

UCH-FC  
Biotecnología  
A663c  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES  $\gamma$ TUBD279N y  $\gamma$ TUB $\Delta$ A283 EN  
EL “LOOP” M DE  $\gamma$ -TUBULINA”**

Seminario de Título entregado a la  
Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniera en Biotecnología Molecular

por

**GÍSSELA ANDREA ARAYA ROJAS**

Director de Seminario de Título: Dr. OCTAVIO MONASTERIO OPAZO  
Co-directora de Seminario de Título: Dra. ROSALBA LAGOS MÓNACO

Agosto, 2011

Santiago – Chile



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Gissela Andrea Araya Rojas**.

“CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES  $\gamma$ TUBD279N y  $\gamma$ TUB $\Delta$ A283 EN EL “LOOP” M DE  $\gamma$ -TUBULINA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

*Dr. Octavio Monasterio Opazo*  
**Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en tinta azul de Octavio Monasterio Opazo.

*Dra. Rosalba Lagos Mónaco*  
**Co-Directora**

Firma manuscrita en tinta azul de Rosalba Lagos Mónaco.



**Comisión de Evaluación**

*Dr. Juan Fernández Hidalgo*  
**Presidente Comisión**

Firma manuscrita en tinta azul de Juan Fernández Hidalgo.

*Dra. Claudia Stange Klein*  
**Evaluador**

Firma manuscrita en tinta azul de Claudia Stange Klein.

Santiago de Chile, Agosto de 2011

## Biografía

Nací el 5 de enero de 1984 en el glorioso Iquique. Mi madre se llama Carmen y mi padre Reinaldo. Para mí son mi mami y mi papi. Tengo una hermana menor por 4 años que se llama Carla. El nombre se lo puse yo, y a pesar de eso para mí es la Carlota. Ella es uno de mis primeros recuerdos nítidos. Mis primeros 11 años los viví en un pueblo en mitad del desierto de la I región, Pozo Almonte. Fue una excelente niñez, acompañada de una gran y cariñosa familia materna, mezclada con numerosos viajes semanales a Iquique a visitar a mis abuelos paternos. Después de eso mi familia se trasladó a vivir a Iquique. Luego de unos meses un poco complicados, que fue lo que me costó adaptarme al nuevo ritmo, empezó la siguiente etapa de mi vida. Una de las mejores. Ingresé al Liceo Academia Iquique en 7° básico y me quedé allí hasta que terminé mi enseñanza media. En esa época es que conocí a “las niñas”, mis grandes amigas del alma, Un par años antes de terminar el colegio aparecieron “los niños”. Ellas y ellos son los que hasta hoy en día, pese a los años, los kilómetros y los distintos estilos de vida, siguen acompañándome en las buenas y en las malas. Y se les agradece. Al salir del colegio estaba media perdida (como me ha ocurrido ya varias veces en la vida, la diferencia es que esa fue la primera vez). Mi papi muy sabiamente me recomendó que hiciera un Bachillerato para aclarar mis dudas vocacionales. Y que ojalá fuera en la Universidad de Chile, que fue donde él estudio. Le hice caso, y con 18 años recién cumplidos, sin saber casi nada de la vida, me vine a Santiago el año 2002. Terminé el Bachillerato y tenía la película más clara: quería ser Ingeniera en Biotecnología Molecular. Por qué? Para qué? Ni idea, solo que era lo que más me gustaba. Pero acerté. Me gustaron los ramos, me fue bastante decente y conocí excelentes personas. Por el dato de mis grandes amigos y compañeros de curso, Mario y Jorge, llegué al BEM. Eso fue hace muchos años ya. Ahí aprendí, de la mejor forma y con los mejores creo yo, casi todo lo que se referente al pipeteo y es donde me convencí finalmente de que había estudiado la carrera correcta.





## Agradecimientos

Quiero empezar dándole las gracias a mi mami. Para mi ella es una especie de ídola y ejemplo a seguir, ya que todo lo que soy se lo debo a ella, También le agradezco a mi papi, por sus consejos y apoyo. Especialmente a mi tía Susana, por su ayuda infaltable. En general a toda mi familia, ya que siempre ha estado allí para apoyarme, contenerme, consolarme y alegrarme.

Agradezco también al Dr. Octavio Monasterio, mi tutor. Y no sólo por su labor como maestro, sino que también por la confianza, el apoyo y los consejos que me ha entregado a lo largo de los años que he trabajado en su laboratorio. También le agradezco a la Dra. Rosalba Lagos.

Quisiera también expresar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Luis Pouchucq por su amistad y porque me enseñó todo lo necesario para trabajar en un laboratorio y para realizar este seminario de título. A Alexis con especial cariño. A Bea, Sergio, Matu, Stolen, Felipe M. y César. A mi compañera de lab y concubina, la Chica. Debo de hacer un reconocimiento especial a Maca y Roselyn, tanto por sus roles en el laboratorio como por su simpatía y capacidad organizativa. Tanto que nos han facilitado la vida! Hago también un reconocimiento a don Pedro, porque su trabajo es fundamental para el laboratorio, y por haberme salvado varias veces de mis olvidos con el agua nanopura.

A mis compañeritos de carrera, especialmente a mis grandes amigas Fran, Cinthia y Yu. A mis queridas Lp's y muchachos asociados, por supuesto. Al Giorgio mio (Jorge Flores) y Marito Leiva (Mario Andrade), por su amistad incondicional, enseñanzas laboratorísticas y consejos varios. Gracias miles a la Coté y el Undu, y relacionados.

A las niñas y los niños. Pazitá, Mela, mi Rick, Cheliz, Pauli, Polly y Pauly M., que son como mis hermanas. Flakito, Ban, Franco, Nano y el Gio. También a "él", por su apoyo, cariño y consejos.



*A mis padres.*



## Índice de contenidos

Índice de contenidos .....	v
Lista de tablas .....	viii
Lista de figuras .....	ix
Lista de abreviaturas .....	xi
Resumen .....	xii
Summary .....	xii
1. Introducción.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivos .....	6
General.....	6
Específicos .....	6
2. Materiales y métodos .....	7
2.1 Materiales.....	7
2.1.1 Reactivos.....	7
2.1.2 Soluciones.....	8
2.1.3 Anticuerpos .....	9
2.1.4 Cepas bacterianas y plásmidos.....	12
2.1.5 Medios de CultivoU .....	12
2.2 Métodos .....	14
2.2.1 Métodos de biología molecular.....	14
2.2.2 Purificación de $\gamma$ -tubulina recombinante.....	20
2.2.3 Marcaje de $\gamma$ -tubulina recombinante. ....	21

2.2.4 Ensayos de incorporación de $\gamma$ -tubulina.....	22
2.2.5 Inmunofluorescencias.....	23
2.2.6 Purificación de $\alpha/\beta$ -tubulina de cerebro de pollo .....	23
2.2.7 Ensayo de polimerización de microtúbulos .....	24
3. Resultados .....	26
3.1 Diseño, expresión y purificación de $\gamma$ -tubulina recombinante silvestre (WT) y mutantes D279N y $\Delta$ A283.....	26
3.1.1 Diseño .....	26
3.1.2 PCR mutagénico .....	27
3.1.3 Transformación de E. coli XL10 GOLD ECC con los plasmidios pETIIa- $\gamma$ tubWT, pETIIa- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pETIIa- $\gamma$ tubD279N.....	31
3.1.4 Análisis de restricción.....	31
3.1.5 Transformación de cepas de E. coli BL21 $\lambda$ (DE3) ECC con los plasmidios pETIIa- $\gamma$ tubWT, pETIIa- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pETIIa- $\gamma$ tubD279N .....	32
3.1.6 Ensayo de inducción .....	32
3.1.7 Secuenciación de los plasmidios pETIIa- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pETIIa- $\gamma$ tubD279N .....	33
3.1.8 Purificación de $\gamma$ -tubulina silvestre y de las mutantes (D279N y $\Delta$ A283) .....	37
3.2 Marcación con biotina de $\gamma$ -tubulina recombinante WT y las mutantes D279N y $\Delta$ A283.....	41
3.3 Microinyección de $\gamma$ -tubulina recombinante marcada en el cigot del pez cebra y su localización subcelular. ....	43

3.4 Funcionalidad de $\gamma$ -TuRC.....	51
4. Discusión.....	54
5. Conclusiones.....	61
6. Proyecciones.....	62
7. Referencias.....	63





## Lista de tablas

Tabla I: Títulos de los anticuerpos utilizados .....	11
Tabla II: Cepas bacterianas utilizadas. ....	13
Tabla III: Partidores utilizados en las reacciones de PCR. ....	15





## Lista de figuras

Figura 1: Modelos propuestos para la nucleación de microtúbulos por $\gamma$ -tubulina. .....	5
Figura 2: Alineamiento de $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ -tubulina realizado con ClustalW.....	28
Figura 3: Superposición de las estructuras 3D de $\gamma$ -tubulina (rojo) y el heterodímero $\alpha/\beta$ -tubulina (blanco)......	29
Figura 4: Diagrama del plasmidio pET11a- $\gamma$ tubWT y la electroforesis de los productos del PCR mutagénico. ....	30
Figura 5: Electroforesis de los productos de digestión con EcoRI y EcoRV del ADN plasmidial de 3 clones que expresan $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y $\gamma$ tubD279N, y el control con ADN plasmidial que expresa $\gamma$ tubWt.....	34
Figura 6: Electroforesis de los productos de los ensayos de expresión de $\gamma$ tubWT, $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y $\gamma$ tubD279N.....	35
Figura 7: Secuenciación de los ADN plasmidiales.....	36
Figura 8: Cromatogramas y electroforesis de las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico utilizada para la purificación de las proteínas WT, D279N y $\Delta$ A283.....	39
Figura 9: Electroforesis y western blot de las $\gamma$ -tubulinas WT, $\Delta$ A283 y D279N purificadas y concentradas. ....	40
Figura 10: Western blot de las proteínas recombinantes biotiniladas $\gamma$ -tubulina WT y las mutantes D279N y $\Delta$ A283.....	42

Figura 11: Inmunofluorescencias de células de embriones tempranos de pez cebra..... 47

Figura 12: Inmunofluorescencias de células de embriones tempranos de pez cebra..... 48

Figura 13: Gráficas del fraccionamiento del extracto de embriones tempranos de pez cebra por ultracentrifugación en gradientes de densidad de glicerol.... 49

Figura 14: Incorporación de  $\gamma$ -tubulina a microtúbulos de  $\alpha/\beta$ -tubulina polimerizados in vitro. .... 53



## Lista de abreviaturas



A <sub>280</sub>	Absorbancia a 280 nm
Amp	Ampicilina
ARS	Persulfato de amonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Kb	kilobases
D.O. <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino
Tet	tetraciclina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## Resumen

$\gamma$ -tubulina es una proteína que forma parte del centrosoma y actúa tanto en la nucleación de microtúbulos como en la regulación de la dinámica de los mismos. Se encuentra en el citoplasma formando, junto a algunas proteínas acompañantes, el complejo  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -Tubulin ring complex). Presenta una elevada similitud estructural con el resto de las proteínas de la familia, lo que sugiere una equivalencia en las superficies de interacción longitudinal y lateral. Los detalles estructurales de las interacciones involucradas en la nucleación son poco conocidos debido a la inestabilidad estructural intrínseca que presentan las tubulinas, lo que hace difícil obtener estas proteínas recombinantes funcionales. Diseñamos una metodología con la cual se obtiene la proteína recombinante no funcional, se introduce dentro del citoplasma de embriones tempranos de pez cebra (*Danio rerio*) mediante microinyección para que la maquinaria presente pliegue correctamente la proteína y la haga funcional. Utilizando microscopía de epifluorescencia y métodos bioquímicos se demostró que  $\gamma$ -tubulina humana recombinante es capaz de incorporarse en los centrosomas y complejos  $\gamma$ -TuRC de los blastómeros de los embriones inyectados. Mediante esta metodología demostramos que mutaciones puntuales en el "loop" M (interacción lateral) alteran su capacidad de incorporarse al  $\gamma$ -TuRC y también la interacción con  $\alpha/\beta$ -tubulina para nuclear los microtúbulos.

## Summary

$\gamma$ -tubulin is a protein that is part of the centrosome and acts in both microtubule nucleation and regulation of their dynamics.  $\gamma$ -Tubulin is located in the cytoplasm and forms, together with some accompanying proteins, the  $\gamma$ -Tubulin Ring Complex ( $\gamma$ -TuRC). This protein shows high structural similarity with the rest of the tubulin family proteins, suggesting equivalence on the surfaces for longitudinal and lateral interactions. The structural details of these interactions involved in nucleation are poorly understood because of the intrinsic structural instability of tubulins, making these functional recombinant proteins very difficult to obtain. We have designed a new methodology to obtain functional recombinant protein, by microinjecting  $\gamma$ -tubulin in the cytoplasm of early zebrafish (*Danio rerio*) embryos, in this manner the cell machinery is used to correctly fold this protein and make it functional. Using fluorescence microscopy and biochemical methods; we demonstrated that recombinant human  $\gamma$ -tubulin can be incorporated in *Danio rerio* centrosomes and form part of the  $\gamma$ -TuRC complexes in blastomeres of the injected embryos. Using this methodology we also demonstrated that mutations in the M-loop (lateral interaction) affected its ability to form the  $\gamma$ -TuRC and make possible its interaction with  $\alpha/\beta$ -tubulin to nucleate microtubules.

## 1. Introducción

La familia de las tubulinas corresponde a un grupo extenso de proteínas de gran similitud estructural y altamente conservadas que tienen la capacidad de generar polímeros, hidrolizar GTP y presentar un papel fundamental en la nucleación de microtúbulos. Los microtúbulos son polímeros polares filamentosos cuya organización y dinámica juegan un papel fundamental en varios procesos celulares. Durante la división celular los microtúbulos forman un arreglo llamado huso mitótico, el cual segrega físicamente los cromosomas y orienta el plano de la citoquinesis. En células interfásicas participan en el transporte direccional de vesículas y proteínas, en la organización citoplasmática (posicionando el núcleo y los otros organelos), en la forma celular, en la polaridad y en la motilidad, siendo el principal elemento estructural de flagelos y cilios. Los microtúbulos son altamente dinámicos y presentan un mecanismo de polimerización/despolimerización conocido como "inestabilidad dinámica". Esta se describe según cuatro parámetros: velocidad de polimerización y despolimerización, la frecuencia de catástrofes (la transición de polimerización a despolimerización) y de rescates (transición de despolimerización a polimerización) (Desai y Mitchison, 1997).

La subunidad estructural de los microtúbulos corresponde a un heterodímero de proteínas pertenecientes a la familia de las tubulinas: la  $\alpha/\beta$ -tubulina. Los dímeros se ensamblan por medio de interacciones no covalentes "cabeza-cola" formando protofilamentos, los cuales se asocian entre ellos lateralmente para formar un cilindro de 25 nm de diámetro que es el microtúbulo. La orientación de los heterodímeros en el protofilamento es lo que le confiere polaridad al microtúbulo, con  $\alpha$ -tubulina en el extremo de crecimiento lento o

extremo (-) y  $\beta$ -tubulina en el de crecimiento rápido o extremo (+) (Desai y Mitchison, 1997).

