FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

ENFERMEDADES DE TUBULINAS

Autor: Dña. Silvia Viñas Domínguez

Director: D. Juan Carlos Zabala

Santander, Junio 2016

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

METODOLOGÍA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. **Estructura y formación de microtúbulos**
II. **Dominios estructurales en tubulinas**
III. **La regulación postraduccional de los microtúbulos. Mecanismos y funciones**
    a. Detirosinación de la tubulina y generación de Δ2-tubulina
    b. Acetilación de la tubulina
    c. Poliglutamilación y poliglicilación de la tubulina

IV. **Alteraciones en las modificaciones postraduccionales**
V. **Base funcional de las mutaciones en los genes de tubulina**
VI. **Mutaciones de las tubulinas responsables de una amplia gama de trastornos neurológicos**
VII. **Mutaciones en TUBA1A**
VIII. **Mutaciones en TUBA8**
IX. **Mutaciones en TUBB3**
X. **Mutaciones en TUBB2B**
    a. Mutaciones heterocigóticas en TUBB2B como causa de CFEOM y discapacidad intelectual
    b. Familia afectada por el síndrome caracterizado por CFEOM y discapacidad intelectual
    c. Patogénesis de CFEOM
    d. Patogénesis de las mutaciones E421K en TUBB2B
    e. Diferencias entre los síndromes CFEOM causados por TUBB2B y TUBB3

XI. **Mutaciones en TUBB**

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN:

El desarrollo del sistema nervioso central de los mamíferos requiere la generación, migración y diferenciación de las neuronas. Cada uno de estos eventos celulares precisa de un citoesqueleto dinámico de microtúbulos. Los microtúbulos son necesarios para la migración intercinética nuclear (los núcleos de los progenitores se mueven entre los bordes apical y basal del neuroepitelio en fase con el ciclo celular), la separación de las cromátidas en la mitosis, la translocación nuclear durante la migración y la formación de las extensiones neuríticas. Su importancia es subrayada por el hallazgo de que las mutaciones en genes que codifican proteínas asociadas a microtúbulos causan trastornos neurológicos importantes.

Las propias subunidades estructurales de los microtúbulos, las proteínas de tubulina, han sido objeto de estudio por diferentes grupos de investigación durante años y se han visto implicadas en un amplio espectro de enfermedades humanas conocidas colectivamente como enfermedades de tubulinas. Cabe esperar que mutaciones en estas proteínas den lugar a enfermedades del desarrollo neurológico que se caracterizan por malformaciones corticales graves. En la mayoría de los casos, hay profundas discapacidades acompañantes, como retraso mental severo y epilepsia.

En este trabajo se revisan los resultados obtenidos en tales líneas de investigación para arrojar claridad a la importancia funcional de los microtúbulos, al papel que desempeñan en el desarrollo neurológico, y dado que los diferentes isotipos de tubulina pueden conferir propiedades únicas al microtúbulo, serán descritas las mutaciones de los genes implicados así como de los cuadros clínicos subyacentes. La atención se centra en los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la patología de las enfermedades asociadas a la tubulina.

Palabras clave: Microtúbulo, tubulina, enfermedades, isotipos, lisencefalia.

ABSTRACT:

The development of the mammalian central nervous system requires the generation, migration and differentiation of neurons. Each of these cellular events requires a dynamic microtubule cytoskeleton. Microtubules are required for interkinetic nuclear migration (the nuclei of progenitors move between the apical and basal surfaces of the neuroepithelium in phase with their cell cycle), the separation of chromatids in mitosis, nuclear translocation during migration and the outgrowth of neurites. Their importance is underlined by the finding that mutations in microtubule associated proteins cause important neurological disorders.

The structural subunits of microtubules, the tubulin proteins, have been studied by different research groups for years and have been implicated in a spectrum of human diseases collectively known as tubulin diseases. Mutations in these proteins result in neurodevelopmental diseases characterized by severe cortical malformations. In most cases, there are deep accompanying disabilities such as severe mental retardation and epilepsy.

The results of that study lines will be reviewed in order to emphasize the functional role of microtubules and their function during neurodevelopment. Different isotypes of tubulin could confer unique properties to the microtubule. Thus, mutations of involved genes such as their underlying clinical conditions will be described. The focus is on the molecular and cellular mechanisms that underlie the pathology of tubulin-associated diseases.

Key words: Microtubule, tubulin, diseases, isotypes, lissencephaly.

INTRODUCCIÓN:

Los microtúbulos son unas estructuras poliméricas del citoesqueleto que desarrollan importantes funciones en todas las células eucariotas, por lo que el conocimiento de la estructura de los microtúbulos, y de las tubulinas que los forman, es esencial para conocer sus propiedades y poder abordar las consecuencias patológicas que tienen las mutaciones que las alteran.

La tubulina es la proteína principal para la composición de los microtúbulos, que es un heterodímero αβ (17,18). Las secuencias de aminoácidos de α y β-tubulinas se determinaron por primera vez en 1981 y encontraron una coincidencia del 41% entre ellas (19, 20). Fue en este trabajo donde se confirma la existencia de diferentes tipos de tubulinas. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de tubulinas α y β obtenidos a partir del cerebro de cerdo mostraron heterogeneidad en varias posiciones, lo que indicaba que hay varias formas de α y β-tubulinas, codificadas además por diferentes genes. Muchos eucariotas codifican proteínas de la misma familia de secuencia de aminoácidos diferente. Estas diferentes proteínas se denominan isotipos, proteínas que pertenecen a la misma familia pero codificadas por genes diferentes y con diferentes secuencias de aminoácidos (19, 20).

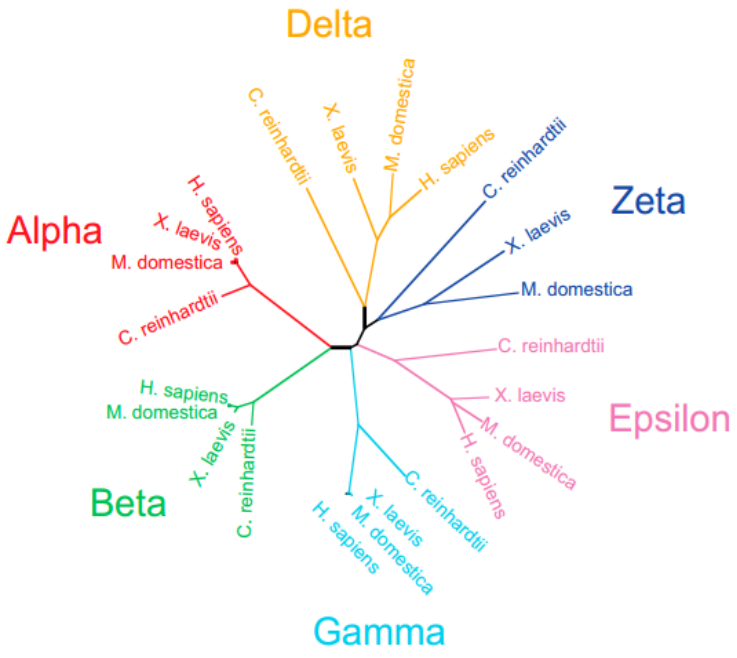

Figura 1. Árbol filogenético de tubulinas relacionadas en organismos eucariotas basado en el programa de alineamiento de secuencia múltiple Clustal Omega (11).

Existen otras muchas formas de tubulina como γ, δ, ε, ζ, η, θ, ι, y κ, z, probablemente se descubran más. Estas tubulinas, junto con α y β, generalmente se agrupan juntos como la superfamilia de las tubulinas. Sin embargo, son 6 los miembros funcionales que forman parte de esta superfamilia en los organismos eucariotas (14): α y β-tubulina polimerizan para formar los microtúbulos; γ nuclean los microtúbulos a partir del anillo de gamma tubulina; δ y ε se asocian con los centriolos y/o cuerpos basales de cilios (12, 13); y el sexto componente es z, último miembro caracterizado de esta superfamilia. Las tubulinas α, β y γ se conservan en todos los eucariotas, mientras que δ y ε se conservan en muchos, pero no todos, y aún hay que profundizar más en su función (15, 16). Se ha descubierto recientemente la existencia de una asociación entre z, δ y ε denominada módulo ZED que se ha conservado evolutivamente. Esto es, aquellos organismos que no tienen tubulina ε también carecerán de δ, y si poseen tubulina ε también contarán con tubulina δ. Se conoce, además, que z y δ son evolutivamente intercambiables, por lo que, aunque los seres humanos carecen de la tubulina z, tienen δ tubulina. De hecho, esta aparente intercambiabilidad evolutiva puede reflejar el solapamiento funcional de estas dos tubulinas (11).

La existencia de isotipos de tubulina se había predicho ya en 1967 cuando Behnke y Forer (21) sugirieron que en vista de la diferente estabilidad de los microtúbulos que realizan diferentes funciones deberían existir diferentes formas de tubulina. Esta propuesta fue posteriormente desarrollada dando lugar a la hipótesis de la multitubulina, que proponía la existencia de tales isotipos, cada una de ellas responsable de una función específica (22). Esta hipótesis es fundamentalmente correcta, pero no todos los isotipos pueden explicarse de esta manera, y las diferencias funcionales son a menudo mucho más sutiles y complejas de lo previsto originalmente.

Las diferencias entre los isotipos de tubulina han sido ampliamente conservadas entre los vertebrados. Este hecho apoya la idea de que tales diferencias pueden resultar importantes. La distribución de estos isotipos en los diferentes tejidos también es diferente, es decir, la expresión de los isotipos en una célula es distinta en función del tejido del que vaya a formar parte (7).

