

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA-IFIMAV

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Biología Molecular



**¿DETERMINA LA VIDA MEDIA DE TBCE Δ 52-55
EL SINDROME DE KENNY-CAFFEY?**

Lorena García Hevia

Memoria de Investigación

JUNIO 2011

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA-IFIMAV

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Biología Molecular



**¿DETERMINA LA VIDA MEDIA DE TBCE Δ 52-55
EL SINDROME DE KENNY-CAFFEY?**

Juan Carlos Zabala Otaño

Catedrático de Biología Molecular y
Bioquímica de la Facultad de Medicina

Mónica López Fanarraga

Profesora titular de Biología Molecular y
Bioquímica de la Facultad de Medicina

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| I. | ANTECEDENTES | 3 |
| 1. | Citoesqueleto celular..... | 3 |
| 1.1 | Filamentos de actina | 3 |
| 1.2 | Filamentos intermedios..... | 4 |
| 1.3 | Microtúbulos | 4 |
| 1.4 | Tubulina..... | 7 |
| 2. | Plegamiento de proteínas | 8 |
| 2.1 | Chaperonas moleculares | 8 |
| 2.2 | Plegamiento de tubulina | 10 |
| 2.2.1 | Interacción con prefoldina..... | 10 |
| 2.2.2 | Interacción con CCT | 10 |
| 2.2.3 | Dimerización de α -tubulina y β -tubulina | 12 |
| 3. | Cofactores del plegamiento de tubulina | 14 |
| 3.1 | Cofactor A..... | 14 |
| 3.2 | Arl2 | 15 |
| 3.3 | Cofactor B..... | 15 |
| 3.4 | Cofactor C..... | 16 |
| 3.5 | Cofactor D | 16 |
| 3.6 | Cofactor E | 16 |
| 4. | Enfermedades relacionadas con los cofactores..... | 17 |
| II. | OJETIVOS | 21 |
| III. | METODOLOGÍA..... | 22 |
| 1. | Soluciones | 22 |
| 2. | Tampones y técnicas de laboratorio..... | 22 |
| 2.1 | Minilizados claros | 22 |
| 2.2 | Tratamiento con cicloheximida | 22 |
| 2.3 | Cuantificación de proteína | 23 |
| 2.4 | Electroforesis de proteínas..... | 23 |
| 2.5 | Inmunoblotting..... | 23 |
| 2.6 | Transcripción y traducción <i>in vitro</i> | 24 |
| 2.7 | Inmunoprecipitación con Dynabeads proteína A | 25 |
| 2.8 | Tinción y fluorografía..... | 25 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.9 | Marcaje metabólico..... | 26 |
| 2.10 | Técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica..... | 27 |
| 2.10.1 | Transfecciones..... | 27 |
| 2.10.2 | Líneas celulares de mamíferos | 27 |
| 2.10.3 | Anticuerpos y fluorocromos | 27 |
| 2.10.4 | Células | 27 |
| 2.10.5 | Microscopía | 28 |
| IV. | RESULTADOS | 29 |
| 1. | Estudio de TBCE <i>in vivo</i> | 29 |
| 1.1 | TBCE despolimeriza microtúbulos <i>in vivo</i> a las 6 horas post-transfección..... | 29 |
| 1.2 | Localización de TBCE en neuronas..... | 30 |
| 1.3 | Distribución de TBCE en el ciclo celular | 31 |
| 2. | Cuantificación de la vida media | 32 |
| 2.1 | Bloqueo de la síntesis proteica con cicloheximida | 32 |
| 2.2 | Marcaje metabólico..... | 33 |
| V. | DISCUSIÓN..... | 36 |
| VI. | CONCLUSIONES | 38 |
| VII. | BIBLIOGRAFÍA | 39 |

I. ANTECEDENTES

1. Citoesqueleto celular

El citoesqueleto es un entramado tridimensional de filamentos proteicos que se extiende por todo el citoplasma. Proporciona el soporte interno de las células e interviene en los fenómenos de transporte intracelular, motilidad y división celular.

El citoesqueleto de las células eucarióticas está constituido por tres tipos de filamentos, cada uno con propiedades mecánicas y dinámicas propias: microfilamentos o filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos.

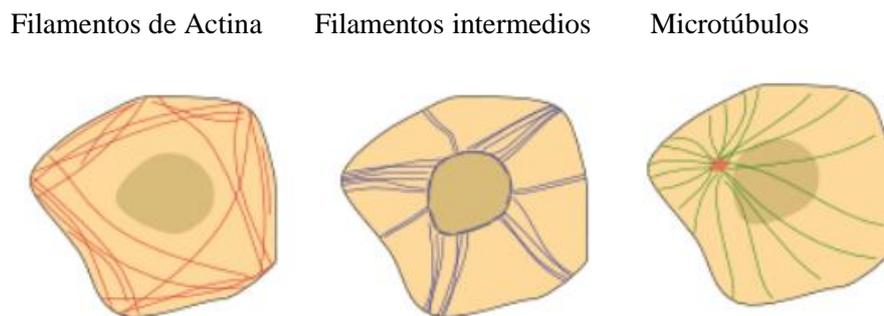


Figura 1. Esquema de la distribución celular de los tres principales componentes del citoesqueleto de una célula animal. Los filamentos de actina se disponen sobre todo en las proximidades de la membrana, los filamentos intermedios se anclan a complejos de unión de la membrana plasmática y también aparecen en las membranas y los microtúbulos adoptan una disposición radial partiendo desde el centrosoma. Estas distribuciones pueden variar según el tipo celular.

1.1 Filamentos de actina

Los microfilamentos tienen un diámetro de unos 7 nm de diámetro y están compuestos por subunidades de actina. Tienen un papel muy importante en la motilidad celular y en el control de la forma de la célula. Forman filamentos y simplemente ensamblándose o despolimerizándose, son capaces de cambiar la morfología de la célula. Son los principales responsables de la contracción muscular.

También son constituyentes de estructuras ciliares, del citoesqueleto cortical, de los axones o del anillo contráctil de la célula en división, por lo que son fundamentales en procesos como el desarrollo embrionario, la defensa contra infecciones, la reparación de heridas o la metástasis en células cancerosas.

La actina es la proteína intracelular más abundante en las células eucariotas, tiene una masa molecular de 43 kDa, es globular y está muy conservada. La especie humana posee 6 isotipos diferentes de actina (Engel y cols, 1982). Los filamentos de actina son polares y la

longitud de éstos varía constantemente y es dependiente del ensamblaje y desensamblaje de las subunidades que son monómeros globulares de actina.

1.2 Filamentos intermedios

Son filamentos de proteína fibrosa de unos 8-10 nm de diámetro, los componentes del citoesqueleto más estables, dando soporte a los orgánulos. Son especialistas en resistir tensiones mecánicas y deformaciones celulares. Al contrario que los otros componentes del citoesqueleto, los filamentos intermedios son polímeros formados por unidades pertenecientes a varias familias de proteínas entre las que se encuentran las queratinas, las vimentinas y las láminas de la envuelta nuclear.

1.3 Microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros proteicos organizados en un círculo de unos 25 nm de diámetro y longitud variable. Los microtúbulos tienen numerosas funciones, como establecer la disposición espacial de determinados orgánulos, formar un sistema de raíles mediante el cual se pueden transportar vesículas o macromoléculas entre compartimentos celulares, son imprescindibles para la división celular puesto que forman el huso mitótico y son esenciales para la estructura y función de los cilios y de los flagelos.

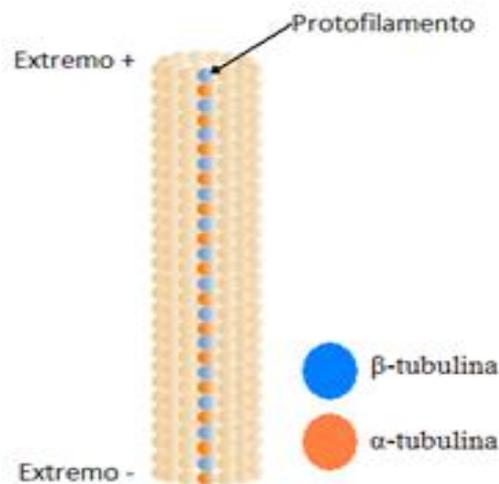


Figura 2. Esquema de la organización de los dímeros de tubulina en uno de los 13 protofilamentos que forman parte de los microtúbulos. La α -tubulina está orientada hacia el extremo menos y la β -tubulina hacia el extremo más, lo que hace que los microtúbulos sean polímeros con una polaridad y extremos diferentes.

La subunidad del microtúbulo son unas proteínas globulares denominada tubulina. Está compuesta por dos tipos de polipéptidos, tubulina: α y β , con una masa molecular aproximada de 50 kDa cada una. Este heterodímero constituye la unidad estructural y funcional del microtúbulo (Weisenberg, 1972). Estas subunidades se alinean ordenadamente, mediante

enlaces no covalentes, en filas longitudinales que se denominan protofilamentos. Un microtúbulo tipo contiene trece protofilamentos (Evans y cols, 1985). Cada protofilamento tiene una polaridad estructural: la α -tubulina siempre formará un extremo del protofilamento y la β el otro. Esta polaridad es la misma para todos los protofilamentos de un microtúbulo y por tanto el microtúbulo también es una estructura polarizada. Se denomina extremo menos (-), menos dinámico, al extremo donde hay una α -tubulina y más (+), más dinámico, donde está la β -tubulina (Mitchison, 1993) (Fig. 2).

La **nucleación** es el proceso de iniciación de la formación de microtúbulos a partir de heterodímeros de tubulina. Tiene un papel fundamental en la función y dinámica intracelular de los microtúbulos inhibiendo la polimerización espontánea de los mismos en el citoplasma y pudiendo, por otra parte, servir para regular el número de protofilamentos del microtúbulo. Se produce en una localización intracelular especializada genéricamente conocida como centro organizador de microtúbulos (MTOC). Estos son los lugares donde comienza la polimerización de un nuevo microtúbulo (Zheng y cols., 1995).

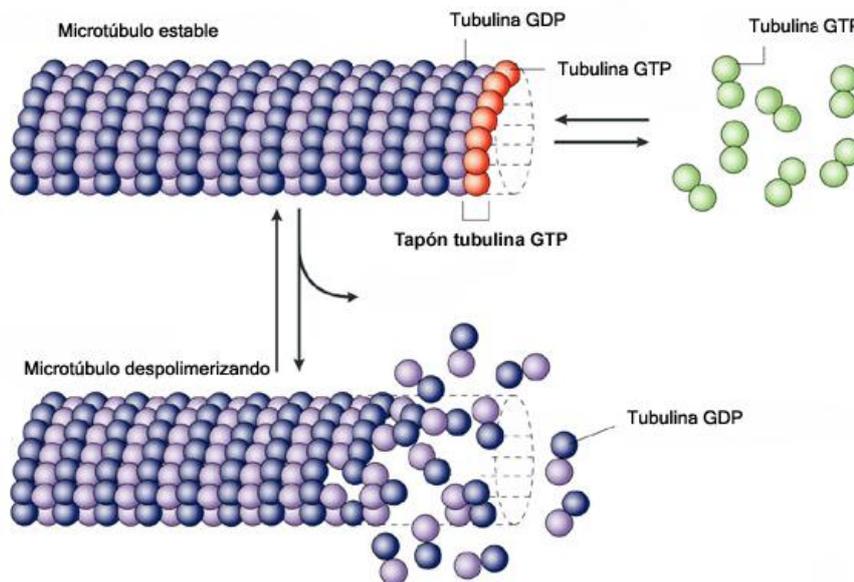


Figura 3. Dinámica de la polimerización de tubulina y modelo del tapón de tubulina GTP. El GTP unido a la tubulina se hidroliza a GDP y fosfato inorgánico (Pi) al mismo tiempo que la tubulina se añade al extremo del microtúbulo o muy poco tiempo después. Finalmente, el Pi se disocia del microtúbulo, dejando un microtúbulo compuesto de tubulina GDP. Un microtúbulo que tiene un tapón de tubulina GTP o GDP-Pi es estable a la despolimerización, pero la pérdida de éste resulta en la despolimerización del microtúbulo (Jordan y Wilson, 2004).

La incorporación de nuevos dímeros de tubulina hace que el microtúbulo crezca en longitud. Este crecimiento a veces se detiene repentinamente y el microtúbulo comienza a despolimerizarse abruptamente, proceso denominado de “catástrofe” microtubular, llegando a veces incluso a desaparecer, o más frecuentemente reinicia el proceso de polimerización. A

estas alternancias entre polimerización y despolimerización es a lo que se conoce como **inestabilidad dinámica** (Fig. 3).

Algunos dímeros en el citoplasma se encuentran unidos a una molécula de GTP. Cuando un dímero se une a un microtúbulo en crecimiento se produce una hidrólisis de GTP a GDP. Si la velocidad con la que se produce la unión de nuevos dímeros es mayor que la de hidrólisis del GTP siempre habrá un conjunto de dímeros en el extremo más que tendrán GTP unido. La velocidad de polimerización, sin embargo, depende de las condiciones del entorno citosólico en las que se encuentre el extremo más del microtúbulo en crecimiento. Si la velocidad de polimerización es ralentizada, la velocidad de hidrólisis de GTP alcanza y supera a la de polimerización. Ello implica que llegará un momento en el que el extremo más no habrá dímeros de tubulina-GTP, sino dímeros de tubulina-GDP, los cuales interaccionan débilmente entre ellos cuando se encuentran formando parte del extremo del microtúbulo. Esto provoca una despolimerización masiva (catástrofe del microtúbulo) y la liberación de los dímeros de tubulina-GDP. Los dímeros de tubulina-GDP que quedan libres son convertidos rápidamente en dímeros de tubulina-GTP y por tanto pueden volver a unirse al extremo más de otro microtúbulo en crecimiento.

