptible de ser silenciado traduccionalmente. Estos resultados se confirmaron en un trabajo reciente, donde se detectó la presencia del mensajero de γ -tubulina mediante hibridización *in situ* en el ovario, ovocito y embrión del pez cebra (Liu y Lessman, 2008).

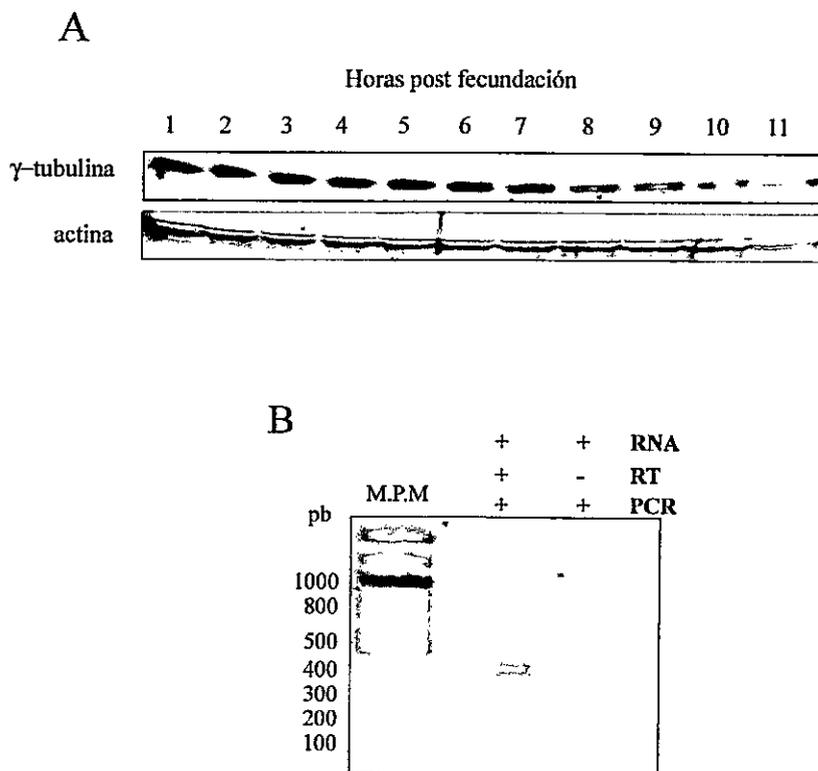


Figura 3. Expresión de γ -tubulina en embriones tempranos del pez cebra. En **A** se muestra un inmunoblot revelado con un anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina y un anticuerpo policlonal anti-actina (control de carga). Las muestras corresponden a embriones del pez cebra provenientes del mismo cruce, lisados a distintos estadios del desarrollo temprano. Los embriones se incubaron a 28 °C durante el tiempo indicado en la Figura. En **B** se muestra un gel de agarosa al 1% donde se cargó el producto de PCR proveniente de cDNA sintetizado a partir de mRNA de embriones del pez cebra de 1 h de desarrollo. Los partidores utilizados en la reacción de PCR son específicos para amplificar el gen de γ -tubulina del pez cebra. A modo de control negativo se realizó el mismo procedimiento en ausencia de retrotranscripción.

El silenciamiento del mRNA de γ -tubulina se realizó mediante el sistema de silenciamiento por oligo morfolino anti-sentido (Mo), el cual es ampliamente utilizado con estos fines en pez cebra. La molécula de Mo es muy resistente a la degradación enzimática y tiene la misma capacidad de hibridación que el RNA (Corey y Abrams, 2001). Mediante este sistema es posible silenciar la expresión de un mRNA por impedimento estérico de la unión al ribosoma. Para esto es necesario diseñar un Mo que hibride con el mensajero en la región que abarca el primer codón del gen. El Mo diseñado, llamado Mo-tubg11, se microinyectó en cigotos del pez cebra a varias concentraciones. En la Figura 4 se muestran micrografías de embriones de pez cebra inyectados con 5 nl de Mo-tubg11 0,1 mM y 0,6 mM y embriones inyectados con el vehículo de inyección, todos pertenecientes al mismo cruce. Como se observa en la Figura 4B, los embriones inyectados con 0,1 mM de Mo-tubg11 presentaron un fenotipo ventralizado, claramente anormal a las 24 h post fecundación. Este fenotipo es muy reproducible, pues el 95% (+/-5) de los embriones lo presentó. Sin embargo, estos embriones no presentaron un fenotipo diferenciable de los embriones control antes de las 12 h de desarrollo. Al inyectar 5 nl de Mo tubg11 a concentraciones superiores de 0,3 mM, apareció otro fenotipo, también muy claro y reproducible. El Mo a estas concentraciones tuvo un efecto mucho más temprano. Como se observa en la Figura 4C, al inyectar 0,6 mM de Mo-tubg11, el desarrollo de los embriones se detuvo entre los estados de 50% y 70% de epibolia (Kimmel y col., 1995). Estos embriones se mantuvieron aparentemente vivos después de 24 h post-fecundación a pesar de que su desarrollo se detuvo. Los embriones inyectados con el Mo-tubg11 que presentan este fenotipo serán llamados embriones “morfantos”.

El análisis de la expresión por inmunoblot de γ -tubulina de extractos crudos de embriones morfantes para confirmar el silenciamiento de la expresión mostró que, la γ -tubulina persiste aun hasta las 24 h post fecundación (Figura 4D). Las densitometrías de la señal de γ -tubulina en los inmunoblots normalizada por la señal de actina, no mostraron diferencias significativas entre los embriones morfantes y los embriones control (test de Student). Indicando que los niveles de γ -tubulina no disminuyen.

Se analizó por inmunofluorescencia el citoesqueleto de microtúbulos y la distribución de γ -tubulina en los embriones morfantes. En la Figura 5 se muestran las inmunofluorescencias contra α -tubulina del blastodermo de un embrión control en estado de 70% de epibolia (Figura 5A), el blastodermo de un embrión morfante (0,5 mM) de 24 h post fecundación (Figura 5B) y de los microtúbulos corticales de un embrión morfante de 24 h post fecundación (Figura 5C). Se observa que en los embriones morfantes la polimerización de microtúbulos no desaparece completamente. Aparecen microtúbulos dispersos en el citoplasma pero sin organizarse en estructuras definidas, como las que se observan en los blastómeros del embrión control (en el mismo estadio del desarrollo en que se detienen los morfantes (Figura 5A). En los embriones morfantes no se observaron blastómeros en mitosis y los microtúbulos no parecen organizarse en un centro organizador de microtúbulos. En la Figura 5C se observan microtúbulos corticales, los cuales intervienen en el proceso de gastrulación (Solnica-Krezel y Driever, 1994) estos continúan apareciendo, sin embargo en la capa sincicial del vitelo no se observan arreglos de microtúbulos interfásicos ni mitóticos.

En la Figura 5D se observa la inmunofluorescencia de un embrión morfante

teñido contra γ -tubulina y con la tinción de DAPI para observar los núcleos. Se observa que la señal de γ -tubulina aun persiste en las células. Esta se encuentra dispersa por el citoplasma, formando pequeños agregados. Este resultado es consistente con lo que se ha visto en los inmunoblots de la Figura 4; la γ -tubulina de los morfantes no desaparece, sin embargo, los embriones dejan de desarrollarse.

En la Figura 6 se observa una tinción DAPI de núcleos, del blastodermo de embriones morfantes de 24 horas post fecundación, fijados en paraformaldehído al 4%. En las micrografías se observa que todos los núcleos de las células de los morfantes se encuentran en un mismo estado del ciclo celular, semejante al de profase temprana (ver más adelante), con núcleos de gran tamaño y cromatina con cierto grado de condensación. No se observaron células en un estado distinto del ciclo celular.

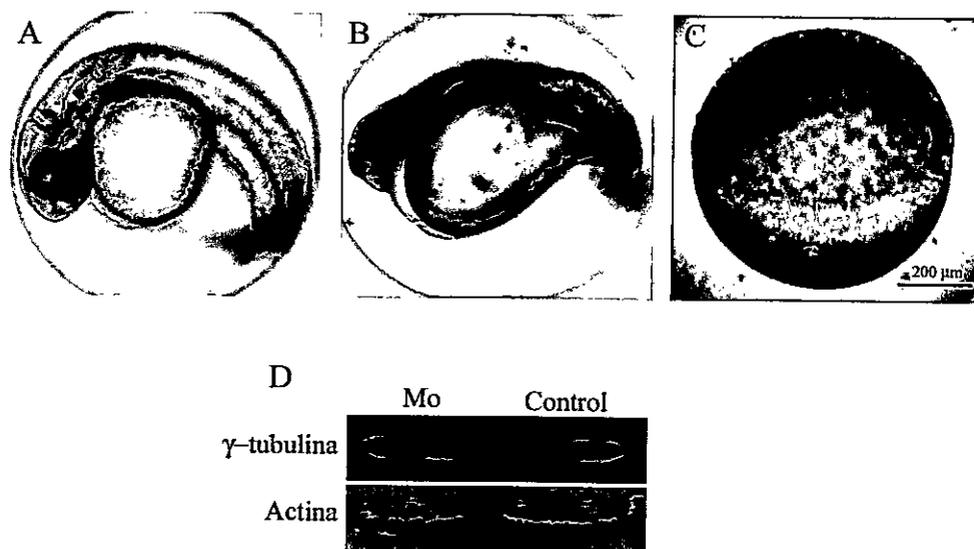


Figura 4. Silenciamiento del gen de γ -tubulina en embriones del pez cebra mediante el uso de oligomorfolino antisentido (Mo). En A, B y C, se muestran micrografías de microscopía de campo claro de embriones de 24 horas de desarrollo incubados a 28 °C. En A se muestra un embrión control, inyectado con 5 nl de medio de inyección sin Mo. En B se muestra un embrión inyectado con 5 nl de Mo 0,3 mM y en C se muestra un embrión inyectado con 5 nl de Mo 0,6 mM. En D se muestra un inmunoblot de lisados de embriones inyectados con Mo 0,6 mM (Mo) y embriones control de 24 h post fecundación, revelando contra γ -tubulina y contra actina como se indica. Los embriones se incubaron a 28 °C.

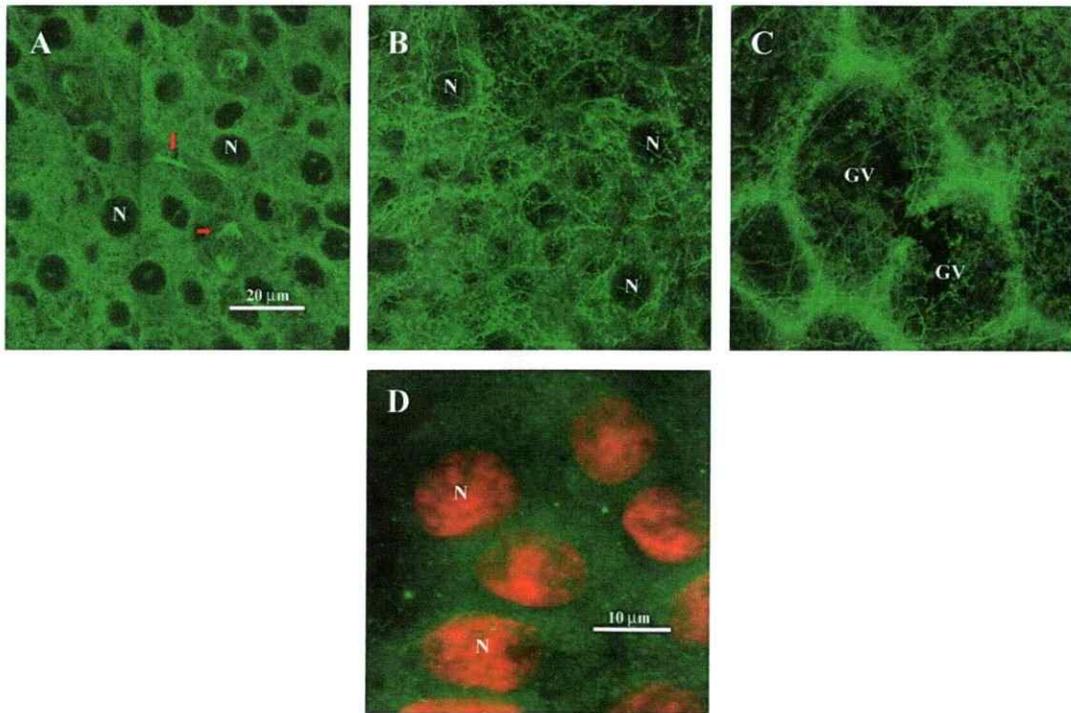


Figura 5. Inmunofluorescencias del citoesqueleto de microtúbulos, γ -tubulina y núcleo de células de embriones morfantes. Los embriones se inyectaron con 0,5 mM de morfolino Mo-tubg11. En A se muestra una inmunofluorescencia hecha con el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina de embriones controles sin inyectar en estado de 70% de epibolia (5 h post fecundación a 28°C). En B se muestra una inmunofluorescencia de embriones morfantes de 24 h pf. con el anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina. En C se muestra una micrografía de los microtúbulos corticales de embriones morfantes de 24 h post fecundación marcados con anticuerpo monoclonal-anti- α -tubulina. En D se muestra una inmunofluorescencia de embriones morfantes de 24 h post fecundación revelando contra γ -tubulina (en verde) tiñendo el núcleo con DAPI (en rojo). N = Núcleo, GV = Gránulo de vitelo. Las flechas rojas indican estructuras formadas por microtúbulos en el interior de las células.

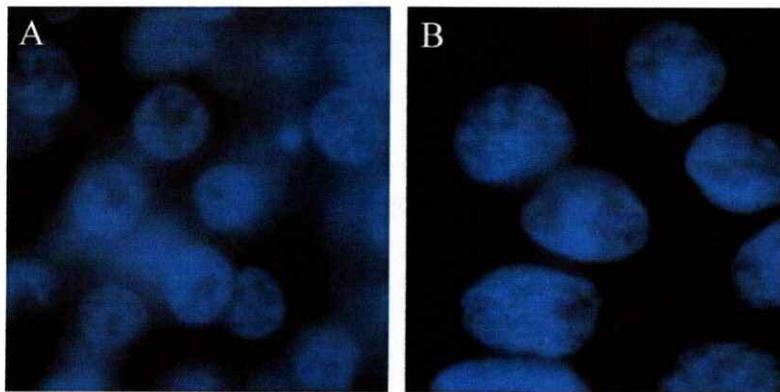


Figura 6. Microscopía de fluorescencia de núcleos de embriones morfantes de 24 h post fecundación. En A y B se muestran dos campos distintos en los cuales se observan núcleos (azul) teñidos con DAPI del blastodermo de embriones morfantes.

7. b. Distribución celular de γ -tubulina endógena en embriones tempranos del pez cebra. Se analizó mediante inmunofluorescencia la distribución celular de γ -tubulina endógena en el pez cebra. En la Figura 7 se muestran las inmunofluorescencias de células de embriones de dos a cuatro horas post fecundación; en A, B y C, las células marcadas se han marcado con γ -tubulina y la tinción nuclear con DAPI. En D, E y F, se muestran las células marcadas con un anticuerpo anti- α -tubulina y DAPI.

La señal correspondiente a γ -tubulina en las células de los embriones aparece siempre cercana al núcleo. Al hacer una comparación entre las Figuras 7A, B y C, es evidente que la distribución de γ -tubulina sufre modificaciones durante el ciclo celular. Su distribución es diferente dependiendo del estado del ciclo en que se encuentre la célula. Como ya hemos dicho, la γ -tubulina forma parte del material pericentrosomal. Por ende, los reordenamientos que sufre la γ -tubulina durante el ciclo celular son representativos de reorganizaciones que sufre el centrosoma. Así, en la Figura 7A se muestra una célula interfásica (a juzgar por el estado de condensación de la cromatina, en rojo). Aquí, la señal de γ -tubulina se ve dispersa a un costado del núcleo. Su distribución es bien delimitada pero no homogénea, formando pequeños cúmulos dentro. En la Figura 7B se observa un par de células que están en estado de anafase. Se observan en rojo los grupos de cromátidas separándose y la señal de γ -tubulina ubicada al costado de cada uno. En este estado del ciclo, la señal de γ -tubulina se ve mucho más compacta. En la Figura 7C, la célula que se muestra está en un estado de profase tardía, a juzgar por el estado de condensación de la cromatina. Aquí, la señal de γ -tubulina se ve como una nube alargada hecha de muchos cúmulos discretos de señal. En todos los casos, la

localización de la γ -tubulina no es homogénea.

En las micrografías D, E y F de la Figura 7, los embriones se realizaron inmunofluorescencias con un anticuerpo anti- α -tubulina para marcar el citoesqueleto de microtúbulos. En la Figura se observan los microtúbulos y los reordenamientos que sufre durante el transcurrir del ciclo celular. Así, en la Figura 7D, en las células en interfase, los microtúbulos se observan distribuidos por todo el citoplasma radiando desde dos puntos muy cercanos al núcleo. En la Figura 7E, las células se encontrarían en interfase temprana. En la Figura 7F, las células se encuentran en estado de metafase y en ellos se observa claramente el haz del uso mitótico y los microtúbulos astrales.

Es evidente que el citoesqueleto de microtúbulos cambia en cuanto a su organización durante el transcurso del ciclo celular. En la Figura 8 se muestra una reconstrucción de todos los cambios que sufre la γ -tubulina durante el ciclo celular. Estos podrían corresponder a cambios que sufre el centrosoma como un todo. La Figura 8 muestra una serie de micrografías de células de embriones de pez cebra de 2 h post fecundación. Las células se encuentran en el estado del ciclo celular indicado para cada micrografía. Así, durante la metafase, el material pericentrosomal se encontraría muy compactado. La célula posee dos centrosomas, en cada extremo del huso, que se encuentran a su vez en el ecuador de la célula. Durante la anafase, los centrosomas no perderían su estado de compactación. Durante la telofase las células comienzan a separarse y cada una recibe un juego de cromosomas y un centrosoma. El único centrosoma de la célula telofásica se dispersa abarcando mayor área dentro de la célula, pero manteniéndose siempre asociado a los cromosomas, que aun presentan un alto grado de compactación. Durante la interfase, la cromatina se

descondensa y aparece el núcleo. Durante este periodo, el centrosoma que se encontraba disperso se vuelve a compactar hacia el núcleo. Al entrar en un nuevo ciclo, la cromatina comienza nuevamente a condensarse y el material pericentrosomal se vuelve a dispersar y comienza a alargarse. Pensamos que ese alargamiento debe culminar en el fraccionamiento del material pericentrosomal para formar los dos centrosomas hijos.