Cada isotipo estaría participando en procesos como la mitosis o como la formación del axonema en epitelios traqueales. La forma ideal para probar que las diferencias estructurales entre los isotipos tienen importancia funcional es demostrar que los isotipos no son funcionalmente intercambiables. Además, hay una gran cantidad de otras evidencias que apoyan la hipótesis de que las diferencias de isotipo son funcionalmente significativas, pero las diferencias en la distribución tisular entre los isotipos de tubulina no lo hacen constituir una prueba definitiva (7).

La distribución de isotipos entre los tejidos e incluso entre diferentes tipos de células en el mismo tejido es extremadamente compleja. Es decir, en ciertos casos las distribuciones de los isotipos parecen diferir dentro de la misma célula. Un ejemplo de ello es el caso de algunas de las neuronas que forman parte del órgano vestibular del oído interno del jerbo. Aunque todas sus neuronas contienen βI, βII, y βIII, el isotipo βIII se expresa solamente es una región concreta de las neuronas del órgano vestibular denominada cáliz, por lo que es lógico pensar que la célula es capaz de discriminar entre los isotipos y que los diferentes isotipos pueden realizar diferentes funciones (23). El

significado funcional de algunos de los isotipos de tubulina está bastante claro, otros son especulativos, y en otros es completamente desconocido.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de los isotipos de un organismo dado revela el hecho de que generalmente las diferencias entre los isotipos se agrupan en los extremos C-terminal. Esta idea, junto con el alto grado de conservación de los C-terminales en las secuencias de los isotipos a lo largo de la evolución, incluso a pequeñas diferencias, indica que el C-terminal es importante. Además, el C-terminal contiene los sitios de la mayoría de las modificaciones postraduccionales, incluyendo la fosforilación, tirosinacion/detirosinacion, deglutamilacion, poliglutamilación, y poliglicilación que serán tratadas con posterioridad en este documento. El extremo C-terminal tiene una carga muy negativa. Estas cargas negativas se repelen, por lo que estos C-terminales probablemente se orientan expulsados hacia fuera desde el dímero de tubulina y de los microtúbulos, componiendo las partes más expuestas superficialmente. Visualizando esta situación, es fácil suponer que el C-terminal sirve como señal para otras proteínas que se relacionan con el microtúbulo y que ayudan a determinar la función de cada isotipo de estas tubulinas. Es así que el C-terminal de α y β-tubulina es también el sitio donde una variedad de proteínas se unen, incluyendo MAP2, tau, proteínas que contienen el dominio calponina y la proteína motora Ncd (24, 25, 26).

Sin embargo, existen más discordancias; los isotipos de tubulina se diferencian entre sí en otros lugares además de su C-terminal. Uno de los ejemplos es el que ya se mencionó con anterioridad, la falta de cisteína 239 en los βIII de mamíferos (27). Otra diferencia es la diferencia de rigidez conformacional entre los dímeros αβII, αβIII, y αβIV. Existen estudios de simulación que indican que la unión del GTP al bolsillo de unión está influenciada por los cambios conformacionales que se producen en esta precisa región de la tubulina. Entonces, toda la cinética de la hidrólisis del GTP que es tan importante por determinar las propiedades dinámicas de los microtúbulos, se verá sin duda influenciada por la rigidez conformacional en esta área, que a su vez depende de la naturaleza del isotipo (28). Esto es: el isotipo de tubulina va a influir en la dinámica del microtúbulo. Y, del mismo modo, las energías de las interacciones laterales y longitudinales entre protofilamentos (entre los dímeros) también dependerán y variarán fácilmente entre los isotipos (29).

Isotipos de tubulina (Tabla 1)

El isotipo βI parece ser el isotipo más extendido de todos, distribuido en un gran número de tejidos de los mamíferos, ya que ha sido encontrado en casi todos los tejidos que han sido examinados (30, 31). Está altamente conservado en la evolución: aunque la línea aviar y la de mamíferos divergieron hace más de 300 millones de años, se ha encontrado que las secuencias de pollo y de ratón son idénticos en los 444 residuos de βI (32, 33, 34). Las mutaciones en el gen TUBB, codificante de este isotipo, causan displasia cortical junto con otras malformaciones cerebrales. Existen múltiples pseudogenes en los cromosomas 1, 6, 7, 8, 9 y 13 (8).

El isotipo de tubulina βII es uno de los isotipos mejor estudiados. Por esta razón, resulta irónico lo poco que se sabe acerca de su función específica. Sin embargo, como βII está altamente conservada en la evolución, es probable que tenga un papel especial que desempeñar. Tiene una distribución mucho más restringida que βI. El βII se encuentra altamente expresado en el tejido cerebral, tanto en las neuronas como en la glía, en el músculo esquelético y liso y en el tejido conectivo (36). Ha sido encontrado a su vez en mama, glándula adrenal y testículos (37, 38). Al contrario que en los casos de βI y βIV, el βII generalmente no participa en la formación de los microtúbulos del axonema, a excepción del de los cilios del epitelio olfativo (39) y la importancia de este hallazgo es incierta. Es posible que βII puede jugar un papel en la organización de la membrana nuclear durante la mitosis. Incluso si βII tiene una función que implica al núcleo celular y la mitosis, sin embargo, esto no parece suficiente para explicar su concentración tan alta en las neuronas, que no se dividen, o en las células musculares (36). En nervios y músculos βII probablemente tiene otras funciones.

El isotipo βIII, por otro lado, posee una serie de características particulares, cada una de las cuales es probablemente relevante para el desarrollo de la comprensión de su significado funcional: 1) El isotipo βIII está altamente conservado en la evolución, como en el caso de βI (40, 41); 2) tiene una distribución muy inusual de las cisteínas ya que en la posición 239 carece de ella, y sin embargo tiene una en la posición 124 en lugar de una serina; 3) tiene una distribución muy concreta en los tejidos adultos, expresándose en muy pocos, siendo más abundante en el cerebro, donde se encuentra sólo en las neuronas y no en las células gliales, mientras que, por el contrario, βII se encuentra en ambos (42). De hecho, su ausencia en las células gliales ha hecho que βIII sea un marcador útil para la diferenciación neuronal (43, 44). El βIII también se encuentra en las células de Sertoli y, en pequeñas cantidades, en el órgano vestibular, el epitelio nasal, y el colon (45). Además, se encuentra sobreexpresada en un gran número de cánceres; 4) βIII está fosforilada en una serina cerca del extremo C-terminal, y excepto βVI, los otros isotipos beta de vertebrados no tienen ninguna serina en esta región, y por lo tanto no pueden ser fosforilados aquí (46); 5) la dinamicidad de los microtúbulos in vitro formados por el dímero αβIII es mayor que el de los microtúbulos formados por dímeros αβII o αβIV (47).

ISOTIPO DE TUBULINA		GEN	LOCALIZACIÓN	C-TERMINAL	EXPRESIÓN
Humano	**Ratón**		**α- Tubulina**		
1A	α1	TUBA1A	12q13.12	-(440) VEGEGEEEGEEY	Cerebro y otros tejidos
1B	α2	TUBA1B	12q13.12	-(440) VEGEGEEEGEEY	Extendida
1C	α6	TUBA1C	12q13.12	-(440) ADGEDEGEEY	Sangre
3C	-	TUBA3C	13q11	-(440) VEAEAEEGEEY	Testículo
3D	α3/7	TUBA3D	2q21.1		
3E	-	TUBA3E	2q21.1	-(440) VEAEAEEGEEY	
4A	α4	TUBA4A	2q35	-(440) YEDEDEGEE	Cerebro, músculo
8	α8	TUBA8	22q11.1	-(440) FEEENEGEEF	Corazón, músculo esquelético, testículo
AL3	-	TUBAL3	10p15.1	-(440) EEVAQSF	Médula ósea, cerebro, útero
Humano	**Ratón**		**β-Tubulina**		
I	β5	TUBB	6p21.33	-(435) DFGEEAEEEA	Extendida
II	β2	TUBB2A/B	6p25	-(435) EFEEEEGEDEA	Cerebro y músculo
III	β6	TUBB3	16q24.3	-(435) EMYEDDEEESEAQGPK	Neuronas, testículo (células de Sertoli)
IVA	β4	TUBB4 (A)	19p13.3	-(435) FEEEAEEEVA	Cerebro
IVB	β3	TUBB2C (4B)	9q34	-(435) EFEEGAEEEVA	Extendida, especialmente en células ciliadas (Espermatozoides)
V	-	TUBB6	18p11.21	-(435) EAFEDEDEEEINE	Desconocido
VI	β1	TUBB1	20q13.32	-(435) DEEVTEEAEMEPEDKGH	Plaquetas, médula ósea
VIII	-	TUBB8	10p15.3	-(435) DEEYAEEEVA	Desconocido

Tabla 1. Clasificación de los isotipos de tubulina basada en la base de datos del genoma humano y por su expresión en el proteoma humano (7, 9).

El hecho de que exista esta diferencia en la distribución de sus cisteínas probablemente hace que este isotipo tan especial sea menos sensible a las especies reactivas de oxígeno

(ROS) y radicales libres. Por esta razón, es más probable que βIII se exprese sobre todo en los tejidos y tumores con niveles elevados de ROS y radicales libres a modo de Silvia.vd@hotmail.cprotección. Cuando los dímeros αβII, αβIII y αβIV son puestos en contacto in vitro en ausencia de MAPs, αβII y αβIV comienzan a ensamblarse en protofilamentos inmediatamente, pero αβIII sólo lo hace después de un largo tiempo de retraso (48). Así pues, parece que βIII puede tener intrínsecamente una menor capacidad de incorporarse a los microtúbulos. Sin embargo, esto no supone ninguna desventaja para células como las neuronas, que requieren grandes cantidades de βIII, pudiendo compensar su polimerización más pobre mediante la síntesis de tau, MAP2, u otros MAPs. Y, de hecho, βIII y MAP2 se sintetizan a menudo al mismo tiempo (49, 50).