A pesar de que es posible ensamblar microtúbulos *in vitro* a partir de tubulina pura, *in vivo* los microtúbulos se encuentran asociados a una gran variedad de proteínas que regulan su función. Estas proteínas (denominadas **proteínas asociadas a microtúbulos** o **MAPs**) actúan tanto estabilizando los microtúbulos contra el desensamblaje, como mediando la interacción con otros componentes celulares. De esta forma, diferentes estructuras microtubulares tienen asociadas diferentes MAPs. Estas proteínas, a su vez, regulan temporal y espacialmente la dinámica de los microtúbulos a lo largo de las diversas etapas del ciclo celular. Como cabe esperar de la diversidad de funciones de los microtúbulos, hay muchos tipos de MAPs; algunas de ellas están ampliamente distribuidas en la mayoría de las células, mientras que otras se encuentran sólo en determinados tipos celulares. Un tipo especial de MAPs son las proteínas motoras, quinesinas y dineínas. Aunque su clasificación es muy compleja podrían agruparse en dos grandes bloques:

- **MAPS estructurales:** Regulan la dinámica microtubular y confieren forma y polaridad a la célula. Algunas de estas MAPs son las responsables de la formación de haces de microtúbulos. Las MAPs pueden formar uniones microtúbulo-microtúbulo controlando la separación entre los mismos, pueden formar uniones microtúbulo-membrana plasmática ó microtúbulo-filamentos intermedios.

- MAPS que estabilizan microtúbulos. Dentro de ellas nos podemos encontrar las tipo I (MAP1A, MAP1B y MAP1C) Tienen múltiples repeticiones de la secuencia KKEK

(Lys-Lys-Glu-X) que se une a dominios de tubulina cargados negativamente y las tipo II (MAP2, MAP4 y Tau) Se caracterizan por la presencia de tres o cuatro repeticiones imperfectas de 18 aminoácidos implicados en la interacción con tubulina.

- MAPs que desestabilizan microtúbulos. Proteínas que, al contrario que las anteriores, promueven el desensamblaje o desestabilizan los microtúbulos.

- **Proteínas motoras:** Son las encargadas del tráfico intracelular mediante gasto de ATP; transportan proteínas, vesículas u orgánulos. Dineínas son proteínas motoras multiméricas compuestas por dos cadenas pesadas idénticas que conforman dos cabezas globulares y de un número variable de cadenas intermedias y de cadenas ligeras que se desplazan sobre los microtúbulos hacia el extremo (-). Quinesinas son proteínas motoras compuestas por 1, 2 ó 3 polipéptidos que se desplazan sobre los microtúbulos hacia el extremo (+).

1.4 Tubulina

El heterodímero de tubulina es la unidad estructural y funcional del microtúbulo. Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas denominadas α y β -tubulina, de unos 50 kDa cada una (Figura 4). Las tubulinas pertenecen a una antigua familia de GTPasas. El heterodímero de tubulina contiene dos sitios de unión a GTP, uno en la subunidad α (sitio-N) y otro en la subunidad β (sitio-E). El GTP unido a β -tubulina se intercambia con el nucleótido en solución y se hidroliza durante el proceso de polimerización (Jacobs y cols., 1974).

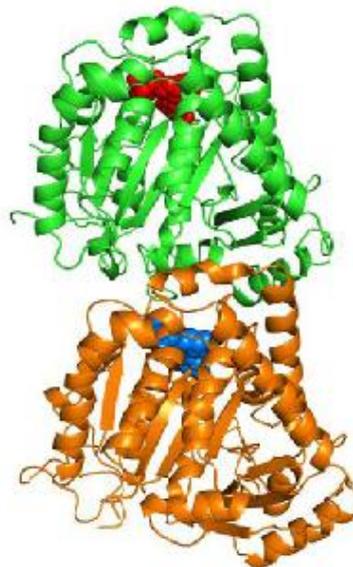


Figura 4. Representación "ribbon" de la estructura secundaria del dímero de tubulina

La región C-terminal de la α - y la β -tubulina sufren una serie de modificaciones post-traduccionales mediante las cuales se generan múltiples variedades de tubulina cuyas

propiedades funcionales son diferentes. Estas modificaciones están conservadas a lo largo de la evolución y regulan la función de los microtúbulos.

2. Plegamiento de proteínas

El plegamiento de proteínas es el proceso por el cual una proteína obtiene su estructura nativa funcional. El plegamiento de proteínas se consigue mediante la combinación de una serie de estructuras ordenadas, como son las estructuras más complejas (estructuras superhelicoidales, hojas beta, dominios alfa-beta, etc.), a partir de la estructura primaria y secundaria y la consiguiente obtención de la estructura terciaria o nativa. Mucho se ha investigado en este campo siendo un especial avance los descubrimientos realizados por Anfinsen y colaboradores que mostraron que la información necesaria para que una proteína alcance su estructura nativa se encuentra en su propia secuencia aminoacídica, hipótesis del autoensamblaje de las proteínas (Anfinsen, 1973). Esta hipótesis postulaba que cada cadena polipeptídica interaccionaba consigo misma hasta lograr un estado de plegamiento de mínima energía libre en el cual, el polipéptido adquiriría su actividad funcional. Si bien es cierto que la estructura primaria de una proteína determina su plegamiento específico, también es verdad que éste depende de una gran cantidad de características del entorno que la rodea (temperatura, pH, radicales, etc) que pueden provocar el colapso del polipéptido en mínimos energéticos no deseados denominados estados de frustración.

Por ello y más considerando el contexto del plegamiento *in vivo*, muchas veces una proteína no es capaz de adoptar su estructura nativa funcional y necesita la ayuda de otras proteínas, llamadas chaperonas moleculares, para plegarse de manera correcta.

2.1 Chaperonas moleculares

Constituyen un numeroso y diverso grupo de proteínas que comparten la propiedad de asistir el plegamiento correcto de otros polipéptidos pero no forman parte de la estructura final de la proteína a la que ayudan (Ellis y Hemmingsen, 1989). Recientemente las chaperonas han sido redefinidas como proteínas que se unen y estabilizan conformaciones de otras proteínas que de otra manera serían inestables, y mediante un proceso de unión-liberación controlada facilitan su correcto destino *in vivo*, ya sea el plegamiento, el ensamblaje en oligómeros, el transporte a compartimentos subcelulares particulares o su degradación (Hendrick y Hartl, 1993). Sus principales funciones son la de prevenir interacciones incorrectas de otras proteínas y rescatar de trampas energéticas los intermedios del plegamiento, estabilizando conformaciones que de otra manera serían inestables. Contribuyen tanto a su plegamiento como al ensamblaje de oligómeros, transporte o degradación.

Diferentes chaperonas pueden unirse a los polipéptidos recién sintetizados en los ribosomas, a proteínas que atraviesan las membranas de diversos orgánulos o a proteínas que se han desnaturizado debido a cualquier tipo de estrés (figura 5).

Las chaperonas moleculares no contienen información estérica que especifique el correcto plegamiento; sin embargo, previenen interacciones incorrectas entre polipéptidos no nativos, incrementando la cantidad de proteína funcional pero no la velocidad de reacción del plegamiento.

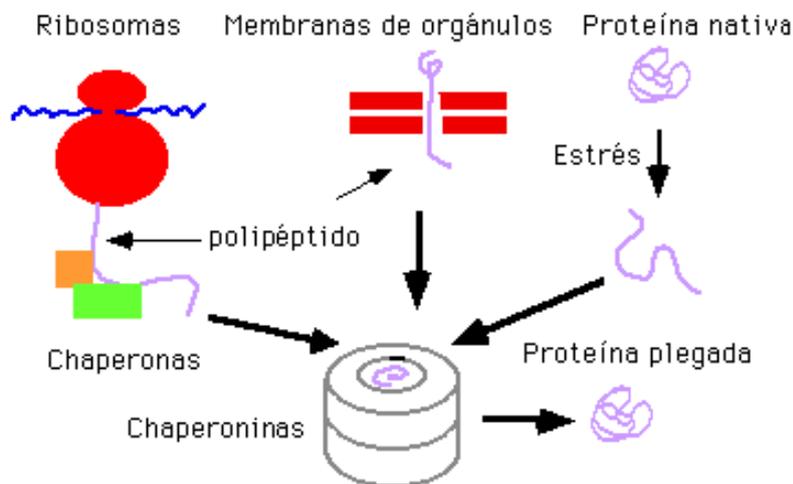


Figura 5. Papel de las chaperoninas en el plegamiento de proteínas en la célula.

Las chaperonas se han clasificado en familias que se definen por su papel funcional. En cada familia se han caracterizado diferentes proteínas que están funcionalmente relacionadas y comparten homología en su secuencia. Entre ellas destacan las *heat shock proteins* (HSPs) y también se consideran chaperonas moleculares proteínas como el tándem calnexina/calreticulina, las nucleoplasminas, Sec B, Pap D y otras.

- Familia de Hsp100: La familia de las Hsp100 está presente en toda clase de organismos, tienen actividad ATPásica y la mayoría forman estructuras oligoméricas.

- Familia de Hsp90: La familia de Hsp90 es de las más abundantes y conservadas, y se encuentran tanto en bacterias como en el citosol y en diferentes compartimentos eucarióticos.

- Familia de Hsp70: Las chaperonas de la familia de las Hsp70 (DnaK en *E. coli*) comprenden un conjunto de proteínas que intervienen en numerosas funciones de la célula, tanto en organismos procarióticos como en casi todos los compartimentos celulares eucarióticos. La regulación de la actividad de hidrólisis de ATP de Hsp70 es llevada a cabo por las proteínas de la familia de Hsp40 (DnaJ en *E. coli*) que no solo estimulan esta hidrólisis, sino que son

capaces de interactuar directamente con el sustrato. La regulación de la liberación del ADP+Pi es facilitada por los miembros de la familia del intercambiador de nucleótidos Bag (GrpE en *E. coli*).

- Familia de Hsp60 o chaperoninas: Las proteínas Hsp60 o chaperoninas son una familia de proteínas relacionadas en su secuencia que realizan una función esencial en el plegamiento de proteínas.

2.2 Plegamiento de tubulina

Es tan complejo que existen decenas de genes dedicados al plegamiento de la tubulina. Para adquirir su conformación nativa requiere la ayuda de chaperonas moleculares puesto que constituyen estructuras oligoméricas con una gran batería de contactos intra- e intermoleculares teniendo, por tanto, una alta probabilidad de generar estructuras no funcionales. Además, también precisa de cofactores proteicos específicos que eviten la unión entre subunidades iguales debido a la gran similitud estructural de las dos subunidades (alfa-beta) que componen la tubulina. (Figura 6).

El proceso de plegamiento de la tubulina *in vitro* puede dividirse en dos fases:

- Una primera en la cual cada polipéptido por separado interactúa con la prefoldina y con la chaperonina citosólica (CCT).
- Una segunda en la que los polipéptidos liberados de CCT, α y β -tubulina interactúan con diferentes cofactores proteicos y generar el heterodímero de tubulina.

2.2.1 Interacción con prefoldina

La prefoldina es una chaperona que interactúa exclusivamente con chaperoninas de tipo II. La prefoldina eucariótica es un complejo heterohexamérico formado por 6 péptidos con un rango de masa molecular entre 14 y 23 kDa.

2.2.2 Interacción con CCT

Las chaperoninas son un grupo especializado pero ubicuo de chaperonas moleculares que se caracterizan por tener una estructura de doble anillo formado por varias subunidades.

Existen en todos los organismos vivos y emplean ciclos de unión e hidrólisis de ATP para generar cambios alostéricos que promueven el plegamiento correcto de la proteína en el hueco existente en el interior de la chaperonina. Tienen un masa molecular total de 800-1000 kDa y las subunidades que la componen son de alrededor de 60 kDa. CCT es la única proteína de la familia Hsp60 que se encuentra en el citoplasma de los organismos eucariotas, pertenece al grupo II y es la chaperonina que contiene TCP-1 (CCT; del inglés Chaperonin Containing TCP1) también denominada TRiC (TCP-1 ring complex) (Gao y cols., 1992).