*In vivo*, la formación de nuevos microtúbulos a partir de la nucleación de polimerización requiere a otro miembro de la familia de las tubulinas, la  $\gamma$ -tubulina. Esta proteína forma parte de los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), como lo son los centrosomas en células animales y el polo del huso en las levaduras cuando la célula está en mitosis. En interfase se le encuentra en sitios de nucleación de microtúbulos no centrosomales, como el aparato de Golgi por ejemplo (Rivero y col., 2009). Esta proteína además de nuclear microtúbulos participa en la regulación de la dinámica de los mismos. Al unirse al extremo (-) del microtúbulo lo bloquea, previniendo el crecimiento o acortamiento de éste extremo (Zheng y Wiese., 2000) y al localizarse a lo largo de la superficie del microtúbulo limita las catástrofes (despolimerización) (Bouissou y col., 2009).

La  $\gamma$ -tubulina forma dos complejos proteicos en conjunto con algunas proteínas acompañantes. Uno de ellos es el complejo pequeño de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuSC) compuesto por dos moléculas de  $\gamma$ -tubulina y otras dos proteínas (Dgrip84 y Dgrip91 en *Drosophila*) y el otro es un complejo mayor de alrededor de 2 MDa llamado complejo de anillo de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuRC) el cual se encuentra formado por  $\gamma$ -TuSC y al menos 4 proteínas más (Dgrip75, Dgrip128, Dgrip163 y Dgp71WD en *Drosophila*) (Oegema y col., 1999). Estos complejos se encuentran en el citosol y en los MTOCs.

Los componentes del complejo  $\gamma$ -TuSC se encuentran altamente conservados en células eucariontes y la eliminación de cualquiera de ellos es letal. En cambio las proteínas acompañantes del  $\gamma$ -TuRC no son esenciales para la viabilidad celular y se ha descrito que son necesarias para el ensamblaje del



complejo, progresión de la mitosis, regulación de la función y orientación del  $\gamma$ -TuRC en el centrosoma y a lo largo del huso.

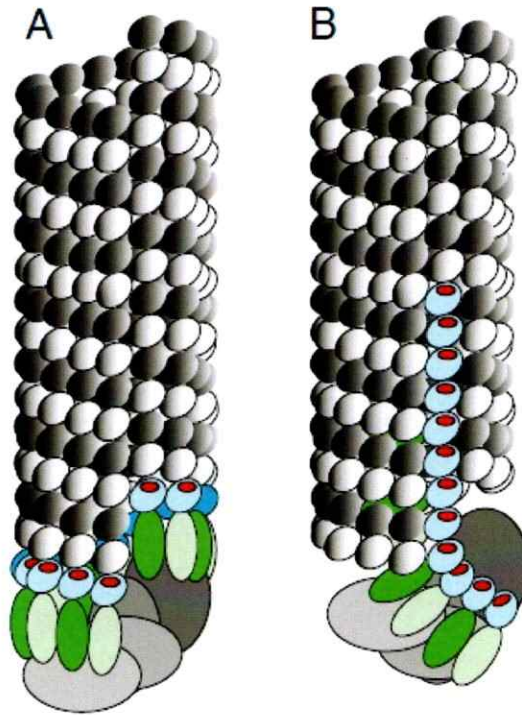
Las bases estructurales de los mecanismos de interacción tubulina-tubulina y de la hidrólisis de GTP son aún desconocidas, debido a la inestabilidad estructural intrínseca que presentan las tubulinas hace difícil obtener estas proteínas recombinantes funcionales y en cantidades suficientes para realizar experimentos *in vitro* dada la compleja vía de plegamiento que presentan.

Se desconoce cómo la  $\gamma$ -tubulina nuclea microtúbulos. Se han propuesto dos modelos alternativos para explicar cómo los microtúbulos son nucleados por  $\gamma$ -tubulina. Estos son el "Modelo del templado" y el "Modelo del protofilamento". En el primer modelo el  $\gamma$ -TuRC actúa como templado, ubicándose en el extremo (-) del microtúbulo, lo que implica que cada  $\gamma$ -tubulina interactúa lateralmente con otra, situándose en la base de un protofilamento e interactuando longitudinalmente con el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina (Zheng y col., 1995). Por otro lado, en el modelo del protofilamento las moléculas de  $\gamma$ -tubulina interactúan entre sí de forma longitudinal y el  $\gamma$ -TuRC se extiende para formar un primer protofilamento que promoverá el ensamblaje lateral y longitudinal de subunidades de  $\alpha/\beta$ -tubulina en el microtúbulo (Erickson y col., 1996 y Moritz y col., 2000). De distinta manera, ambos modelos implican interacciones laterales y longitudinales (Erickson y col., 2000) (Fig. 1).

Dado que los miembros de la familia de las tubulinas presentan gran similitud estructural y grado de conservación, se sugiere una equivalencia en las superficies de interacción lateral y longitudinal. Debido a esto se ha descrito para  $\gamma$ -tubulina, mediante análisis de homología con  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, zonas de interacción lateral y longitudinal correspondiente a "loops" conservados, que en las tres tubulinas se denominan "loop" M y "loop" T7, respectivamente (Aldaz y col., 2005).

Con el propósito de determinar la importancia de estos "loops" en las interacciones de  $\gamma$ -tubulina se construyeron dos mutantes en el "loop" M. Las mutantes son D279N y  $\Delta$ A283. En la mutante D279N se sustituyó el residuo ácido aspártico 279 por asparragina, la cual posee similar volumen pero no presenta carga. La segunda mutante,  $\Delta$ A283, carece del residuo alanina 283. De este modo el "loop" M de  $\gamma$ -tubulina se asemeja al de  $\beta$ -tubulina, que no posee este residuo.

En este Seminario de Título se caracterizarán dichas mutantes para determinar si los aminoácidos modificados pertenecientes al "loop" M son esenciales para la funcionalidad de la proteína, se analizará la capacidad de las proteínas modificadas de incorporarse a los complejos  $\gamma$ -TuRC y de interactuar con microtúbulos. Para esto se diseñó una metodología en la cual se obtiene la proteína recombinante no funcional, se introduce dentro del citoplasma de cigotos del pez cebra (*Danio rerio*) mediante microinyección para que la maquinaria presente en ésta célula pliegue correctamente la proteína y la haga funcional. Utilizando microscopía de fluorescencia y métodos bioquímicos se demostró que  $\gamma$ -tubulina humana recombinante es capaz de incorporarse en los centrosomas y complejos  $\gamma$ -TuRC de los blastómeros de los cigotos inyectados. De este modo se demostró que las mutaciones puntuales en el "loop" M alteran la capacidad de  $\gamma$ -tubulina para incorporarse al  $\gamma$ -TuRC y para interactuar con microtúbulos.



**Figura 1: Modelos propuestos para la nucleación de microtúbulos por  $\gamma$ -tubulina.**

A) Modelo del templado. Este modelo implica interacciones laterales entre las moléculas de  $\gamma$ -tubulina para formar la base del microtúbulo e interacciones longitudinales por una cara de  $\gamma$ -tubulina con el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina y por la otra con las proteínas Grip. B) Modelo del protofilamento. Las subunidades de  $\gamma$ -tubulina interactúan longitudinalmente entre ellas, y de forma lateral con los heterodímeros y las proteínas Grip. En blanco  $\alpha$ -tubulina, negro  $\beta$ -tubulina, celeste con centro rojo  $\gamma$ -tubulina y las demás estructuras corresponde a las proteínas acompañantes del  $\gamma$ -TuRC. Modificado de Zheng, 2000.

## Hipótesis

"La alanina 283 y el ácido aspártico 279 del "loop" M son esenciales para las interacciones de tipo lateral de  $\gamma$ -tubulina"

## Objetivos

### General

Determinar la participación del "loop" M de  $\gamma$ -tubulina en la formación de los centros nucleadores de microtúbulos y en su polimerización.

### Específicos

1. Construir, expresar y purificar las mutantes D279N y  $\Delta$ A283 de  $\gamma$ -tubulina.
2. Marcar  $\gamma$ -tubulina WT y las mutantes con biotina.
3. Microinyectar las proteínas marcadas en embriones tempranos de pez cebra, para determinar su incorporación *in vivo* en los  $\gamma$ -TuRC.
4. Determinar el efecto de estas mutaciones sobre la nucleación de microtúbulos *in vitro*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 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 se adquirieron en Merck S.A. (Darmstadt, Alemania). Las resinas Sephadex G25 y DEAE Sephadex A50 y los reactivos EGTA, lisozima, DNAsa, DMSO, ácido p-cumárico, la bis-acrilamida, el patrón de bajo peso molecular para péptidos y GTP se adquirieron en Sigma Chemical Co (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). La Resina Q-Sepharosa fue adquirida de GE Healthcare BioSciences AB. La Estreptavidina-HRP se adquirió en Biosource Tagoinmunologica TM. (California, Estados Unidos). Los reactivos ácido desoxicólico, GndHCl, Tween 20, agarosa, seroalbúmina de bovino, glicerol, acrilamida y Tritón X100 se adquirieron en Winckler Ltda (Santiago, Chile). El cóctel de inhibidores de proteasas se adquirió de ROCHE Chile Ltda. (Santiago, Chile). Las membranas de nitrocelulosa para ensayos de inmunoblot, acrilamida, TEMED y las cubetas para electroporación se adquirieron de BioRad Laboratorios Inc. (Hercules, California, Estados Unidos). El reactivo MES se adquirió en Phytotechnology Labs TM. La ampicilina, glicina, DTT, IPTG y Hepes se adquirieron en U.S Biological (Swanpcott, Massachusetts, Estados Unidos). El metanol y ácido acético técnicos, se adquirieron de TCL. (Santiago, Chile). El luminol se obtuvo en Fluka Chemie AG. (Buchs, Suiza). La DNapolimerasa Pfu Ultra II se obtuvo en Promega Corporation (Madison, Estados Unidos). Los sistemas de filtración Centricon, los filtros de tipos low binding con poros de 2  $\mu\text{m}$  para la

esterilización de soluciones y las membranas de nitrocelulosa VSWP02500 para realizar diálisis a ácidos nucleicos se obtuvieron en Millipore. (Billerica, Massachussets, Estados Unidos). Las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV se obtuvieron en New England BioLabs Inc. La biotina para el marcaje de proteínas (Ez-Link Sulfo-NHS-Biotina) se adquirió en PIERCE Biotechnology, (Rockford, Illinois, Estados Unidos). Los dNTPs se adquirieron en Omega. El SDS y el DAPI se adquirieron 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. El cloruro de sodio, agar, Tris, glicerol, EDTA, fosfato ácido de sodio, agarosa y marcador de peso molecular de 1Kpb se compraron en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). La película autoradiográfica HR-U30 Super Medical X-Ray film se compró en Fujifilm Corporation (Tokio, Japón).

#### *2.1.2 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, TritónX100 1% (v/v).

Urea 8M: amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8,0, bisulfito de sodio 10 mM. DTT 5 mM, urea 8M.

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

PMS: amortiguador fosfato de sodio 10 mM pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 0,24 M sacarosa.

PMG: amortiguador fosfato de sodio 10 mM pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 0,24 M sacarosa, GTP 0,1 mM.

Solución de extracción  $\gamma$ -TuRC 1: amortiguador Hepes 50 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA 1mM; KCl 100mM, glicerol 10%, cóctel de inhibidores de proteasas.

Solución de extracción  $\gamma$ -TuRC 2: amortiguador Hepes 50 mM pH 7,6,  $MgCl_2$  1 mM, EGTA 1mM, cóctel de inhibidores de proteasas.

Solución de polimerización: amortiguador MES 50 mM pH 6,8, EGTA 0,5 mM,  $MgCl_2$  6 mM, GTP 0,1 mM, glicerol 10% y solución H (amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,2, NaCl 10 mM,  $MgCl_2$  5 mM. DTT 1mM, PMSF 1mM, cóctel de inhibidores de proteasas).

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 G250 0,3% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

Solución de destañido: metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

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

Solución bloqueo immunoblot: amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, leche descremada comercial al 5% (p/v).

TBS/Tween: amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween20 0,1%.

Solución de transferencia: 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.

### 2.1.3 Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal hecho en ratón llamado antigammatubulin clone GTU88Ei se usó para detectar  $\gamma$ -tubulina en los immunoblots y en las

inmunofluorescencias. El anticuerpo monoclonal hecho en ratón antialphatubulin cione B512 se utilizó para detectar  $\alpha$ -tubulina en los inmunoblots y en las inmunofluorescencias. Ambos se adquirieron en Sigma Aldrich (Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

El anticuerpo policlonal hecho en cabra conjugado con HRP llamado Goat Anti Mouse IgGHRP sc 2005 se usó como anticuerpo secundario para el sistema de revelado por quimioluminiscencia en los inmunoblots. Se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, Estados Unidos).

El anticuerpo policlonal hecho en cabra conjugado con Alexa fluor 488 llamado Alexa Fluor 488 GoatAntiMouse IgG (H+L) se utilizó como anticuerpo secundario para inmunofluorescencia. Se obtuvo de Invitrogen Molecular Probes (Eugene, Oregon, Estados Unidos).



**Tabla I: Títulos de los anticuerpos utilizados**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Inmunoblot</b>	<b>Inmunofluorescencia</b>
antigammatubulin clone GTU88	1:10.000	1:100
antialphatubulin clone B512	1:10.000	1:100
Goat Anti Mouse IgGHRP sc 2005	1:100	-
Alexa Fluor 488 GoatAntiMouse IgG (H+L)	-	1:500

#### *2.1.4 Cepas bacterianas y plásmidos*

La fuente y el fenotipo de los microorganismos utilizados, así como se uso se muestran en la Tabla II.

El gen de  $\gamma$ -tubulina humana Tubg1 (código NM\_001070 en la base de datos) se encuentra clonado en el vector pET11a de Novagen (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), con lo que se obtiene la construcción pET11aTubg1.

#### *2.1.5 Medios de Cultivo*

Se utilizó el medio Luria-Bertani (LB). Un litro de LB se preparó con 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Luego se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1N y finalmente el medio se esterilizó en un autoclave. Al momento de su utilización se le agregó el antibiótico (ampicilina y/o tetraciclina, ambos a una concentración de 100 mg/mL).

Tabla II: Cepas bacterianas utilizadas.

Cepas	Genotipo/Fenotipo	Fuente	Uso
BL21(DE3)	F ompT hsdSB (rB mB ) gal dcm con DE3, un profago que porta el gen de la polimerasa del bacteriofago T7 inducible por IPTG.	Novagen	Síntesis de proteína recombinante
XL10 Gold	TetrD( <i>mcrA</i> )183 D( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZDM15</i> Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagen	Transformación con plásmidos producto de mutación sitio-dirigida
DH5α	DlacU169 <i>recA1 endA1 gyrA96 relA1 hsdR17 thi1 supE44</i>		Propagación y mantención de plásmidos.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Métodos de biología molecular.