Los microtúbulos formados por αβIII son, por lo tanto, considerablemente más dinámicos in vitro que los formados por αβII o αβIV (47), lo cual supone un dato muy importante en el desarrollo. βIII se expresa en las neuronas en el sistema nervioso embrionario, así como en células que después dejarán de expresarla (44). βIII se expresa también en células diferenciadas del neuroblastoma (51) y en las neuronas de regeneración. Es posible que las neuronas sometidas a un rápido crecimiento y a la diferenciación requieran microtúbulos muy dinámicos (44). Una pequeña cantidad de MAP2 se expresa en esta etapa, lo que puede ser suficiente para permitir que el dímero αβIII forme microtúbulos eficientemente (52). En esta etapa temprana del desarrollo neuronal βIII no es fosforilada, y sólo una vez las neuronas hayan madurado se fosforila (53).

Los mamíferos tienen dos formas de βIV, denominados βIVa y βIVb. La primera es expresada sólo en el cerebro, mientras que la segunda se expresa en una amplia variedad de tejidos, incluyendo el cerebro (54). βIV tiene una función muy concreta: la formación de los axonemas, estructura basada en microtúbulos necesario en cilios y flagelos. En los mamíferos, βIV se ha localizado en los flagelos de espermatozoides, en los cilios del epitelio traqueal, epéndimo cerebral, oviducto, el conducto eferente de los testículos, las células ciliadas vestibulares, los bastones de la retina, las neuronas olfativas y las células progenitoras esofágicas. El axonema se compone de un par de microtúbulos centrales compuestos por los 13 protofilamentos junto con unos microtúbulos exteriores específicos, formando un entramado mantenido por conexiones proteicas internas. Son 9 los dobletes de microtúbulos que rodean al par central (disposición conocida como 9+2), los cuales están formados por un microtúbulo completo (túbulo A) y otro incompleto (túbulo B) (55). Es decir, se trata de una compleja maquinaria de microtúbulos que no sorprende que requieran de un isotipo de tubulina en particular. De hecho, se ha mencionado anteriormente que muchos axonemas también contienen βI, por lo que hay espacio en este escenario para más de un isotipo en realidad (56). Además, dos de los tipos de cilios en los que participa βIV son inmóviles, por lo que es posible que βIV esté involucrado en la determinación de la estructura de los microtúbulos del axonema en lugar de ser directamente necesaria para la motilidad. La clave para la participación en la estructura del axonema parece ser la secuencia EGGFREE, sitio para la poliglicilación, una modificación post-traduccional en el que una serie de glicinas están unidos al grupo γ-carboxilo de residuos de glutamato, ya que esta modificación es muy común en las tubulinas de los axonemas. Se cree que la cadena lateral poliglicil es necesaria para el montaje de los pares de microtúbulos centrales del propio axonema (57).

βV es la más intrigante de los isotipos beta. Nuevamente, es un isotipo altamente conservado en la evolución, lo que sugiere que puede tener una función específica. Sin embargo, no sólo es que la función nos resulta desconocida sino que la propia distribución normal de βV no se conoce. Tal vez la única pista que nos oriente a la función de βV es que tiene la misma distribución de residuos de cisteína que βIII. En otras palabras, tiene cisteína-124, pero carece de cisteína-239 (32).

Sin embargo, βVI es la menos conservada de los isotipos beta. Está claramente asociada con el sistema hematopoyético. En mamíferos, cuyos eritrocitos carecen de microtúbulos, βVI se encuentra en las plaquetas y en los tejidos hematopoyéticos, tales como la médula ósea y el bazo. βVI tiene una disposición única de cisteínas. Así como βIII y βV tiene una cisteína-239, βVI posee una serina-239 en su lugar. βVI constituye alrededor del 90% del total de las β-tubulinas de las plaquetas (58). Es el factor de transcripción NF-E2 el que se encarga de inducir la síntesis de βVI en los megacariocitos de la médula ósea y no de otro isotipo (59). Las plaquetas poseen una banda marginal en la periferia de la célula. Esta banda marginal consiste en un sólo microtúbulo de aproximadamente 100 µm de largo, enrollado alrededor de sí mismo de 7 a 12 veces. Se han realizado pruebas de inhibición de la síntesis de βVI que dan lugar a unas plaquetas con una banda marginal defectuosa, formadas por un único microtúbulo con sólo 2-3 vueltas (cuando lo normal era al menos 7). Dichas plaquetas se tornaban en una forma esférica en lugar de la forma de disco habitual con implicaciones funcionales a nivel de la coagulación, viéndose ésta comprometida en algunos casos (58, 59, 60). Basándose en estos resultados se podría plantear la hipótesis de que la peculiar estructura de βVI se presta como fundamental en la formación de los microtúbulos de la banda marginal de las plaquetas.

Por otro lado, no hay mucho que decir acerca de las funciones específicas de los isotipos alfa en los mamíferos. Su distribución en los tejidos parece mucho menos compleja, en la medida de lo que se conoce, en comparación con la de los isotipos beta.

La tubulina α1 se encuentra en tejidos como el cerebro, aunque también la podemos encontrar en otros tejidos (30). La tubulina α2 es muy similar a esta (61, 62). La α3/7 se encuentra sólo en el testículo, donde es el principal isotipo. La α4 está se expresa en una variedad de tejidos, pero particularmente en el músculo y el corazón, así como la α6 también que es muy ubicua, siendo menos abundante que los otros isotipos. La α8 es considerablemente distinta a las demás, su secuencia difiere de los demás isotipos α quedando únicamente un 89% de secuencia idéntica a las otras α. El resto de isotipos, α1, α2, α3/7, α4 y α6, comparten al menos el 96% de su secuencia de aminoácidos, que es idéntica entre sí. La α8 se encuentra en corazón, testículo y músculo esquelético, y a niveles muy bajos en el cerebro y el páncreas.

Las diferencias entre ellas tienden a ser muy conservadas. Arrojando una visión global, podemos observar que la distribución en los tejidos de varios de los isotipos es parecida, por lo que es difícil de imaginar que las diferencias entre ellos sean funcionalmente importantes.

Sin embargo, el isotipo α8 podría suponer una excepción al presentar una secuencia más divergente y una distribución mucho más restringida que las demás. Este isotipo tiene una secuencia única en la posición 35 que es TFDAQASKIND; y otra en la 45 que es TFGTQASKIND, tanto en la α8 de humanos y como la de ratón. La secuencia equivalente en los isotipos α1, α2, α3/7, α4, y α6 es completamente diferente: QMPSDKTIGGG. Esta región corresponde a un bucle situado en la pared interior de los microtúbulos que puede empeñar un papel en los contactos entre protofilamentos adyacentes (63). Debido a esta diferencia, es posible que los microtúbulos con α8 podrían tener propiedades dinámicas muy distintas a las que contienen los otros isotipos alfa. Estas características especiales de α8 están muy conservadas en la evolución, lo cual sugiere que son funcionalmente importantes. Al igual que con los isotipos beta, la comparación del comportamiento in vitro de microtúbulos con diferentes isotipos alfa puede revelar diferencias funcionales. Sin embargo, esta comparación debería tener en cuenta las diferencias que puedan surgir debido a los diferentes grados de tirosinación, detirosinación y deglutamilación. Por lo tanto, de momento aún queda mucho por hacer para poder entender plenamente el significado de los isotipos alfa en nuestra especie.

OBJETIVOS:

Este trabajo se centra en el estudio de las enfermedades de las tubulinas a través de la revisión de la literatura científica publicada hasta el momento con el objetivo de organizar y resumir la importancia que tienen las tubulinas en el desarrollo neurológico del ser humano y, posteriormente, analizar la patología subyacente a sus alteraciones.

La relevancia de este tema recae en que las mutaciones que afectan a las tubulinas están erigiéndose como principales causas de malformaciones cerebrales complejas, muchas de ellas incompatibles con la vida y, otras, responsables de diversos síndromes que abarcan un amplio espectro de gravedad.

La idea principal es mostrar cómo estas alteraciones genéticas están vinculadas a defectos que interfieren durante la embriogénesis humana en el desarrollo. ¿Cómo afectan estas mutaciones a los microtúbulos? ¿Qué tipo de trastornos se derivan de ellas? ¿Cuáles son los mecanismos por los cuales estas mutaciones conducen al desarrollo de estas patologías? En esta revisión serán respondidas estas preguntas y llegaremos a tratar de explicar y entender la base molecular de las enfermedades que afectan a los genes de tubulina.

METODOLOGÍA:

Para llevar a cabo el proceso de búsqueda de la información de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica sistemática de la literatura publicada sobre las mutaciones en las tubulinas y sus implicaciones clínicas desde 2002 hasta 2016. La búsqueda ha sido realizada en inglés en su mayoría dada la actualidad del tema.

Los descriptores que se han empleado son los siguientes:

- Posttranslational modifications
- Tubulin mutation
- Tubulinopathies human
- TUBA1A mutation
- TUBA8 mutation
- TUBB3 mutation
- TUBB2B mutation
- TUBB mutation
- CFEOM síndrome

Para reducir el volumen de resultados que aparecen, la búsqueda ha sido acotada mediante el operador booleano AND.