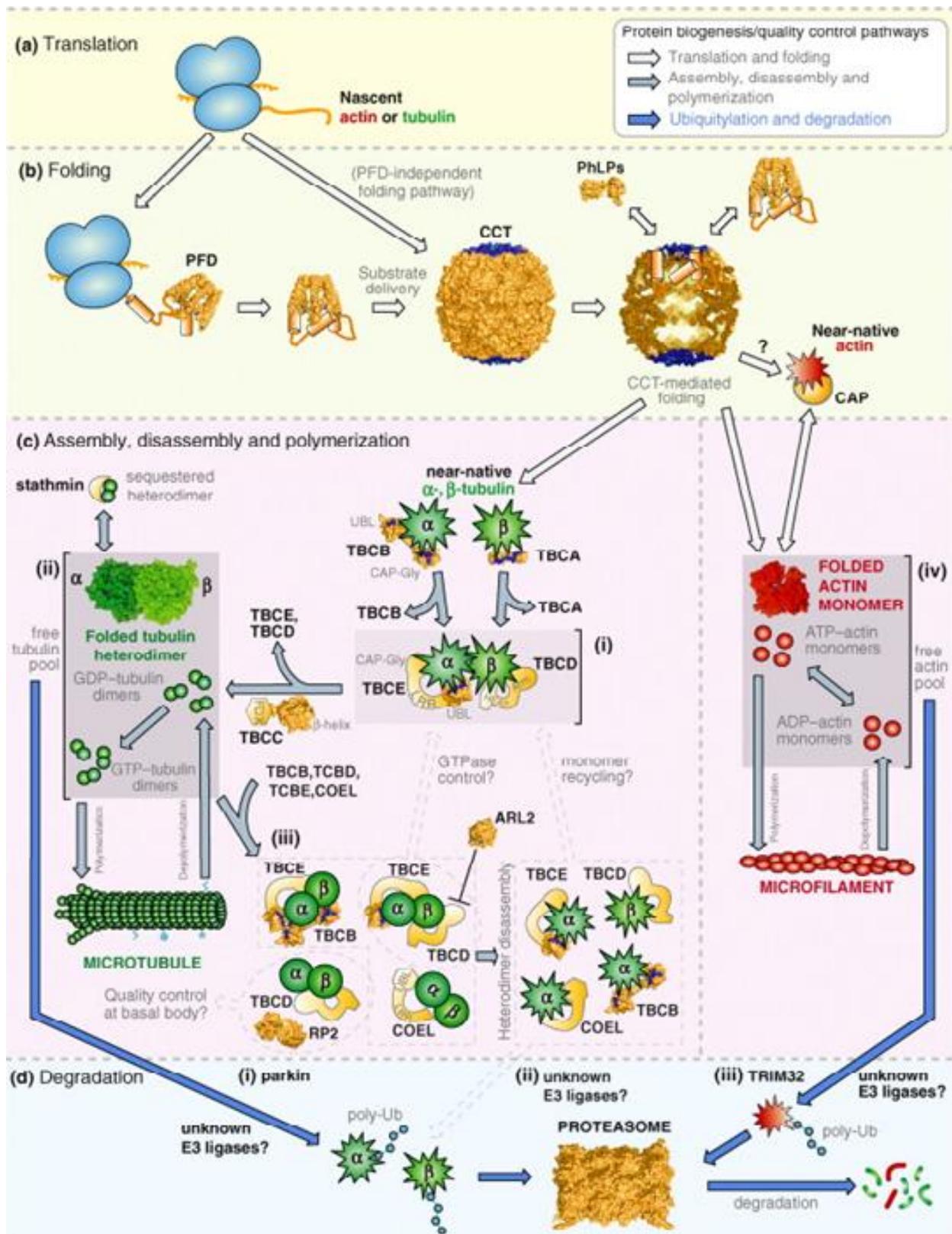


Figura 6. Esquema detallado de la proteostasis de la tubulina. Detalles de todas las proteínas y cofactores implicados en cada etapa. (Lundin y cols., 2010)

2.2.3 Dimerización de α -tubulina y β -tubulina

Proteínas como la actina o la γ -tubulina se liberan aparentemente en el estado nativo tras su interacción con CCT y pueden desempeñar sus funciones, terminando su plegamiento en este paso. Pero α -tubulina y β -tubulina deben interaccionar entre sí para poder formar el heterodímero e incorporarse al microtúbulo.

La formación del heterodímero es un proceso complicado y precisa de una serie de cofactores proteicos (Zabala y Cowan, 1992) que actúen de manera coordinada para facilitar la asociación de α y β -tubulina e incorporarse al microtúbulo tras la hidrólisis de GTP (Fontalba y cols, 1993). La α -tubulina se encuentra en un estado casi nativo con una molécula de GTP unida tras su interacción con CCT (Tian y cols, 1995) y se supone que β -tubulina esté en un estado similar.

Hasta la fecha se han identificado seis proteínas que intervienen en el proceso de formación del heterodímero de tubulina *in vitro*, tras su liberación de CCT. Cinco de estas proteínas: cofactor A o p14 (Campo y cols., 1994; Gao y cols., 1994), cofactores C, D y E (Tian y cols., 1996) y cofactor B (Tian y cols., 1997) participan directamente en la formación del heterodímero. La sexta proteína, Arl2, regula la actividad del cofactor D (Bhamidipati y cols., 2000). Todos los cofactores están conservados evolutivamente y, tanto en levaduras como en plantas, se ha demostrado que son necesarios para la supervivencia de la célula.

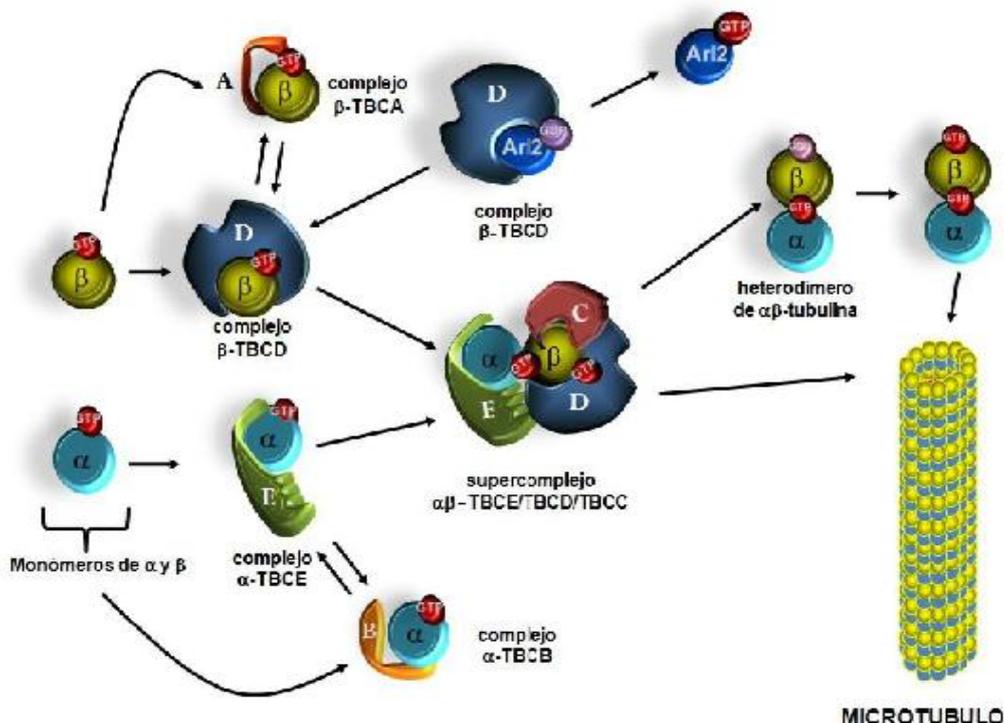


Figura 7. Esquema de la dimerización de la tubulina. (Tesis doctoral Gerardo Carranza).

Tanto α como β -tubulina llegan a esta fase con una molécula de GTP unida y en un estado casi nativo, como resultado de su interacción con CCT. En el caso de la β -tubulina el monómero puede interactuar con el cofactor A o también con el cofactor D, pudiendo transferirse de uno a otro cofactor (Tian y cols., 1996). Los cofactores A y D interactúan y estabilizan el monómero de β -tubulina formando los complejos β /TBCA y β /TBCD. Por otra parte, el monómero de α -tubulina puede unirse tanto al cofactor B como al cofactor E (Tian y cols., 1997) para formar los complejos α /TBCB y α /TBCE, aunque estos procesos no han sido estudiados.

Tanto el cofactor A como el cofactor B actúan como reservorios del exceso de β - y α -tubulina respectivamente, pueden funcionar alterando el equilibrio de la reacción y proveer de una fuente de proteína para la unión a los cofactores E y D (Tian y cols., 1997).

Una vez formados los complejos entre β -tubulina y cofactor D y α -tubulina y cofactor E éstos interactúan entre sí para formar el complejo β /TBCD/ α /TBCE, que en presencia de iones de magnesio y moléculas de GTP, tras la intervención del cofactor C como estimulador de la actividad GTPasa de β -tubulina, se libera el heterodímero-GDP plegado correctamente. Para incorporarse al microtúbulo (Fontalba y cols., 1993; Tian y cols., 1997). La hidrólisis de GTP es esencial para el proceso de dimerización *in vitro* (Zabala y Cowan, 1992; Fontalba y cols., 1993). Este proceso está regulado por Arl2 que, unida a GDP, interacciona con TBCD impidiendo su unión a β -tubulina (figura 7).

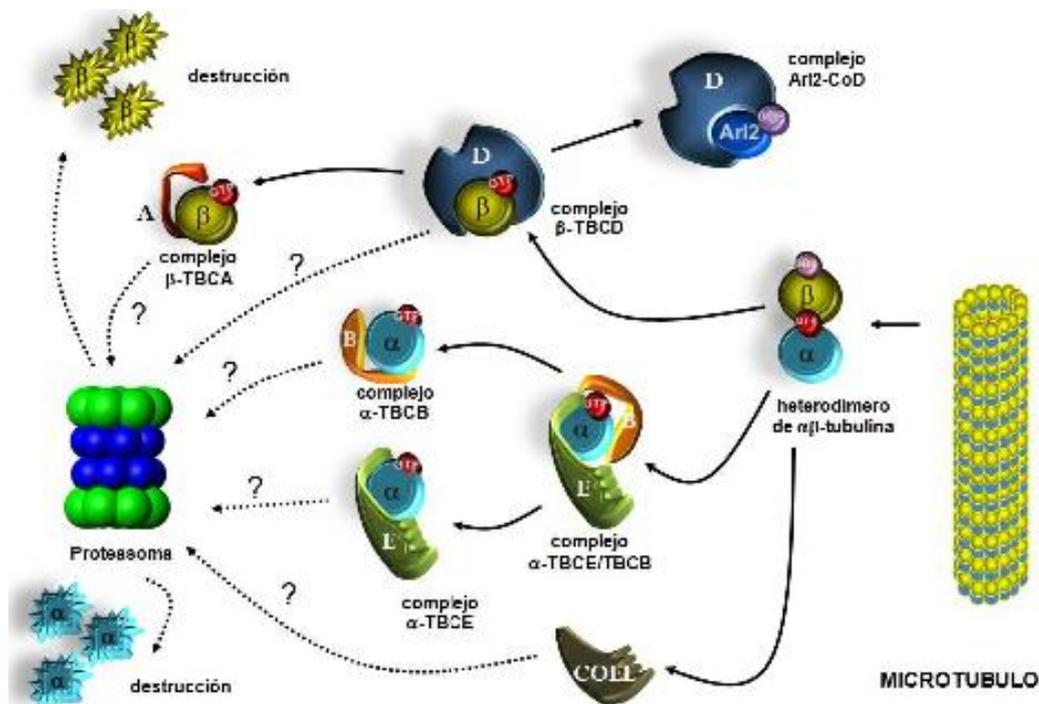


Figura 8. Esquema de la disociación del dímero de tubulina. (Tesis doctoral Gerardo Carranza).

Al igual que existe la ruta de liberación del heterodímero para su incorporación al microtúbulo, también puede ocurrir la ruta inversa, donde los cofactores E (TBCE) y D (TBCD) captan respectivamente la α - y β -tubulina del heterodímero. Tras la disociación del heterodímero, TBCD se une a β -tubulina y TBCE a α -tubulina (Tian y cols., 1997; Martin y cols., 2000). TBCB aumenta la capacidad del cofactor E para liberar el heterodímero, interaccionando con la α -tubulina liberada (Fig 8, Kortazar y cols., 2007).

TBCB interacciona con TBCE para facilitar, por parte de este último, la disociación del heterodímero de tubulina. De esta manera, siendo la interacción entre TBCB con TBCE anterior, se forma un complejo ternario entre TBCB, TBCE y α -tubulina, que corresponde con una estequiometría 1:1:1 (Kortazar y cols, 2007).

Recientemente se ha identificado una nueva proteína denominada TBCE-like debido a la gran homología entre las secuencias de aminoácidos de esta proteína con TBCE. Estaría formado por un dominio *Leucine-Rich Repeats* LRR (Bartolini y cols, 2005) y un dominio *Ubiquitin-like* (UBL). A pesar del parecido entre ambas proteínas COEL no está implicada en la formación, ni en la liberación del dímero de tubulina, aunque sí parece estar implicada en la desestabilización de los microtúbulos, por un mecanismo todavía sin determinar.

Estas tres proteínas junto con el TBCB tienen un dominio UBL, el cual está conservado en proteínas como Rad23 o Parkina, las cuales tienen motivos de unión con el proteasoma (Upadhyay y Hegde, 2003).

3. Cofactores del plegamiento de tubulina

3.1 Cofactor A

El cofactor A, también denominado p14, CoA o TBCA (tubulin cofactor A). El único gen humano se localiza en el cromosoma 5 (5q14.1), codifica para una proteína de 108 aminoácidos y hasta el momento solo se ha identificado una única isoforma.

Su delección causa alteraciones en las estructuras de los microtúbulos. Experimentos *in vitro* han demostrado un doble papel por parte de TBCA actuando tanto como reservorio de β -tubulina como aumentando la tasa de dimerización de tubulina. Mediante el silenciamiento de TBCA *in vivo* usando un siRNA en dos líneas celulares de mamífero HeLa y MCF-7 se ha visto que el gen de TBCA es esencial para la viabilidad de las células de mamífero y que la inhibición de la expresión conlleva una parada del ciclo celular en G1 (Nolasco y cols., 2005).

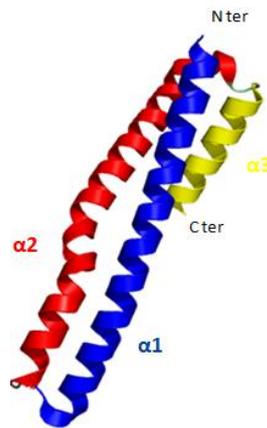


Figura 9. Estructura tridimensional de TBCA humano (Guasch y cols, 2002).

La estructura de TBCA humano ha sido obtenida a una resolución de 1,7 Å, monómero con forma de varilla, constituido por tres hélices α (Guasch y cols., 2002), (Figura 9).