2.2.1.1 PCR mutagénico: Dos reacciones de PCR mutagénico se hicieron paralelamente, una para cada mutación sitio dirigida. En cada reacción se utilizaron 1,56  $\mu\text{L}$  de templado (plásmido pET11a- $\gamma\text{tubWT}$  de 6680 pb), 1  $\mu\text{L}$  de cada partidor, 0,5  $\mu\text{L}$  de mezcla de desoxirribonucleótidos (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de enzima polimerasa Pfu II Ultra, 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador Pfu II Ultra 10X y posteriormente se llevó a un volumen final de reacción de 50  $\mu\text{L}$  con agua nanopura estéril. El protocolo de PCR utilizado consistió en 2 minutos a 95 °C como paso de iniciación, 20 segundos a 95 °C para denaturación, 20 segundos a 60 °C para la hibridación de los partidores, 1 minuto y 45 segundos a 68 °C para la elongación. Se efectuaron 18 ciclos y se finalizó con 3 minutos a 68 °C. El producto de PCR se trató con 1,5  $\mu\text{L}$  de *DpnI* por 3 horas a 37 °C para la digestión del templado, y luego se llevó a 95 °C por 20 minutos para la inactivación de la enzima. Posteriormente el producto de PCR se sometió a una microdiálisis para eliminar sales, y se concentró en una centrifuga Speedvac hasta un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

Tabla III: Partidores utilizados en las reacciones de PCR.

Mutante	Partidores	Tm
ytubD279N	Forward: 5'-CCCTCTCACTACGAACCAGTCAGTGG-3'	68 °C
	Reverse: 5'-CCACTGACTGGTTCGTAGTGAGAGGG-3'	68 °C
ytubΔA283	Forward: 5'-GGACCAGTCAGTGAGCGTGAGGAAG-3'	70 °C
	Reverse: 5'-CTTCCTCACGCTCACTGACTGGTCC-3'	70 °C

2.2.1.2 Preparación de células electrocompetentes: Para este fin, se usaron dos tipos de células de *E. coli* electrocompetentes: XL10 GOLD y BL21  $\lambda$ (DE3). Las primeras se utilizaron para introducir y circularizar el ADN plasmidial obtenido por PCR mutagénico, pues éstas células presentan una mutación que se traduce en que no degradan ADN lineal, por lo que se aumenta significativamente la eficiencia de transformación. Las segundas se utilizaron para sobreexpresar las proteínas debido a que poseen en su genoma una copia del gen de la RNA polimerasa del fago T7 inducible por IPTG. Se crecieron cultivos de las cepas nombradas en medio LB y, para el caso de XL10 GOLD, se agregó además el antibiótico tetraciclina. Luego se inocularon 100 mL de medio LB más tetraciclina con 100  $\mu$ L de este cultivo. Las células se crecieron con agitación (190 rpm) a 37 °C hasta llegar a D.O.<sub>600</sub> = 0,6. Después se centrifugaron en un rotor Sorval SS34 a 7.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó 3 veces con volúmenes de 10 mL de glicerol 10% estéril frío. Después del último lavado, el precipitado se homogeneizó en un volumen mínimo de glicerol 10% y las células se alicuotaron en 50  $\mu$ L y se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

2.2.1.3 Electrotransformación de XL10 GOLD con los plasmidios pET11a- $\gamma$ tubWT, pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pET11a- $\gamma$ tubD279N: Para la electrotransformación se usaron 25  $\mu$ L de las células XL10 GOLD electrocompetentes y 5  $\mu$ L de ADN plasmidial concentrado (obtenido por PCR). El electroporador usado es el GenePulser Xcell de Bio-Rad. El protocolo de electroporación corresponde al de *E. coli*, para una cubeta de 2 mm, 2,5 kVolts, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Luego de la electroporación las células se incubaron en 1 mL de LB a 37 °C con agitación. Luego se plaquearon en placas LB/Tet/Amp, para seleccionar las células que presentaran resistencia a tetraciclina y a ampicilina, ésta última resistencia otorgada por el plásmido. Paralelamente se

realizaron los controles positivos y negativos de la transformación. Las placas se incubaron a 37 °C. A partir de las colonias resultantes se eligió una de cada placa, la cual se picó y creció en medio LB suplementado con tetraciclina y ampicilina, para extraer el ADN plasmidial de las cepas XL-10 GOLD pET11a-ytubWT, XL10-GOLD pET11a-ytubΔA283 y XL10-GOLD pET11a-ytubD279N mediante miniprep.

2.2.1.3 Análisis de restricción: Mediante la herramienta bioinformática Vector NTI Advance 10 se realizó la búsqueda de los sitios de corte para diversas enzimas de restricción. De esta forma se seleccionaron las enzimas *EcoRI* y *EcoRV*, las cuales cortan una única vez los plásmidos, y al digerir con ambas al mismo tiempo se obtienen dos fragmentos, de 4040 pb y 2640-pb. Este ensayo de restricción se llevó a cabo con los ADN plasmidiales obtenidos de la transformación realizada antes. Para esto a 5 µL de cada ADN se le agregaron 0,5 µL de las enzimas *EcoRI* y/o *EcoRV*, además de los amortiguadores de la reacción y agua hasta un volumen de 20 µL. La reacción se incubó por 20 horas a 37 °C y luego se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a los productos de digestión de estas reacciones.

2.2.1.4 Electrotransformación de BL21 λ(DE3) con plasmidio pET11a-ytubWT, pET11a-ytubΔA283 y pET11a-ytubD279N: Las células electrocompetentes BL21 λ(DE3) (25 µL) se transformaron por electroporación con 5 µL de los distintos plásmidos obtenidos anteriormente. Las bacterias se incubaron en 1 mL de LB, con agitación orbital de 150 rpm a 37 °C y se dispersaron en placas LB/amp.

2.2.1.5 Ensayo de inducción: se seleccionaron clones de cada electrotransformación y se crecieron en medio LB/Amp toda la noche. Luego 100 µL

de estos cultivos se transfirieron 4 tubos falcón con 10 mL de medio LB/Amp y se hicieron crecer con agitación a 37 °C hasta alcanzar una  $D.O_{600} = 0,6$ . Posteriormente a cada cultivo se le adicionó IPTG a una concentración distinta (0,1, 0,01 y 0,001 mM) y a uno de ellos no se le agregó el inductor. Los cultivos se incubaron en agitación a 37 °C por 3 horas. Se tomó 1 mL de cada cultivo inducido y se centrifugó por 5 minutos a 14.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 1 mL de TBS/Tween 0,1%. Se lavó una última vez con 1 mL de agua nanopura. El precipitado resultante se suspendió en 100  $\mu$ L de amortiguador de carga 2X y se llevó a 95 °C por 20 minutos. A continuación cada muestra se analizó por SDS-PAGE. El gel se tiñó con Azul de Coomassie por una noche y se lavó 2 veces con solución de destañido para visualizar las proteínas.

2.2.1.6 Secuenciación de los plásmidos pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pET11a- $\gamma$ tubD279N: Un clon de cada mutante se seleccionó a partir del ensayo de inducción. Con 30 mL de cultivo de XL10 GOLD. pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y XL10 GOLD pET11a- $\gamma$ tubD279N se realizaron "minipreps". El ADN plasmidial obtenido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar el plásmido y descartar la presencia de otros plásmidos. Luego se concentró el ADN plasmidial a 60 °C al vacío (Centrivac, Labconco) hasta un volumen aproximado de 50  $\mu$ L. Las concentraciones se determinaron por Nanodrop. Posteriormente se enviaron a secuenciar para verificar que las mutaciones realizadas fueran correctas.

2.2.1.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE): Se utilizó acrilamida al 10 % en el gel separador y 4 % en el concentrador. Las muestras se disolvieron en solución de carga, se incubaron a 95 °C por 5 minutos y se cargaron en los pocillos del gel. La electroforesis se hizo a un amperaje constante de 60 mA



durante una hora. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar western blots.

#### 2.2.1.8 Inmunoblots:

Western blot: La transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se realizó mediante electrotransferencia. Para esto se utilizó un voltaje fijo de 100 V y un amperaje variable máximo de 400 mA durante 90 minutos a -20 °C.

Dotblot: las proteínas de las fracciones del gradiente de glicerol se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa al vacío.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas adheridas se bloquearon durante toda la noche a 4 °C. Estas se revelaron contra  $\gamma$ -tubulina,  $\alpha$ -tubulina y/o biotina. Se incubó con el anticuerpo primario (anti- $\gamma$ -tubulina o anti- $\alpha$ -tubulina) en un volumen de 5 mL de solución de bloqueo de acuerdo a los títulos informados (Tabla II), durante 2 horas con agitación a 37 °C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos en agitación con TBS/Tween. Se incubó con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 1 hora en agitación a 37 °C y se repitieron los 3 lavados con TBS/Tween. La incubación con estreptavidina se realizó con 5  $\mu$ L de ésta en 5 mL de solución de bloqueo con agitación por 4 horas a 4 °C. Se lavó la membrana 3X 15 minutos con agitación utilizando TBS/Tween.

Se reveló en todos los casos por quimioluminiscencia, por lo que se utilizó un *kit* de quimioluminiscencia preparada en el laboratorio (25  $\mu$ L de solución 1 de ácido cumárico 90 mM y 50  $\mu$ L de solución 2 de luminol 250 mM, ambas en DMSO) más 5  $\mu$ L peróxido de hidrógeno.

2.2.2 *Purificación de  $\gamma$ -tubulina recombinante.* Cultivos de BL21  $\lambda$ (DE3) pET11a- $\gamma$ tubWT, BL21  $\lambda$ (DE3) pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y BL21  $\lambda$ (DE3) pET11a- $\gamma$ tubD279N se crecieron en medio LB/Amp con agitación y a 200 rpm a 37 °C, hasta que alcanzaron una D.O.<sub>600nm</sub> = 0,6. Al llegar a esta densidad óptica, la sobreexpresión de las proteínas se indujo agregando 0,3 mM de IPTG y se continuó agitando el cultivo por 3 horas. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron en un rotor Sorval RC-3B a 5.000 rpm, por 30 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó 3 veces por centrifugación (7.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. en un rotor F0650 Beckman) en tubos Falcon de 50 mL con 20 mL de amortiguador TEN 1X cada vez. Luego del último lavado, el precipitado se suspendió en 10 mL del mismo amortiguador. A esta suspensión se agregó 10 mM de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> como inhibidor de proteasas y antioxidante, y se suplementó con 5 mM de DTT, 300  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL) y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La solución se incubó por una hora en hielo con agitaciones recurrentes. Luego se agregaron 200  $\mu$ L de ácido desoxicólico (10% P/V) y se incubó a 37 °C, con lo cual la solución adquirió gran viscosidad. Se agregó ADNasa (4 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 90 minutos. La solución se sonicó por 3 minutos, con pulsos de 20 segundos, para romper el ADN presente, lo cual se manifestó en una pérdida de viscosidad de la solución. Se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos en el rotor SS34 en una centrifuga Sorval. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó 3 veces con 10 mL de amortiguador de lisis 2 a pH 8,0 (TrisCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM y Triton X100 al 1%). El precipitado se lavó con agua 2 veces, y se disolvió en amortiguador urea 8 M. Esta solución se centrifugó por una hora a 12.000 rpm en un microfuga. El sobrenadante se cargó en la columna de afinidad de Q-Sepharosa utilizada para purificar la proteína. Esta columna se equilibró antes de cargar la muestra con amortiguador urea 6 M, pasando a través de ella primero 20 mL de

este amortiguador, pero sin DTT ni  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , y luego 14 mL del amortiguador completo. A continuación la columna se lavó con dos volúmenes de 13 mL del amortiguador nombrado para eliminar las moléculas unidas inespecíficamente, y los lavados se colectaron. La columna se lavó luego con un gradiente de 0 a 1 M de amortiguador urea 6 M KCl (60 mL totales), y las eluciones se colectaron en volúmenes de 1,5 mL. A los lavados y fracciones colectadas se les midió la  $A_{280}$ , y con estos datos se generó un cromatograma, el cual indica la presencia de la proteína. Para verificar que se trataba de  $\gamma$ -tubulina, se realizó una electroforesis a las fracciones que comprenden el pico de elución. Una vez identificadas las fracciones se juntaron y se concentraron en Centricones (corte de 30.000 Da) a 7.000 rpm en un rotor Sorval SS34 a 10 °C, hasta un volumen aproximado de 500  $\mu\text{L}$ .

Este procedimiento se llevó a cabo para  $\gamma\text{tubWT}$ ,  $\gamma\text{tub}\Delta\text{A283}$  y  $\gamma\text{tubD279N}$ . Finalmente se visualizó el resultado por medio de un SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie y un western blot.

*2.2.3 Marcaje de  $\gamma$ -tubulina recombinante.* Las tres  $\gamma$ -tubulinas recombinantes ( $\gamma\text{tubWT}$ ,  $\gamma\text{tub}\Delta\text{A283}$  y  $\gamma\text{tubD279N}$ ), una vez purificadas y concentradas, se dializaron contra la solución de marcaje (Hepes 25 mM, pH 7,5, urea 1M) y después se marcaron con Biotina (Ez-Link Sulfo-NHS-Biotin). Para ello las proteínas se diluyeron por dilución rápida en un "vortex" en solución de marcaje más biotina, en un exceso molar de 10 veces respecto a la proteína. Los tubos se incubaron por una hora en hielo con agitaciones recurrentes. Luego la proteína marcada se cargó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25, para eliminar la sonda no unida. Para seleccionar las fracciones que contenían la proteína marcada con biotina se midió la  $A_{280}$  de cada fracción, y se construyó un cromatograma. El

primer pico correspondió a la proteína marcada y el segundo a la biotina libre, según a lo esperado de acuerdo a las masas moleculares (alrededor de 50 kDa para  $\gamma$ -tubulina y de 443,43 Da para la biotina). Las fracciones que contenían la proteína marcada se juntaron y concentraron en centricones (de corte de 30.000 Da) hasta un volumen similar al inicial. Posteriormente, la proteína marcada se pasó nuevamente por la columna, repitiendo el proceso anteriormente descrito. El amortiguador que se usó para equilibrar la columna y eluir la proteína es el de la solución de marcaje. El "pool" de fracciones que contenían la proteína marcada se dializó contra el amortiguador de marcaje. Las proteínas marcadas con biotina se analizaron mediante inmunoblot, utilizando estreptavidina conjugada con HRP y se reveló por quimioluminiscencia.

*2.2.4 Ensayos de incorporación de  $\gamma$ -tubulina.* Las proteínas marcadas en solución de urea 1M se centrifugaron a 14.000 rpm en microfuga antes de ser inyectadas, para evitar de esta forma la presencia de agregados. Cinco nL de la proteína se microinyectaron en embriones de pez cebra en estado de una célula. Los cigotos inyectados con proteína marcada con biotina se incubaron por 4 horas a 28 °C para que continuase su desarrollo. Posteriormente se maceraron en un homogeneizador (vidrio teflón). El macerado se centrifugó a 14.000 rpm en una microfuga a 4 °C. El sobrenadante se cargó sobre un gradiente discontinuo de glicerol (5%, 10%, 20% y 40%) de volumen total de 4 mL, que luego se centrifugó en un rotor Sorval AH650 a 40.000 rpm durante 4 horas a 4°C. El gradiente se fraccionó de arriba hacia abajo en alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos Eppendorf. Éstos se analizaron mediante dot blot, el cual se reveló tanto contra  $\gamma$ -tubulina (anticuerpo monoclonal hecho en ratón) como contra biotina (estreptavidina conjugada con HRP). El primer revelado indicó la  $\gamma$ -tubulina total, y el segundo la  $\gamma$ -tubulina exógena. Un perfil densitométrico se construyó mediante un análisis de

densitometria de las intensidades de las señales de ambos revelados. El perfil grafica la intensidad de la señal normalizada v/s fracción del gradiente de glicerol (el cual es creciente). De esta forma se observó si la  $\gamma$ -tubulina exógena (inyectada) se incorpora a los complejos de  $\gamma$ -TuRC, y, si es que lo hace, en qué cantidad aproximadamente.