Además, han sido utilizadas otras fuentes de información para completar conceptos más concretos:

- Libros:

    - **La Célula**; fue de gran utilidad el capítulo 12 (Citoesqueleto y movimiento celular) sobre la estructura y organización dinámica de los microtúbulos, su ensamblaje y papel en la célula, con el que fue elaborado el apartado I (Estructura y formación) a fin de acercar al lector al tema de discusión y aportar unas pinceladas básicas sobre el mismo y facilitar así su lectura y comprensión.

    - **The role of microtubules in cell biology, neurobiology and oncology**; libro imprescindible para poder desarrollar la introducción y los apartados II (Dominios de tubulina) y III (La regulación postraduccional de los microtúbulos). Es un extenso libro que me aportó la información fundamental para explicar y desarrollar las funciones y diferencias de los isotipos de las tubulinas.

- Bases de datos:

    - **PubMed**; es la plataforma que permite el acceso libre a la base de datos de artículos de investigación en biomedicina (MEDLINE). Fue creada por

la National Center for Biotechnology Information (NCBI) en EEUU en la National Library of Medicine (NLM).

- **The Human Protein Atlas**; es una base de datos de disposición pública con imágenes de alta resolución que muestran la distribución espacial de las proteínas en 44 diferentes tejidos humanos normales y 20 tipos diferentes de cáncer, así como 46 líneas celulares humanas diferentes.

- **PDB RCSB** (Protein Data Bank); es un portal de información sobre la estructura de las macromoléculas biológicas. Alberga información sobre las estructuras de proteínas, ácidos nucleicos, y diferentes complejos. Estos datos, generalmente obtenidos mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o microscopia electrónica de alta resolución, son enviados por investigadores de todo el mundo. Están bajo dominio público y pueden ser usados libremente. Este portal fue requerido para acceder a la estructura y secuencia de las subunidades de tubulina, permitiéndome descargarla en formato pdb para poder trabajar con ella mediante el programa informático PyMOL. Este programa permite visualizar las estructuras en 3D para poder entender en que afectaría un cambio en una determinada posición en la molécula, en este caso de tubulina.

Han sido requeridos, además, los siguientes softwares para elaborar este trabajo:

- **STRAP** (Intuitive Editor for annotated multiple Sequence and Structure Alignments); disponible a través del siguiente enlace: Bioinformatics.org/strap/aa

  Con este software libre de Java se puede realizar comparaciones de proteínas mediante su secuencia o su estructura 3D, función para la que principalmente ha sido empleado. Además, este software permite destacar posiciones importantes en las secuencias de proteínas, predecir su estructura secundaria, crear figuras de alta calidad y realizar exportaciones a FASTA (formato de fichero informático basado en texto, utilizado para representar secuencias en el que los pares de bases o los aminoácidos se representan usando códigos de una única letra).

- **PyMOL**; sistema de visualización molecular de código abierto creada por Warren Lyford Delano. PyMOL puede producir imágenes en 3D de alta calidad de moléculas pequeñas y macromoléculas biológicas, como las proteínas. Es una de las pocas herramientas de visualización de código abierto disponibles para su uso en biología estructural. Este programa fue descargado y empleado para la realización de figuras que representan la estructura de la tubulina así como de sus diversas mutaciones a fin de ilustrar este trabajo con mayor calidad y precisión.

Criterios para la elección de los artículos:

La búsqueda mediante los descriptores previamente nombrados proporcionó una gran cantidad de artículos relacionados con las diversas mutaciones en los genes de las tubulinas que han sido estudiadas y descritas. Fueron seleccionados 25 artículos publicados entre 2002 y 2016 para elaborar dicho trabajo. Fue escogido este periodo de publicación debido a que el número de artículos comienza a elevarse marcadamente a partir del 2002, año en el que comienza a cobrar mayor importancia este tema en el mundo científico. La primera mutación en humanos en un gen de tubulina tardó mucho en describirse porque las mutaciones en general son letales y no fue hasta mediados de la década pasada cuando se describió el primer mutante. En la siguiente tabla se representa el número de publicaciones a lo largo de este periodo de tiempo, dejándose ver esta tendencia a aumentar durante los últimos años.

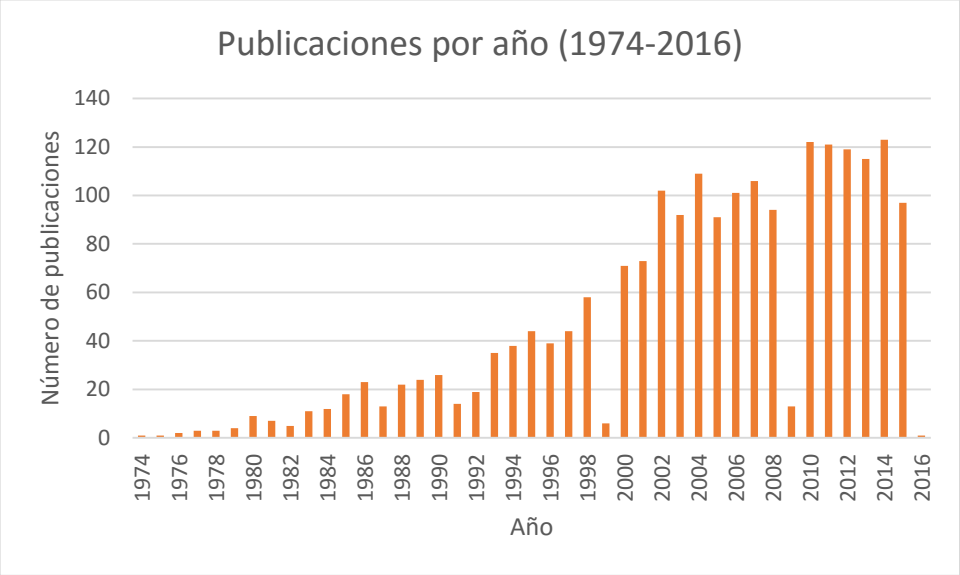

Gráfico 1. Número de artículos publicados sobre mutaciones en las tubulinas según el año de publicación.

Dentro de todos los resultados de búsqueda fueron seleccionados 25 artículos, aquellos de mayor trascendencia, siendo excluidos aquellos que no aportaban información nueva o relevante, así como los que no se ajustaban a los objetivos propuestos para el trabajo. Todos los artículos se obtuvieron mediante libre acceso a la base de datos "PubMed" gracias a la colaboración y orientación del tutor de este trabajo, a excepción de 4 artículos proporcionados por el propio tutor debido a que la reciente publicación de los mismos no permitía su acceso a través de internet.

El trabajo en total consta de 180 referencias bibliográficas extraídas durante la lectura de los 25 artículos mencionados, citadas en estilo "Vancouver". Esto se debe a que los autores de los mismos se han basado a su vez en ideas que han extraído de otros artículos, por lo que se ha decidido citar tales referencias a fin de que durante la lectura del presente trabajo sea posible acceder con total facilidad a la información original.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

I. Estructura y formación de microtúbulos

Los microtúbulos son unos polímeros dinámicos que componen el citoesqueleto celular y consecuentemente desempeñan papeles esenciales para la célula tales como la determinación de la forma celular, el transporte intracelular, la segregación cromosómica, la organización celular y la motilidad celular (4). La subunidad estructural y funcional del microtubulo es un heterodimero de dos proteínas muy conservadas, globulares, que son α- y ß-tubulina. Los dímeros de α- y de ß-tubulina polimerizan para formar 13 protofilamentos asociados lateralmente constituyendo un cilindro hueco polar (2) compuesto por dos extremos, un extremo más (creciente) y extremo menos (despolimerizante). La conformación estructural de protofilamentos longitudinales está estrechamente regulada y, por lo tanto, las estructuras de α- y β-tubulina están altamente conservadas a lo largo de los eucariotas (1).

Los contactos laterales son homotípicos (α- α y ß -ß), salvo en un solo sitio o "costura" (α-ß y ß-α), y la relevancia funcional de los mismos aún no se entiende, aunque parece estar ligada a la estructura del anillo de γ-TURC que se explica más adelante (2). Esta polaridad es la que va a determinar la dirección de los motores moleculares a lo largo de los microtúbulos y una alteración en esta propiedad tendrá consecuencias importantes que serán mostradas a lo largo de este trabajo.

Los microtúbulos sufren ciclos rápidos de ensamblaje y desensamblaje mediante la polimerización y despolimerización de los dímeros de tubulina. Cada monómero de tubulina se une a una molécula de guanosina 5'-trifosfato (GTP), no intercambiable en α-tubulina (sitio-N) e intercambiable en β-tubulina (sitio-E). El GTP unido a la ß-tubulina se hidroliza a GDP inmediatamente después de la polimerización, debilitando así la afinidad de unión entre los dímeros de tubulina y provocando la despolimerización rápida y pérdida de las moléculas de tubulina unidas a GDP en el extremo más.

En la célula, el extremo menos del microtúbulo está coronado por los monómeros α, y mediante su anclaje al γ-TURC (gamma- tubulin ring complex) en el centro organizador de microtúbulos por excelencia, el centrosoma, el microtúbulo será nucleado y podrá polimerizar. En el extremo más, el más dinámico, están los monómeros de ß-tubulina (7). El GTP debe estar presente en el sitio-E para que la tubulina polimerice, pero si se hidroliza a guanosina 5'-difosfato (GDP) los microtúbulos se encuentra en una estructura metaestable. Es la hidrólisis acelerada de GTP en el extremo más lo que resulta en una rápida despolimerización. Por tanto, la estabilidad de los microtubulos viene determinada por la presencia o ausencia de tubulina-GTP en el extremo + (GTP-CAP). La presencia de esta caperuza determinará si el microtubulo crecerá o despolimerizará y esta característica da lugar al proceso conocido como “inestabilidad dinámica”, propiedad esencial de los microtúbulos (142, 143).