3.2 Arl2

Se trata de una proteína Arl (*ARF-like protein*), que pertenece a la familia de ARFs (*ADP Ribosylation Factors*, Kahn y cols, 2005), aunque aparentemente no es modificado por miristoilación en su N-terminal, tal y como ocurre con los ARFs. El ortólogo de Arl2 en *S. cerevisiae* se denomina Cin4p y el de *S. pombe*, Alp41.

Arl2 no es un cofactor del plegamiento de tubulina propiamente dicho pero está directamente implicado en el proceso de dimerización de tubulina. El gen humano se localiza en el cromosoma 11 (11q13) y codifica para una proteína de 184 aminoácidos de la que, hasta el momento, sólo se ha descrito una isoforma.

3.3 Cofactor B

El cofactor B del plegamiento de tubulina, también llamado CoB, CKAP1 o TBCB, forma parte de la ruta de plegamiento postchaperonina de α -tubulina (Tian y cols., 1997). En humanos existe un único gen localizado en el cromosoma 19, en la posición 19q13.11-q13.12. Tiene un tamaño de 10,5 kb y contiene 6 exones. TBCB representa a una familia de proteínas de unos 244 aminoácidos con una masa molecular de unos 27 kDa.

Esta proteína interacciona con α -tubulina una vez terminada su interacción con CCT o tras interactuar con TBCE.

Todos los homólogos de TBCB estudiados hasta el momento poseen tres dominios diferenciados. Un dominio N-terminal caracterizado como dominio UBL (*Ubiquitin like domain*), un dominio central coiled-coil y un dominio C-terminal CAP-Gly. La estructura de

este dominio ha sido resuelta en TBCB de *C. elegans* con una resolución de 2,5 Å, confirmando la presencia de un barril- β como parte central del dominio.

3.4 Cofactor C

El cofactor C, también denominado CoC o TBCC (*Tubulin cofactor C*), dentro del complicado proceso de dimerización de tubulina, es la proteína encargada de liberar los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina competentes para incorporarse al microtúbulo, a partir del complejo C300 formado por α -tubulina, TBCE, β -tubulina y TBCD. El cofactor C posee actividad GTP-asa (*GTPase activating protein*), esto es, induce la hidrólisis del GTP unido a β -tubulina por parte de esta última.

Su único gen en humanos está localizado en el cromosoma 6 (6p12.1) y contiene únicamente un exón.

TBCC está compuesto por un dominio N-terminal que posee una similitud estructural con una repetición de espectrina, y un dominio C-terminal que tiene similitud significativa con un dominio CAP implicado en la unión a actina,

3.5 Cofactor D

El cofactor D, CoD o TBCD (*Tubulin cofactor D*), interacciona directamente con β -tubulina y secuestra monómeros de β -tubulina *in vitro* e *in vivo* para formar el complejo TBCD/ β -tubulina (Tian y cols, 1997). El gen humano se localiza en el cromosoma 17 (17q25.3).

Recientemente se ha demostrado que TBCD es una proteína centrosómica y que cuando se sobreexpresa se produce la pérdida del anclaje del γ -TURC (Cunningham y Kahn, 2008). Además, se ha descubierto una nueva localización y función de TBCD, pues esta proteína se concentra en el centriolo hijo y procentriolos, así como en los *midbodies* de las células en división, se piensa que lleva a cabo una importante función tras la mitosis en la organización del huso mitótico y en la abscisión de la célula (Fanarraga y cols, 2010).

3.6 Cofactor E

El cofactor E del plegamiento de tubulina es también denominado CoE o TBCE (*Tubulin cofactor E*). Su único gen en humanos está localizado en el cromosoma 1 (1q42.3) y contiene 17 exones, pudiendo dar lugar a dos isoformas diferentes. TBCE representa a una familia de proteínas de unos 527 aminoácidos y una masa molecular aproximada de 60 kDa.



Figura 10. Esquema del TBCE en el que se muestran los dominios de la proteína

TBCE está compuesto por tres dominios (figura 10). El dominio CAP-Gly se encuentra en su zona N-terminal y parece estar relacionado con la unión a α -tubulina (Radcliffe y cols., 1999) y el dominio UBL se sitúa en su zona C-terminal. Hasta el momento no posee una función definida clara, aunque podría servir para interacción proteína-proteína y más concretamente con tubulina o TBCB.

El dominio situado en la zona intermedia de la proteína es un LRR o dominio de repeticiones ricas en leucinas. Estructuralmente es un dominio no globular que aparece en varias proteínas con funciones bien distintas, como el inhibidor de la ribonucleasa (Kobe y Deisenhofer, 1994) aunque la función principal de estos dominios ricos en leucinas parece ser la de proporcionar un marco estructural versátil para la formación de las interacciones proteína-proteína (Kobe y Kajava, 2001), en parte quizás con TBCD.

TBCE se une a α -tubulina tras su interacción con CCT, asociándola posteriormente a estos complejos C300 (Tian y cols, 1996) y su sobreexpresión en células HeLa conlleva la completa destrucción de los microtúbulos celulares, al igual que ocurre con TBCD (Bhamidipati y cols, 2000).

In vitro TBCE, purificado utilizando células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes (Kortazar y cols, 2006), es capaz de disociar el heterodímero de tubulina *in vitro*. Se ha demostrado que TBCB y TBCE interaccionan entre sí para disociar eficientemente el heterodímero de tubulina (Kortazar y cols, 2007),

Se han encontrado homólogos del TBCE en diferentes especies. La homología entre mamíferos es de alrededor de un 85%, entre humanos y *A. thaliana* es de un 30%, al igual que entre humanos y levaduras.

TBCE es una proteína ubicua que se encuentra en todos los tejidos pero tiene una expresión mayoritaria en testículo, cerebro y pulmón. Por lo que TBCE está mayoritariamente expresado en tejidos cuyas células contienen microtúbulos con propiedades dinámicas muy especializadas, como cerebro y testículo o células con abundantes cilios.

4. Enfermedades relacionadas con los cofactores

Como ya se ha dicho anteriormente los cofactores intervienen en el plegamiento de la tubulina, que es el componente principal de los microtúbulos que son estructuras cruciales en mitosis, mantenimiento de la estructura celular, etc. Puesto que los microtúbulos son estructuras esenciales para la vida las mutaciones que causan la pérdida de función de los cofactores. Así pues, son pocas las mutaciones viables detectadas en los genes de estos cofactores resultando en enfermedades poco frecuentes letales o muy graves (Tabla 1). La gran

mayoría de estas enfermedades o síndromes están asociados a alteraciones que producen por regla general una desorganización de los microtúbulos cuyos síntomas más evidentes son:

- Alteraciones mitóticas.
- Deficiencias en la migración neuronal y/o en la axonogénesis.
- Retraso del crecimiento y malformaciones óseas.
- Cerebros pequeños.
- Infertilidad tanto en varones (espermatogénesis alterada) como en hembras.
- Sordera y disquinesia ciliar.

Un ejemplo claro son las mutaciones en el gen de TBCE que resultan en los síndromes de **Kenny-Caffey** y **Sanjad-Sakati** (Parvari y cols., 2002). Estas mutaciones en homocigosis son compatibles con el desarrollo fetal aunque los afectados mueren muy jóvenes presentando una sintomatología generalizada con un componente predominantemente neurológico.

Concretamente el HRD o Síndrome de Sanjad-Sakati se produce cuando existe una delección de 4 aminoácidos en el dominio CAP-Gly de TBCE, recibiendo el nombre de **TBCE Δ 52-55**. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva que cursa con hipoparatiroidismo, retardo mental y dismorfismo facial. Si además, los pacientes presentan osteoporosis e infecciones bacterianas recurrentes, se denomina síndrome de Kenny-Caffey (Parvari y cols., 2002).

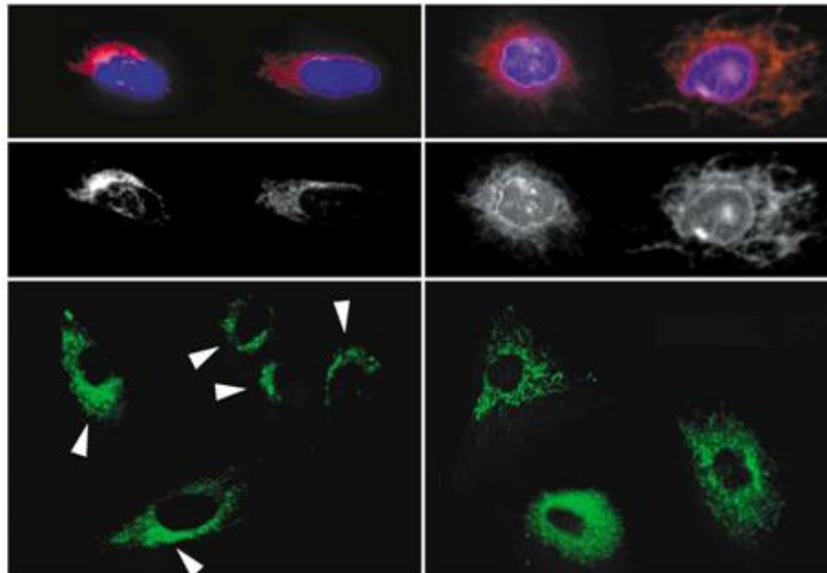


Figura 11. Localización subcelular del Aparato de Golgi y de los compartimentos endosomales. TBCE wt (a) y TBCE Δ 52 de 55 homocigotos (b) los fibroblastos dérmicos se tiñeron directamente con la Griffonia simplicifolia GC-específica lectina GS-II Alexa Fluor 488 conjugado (Molecular Probes) y los núcleos con DAPI. La tinción específica GC se compacta en las células control (c), pero están dispersos alrededor del núcleo y el citoplasma en las células enfermas (d). Endosomas tardíos positivos para Rab7 se visualizaron por inmunofluorescencia indirecta en el representante del control (e) y en los enfermos (f). (Parvari y cols., 2002).

El análisis de fibroblastos y células linfoblastoides de enfermos muestra una menor densidad de microtúbulos en la célula y alteraciones en la polaridad de los microtúbulos, lo que sugiere que el centrosoma puede estar afectado. Estudios de inmunofluorescencia y ultraestructura han mostrado alteraciones en orgánulos subcelulares que requieren de los microtúbulos para el tráfico a través de célula, tales como el Golgi o los endosomas tardíos. (Figura 11).

También se ha trabajado con modelos de ratones y se ha descubierto que una simple mutación en el último aminoácido de TBCE produce una neuropatía motora progresiva que acaba con su muerte a las 4–6 semanas después de nacer. Parece que éste último aminoácido, un triptófano, estaría implicado en la estabilidad de la proteína que conllevaría una disminución en el número de microtúbulos en los axones motores de la neurona del ratón. (Fig. 12, Bommel y cols., 2002; Martin y cols., 2002).

En las células de los ratones enfermos se observan axones más cortos y un reducido número de microtúbulos, pero si se sobreexpresa la proteína transfectando el cDNA de TBCE wt se recupera el fenotipo normal. La proteína mutada es aún más sensible a proteólisis que la proteína wt, consistente con una conformación diferente. En vista de estos resultados, TBCE estaría implicado en el mantenimiento de la red microtubular en neuronas y resultaría ser crítico para el mantenimiento de los microtúbulos en los axones de las neuronas motoras del ratón (Bommel y cols, 2002; Martin y cols, 2002).

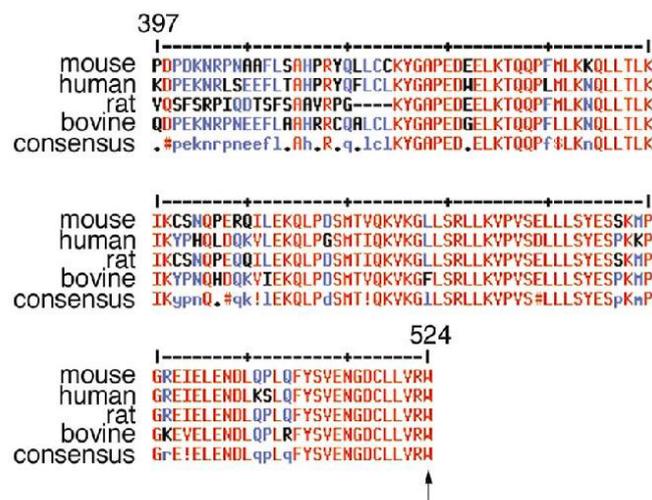


Figura 12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de TBCE de diferentes organismos. La flecha indica el aminoácido (W) mutado en la neuropatía en ratones. En azul se indican las sustituciones conservadas o semiconservadas, en rojo los residuos idénticos y en negro las sustituciones no conservadas (Bommel y cols, 2002).

Los defectos en la degradación de TBCB causados por mutaciones en gigaxonina, que controla la degradación de TBCB via ubiquitina-proteasoma, producen una acumulación de TBCB y una pérdida de microtúbulos en neuronas originando la Neuropatía

Axonal Gigante (GAN) (Wang y cols, 2005). Esta enfermedad es una neuropatía temprana periférica mixta y progresiva que cursa con retraso mental, ataxia, etc.

Otro cofactor que a nivel genético parece estar implicado en problemas neurológicos es TBCD, recientemente ligado al Síndrome de Gilles de la Tourette (Paschou y cols, 2004). Se trata de una enfermedad neuro-psiquiátrica, diagnosticada por la existencia de tics motores crónicos que, al igual que ocurre con otros trastornos disociativos como la esquizofrenia (Kamiya y cols, 2005), pensamos que podría ser el resultado de cambios sutiles, provocados por diversas mutaciones, en los patrones de migración celular durante la neurogénesis.