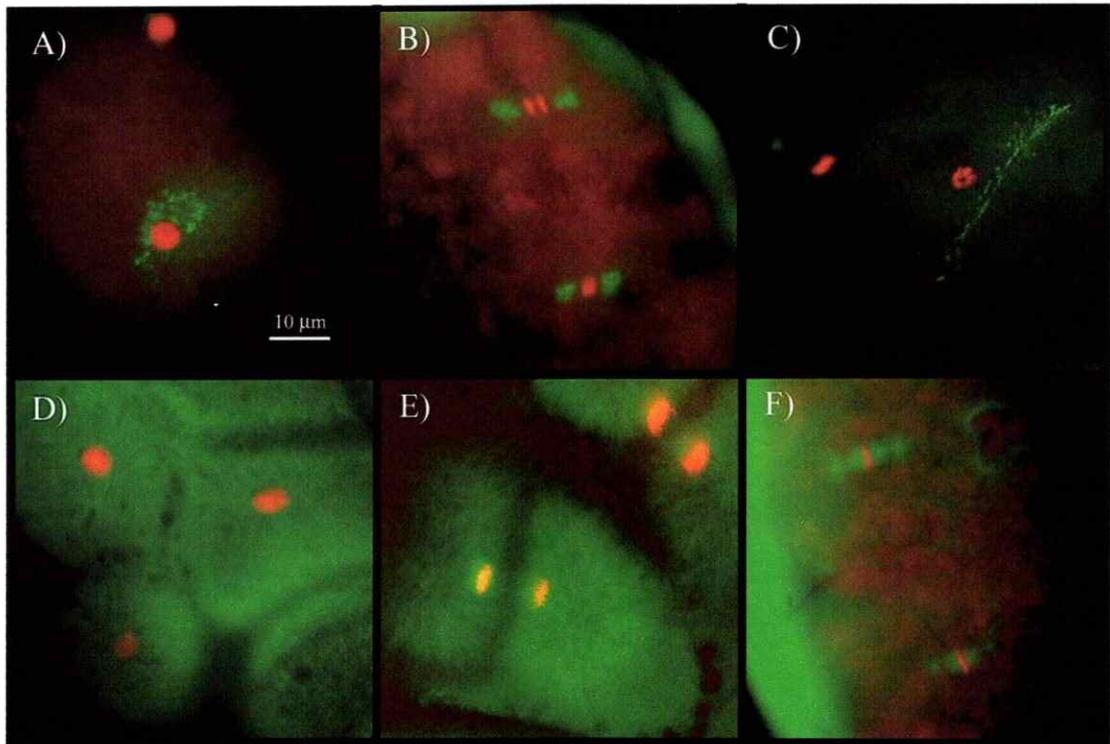
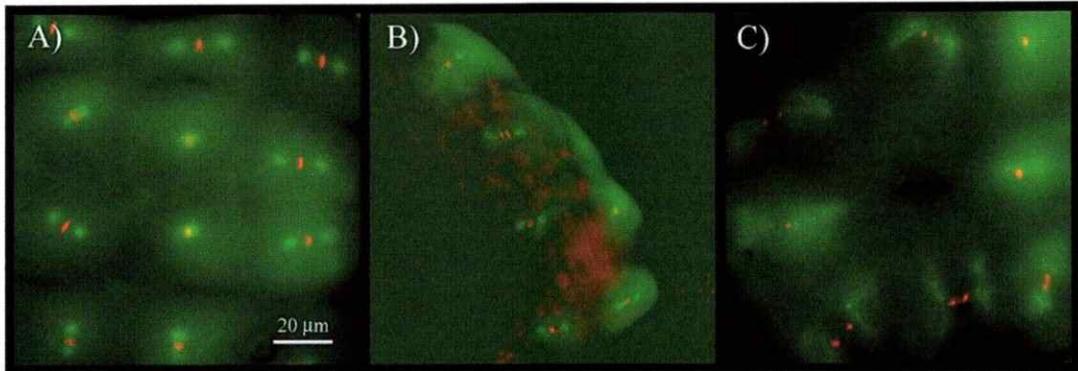


Figura 7. Immunofluorescencias de células de embriones tempranos de pez cebra. En **A**, **B** y **C** se muestran inmunofluorescencias de células de embriones tempranos del pez cebra en interfase, anafase y profase, respectivamente, reveladas utilizando un anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina en verde y la tinción nuclear con DAPI en rojo. En **D**, **E** y **F** se muestran las inmunofluorescencias de embriones tempranos del pez cebra en profase, interfase y metafase, respectivamente, reveladas con un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina en verde y la tinción nuclear con DAPI en rojo.

METAFASE

ANAFASE

TELOFASE



INTERFASE

PROFASE

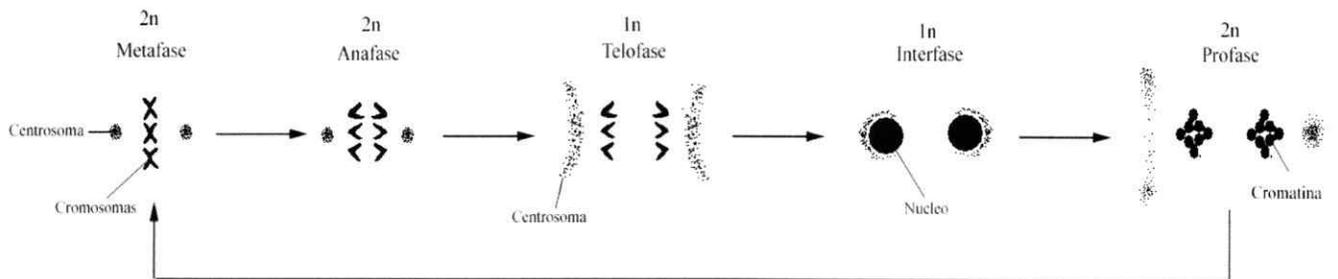
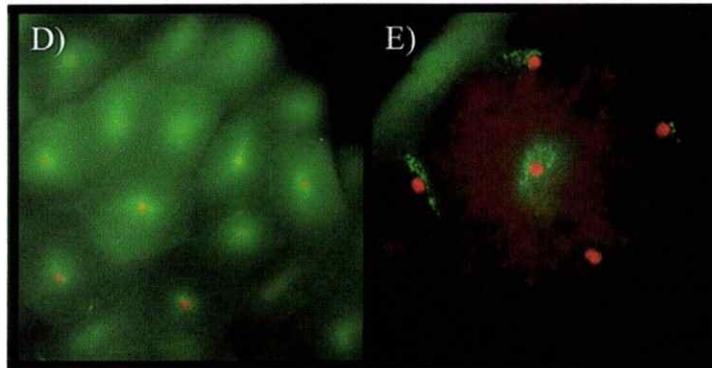


Figura 8: Posibles cambios morfológicos del centrosoma durante el ciclo celular de embriones tempranos del pez cebra revelados con γ -tubulina como marcador. En A, B, C, D y E se muestran las inmunofluorescencias de embriones tempranos del pez cebra de 2 h de desarrollo, reveladas utilizando un anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina en verde y la tinción nuclear con DAPI. El estado del ciclo celular se indica en la parte superior de las micrografías. En la parte inferior de la Figura se muestra un modelo esquemático que representa los posibles cambios de morfología del centrosoma durante el ciclo celular en las células del embrión temprano del pez cebra.

7. c. Los complejos de γ -tubulina y su actividad nucleadora en los embriones tempranos del pez cebra. La información acerca de los complejos que forma la γ -tubulina en los embriones del pez cebra es muy limitada en comparación a la que existe para sistemas como *Drosophila* y *Xenopus* (Zheng y col., 1995; Gunawardane y col., 2000; Moritz y col., 2000; Oregama y col., 1999). De hecho, nunca se han aislados los complejos γ -TuRC del pez cebra y son desconocidas sus características en cuanto a tamaño, morfología y capacidad de interactuar o bien nuclear la polimerización de microtúbulos. Sin embargo, no tenemos ninguna razón para pensar que la situación sea muy distinta a lo observado en los organismos estudiados hasta hoy en día, donde γ -tubulina se organiza en complejos denominados γ -TuRC.

Para caracterizar las superficies de interacción de γ -tubulina, ésta debe estar plegada correctamente y por ende estar incorporada en estructuras celulares del embrión. Para verificar esta proposición se aislaron complejos γ -TuRC desde embriones tempranos del pez cebra y se probó su capacidad de nuclear microtúbulos, con el propósito de diseñar un ensayo que permitiera probar que la proteína recombinante micro-inyectada en los embriones efectivamente se incorpora en el γ -TuRC y que además es capaz de interactuar con microtúbulos. Para esto se utilizó una metodología descrita para aislar los complejos γ -TuRC de *Drosophila sp.* (Moritz y col., 2000). La Figura 9 muestra una serie de inmunoblots de las fracciones provenientes de un fraccionamiento celular representativo de embriones tempranos del pez cebra hecho mediante gradientes discontinuos de glicerol. Los inmunoblots muestran la aparición de dos poblaciones de γ -tubulina en el gradiente de densidad (barras negras). Una población de menor densidad que aparece entre las fracciones 7 y 10 (glicerol del 7 al 9 % (v/v)) y una población más densa que aparece entre las

fracciones 18 y 22 (glicerol del 26 a 38 % (v/v)) de un total de 24 fracciones. En la literatura se han descrito dos tipos de complejos de γ -tubulina con diferente tamaño, los más pequeños corresponden a los complejos γ -TuSC y los más grandes a los complejos mayores γ -TuRC (Oregama y col., 1999). Esto es muy consistente con las dos poblaciones encontradas en nuestros gradientes. Sin embargo, existen pruebas experimentales de que la γ -tubulina se encuentra formando parte de complejos aún mayores que incluyen a la proteína centrosomal pericentrina (Dictenberg y col., 1998). Independiente del tipo de complejo del que se trate, en adelante nos referiremos al complejo más denso de la γ -tubulina que aparece en los gradientes como γ -TuRC, pues se ha demostrado que la γ -tubulina en estructuras mayores se encuentra siempre en complejos γ -TuRC.

A modo de control se revelaron los immunoblots con un anticuerpo anti- α -tubulina para descartar la posibilidad de que la población más densa de γ -tubulina, que se observa en los gradientes sea parte de los polímeros de tubulina. En la Figura 9 (barras grises) se observa que la α -tubulina aparece en el gradiente entre las fracciones 4 y 8 (glicerol 6 a 7 % (v/v)), probablemente como parte del heterodímero α/β .

Para determinar si los complejos de γ -tubulina que se encuentran en la fracción más densa de los gradientes son efectivamente capaces de nuclear la polimerización de microtúbulos, se realizó un ensayo de polimerización *in vitro* con α/β -tubulina purificada de cerebro de pollo al cual se le adicionó un volumen de extracto de γ -TuRC (fracción más densa). En la Figura 10A, se muestra un experimento de polimerización en el cual los microtúbulos se precipitaron por

centrifugación a los 5, 10 y 20 min de iniciada la reacción. Los líquidos sobrenadantes y los precipitados se separaron y analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS e inmunoblot anti- γ -tubulina. En el control negativo, sin adicionar extracto de γ -TuRC, se observa que aparece una pequeña señal de γ -tubulina que probablemente se trata de γ -tubulina contaminante que copurifica con la tubulina del cerebro de pollo, pues la señal se encuentra mayormente en los precipitados, es decir asociada a los microtúbulos. Al adicionar 10 o 50 μ l de extracto de γ -TuRC, observamos como la γ -tubulina que se encuentra en los precipitados aumenta y este aumento es proporcional a la cantidad de extracto adicionado. Como control se repitió el mismo procedimiento en ausencia de α/β -tubulina, con 50 μ l de extracto, donde se observa que la señal de γ -tubulina se encuentra mayormente en los sobrenadantes. Estos resultados indican que γ -tubulina aislada desde los embriones tempranos del pez cebra es capaz de interactuar y por ende coprecipitar con microtúbulos polimerizados *in vitro*.

Se probó la funcionalidad de los γ -TuRC aislados de embriones tempranos del pez cebra por su capacidad de nuclear microtúbulos. De este modo, al adicionar extracto de γ -TuRC a la reacción de polimerización *in vitro*, el tiempo de latencia debe disminuir y esta disminución debe tener relación con la cantidad de γ -TuRC que se adiciona. En la Figura 10B se muestran los resultados del efecto de la concentración de γ -TuRC sobre el periodo de latencia de la polimerización de microtúbulos *in vitro*. El experimento se hizo en ausencia y en presencia de dos cantidades del extracto de γ -TuRC (10 o 50 μ l). La curva fue ajustada a un modelo sigmoideo de dos parámetros y se definió al tiempo en que se alcanza un 50% de

polimerización como el tiempo de latencia. Este tiempo o periodo de latencia (τ) se graficó en función de la cantidad de extracto adicionado. Se observa una disminución aparentemente exponencial del tiempo de latencia al adicionar extracto. Estos resultados muestran que los complejos γ -TuRC de los embriones del pez cebra son funcionales, pues son capaces de interactuar con microtúbulos *in vitro* y nuclear su polimerización.

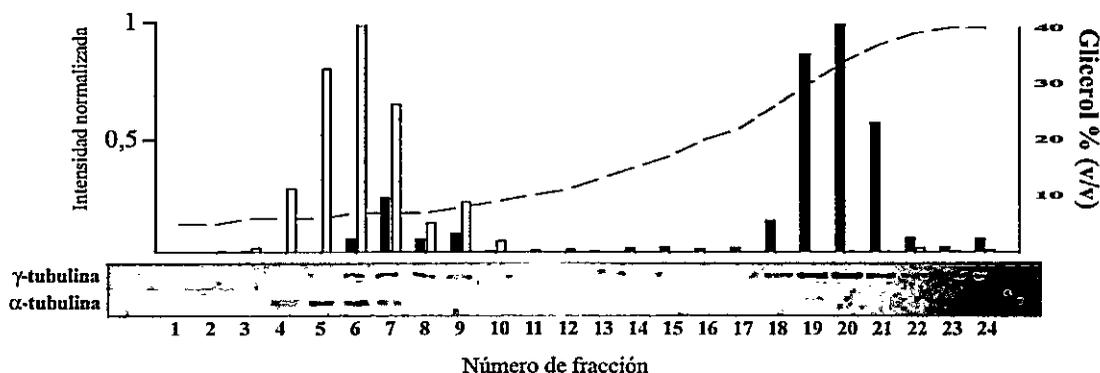


Figura 9. Fraccionamiento del extracto que contiene los complejos γ -TuRC de embriones tempranos del pez cebra por centrifugación en gradientes de densidad de glicerol. En la parte inferior de la Figura se muestran tres inmunoblots de un fraccionamiento celular hecho en gradiente de densidad de glicerol mediante ultracentrifugación, que se revelaron utilizando anticuerpos anti- γ -tubulina y α -tubulina, como se indica a la izquierda de la Figura. En la parte superior de la Figura se muestra un gráfico de barras de las densitometrías normalizadas de las señales de los inmunoblots. En barras negras se muestran las densitometrías de los inmunoblots revelados contra γ -tubulina y en barras grises las densitometrías de α -tubulina. En líneas punteadas se indica la cantidad de glicerol (% v/v) en cada fracción del gradiente.

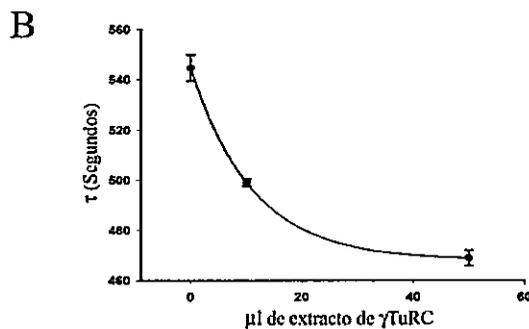
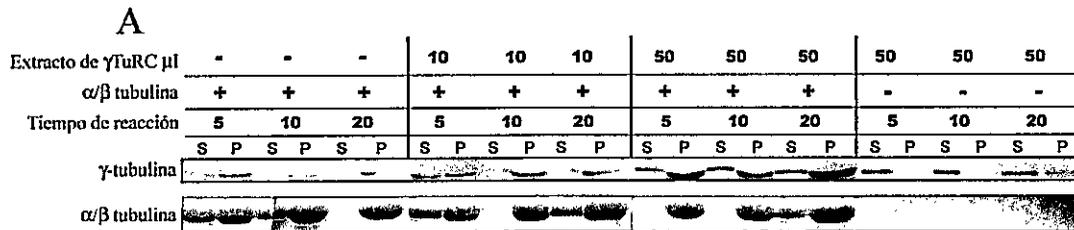


Figura 10. Nucleación de la polimerización *in vitro* de microtúbulos por γ -TuRC extraídos desde embriones tempranos del pez cebra. En A se muestra un experimento de nucleación de microtúbulos precipitados por centrifugación. Se adicionaron 0, 10, o 50 μ l de extracto de γ -TuRC a 250 μ l totales de la reacción de polimerización de microtúbulos. Como control se realizó una reacción en ausencia de tubulina. Se tomaron muestras a los 5, 10 y 20 min desde iniciada la reacción, se precipitaron por centrifugación y se separó el precipitado (P) del líquido sobrenadante (S). Las muestras se revelaron por electroforesis en geles de acrilamida-SDS e inmunoblot utilizando anticuerpo anti- γ -tubulina. En B, se muestra un gráfico de la disminución del tiempo de latencia (τ) de reacciones de polimerización de microtúbulos *in vitro* seguidas por densidad óptica a 350 nm.