El crecimiento de los microtúbulos continúa mientras exista una concentración elevada de tubulina unida a GTP. En este caso, las moléculas de tubulina unidas a GTP se añaden

más rápido de lo que el GTP es hidrolizado, por lo que se mantiene una caperuza de GTP en el extremo de crecimiento. Por otro lado, si el GTP se hidroliza más rápidamente de lo que se añaden las nuevas subunidades, la presencia de tubulina unida al GDP lleva al desensamblaje y al acortamiento (1). Tanto in vivo como in vitro, el extremo más del microtúbulo sufre dichas conmutaciones entre las fases de crecimiento y despolimerización. Este comportamiento distintivo supone una propiedad vital para la función celular, sobre todo durante la mitosis, según ha destacado el hecho, por ejemplo, de que los agentes anticancerosos como el taxol inhiben la división celular mediante la estabilización de los microtúbulos y la supresión de su particular "inestabilidad dinámica" (2).

La correcta organización intracelular de los microtúbulos supone la participación del centro organizador principal de los microtúbulos o centrosoma, lugar en el cual se unen los extremos menos y, a partir del mismo inician éstos su crecimiento hacia la periferia celular. Es el inicio del crecimiento de los microtúbulos en el centrosoma el que establece la polaridad de los mismos en la célula. El principal componente del centrosoma es otra tubulina, la γ-tubulina, asociada con otras proteínas diferentes para componer una estructura en forma de anillo conocido como complejo del anillo de la γ-tubulina (γ-TURC) (1).

Las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) regulan el comportamiento dinámico de los microtúbulos celulares estabilizando el extremo menos para evitar su despolarización. A su vez, el crecimiento o acortamiento del extremo más está regulado por MAPs que promueven la polimerización o bien la despolarización de los dímeros de tubulina. Las polimerasas se unen al extremo más y multiplican su velocidad de crecimiento aumentando la incorporación de la tubulina-GTP, mientras que las despolimerasas estimulan su acortamiento acelerando la disociación de la tubulina-GDP. A su vez, otra clase de MAPs denominadas proteínas CLASP suprimen la catástrofe y promueven el rescate de los microtúbulos al detener su desensamblaje y reiniciar su crecimiento (1).

El plegamiento de los heterodímeros de tubulina comienza con la síntesis en el citosol de los polipéptidos de tubulina α y β. La chaperonina citosólica CCT se encarga de facilitar que puedan adquirir su estructura final terciaria con sitios de unión para GTP. Estos intermedios son liberados y procesados por otras chaperonas que permiten su estabilidad y la formación del heterodímero, TBCB y TBCE se encargan de la α-tubulina y la TBCA y TBCD en el caso de β-tubulina. En este momento se forma un complejo de plegamiento entre TBCD y TBCE con las dos subunidades de tubulina para la unión de ambos polipéptidos en un heterodímero, aún inmaduro, para que posteriormente se acople TBCC. Este es el punto necesario para desencadenar la hidrólisis de GTP unido a la β-tubulina y se produzca la liberación del dímero. Para su incorporación al microtúbulo se requiere previamente la transformación de GDP a GTP en la β-tubulina. Estos heterodímeros se ensamblan entonces de cabeza a cola para componer una lámina de protofilamentos longitudinales polares inicialmente abierta. Son las interacciones laterales entre los filamentos las que originan que pasemos de una hoja abierta a la formación de un tubo hueco. Las MAPs interactúan con la superficie externa de los microtúbulos para la regulación de su propiedad dinámica y su estabilidad, así como las proteínas motoras (dineína y quinesina) que también se unen en estas regiones

para llevar a cabo el transporte anterógrado y retrógrado de orgánulos y proteínas a lo largo de toda la célula. Así, la dinámica y función de los microtúbulos son modulados por las interacciones con otras proteínas, las proteínas motoras de los microtúbulos y proteínas asociadas a los microtúbulos no motoras (MAPs) (82). De este modo, se conoce que las mutaciones situadas en las hélices externas de las tubulinas van a afectar a la correcta interacción con estas proteínas (Figura 1).

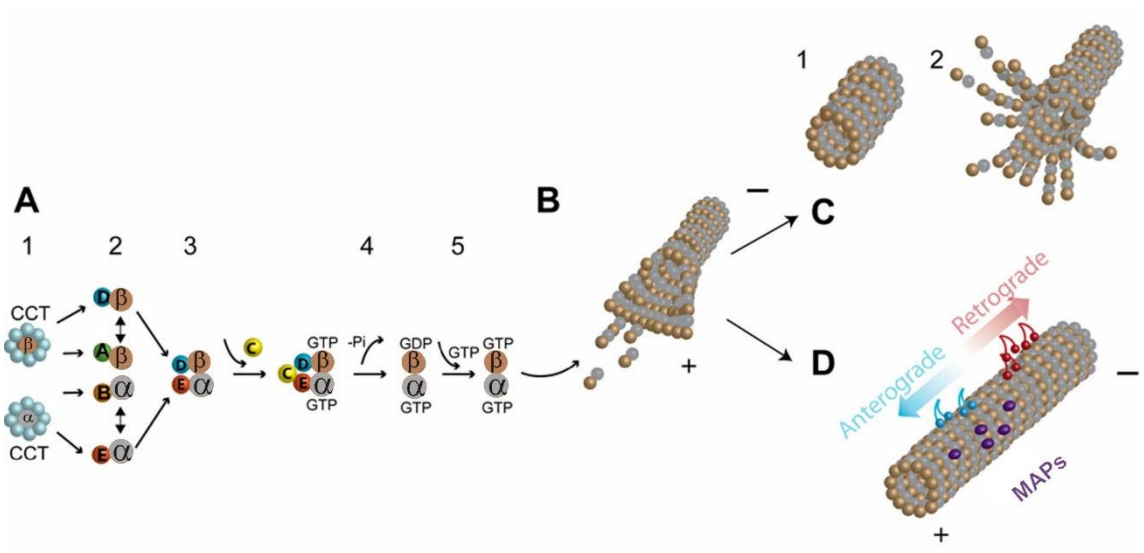

Figura 2. Plegamiento de los heterodímeros de tubulina e interacciones con MAPs y proteínas motoras. Las esferas marrones representan los monómeros de β-tubulina, las esferas de color gris representan los de α-tubulina. El resto de esferas simbolizan las chaperonas que colaboran en la estabilidad y formación del heterodímero, en verde (TBCA), naranja (TBCB), amarillo (TBCC), azul (TBCD) y rojo (TBCE) (4).

II. Dominios estructurales en tubulinas

La estructura del dímero de tubulina se obtuvo por cristalografía de electrones de hojas de tubulina inducidas por zinc y estabilizadas con el fármaco antitumoral Taxol (placlitaxel) (144). Los monómeros de α - y β- tubulina son muy similares en su compacta estructura. Las estructuras secundarias y terciarias de los monómeros son esencialmente idénticos, como se podría esperar de una identidad en > 40% en su secuencia de aproximadamente 450 aminoácidos (145). Cada monómero está formada por tres dominios secuenciales y funcionalmente distintivos: el dominio C-terminal, dominio intermedio y el dominio N-terminal (Figura 3). Cada uno de ellos se compone tanto de estructura de hélices α como de cadenas β y desarrollan al menos 5 funciones diferentes participando en la estabilidad del heterodímero, interacciones longitudinales y laterales del protofilamento, intercambio de nucleótidos e hidrólisis, y las interacciones proteína-microtúbulos (64).

La región N-terminal es un dominio formado por seis cadenas β (S1–S6) paralelas que se alternan con hélices (H1–H6). Cada una de las hélices o bucles (T1-T6) que se une al

extremo de una cadena unida al comienzo de la siguiente hélice está directamente implicada en las interacciones con el nucleótido. El bolsillo de unión a GTP es una estructura muy importante para su plegamiento, la estructura y la estabilidad de los heterodímeros de tubulina, así como para el ensamblaje de los protofilamentos y sus interacciones laterales necesarias para la estructura final del microtúbulo (64, 65). Tanto