*2.2.5 Inmunofluorescencias.* Los embriones tempranos de pez cebra se fijaron paraformaldehído al 4% toda la noche a 4 °C. Se lavaron 3 veces por 10 minutos en agitación con PBS Tween20 al 0,2%, se descorionaron y bloquearon durante 2 horas en una solución de bloqueo de inmunofluorescencia. Los embriones se incubaron luego a 4 °C en solución de bloqueo con el anticuerpo primario (1:100) durante toda la noche. Se lavaron 3 veces durante 30 minutos en agitación con solución de bloqueo, se incubaron en agitación en el anticuerpo secundario (1:500) durante 2 horas y posteriormente se lavaron 3 veces en agitación con solución de bloqueo durante 30 minutos. Se incubó con DAPI (diluido 10 veces) durante 10 minutos y se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación con PBS Tween 0,02%. Finalmente los embriones se montaron en un portaobjeto para observarlos al microscopio.

*2.2.6 Purificación de  $\alpha/\beta$ -tubulina de cerebro de pollo.* Alrededor de 400 cerebros (600 mL) de cabezas de pollo frescas mantenidas en hielo se extrajeron y lavaron dos veces con un volumen de solución PMS fría. 1,5 volúmenes de PMS frío se agregó a los cerebros para homogeneizarlos en una juguera durante 45 segundos. El homogeneizado se centrifugó durante 40 minutos a 10,000 rpm en un rotor GSA Sorval a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó lentamente 32% de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en hielo y se mantuvo en agitación continua. Luego de reposar la solución por 10 minutos se

centrifugó nuevamente en un rotor GSA Sorval a 10,000 rpm durante 40 minutos. El precipitado se descartó y al sobrenadante se le adicionó  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  lentamente hasta alcanzar el 43% de saturación, en hielo y con agitación continua. Después de un reposo de 10 minutos la solución se centrifugó a 10,000 rpm en un rotor GSA Sorval. El precipitado se suspendió en PMG utilizando un homogenizador (vidrioteflón), hasta alcanzar un volumen de 50 aproximadamente mL. Estos se mezclaron con 300 mL de resina DEAE Sphadex A50 previamente equilibrada con PMG. La resina se lavó dos veces con un volumen de PMG-KCl 0,4 M y se eluyó dos veces con 250 mL de PMG-KCl 0,8M. Al eluido se le agregó lentamente  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  hasta alcanzar un 43% de saturación y se centrifugó durante 40 minutos a 10,000 rpm en un rotor GSA Sorval. El precipitado se disolvió en 5 mL de PMG y luego se cargó en una columna de exclusión molecular Sephadex G25 que se preequilibró y eluyó con PMG a un flujo no menor a 1 mL/minuto. Las fracciones se analizaron induciendo la polimerización de anillos por adición de  $\text{MgCl}_2$ . Las fracciones que presentaron precipitado blanco se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos. El precipitado se suspendió 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 se estimó espectrofotométricamente midiendo la  $A_{280}$  en una solución de GdCl 6 M fosfato 10 mM pH 6,5 y utilizando un coeficiente de extinción teórico de  $1,03 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ . La proteína se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C.

*2.2.7 Ensayo de polimerización de microtúbulos.* Estos experimentos se realizaron a partir del lisado de embriones. Una alícuota de la proteína marcada se incubó durante una hora en el extracto de embriones a 28° C, con el fin de plegarla. Una solución con microtúbulos (tubulina purificada de cerebro de pollo) se agregó a la

mezcla. Luego de aproximadamente 30 minutos de inducir la polimerización (bajo las condiciones de polimerización descritas) la solución se centrifugó a 14.000 rpm (microfuga) obteniéndose un precipitado y un sobrenadante. Éstos se analizaron mediante un SDS-PAGE que se tiñó con Azul de Coomassie y mediante inmunoblot (contra  $\gamma$ -tubulina y biotina). De esta forma, si las mutantes eran funcionales e interactuaban con los microtúbulos, se observaría una banda en los carriles correspondientes al precipitado, de acuerdo a lo descrito anteriormente para  $\gamma$ -tubulina WT (Tesis Doctoral Pouchucq, L. 2009). Se realizó, además, un control de la reacción en ausencia de microtúbulos. En este caso se espera observar la banda para  $\gamma$ -tubulina en el sobrenadante, y no en el precipitado.

### 3. Resultados

#### 3.1 Diseño, expresión y purificación de $\gamma$ -tubulina recombinante silvestre (WT) y mutantes D279N y $\Delta$ A283.

- 3.1.1 *Diseño*. La secuencia de residuos correspondientes al "loop" M de  $\gamma$ -tubulina se determinó mediante un alineamiento múltiple (ClustalW) a partir de las secuencias aminoácidas de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -tubulina. Esto se basó en la homología de secuencia que presenta esta zona con la de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina (Fig. 2). Este resultado se corroboró con el software DsspCMBI, que predice estructuras secundarias, lo que permitió determinar los límites del "loop". Se determinó que el "loop" M de  $\gamma$ -tubulina humana se extiende entre el residuo treonina 274 y el residuo treonina 289.

La superposición de las estructuras 3D de  $\gamma$ -tubulina (1Z5V.pdb) y del heterodímero  $\alpha/\beta$ -tubulina (1TUB.pdb) se hizo con el programa SPDB Viewer. Se observó que  $\gamma$ -tubulina se superpone preferentemente con  $\beta$ -tubulina, debido a su mayor similitud. De esta forma se compararon ambos "loops". La figura 3 muestra esta superposición, efectuada con la herramienta Magic Fit del programa. La estructura del "loop" M de  $\gamma$ -tubulina no está resuelta en el cristal, por lo que se observa un "gap" que corta el "loop". Por lo tanto el resto de los análisis se hicieron con la secuencia del "loop" y su homología estructural con  $\beta$ -tubulina.

Una vez conocidos el largo y la secuencia del "loop" M de  $\gamma$ -tubulina, se buscó que aminoácidos podrían ser blanco para la mutación. Las secuencias aminoácidas de la zona de interés de  $\beta$  y  $\gamma$ -tubulina se compararon y se propuso eliminar el residuo alanina 283 (mutante  $\gamma$ tub $\Delta$ A283), dado que la secuencia de  $\gamma$ -tubulina posee en esta zona un aminoácido extra respecto a la de  $\beta$ -tubulina, y así

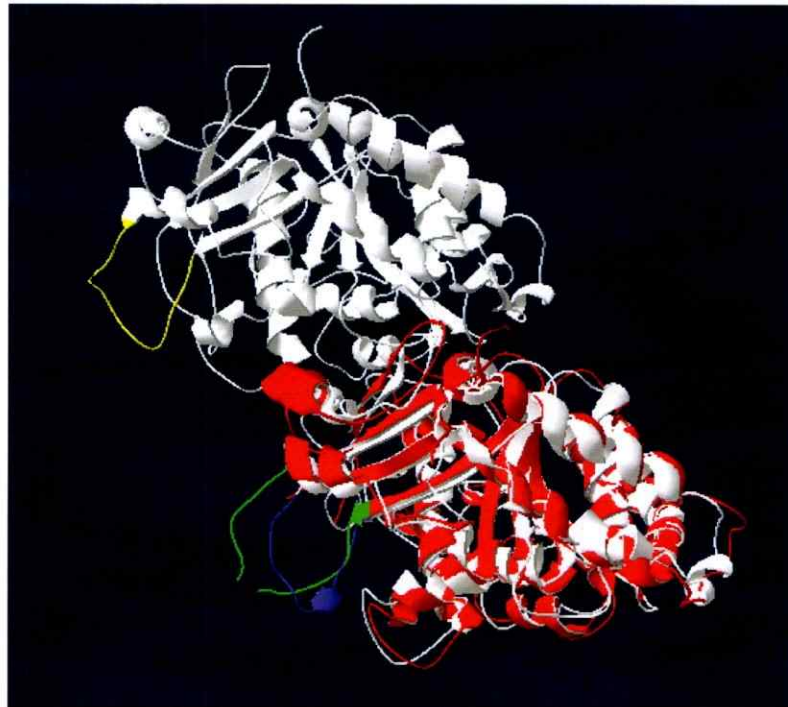


al eliminar éste residuo se aumentó la homología entre ambas. Por otra parte, en la zona central de la secuencia del "loop" M se encuentra el residuo de ácido aspártico 279, que corresponde a un aminoácido con carga negativa por lo que podría estar jugando un rol importante en la interacción lateral de  $\gamma$ -tubulina. En base a esto se diseñó la mutante  $\gamma$ tubD279N, donde el residuo ácido aspártico se modificó por una asparragina, residuo que posee un volumen similar pero no presenta carga.

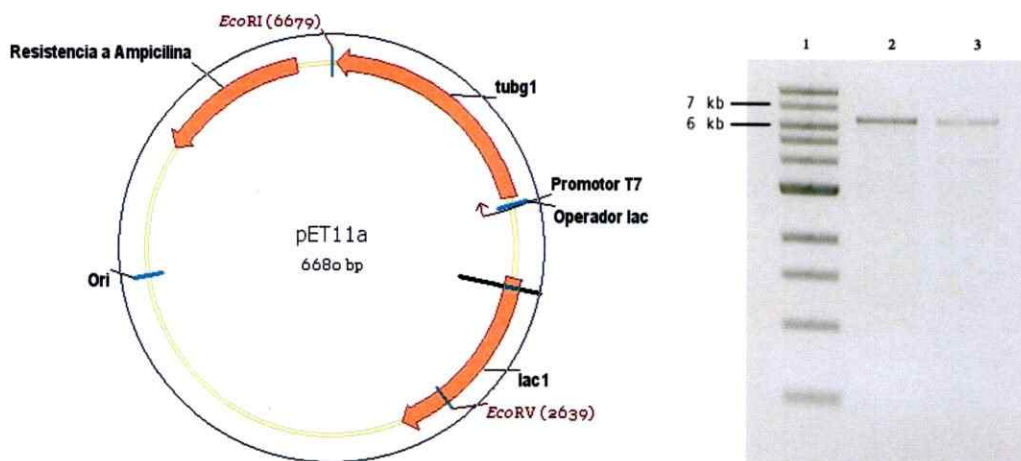
Los partidores mutagénicos se diseñaron utilizando el programa Vector NTI Advance 10, para visualizar la secuencia nucleotídica de  $\gamma$ -tubulina humana (NM\_001070) y generar los cambios de bases necesarios para cada mutación. Para el caso de la mutante  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 se eliminaron 3 bases (GCC), y para  $\gamma$ tubD279N sólo se realizó un cambio de base (guanina por adenina) para generar la modificación aminoácídica. Una vez obtenidas las nuevas secuencias, estas se ingresaron a la página web X-primer, donde se obtuvieron finalmente los partidores a utilizar (Tabla III en Materiales y métodos).

*3.1.2 PCR mutagénico.* Las mutaciones puntuales no modificaron el tamaño de los productos de PCR, pues se observó una migración similar a la del templado de 6680 pb (Fig.4, derecha). El templado corresponde a un plasmidio pET11a que contiene el gen de  $\gamma$ -tubulina humana cuyo diagrama se muestra a la izquierda de la figura 4. Luego de verificar la presencia de los productos de PCR, estos se trataron con *DpnI* para digerir el ADN parental, y posteriormente se concentraron y dializaron para su posterior utilización.





**Figura 3: Superposición de las estructuras 3D de  $\gamma$ -tubulina (rojo) y el heterodímero  $\alpha/\beta$ -tubulina (blanco).** El heterodímero se muestra coloreado en blanco, el "loop" M de  $\beta$ -tubulina en morado, el de  $\alpha$ -tubulina en amarillo (obtenidos de la literatura) y el de  $\gamma$ -tubulina en rojo con su "loop" M en verde, determinado por DsspCMBI.



**Figura 4: Diagrama del plasmidio pET11a-γtubWT y la electroforesis de los productos del PCR mutagénico.** Izquierda. Esquema del plasmidio pET11a-γtubWT. Se indica la resistencia a ampicilina, el gen lac1, el promotor T7 y el gen clonado de  $\gamma$ -tubulina humana. También se muestran los sitios de corte para *EcoRI* y *EcoRV*. Derecha. Gel de la electroforesis de los productos de PCR mutagénico. Carril 1: Marcador de número de bases (kb), Carril 2: pET11a-γtubD279N y Carril 3: pET11a-γtubΔA283.

3.1.3 Transformación de *E. coli* XL10 GOLD ECC con los plasmidios pETIIa- $\gamma$ tubWT, pETIIa- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pETIIa- $\gamma$ tubD279N. Cepas de *E. coli* XL10 GOLD electrocompetentes se transformaron por electroporación con los productos de PCR de la proteína silvestre y las dos mutantes. Se obtuvieron múltiples colonias que presentaban resistencia a ampicilina para cada transformación (no se muestra). Se seleccionaron 3 clones transformantes para cada cepa, los cuales se hicieron crecer en cultivo líquido de LB más tetraciclina (tet) y ampicilina (amp). Los controles, bacterias que no se transformaron con el plasmidio, no crecieron en las placas LB/tet/amp, pero sí en placas LB/tet y LB (no se muestra). De esta forma se corroboró que la transformación es eficiente y que la resistencia a ampicilina está dada por el plasmidio de interés.

A partir de los cultivos líquidos de los clones se hizo una "miniprep" para extraer el ADN plasmidial. Una pequeña alícuota de estos ADNs se sometió a un ensayo de restricción.

3.1.4 Análisis de restricción. Se determinaron los sitios de corte único para las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV*, a partir de la secuencia nucleotídica del plasmidio pETIIa- $\gamma$ tubWT con VectorNTI (Fig. 4, izquierda). La digestión con ambas enzimas genera dos fragmentos, uno de 4040 pb y otro de 2640 pb. Los resultados de la electroforesis de los productos de la digestión de los plasmidios de los tres clones y el control para las mutantes y  $\gamma$ tubWT se muestran en la figura 5 (A, B, C y D). Todos los plasmidios que contienen el gen de  $\gamma$ -tubulina modificado muestran un comportamiento similar al de pETIIa- $\gamma$ tubWT, el cual al ser digerido por sólo una de las enzimas (*EcoRI* o *EcoRV*) se lineariza mostrando una banda única que aparece levemente sobre los 6 kDa. Cuando se digirió con ambas enzimas simultáneamente, se obtuvieron dos bandas donde una de ellas apareció cercana a

los 4 kDa y la otra sobre los 2 kDa. Estos resultados concuerdan con lo predicho por el programa informático. A su vez, indicaron que los mutantes son bastante parecidos al plasmidio sin modificar, por lo que las posibilidades de que la mutación haya sido exitosa son altas.