7. d. Regiones de interacción de γ -tubulina. Como se ha mencionado en la hipótesis de este trabajo, se espera que las regiones de interacción longitudinal y lateral de α y β tubulina estén conservadas en la γ -tubulina. De hecho, en los contactos de γ -tubulina en el cristal, de donde se obtuvo su estructura 3D por cristalografía de rayos X a 2,7 Å de resolución, se observan ciertas interacciones de tipo lateral (Aldaz y col., 2005), que son muy semejantes a las del heterodímero α/β -tubulina cuando se encuentra formando parte de un microtúbulo (Nogales y col., 1998). Hasta el momento no se ha podido obtener una estructura en que participe un polímero de γ -tubulina que permita observar sus zonas de interacción. Por esta razón, se modeló un homodímero γ -tubulina (dímero γ/γ), utilizando como templado la estructura 3D del heterodímero de α/β tubulina (1TUB) y la estructura cristalina de γ -tubulina (1Z5V). El modelo se obtuvo por homología estructural con el programa MODELLER (Eswar y col., 2000), y se validó con el programa proSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). Se obtuvo un valor de Z-score de -11.71 para el total de los 875 aminoácidos de los dos monómeros. Se comprobó también mediante el programa Verify 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D) (Lüthy y col., 1992). Con el uso de este modelo se examinaron las regiones involucradas en la interacción longitudinal y los residuos clave.

En el modelo del heterodímero α/β (1TUB) que se muestra en la Figura 1A, se observa que la región del “loop” T7 penetra en la cavidad donde se aloja el nucleótido del monómero adyacente. En el modelo del homodímero γ/γ que se muestra en la Figura 11A, la región que se encuentra más cercana al nucleótido del monómero adyacente corresponde a los residuos Y248, M249 y N250, ubicados en el centro del “loop” T7. Los alineamientos de secuencia y estructurales confirman que

estos residuos se ubican en la misma región en la β -tubulina, como se resalta en el alineamiento de la Figura 12. En la Figura 11B y 11C se muestran dos vistas de la estructura de la γ -tubulina a 1,4 Å de resolución (1Z5V), coloreadas según el potencial electrostático de su superficie. Aquí se observa que la región del "loop" T7 se encuentra en el límite entre una región polar, que en el modelo se encuentra expuesta al solvente y una región de naturaleza hidrofóbica, que se encuentra formando parte de la interfase. También es evidente que esta región forma una gran protrusión que, como ya se ha mencionado, penetra en la cavidad donde aloja el nucleótido del monómero adyacente, quedando muy cercana al nucleótido. El residuo metionina 249 se encuentra en el centro de interacción (Figura 11A), y debido a su naturaleza hidrofóbica resulta un excelente blanco para una mutación. En el modelo de homodímero γ/γ , la metionina 249 se sitúa en las cercanías del fosfato α del GTP del monómero adyacente. Por esta razón se cambió la metionina 249 por un glutamato (mutante M249E) para introducir una carga negativa y generar una repulsión entre el grupo carboxilo y los fosfatos del GTP.

En la β -tubulina los aminoácidos que se encuentran de la región del "Loop" T7 corresponden a F-P-G-Q-L-N (del 242 al 247 en la secuencia). Como se muestra en el alineamiento de la Figura 12, la región del "loop" T7 difiere solamente en los residuos F242, Q245 y la L246 de β -tubulina, con los que corresponden a γ -tubulina. Con la finalidad de evaluar la importancia de los residuos del "Loop" T7 antes mencionados en γ -tubulina, se optó por cambiarlos por los de β -tubulina. Se generó otra mutante de γ -tubulina, en el cual se introdujeron mutaciones puntuales en la secuencia del "loop" T7 de modo de asemejarlo a la secuencia del "loop" T7 de β -tubulina, a modo de proteína quimérica. Para obtener esta mutante, a la que

llamaremos T7 β , realizamos las siguientes mutaciones puntuales Y245F; Y248Q y M249L en γ -tubulina.

El gen de la γ -tubulina que se utilizó corresponde al de la γ -tubulina humana TUBG1 (GeneBank NM_001070). Este gen está clonado en un vector de expresión pET11A el cual se muestra esquemáticamente en la Figura 2. Es inducible por IPTG, posee un sitio de múltiple clonamiento corriente abajo de un promotor del fago T7 y posee una secuencia de resistencia a ampicilina. Las mutaciones se realizaron sobre este plásmido pET11a-Tubg1 mediante PCR, utilizando los partidores que se describen en materiales y métodos. En la Figura 13 se observa que todos los plásmidos, las mutantes (M249E y T7 β) y la tipo silvestre (WT), expresan una proteína que es inmunoreactiva con el anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina. Se observa que las tres proteínas tienen un patrón de migración muy semejante en la electroforesis de acrilamida-SDS y muestra una masa relativa de alrededor a 50 kDa.

La purificación de la γ -tubulina, WT y las mutantes sobre-expresadas en *E. coli*, mostró que estas forman grandes agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión. Por eso, para purificar las proteínas utilizamos el protocolo de purificación de cuerpos de inclusión propuesto en la tesis doctoral del Dr. Carlos González. La etapa clave de la purificación de la γ -tubulina recombinante de tipo silvestre (WT) y las mutantes M249E y T7 β consistió en una cromatografía de intercambio iónico en presencia de urea como agente desnaturante. En la Figura 13 se observa un gel de poliacrilamida-SDS de las tres proteínas de γ -tubulina recombinante, una cuantificación por densitomería de las bandas muestra una pureza superior al 95%. Sin embargo, se observan ciertas bandas de menor peso molecular que corresponden a productos de degradación de la proteína que ocurrirían al interior de la bacteria durante su síntesis,

pues son inmunoreactivos con el anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina. De este modo se obtuvo una proteína desplegada, no funcional y que se mantuvo soluble en presencia de altas concentraciones del agente denaturante (urea 1 a 8 M).

Con el propósito de replegar las proteínas purificadas se utilizó el método de dilución rápida en concentraciones decrecientes del agente desnaturalante. La renaturación de la proteína se siguió mediante el cambio en la fluorescencia intrínseca de los triptófanos al excitar a 295 nm. En la Figura 14A, B y C, se grafica la fracción de cambio del corrimiento de la longitud de onda máxima de fluorescencia versus la concentración de GdmCl. En los gráficos se observa que al disminuir la concentración de agente denaturante hay una transición que tiene como punto medio 0,8 M de GdmCl. La transición es propia de un cambio de estado donde se recupera la estructura de la proteína. La proteína renaturada muestra una fuerte tendencia a la agregación, como se observa en las mismas Figuras, al seguir la dispersión de luz a 350 nm. El punto medio de renaturación para las tres proteínas es de 0,8 M de GdmCl, lo cual indica que las mutaciones no afectan la estabilidad de esta proteína. También se observa que en ausencia del agente desnaturalante (primer punto de cada curva), la intensidad de la dispersión de luz a 350 nm disminuye. Esto indica que la población de agregados disminuye haciéndose la proteína más soluble. Para observar que ocurre con esta proteína menos agregada, se precipitaron los agregados por centrifugación y las fracciones solubles se utilizaron para el análisis de dicroísmo circular que se muestra en la Figura 14D. Aunque la cantidad de proteína que permanece soluble al eliminar la fracción agregada corresponde a alrededor de 0,01 mg/ml, la señal de dicroísmo circular se pudo analizar. En el gráfico de barras de la figura 14D se observa que para las tres proteínas, la elipticidad por residuo medio a

220 nm se hace mas negativa alcanzando un promedio de $-20.000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, y la proteína completamente desnaturalada a 6 M de GdmCl, un valor promedio de $-5.000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, a la misma concentración de proteína. Esto indica un aumento en el contenido de estructura secundaria al eliminar el agente desnaturalante.

En el laboratorio se demostró que α y β -tubulina recuperan casi totalmente su estructura secundaria al ser renaturadas (Andreu y col., 2002). Sin embargo, el heterodímero renaturado no es funcional. Con el objeto de determinar si la γ -tubulina renaturada, que se obtiene en la fracción soluble, es funcional, se probó su interacción con el heterodímero de α/β -tubulina en una reacción de polimerización de microtúbulos *in vitro*. El ensayo consistió en agregar γ -tubulina renaturada (de la fracción soluble) a una reacción de polimerización de microtúbulos *in vitro* y observar si ésta coprecipita con los polímeros al sedimentarlos por centrifugación. En la Figura 15 se muestra un análisis por electroforesis en geles de acrilamida-SDS e inmunoblot de los precipitados y sobrenadantes resultantes del ensayo. Se observa que la γ -tubulina WT, y las mutantes M249E y T7 β recombinantes no coprecipitan con los polímeros y se mantienen solubles, en el sobrenadante. A modo de control se hizo el mismo experimento con extractos de citoplasma de embriones tempranos del pez cebra que contiene γ -tubulina nativa que es capaz de interactuar y coprecipitar con los microtúbulos en las mismas condiciones. Este experimento mostró que la γ -tubulina recombinante tipo silvestre y las mutantes M249E y T7 β purificadas desde los cuerpos de inclusión y renaturadas al equilibrio se renaturan en un estado que no es funcional, aun cuando posee estructura secundaria, como lo indican los espectros de dicroísmo circular.

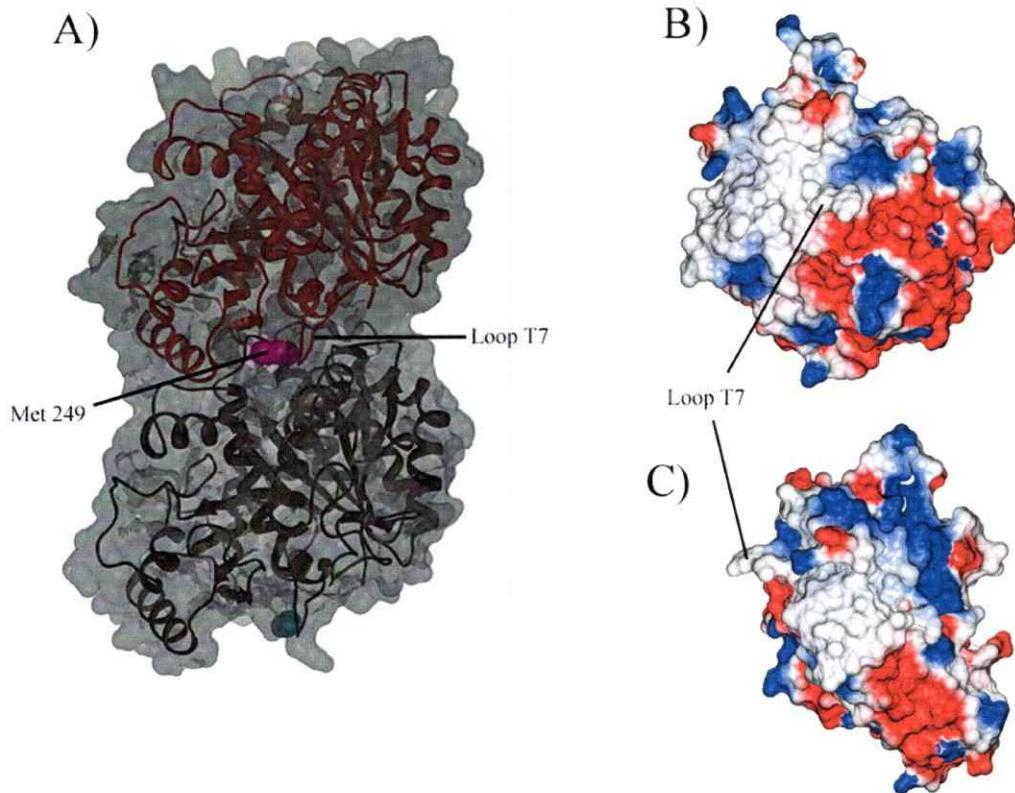


Figura 11. Modelo del homodímero de γ -tubulina. **A** Representación esquemática en cintas y volumen del modelo de homodímero de γ -tubulina construido a partir del heterodímero α/β tubulina (1TUB) como templado. **B** y **C** corresponden a dos vistas esquemáticas de una representación de la estructura de γ -tubulina (1Z5V) coloreada según el potencial electrostático de los aminoácidos de la superficie. En rojo se muestran las regiones electronegativas y azul las electropositivas. En blanco se muestran las regiones apolares.

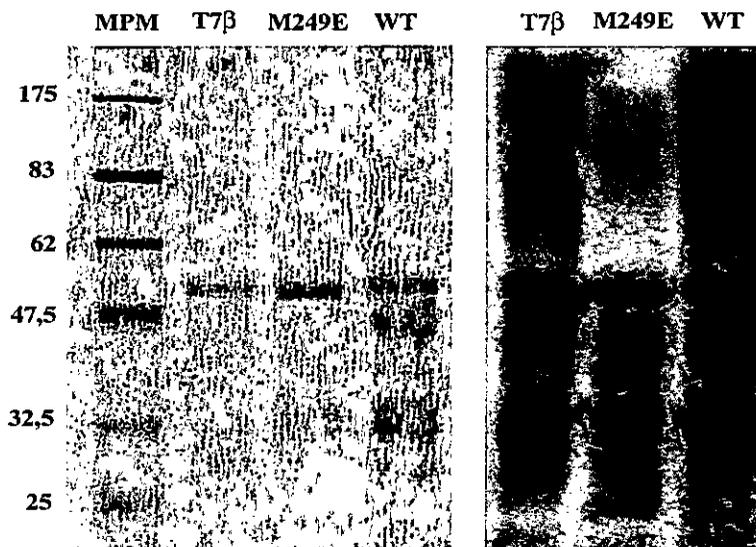


Figura 13. Expresión de γ -tubulina tipo silvestre (WT), y de las mutantes M249E y T7 β . A la izquierda se muestra las bandas de proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de coomasie para las proteínas γ -tubulina silvestre (WT) y las mutantes recombinantes purificadas desde cuerpos de inclusión producto de la sobreexpresión en cepas de *E. coli*. A la derecha se muestra un inmunoblot de las mismas proteínas revelado con anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina.

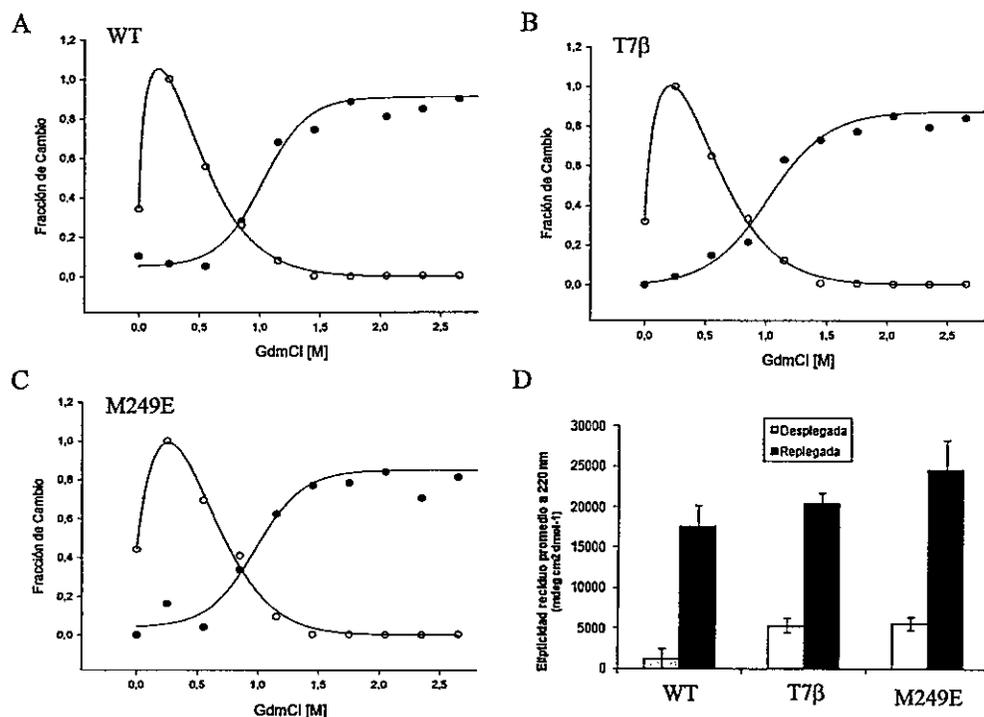


Figura 14. Renaturación al equilibrio de γ -tubulina recombinante. A la izquierda se muestran gráficos de la fracción de cambio de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos (círculos negros) y de la dispersión de luz a 350 nm (círculos blancos) de la γ -tubulina recombinante tipo silvestre (A) y las mutantes M249E (B) y T7 β (C), replegadas al equilibrio por dilución rápida a concentraciones decrecientes de agente denaturante (GdmCl). En D se muestra un gráfico de barras con los valores de elipticidad residuo promedio a 220 nm de los espectros de dicroísmo circular de γ -tubulina recombinante WT, M249E y T7 β .