Aunque ARL2 no es propiamente un cofactor del plegamiento de la tubulina juega un papel fundamental en la regulación de la actividad de TBCD. ARL2 podría estar implicado en el Síndrome de Silver (SS) (Warner y cols., 2004), una forma complicada de parálisis espástica hereditaria, puesto que mapea con un locus que se ha demostrado que está ligado a una de las formas de este síndrome.

| COFACTOR | ENFERMEDAD | REFERENCIA |
|----------|---|---|
| TBCA | Parkinson. Aumento de TBCA que implica una reorganización estructural de la sustancia negra en esta enfermedad. | Werner y cols., 2008 |
| TBCB | Neuropatía Axonal Gigante (GAN). Acumulación de TBCB con pérdida de microtúbulos. Retraso mental, ataxia... | Wang y cols, 2005 |
| TBCB | Sobreexpresión y fosforilación en los tumores de mama. | Vadlamudi y cols., 2005 |
| TBCB | Lisencefallia Pachygyria. TBCE no interacciona con tubulina a causa de una mutación en α -tubulina Anomalías en los pliegues del cerebro. | Tian y cols., 2008 |
| TBCC | Ritinitis pigmentosa. Mutaciones en el N-terminal de RP2, homólogo de TBCC. | Evans y cols., 2010 |
| TBCD | Síndrome de Gilles de la Tourette. Enfermedad neuro-psiquiátrica, con la existencia de tics motores crónicos debido a cambios sutiles en los patrones de migración celular durante la neurogénesis provocados por diversas mutaciones. | Paschou y cols., 2004 |
| TBCD | Psoriasis. Enfermedad crónica inflamatoria de la piel. Es posible que una mutación o polimorfismo en TBCD pueda alterar la integridad de los queratinocitos. | Hwu y cols., 2005 |
| TBCE | Síndrome de Sanjad-Sakati (HRD). Delección 4 aminoácidos. Hipoparatiroidismo, retraso mental, dimorfismo facial... | Pavary y cols., 2002 |
| TBCE | Síndrome de Kenny-Caffey. Delección 4 aminoácidos. HRD con infecciones bacteriana recurrentes. | Pavary y cols., 2002 |
| TBCE | Neuropatía motora progresiva en ratón (PMN). Mutación en el último aminoácido (W). Disminución microtúbulos de los axones motores de la neuronas | Bommel y cols., 2002 Martin y cols. 2002 |
| ARL2 | Síndrome de Silver (SS). Parálisis espástica hereditaria. | Warner y cols., 2004 |
| ARL2 | Cáncer de mama. Aumento del crecimiento y la agresividad de este cáncer mediante la vía PP2A. Mayor potencial metastático en ratones SCID. | Beghin y cols., 2009 |

Tabla 1. Resumen de las distintas enfermedades relacionadas con los cofactores del plegamiento de la tubulina.

II. OJETIVOS

Numerosas estudios biofísicos y bioquímicos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que no existen diferencias cualitativas entre TBCE silvestre, a partir de ahora wt (del inglés *Wild type*) y TBCE $\Delta 52-55$. Sin embargo, estudios recientes han dado como resultado que hay diferencias cuantitativas en su capacidad de despolimerizar microtúbulos. Llevándonos a concluir que la proteína mutante TBCE $\Delta 52-55$ es funcional y que la enfermedad que causa, Síndrome de Kenny-Caffey, podría ser el resultado de un aumento en la actividad de despolimerización debido a un mayor tiempo de actuación de dicha proteína TBCE $\Delta 52-55$.

Por lo que los objetivos que se plantean en este trabajo de investigación y que forman parte de mi Tesis Doctoral son:

- Puesta a punto de técnicas de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos policlonales anti-TBCE obtenidos previamente en nuestro laboratorio
- Determinación de la vida media tanto de TBCE wt como de TBCE $\Delta 52-55$.
- Observación *in vivo* de TBCE mediante “time-lapse” video-microscopía.
- Determinación del tiempo mínimo al cual el TBCE comienza a despolimerizar microtúbulos en las células.

III. METODOLOGÍA

1. Soluciones

Los tampones concretos de cada técnica se especifican en el apartado correspondiente.

- PBS: NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM. Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar en autoclave.

- TBS: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM.

- TBST: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%.

2. Tampones y técnicas de laboratorio

2.1 Minilizados claros

Un cultivo de 1 ml de LB crecido hasta fase estacionaria se centrifugó 5 minutos a 12.000 r.p.m. (Eppendorf). El precipitado celular se resuspendió en 15 µl de una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 con sacarosa al 25%. A continuación se añadieron 10 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se añadieron 100 µl de la mezcla lítica Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Triton X-100 5%, EDTA 50 mM, sacarosa 5% y se incubó a temperatura ambiente hasta obtener una solución de consistencia mucosa.

Este lisado claro se calentó a 100°C durante 3 minutos y se recogió el sobrenadante obtenido después de centrifugar el lisado durante 15 minutos a 14.000 r.p.m. (Eppendorf). Al sobrenadante se le añadió 1/10 de su volumen de AcK (acetato potásico) 3 M pH 4,8 e igual volumen de isopropanol para precipitar el DNA plasmídico. Se incubó 1 hora a -20° C o 15 minutos a -70° C, se centrifugó 15 minutos a 14.000 r.p.m. (Eppendorf) y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El DNA se secó y se resuspendió en 48 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, y 2 µl de RNasa (10 mg/ml en Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM y NaCl 15 mM después de calentar a 100° C durante 15 minutos) y se incubó 30 minutos a 37° C.

Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico más puro se utilizaron los “kit” QIAprep Plasmid Mini Kit (Qiagen).

2.2 Tratamiento con cicloheximida

La Cicloheximida es un antibiótico obtenido del *Streptomyces griseus*, que actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional.

Es utilizada en una concentración de 30µg/ml diluida en etanol. Se crecieron tres cultivos paralelos de células HEK 293 en placas de 100mm. Se añade el inhibidor de biosíntesis, cicloheximida, a una concentración final de 30 µg/ml. Después se recogen igual número de

células a las 0,24 y 36 horas. Se lisan las células en un buffer en tampón de ruptura hipoosmótico (Mes 0,5mM pH 6,7, EDTA 2mM, aprotinina 2 μ M, PMSF 1mM, benzamidina 100 μ M, leupeptina 10 μ M, pepstatina 1 μ M y DTT 1mM). Después se utilizaron dos kits comerciales de limpieza (PlusOne Sample Grinding Kit y 2-D Clean-Up Kit, GE Healthcare®) que se utilizan combinadamente para precipitar cuantitativamente las proteínas de la muestra, dejando atrás sustancias interferentes, tales como detergentes, sales, lípidos, fenoles y ácidos nucleicos. Los extractos proteicos se cuantifican como se describe abajo, para luego ser analizados por Western Blot.

2.3 Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método Bradford. Se prepara una recta patrón con seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), entre 0 y 25 μ g/ml, disuelta en el mismo tampón en el que se encuentra la proteína problema. Cada tubo con patrón o muestra se completa hasta 800 μ l con agua y se le añaden 200 μ l del reactivo “Bio-Rad Protein Assay” (BioRad). Se agitan los tubos y se espera 15 minutos antes de medir la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro DU640 Spectrophotometer (Beckman).

2.4 Electroforesis de proteínas

Se utilizaron geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) entre el 7,5 y el 12%, en un tampón Tris-glicina compuesto por Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM y SDS 0,1%.

Se utilizó tampón de carga SDS 2X para cargar las muestras en el gel. El tampón de carga SDS 2X está compuesto por Tris-HCl 100mM pH 6,8, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0,2%, Glicerol 20%, y β -mercaptoetanol 200mM. Los marcadores de pesos moleculares utilizados fueron “SDS-PAGE Standards, Low Range” (Bio-Rad) y “Prestained Protein Marker” (New England Biolabs).

También se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes entre el 4,5 y el 7% (Zabala y Cowan, 1992). Esta electroforesis se realizó en tampón MES 100mM pH 6,75, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM. Cuando la muestra contenía tubulina se añadió GTP a concentración final 0,1 mM.

Para cargar las muestras en los geles no desnaturizantes se empleó un tampón de carga nativo compuesto por MES 50mM pH 6,7, Sacarosa 20% y Azul de bromofenol 0,2%. La electroforesis en condiciones nativas se realizó a 80V durante 2 horas.

2.5 Immunoblotting

La electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida nativos o de SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa “Hybond ECL” (GE Healthcare®) se realizó en un sistema

“Mini Trans-Blot Cell” (Bio-Rad) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 200mM con 20% de metanol) durante 45 minutos a 370mA. En el caso de geles no desnaturalizantes se omitió el metanol.

Tras la electrotransferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (Sigma) al 0,2% en una solución de ácido tricloacético al 3%. El exceso de colorante se eliminó enjuagando las membranas con agua Milli-Q. Antes de llevar a cabo el bloqueo de las membranas se lavaron repetidas veces con TBST (Tris-HCl 50mM, pH 7,8, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%). A continuación se trataron con la solución de bloqueo durante al menos una hora a temperatura ambiente.

Tanto para bloquear las membranas como para diluir los anticuerpos primarios y secundarios se utilizó TBST con leche desnatada en polvo al 3%. Después de bloquear las membranas los filtros se incubaron con el anticuerpo primario diluido durante al menos una hora a temperatura ambiente, se lavaron varias veces con TBST y se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) 70 % diluido. La proteína unida al anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia utilizando el “Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus”(Perkin Elmer) y exponiendo las membranas con “Hyperfilm-MP” (GE Healthcare) entre 10 segundos y varios minutos.

Se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti- α -tubulina y anti- β -tubulina (GE Healthcare, Sigma) a las diluciones recomendadas y policlonales de conejo anti-TBCE producidos recientemente en nuestro laboratorio. Los anticuerpos secundarios de ratón y conejo conjugados con peroxidasa (GE Healthcare®, Molecular Probes) se utilizaron a las diluciones 1:2000 y 1:4000 respectivamente.

2.5.1 Reutilización de membranas de nitrocelulosa para reblotear.

En primer lugar se tiene que lavar bien la membrana con TBST 30 minutos y aclarar con agua élix. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente con buffer Glicina 0,2 M pH 2,8, EGTA1 mM y SDS 0,1%. A continuación se vuelve a aclarar bien la membrana con agua élix y se lava de nuevo con TBST. Ahora ya se puede volver a incubar directamente la membrana con los anticuerpos o bien bloquear de nuevo y después incubar.

2.6 Transcripción y traducción *in vitro*

La transcripción y traducción *in vitro* se realizó en lisados de reticulocitos de conejo (TNT Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) (Pelham y Jackson, 1976) en presencia de ^{35}S -metionina (1.000 Ci/mmol, Harman Analytic).

Dependiendo del ensayo, se realizaron traducciones de 25 o 50 o 100 μ l. La mezcla de traducción se incubó a 30°C y las reacciones se pararon en los tiempos indicados en cada caso.

2.7 Inmunoprecipitación con Dynabeads proteína A

Mediante la técnica de inmunoprecipitación es posible atrapar, empleando anticuerpos específicos, una proteína determinada y a sus partners a partir de una mezcla compleja de proteínas. (Figura 13).

Se usaron bolas magnéticas (Dynabeads®, Invitrogen) con proteína A para capturar los complejos inmunes y separarlos del sobrenadante. El protocolo puede dividirse en tres pasos:

A. Preparación de la muestra: el extracto proteico es mezclado con distintos tampones de lisis.

B. Inmunoprecipitación: El extracto proteico es incubado con el anticuerpo con el fin de formar el complejo antígeno-anticuerpo a diferentes tiempos y temperaturas. El complejo es capturado con la adición de 25 ó 50 μ l a la muestra de Dynabeads con proteína A, seguido de separación magnética.

C. Eluición: Tras el último lavado se aspira el sobrenadante y se mezcla el precipitado con 25 μ l de **tampón de carga**. Se calientan las muestras a 70° C durante 10 minutos. Los tubos son colocados en la gradilla magnética y se eliminan las bolas. El sobrenadante es cargado en un gel SDS-PAGE.

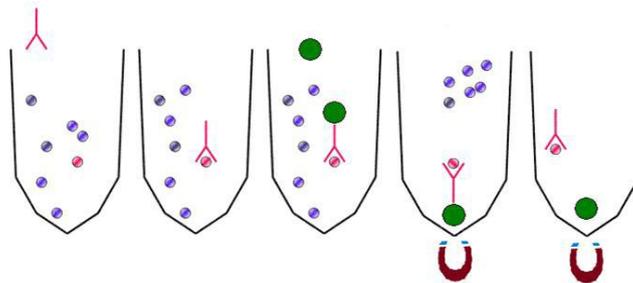


Figura 13. Esquema de los pasos en los que se divide la inmunoprecipitación

El estudio se comparó con los siguientes tampones de lisis:

- RIPA: Tris 50mM, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Deoxycolato, 0,1 %SDS
- NP-40: Tris 50mM, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40
- Triton-X-100

2.8 Tinción y fluorografía

Los geles de agarosa y poliacrilamida de DNA se tiñeron con bromuro de etidio. Los geles de poliacrilamida de proteínas, cuando fue necesario, se tiñeron con una solución de

“Coomassie Brilliant Blue R250” (MERCK) al 0,2% en 50% de metanol y 7% de ácido acético glacial durante 30 minutos. Después se destiñeron en una solución que contenía 50% de metanol y 7% de ácido acético glacial y posteriormente en una solución 5% de metanol y 7% de ácido acético glacial. Cuando la cantidad de proteína no fue suficiente para ser detectada con azul de Coomassie se utilizó tinción con plata (Silver Stain, Bio-Rad).

Los geles de poliacrilamida con proteínas marcadas se trataron de la misma manera y una vez desteñidos, se sumergieron en ácido salicílico 0,5M (Sigma), utilizado como agente fluorográfico, durante 15 minutos.