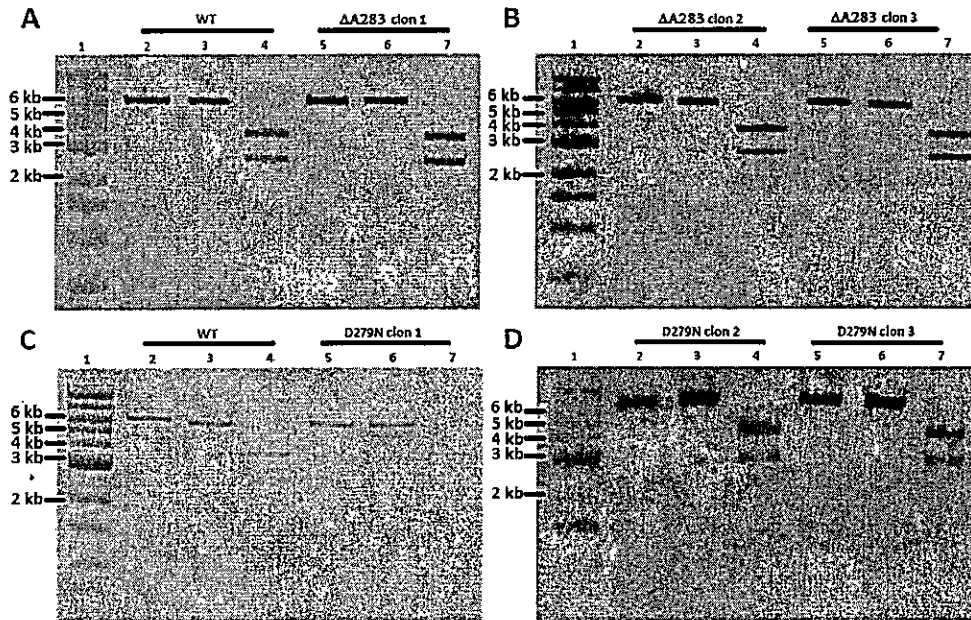
*3.1.5 Transformación de cepas de E. coli BL21  $\lambda$ (DE3) ECC con los plasmidios pET11a-ytubWT, pET11a-ytub $\Delta$ A283 y pET11a-ytubD279N.* Bacterias BL21  $\lambda$ (DE3) se transformaron con los plasmidios pET11a-ytubWT, pET11a-ytub $\Delta$ A283 (clon 1 y 2) y pET11a-ytubD279N (clon 1 y 2) obtenidos anteriormente por "miniprep" a partir de XL10 GOLD. Se obtuvieron múltiples colonias en cada transformación. Se tomó una colonia de cada cepa, con la cual se hizo un inóculo. No se observaron colonias en las placas LB/amp donde se plaquearon las células sin el plasmidio, pero sí en placas LB (no se muestra). De esta forma se descartó que la resistencia a ampicilina presentada por los transformantes se deba a otro factor que no sea el plasmidio con el que se transformó.

*3.1.6 Ensayo de inducción.* Se inocularon 10 mL de medio de cultivo LB/Amp con los cultivos líquidos generados antes. Se llevaron a una  $DO_{600nm} = 0,6$  a 37 °C en agitación. Una vez alcanzada la densidad óptica requerida, los cultivos se indujeron mediante IPTG a distintas concentraciones. Se obtuvo el extracto total de proteínas de cada condición y se analizó por SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la figura 6 (A y B). En los geles teñidos con Azul de Coomassie se observó que al inducir con IPTG aparece una banda algo más arriba de 45 kDa, la cual aumenta su intensidad al aumentar la concentración del inductor. Al mismo tiempo se observó que esta banda no apareció cuando no se hizo la inducción. Dado al comportamiento descrito, y el tamaño en que aparece la banda, se infirió que esta

banda corresponde a la expresión de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ tubWT,  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y  $\gamma$ tubD279N). Ambos clones seleccionados para cada mutante presentaron un comportamiento similar, por lo que se eligió arbitrariamente uno de ellos para su secuenciación. Para las mutantes  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y  $\gamma$ tubD279N se eligió el clon 1.

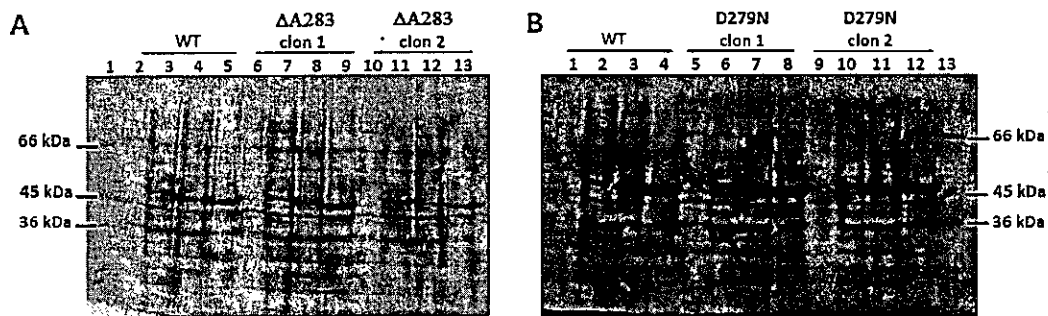
### *3.1.7 Secuenciación de los plasmidios pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y pET11a- $\gamma$ tubD279N.*

Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% se comprobó la presencia de una banda única del tamaño esperado en las preparaciones de ADN plasmidial. Los resultados de la secuenciación (Fig. 7) indicaron que las únicas mutaciones presentes son las introducidas por el PCR mutagénico, por lo que se concluyó que las mutaciones correspondían a lo diseñado y por lo tanto las proteínas podían ser expresadas y purificadas para su posterior caracterización. El plasmidio que contiene el gen para  $\gamma$ -tubulina silvestre no se envió a secuenciar, pues su secuencia se conocía con anterioridad.



**Figura 5: Electroforesis de los productos de digestión con *EcoRI* y *EcoRV* del ADN plasmidial de 3 clones que expresan  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y  $\gamma$ tubD279N, y el control con ADN plasmidial que expresa  $\gamma$ tubWt.** A) Carril 1: Marcador de número de bases (kb), Carril 2, 3 y 4: plasmidio pET11a- $\gamma$ tubWT digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. Carril 5, 6 y 7: plasmidio pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 clon 1 digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. B) Carril 1: Marcador de número de bases (kb), Carril 2, 3 y 4: plasmidio pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 clon 2 digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. Carril 5, 6 y 7: plasmidio pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 clon 3 digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. C) Carril 1: Marcador de número de bases (kb), Carril 2, 3 y 4: plasmidio pET11a- $\gamma$ tubWT digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. Carril 5, 6 y 7: plasmidio pET11a- $\gamma$ tubD279N clon 1 digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. D) Carril 1: Marcador de número de bases (kb), Carril 2, 3 y 4: plasmidio pET11a- $\gamma$ tubD279N clon 2 digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente. Carril 5, 6 y 7: plasmidio pET11a- $\gamma$ tubD279N clon 3 digerido con *EcoRI*, *EcoRV* y *EcoRI/EcoRV*, respectivamente.





**Figura 6: Electroforesis de los productos de los ensayos de expresión de  $\gamma$ tubWT,  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y  $\gamma$ tubD279N.** Geles de poliacrilamida-SDS teñidos con Azul de Coomassie de los ensayos de inducción realizados a los clones 1 y 2 seleccionados para cada mutante. A) Carril 1: Marcador de masa molecular (kDa), Carriles 2, 3, 4 y 5: BL21  $\lambda$ (DE3)/pET11a- $\gamma$ tubWT a 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM y 0,1 mM de IPTG, respectivamente. Carriles 6, 7, 8 y 9: BL21  $\lambda$ (DE3)/pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 clon 1 a 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM y 0,1 mM de IPTG, respectivamente. Carriles 10, 11, 12 y 13: BL21  $\lambda$ (DE3)/pET11a- $\gamma$ tub $\Delta$ A283 clon 2 a 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM y 0,1 mM de IPTG, respectivamente. B) Carriles 1, 2, 3 y 4 : BL21  $\lambda$ (DE3)/pET11a- $\gamma$ tubWT a 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM y 0,1 mM de IPTG, respectivamente. Carriles 5, 6, 7 y 8: BL21  $\lambda$ (DE3)/pET11a- $\gamma$ tubD279N clon 1 a 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM y 0,1 mM de IPTG, respectivamente. Carriles 9, 10, 11, y 12: BL21  $\lambda$ (DE3)/pET11a- $\gamma$ tubD279N clon 2 a 0 mM, 0,001 mM, 0,01 mM y 0,1 mM de IPTG, respectivamente. Carril 13: Marcador de masa molecular (kDa).

tubgWT	ACCGGCTACACCCCTCTCACTACGGACCAGTCAGTGCCAGCGTGAGGAAGACCACGGTC
tubgΔA283	ACCGGCTACACCCCTCTCACTACGGACCAGTCAGTG---AGCGTGAGGAAGACCACGGTC
tubgD279N	ACCGGCTACACCCCTCTCACTACGAACCAGTCAGTGCCAGCGTGAGGAAGACCACGGTC

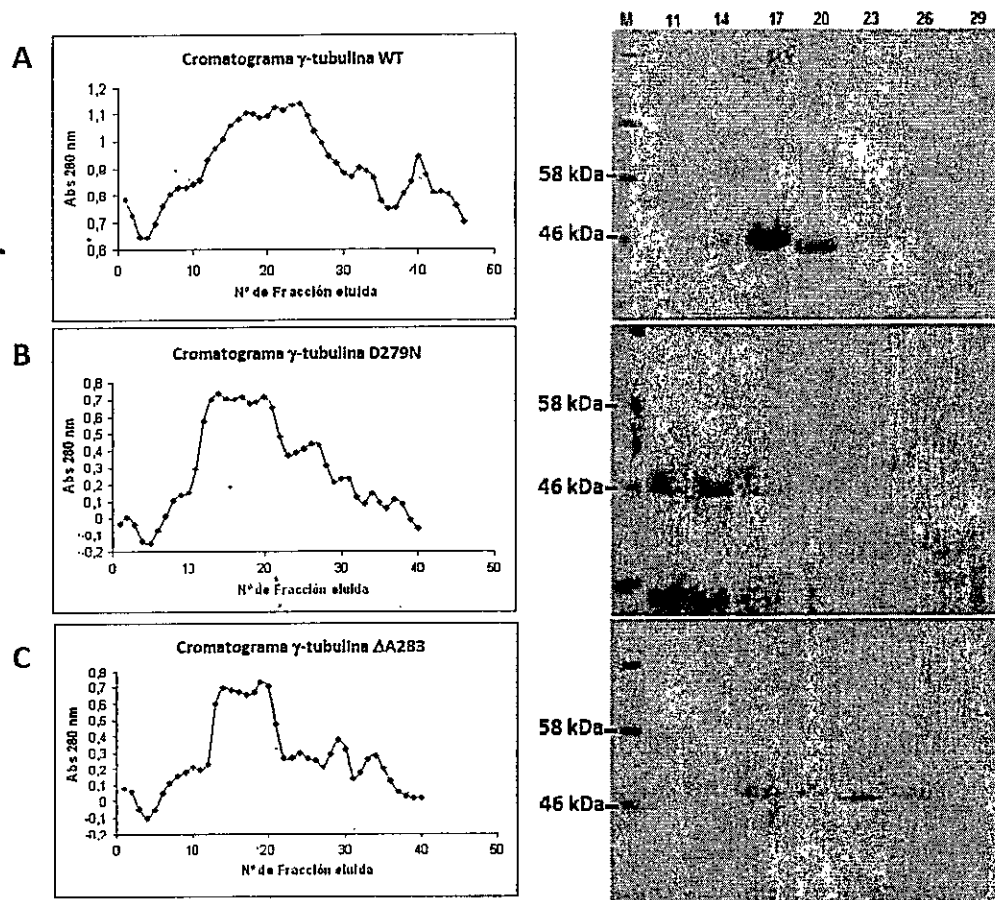
**Figura 7: Secuenciación de los ADN plasmidiales.** Alineamiento de la secuenciación nucleotídica, en AlignX de Vector NTI Advance 10. Se destaca en blanco en la secuencia de  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 donde se eliminaron las 3 bases que codifican para la alanina 283, y en la de  $\gamma$ tubD279N el cambio de una base que genera la modificación del ácido aspártico 279 por una asparragina.

3.1.8 Purificación de  $\gamma$ -tubulina silvestre y de las mutantes (D279N y  $\Delta$ A283). Las proteínas se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico. Se tomaron fracciones de 1, 5 mL, las que se analizaron por electroforesis SDS-PAGE para evidenciar la presencia de la proteína. La  $\gamma$ -tubulina silvestre se encontró desde la fracción 14 hasta la 26; la mutante  $\Delta$ A283 entre la fracción 17 y 26, y la mutante D279N en el rango que va desde la fracción 10 hasta la 20 (Fig. 8). La proteína mostró una banda con una masa molecular relativa de 46 kDa para WT y D279N y de 47 kDa para  $\Delta$ A283, más baja que la masa esperada de 51 kDa según el programa ProtParam del servidor ExPaSy de la SwizzProt. Bandas menos intensas se observaron bajo los 45 kDa, que probablemente corresponden a productos de degradación de las proteínas. Los valores de masa molecular de las bandas se obtuvieron mediante la construcción de gráficos de log de la masa molecular v/s migración relativa, los cuales relacionan la migración relativa de proteínas respecto a su masa.

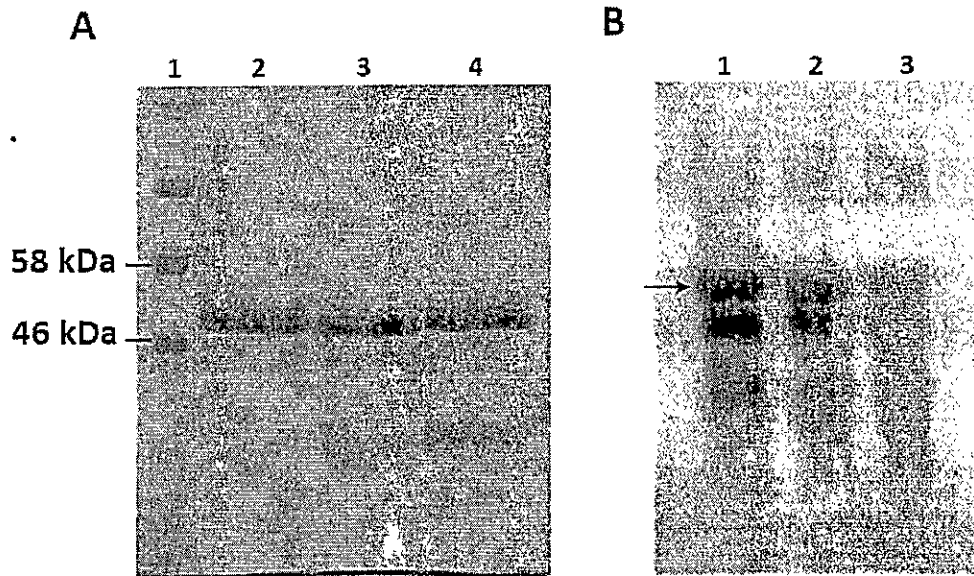
Las fracciones en que se encontraba la proteína se juntaron y concentraron por centrifugación en centricones hasta un volumen final aproximado de 500  $\mu$ L. Se estimó la concentración de las proteínas midiendo su  $A_{280}$  y la concentración se calculó según la ley de Lambert-Beer, utilizando un valor de coeficiente de extinción molar de  $45865 \text{ M}^{-1}\text{m}^{-1}$  para  $\gamma$ -tubulina obtenido por ProtParam. Se obtuvo una concentración de  $3,4 \times 10^{-5} \text{ M}$  para  $\gamma$ -tubulina recombinante WT,  $3,37 \times 10^{-5} \text{ M}$  para la mutante  $\Delta$ A283 y  $4,4 \times 10^{-5} \text{ M}$  para la mutante D279N.