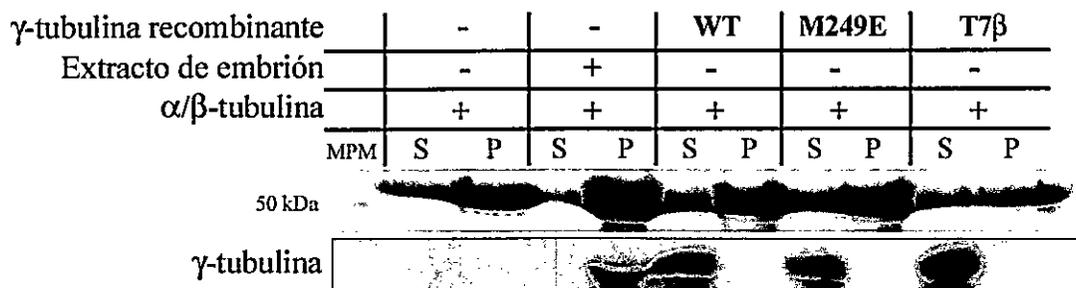


Figura 15. Polimerización *in vitro* de microtúbulos en presencia de γ -tubulina recombinante renaturada al equilibrio y de un extracto de embrión temprano del pez cebra. Las reacciones de polimerización de microtúbulos se hicieron en presencia de γ -tubulina recombinante WT, M249E y T7 β replegadas, y en presencia de un extracto crudo de embrión temprano del pez cebra que posee γ -tubulina nativa (control positivo) y en ausencia de γ -tubulina y extracto (control negativo). Los productos de la reacción de polimerización se centrifugaron y se separó el precipitado (P) del líquido sobrenadante (S), los que se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La presencia de γ -tubulina se reveló por inmunoblot con un anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina.

7. e. Interacción de γ -tubulina con la chaperonina CCT. La proteína recombinante micro-inyectada en los embriones debe interactuar con la chaperonina CCT para ser plegada. Por esta razón se probó la interacción de γ -tubulina recombinante con la chaperonina CCT *in vitro* y así poder determinar el efecto de las mutaciones en el "loop" T7 sobre la capacidad de la γ -tubulina de interactuar con CCT. Con este propósito se utilizó electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones. La primera dimensión corresponde a una electroforesis en gel nativo, desde la cual la banda correspondiente al complejo CCT- γ -tubulina es escindida y posteriormente sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Si las proteínas están formando un complejo en la banda del gel nativo, éste contendrá la γ -tubulina que se encuentra interactuando, la cual se podrá separar de la CCT y detectar en la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. En la Figura 16A se muestra un gel de poliacrilamida-SDS de un experimento representativo donde se observa que en presencia de CCT (carril 4), γ -tubulina aparece en la segunda dimensión del ensayo de interacción, al contrario de lo que ocurre en ausencia de CCT (carril 7), donde γ -tubulina no aparece. Lo mismo ocurre para las mutantes M249E y T7 β en presencia de CCT (carriles 5 y 6 respectivamente). Este resultado indica que γ -tubulina recombinante WT y las mutantes M249E y T7 β interactúan con la chaperonina CCT y probablemente alcanzan su estado nativo.

El análisis de la intensidad de las bandas (Figura 16B) muestra que las mutaciones disminuyen la interacción de las proteínas mutantes con CCT. Así, la densitometría de las bandas indica que la interacción con CCT de las mutantes M249E y T7 β disminuye en 68% +/-7 y en un 37% +/-12, respectivamente. El test de Student mostró que estas cifras son significativamente diferentes con un valor de P

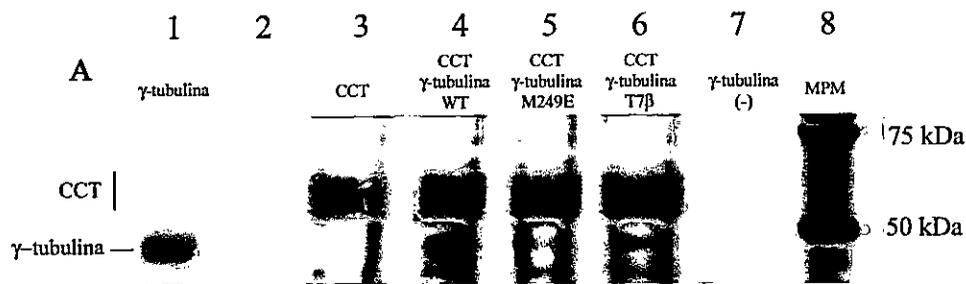
de 0,0171. Estos resultados indican que la región del “loop” T7 es importante para la unión de γ -tubulina con la chaperonina CCT, confirmando lo propuesto para α -tubulina (Llorca y col., 2001). Es decir que en α , β y γ -tubulina la región del “loop” T7 es importante para la unión con CCT.

Con el objeto de localizar la γ -tubulina en el interior de la cavidad de la chaperonina se utilizó microscopía electrónica. La Figura 17 muestra un campo representativo de los complejos de CCT- γ -tubulina. Se observa que los complejos aparecen en dos posiciones: una vista frontal con la cavidad de la chaperonina, lugar en que se aloja la proteína sustrato (Llorca y col., 2001a) y una vista lateral. La resolución del microscopio electrónico no es suficiente para detectar la γ -tubulina en el interior de la chaperonina. Para mejorar la resolución y poder detectarla se utilizó un método conocido como alineamiento de partículas únicas, que permite aumentar la resolución de las imágenes de partículas provenientes de microscopía electrónica. La metodología se basa en un alineamiento rotacional y translacional iterativo de las imágenes de partículas, las que son alineadas y clasificadas en grupos (referencias) de acuerdo con la heterogeneidad de las formas presentes. Esto, además de mejorar la resolución, permite encontrar heterogeneidades estructurales en una población de partículas. De este modo, se realizaron los alineamientos utilizando el programa MLalingn2D Fast del paquete de programas Xmipp (Scheres y col., 2005a; Scheres y col., 2005b), desarrollado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid España. Los alineamientos se hicieron con 3.980 partículas en vista frontal, utilizando de 2 a 16 clases, hasta encontrar que los grupos de partículas que no varíen entre un alineamiento y otro y permanezcan más o menos constantes en el número de partículas que las integran.

Se consideró oportuno correr un MLalign2D de siete referencias con el total de las partículas. El resultado de este alineamiento se muestra en la Figura 17B. Se tomó todas las partículas de las referencias 1, 3, 5, 6 y 7, las cuales mostraban la cavidad de CCT llena. Estas partículas se juntaron en un solo grupo y se realizó con ellas varios pasos de alineamientos rotales y transaccionales. Después del alineamiento se utilizó el programa `xmipp_classify_kerdersom`, el cual permite separar las partículas en función de diferencias que encuentre, en este caso, en el interior de la cavidad. Luego de este procedimiento fueron seleccionadas 563 partículas para ser alineadas nuevamente (rotales y transales), con lo cual se generó la imagen promedio que aparece en la Figura 18A. Este mismo procedimiento se realizó con las referencias 2 y 4 de la Figura 17B para generar la imagen promedio de la chaperonina CCT vacía (Figura 18B), la cual contiene 380 partículas.

En la Figura 18 se muestran los promedios resultantes de los alineamientos. Se observan dos imágenes de partículas en vista frontal, una de las cuales (fig. 18A y C) muestra una densidad extra en el interior de la cavidad del complejo y otra (fig. 18B y D) se encuentra aparentemente vacía. Se observa en ambas la morfología en forma de anillo de la chaperonina CCT. Para mejorar el contraste se hizo un análisis de niveles de intensidad utilizando el programa ImageJ (fig. 18C yD), el cual permite observar claramente las densidades correspondientes a las 8 subunidades de CCT. En la partícula llena (fig 18A y C) se observa la densidad extra en el interior de la cavidad, que corresponde a γ -tubulina. Se observa que la γ -tubulina interactúa con dos regiones opuestas de la cavidad del complejo CCT, mediante un dominio estrecho y otro ancho, atravesando la cavidad de lado a lado. Se realizaron experimentos similares utilizando un anticuerpo contra la subunidad δ de CCT de

modo de mapear la topología de la unión. En la Figura 18E y F se observan dos partículas de CCT- γ -tubulina en las cuales la presencia del anticuerpo aparece como una densidad extra en la parte externa del anillo de la chaperonina (flechas rojas). La densidad del anticuerpo delata la ubicación de la subunidad δ de la chaperonina, como se indica con letras griegas. Se encontraron dos topologías de unión de la γ -tubulina con CCT. Una donde γ -tubulina se asocia por un lado con las subunidades η y α de CCT y por el otro lado con las subunidades β y γ (Figura 18E). En tanto que otra topología γ -tubulina interactúa con las subunidades δ y θ por un lado y ζ y ϵ por el otro. Esta disposición es exactamente la misma publicada por Llorca (2001a) para la interacción CCT- β -tubulina.



B

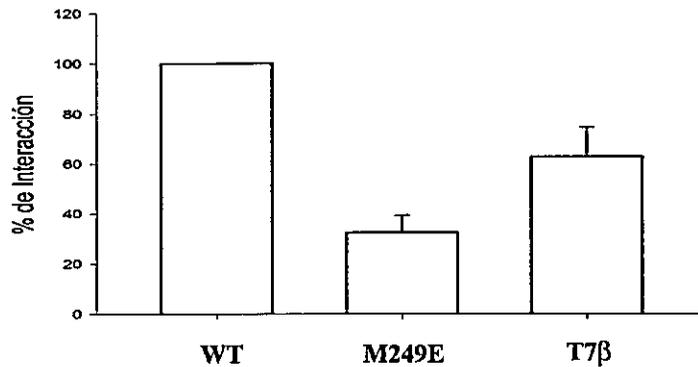


Figura 16. Separación y cuantificación de la γ -tubulina unida a la chaperonina CCT. A Electroforesis un en gel de poliacrilamida-SDS del complejo γ -tubulina-CCT proveniente de un gel en condiciones nativas donde se separó el complejo γ -tubulina-CCT formado *in vitro*. En el primer carril se cargó γ -tubulina recombinante. En el tercer carril se cargó solo CCT proveniente de la primera dimensión. En los carriles cuarto, quinto y sexto se cargaron los productos de las reacciones de interacción de la chaperonina CCT con las proteínas γ -tubulina WT, y las mutantes M249E y T7 β respectivamente. Como control negativo se utilizó solo γ -tubulina recombinante, la cual fue cargada en la primera dimensión. B. Gráfico de barras que muestra el % de γ -tubulina WT, M249E y T7 β unida a CCT provenientes de densitometrías obtenidas desde geles mostrado en A, asumiendo que la densitometría de la proteína WT corresponde al 100% de unión. Las barras corresponden a la desviación de tres experimentos distintos.

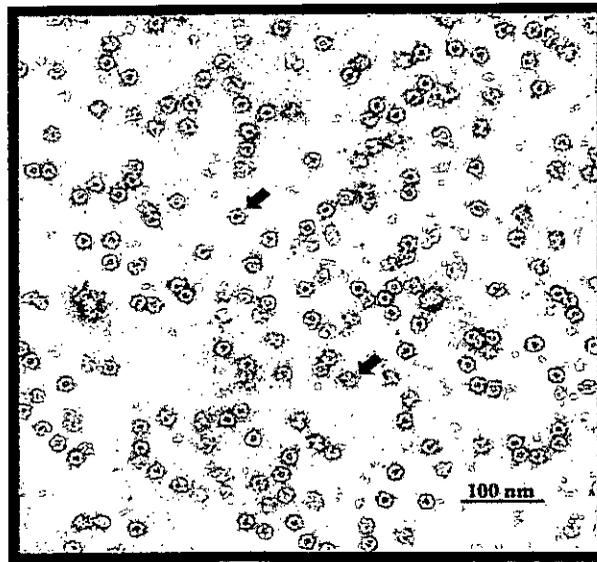
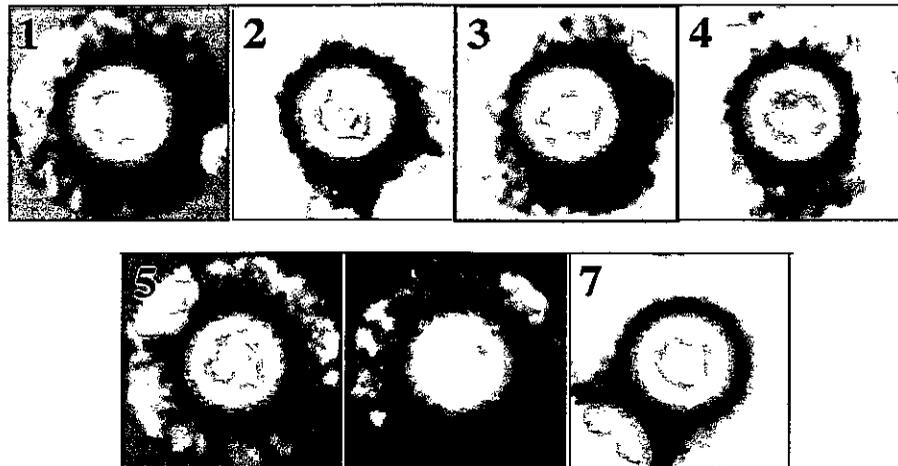
A**B**

Figura 17. Micrografía electrónica de transmisión de complejos CCT- γ -tubulina WT y alineamiento de partículas mediante Xmipp-MLalingn2D. A; Micrografía electrónica de transmisión de complejos CCT- γ -tubulina teñidos con tinción negativa. La micrografía se tomó a un aumento de 20.000 X. La flecha negra superior indica una partícula en vista frontal y la inferior una en vista lateral. **B;** Resultado de un alineamiento de 3.980 partículas mediante el programa Xmipp_MLalingn2D para siete referencias. Las referencias 1, 3, 5, 6 y 7 presentan la cavidad llena, en tanto que las partículas 2 y 4 presentan la cavidad vacía.

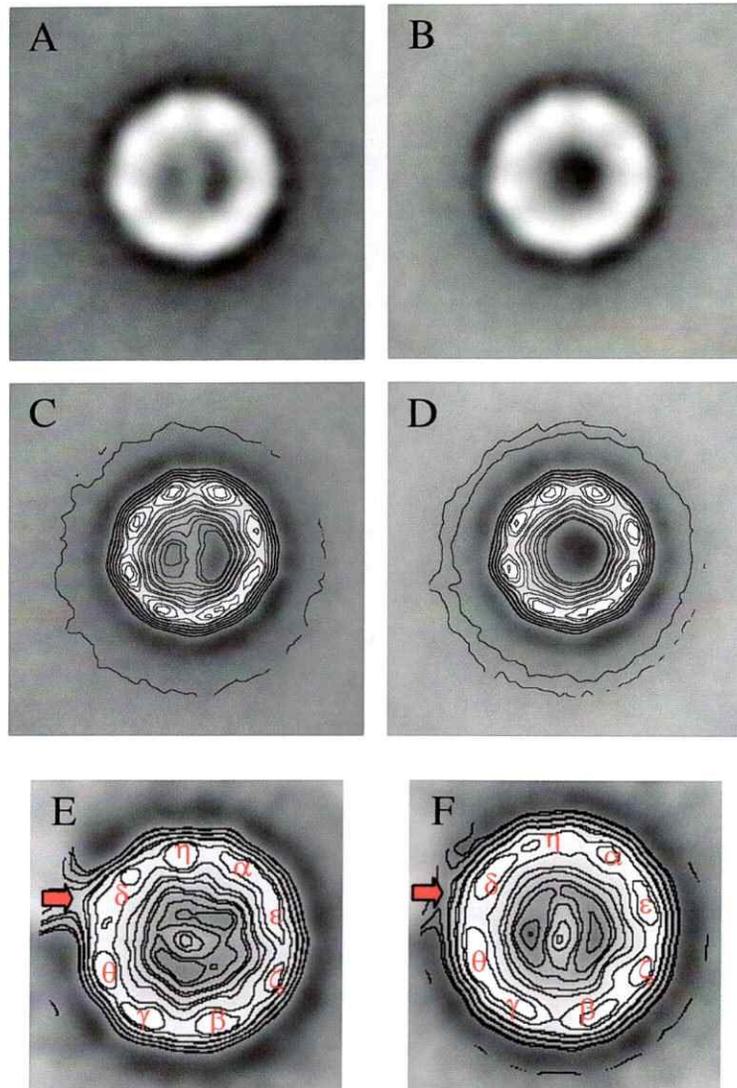


Figura 18. Imágenes promedio complejos CCT- γ -tubulina obtenidas por alineamiento con Xmipp_MLalign2D. A; Imagen promedio de 563 partículas frontales de complejo CCT- γ -tubulina. B; Imagen promedio 380 partículas de complejos CCT vacíos. C; Análisis de niveles de intensidad de la imagen promedio mostrada en A. D; Análisis de niveles de intensidad de la imagen promedio mostrada en B. E y F; imágenes promedio de partículas de complejos ternarios CCT- γ -tubulina-anticuerpo contra la subunidad δ de CCT. En letras griegas se indica el nombre de cada subunidad de CCT. Con flechas rojas se indica la posición del anticuerpo.

7. f. Incorporación de γ -tubulina recombinante en los centrosomas de embriones tempranos del pez cebra. La γ -tubulina del tipo silvestre y las mutantes sintetizadas de manera recombinante en bacteria no se pliegan en un estado funcional, tanto en el citoplasma bacteriano como por replegamiento *in vitro*. Esto es común para proteínas del citoesqueleto eucarionte (Andreu y col., 2002). La forma de resolver este problema ha sido expresar las proteínas en levadura (Lacefield, 2006) o bien utilizar sistemas de plegamiento *in vitro* de reticulocitos de conejo (Leguy y col., 2000). Sin embargo, la funcionalidad *in vivo* con estos sistemas es difícil de analizar. Por este motivo se prefirió utilizar la maquinaria citoplasmática de embriones tempranos del pez cebra, que contiene todos los factores necesarios para su plegamiento correcto y funcionalidad. De este modo, por medio del análisis de la viabilidad del embrión y de la estructura del citoesqueleto se correlacionó los cambios en la estructura (mutaciones) con el comportamiento de la γ -tubulina recombinante humana y su efecto sobre el fenotipo del embrión al ser microinyectada.