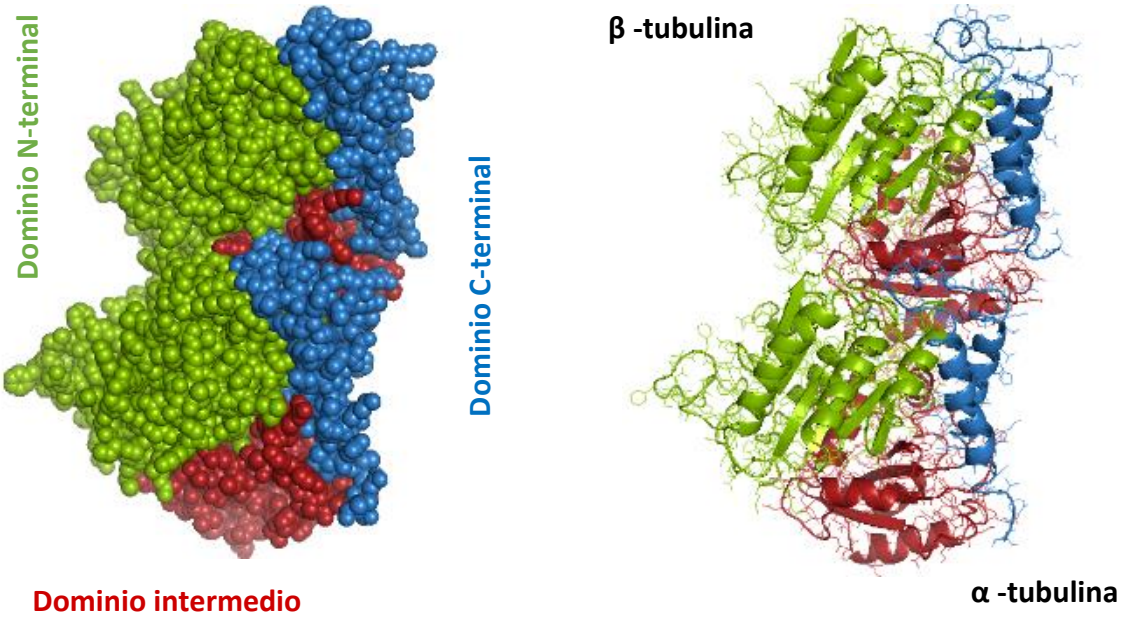

Figura 3. Dominios funcionales del dímero de tubulina

La región N-terminal es un dominio formado por seis cadenas β (S1–S6) paralelas que se alternan con hélices (H1–H6). Cada una de las hélices o bucles (T1-T6) que se une al extremo de una cadena unida al comienzo de la siguiente hélice está directamente implicada en las interacciones con el nucleótido. El bolsillo de unión a GTP es una estructura muy importante para su plegamiento, la estructura y la estabilidad de los heterodímeros de tubulina, así como para el ensamblaje de los protofilamentos y sus interacciones laterales necesarias para la estructura final del microtúbulo (64, 65). Tanto α como β-tubulina contienen un bolsillo de unión a GTP en sus sitios N y E, respectivamente, que se encuentran dentro de este dominio.

El sitio N está formado principalmente por residuos de α-tubulina y el GTP de esta α-tubulina se encuentra enterrado en la interfaz intra-heterodimérica, entre los dos monómeros, lo que impide que éste pueda ser hidrolizado a GDP. El sitio-E, por el contrario, se compone de residuos situados en el extremo + de la β-tubulina por lo que está parcialmente expuesto en la superficie del dímero, y GTP de la β-tubulina podrá

hidrolizarse eventualmente cuando los heterodímeros se incorporan al microtúbulo, y será competente para la despolimerización una vez desaparezca el GTP cap, como se muestra en la figura 4 (4).

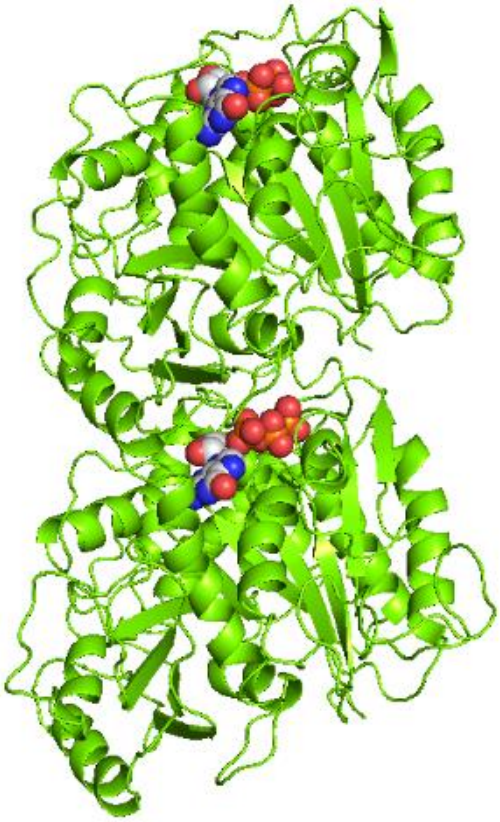

Figura 4. Representación del heterodímero de tubulina. El GTP de la α-tubulina (abajo) y el GDP de la β-tubulina (arriba) se muestran coloreados según los elementos atómicos. Se aprecia cómo el GTP de la α-tubulina queda enterrado en la cara intradimérica, mientras que el GDP de la β-tubulina queda expuesto en la superficie del dímero.

Por lo tanto, este bolsillo se compone de un sitio N (Non-exchangeable) que es el sitio de unión a la α-tubulina. El GTP de la α-tubulina no se hidroliza ya que está en la cara intradimérica. El sitio E (Exchangeable) está formado principalmente por residuos localizados en el N-terminal de la β-tubulina, algunos de cuyos residuos interaccionan con los residuos intradiméricos de la α-tubulina. El GTP se hidroliza a GDP cuando el heterodímero se ha incorporado al microtúbulo.

Las interacciones entre el dominio N-terminal y el dominio intermedio del monómero adyacente participan en los reordenamientos estructurales resultantes de la hidrólisis del GTP. Los residuos implicados directamente en la unión y la hidrólisis de nucleótidos están altamente conservadas entre α-y beta-monómeros.

El dominio C-terminal está formado principalmente por dos hélices antiparalelas (H11-H12) que cruzan los otros dominios (7). Estas hélices α quedan expuestas hacia la superficie externa de la tubulina y contiene residuos que son importantes para la estabilidad de los protofilamentos. Los que quedan orientados hacia la superficie son

los que permiten la asociación entre los microtúbulos con las proteínas motoras y demás MAPs ya que median las interacciones entre ellos, permitiendo un correcto transporte intracelular y, a su vez, otras MAPs controlan extrínsecamente la dinámica microtubular (66, 67, 68).

Los dominios intermedios van a permitir las interacciones necesarias para la estabilidad tanto entre los propios monómeros dentro del heterodímero como para la del propio microtúbulo. Otros residuos del dominio intermedio interaccionarán con dominios N-terminal adyacentes para participar en los reordenamientos estructurales que son productos de la hidrólisis del GTP dentro de la β-tubulina. Cuando se produce esta hidrólisis, el heterodímero, y como consecuencia el protofilamento, torna de su inicial estructura recta hacia una curva abierta que lleva a la despolimerización (64, 65).

Las interacciones longitudinales son mediadas por unos residuos altamente conservados situados en las regiones inter e intra-heterodiméricas y su función principal es preservar la estabilidad del dímero y el montaje del protofilamento. Las interacciones laterales entre los protofilamentos se realizan por residuos situados en las caras laterales e internas del heterodímero y son importantes para comprimir la lámina de protofilamentos en una estructura cilíndrica hueca definitiva y para regular la dinámica del microtúbulo (4).

Por lo tanto, y como es lógico, la alteración de determinadas funciones de los microtúbulos dependerá de la localización y del tipo de mutación responsable.

III. La regulación post-traduccional de los microtúbulos. Mecanismos y funciones

Ya hemos desarrollado la idea de que las células generan subtipos distintos de microtúbulos a través de la expresión de diferentes isotipos de tubulina, donde a su vez cada uno dará lugar a diferentes isoformas, pero, ¿cómo hacen esto? Mediante las modificaciones post-traduccionales. La incorporación de diferentes isotipos de tubulina para generar microtúbulos especializados (83) a través de una serie de modificaciones posteriores a la traducción (MPTs) que se producen en los propios microtúbulos es crucial para regular sus propiedades y funciones. La molécula de tubulina está sujeta a un gran número de modificaciones post-traduccionales (Tabla 2). Aquí me centraré en las MPT de los microtúbulos mejor estudiadas: tirosinación/detirosinación, generación de Δ2-tubulina, poliglutamilación, poliglicilación y acetilación.

Tubulina	Modificación	Animales	Plantas	Hongos	Protistas
α	Acetilación	Sí	Sí	No	Sí
	Detirosinación	Sí	Sí	No	Sí
	Deglutamilación	Sí	No	No	No
	Poliglutamilación	Sí	Sí	No	Sí
	Poliglicilación	Sí	No	No	Sí
	Fosforilación	Sí	No	No	Sí
	Palmitoilación	Sí	No	Sí	No
β	Fosforilación	Sí	No	No	No
	Poliglutamilación	Sí	No	No	Sí
	Poliglicilación	Sí	No	No	Sí

Tabla 2. Distribución de las modificaciones post-traduccionales de tubulina (82).

a. Detirosinación de la tubulina y generación de Δ2-tubulina

Los genes para la mayoría de los isotipos de α-tubulina de los vertebrados codifican una tirosina (Tyr) en la posición C-terminal, precedida por un glutamato. Por lo tanto, el ciclo tirosinación-detirosinación es realmente iniciado por la eliminación de un grupo funcional tirosina (detirosinación), que después puede volver a añadirse (tirosinación) y volver a la tubulina a su estado inicial (84).

La enzima encargada de la detirosinación es una peptidasa sin identificar (tubulin carboxypeptidase [TCP]). La detirosinación favorece el estado de polimerización del microtúbulo. Sí se conoce la ligasa catalizadora de la tirosinación, las tubulin tyrosinligasas (TTLs) (86). Las TTL fueron descubiertas en 1993 y demostraron ser esenciales para la organización neuronal y la limitación del crecimiento tumoral. Las TTLs ejercen su función únicamente en los dímeros solubles de tubulina. Estas TTLs muestran una especificidad exquisita por la cola de α-tubulina, ligando una tirosina sólo a su glutamato C-terminal (127). La tirosina C-terminal de la α-tubulina se demostró que era crucial para el posicionamiento de las proteínas CAP en el extremo más del microtúbulo y para el buen funcionamiento de los motores moleculares de la familia de las quiinesinas-13 (179).