Estos geles se secaron sobre papel Whatman 3MM o Whatman número 1 a 80°C durante 40 minutos los de porcentaje de acrilamida inferior al 14% y a 60°C durante 2 horas los de porcentaje superior al 14%, en un secador Gel Dryer 583 (BioRad) conectado a una bomba de vacío.

Los geles con proteínas marcadas se autorradiografiaron utilizando películas Hyperfilm-MP (GE- Healthcare®) y las bandas radiactivas se cuantificaron utilizando un Molecular Imager System (Bio-Rad).

2.9 Marcaje metabólico

El marcaje metabólico se lleva a cabo mediante un experimento de **pulso-caza**. La proteína de interés es metabólicamente marcada en una placa con células creciendo con un precursor radiactivo, [³⁵S]-metionina, (**Pulso**). Después se añade la metionina fría al cultivo celular para detener la incorporación radiactiva de proteínas (**Caza**). Así, se preparan dos placas de 100mm con 2x10⁶ células HeLa y se transfectan con el plásmido que contiene en gen para TBCE, dejándolo incubar unas 12 horas a 37°C. Pasado este tiempo se retira el medio y se tripsiniza y se hacen alícuotas iguales que se pasan a cinco nuevas placas de 100mm. Se deja incubar nuevamente 5 horas. Se retira el medio y se lavan las células tres veces con 5ml de PBS para a continuación añadirle 1ml de medio DMEM libre de metionina con 10% de suero fetal bovino dejándolo incubar 1h a 37°C. Pasado este tiempo se le añade a cada placa 100μCi de [³⁵S]-metionina incubando 30 minutos. A continuación se lava varias veces con 5ml de PBS. En este momento se añaden 3ml de medio DMEM, con 10% suero fetal bovino y 3mM de L-metionina y partir de aquí contar los tiempos requeridos (0, 2, 4, 8, 16) lavando con PBS.

Una vez obtenido el pellet celular se lisa con 300μl de buffer RIPA (50mM Tris-HCL, pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato y 0,1% SDS) que contiene inhibidores de proteasas.

Se centrifugan las células a 14000 rpm, 10 minutos a 4°C. Tras lo cual se determina la concentración de la proteína mediante el método Bradford.

Para obtener la proteína específica es necesario llevar a cabo una inmunoprecipitación, que nos permite, mediante el uso de un anticuerpo específico para TBCE, seleccionarla de entre todas las demás.

2.10 Técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

2.10.1 Transfecciones

Diferentes vectores de expresión en eucariotas que contenía el cDNA del gen correspondiente se transfectaron en células HeLa mediante la utilización de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y/o X-tremeGene 6 (Roche) siguiendo las instrucciones de los proveedores.

2.10.2 Líneas celulares de mamíferos

Para la realización de nuestros estudios se han utilizado las líneas celulares HeLa y HEK293T:

-HeLa: Células humanas epiteliales cancerígenas provenientes de un adenocarcinoma de cuello de útero.

-HEK 293: Células humanas epiteliales de riñón

2.10.3 Anticuerpos y fluorocromos

Todos nuestros anticuerpos primarios policlonales fueron purificados por afinidad, siguiendo una modificación del protocolo de Lajoie-Mazenc (Lajoie-Mazenc y cols, 1994), para su empleo en inmunofluorescencia o Western Blot. Los anticuerpos primarios comerciales empleados son el anti α -tubulina B512 monoclonal de ratón (Sigma), y el anti tubulina acetilada monoclonal de ratón (Sigma).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488, Cy3 o Cy5, cabra anti IgG de ratón conjugado con Alexa488 (Molecular Probes, Invitrogen), Cy3 o Alexa 647 y cabra anti IgG1 de ratón conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las combinaciones de anticuerpos secundarios fueron decididas para evitar posibles reacciones cruzadas. Para visualizar los núcleos se utilizó Hoechst 33258 o DAPI.

2.10.4 Células

Para la fijación de las células se empleó metanol frío o paraformaldehído al 4%. El paraformaldehído utilizado está al 16% (Electrón Microscopy Sciences) y para prepararlo a la concentración de uso se le añaden 100 μ l de PBS 10X a temperatura ambiente y 650 μ l de agua Milli-Q a 250 μ l de paraformaldehído al 16%.

A continuación se añaden 100µl a cada cubre y se deja 15 minutos. Una vez fijadas las células fueron permeabilizadas en metanol frío seguidas de Triton X-100 al 0,1% en PBS (NaCl 136mM, KCl 2,6mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,7mM). Para almacenar los cubres fijados se dejan en una solución de PBS+0,1% azida sódica.

2.10.5 Microscopía

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia convencional y microscopía confocal empleando un microscopio Nikon A1R equipado una bancada de láseres de las líneas 405, 488, 514, 561, 633, además de dos sistemas de detección, por filtros en 4 canales y espectral de 32 canales con 3 rejillas de difracción diferentes.

IV. RESULTADOS

1. Estudio de TBCE *in vivo*

1.1 TBCE despolimeriza microtúbulos *in vivo* a las 6 horas post-transfección

Esta proteína tiene una gran actividad despolimerizadora de microtúbulos ya que se observó que la sobreexpresión de la proteína en células humanas tan pronto como a las 6 horas post-transfección genera una gran pérdida de los microtúbulos en las células HeLa transfectadas. El cDNA de TBCE se clonó en el vector de expresión eucariótico pcDNA3 y éste plásmido se transfectó en células Hela y se examinó a las 6 horas post-transfección. (Figura 14).

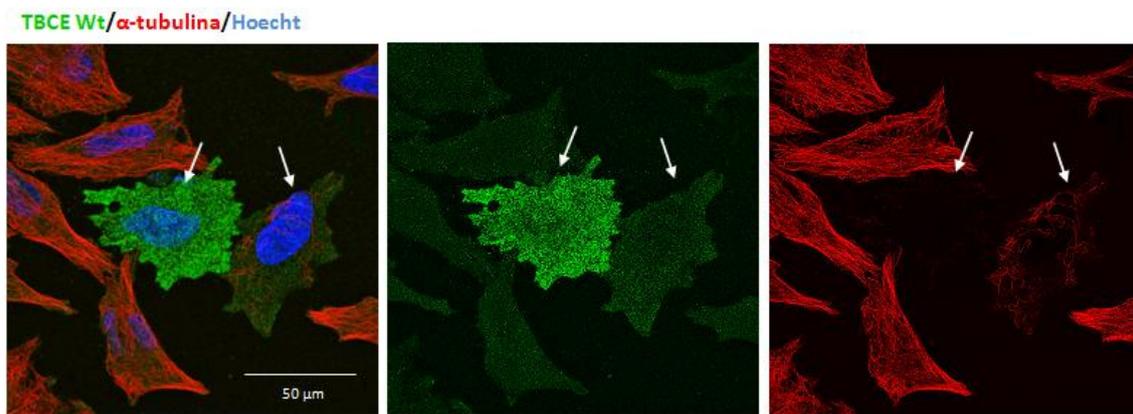


Figura 14. Transfección de TBCE en células HeLa. Imagen de microscopía confocal a las 6 horas de la transfección. TBCE es detectado con un anticuerpo primario anti-TBCE purificado por afinidad (en verde) Los microtúbulos se marcan con un anticuerpo frente a α -tubulina reconocido por el anticuerpo primario B512 (en rojo). Las flechas indican diferentes células que sobreexpresan TBCE y la consiguiente pérdida de microtúbulos, ya que TBCE induce despolimerización, detalle de la completa desaparición de los microtúbulos en la célula central.

En un futuro próximo llevaremos a cabo experimentos y estudios *in vivo* con los cofactores del plegamiento de la tubulina mediante “time-lapse” video microscopía.

Para ello es muy aconsejable tener los cDNAs de TBCE clonados como proteínas de fusión tipo GFP, YFP, CFP, etc en vectores fluorescentes para posibilitar el seguimiento *in-vivo* en la célula. Tras ello comprobamos la actividad de las proteínas recombinantes clonadas en los vectores fluorescentes de expresión en eucariotas mediante transfección transitoria.

Así transfectamos YFP:TBCE en células HeLa. Observamos que al igual que sucede con la proteína silvestre su sobreexpresión a las 6 horas también produce una pérdida de los microtúbulos en las células que expresan YFP:TBCE. (Figura 14)

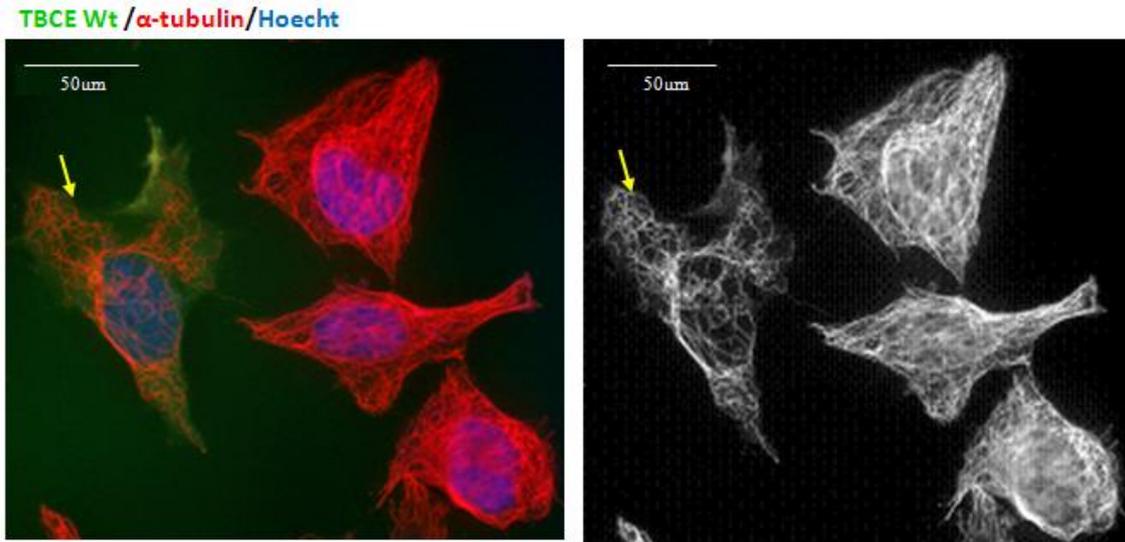


Figura 15. Transfección transitoria de YFP:TBCE en células HeLa. Imagen de microscopía confocal a las 6 horas de la transfección. TBCE es expresado junto con el vector fluorescente YFP. Los microtúbulos se marcan con un anticuerpo frente a α -tubulina reconocido por el anticuerpo primario B512 (foto derecha). La flecha indica una célula que ha perdido la totalidad de sus microtúbulos por lo que YFP:TBCE también induce despolimerización.

1.2 Localización de TBCE en neuronas

TBCE es una proteína ubicua que se encuentra en todos los tejidos, pero es mayoritaria en cerebro, testículo y pulmón, es decir, en tejidos cuyas células contienen microtúbulos con propiedades dinámicas únicas, como cerebro y testículo o células con abundantes cilios o flagelos, (figura 16).

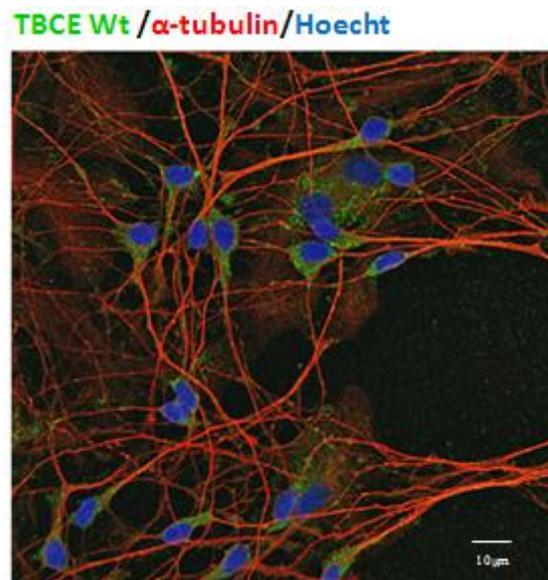


Figura 16. Localización de TBCE endógeno en neuronas mediante microscopía confocal. Cultivo primario de cerebelo de ratón postnatal. Immunolocalización de TBCE mediante el anticuerpo primario anti-TBCE producido y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (verde). La α -tubulina es reconocida por el anticuerpo monoclonal primario B512 y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (rojo).