Con este propósito se marcó γ -tubulina recombinante con una sonda fluorescente (rodamina) y se microinyectó dentro del citoplasma de ovocitos recién fecundados con una solución que contenía 1 mg/ml de proteína. La distribución de la fluorescencia de la proteína y el desarrollo del embrión se registró simultáneamente mediante microscopía de fluorescencia y de campo claro. En la Figura 19 se muestra una serie de micrografías de un embrión representativo microinyectado con γ -tubulina tipo silvestre (WT). Las fotografías de microscopía de fluorescencia y de campo claro se tomaron cada 30 min. El embrión control se micro-inyectó con la solución de inyección sin la proteína. Se observa que entre los 30 y 90 min de

desarrollo la fluorescencia de la proteína marcada de color verde se moviliza desde el viteloplasma del embrión hacia el sector donde se forma el disco embrionario (Figura 19A). Este proceso se conoce como segregación ovoplásmica (Fernández y col., 2006), en el cual ocurre un desplazamiento neto de citoplasma hacia el polo animal del embrión, donde se origina la primera célula. A los 120 min de desarrollo embrionario, la mayoría de la señal de γ -tubulina se encuentra dentro de los blastómeros y su distribución es difusa en su interior. Posteriormente la señal fluorescente de γ -tubulina coalesce en el centro de las células, formando pequeños cúmulos de señal en el centro de algunos blastómeros. Este comportamiento lo muestra el 27% de los embriones inyectados.

Al comparar la morfología de los embriones inyectados con γ -tubulina recombinante (Figura 19B), con la morfología de los embriones control, inyectados sólo con el medio de inyección (Figura 19C), se observa que el desarrollo de los embriones es seriamente alterado por la proteína exógena (en base a lo descrito en cuanto a desarrollo y morfología del pez cebra a 28°C (Kimmel y col., 1995)). Se observa que los blastómeros de los embriones se hacen más esféricos y al parecer pierden cohesión entre ellos. Así, aparecen blastómeros de distinto tamaño e incluso algunos que no se dividen, produciendo embriones con tres blastómeros. Con altas cantidades de γ -tubulina no alcanzan la primera división. Se ha observado que la magnitud del efecto es proporcional a la cantidad de proteína inyectada (datos no mostrados) disminuyendo la viabilidad de los embriones.

La coalescencia de la γ -tubulina fluorescente dentro de los embriones se observa como la formación de pequeñas estructuras más intensas en el interior de los blastómeros. Estas estructuras de γ -tubulina no presentan un tamaño uniforme, es

más, su morfología es diferente entre embriones, incluso entre blastómeros del mismo embrión. En la Figura 20 se muestran algunas morfologías recurrentes que pueden corresponder a distintos estadios del centrosoma durante el ciclo celular (Figura 8). Así, en la Figura 20A se muestra una micrografía de fluorescencia aumentada de una de estas estructuras que parece estar rodeando al núcleo, adoptando la forma de una nube difusa, imagen muy semejante a la γ -tubulina endógena del pez cebra en estado de profase (Figura 8E). En la Figura 20B se muestra otra morfología común de estas estructuras, en que la célula podría estar en estado de interfase (Figura 8D). En ésta aparecen dos pequeñas zonas en el eje longitudinal con menor intensidad de señal que ocupan el lugar habitual de los centriolos. En la Figura 20C se muestra una de estas estructuras dividiéndose. La estructura hija se indica con una flecha roja. Estas estructuras parecen dividirse durante la división de los blastómeros y las dos estructuras hijas producto de la división migran cada una a uno de los blastómeros hijos resultantes de la citocinesis. Extensa literatura ha sido dedicada al tema de la división del centrosoma (revisado en Doxey 2001). Sabemos que esta división ocurre durante el ciclo celular y cada célula hija culmina con un centrosoma hijo. El comportamiento observado de la señal de γ -tubulina es consistente con la conducta observada para el centrosoma y se confirma con los experimentos de inmunofluorescencia mostrados en la sección 7. b. de los resultados.

Con el objeto de localizar en los blastómeros las estructuras de γ -tubulina antes mencionadas se fijaron embriones inyectados con γ -tubulina-rodamina de 2 horas de desarrollo y posteriormente se tiñeron con DAPI, de modo de detectar en los blastómeros la proteína fluorescente y el núcleo simultáneamente. En la micrografía

de la Figura 21 se observan 5 blastómeros de una región del blastodermo de un embrión, donde se distingue claramente la posición de los núcleos en rojo y la señal correspondiente a la γ -tubulina recombinante en verde. La señal de la proteína fluorescente se observa difusa dentro del citoplasma de los blastómeros y acúmulos de ella en la región cercana al núcleo. La distribución de la señal fluorescente es la misma que se observa en las inmunofluorescencias de γ -tubulina de las Figuras 7 y 8, por lo tanto estas señales deberían corresponder a los centrosomas de las células. En la micrografía se indican con flechas rojas la posición de los centrosomas. Los blastómeros de la parte inferior de la Figura aparentemente se encuentran en estado de metafase, con dos centrosomas, uno a cada lado del juego de cromosomas. En la parte superior de la Figura aparecen tres núcleos, de los cuales el núcleo central muestra una señal de γ -tubulina difusa a su alrededor. Gran parte de la señal se observa amarilla producto de la superposición de la señal de DAPI y la de γ -tubulina. Este núcleo se encuentra en estado de interfase. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis del plegamiento correcto de γ -tubulina en el embrión, donde adquiere su conformación funcional y es capaz de incorporarse al centrosoma.

Como control se utilizó α -tubulina recombinante en las mismas condiciones y no se observó efectos evidentes en la morfología y en el desarrollo de los embriones (resultados no mostrados). Por lo tanto el efecto de la γ -tubulina es específico y no influye el método experimental ni el hecho de inyectar proteína.

Con el propósito de confirmar la funcionalidad de la γ -tubulina recombinante micro-inyectada en los embriones se analizó su incorporación en los complejos γ -TuRC. Con este propósito se marcó γ -tubulina recombinante con biotina para detectarla una vez aislada de los embriones y fraccionada en gradientes de glicerol,

con estreptavidina fusionada con la peroxidasa de rabano (HRP) en una reacción de quimioluminiscencia. En la Figura 22 se muestra el fraccionamiento de un extracto de embriones inyectados con γ -tubulina biotinilada (1 mg/ml). La distribución de γ -tubulina en el gradiente es muy semejante a de γ -tubulina endógena del pez cebra, de acuerdo a los resultados de la Figura 9, con un máximo entre las fracciones 20 a 24 (alrededor del 35 % (v/v) de glicerol). Se observa que la señal de biotina revelada con estreptavidina-HRP muestra la misma distribución que la señal proveniente del revelado con anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina. Para comparar ambas distribuciones se analizó la densitometría de las intensidades de las bandas, que se normalizaron de 0 a 1 y graficaron en un gráfico de barras que se muestra en la parte superior de la Figura. Al comparar ambas curvas es evidente que las distribuciones de ambas señales, γ -tubulina y biotina presentan un patrón similar. Estos resultados permiten concluir que γ -tubulina recombinante purificada desde cuerpos de inclusión, completamente desnaturalada y no funcional es capaz de incorporarse a los complejos γ -TuRC y a los centrosomas de las células de los embriones del pez.

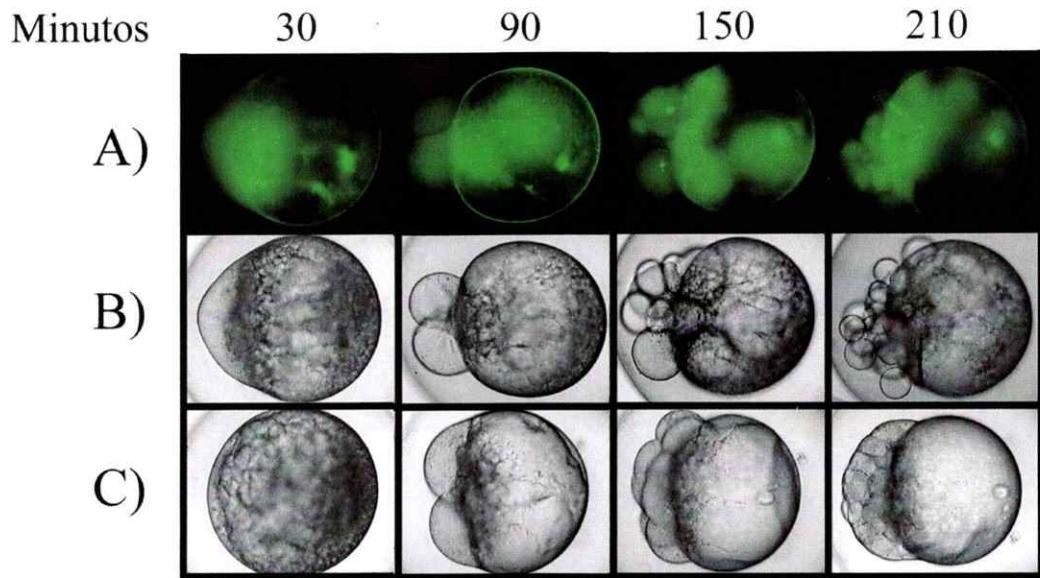


Figura 19. Microscopía de fluorescencia y de campo claro de un embrión temprano del pez cebra inyectado con γ -tubulina recombinante marcada con rodamina. A, micrografías de microscopía de fluorescencia tomadas a diferentes tiempos, durante el desarrollo de un embrión inyectado en estado de una célula con una solución que contiene γ -tubulina-rodamina (1 mg/ml). **B,** micrografías de campo claro tomadas a los mismos tiempos en el mismo embrión que se muestra en A. **C,** micrografías de campo claro de un embrión inyectado sólo con la solución de inyección. Los embriones se incubaron a 22 ° C.

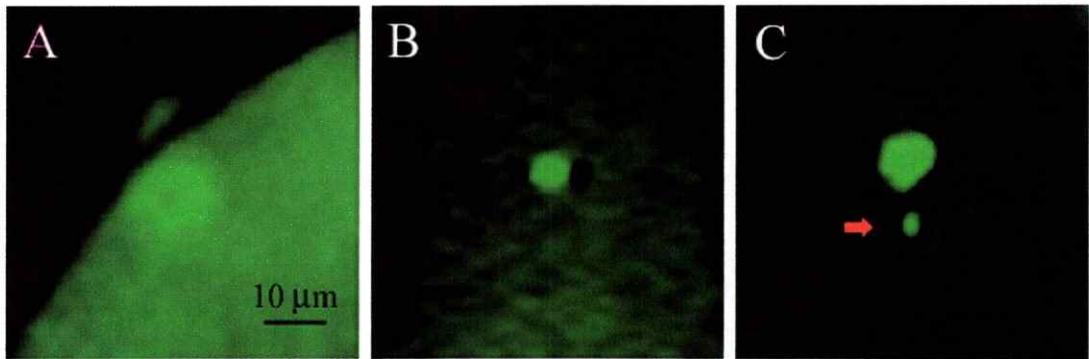


Figura 20. Micrografías de microscopía de fluorescencia de embriones inyectados con γ -tubulina recombinante marcada con rodamina. En A, B y C se observan tres imágenes representativas de coalescencias de γ -tubulina en diferentes embriones. Con la flecha roja se indica una coalescencia de γ -tubulina generada a partir de la coalescencia más grande.

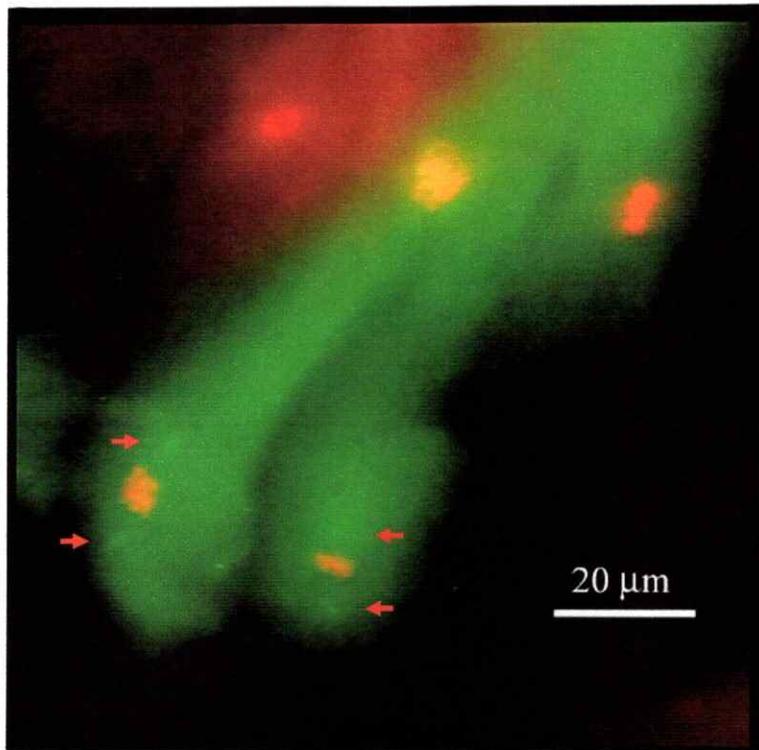


Figura 21. Micrografía de fluorescencia de células de un embrión inyectado con γ -tubulina recombinante marcada con rodamina. El embrión se fijó a las dos horas de desarrollo. γ -tubulina aparece en color verde y el material nuclear teñido con DAPI en rojo. Con cabezas de flechas rojas se indica la posición de los centrosomas marcados por la incorporación de la tubulina recombinante, asociados al núcleo de las células.

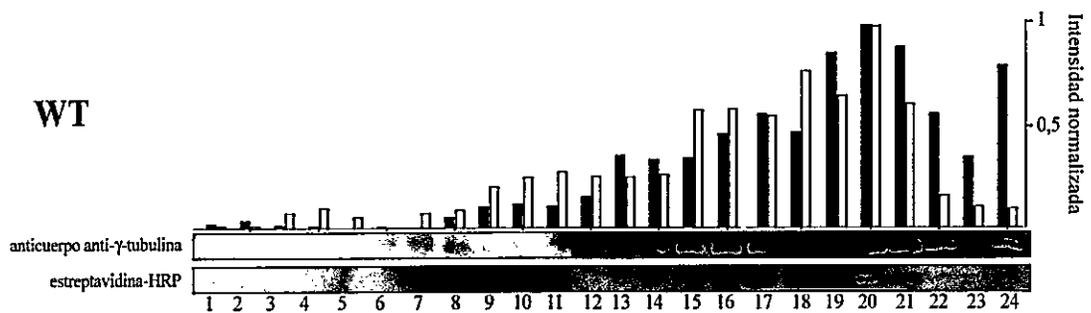


Figura 22: Fraccionamiento de un extracto de embriones tempranos del pez cebra inyectados con γ -tubulina biotinilada. El gráfico de barras muestra la distribución de la γ -tubulina biotinilada en un gradiente de glicerol. En barras negras se muestra la señal del anticuerpo anti- γ -tubulina y en gris la señal de la estreptavidina-HRP. Estos datos corresponden a las densitometrías de los inmunoblot de las fracciones separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS reveladas después de transferirlas a una membrana de nitrocelulosa con anticuerpo monoclonal-anti γ -tubulina y estreptavidina-HRP como se indica en la Figura.

7. g. Importancia del “loop” T7 en la incorporación de γ -tubulina humana en el γ -TuRC y en su funcionalidad. Con el objetivo de demostrar la importancia del “loop” T7 en la función de la γ -tubulina se utilizaron las mismas mutantes analizadas para su interacción con la chaperonina CCT mostradas en la Figura 16, donde se demostró que estas mutaciones sólo inducen una pérdida de afinidad por la chaperonina. Se probó el efecto de estas mutaciones sobre el desarrollo temprano del embrión de manera análoga a los experimentos mostrados en la Figura 19. En la Figura 23, se muestran micrografías de embriones representativos microinyectados en estado de una célula con γ -tubulina recombinante WT y las mutantes M249E y T7 β marcadas con rodamina (1 mg/ml). Como se observa en las micrografías, la morfología de los embriones (Figura 23B, C y D) incubados durante dos horas es claramente anormal. Presentan blastómeros con una morfología distinta a la del embrión control. A veces con números impares de células. Muy semejante a lo que ocurre con los embriones inyectados con la proteína tipo silvestre. La distribución de la señal de fluorescencia es la misma para todas las proteínas, siendo desplazada hacia el polo animal durante la segregación ovoplásmica y quedando distribuida en su mayoría al interior de los blastómeros. La microinyección de altas cantidades de γ -tubulina, (5 ng) produce una elevada mortalidad de los embriones, y solo un promedio del 5% de los embriones permanecen vivos después de 24 h de desarrollo. Estos embriones probablemente incorporaron menos proteína de la inyectada. En la parte inferior de la Figura 23 se muestran tres embriones de 24 horas representativos que fueron inyectados con γ -tubulina WT, y las mutantes M249E y T7 β . Se observa que el embrión inyectado con proteína WT no es capaz de desarrollarse, quedando detenido aparentemente en estado de “bud stage” o “2-somitos” según Kimmel y

col. (1995). El embrión inyectado con la mutante M249E se desarrolló a estadios más avanzados, pero presenta claras anomalías. Estos embriones son en su mayoría acefálicos. No muestran formación de las vesículas ópticas. Sin embargo presentan movimientos espontáneos. Probablemente estos embriones mueran en etapas posteriores de su desarrollo. Los embriones sobrevivientes a la inyección con γ -tubulina T7 β parecen ser más normales que los dos anteriores. Sin embargo, su morfología no es igual a la de embriones del mismo estado de desarrollo en el control, mostrando diferencias en la disposición de las vesículas ópticas. A pesar de último, estos embriones muestran un comportamiento muy semejante a los embriones control. En cuanto a la distribución de la fluorescencia, en los embriones en estadios más tempranos, la señal se encuentra restringida a la zona del disco embrionario, donde se encuentran los blastómeros del embrión en desarrollo, es decir el polo animal. En tanto que en los embriones de 24 h de desarrollo la señal se encuentra más distribuida. Gran parte de la señal se encuentra en el viteloplasma y parte minoritaria en el embrión propiamente tal. En todos los embriones de 24 h se observa coalescencias de la señal dentro de las células como las que se muestran en las Figuras 19 y 20. La ubicación de estas señales no parecen tener un patrón discernible, encontrándose por toda la extensión del cuerpo del embrión, incluida la cabeza. Los ojos parecen excluir la señal en el caso de los embriones inyectados con la mutante T7 β .