El penúltimo residuo del extremo C-terminal es el glutamato (Glu). Por lo tanto, una Tyr-tubulina se puede detirosinar para formar Glu-tubulina, que luego pueden ser retirosinada a Tyr-tubulina (82). En general, Glu-tubulina aparece en los microtúbulos estables, mientras que los microtúbulos que contienen Tyr-tubulina son más dinámicos (133, 134). Por esto, Glu-tubulina se ve a menudo en el axonema, cuerpos basales, centriolos, centrosomas y el cilio primario, así como en la región perinuclear (135, 136, 137, 138, 139).

A través de la eliminación del residuo Glu terminal en una tubulina detirosinada se puede convertir en Δ2-tubulina mediante la catalización promovida por enzimas deglutamilasas de la familia CCP (85, 87). Ésta supone una MPT irreversible ya que la TTL no parece capaz de actuar sobre Δ2-tubulina. No se conoce el papel molecular de Δ2-tubulina. Se expresa en las células diferenciadas y supone el bloqueo de los microtúbulos en un estado detirosinado, ayudando así a estabilizarlos permanentemente (179).

b. Acetilación de la tubulina

La acetilación tiene lugar en la α-tubulina. Se conocen diversas enzimas acetiltransferasas que participan en la acetilación de la lisina Lys40 de la α-tubulina, como ARD1–NAT1 (arrest-defective 1–amino-terminal, α-amino) (91) y el complejo ELP (complejo de proteína elongadora). En este grupo se ha incluido MEC-17, que ha sido renombrada como α-tubulin N-acetiltransferasa 1 (αTAT1), y aunque se ha correlacionado la acetilación de la α-tubulina con αTAT1, no así a la inversa, por lo que, aunque el organismo posea una Lys40 acetilada, no quiere decir que exprese necesariamente αTAT1 y podrían existir enzimas acetiltransferasas adicionales (87). De hecho, aún quedan vías por investigar, como la acetilación de Lys252 de β-tubulina por SAN36 acetiltransferasa (88). Otras enzimas son deacetiltransferasas, véase HDAC6 (89) y SIRT2 (90).

c. Poliglutamilación y poliglicilación de tubulina

El análisis de tubulina del cerebro de los mamíferos mediante espectrometría de masas (92) llevó al notable hallazgo de la poliglutamilación, es decir, las adiciones de progresivos residuos de Glu junto al extremo C-terminal de la tubulina polimerizada (93, 94). La poliglutamilación se ha demostrado que estimula la ruptura de los microtúbulos mediada por espastina y, por lo tanto, participa en la regulación de la dinámica y la estabilidad de microtúbulos (179). El control de la extensión de la poliglutamilación es crítico para la supervivencia neuronal, como se muestra mediante el estudio PCD (degeneración de células de Purkinje), en ratones que carecen de CCP1 funcional. En estos ratones, la poliglutamilación de la tubulina conduce a la degeneración masiva de determinadas neuronas.

En las tubulinas tomadas de células ciliadas de *Paramecium spp* se demostró otra MPT, la poliglicilación, que extiende cadenas laterales de glicina (Gly) a partir de residuos de Glu cercanos al C- terminal del propio microtúbulo.

Estas modificaciones son más heterogéneas que las anteriores ya que pueden ocurrir tanto en α como en β-tubulina y formar cadenas de diferentes longitudes y ha sido difícil su estudio ante su diversa distribución entre diferentes microtúbulos o a lo largo de un mismo microtúbulo (100, 101). Sin embargo, ambas MPT utilizan sitios de modificación similares o coincidentes (102, 103). Tanto la adición como la eliminación de Glu han sido caracterizadas en el

cerebro, órgano donde ocurren numerosas MPTs. La familia de enzimas TTL-Like recoge a las enzimas que catalizan tanto la glutamilación como la poliglicilación, y cada una de ellas presenta sus propias preferencias para modificar α- tubulina o β-tubulina y añadir cadenas cortas o largas. (85, 99).

Las enzimas encargadas de la deglutamilación fueron identificadas dentro de la familia de las CCP (85, 104), y muestran, al igual que las anteriores, preferencias en las reacciones, y además de hidrolizar la cadena lineal de Glu también genera Δ2-tubulinas a partir de una tubulina detirosinada.

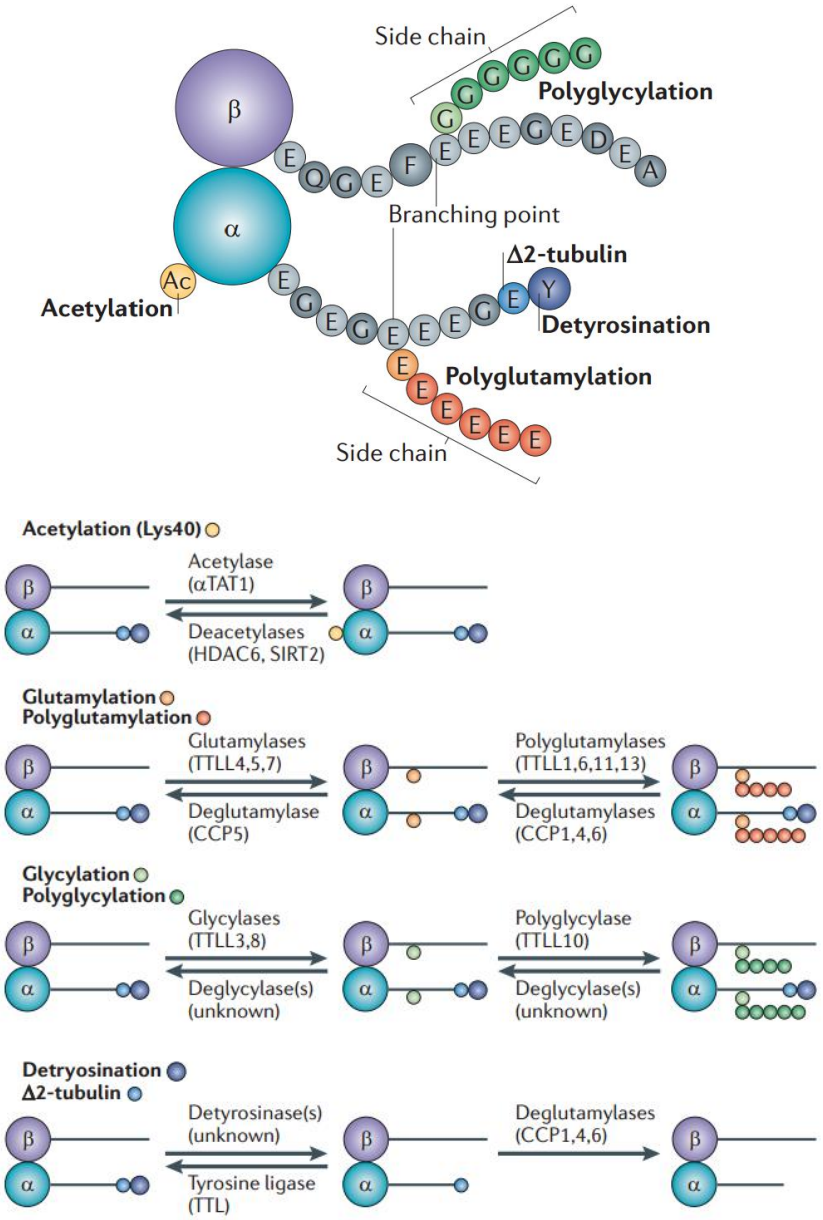

Figura 5. Modificaciones post-traduccionales de las tubulinas (MPT) y enzimas involucradas (82).

IV. Alteraciones en las modificaciones post-traduccionales

A excepción de la acetilación, todas las MPT de la tubulina discutidas aquí tienen lugar en los extremos C-terminal de α o de β-tubulina debido a que están expuestos en la superficie externa de los microtúbulos y son sitios de interacción clave para las MAPs.

La estabilidad y longevidad son las propiedades distintivas de los microtúbulos tras las modificaciones post-traduccionales. Se ha visto que la detirosinación está incrementada en los microtúbulos de larga vida en muchos tipos de células (105); pero la modificación no estabiliza los microtúbulos "per se" sino el hecho de que las quinesinas que despolimerizan los microtúbulos (pertenecientes a la familia 13 de las quinesinas) tengan preferencia por los microtúbulo tirosinados.

Existen descubrimientos que arrojan luz sobre la modificación Δ2 en los microtúbulos: una Δ2-tubulina carece del residuo Tyr en el C-terminal, de modo que esta modificación puede funcionar para bloquear irreversiblemente los microtúbulos a un estado detirosinado, lo que ayudaría a estabilizarlos. En consonancia con esta idea, se sabe que la Δ2-tubulina se produce generalmente en las etapas finales de la diferenciación neuronal (106).

Sin embargo, la MPT que más se ha relacionado con la estabilidad del microtúbulo es la acetilación. El término "microtúbulo estable" se usa a menudo casi como sinónimo de "microtúbulo acetilado". Aunque no hay demasiada evidencia experimental para asumir esta afirmación: en las células, la sobreexpresión de la deacetilasa HDAC6 condujo, como es lógico, a una disminución global en la acetilación de la tubulina, acompañada de un aumento de la susceptibilidad de los microtúbulos a la despolimerización inducida por fármacos (107); mientras que la inhibición inducida por fármacos o la reducción de la expresión de HDAC6 disminuyeron significativamente la dinámica de microtúbulos (108). Pero estas afirmaciones iniciales de que el proceso de acetilación de la tubulina estabiliza los microtúbulos fueron puestas en duda por el descubrimiento de que la proteína HDAC6 puede inhibir el crecimiento del microtúbulo (109).