Para analizar la pureza de las proteínas se realizó un SDS-PAGE y un western blot. En el SDS-PAGE se cargaron alrededor de 4  $\mu$ g de proteína y se tiñó con Azul de Coomassie. Para el western blot se cargaron aproximadamente 0,3  $\mu$ g de cada muestra y se reveló con un anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina. En la figura 9A se muestra un gel teñido con Azul de Coomassie en el que se observa para cada una

de las tres proteínas una banda que corresponden a 54,23 kDa para  $\gamma$ -tubulina WT y  $\gamma$ -tubulina D279N, y en 53,33 kDa para  $\gamma$ tub $\Delta$ A283, lo cual concuerda con el valor esperado próximo a los 51 kDa dado por ProtParam (Fig. 9A). Se observaron además para las tres proteínas bandas menos intensas de menor tamaño en el gel de poliacrilamida-SDS y en el westerner blot, que corresponden a productos de degradación de las mismas (Fig. 9B).



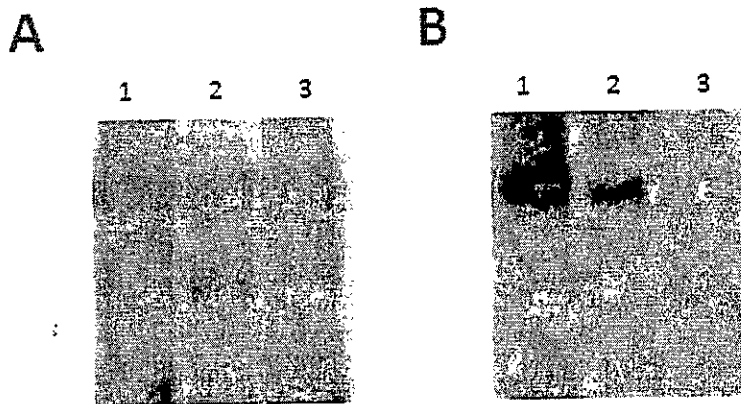
**Figura 8: Cromatogramas y electroforesis de las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico utilizada para la purificación de las proteínas WT, D279N y  $\Delta$ A283. Geles teñidos con Azul de Coomassie. Los números sobre cada carril indican el número de la fracción obtenida de la cromatografía que se muestra en la figura. A)  $\gamma$ -tubulina WT, B)  $\gamma$ -tubulina D279N y C)  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283. M es el marcador de masa molecular (kDa).**



**Figura 9: Electroforesis y western blot de las  $\gamma$ -tubulinas WT,  $\Delta$ A283 y D279N purificadas y concentradas.** A) SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Carril 1: marcador de masa molecular (kDa), Carril 2:  $\gamma$ -tubulina WT, Carril 3:  $\gamma$ tub $\Delta$ A283 y carril 4:  $\gamma$ -tubulina D279N. La banda más intensa corresponde a 54,23 kDa para  $\gamma$ -tubulina WT y  $\gamma$ -tubulina D279N, y en 53,33 kDa para  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283, concordante con lo esperado. Se observan además otras bandas bajo los 45 kDa. B) Western Blot. Carril 1:  $\gamma$ -tubulina WT, Carril 2:  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283 y Carril 3:  $\gamma$ -tubulina D279N. La flecha indica la banda correspondiente a las  $\gamma$ -tubulina, silvestre y mutantes. Las bandas inferiores para ambas imágenes corresponden a degradados de la proteína.

### 3.2 Marcación con biotina de $\gamma$ -tubulina recombinante WT y las mutantes D279N y $\Delta$ A283.

Las 3 proteínas recombinantes, silvestre y mutantes, se marcaron con biotina, de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante del reactivo. Luego de la reacción de marcaje, las proteínas se cargaron en una columna de exclusión molecular equilibrada con solución de marcaje para separar la proteína biotinilada de la biotina libre (datos no-mostrados). Se juntaron las fracciones correspondientes a la proteína biotinilada y se dializó contra la solución de marcaje para eliminar la biotina no unida aun presente. La concentración de proteína biotinilada se estimó midiendo la  $A_{280}$  y usando el coeficiente de extinción teórico para  $\gamma$ -tubulina. Finalmente las proteínas se llevaron todas a una concentración de 1 mg/mL. Con estas se hizo un SDS-PAGE y western blot. Este último se reveló contra  $\gamma$ -tubulina (Fig. 10A) y contra biotina (Fig. 10B). Se observaron bandas de tamaños correspondientes a  $\gamma$ -tubulina en los tres casos (WT, D279N y  $\Delta$ A283) y los degradados observados ya anteriormente. Se obtuvieron distintos grados de marcaje en las proteínas al revelar con estreptavidina. Para el caso de  $\gamma$ -tubulina WT y la mutante D279N se observaron bandas nítidas, siendo la de la proteína silvestre de mayor intensidad, lo que nos indicó una mayor grado de marcaje. Para la mutante  $\Delta$ A283 se obtuvo una señal bastante débil, que nos indicó que el grado de marcaje en este caso es mucho menor que el de las otras proteínas recombinantes. Pese a la diferencia observada en los grados de marcaje con biotina, las 3 proteínas se utilizaron en los ensayos siguientes.



**Figura 10: Western blot de las proteínas recombinantes biotiniladas  $\gamma$ -tubulina WT y las mutantes D279N y  $\Delta$ A283.** A) Inmunoblot contra  $\gamma$ -tubulina. Carril 1:  $\gamma$ -tubulina WT biotinilada, Carril 2:  $\gamma$ -tubulina D279N biotinilada y Carril 3:  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283 biotinilada. B) Inmunoblot contra biotina utilizando estreptavidina-hrp. Carril 1:  $\gamma$ -tubulina WT biotinilada, Carril 2:  $\gamma$ -tubulina D279N biotinilada y Carril 3:  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283 biotinilada.



### 3.3 Microinyección de $\gamma$ -tubulina recombinante marcada en el cigoto del pez cebra y su localización subcelular.

Cigotos de pez cebra recién fecundados se microinyectaron con las proteínas recombinantes marcadas (silvestre y mutantes), con el propósito de averiguar si podían ser plegadas por la maquinaria citoplasmática presente. Las proteínas se introdujeron en el citoplasma del embrión a una concentración final aproximada de  $2,5 \times 10^{-5}$  mg/mL. Se observaron diferencias en los embriones inyectados respecto a los embriones control (no inyectados), que corresponden a cambios de tipo morfológicos (hinchazón y deformación del embrión, detención del desarrollo, blastómeros con morfología diferente a los del embrión control, presencia de número impares de células en algunos casos y diferencias en la formación de las vesículas ópticas, entre otros) y aumento de la mortalidad (datos no mostrados). El comportamiento observado concordó con los resultados anteriores de nuestro laboratorio que muestran estos efectos y que son proporcionales a la cantidad de proteína inyectada (Tesis Doctoral de Luis Pouchucq, L. 2009).

Los embriones inyectados con proteína recombinante biotinilada se analizaron por inmunofluorescencia y fraccionamiento en gradientes discontinuos de glicerol.

La localización celular de  $\gamma$ -tubulina se observó por inmunofluorescencia. Para ello, los embriones inyectados se incubaron en agua del sistema de acuarios por dos horas a 28 °C y luego se fijaron. Las inmunofluorescencias se revelaron utilizando anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina y DAPI, como tinción nuclear (Fig. 11). En la figura 11A y 11B se muestran las células de embriones controles que corresponden a embriones no inyectados. En C y D se muestran las células de embriones

inyectados con  $\gamma$ -tubulina WT. En E y F se muestran los embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina D279N y G y H los embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283. En la figura 11 se observa que la distribución de  $\gamma$ -tubulina, que representa las reorganizaciones del centrosoma, sufre reordenamientos dependientes del estado del ciclo celular en que se encuentre la célula, tanto en los embriones controles como en los inyectados. De esta forma se observa que en estado de interfase la señal de  $\gamma$ -tubulina se distribuye de forma dispersa y no homogénea al costado del núcleo de forma delimitada (Fig. 11 A, B, C y D). En E, F y G se observa  $\gamma$ -tubulina como una nube alargada hecha de cúmulos discretos de señal, a ambos costados de las dos señales en rojo que corresponden a los grupos de cromátidas en migración, lo que indicaría que aquellas células se encontrarían en estado de telofase. Por último, en H se observa  $\gamma$ -tubulina como una señal compacta al costado de la señal roja alargada correspondiente a las cromátidas, que indicaría que la célula se encuentra en estado de anafase. Los embriones inyectados y los embriones sin inyectar en general no mostraron diferencias en cuanto a la distribución de  $\gamma$ -tubulina. Sin embargo, las células en estado de interfase de los embriones inyectados, ya sea con proteína silvestre o mutante, presentaron núcleos irregulares cuya forma no es redonda como en el caso de los embriones controles (Fig.11).

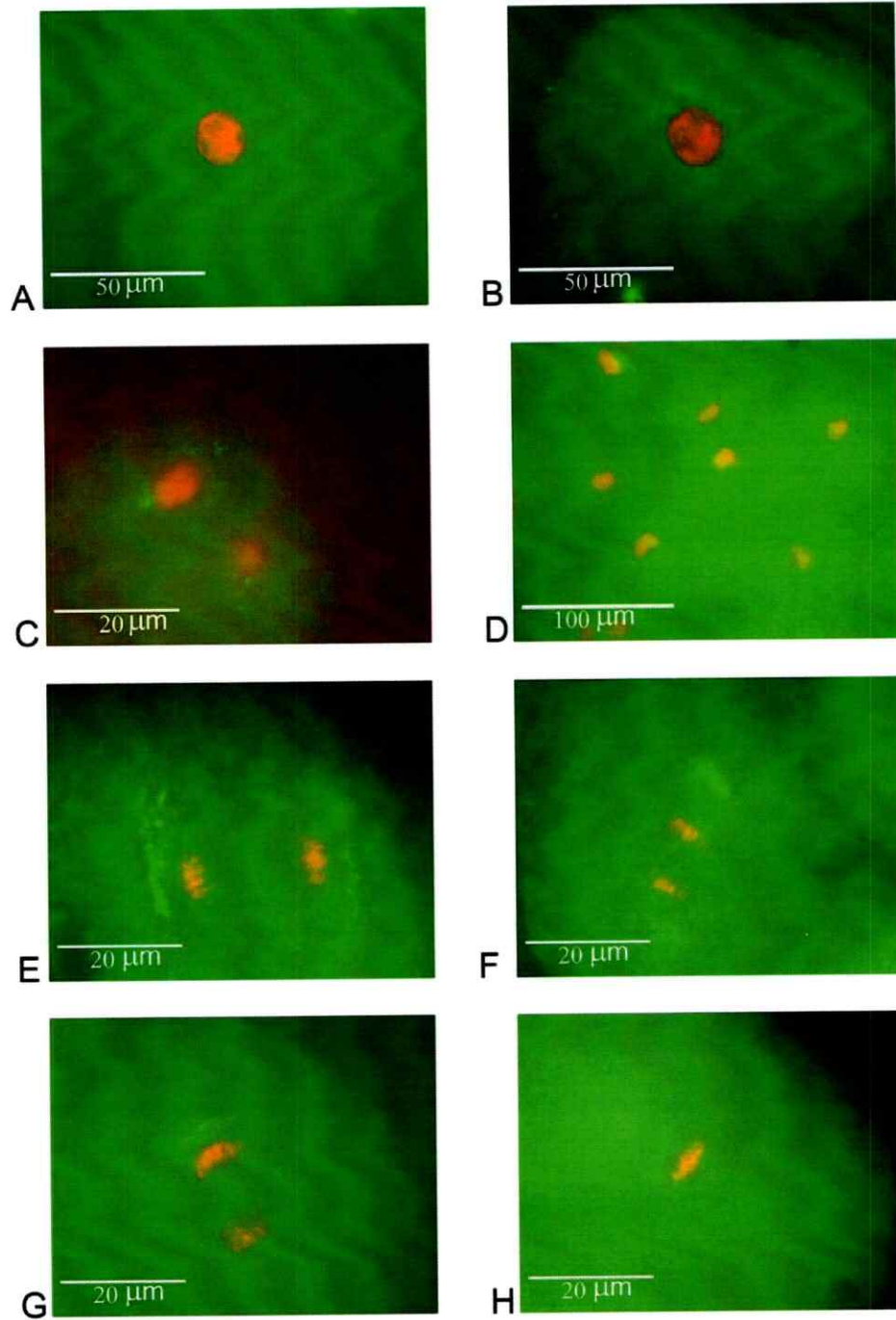
La distribución del citoesqueleto de microtúbulos se reveló con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (Fig. 12). En la figura 12, en A y B se muestran células de embriones no inyectados. En C y D se muestran células de embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina WT. En E y F se muestran células de embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina D279N y en G y H los embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina  $\Delta$ A283. En general las células se observaron bastante similares, tanto en los embriones controles como los embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina silvestre y

las mutantes. La organización del citoesqueleto de microtúbulos mostró los reordenamientos esperados de acuerdo a los distintos estados del ciclo celular, en todos los embriones, inyectados o no.