1.3 Distribución de TBCE en el ciclo celular

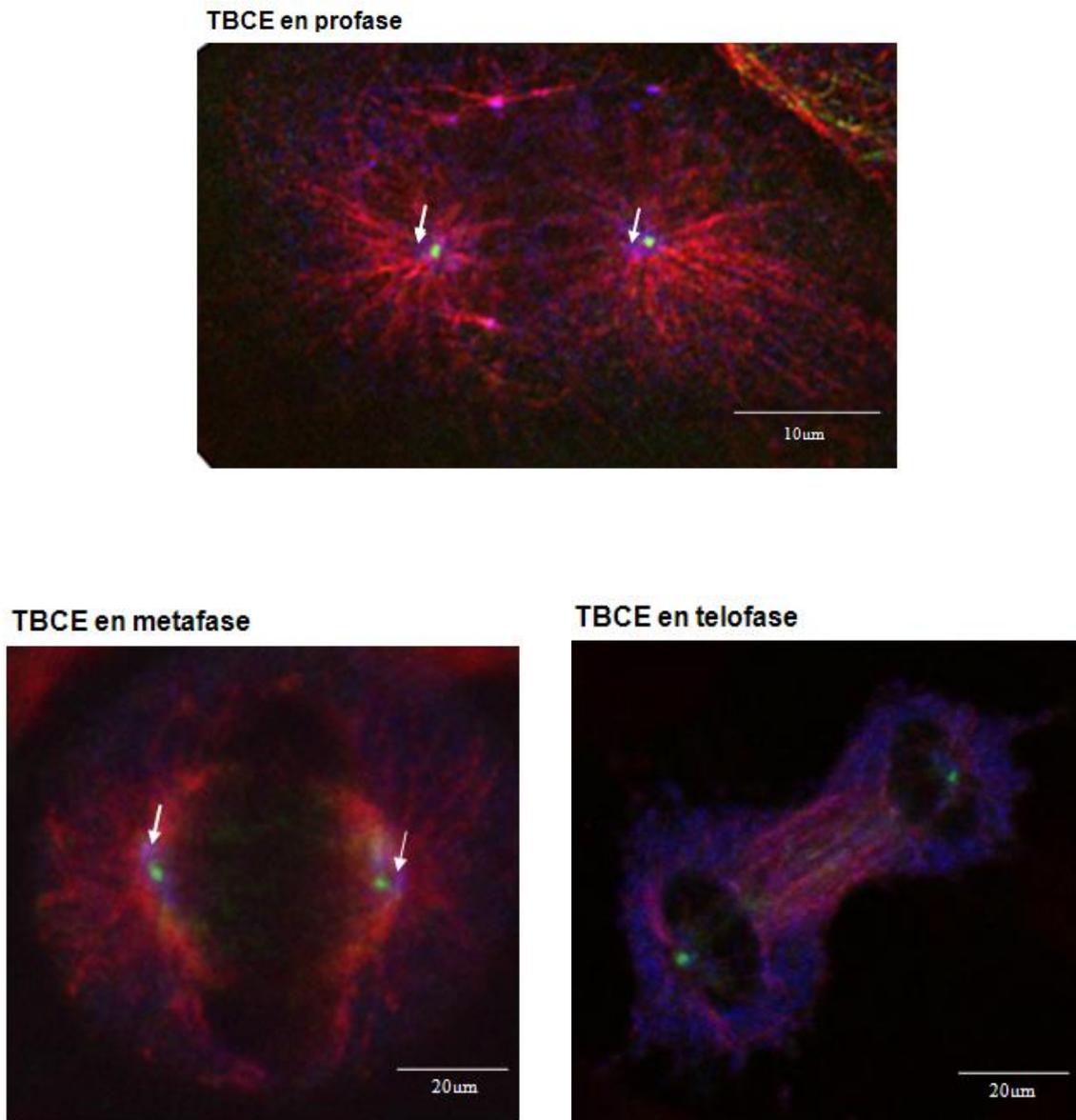


Figura 17. Localización de TBCE endógeno en las distintas fases del ciclo celular de células HeLa (flechas). Immunolocalización de TBCE mediante el anticuerpo primario anti-TBCE producido y un anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (azul). La α -tubulina es reconocida por el anticuerpo monoclonal primario B512 y un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (rojo). El centrosoma está marcado mediante tubulina acetilada (verde).

Un punto interesante en el estudio de esta proteína es su localización durante la división celular, (figura 17). Se puede observar que tanto en profase como en metafase como el TBCE se concentra alrededor de los centrosomas (flechas). Ya en telofase, no se encuentra en un sitio concreto sino disminuido de forma más homogénea por el citoplasma celular.

2. Cuantificación de la vida media

2.1 Bloqueo de la síntesis proteica con cicloheximida

Tras añadir 30 μ l de cicloheximida a cada placa de 100mm cultivo celular crecido con células HEK, se cuantificó la expresión de TBCE a las 0, 24 y 36 horas. Tras la lisis celular se realizó un western con un anticuerpo anti-TBCE purificado por afinidad en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos revelan que la señal de TBCE disminuye a lo largo de las 36 horas (figura 18). TBCE decae inducido por el tratamiento con cicloheximida. Se obtiene una única banda de unos 60 kDa correspondiente a TBCE wt que muestra una disminución progresiva a lo largo del tiempo.



Figura 18. Western Blot de extractos de proteína total a distintas horas. Los extractos fueron normalizados y ajustados para cargar la misma cantidad de proteínas (80 mg) mediante cuantificación de las proteínas totales por el método de Bradford (ver Materiales y métodos). Gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida.

Tras obtener este resultado con el western blot, se procedió a la medición de la intensidad de las distintas señales. Para ello la imagen fue analizada mediante el programa ImageJ, que le da un valor arbitrario a cada señal. Después se realice un gráfico en el que se enfrenta este valor arbitrario con su correspondiente valor de tiempo. (Figura 19).

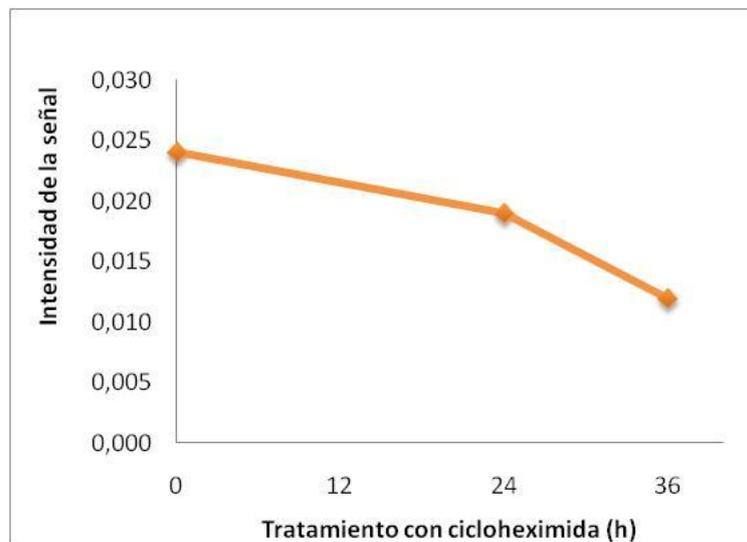


Figura 19. Resultado de la cuantificación de la vida media de TBCE. En la gráfica de muestra la intensidad de cada señal expresada en cada momento del tratamiento con cicloheximida, 0, 24 y 36 horas.

A la vista de este gráfico, y teniendo en cuenta que la vida media de una proteína es el tiempo necesario para que el nivel de la proteína se reduzca en un 50% con respecto al inicio del tratamiento, si a tiempo cero el valor asignado es 0.024 la mitad será 0.012 lo que corresponde un valor de **36 horas**.

2.2 Marcaje metabólico

El marcaje metabólico se lleva a cabo mediante un experimento de **pulso-caza**. La proteína de interés es metabólicamente marcada en una placa con células creciendo con un precursor radiactivo, [³⁵S]-metionina, (**Pulso**). Después se añade la metionina fría al cultivo celular para detener la incorporación radiactiva de proteínas (**Caza**). De esta manera se detiene el marcaje radiactivo y se ve la progresiva disminución de la proteína, pudiendo analizar su vida media.

Dada la dificultad del experimento decidimos poner a punto las técnicas que se requieren en este experimento, para que, una vez optimizadas, podamos llevar a cabo el marcaje metabólico.

2.2.1 Traducción *in vitro*

Con el fin de optimizar las inmunoprecipitaciones y estudiar si los anticuerpos que disponíamos eran capaces o no de inmunoprecipitar a TBCE específicamente decidimos producir la proteína *in vitro*. Para ello se utilizó un kit comercial de células de reticulocitos y metionina radiactiva. Tras varios pasos realizados se obtiene la proteína deseada y marcada radiactivamente.

2.2.2 Inmunoprecipitación

Este paso es determinante para poder realizar el experimento. Con la proteína radiactiva podemos optimizar las condiciones apropiadas para las inmunoprecipitaciones, y con el fin de explorar todas las condiciones posibles para llegar a las más adecuadas decidimos probar decidimos tiempos (de 2 horas a toda la noche), temperaturas (4°C o temperatura ambiente), concentración salina, detergentes utilizados (buffer RIPA, Tritón-X-100 SDS y NP-40) y, cómo no, los dos anticuerpos que disponíamos. Para el control negativo utilizamos los correspondientes sueros preinmunes.

Las variables consideradas son: temperatura, tiempo, buffer de preparación de muestra y anticuerpo como control negativo.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es comprobar la afinidad de las bolas magnéticas por el anticuerpo, es decir, evitar que se unan inespecíficamente. Para ello se llevó a cabo un control más en las inmunoprecipitaciones con suero pre-inmune, es decir, el que se le

extrae al conejo antes de ser inmunizado y, como es lógico, no contiene anticuerpos frente al antígeno utilizado.

Decidimos usar el suero completo del conejo con el que se obtuvo el anticuerpo, debido a que el anticuerpo purificado por afinidad suele estar mucho más diluido y es menos estable.

Escogemos el método indirecto de la inmunoprecipitación consistente en exponer en contacto el antígeno con el anticuerpo y, un tiempo después, añadir las bolas magnéticas con proteína A. Después de este paso se eluye el complejo antígeno-anticuerpo-bolas con el buffer de carga y calentado 10 minutos a 70 °C. Posteriormente se carga el gel de SDS-PAGE. (Figura 20).

Utilizamos como control la proteína sintetizada por traducción *in vitro* diluida en agua y buffer de carga.

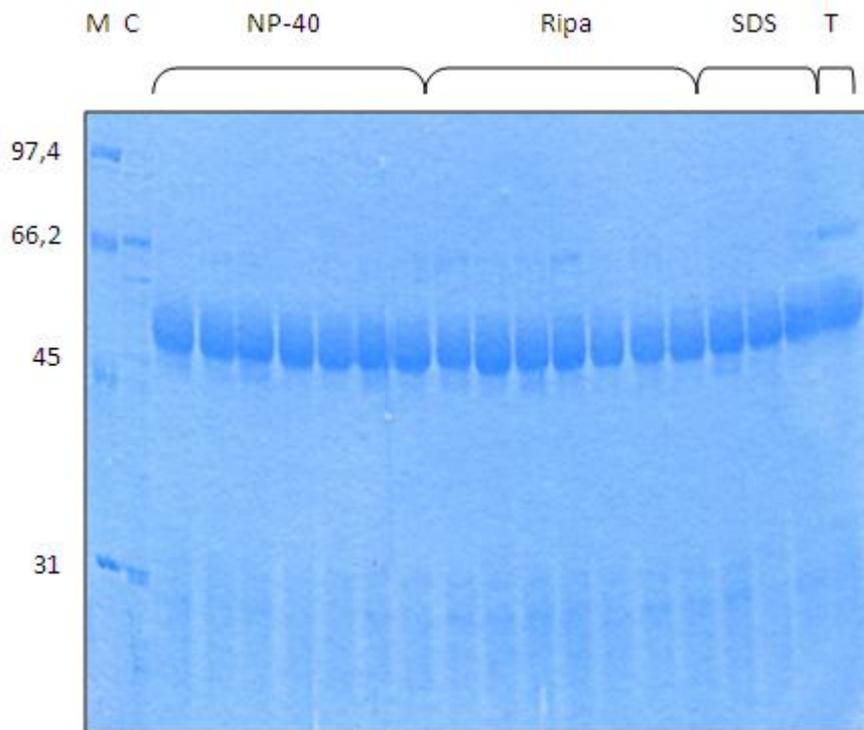


Figura 20. Reacciones con las distintas condiciones de inmunoprecipitación que se señalan en la figura fueron cargadas en un gel SDS-PAGE al 8,5% de acrilamida y teñido con azul de Coomassie. En la primera columna tenemos el marcador de tamaño (M), a continuación el control).

El gel muestra las bandas del marcador de tamaño expresado en kDa, y en las inmunoprecipitaciones la marca correspondiente a la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Tras obtener este gel se procede a su secado para llevar a cabo una fluorografía, (figura 21).

Las inmunoprecipitaciones fueron llevadas a cabo con cuatro tipo de buffer de muestra (NP-40, RIPA, SDS y Tritón-X-100), a distintas temperaturas y tiempos de incubación.

Como se puede observar en la figura 20, los resultados han sido satisfactorios, no observándose señal en las calles correspondientes al suero preinmune, por lo que queda de manifiesto que el anticuerpo anti-TBCE se une específicamente a las bolas magnéticas.

Con respecto a las señales obtenidas se puede observar cierta heterogeneidad, porque aunque en todos los parámetros se obtiene resultado, en unos casos es más evidente que en otros. Es el caso de los resultados obtenidos con los buffer SDS y Tritón, con una señal más difusa.