En la Figura 24 se muestra el fraccionamiento de extractos de embrión inyectados con γ -tubulina WT y las mutantes M249E y T7 β . Las fracciones se analizaron por inmunoblot con estreptavidina-HRP para detectar la presencia de la proteína biotilada y un anticuerpo anti- γ -tubulina para detectar la γ -tubulina total.

El fraccionamiento del extracto de los embriones inyectados con γ -tubulina M249E biotinilada (Figura 24B) muestra una distribución diferente de la señal de la biotina (barras grises) respecto de la señal del anticuerpo anti- γ -tubulina en los gradientes (barras negras). La señal del anticuerpo de γ -tubulina aparece en tres fracciones; una más densa (fracciones de la 18 a la 22) que corresponde a los complejos γ -TuRC y una menos densa (de la fracción 3 a la 14) de complejos o polímeros más pequeños de γ -tubulina (muy semejante a lo observado en Figura 8) y una en la última fracción, que puede corresponder a proteína agregada. La señal de estreptavidina en cambio, se distribuye solamente en la fracción menos densa y en la última fracción (de agregados de proteína). Este resultado indica que la γ -tubulina M249E no se incorpora en los complejos γ -TuRC de los embriones, indicando que este aminoácido del "loop" T7 es necesario para la interacción de γ -tubulina con las proteínas del complejo γ -TuRC.

En la Figura 24C se observa que la proteína γ -tubulina T7 β biotinilada, se distribuye de manera diferente a la proteína WT y la mutante M249E, con un máximo de intensidad en fracciones de menor densidad (14 a 16) a la que habitualmente aparece el γ -TuRC (19 a 21). Además, se observa que la señal de la estreptavidina coincide con la señal del anticuerpo anti- γ -tubulina. Estos resultados indican que la incorporación de γ -tubulina T7 β a los complejos γ -TuRC de los embriones, modifica la conducta hidrodinámica de estos últimos, induciendo complejos con un tamaño menor o con una forma más simétrica.

Resumiendo, los resultados de la Figura 24 muestran que la mutación M249E impide la incorporación en los γ -TuRC y la T7 β modifica la conducta hidrodinámica

de los complejos γ -TuRC. Sin embargo no permiten distinguir si los efectos *in vivo* son por la pérdida de funcionalidad de la γ -tubulina. Para determinar de manera directa la capacidad nucleadora de las mutantes de γ -tubulina, se probó su capacidad de interactuar con microtúbulos *in vitro*. Con este propósito se inyectó γ -tubulina recombinante biotinilada WT, M249E y T7 β en 300 embriones tempranos del pez cebra (en estado de una célula) que se incubaron por 4 h a 28 °C para favorecer la incorporación y posteriormente se prepararon extractos crudos del citoplasma de los embriones inyectados. Los extractos crudos se mezclaron con tubulina purificada de cerebro de pollo y se polimerizaron *in vitro*. Las polimerizaciones fueron inducidas por temperatura y después de 5 minutos de reacción los polímeros se precipitaron. Los líquidos sobrenadantes y los precipitados se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y por inmunoblot se detectó la γ -tubulina marcada y no marcada con biotina con un anticuerpo anti- γ -tubulina para detectar la γ -tubulina total y con streptavidina-HRP para detectar la γ -tubulina biotinilada inyectada en los embriones. Como control negativo se realizó una reacción en ausencia de tubulina y como control positivo la polimerización de microtúbulos se hizo en presencia de un extracto de embriones sin inyectar.

Como se observa en los inmunoblot de la Figura 25, en ausencia de tubulina, la γ -tubulina proveniente de los extractos de embrión permanece en los sobrenadantes. En presencia de α/β -tubulina polimerizada, parte de la γ -tubulina soluble, precipita. Esta conducta se observa con la γ -tubulina de los embriones sin inyectar y con las tres proteínas inyectadas, la γ -tubulina WT y las mutantes M249E y T7 β . Se observa una menor cantidad de señal de γ -tubulina en el control sin

inyectar que en los embriones inyectados, debido al aumento de la cantidad de γ -tubulina total por la inyección de γ -tubulina recombinante. En todos los casos se observa que la mayoría de la γ -tubulina se encuentra en los precipitados, es decir que se encuentra interactuando con los microtúbulos. Lo mismo es válido para la γ -tubulina inyectada, pues los inmunoblot revelados con estreptavidina-HRP muestran la misma conducta. Así: γ -tubulina WT y las mutantes biotiniladas en las reacciones en ausencia de α/β -tubulina, permanecen solubles. En tanto que en presencia de α/β -tubulina, la mayoría de la proteína precipita con los microtúbulos. Estos resultados indican que las mutaciones en el "loop" T7 no alteran la interacción de γ -tubulina con α/β -tubulina para nuclear los microtúbulos, aunque la afinidad de las mutantes con CCT está disminuida (Figura 16)

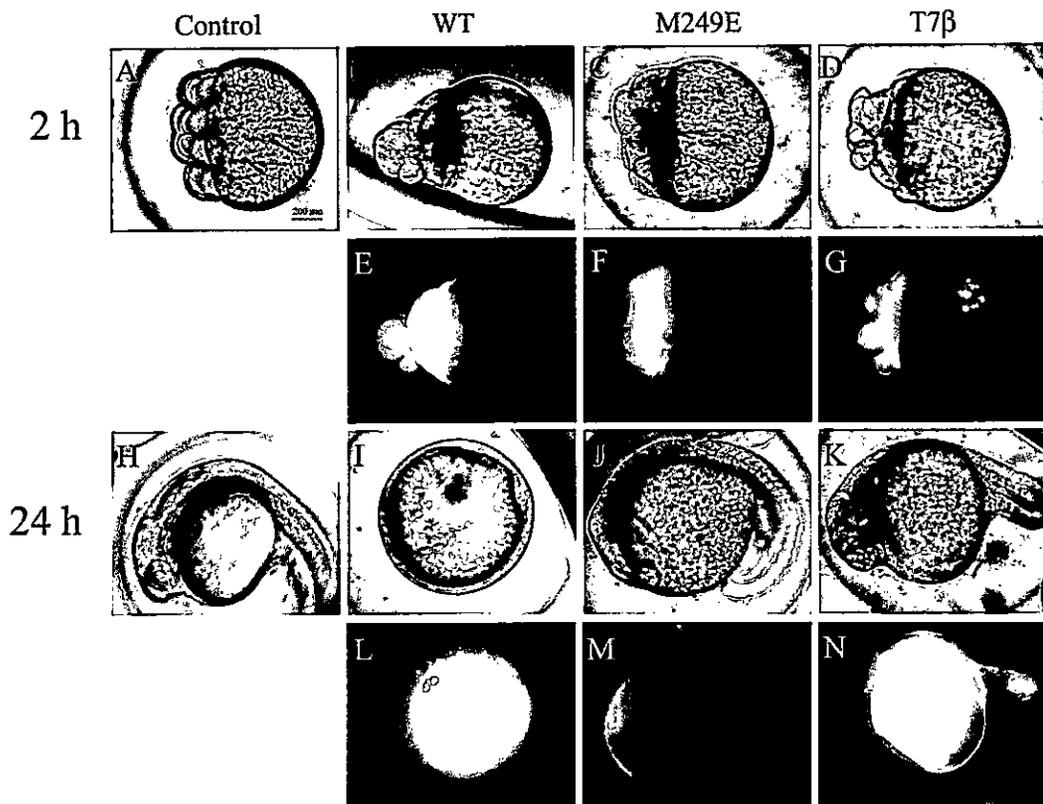


Figura 23: Microscopía de fluorescencia (E-G y L-N) y de campo claro (A-D y H-K) de embriones inyectados con γ -tubulina recombinante tipo silvestre (WT) y las mutantes M249E y T7 β marcadas con rodamina. En la parte superior de la Figura se muestran micrografías de campo claro (B, C y D) y fluorescencia (E, F y G) de embriones de dos horas de desarrollo microinyectados con la proteína recombinante WT y las mutantes (1 mg/ml) como se indica en la parte superior. En la parte inferior de la figura se muestran micrografías de campo claro (I, J y K) y fluorescencia (L, M y N) de embriones de 24 h de desarrollo microinyectados con las mismas proteínas recombinantes. En A y H se muestran embriones control microinyectados con medio de inyección de dos y veinticuatro horas de desarrollo, respectivamente.

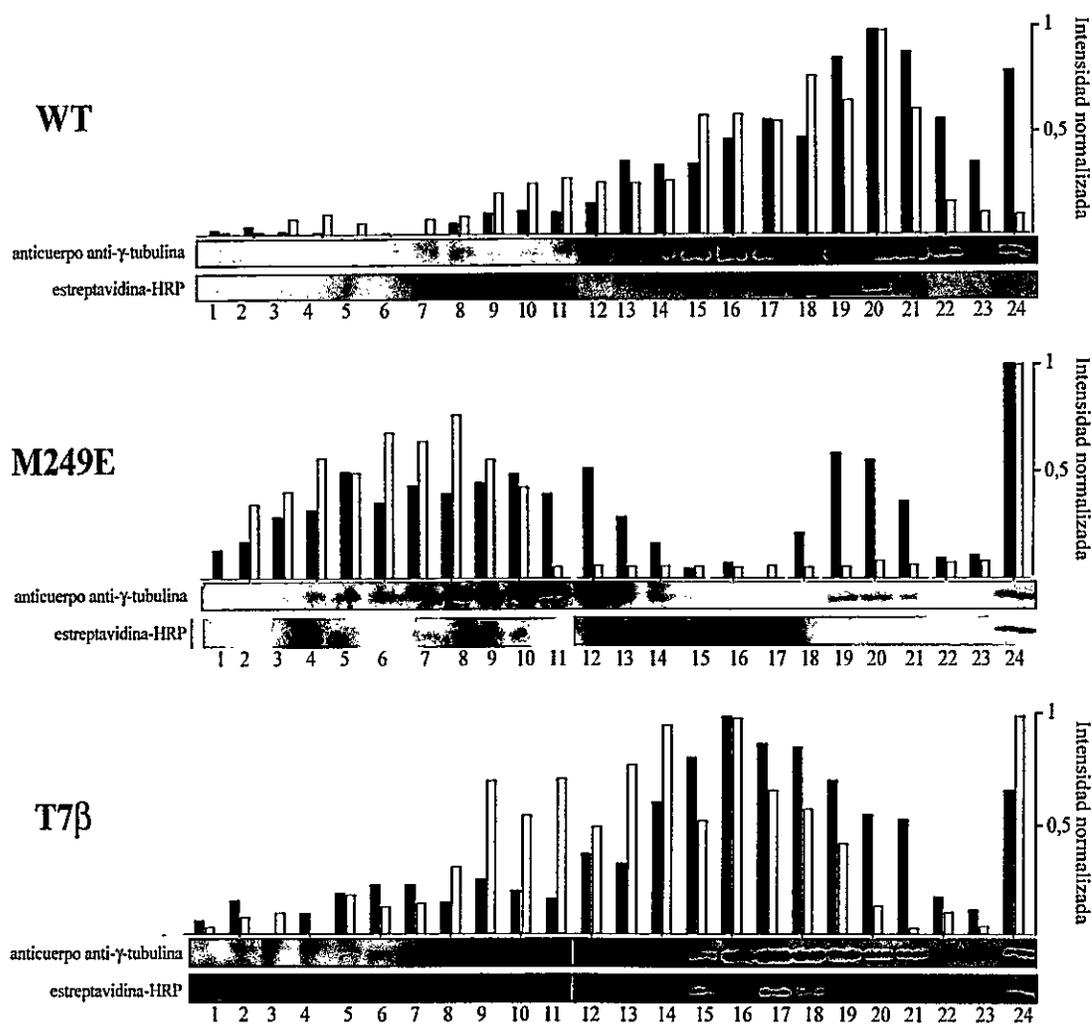


Figura 24. Fraccionamiento de extractos de embriones tempranos del pez cebra inyectados con γ -tubulina WT y mutantes M249E y T7 β biotiniladas. Se muestran análisis por inmunoblot (la parte inferior de las Figuras) de fraccionamientos por centrifugación en gradientes de densidad de glicerol de extractos crudos de embriones del pez cebra de 4 h de desarrollo (28 °C) microinyectados en estado de una célula con γ -tubulina recombinante biotinilada WT, M249E y T7 β , respectivamente. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas utilizando estreptavidina-HRP para detectar la presencia de la proteína biotinilada y posteriormente reveladas con un anticuerpo monoclonal anti- γ -tubulina como se indica en cada figura. En la parte superior cada figura se muestra un grafico

de barras de las densitometrías normalizadas de las bandas de los inmunoblot de la parte inferior. En barras negras se muestra la señal del anticuerpo anti- γ -tubulina y en gris la señal de la streptavidina-HRP.

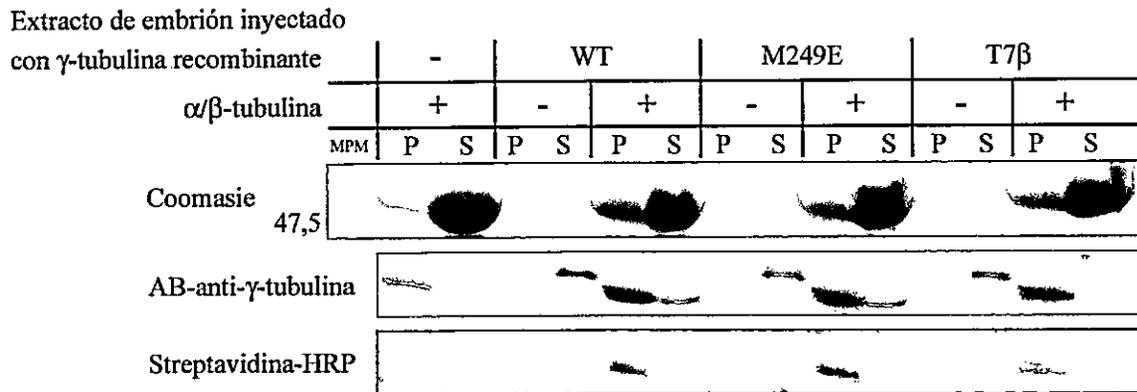


Figura 25. Polimerización *in vitro* de microtúbulos de α/β -tubulina de cerebro de pollo en presencia de extractos de embriones tempranos del pez cebra inyectados con γ -tubulina recombinante WT y las mutantes M249E y T7 β . Polimerización de microtúbulos separados por centrifugación en presencia de un extracto de embriones pez cebra (control negativo), extracto de embriones de pez cebra inyectados con γ -tubulina recombinante biotinilada tipo silvestre (WT) y las mutantes M249E y T7 β , según se indica en la figura. En las reacciones donde se indica con un signo (+) se adicionó tubulina (2mg/ml) purificada desde cerebro de pollo. Control negativo en ausencia de tubulina (-). Las reacciones de polimerización se indujeron por temperatura y los microtúbulos se precipitaron a los 5 min. Se separaron los precipitados (P) de los líquidos sobrenadantes (S) y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS e inmunoblot. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul de Coomassie para detectar la tubulina. Los inmunoblot se revelaron con estreptavidina HRP para detectar la proteína biotinilada y con anticuerpo anti- γ -tubulina, como se indica en la figura.

8. DISCUSION.

Las tubulinas son proteínas incapaces de plegarse espontáneamente *in vitro* y dependen de una serie de factores citoplasmáticos de plegamiento para alcanzar su estructura funcional *in vivo*. Esta característica de las tubulinas ha reducido las posibilidades metodológicas para hacer estudios que puedan relacionar su estructura con la función que cumplen en la célula. Mucha de la información proveniente de los modelos estructurales de estas proteínas permanece aun en el plano hipotético debido a la dificultad de obtener pruebas experimentales que la avalen. Por un lado, se han realizado estudios genéticos en levaduras, donde se ha demostrado la importancia de ciertas regiones de la estructura de estas proteínas en su función dentro del contexto celular (Anders y Botstein, 2001; Jung y col., 2001; Vega y col., 1998). Así, mutaciones que alteran la función de las tubulinas generan fenotipos letales en levaduras, por lo que la información obtenida en estos experimentos es difícil de interpretar en términos estructurales, pues no es posible purificarlas en cantidades suficientes para la experimentación bioquímica. Por otro lado, se han realizado estudios bioquímicos con tubulinas que se han obtenido en sistemas de traducción *in vitro* (Leguy y col., 2000; Farr y col., 1997), en los cuales se agrega en un extracto de citoplasma el mensajero que codifica la proteína o bien la proteína ya traducida. Mediante esta metodología se ha obtenido tubulinas en estado funcional, sin embargo, la traducción *in vitro* es un sistema complejo, costoso y muy poco eficiente en cuanto a las cantidades de proteína que se obtienen. La inyección de RNA mensajero o proteína sintetizada *in vitro* en citoplasma de células vivas ofrece una alternativa interesante para este tipo de estudios. Los ovocitos y los embriones fecundados de anfibios, peces e invertebrados son sistemas robustos y de gran

tamaño, que facilitan la microinyección de proteínas, ARN o ADN en su interior. Son comunes los experimentos donde se inyecta el heterodímero de α/β -tubulina purificado desde cerebro de bovino marcado con alguna sonda fluorescente en embriones de *Drosophila* (Kellogg y col. 1988), de pez cebra (Fernandez y col. 2006) y de sanguijuela (Fernández y col. 2004; Fernández y col. 2002) El heterodímero α/β -tubulina microinyectado en estado nativo se incorpora sin problemas a los microtúbulos de la célula. En todos estos experimentos el heterodímero α/β inyectado se utiliza como trazador de citoesqueleto y no como objeto de estudio. Hasta donde se sabe, no se ha utilizado este sistema con la finalidad de estudiar la estructura o el tipo de interacciones de la tubulina al ser incorporada en las estructuras celulares. Tampoco existen trabajos donde se haya inyectado alguna tubulina distinta del heterodímero α/β -tubulina y aun menos tubulina desplegada. En la presente tesis se utilizaron los embriones tempranos del pez cebra como modelo experimental para plegar γ -tubulina recombinante marcada y estudiar la relación que existe entre la región del el "loop" T7 y la función que éste cumple en la célula, y de este modo contar con una metodología robusta para posteriores estudios estructura-función con proteínas que no pueden plegarse *in vitro*.