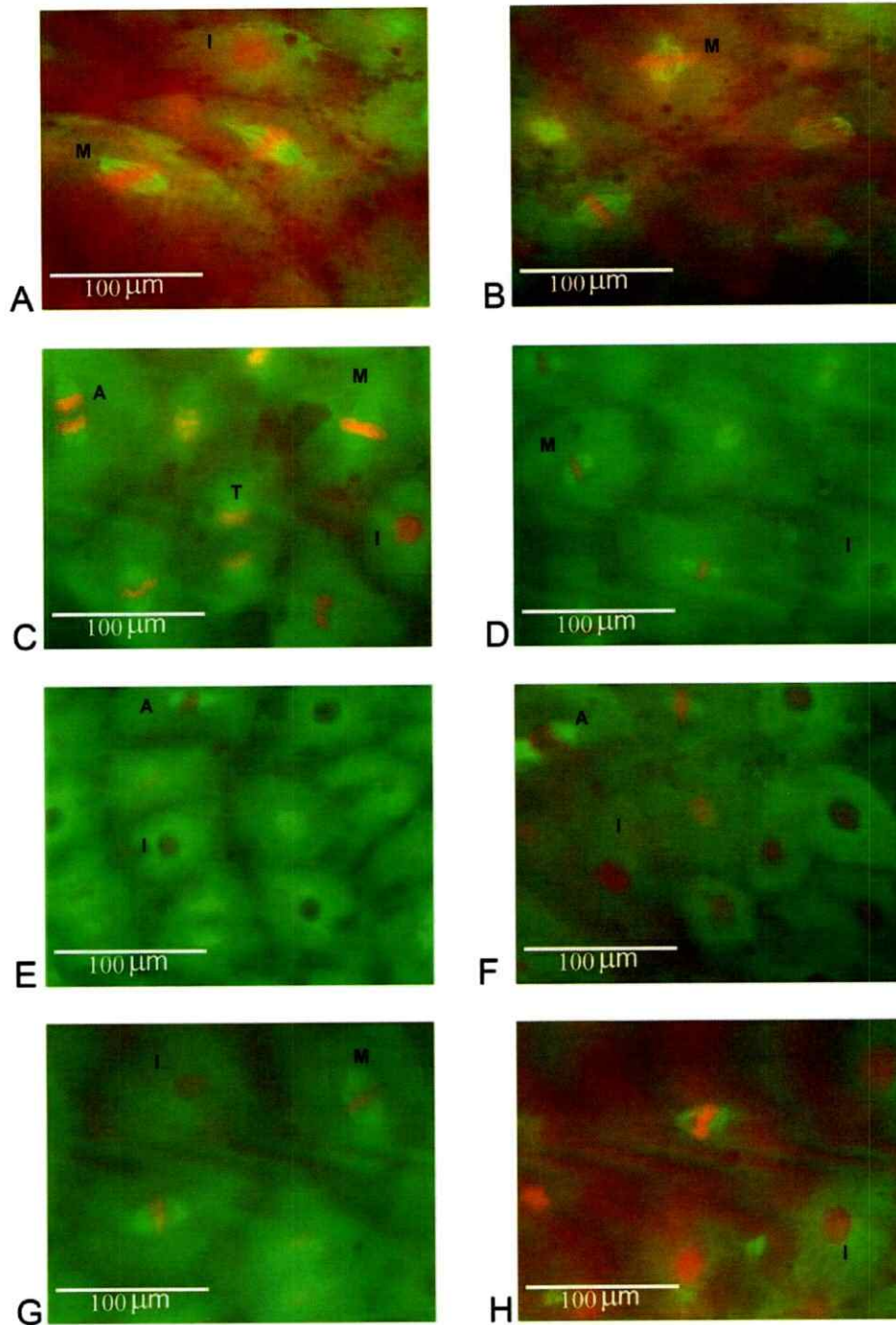
La unión de las proteínas recombinantes (silvestre y mutantes) al  $\gamma$ -TuRC se analizó con la siguiente estrategia. Los embriones microinyectados con las proteínas recombinantes biotiniladas se incubaron por 4 horas a 28 °C, luego se seleccionaron los embriones vivos y se homogeneizaron en amortiguador de extracción de  $\gamma$ -TuRC. El extracto se fraccionó en gradientes discontinuos de glicerol. Con las fracciones se hizo un dot blot, el cual se reveló por quimioluminiscencia con un anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina, para detectar la  $\gamma$ -tubulina total (endógena y exógena), y con estreptavidina conjugada a peroxidasa, para detectar la biotina unida a las proteínas recombinantes (exógena). Cada punto del dot blot se analizó por densitometría. Con los valores normalizados se construyeron gráficos de barra que comparan ambas señales (en gris la de biotina y en negro la de  $\gamma$ -tubulina). La figura 13 muestra el fraccionamiento de los embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina WT y las mutantes D279N y  $\Delta$ A283. Se observa que la distribución de  $\gamma$ -tubulina WT microinyectada y de la proteína endógena en el gradiente es similar al descrito para la  $\gamma$ -tubulina endógena del embrión de pez cebra (Tesis Doctoral de Luis Pouchucq, L. 2009). Así, se observan dos poblaciones mayoritarias, una más pequeña entre las fracciones 8 y 12 que podría corresponder a los complejos pequeños de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuSC) y otra mayor entre las fracciones 17 y 21 que correspondería al complejo anillo de  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TuRC). La señal de estreptavidina indica la distribución de la proteína biotinilada, la cual presenta un patrón muy similar a la del anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina, excepto en las fracciones 7 y 10 donde no aparece y solo lo hace en las fracciones 11 y 12. En los embriones inyectados con la mutante D279N se observan tres poblaciones con estreptavidina

entre las fracciones 7 y 8, 14-16 y 20-24 y solo en esta última población aparece la  $\gamma$ -tubulina (exógena y endógena). Cabe destacar que esta distribución es diferente a la distribución normal de  $\gamma$ -tubulina en un embrión no inyectado, que es similar a la distribución de la proteína WT microinyectada.

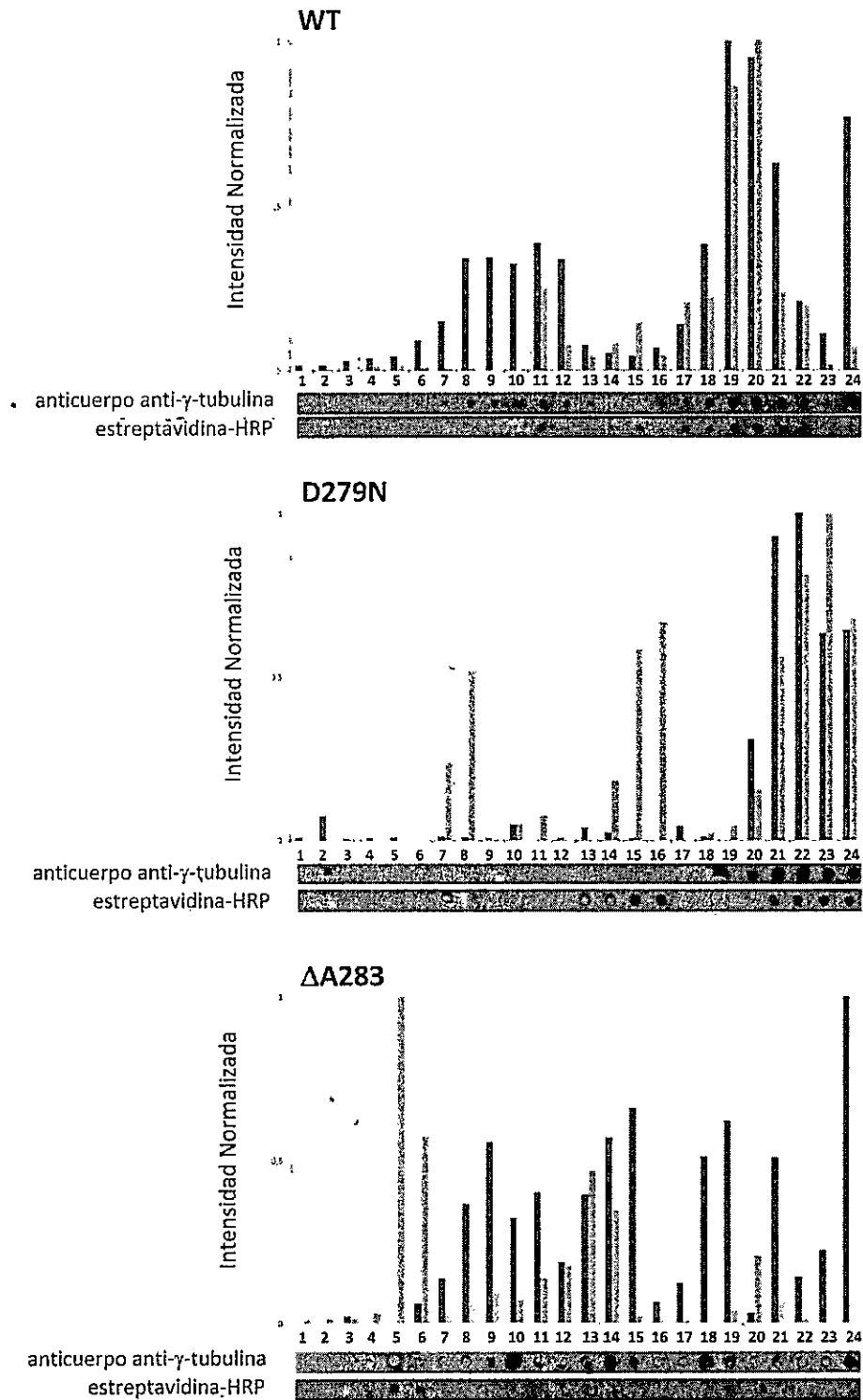
El fraccionamiento de los embriones inyectados con  $\Delta A283$  muestra que se distribuye de manera parecida entre las fracciones 6 y 11 a la primera población de la  $\gamma$ -tubulina WT y entre las fracciones 17 a 23 a la segunda población de la WT. Es notoria la presencia de una nueva población entre las fracciones 12-16 que tiene más coincidencia con la segunda población de  $\gamma$ -tubulina microinyectada de la mutante D279N. También cabe destacar la presencia de una fracción importante de  $\gamma$ -tubulina total que indica la presencia de  $\gamma$ -tubulina endógena.



**Figura 11: Inmunofluorescencias de células de embriones tempranos de pez cebra.** En A y B se observan células de embriones no inyectados. C y D corresponden a células de embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina recombinante WT. E y F a embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina recombinante D279N y en G y H a embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina recombinante  $\Delta$ A283. En A, B, C y D se observan células en estado de interfase, en E, F y G en estado de telofase, y en H en estado de anafase. Estas inmunofluorescencias se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti- $\gamma$ -tubulina (verde) y por tinción nuclear con DAPI (rojo).



**Figura 12: Inmunofluorescencias de células de embriones tempranos de pez cebra.** En A y B se observan células de embriones no inyectados. C y D corresponden a células de embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina recombinante WT. E y F a embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina recombinante D279N y en G y H a embriones inyectados con  $\gamma$ -tubulina recombinante  $\Delta$ A283. I = células en estado de interfase, M = células en estado de metafase, A = células en estado de anafase, y T = células en estado de telofase. Estas inmunofluorescencias se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (verde) y por tinción nuclear con DAPI (rojo).



**Figura 13: Gráficas del fraccionamiento del extracto de embriones tempranos del pez cebra por ultracentrifugación en gradientes de densidad de glicerol. En los gráficos para  $\gamma$ -tubulina WT, D279N y  $\Delta A283$  se muestran las intensidades relativas de los inmunoblots que aparecen bajo ellos. Las barras negras indican las**

intensidades relativas del inmunoblot con anti- $\gamma$ -tubulina y las grises con estreptavidina-hrp. Los números corresponden a las fracciones del gradiente.



### 3.4 Funcionalidad de $\gamma$ -TuRC.

El efecto de las mutaciones sobre la distribución de los complejos de  $\gamma$ -tubulina del embrión de pez cebra podría asociarse a una pérdida de función de  $\gamma$ -tubulina como proteína nucleadora de microtúbulos. Para comprobar esta hipótesis se hizo un ensayo de polimerización de microtúbulos *in vitro*, para observar de manera directa la interacción de las mutantes de  $\gamma$ -tubulina con el heterodímero de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina en la formación del microtúbulo. Las tres proteínas recombinantes biotiniladas (la proteína WT y las dos mutantes) se incubaron con un extracto crudo de embriones de pez cebra de 4 horas de desarrollo suplementado con 0,1 mM de ATP durante una hora a 28 °C. Se tomaron 100  $\mu$ l de los extractos y se mezclaron con una solución de polimerización con tubulina de cerebro de pollo (2 mg/mL) que contenía 0,1 mM de GTP. La polimerización de microtúbulos se indujo al aumentar la temperatura de 4 a 37 °C y luego de 30 minutos de reacción los microtúbulos se precipitaron. El sobrenadante y el precipitado se analizaron por inmunoblot, revelando la  $\gamma$ -tubulina total con un anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina y la  $\gamma$ -tubulina biotinilada (exógena) con estreptavidina. Previamente el sobrenadante se concentró precipitando con acetona. Como controles se hizo un ensayo solo con extracto de embrión de pez cebra, uno solo con  $\alpha/\beta$ -tubulina y otro en ausencia de  $\gamma$ -tubulina recombinante biotinilada. Como se observa en la figura 14 los controles mostraron que la  $\gamma$ -tubulina endógena del embrión no se detecta y no se observó señal para biotina. La reacción de polimerización de microtúbulos en presencia de extractos adicionados con  $\gamma$ -tubulina WT biotinilada mostró que ésta precipita con los microtúbulos, observándose la señal de  $\gamma$ -tubulina y de biotina en el precipitado. Ambas mutantes, D279N y  $\Delta$ A283, precipitan casi totalmente con los microtúbulos (señal  $\gamma$ -tubulina), y una parte de la proteína queda en el sobrenadante (señal

biotina). Las mutantes D279N y  $\Delta$ A283 mostraron señales para biotina mayores en el precipitado que en el sobrenadante. Estos resultados indican que ambas mutantes se unen al microtúbulo pero se mantienen en equilibrio con la proteína no unida.

		control (+) extracto	control (+) $\alpha/\beta$ tub	control (-) $\gamma$ tub	$\gamma$ -TUBULINA RECOMBINANTE								
$\gamma$ -tubulina recombinante		-	-	-	WT		D279N		$\Delta$ A283				
extracto de embrión de pez cebra		+	-	+	+		+		+				
$\alpha/\beta$ -tubulina		-	+	+	+		+		+				
		P S	P S	P S	P S	P S	P S	P S	P S	P S			
anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina													
estreptavidina													

**Figura 14: Incorporación de  $\gamma$ -tubulina a microtúbulos de  $\alpha/\beta$ -tubulina polimerizados *in vitro*.** Polimerización *in vitro* de microtúbulos de  $\alpha/\beta$ -tubulina en presencia de extractos de embriones tempranos de pez cebra más  $\gamma$ -tubulina recombinante biotinilada. Se separaron por centrifugación los microtúbulos polimerizados en presencia de: un extracto de embriones de pez cebra y un extracto de embriones de pez cebra más  $\gamma$ -tubulina recombinante biotinilada WT y las mutantes biotiniladas D279N y  $\Delta$ A283. Se hizo un control negativo en ausencia de  $\alpha/\beta$ -tubulina, como se indica en la figura. El signo + significa presencia y el signo - ausencia. Se utilizó  $\alpha/\beta$ -tubulina (~2 mg/mL) purificada desde cerebro de pollo. Las reacciones de polimerización se indujeron al aumentar la temperatura a 37 °C por 30 minutos. Se separó el precipitado (P) del sobrenadante (S) y se analizaron mediante inmunoblot con un anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina y estreptavidina-hrp.

#### 4. Discusión

Experimentos genéticos hechos en levaduras han demostrado que mutaciones en ciertas zonas de interacción de las tubulinas generan fenotipos letales, lo cual indica la importancia de la estructura en la función de estas zonas (Anders y Botstein, 2001). La caracterización de las zonas importantes para la función de estas proteínas se ha mantenido vedada, pues no ha sido posible obtener tubulina recombinante funcional sobreexpresada en bacterias. Esto se ha debido a la compleja vía de plegamiento que estas proteínas poseen. En la década de los 80 se obtuvo la proteína por traducción *in vitro* en un sistema de reticulocitos de conejo, sin embargo, para caracterizar su funcionalidad con métodos biofísicos este procedimiento es costoso y poco eficiente (Yaffe y cols. 1988). En el laboratorio se intentó replegar *in vitro* la tubulina a partir de la proteína recombinante expresada en *E. coli*, pero ésta aunque retoma su contenido de estructura secundaria no es funcional (Andreu y cols. 2002). Se ha descrito que al microinyectar  $\alpha/\beta$ -tubulina nativa en cigotos de sanguijuela, el heterodímero se incorpora a los microtúbulos (Fernández y cols. 2002). Los resultados expuestos muestran que es necesario el desarrollo de una técnica eficiente que permita obtener proteína funcional en cantidades suficientes para hacer los ensayos biofísicos necesarios para caracterizar las zonas de interacción que determinan la función de estas proteínas.