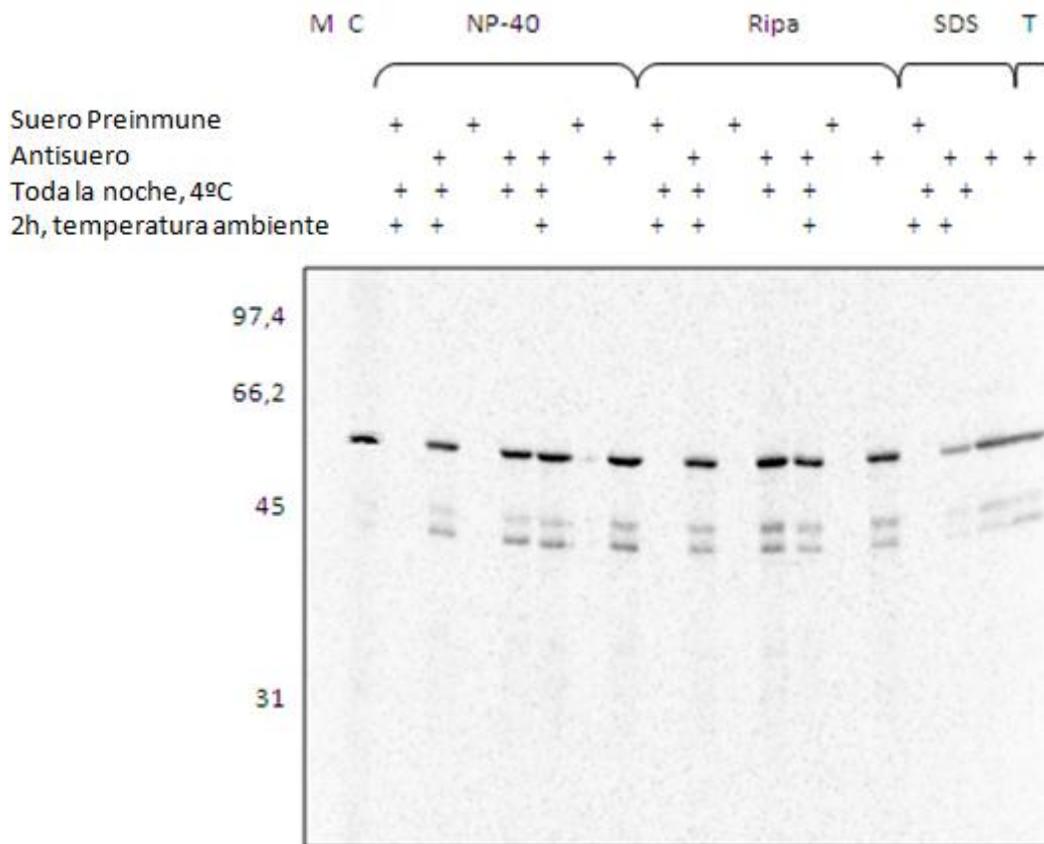


Figura 21. Fluorografía obtenida en el phosphorimager (Bio-Rad, Personal Molecular Imager FX) tras dejar el gel exponiendo durante 12 horas.

Así, queda de manifiesto que las mejores señales corresponden al buffer RIPA, incubado toda la noche a 4°C con el suero inmune.

Una vez hemos optimizado las condiciones de la inmunoprecipitación nos disponemos a realizar los experimentos de marcaje metabólico (pulso-caza) en los próximos meses para así determinar si existe o no alguna diferencia entre la vida media de TBCE wt y TBCE Δ52-55.

V. DISCUSIÓN

Como es sabido el citoesqueleto juega un papel fundamental en los diferentes procesos relacionados con el desarrollo embrionario y mantenimiento celular en general.

A lo largo de éstos últimos años en nuestro grupo de investigación se intenta entender los mecanismos que regulan la dinámica microtubular. Los cofactores del plegamiento de la tubulina son parte fundamental de ésta dinámica ya que participan tanto en la dimerización de la tubulina como en la disociación facilitando la despolimerización de microtúbulos. Los cofactores del plegamiento de la tubulina como TBCB o TBCE podrían jugar un papel muy importante en la dinámica microtubular, controlando la densidad microtubular, la longitud de los microtúbulo, etc.

Ambas proteínas colaboran en la disociación de tubulina y TBCB aumenta la capacidad de despolimerizar microtúbulos de TBCE (Kortazar y cols, 2007), pero en cambio no se ha detectado una expresión notable de TBCE en células de la microglía por lo que, sin descartar a TBCE, es posible que TBCB pueda colaborar con otra proteína para regular la dinámica microtubular en éste tipo de células de la microglía ameboides activadas. Un posible candidato podría ser COEL (Cofactor E-Like) aunque todavía no tenemos datos al respecto.

Se sabe que TBCE es capaz de interactuar con el heterodímero de tubulina nativa (Tian y cols., 1997) y que su sobreexpresión en células produce una despolimerización de microtúbulos al igual que sucede con TBCD (Bhamidipati y cols, 2000; Martin y cols, 2000).

A mi llegada al laboratorio, TBCE era objeto de múltiples estudios, se había purificado a partir de la sobreexpresión en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes (Kortazar y cols, 2006), se hicieron ensayos de disociación de tubulina observando en geles no desnaturizantes que tenía capacidad para disociar tubulina. Al añadir cantidades crecientes de TBCE a la muestra de tubulina, la banda correspondiente al dímero de α/β -tubulina disminuía, y en presencia de TBCE (que no interactúa con el heterodímero) se forma el complejo estable TBCE/ β -tubulina, demostrando que realmente TBCE es capaz de disociar el heterodímero de tubulina y no simplemente unirse a él.

Además se comprobó que TBCE es una proteína ubicua que tiene capacidad para despolimerizar microtúbulos cuando era sobreexpresada en células HeLa en menos de 24 horas post-transfección. Para llevar a cabo experimentos y estudios *in vivo* con los cofactores del plegamiento de la tubulina mediante “time-lapse” video microscopía se decidió clonar TBCE en vectores de expresión en eucariotas con proteínas fluorescentes (YFP-yellow fluorescent protein- y CFP-cyan-fluorescent protein) y comprobamos que, al igual que pasaba con la proteína nativa, YFP-TBCE tras su sobreexpresión inducía despolimerización muy eficiente de

los microtúbulos. Además, también se trabaja en la expresión y localización de TBCE en diferentes tejidos de mamífero, así como su interacción con CCT y con α -tubulina.

Con el fin de entender la patología de Kenny-Caffey resultado de la delección de 4 aminoácidos en el dominio CAP-Gly en el gen TBCE se han llevado a cabo diversos estudios bioquímicos, biofísicos y de inmunocitoquímica para intentar comprender los posibles mecanismos moleculares que pudieran encontrarse alterados en la actividad de TBCE causados por esa delección de 4 aminoácidos y que están relacionados con los síndromes de Kenny-Caffey (*AR-KCS*) y Sanjad-Sakati (*HRD*). Para ello se han realizando ensayos de *Dynamic light scattering* (DLS) y dicroísmo circular (CD). También durante el estudio de su estructura mediante microscopía electrónica se comprobó que no sólo no se encontraba alterada la estabilidad de la proteína si no que, aparentemente la estructura era muy similar a la de la proteína wt. En diferentes ensayos de actividad observaron que TBCE Δ 52-55 es capaz de disociar el dímero de tubulina *in vitro* formando complejo ternario con TBCB y α -tubulina y de despolimerizar microtúbulos cuando es sobreexpresado en células en cultivo.

Dado que los resultados obtenidos por mis compañeros de laboratorio sugieren que la interacción entre TBCE Δ 52-55 y α -tubulina no se encuentra alterada y que aparentemente disocia el dímero igual que la proteína wt, la menor densidad microtubular observada en las células de enfermos podría explicarse debido a que la mutación conlleve al aumento de la vida útil de la proteína en la célula y por tanto su actividad en el tiempo.

Así decidimos calcular la vida media de TBCE wt y del TBCE Δ 52-55. Los resultados obtenidos a cerca de la vida media del TBCE wt nos demuestran que es muy larga. Nos lleva pensar que quizá esta región del polipéptido se una a ciertos partners o sufra algunas modificaciones postraduccionales que le permitan permanecer activo durante más tiempo, línea en la que planificamos experimentos futuros que desarrollaré a lo largo de mi tesis. Esperamos también poder hacer una comparación con la vida media del TBCE Δ 52-55, y que si se observan diferencias notables, estudiar más detenidamente la delección de esos cuatro aminoácidos para poder dar respuesta a la función devastadora de esta proteína TBCE Δ 52-55 en quien la padece.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones finales a las que nos ha llevado el presente trabajo de investigación son:

- YFP-TBCE es detectada al temprano tiempo de 6 horas tras la transfección. A este tiempo la señal de TBCE en el citoplasma es difusa pero la destrucción de los microtúbulos es bastante evidente, es más, en algunas células se observa la completa desaparición de todo el citoesqueleto microtubular.

- La proteína TBCE wt tiene una larga vida media en las células, unas 36 horas.

- Tras la utilización de dos antisueros de conejo producidos en nuestro laboratorio frente a la proteína entera, uno ha resultado apropiado para las inmunoprecipitaciones mientras que el otro a pesar de funcionar muy bien en westerns y en inmunocitoquímica no es capaz de inmunoprecipitar a TBCE sintetizado in vitro, sugiriendo que los dos anticuerpos reconocen diferentes epítomos.

- Este estudio nos ha servido para la puesta a punto y optimización de la técnica de inmunoprecipitación, identificando las condiciones ideales de buffer, temperatura y tiempo de incubación para este antisuero en particular.

- La especificidad de la unión de las bolas magnéticas con el antisuero queda de manifiesto en los resultados obtenidos mediante fluorografía.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181; 223 - 230. (1973).
- Bhamidipati, A., Lewis, S. A. y Cowan, N. J. ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J.Cell Biol.* 149; 1087 - 1096. (2000).
- Bommel, H., Xie, G., Rossoll, W., Wiese, S., Jablonka, S., Boehm, T. y Sendtner, M. Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease. *J.Cell Biol.* 159; 563 - 569. (2002).
- Campo, R., Fontalba, A., Sanchez, L. M. y Zabala, J. C. A 14 kDa release factor is involved in GTP-dependent beta-tubulin folding. *FEBS Lett.* 353; 162 - 166. (1994).
- Cunningham, L. A. y Kahn, R. A. Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle. *J.Biol.Chem.* 283; 7155 - 7165. (2008).
- Ellis, R. J., van der Vies, S. M. y Hemmingsen, S. M. The molecular chaperone concept. *Biochem.Soc.Symp.* 55; 145 - 153. (1989).
- Engel, J., Gunning, P. y Kedes, L. Human cytoplasmic actin proteins are encoded by a multigene family. *Mol.Cell Biol.* 2; 674 - 684. (1982).
- Evans, L., Mitchison, T. y Kirschner, M. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J.Cell Biol.* 100; 1185 - 1191. (1985).
- Fanarraga, M. L., Bellido, J., Jaen, C., Villegas, J. C. y Zabala, J. C. TBCD links centriologenesis, spindle microtubule dynamics, and midbody abscission in human cells. *PLoS.One.* 5; e8846. (2010).
- Fontalba, A., Paciucci, R., Avila, J. y Zabala, J. C. Incorporation of tubulin subunits into dimers requires GTP hydrolysis. *J.Cell Sci.* 106 (Pt 2); 627 - 632. (1993).
- Gao, Y., Melki, R., Walden, P. D., Lewis, S. A., Ampe, C., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J. y Cowan, N. J. A novel cochaperonin that modulates the ATPase activity of cytoplasmic chaperonin. *J.Cell Biol.* 125; 989 - 996. (1994).

- Hendrick, J. P., Langer, T., Davis, T. A., Hartl, F. U. y Wiedmann, M. Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* , 90; 10216 - 10220. (1993).
- Kahn, R. A.,Volpicelli-Daley, L.,Bowzard, B.,Shrivastava-Ranjan, P.,Li, Y.,Zhou, C. y Cunningham, L. Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics . *Biochem.Soc.Trans.* 33; 1269 - 1272. (2005).
- Kobe, B. y Deisenhofer, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem.Sci.* 19; 415 - 421. (1994).
- Kobe, B. y Kajava, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11; 725 - 732. (2001).
- Kortazar, D., Carranza, G., Bellido, J., Villegas, J. C., Fanarraga, M. L. y Zabala, J. C. Native tubulin-folding cofactor E purified from baculovirus-infected Sf9 cells dissociates tubulin dimers. *Protein Expr.Purif.* 49; 196 - 202. (2006).
- Kortazar, D., Fanarraga, M. L., Carranza, G., Bellido, J., Villegas, J. C., Avila, J. y Zabala, J. C. Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. *Exp.Cell Res.* 313; 425 - 436. (2007).
- Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, A., Coll, M. y Zabala, J. C. Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J.Struct.Biol.* 135; 219 - 229. (2001).
- Martin, L., Fanarraga, M. L., Aloria, K. y Zabala, J. C. Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein. *FEBS Lett.* 470; 93 - 95. (2000).
- Martin, N., Jaubert, J., Gounon, P., Salido, E., Haase, G., Szatanik, M. y Guenet, J. L. A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy in mice. *Nat.Genet.* 32; 443 - 447. (2002).
- Mitchison, T. J. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science*, 261; 1044 - 1047. (1993).
- Parvari, R., Hershkovitz, E., Grossman, N., Gorodischer, R., Loeys, B., Zecic, A., Mortier, G., Gregory, S., Sharony, R., Kambouris, M., Sakati, N., Meyer, B. F., Al Aqeel, A. I., Al Humaidan, A. K., Al Zahrani, F., Al Swaid A., Al Othman J., Diaz, G. A., Weiner, R., Khan, K. T., Gordon, R. y Gelb, B. D. Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome. *Nat.Genet.* 32; 448 - 452. (2002).

- Radcliffe, P. A., Hirata, D., Vardy, L. y Toda, T. Functional dissection and hierarchy of tubulin-folding cofactor homologues in fission yeast. *Mol.Biol.Cell* , 10; 2987 - 3001. (1999).
- Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C. y Cowan, N. J. Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell*, 86; 287 - 296. (1996).
- Tian, G., Lewis, S. A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C. y Cowan, N. J. Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J.Cell Biol.* 138; 821 - 832. (1997).
- Tian, G., Vainberg, I. E., Tap, W. D., Lewis, S. A. y Cowan, N. J. Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. *J.Biol.Chem.* 270; 23910 - 23913. (1995).
- Wang, W., Ding, J., Allen, E., Zhu, P., Zhang, L., Vogel, H. y Yang, Y. Gigaxonin interacts with tubulin folding cofactor B and controls its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. *Curr.Biol.* 15; 2050 - 2055. (2005).
- Weisenberg, R. C. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science*, 177; 1104 - 1105. (1972).
- Zabala, J. C. y Cowan, N. J. Tubulin dimer formation via the release of alpha- and beta-tubulin monomers from multimolecular complexes. *Cell Motil.Cytoskeleton*, 23; 222 - 230. (1992).
- Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. y Mitchison, T. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*, 378; 578 - 583. (1995).