8. a. Expresión y silenciamiento de la γ -tubulina endógena en embriones tempranos del pez cebra. El primer objetivo de esta tesis implicó el estudio de la biología de la γ -tubulina endógena de los embriones tempranos del pez cebra. El único gen de γ -tubulina del pez cebra está codificado en el cromosoma 3 en la posición 34.870.575 – 34.892.264 y su transcrito es un mensajero conocido como tubgl. Mediante inmunoblots y RT-PCR se demostró que los cigotos del pez cebra

poseen el mensajero de γ -tubulina. Esto es consistente con el trabajo de Liu y Lessman (2007) donde se demostró por hibridización *in situ* que el mensajero de γ -tubulina se encuentra presente en el ovario, en el ovocito y en los embriones temprano del pez. Por ende debe corresponder a un producto materno (Kane y Kimmel, 1993; Pellegrini 2003). Mediante inmunoblot se detectó solamente una isoforma de la proteína de γ -tubulina, lo que se condice con la existencia de solamente un gen que la codifica. Los niveles de expresión de la proteína parecen no variar durante el desarrollo temprano del pez.

Los resultados de esta tesis demuestran que la γ -tubulina del pez cebra se ubica en la matriz pericentrosomal, al igual que en todos los sistemas animales estudiados (Zheng y col. 1995; Gunawardane y col. 2000, Moritz y col. 2000; Oregama y col. 1999 y Murphy y col. 2001). En las inmunofluorescencias de las Figuras 7 y 8, se observa que la matriz pericentrosomal sufre evidentes reestructuraciones durante el ciclo celular. Se ha observado que durante la primera división de los embriones de *C. elegans*, la matriz pericentrosomal sufre reestructuraciones muy parecidas (Strome y Cols 2001). La γ -tubulina forma dos puntos muy intensos de señal durante la metafase y la anafase, los cuales se ubican uno a cada lado del núcleo. Luego la señal se dispersa entre la anafase tardía y la telofase. Esta dispersión debe estar asociada al proceso de tracción de las cromátidas hacia las dos células hijas (ver Figura 8). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la señal de γ -tubulina sufre una segunda reestructuración durante la profase temprana (Figura 8), donde el material pericentrosomal parece dispersarse y adoptar una forma alargada. Es posible que este alargamiento de la matriz pericentrosomal sea parte del proceso de división del centrosoma. No se encontró ningún trabajo que

reporte una reestructuración de la matriz pericentrosomal semejante a la que observamos en los embriones tempranos del pez cebra. Para determinar la naturaleza de este proceso es necesaria más investigación a nivel celular para determinar la topología de los centriolos y del arreglo de microtúbulos simultáneamente y de la señal de γ -tubulina y el núcleo.

Para determinar la tasa de recambio de γ -tubulina de los embriones tempranos del pez cebra se silenció la expresión de γ -tubulina a nivel traduccional con un oligomorfolino antisentido (*tubg11*). Si la proteína no se expresa más, la disminución de esta dependerá de su tiempo de vida, lo que nos podría dar información indirecta acerca del recambio de la proteína en los embriones. El fenotipo que genera el *Mo-tubg11* (Figura 4) inyectado a bajas concentraciones es claramente anormal en relación a los embriones controles. Estos embriones “morfantes” llegan a desarrollarse hasta estadios tardíos del desarrollo pero mueren antes de las 48 horas. Los embriones inyectados a mayores concentraciones de *Mo-tubg1* se detienen durante la gastrulación. Este fenotipo es muy concordante con lo observado en un trabajo realizado en ratón, donde se demostró que animales transgénicos “knockout” (γ -tubulina^{-/-}) en una de las dos isoformas de γ -tubulina, los embriones no son capaces de desarrollarse mas allá del estado de gástrula (Yuba-Kubo y col. 2005). Los embriones de *C. elegans* silenciados por RNAi inyectado en el gusano progenitor, la síntesis de γ -tubulina cesa y los niveles de proteína disminuyen (Liu y col. 1998) a diferencia de lo que ocurre nuestros embriones morfantes donde los niveles de γ -tubulina no varían significativamente respecto a los controles (Figura 4). Los autores de la publicación del ratón “knockout” de γ -tubulina no presentan ninguna evidencia de la disminución de la cantidad de γ -tubulina en sus embriones.

Probablemente lo que ocurre es semejante a lo que observamos en nuestros morfantes: los niveles de proteína no disminuyen, pero el citoesqueleto de microtúbulos presenta serias alteraciones y las células dejan de dividirse.

La polimerización de microtúbulos en los embriones morfantes *tubg11* no cesa, del mismo modo que ocurre en ratones transgénicos γ -tubulina^{-/-} en ratón y en *C. elegans* (Liu y col. 1998; Strome y Col. 2001). En los embriones morfantes se observa una gran cantidad de microtúbulos en los blastómeros y en la región cortical, sin embargo estos no parecen estar formando alguna estructura definida semejante a un huso mitótico o a microtúbulos astrales, solamente detectamos microtúbulos dispersos en el citoplasma sin una aparente organización. Al contrario del ratón "knockout" y en *C. elegans* silenciado por RNAi, donde los microtúbulos continúan formando parte de estructuras mayores, semejantes al haz del huso.

Los resultados que se obtuvieron llevan a la conclusión de que el fenotipo que produce el *Mo-tubg11* no se debe a una disminución de la cantidad de γ -tubulina en los embriones, pues esta no disminuye notoriamente y tampoco a un cese de la nucleación de microtúbulos, debido a que estos no dejan de aparecer en las células. Es posible concluir también que el tiempo de vida medio de γ -tubulina debería ser mas largo que el período que se está analizando. Sin embargo, la aparición del fenotipo morfante sugiere que la γ -tubulina debe estar traduciéndose en los estadios tempranos del desarrollo del pez y que además, su traducción es esencial para el desarrollo y el proceder del ciclo celular. También podemos concluir que la maquinaria de plegamiento de γ -tubulina debe estar funcional en estos estadios tempranos. El hecho de que en el silenciamiento génico producido por *Mo*, el mRNA no es eliminado, permite proponer la existencia de un mecanismo de regulación del

ciclo celular a nivel de mensajero que involucra la traducción de γ -tubulina.

8. b. Interacción de la γ -tubulina con la chaperonina CCT. Llorca y col. (2001b) y Bertrand y col. (2005) proponen que algunas regiones en la estructura de β -tubulina estarían involucradas en la interacción con CCT. Una de las regiones descritas por estos autores corresponde a la región del “loop” T7, estructura objeto de investigación en esta tesis y que se alteró por mutagénesis (mutantes M249E y T7 β). Hasta el momento no existe información a nivel estructural acerca de las regiones de interacción de γ -tubulina con CCT, sin embargo, dada la similitud de secuencia y de estructura es probable que la interacción sea similar a la de β -tubulina. Se sabe por los experimentos de Melki y col. (1993) y Ritco-Vinsovici y Willson (2000) que γ -tubulina interactúa con CCT y que además solo necesita esta interacción para alcanzar el estado funcional. Dado esto y dada la similitud estructural que presenta con β -tubulina (Aldaz y col. 2005) es posible esperar que las mutaciones que hemos introducido en la región del “loop” T7 de γ -tubulina alteren su capacidad de interactuar con CCT. Los resultados apoyan esta idea, pues ambas mutantes disminuyen su capacidad de interactuar con CCT, y además, esta disminución depende de la mutación. Como se observa en la Figura 14B, la disminución de la unión de los mutantes a CCT es mayor para la mutante M249E que para la mutante T7 β . Esto se debe a la naturaleza de la mutación introducida, pues la mutante M249E posee una carga negativa donde antes había un residuo hidrófobo, en tanto que la mutante T7 β posee la misma secuencia de β -tubulina en el “loop” T7, la cual también es sustrato de CCT por lo que no se esperaría una alteración muy grande en la unión.

Para precisar el fenómeno es necesario realizar otro tipo de experimentos en orden de determinar las constantes termodinámicas de unión de γ -tubulina con CCT y el efecto que tiene el "loop" T7 sobre estas constantes. Es posible realizar experimentos con γ -tubulina recombinante marcada con alguna sonda fluorescente, de modo de observar por ejemplo los cambios en la anisotropía de fluorescencia al ser titulada con diferentes cantidades de CCT.

Se sabe que β -tubulina interactúa con dos regiones opuestas de la cavidad de la chaperonina CCT, mediante dos dominios de su estructura. Así, la interacción se produce a través de un dominio estrecho y otro más grueso, atravesando la cavidad y adoptando una forma aparentemente triangular (Llorca y col. 2001a). Según Llorca y col. (2001a). La forma de la interacción de γ -tubulina con la chaperonina CCT es muy semejante al modelo propuesto para la interacción de β -tubulina con CCT. En este modelo la β -tubulina interactúa de dos modos con la chaperonina; la región gruesa de interacción corresponde al dominio C-terminal e interactúa con las subunidades β , δ y θ o bien con las subunidades ϵ , ζ y β . La interacción más pequeña corresponde al dominio N-terminal, que interactúa con las subunidades η y α y con α y θ . Esto es muy semejante a lo que observamos en los complejos ternarios de CCT- γ -tubulina-AB (Figura 18). Esto último en conjunto con la disminución de la afinidad por la chaperonina inducida por las mutaciones en el "loop T7", nos permite concluir que γ -tubulina interactúa con la chaperonina CCT de la misma manera que lo hace β -tubulina según lo descrito por Llorca y col. 2001a.

8. c. Relación entre la estructura y la función del "loop" T7 de γ -tubulina replegada en el citoplasma de embriones tempranos del pez cebra. La estructura

de los microtúbulos (Nogales y col. 1998) muestra que la región del “loop” T7 podría actuar como un componente importante para la interacción longitudinal de la tubulina, es más, se ha hipotetizado que en el “loop” T7 de α -tubulina se encuentra el residuo catalítico, el E255. En una posición análoga se encuentra el residuo D212 en FtsZ, homólogo bacteriano de las tubulinas. Este residuo se encuentra formando parte de la interacción longitudinal y parece estimular la hidrólisis del GTP durante la polimerización (Mukherjee y col., 2001). Sin embargo, la dificultad de obtener tubulina recombinante funcional ha impedido demostrar experimentalmente este hecho, aunque se conoce el detalle estructural de la zona de interacción longitudinal entre α/β -tubulina hace más de 10 años. De la γ -tubulina se sabe aun menos. Su estructura, publicada el 2005 (Aldaz y col., 2005), mostró una elevada similitud con sus parientes cercanos; α y β tubulina, lo cual indica que es muy probable que las regiones de interacción tanto lateral como longitudinal sean conservadas. La γ -tubulina une y cataliza la hidrólisis del GTP en solución, lo que indica que podría ser producto de una interacción longitudinal. No se ha demostrado que esta actividad sea producto de la polimerización como ocurre en α y β tubulina. Esto deja abierta la pregunta acerca de la formación de polímeros de γ -tubulina.

Después de descubierta la actividad nucleadora de microtúbulos de γ -tubulina (Zheng y col. 1995) varios autores propusieron modelos para explicar dicho mecanismo (Moritz y Agard, 2001; Erickson y Stoffler, 1996). Mediante microscopía electrónica se ha demostrado que γ -tubulina forma polímeros con forma de anillo (Zheng y cols 1995, Moritz y cols 2000). La que resulta ser una de las disposiciones más comunes de los polímeros de tubulina (Erickson y Stoffler 1996), incluidos los polímeros de FtsZ. Existe mucha evidencia que asegura que el tipo de polímero que

γ -tubulina genera es uno producido por interacciones laterales y se postula que la nucleación de microtúbulos es producida a su vez por interacciones longitudinales (Job y col., 2003; Weise y Zheng 2000; Keating y Borisy 2000; Moritz y col. 2000; Aldaz y col. 2005; Rice y col. 2008).

Con el propósito de demostrar en forma experimental el mecanismo de nucleación de los microtúbulos se obtuvo la γ -tubulina recombinante en bacteria, se marcó con rodamina y se microinyectó desnaturalada en los embriones. Se observó que la fluorescencia aparecía ubicada en los centrosomas. Esto se confirmó con γ -tubulina recombinante marcada con biotina, la cual es capaz de incorporarse a los complejos γ -TuRC de los embriones e interactuar con microtúbulos *in vitro*.

Llama la atención que la microinyección de γ -tubulina en embriones del pez cebra produzca alteraciones en su desarrollo. Aparecen fenotipos anormales que en la mayoría de los casos son letales. Este efecto que se observa es proporcional a la cantidad de proteína microinyectada. Podríamos especular que este efecto se debe a un exceso de γ -tubulina en el citoplasma de los embriones que aumenta el número de sitios de nucleación de microtúbulos, secuestrando así a la tubulina citoplasmática e induciendo un fenotipo semejante al que podría ser inducido por drogas que inhiben la polimerización de microtúbulos. Para comprobar esta proposición hace falta realizar inmunofluorescencias marcando el citoesqueleto de microtúbulos de embriones microinyectados, para observar el efecto del aumento de los sitios de nucleación dentro del citoplasma.

Los resultados muestran que al mutar la región del "loop" T7 de γ -tubulina se altera su incorporación en los complejos γ -TuRC. Este efecto depende del tipo de mutación, así, por ejemplo, una γ -tubulina con una mutación que cambia un residuo

hidrofóbico, la metionina 249, por un glutamato (mutante M249E), un residuo cargado, no es capaz de incorporarse en los complejos γ -TuRC de los embriones (Figura 23B). En tanto que una mutación que simula el "loop" T7 de β -tubulina se incorpora en los complejos γ -TuRC, cambiando su patrón de sedimentación dentro de los gradientes de densidad de glicerol (Figura 23C), lo que indica un cambio de forma. Este cambio puede deberse a una disminución en la interacción con alguna de las proteínas GRIP que forman parte del complejo γ -TuRC dando como resultado complejos con menor número de componentes, que en el caso de la mutación M249E, la disminución de la interacción con la proteína GRIP podría ser más drástica, de modo que no sería capaz de intercambiarse con la γ -tubulina endógena que esta formando parte de los complejos γ -TuRC.

Las proteínas mutadas en el loop T7 (T7 β y M249E) no presentaron ninguna diferencia en su capacidad de interactuar con microtúbulos *in vitro*, en comparación a la proteína tipo silvestre, como se observa en la Figura 24, lo que además sugiere que a pesar de la disminución en la interacción con la chaperonina, estas proteínas mutantes son capaces de alcanzar su estado funcional. La distribución en los gradientes de glicerol de la mutante γ -tubulina M249E (Figura 23B), muestra que esta proteína no se incorpora en los complejos γ -TuRC, sin embargo, su distribución parece no corresponder a proteínas monoméricas, ni diméricas, si comparamos su perfil con el perfil del heterodímero α/β -tubulina de la Figura 9. Al parecer esta mutante forma pequeños polímeros de γ -tubulina o bien complejos de menor tamaño en asociación con alguna proteína GRIP cuando se encuentra en el citoplasma de los embriones.

Los resultados en conjunto permiten proponer el modelo que se muestra

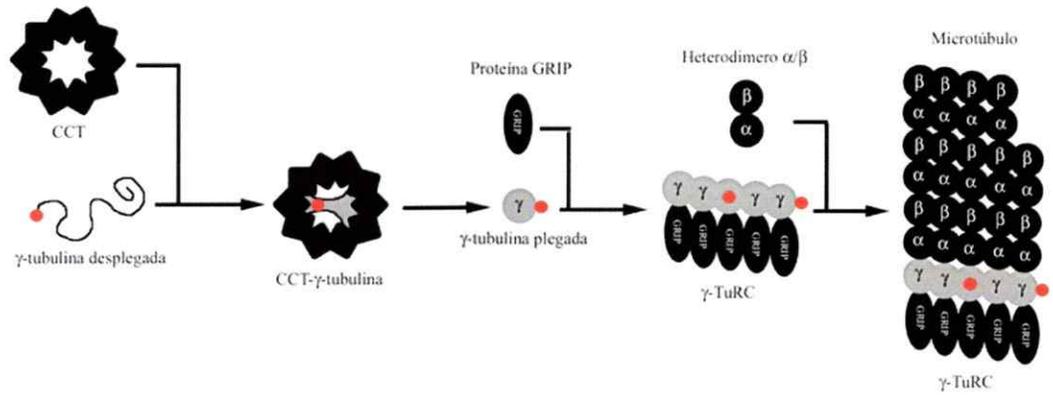
esquemáticamente en la Figura 25. La γ -tubulina recombinante desplegada, una vez dentro del citoplasma de los embriones es reconocida por la chaperonina CCT. Como resultado de esta interacción la proteína recombinante adquiere su conformación funcional, que permite su polimerización por interacciones laterales y longitudinales (por el extremo (-)) con proteínas GRIP para formar el complejo γ -TuRC. Esta sería la interacción que se encuentra alterada en las proteínas mutantes en el “loop” T7 (Figura 25B). Sin embargo, esta γ -tubulina mutante puede interactuar en forma lateral para formar polímeros de γ -tubulina, que es lo que se observa en la mutante M249E. El siguiente paso es la interacción longitudinal con heterodímeros de α/β tubulina durante la nucleación. Esta interacción longitudinal, que corresponde al extremo (+), no está afectada por las mutaciones.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la teoría de nucleación de microtúbulos conocida como modelo del templado (Mortiz y Agard, 2001). Este modelo propone que la interacción entre proteínas de γ -tubulina es de naturaleza lateral, siendo la interacción con las proteínas GRIP de naturaleza longitudinal mediante el extremo (-) y la interacción con α y β tubulina de naturaleza longitudinal mediante el extremo (+). Las mutaciones en el “loop T7”, afectarían la interacción longitudinal del extremo (-) impidiendo la incorporación de la γ -tubulina en los complejos γ -TuRC, sin alterar su oligomerización y su interacción con los microtúbulos *in vitro*, lo que se ajusta bien con el modelo mencionado. Sin embargo, para confirmar esta proposición hace falta explorar el resto de las superficies de interacción, así como la interacción lateral, donde se encuentra el “Loop” M (Nogales y col. 1999). Es necesario también explorar la interacción longitudinal del extremo (+) que permite la unión con α y β -tubulina. Para confirmar las

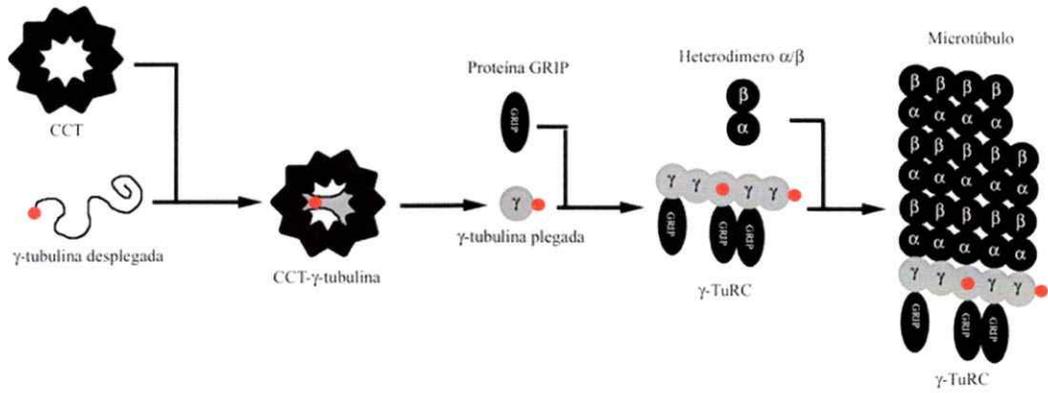
interacciones longitudinales con las proteínas GRIP, es necesario utilizar anticuerpos específicos contra estas proteínas, para de este modo ver su distribución en los gradientes.