Con estos antecedentes, en este Seminario de Título se utilizó el embrión temprano de pez cebra y la  $\gamma$ -tubulina WT y sus mutantes expresadas como proteínas recombinantes en *E. coli*. La estrategia consistió en marcar la proteína con biotina, microinyectarla y seguir su localización celular por medio de inmunofluorescencia y evaluar su presencia en los centros nucleadores de

La incorporación de las  $\gamma$ -tubulinas recombinantes biotiniladas microinyectadas a los complejos de  $\gamma$ -tubulina del embrión se determinó separando estas estructuras en un gradiente de glicerol. Se evaluó la presencia de  $\gamma$ -tubulina total (endógena + inyectada) por inmunoblot y de  $\gamma$ -tubulina inyectada con estreptavidina específica para biotina. Los resultados en el gradiente mostraron una típica distribución de la  $\gamma$ -tubulina WT (Pouchucq, 2009). Se observa (Fig. 13) que la proteína WT se incorpora a los complejos de  $\gamma$ -tubulina del embrión y se destacan dos poblaciones mayoritarias de acuerdo a sus propiedades hidrodinámicas, una de menor tamaño, que correspondería a los complejos pequeños ( $\gamma$ -TuSC), y otra de mayor tamaño que correspondería al  $\gamma$ -TuRC.

La importancia del "loop" M de  $\gamma$ -tubulina para la formación de los centros nucleadores de microtúbulos se evaluó por la incorporación de mutantes en este "loop" a dichos centros. Así, se encontró que la mutante D279N se distribuía en tres poblaciones de acuerdo a la presencia de biotina. Estas poblaciones corresponden a complejos de distintos tamaños (pequeños, intermedios y grandes). Los complejos de menor tamaño ( $\gamma$ -TuSC) concuerdan con los obtenidos para  $\gamma$ -tubulina WT y los de mayor tamaño ( $\gamma$ -TuRC) se distribuyen con un patrón diferente en el mismo rango de densidad del gradiente observado para la proteína WT. Estos resultados indicarían que la mutación no afecta la incorporación de  $\gamma$ -tubulina en estas estructuras. Sin embargo, la presencia de la población de tamaño intermedio y el desplazamiento de las señales de la población de mayor tamaño hacia densidades mayores indicaría que la incorporación de esta mutante a ambos complejos,  $\gamma$ -TuSC y  $\gamma$ -TuRC, induciría un cambio en el tamaño y/o la forma de estos complejos. Estos resultados en su conjunto muestran la participación del "loop" M y la importancia del aspartato 279 en la formación de los centros nucleadores de microtúbulos. Para confirmar la especificidad de esta interacción se

utilizó la mutante cuyo "loop" M se asemeja al de la  $\beta$ -tubulina. La separación de la fracción soluble de los embriones inyectados con  $\Delta A283$  muestra 3 poblaciones al igual que con la mutante anterior. Las poblaciones de menor y mayor tamaño se distribuyen de manera similar a las dos poblaciones descritas para  $\gamma$ -tubulina WT. La tercera población de tamaño intermedio muestra una distribución con densidades similares a la misma población de los embriones microinyectados con la mutante D279N. Es interesante notar que en este caso hay una muy buena correspondencia entre las fracciones reveladas con western blot contra  $\gamma$ -tubulina (proteína total) y las reveladas con estreptavidina (proteína microinyectada), a diferencia de la mutante D279N que presenta una menor correspondencia. Los resultados en su conjunto indican que ambas mutantes se incorporan en los centros nucleadores de microtúbulos y forman una población con tamaño intermedio entre el  $\gamma$ -TuSC y el  $\gamma$ -TuRC. Esta nueva población no es la misma para ambas mutantes, pues para la mutante D279N se observa casi exclusivamente la señal de biotina (recordar que es mucho más sensible que el western blot) y con la mutante  $\Delta A283$  se observan ambas señales. Esto se puede interpretar de la siguiente manera, que la mutante D279N induce y es parte exclusiva de esta nueva especie y la mutante  $\Delta A283$  disminuye significativamente la población de  $\gamma$ -TuRC y mantiene la de  $\gamma$ -TuSC. Sorprendentemente, en la población intermedia hay un aumento de la  $\gamma$ -tubulina total que tiene un alto contenido de la mutante microinyectada. Esto significa que cuando el "loop" M se parece al de  $\beta$ -tubulina hay formación de macroestructuras intermedias entre el  $\gamma$ -TuSC y el  $\gamma$ -TuRC. Surge entonces la pregunta ¿Porqué  $\beta$ -tubulina no se incorpora a los centros nucleadores? La respuesta radica en la formación del heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulina que se mantiene como tal desde su formación dada la alta afinidad entre ambas tubulinas (Sánchez

y cols., 2004) y la regulación a nivel traduccional de  $\beta$ -tubulina que mantiene la población de heterodímeros (Cleveland, D. W. y cols. 1983).

Una duda razonable es si ocurre un plegamiento correcto de la proteína cuando se microinyecta. Para disipar esta duda la funcionalidad de la  $\gamma$ -tubulina inyectada en los embriones se ensayó *in vitro*. La racional detrás de este ensayo es que si la proteína está bien plegada debiera ayudar a nuclear a los microtúbulos e incorporarse a ellos (Pouchucq, 2009). Los ensayos de polimerización de microtúbulos *in vitro* muestran que  $\gamma$ -tubulina WT interactúa con los microtúbulos, pues precipita con ellos. Esta es una prueba del correcto plegamiento *in vitro* de  $\gamma$ -tubulina con un extracto de citoplasma de embrión. Ambas mutantes, D279N y  $\Delta$ A283, precipitan con los microtúbulos, pero una parte minoritaria queda en el sobrenadante. Esto indica que las mutantes interactúan con los microtúbulos uniéndose a ellos, pero que existe un equilibrio con proteína que no se une. Estos resultados apuntan a que las mutaciones en el "loop" M de  $\gamma$ -tubulina alteran la interacción de  $\gamma$ -tubulina con  $\alpha/\beta$ -tubulina para nuclear los microtúbulos, sin eliminarla.

En la introducción mencionamos que actualmente existen dos modelos para explicar la nucleación de los microtúbulos y planteamos como objetivo de esta Memoria determinar cuál de ellos es el correcto. Los resultados permiten aclarar el mecanismo de nucleación de microtúbulos por  $\gamma$ -tubulina y es a lo que nos referiremos a continuación. De acuerdo al modelo del templado, las mutaciones en el "loop" M de  $\gamma$ -tubulina debieran modificar la formación del  $\gamma$ -TuRC debido a que, aunque las interacciones longitudinales con las otras proteínas del complejo permanecen inalteradas, las interacciones laterales entre las moléculas de  $\gamma$ -tubulina si se modifican, pues participa el "loop" M, que se ha mutado. Hay que considerar en este modelo que la función nucleadora de microtúbulos de  $\gamma$ -tubulina

ocurre a través de las interacciones longitudinales que en este caso se mantienen intactas. En el Modelo del protofilamento, las mutaciones en el "loop" M de  $\gamma$ -tubulina afectarían la formación del  $\gamma$ -TuRC, debido a que se alterarían las interacciones con las otras proteínas de este complejo y principalmente debiera afectarse la interacción con  $\alpha\beta$ -tubulina al comienzo de la polimerización impidiendo la nucleación de los microtúbulos.

Los resultados discutidos con anterioridad indican que las mutaciones en el "loop" M de  $\gamma$ -tubulina (de interacción lateral) alteran la estructura de los centros nucleadores de microtúbulos e interfieren la nucleación *in vitro* de los microtúbulos, disminuyéndola sin eliminarla. Resultados previos del laboratorio mostraron que mutaciones en el "loop" T7 (de interacción longitudinal) ubicado en el extremo (-) de  $\gamma$ -tubulina, afecta la formación del  $\gamma$ -TuRC pero no la interacción con los microtúbulos (Pouchucq, 2009). Este conjunto de resultados apoya fuertemente la participación de las interacciones laterales en la estructuración de los centros nucleadores de microtúbulos más bien que en las interacciones con  $\alpha\beta$ -tubulina durante la nucleación. De este modo las interacciones laterales serían responsables de la formación del anillo de  $\gamma$ -tubulina que por medio de las interacciones longitudinales del extremo (-) con las otras proteínas del complejo daría origen al centro nucleador. El anillo del complejo a través del extremo (+) de  $\gamma$ -tubulina interactuaría con el monómero de  $\alpha$ -tubulina del heterodímero iniciando las interacciones longitudinales que dan origen a los protofilamentos del microtúbulo. La disminución de la interacción *in vitro* de los complejos de  $\gamma$ -tubulina del extracto soluble de embriones podría explicarse por la modificación estructural de éstos. Es claro que las mutantes en el "loop" M mantendrían la potencialidad de las interacciones longitudinales de  $\gamma$ -tubulina y serían responsables del grado de



interacción que se observa de esta proteína con los microtúbulos. Esta conducta se explica con el modelo de nucleación llamado "Modelo del Templado" (Fig. 1A).

Es importante destacar que el uso de embriones de pez cebra es un sistema que en forma elegante permite establecer la relación entre la estructura y la función de proteínas expresadas en bacterias u otro sistema de expresión. La alternativa que ya ha sido utilizada con  $\alpha$ -tubulina es la incorporación de la información genética con proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes (Russan, N. M. y cols. 2001). Sin embargo, aunque este es un método habitual tiene el inconveniente de introducir una proteína de gran tamaño que puede interferir con los procesos normales. Como el Dr. Gregorio Weber afirmaba "La sonda fluorescente debe ser un testigo y no actor".

## 5. Conclusiones

- La  $\gamma$ -tubulina WT biotinilada se incorpora a los complejos  $\gamma$ -TuSC y  $\gamma$ -TuRC del embrión temprano de pez cebra. Lo mismo que las mutantes D279N y  $\Delta$ A283. La mutante D279N favorece la formación de complejos de mayor tamaño a lo descrito y la mutante  $\Delta$ A283 favorece la formación de complejos de tamaño intermedio. Ambas mutantes inducirían un cambio estructural de distinta magnitud en los centros nucleadores de microtúbulos, lo que demuestra la importancia del "loop" M en la formación de los complejos  $\gamma$ -TuSC y  $\gamma$ -TuRC .
- La  $\gamma$ -tubulina biotinilada es funcional, pues interactúa con los microtúbulos polimerizados *in vitro*. Las mutantes D279N y  $\Delta$ A283 se unen de forma parcial a los microtúbulos.
- Se confirma el uso de embriones tempranos de pez cebra para establecer la relación entre la estructura de la  $\gamma$ -tubulina y su función.
- Se propone el "Modelo del Templado" como mecanismo de nucleación de microtúbulos por  $\gamma$ -tubulina.

## 6. Proyecciones

Los resultados obtenidos en este trabajo generan interrogantes que es necesario responder para dilucidar como la  $\gamma$ -tubulina lleva a cabo su función. A partir de los resultados se generan las siguientes proyecciones experimentales:

- Demostrar que la interacción de  $\gamma$ -tubulina con las proteínas acompañantes del complejo anillo es de tipo longitudinal y por el extremo (-) de  $\gamma$ -tubulina.
- Demostrar que la interacción de  $\gamma$ -tubulina con el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina para la nucleación de microtúbulos es de tipo longitudinal y por el extremo superior.
- Demostrar que las mutantes dobles, de interacción lateral y longitudinal debieran ser letales.
- Demostrar que las mutaciones analizadas no interfieren el proceso de plegamiento inducido por la chaperonina CCT.

## 7. Referencias

- Aldaz H., Rice L.M., Stearns. y Agard D.A. (2005) Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human  $\gamma$ -tubulin. *Nature* 435:523-7.
- Anders, K. y Botstein, D. (2001) Dominant-lethal  $\alpha$ -Tubulin mutants defective in microtubule depolymerization in yeast. *Mol. Biol. Cell* 12: 3973–3986.
- Andreu, J.M, Oliva, M.A y Monasterio, O. (2002) Reversible Unfolding of FtsZ Cell Division Proteins from Archaea and Bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly. *J. Biol. Chem.* 277:43262-43270.
- Bouissou,A., Vérollet,C., Sousa, A., Sampaio, P., Wright M., Sunkel, C., Merdes, A. y Raynaud-Messina, K. (2009)  $\gamma$ -Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *J. Cell Biol.* 187:327–334.
- Cleveland, D. W., Pittenger, M. F. y Feramisco, J. (1983) Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis. *Nature* 305:738-740.
- Debec, A., Détraves, C., Montmory, C., Géraud, G. y Wright, M. (1995) Polar organization of gamma-tubulin in acentriolar mitotic spindles of *Drosophila melanogaster* cells. *J. Cell Sc.* 108:2645-2653.
- Desai, A y Mitchison, T. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83-117.
- Ericsson, H. (2000)  $\gamma$ -tubulin nucleation: template or protofilament? *Nat. Cell Biol.* 2:93-96
- Ericsson, H. y Stoffler D. (1996) Protofilaments and Rings, Two Conformations of the Tubulin Family Conserved from Bacterial FtsZ to  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  Tubulin. *J. Cell Biol.* 135:5–8.

- 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*. 53:214-230.
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B. y Schilling, T. (1995) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn*. 203:255-310.
- Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C y Palevitz, B.A. (1993) A  $\alpha$ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sc.* 104:1217-1228.
- Moritz M., Braunfeld M.B., Guénebaut V., Heuser J. y Agard D.A. (2001) Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 2(6):365-370.
- Nogales E., Wolf S.G. y Downing KH. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199-203
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O., Milligan, R., Iwamatsu, A., Mitchison, T.; y Zheng, Y. (1999) Characterization of Two Related Drosophila gamma-tubulin Complexes that Differ in Their Ability to Nucleate Microtubules. *J. Cell Biol.* 144: 721-733.
- Pouchucq L. (2009). Análisis estructural y funcional de las regiones de interacción de  $\gamma$ -tubulina en la nucleación de microtúbulos y el plegamiento asistido por la chaperonina CCT. Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M. y Ríos, R. (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J.* 28:1016-1028.

- Rusan, N.M., Fagerstrom, C. J., Yvon, A. C. y Wadsworth, P. (2001) Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein- $\alpha$ -tubulin. *Mol. Biol. Cell* 12:971-980.
- Sánchez, S., Brunet, J., Jameson, D.M., Lagos, R. y Monasterio, O. (2004) Tubulin equilibrium unfolding followed by time-resolved fluorescence and fluorescence correlation spectroscopy. *Protein Sc.* 13:81-88.
- Yaffe, M., Farrj, G.W. y Sternlichtn, H. (1988). Translation of  $\beta$ -tubulin mRNA in vitro generates multiple molecular forms. *J. Biol. Chem.* 263:16023-16031.
- Zheng, Y. y Wiese, C. (2000) A new function for the  $\gamma$ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat. Cell Biol.* 2: 358 – 364.
- Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. y Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578-583.