Por último, el uso de embriones tempranos del pez cebra para obtener tubulina recombinante funcional y como método de estudio estructura-función de proteínas del citoesqueleto demuestra ser un buen modelo, pues posee cualidades que lo hacen apto para el uso de la microscopía óptica y de fluorescencia. Su tamaño y cantidad de citoplasma facilita los estudios bioquímicos, como se ha demostrado en esta tesis. El uso del embrión temprano pez cebra puede facilitar el estudio de otras tubulinas y eventualmente de otras proteínas que al igual que las tubulina no se pueden obtener funcionales al ser expresadas y purificadas como proteínas recombinantes en bacteria.

A



B



C

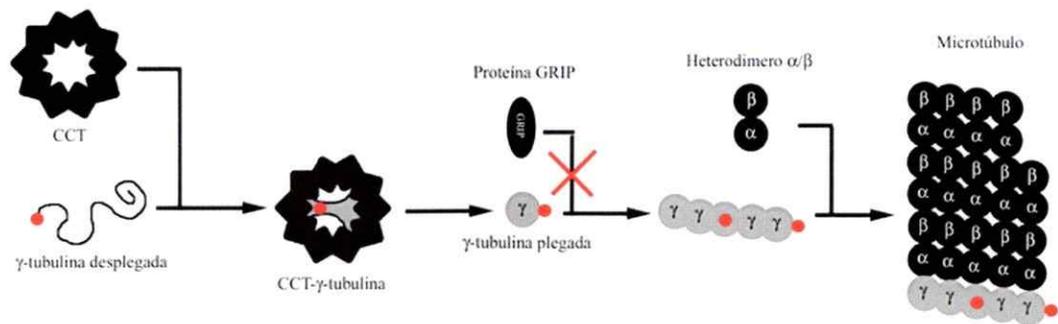


Figura 25. Modelo de la secuencia de interacciones de γ -tubulina en el citoplasma de embriones tempranos del pez cebra. En A se muestra el modelo de interacciones de γ -tubulina tipo silvestre, en B de la mutante de γ -tubulina T7 β y en C de la mutante de γ -tubulina M249E. La γ -tubulina recombinante desplegada, en el citoplasma de los embriones es reconocida e interactúa con la chaperonina CCT para adquirir su estructura funcional. La γ -tubulina funcional forma oligómeros por interacciones laterales y longitudinales (por el extremo (-)) con proteínas GRIP para formar el complejo γ -TuRC. El complejo γ -TuRC, por interacciones longitudinales con los heterodímeros de α/β tubulina da a lugar a la nucleación de los microtúbulos.

9. BIBLIOGRAFIA.

Aldaz H., Rice L., Stearns T. y Agard D. (2005). Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human γ -tubulin. *Nature* 435: 523 – 527.

Anders KR. y Botstein D. Dominant-lethal alpha-tubulin mutants defective in microtubule depolymerization in yeast. (2001) *Molecular Biology of the Cell*. 12: 3973-86.

Andreu, J., Oliva, M. y Monasterio, O. Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly. 2002. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(45): 43262 – 43270.

Archer J y Solomon F., 1994. Deconstructing the microtubule-organizing center. *Cell*, 79: 589 – 591.

Bertrand, S., barthelemy, I., Oliva, M., Carrascosa, J., Andreu, J. y Valpuesta, J. 2005. Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation. *Journal of Molecular Biology*, 346: 319 – 330.

Corey D. y Abrams J. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. 2001. *Genome Biology*. 2 (5): reviews 1015.1 – 1015.3.

Dictenberg, J. Zimmerman, W., Saparks, C., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F y Doxey, S. Pericentrin and γ -tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. 1998. *The Journal of Cell Biology*, 141 (1): 163 – 174.

Doxey S. 2001. Re-evaluation Centrosome Function. *Nature Reviews*, 2: 688-697.

Erickson, H. P. y Stoffler, D. 1996. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to α/β and γ -tubulin. *The Journal of Cell Biology*. 135 (1): 5 – 8.

Eswar N., Marti-Renom M. A., Webb B., Madhusudhan M. S., Eramian D., Shen M., Pieper U. y Sali A.. 2000. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.

Fernandez J., Toro J. y Ubilla A. 2004. Confocal and Video Imaging of Cytoskeleton Dynamics in the Leech Zygote. *Developmental Biology* 27: 59–74

Fernández J., Cantillana V. y Ubilla A. 2002. Reorganization and translocation of the ectoplasmic cytoskeleton in the leech zygote by condensation of cytasters and interactions of dynamic microtubules and actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* 53(3):214-30.

Fernández J., Valladares M., Fuentes R. y Ubilla A. 2006. Reorganization of Cytoplasm in the Zebrafish Oocyte and Egg During Early Steps of Ooplasmic Segregation Developmental Dynamics 235:656-671

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. y Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607.

Gomez-Puertas, P., Martín-Benito, J., Carrascosa, J., Willison, K. y Valpuesta, J. 2004. The substrate recognition mechanism in chaperonins. Journal of Molecular Recognition, 17: 85 - 94.

Gonzalez Carlos. Subclonamiento y expresión de polipéptidos C-terminal de α y β -tubulina en *Escherichia coli*. Estudio sobre la formación de cuerpos de inclusión (Co-director). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, Universidad de Chile (1997).

Guha, S. y Bhattacharyya, B. Refolding of urea-denatured tubulin: recovery of nativelike structure and colchicine binding activity from partly unfolded states. 1997. Biochemistry. 36: 13208-13213.

Gunawardane R., Martin O., Cao K., Zhang L., Dej K., Iwamatsu A. y Zheng Y. 2000. Characterization and reconstruction of *Drosophila* γ -tubulin ring complex subunits. The Journal of Cell Biology. 151 (7): 1513-1523.

Hannak E., Oegema K., Kirkham M., Gönczy P., Habermann B. y Hyman A. The kinetically dominant assembly pathway for centrosomal asters in *Caenorabditis elegans* is γ -tubulin dependent. 2002. The Journal of Cell Biology. 157 (4): 591-601.

Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B., Petroni, G., Michilova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G. y Staley, J. Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. 2002. PNAS, 99(26): 17049 - 17054

Job D., Valiron O. y Oakley B. 2003. Microtubule nucleation. Current Opinion in Cell Biology. 15: 111-117.

Joshi H., Palacios M., McNamara L. y Cleveland D. γ -tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. 1992. Nature. 356: 80-83.

Jung, M., Prigozhina, N., Oakley, E., Nogales, E. y Oakley, B. 2001. Alanine-scanning Mutagenesis of *Aspergillus* γ -Tubulin Yields Diverse and Novel Phenotypes. Molecular Biology of the Cell, 12: 2119 - 2136.

- Kane A. y Kimmel C. 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development*, 119: 447-456.
- Keating T. y Borisy G. Immunostructural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. 2000. *Nature Cell Biology*. 2: 352-357.
- Kimmel C., Ballard W., Kimmel S., Ullman B. y Schilling T. Stages of embryonic development of the zebrafish. 1995. *Developmental Dynamics*. 203: 253 – 310.
- Lacefield S. Magendantz, M. y Solomon, F. 2006. Consequences of Defective Tubulin Folding on Heterodimer Levels, Mitosis and Spindle Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 173: 635–646
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Leguy R., Melki R., Pantaloni D. y Carlier M. 2000. Monomeric γ -tubulin nucleates microtubules. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (29): 21975-21980.
- Li H., DeRosier D., Nicholson W., Nogales E. y Downing K. Microtubule structure at 8 Å resolution. 2002. *Structure*. 10: 1317-1328.
- Liu J. y Lessman C. Changes of γ -tubulin expression and distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary, oocyte and embryo. 2008. *Gene Expression Pattern*. 8: 237-247.
- Llanos R. y Chevrier V., Ronjat M., Meurer-Grob P., Martinez P., Frank R., Bornens M., Wade R., Whehland J. y Job. D. 1999. Tubulin binding sites on γ -tubulin: identification and molecular characterization. *Biochemistry*. 38: 15712-15720.
- Llorca O., Martín-Benito, J., Gómez-Puertas, P., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K., Carrascosa, J. y Valpuesta, J. 2001a. Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonine CCT and its substrate actin and tubulin. *Journal of Structural Biology*, 135: 205 – 218.
- Llorca, O., Martín-Benito, J., Grantham, J., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K., Carrascosa, J. y Valpuesta, J. 2001b. The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonine assisted folding of actin and tubulina. *The EMBO Journal*, 20 (15): 4065 – 4075.
- Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, A., Coll, M. y Zabala, J. 2001. Review: Postchaperonine tubulin holding cofactor and their role in microtubule dynamics. *Journal of Structural Biology*, 135:219 – 229.
- Lüthy R., Browie J. y Eisenberg D. 1992. Assesment of protein models whith three-dimensional profiles. *Nature*. 356 (6364): 83-85.
- McKean P., Vaughan S. y Gull K. 2001. The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science*. 114: 2723-2733.

- Melki, R., Vainberg, I., Chow, R. y Cowan, N. 1993, Chaperonine-mediated folding of vertebrate actin-related protein and γ -tubulin. *The Journal of Cell Biology*, 122 (6): 1301 – 1310.
- Mitchison T y Kirschner. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 1984 Nov 15-21;312(5991):237-42.
- Mitchison T. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science*. 1993 Aug 20;261(5124):1044-7.
- Moritz M. y Agard D. (2001) γ -tubulin complexes and microtubule nucleation. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 174 – 181
- Morits M., Braunfeld M., Guénebaut V., Heuser J. y Agard D. Structure of the γ -tubulin ring complex: A template for microtubule nucleation. 2000. *Nature Cell Biology*. 2: 365-370.
- Moritz M. y Agard D. γ -tubulin complex and microtubule nucleation. 2001. *Current Opinion in Structural Biology*. 11:174-181.
- Mukherjee A., Saez C. y Lutkenhaus J. 2001. Assembly of an FtsZ mutant deficient in GTPase activity has implications for FtsZ assembly and the role of the ZRing in cell division. *Journal of Bacteriology*. 183 (24): 7190-7197.
- Murata T., Sonobe S., Baskin T., Hyodo S., Hasezawa S., Nagata T., Horio T. y Hasebe M. 2005. Microtubule-depedent microtubule nucleation base don reclitment of γ -tubulin in higer plants. *Nature Cell Biology*. 7 (10): 961 – 968.
- Na, G.C., y Timashef, S. N. (1980). Thermodinamic linkage between tubulina self-association and the binding of vinblastine. *Biochemistry*. 19: 1355 – 1365.
- Nogales E., Wolf S. y Downing K. Structure of the α/β tubulin dimer by electron crystallography. 1998. *Nature*. 391: 199-203.
- Nogales E., hittaker M., Millagan R y Downing K. 1998. High-resolution model of the microtubule. *Cell*. 96: 79-88.
- Nogales E., Downing K., Amos L y Löwe J. 1998. Tubulin and FtsZ form a disctinct family of GTPases. *Nature Structural Biology*. 5(6): 451-458.
- Nogales E., Wang H.W. y Niderstrasser H. 2003. Tubulin rings: which way do they curve?. *Current Opinion in Structural Biology*. 13: 256 – 261
- Oliva M., Cordell S. y Löwe J. 2004. Structural insights into FtsZ protofilaments formation. *Nature Structural and Molecular Biology*. 11 (12): 1243-1250.
- Oregama K., Wiese C., Martin O., Milligran R., Iwamatsu A., Mitchison T. y Zheng Y. 1999. Characterization of two related *Drosophila* γ -tubulin complexex that difer in

- their ability to nucleate microtubules. *Journal of Cell Biology* 144 (4): 721-733.
- Popov A., Severin F. y Karsenti E. XMAP215 is required for the microtubule-nucleating activity of centrosomes. 2002. *Current Biology*. 12: 1326-1330.
- Reinaud-Messina, B. y Merdes, A. 2006. Gamma tubulin complexes and microtubule organization. *Current Opinion in Cell Biology*. 19(1):24-30
- Ritco-Vonsovici, M. y Willison, K. 2000. Defining the eukaryotic cytosolic chaperonin-binding sites in human tubulins. *Journal of Molecular Biology*, 304: 81 – 98.
- Sánchez, A., Brunet, J., Jameson, D., Lagos, R. y Monasterio, O. Tubulin equilibrium unfolding followed by time-resolved fluorescence and fluorescence correlation spectroscopy. 2004. *Protein Science*, 13: 81 – 88.
- Scheres, S.H.W., Valle, M., Nuñez, R., Marabini, R., Sorzano, C.O.S., Herman G.T. y Carazo, J.M. 2005. Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J. Mol. Biol.*, 348(1): 139-149
- Scheres, S.H.W., Valle M. y Carazo, J.M. 2005. Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics* 21 (Suppl. 2): ii243-ii244
- Schiebel E. γ -tubulin complexes: binding to centrosome, regulation and microtubule nucleation. 2000. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 113-118.
- Spiess, C., Meyer, A., Reissmann, S. y Frydman, J. 2004. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends in Cell Biology*, 14 (11): 598 – 604
- Solnica-Krezel, L. y Driever, W. 1994. Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organizing and function during epiboly. *Development*. 120: 2443- 2455.
- Sontag, C., Statley, J. y Erickson, H. In vitro assembly and GTP hydrolysis by bacterial tubulins BtubA and BtubB. 2005. *Journal of Cell Biology*, 169(2):233 –238
- Soriano C., Marabini R., Velásquez-Muriel J., Bilbao-Castro J.R., Scheres S. Carazo J.M. y Pascual-Montano A. 2004. XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* Volume 148 (2); 194-204.
- Strome S., Powers J., Dunn M., Reese K., Malone C., White J., Seydoux G. y Saxton W. 2001. Spindle Dynamics and the role of γ -tubulin in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 1751–1764.
- Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vanderkerckhove, J., Ampe, C. y Cowan, N. 1996. Pathway Leading to correctly folded β -tubulin. *Cell*. 86: 287 – 296.

- Tian, G., Vainverg, I., Tap, W., Lewis, S. y Cowan, N. 1995. Quasi-native chaperonine-bound intermediates in facilitated protein folding. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(41): 23910–23913.
- Vega, L., Fleming, J. y Solomon F. 1998. An α -Tubulin Mutant Destabilizes the Heterodimer: Phenotypic Consequences and Interactions with Tubulin-binding Proteins. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 9, 2349–2360.
- Vérollet C., Colombié N., Daubon T., Bourbon H., Wright M. y Raynaud-Messina B. 2005. *Drosophila melanogaster* γ -TuRC is dispensable for targeting γ -tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *Journal of Cell Biology* 172 (4): 517-528.
- Voguel J., Drapkin B., Oomen J., Beach D., Bloom K. y Snyder M. 2001. Phosphorylation of γ -tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Developmental Cell*. 1: 621-631.
- Volter W. y Erickson H. 1984. The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 259 (16): 10430-10438.
- Wang C., Cormier A., Gigant B. y Knossow M. 2007. Insight into the GTPase activity of tubulin from complexes with stathmin-like domains. *Biochemistry*. 46, 10595-10602.
- Wiese C. y Zheng Y. A new function for the γ -tubulin ring complex as microtubule minus-end cap. 2000. *Nature Cell Biology*. 2: 358-364.
- Wise, D. O., Krahe, R. y Oakley, B. R. 2002. The gamma-tubulin gene family in humans. *Genomics* 67, 164 – 170.
- Wiese, C. y Zheng, Y. 2006. Microtubule nucleation: γ -tubulin and beyond. *Journal of Cell Science*. 119: 4143-4153.
- Yuba-Kubo A., Kubo A., Hata M. y Tsukita S. Gene knockout analysis of two γ -tubulin isoforms in mice. 2005. *Developmental Biology*. 282(2):361-73.
- Zheng Y., Jung K. y Oakley B., 1991. γ -tubulin is present *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated whit the centrosome. *Cell*. 65: 817-823.
- Zheng Y., Wong M., Alberts, B. y Mitchison T. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378: 578-583.