Con esta información uno ya se puede ir imaginando que las MPT de la tubulina están involucrados, de alguna manera, en la regulación de la mayoría de las funciones de los microtúbulos y que las aberraciones en el patrón normal de PTM podrían conducir directa o indirectamente a la enfermedad. Los principales candidatos para este tipo de enfermedades son las conectadas a un mal funcionamiento de microtúbulos que normalmente tiene altos niveles de MPT, tales como ciliopatías (111,112) y enfermedades neurodegenerativas (113,114).

Las ciliopatías son enfermedades causadas por defectos ciliares: trastornos de asimetría izquierda-derecha, hidrocefalia y esterilidad masculina pueden ser el resultado de un mal funcionamiento o ausencia de cilios móviles. Las enfermedades que están menos relacionadas con la alteración de los cilios móviles, como la poliquistosis renal, trastornos del desarrollo y el cáncer, son el resultado de la ausencia o mal funcionamiento de los cilios primarios y la consiguiente pérdida de sus funciones de señalización. Los cilios primarios se encuentran en virtualmente todas las células de

vertebrados y han sido recientemente reconocidos como actores importantes en la señalización celular, especialmente durante el desarrollo (119, 120).

La poliglutamilación es, a su vez, otra MPT que puede regular la estabilidad de los microtúbulos a través de las enzimas Katanina y Espastina que cortan los microtúbulos (110). La observación de que las cadenas laterales largas de Glu son particularmente potentes en la activación la acción de la Espastina sugiere que existen mecanismos complementarios para proteger a los microtúbulos poliglutamilados de una ruptura descontrolada.

Alteraciones en la regulación de la glutamilación de la tubulina conduce a varias anomalías fisiológicas (142). La hiperglutamilación en las células de Purkinje en ratones lleva a la neurodegeneración (128), mientras que niveles disminuidos de glutamilación perjudica a la fluidez mucosa facilitada por los cilios, inhibe el crecimiento de neuritas y compromete la función sináptica (129, 130). Por otra parte, las mutaciones en las glutamilasas TTLL han sido implicadas en varios trastornos degenerativos incluyendo la distrofia retinal (131) y el síndrome de Joubert (132). Como hemos indicado, a nivel molecular la glutamilación favorece la estabilidad de los microtúbulos y regula la interacción entre éstos y las proteínas motoras y MAPs.

Cómo las alteraciones en las MPT están vinculadas con el cáncer está menos claro, pero el cilio primario y las vías de señalización que proporciona parecen bastante relevantes (115,116); lo que sí se ha descrito es un aumento de los niveles de tubulina detirosinada y poliglutamilada en las células cancerosas (117 y 118). Es así que la supresión de la TTL está ligada a la transformación celular y se correlaciona con un mal pronóstico en los pacientes que padecen diversas formas de cáncer (112, 122; 123, 124). En conjunto, estos resultados respaldan el papel vital de las TTL en condiciones fisiológicas y su implicación en patologías humanas. Aún más, existen hallazgos que sugieren que algunas de las mutaciones que aparecen en los genes de tubulina podrían tener un impacto en la tirosinación de la misma (140). De hecho, hay dos estudios recientes que describen una mutación de Arg390, un residuo de α-tubulina que se encuentra en la superficie de interacción entre la tubulina y la TTL, que están vinculados a casos de lisencefalia (70) y polimicrogiria (126).

V. Base funcional de las mutaciones en los genes de tubulina

Una serie de trastornos del neurodesarrollo están relacionados con mutaciones en los genes de tubulina. Los mecanismos por los cuales estas mutaciones conducen patología no se entienden completamente en la mayoría de los casos; sin embargo, en general, parece que alteran la función de la propia molécula de tubulina (125).

Los aspectos funcionales que se ven modificados a causa de estas alteraciones son 1) errores en la interacción entre los monómeros de tubulina entre sí durante la formación de los heterodímeros o con otros dímeros durante la construcción de los protofilamentos; 2) fallos en la unión a GTP/GDP y a MAPs que cambiaran la propiedad dinámica de los microtúbulos; 3) disminución de la afinidad por las proteínas motoras

necesaria para el mantenimiento y orientación axonal; y 4) cambios en las respuestas a las señales ambientales que determinan la polaridad del microtúbulo y la dirección del crecimiento axonal (3).

Las mutaciones en las tubulinas son capaces de disminuir la concentración de heterodímeros funcionales al interferir en la adecuada formación de los bolsillos de unión a GTP y/o alterar la unión con sus chaperonas moleculares. Otras mutaciones se han encontrado en las superficies interdiméricas o en las regiones de interacción lateral entre protofilamentos.

Como consecuencia de todo ello, se despliega un importante espectro de trastornos neurológicos caracterizados por una migración, diferenciación y orientación axonal neuronal alterada (Tabla 3). Las mutaciones de sustitución de aminoácidos en los genes de tubulina se encuentran ampliamente repartidas en los diferentes dominios de la tubulina, por lo que se prevé que serán modificadas diferentes funciones en cada caso.

Aquellas mutaciones que modifican las superficies de contacto intra-heterodímero o inter-heterodímero alteran las interacciones longitudinales del protofilamento. Estas regiones de la tubulina se encuentran altamente conservadas debido a su importante papel funcional, por lo que la sustitución de un único aminoácido a este nivel puede desencadenar dificultades para la formación del heterodímero, para la polimerización del microtúbulo o para desarrollar los cambios conformacionales propios de su particular dinámica ya que impiden la correcta polimerización del microtúbulo, dando lugar a unos microtúbulos poco dinámicos, con una frecuencia reducida de crecimiento y acortamiento o bien a unos microtúbulos muy inestables y tendentes a la despolimerización (64).

Otras mutaciones afectan a las superficies de contacto entre el dominio N-terminal y el dominio intermedio. En estos casos las consecuencias también resultan en la afectación de la estabilidad del heterodímero o de la propia dinámica del microtúbulo. Las interacciones que tienen lugar entre el bucle N-terminal de un heterodímero y el bucle de los dominios intermedios del heterodímero del protofilamento adyacente se denominan interacciones laterales. Dichas interacciones son las que permiten el ensamblaje de los microtúbulos y regulando su constante crecimiento y acortamiento, además de aportarles la propiedad de flexionarse y doblarse sin romperse. Este hecho es particularmente importante en las neuronas, donde los microtúbulos de disponen en densas redes y para mantener la integridad estructural deben ser resistentes a fuerzas que los deformen (69).

En el caso de las mutaciones que tienen lugar en los residuos de la superficie del microtúbulo se verán afectadas las interacciones con las proteínas motoras y las MAPs en general, dando como resultado alteraciones en las vías del desarrollo relacionadas con la migración neuronal y la guía y mantenimiento axonal. Como ejemplo de esta situación tenemos las mutaciones en residuos superficiales R402C y R402H presentes en la TUBA1A. Alteraciones en estos residuos resultan en un fenotipo de lisencefalia. A su vez, otras mutaciones conocidas en otro gen, LIS1, dan lugar a un cuadro fenotípico de lisencefalia clásica indistinguible del anterior (70, 71). Sabemos que LIS1 forma un complejo proteico con una dineína y cuya función es esencial para la migración neuronal

y la propagación de las neuritas líder, lo que sugiere que R402 tenga un papel importante para algunos aspectos funcionales de este complejo. Otras mutaciones que afectan a residuos en TUBB3 y que darán lugar a un síndrome denominado CFEOM3 interfieren en la interacción de las quinesinas con el microtúbulo, destruyendo el tráfico motor e iniciando una neurodegeneración importante en el enfermo (72).

VI. Mutaciones de las tubulinas responsables de una amplia gama de trastornos neurológicos

La organización del cerebro de los mamíferos depende de acontecimientos relacionados con una extensa migración neuronal durante el desarrollo embrionario. Después de la proliferación en la zona ventricular, las neuronas migran a su destino final de una forma orquestada (153). Estos eventos de migración están influenciados por el espectro de genes que codifican las tubulinas que son las que van a regular el avance de la neurita dominante, la translocación del núcleo y la retracción del proceso final. Cada vez está más claro que la migración nuclear y extensión del cono de crecimiento son componentes clave de la migración neuronal y que ambos son dependientes de una red dinámica de microtúbulos (154). Por lo tanto, no es sorprendente que las mutaciones en estos genes den lugar a una serie de enfermedades del desarrollo neurológico que se caracteriza por malformaciones en los pliegues cerebrales que se forman durante ese proceso (146). En la mayoría de los casos, hay profundas discapacidades acompañantes, como retraso mental severo, epilepsia y defectos motores que van de leves a graves (3).

La lisencefalia y la polimicrogiria son dichas alteraciones estructurales cerebrales resultado de la migración neuronal defectuosa de la corteza que pueden ir asociadas con la denervación de algunos nervios a nivel periférico como consecuencia de una orientación y mantenimiento axonal aberrante. La lisencefalia supone una malformación cerebral caracterizada por microcefalia y ausencia de las circunvoluciones que da lugar a un cerebro estructuralmente liso. Este trastorno abarca malformaciones que van desde la pérdida completa de las circunvoluciones y surcos cerebrales fisiológicas (agiria) a cerebros con circunvoluciones simplificadas, anormalmente gruesas (paquigiria). Por otro lado, la polimicrogiria es una malformación de la corteza cerebral en la que el patrón de pliegues habitual se sustituye por pequeños y numerosos repliegues, separados por surcos y fusionados inferiormente, y cuya corteza, que normalmente se compone de seis capas bien estructuradas, es sustituida por una de cuatro o se desestratifica por completo (73).

A nivel molecular esto responde a los mecanismos que ya hemos visto que van a estar modificados, ya sea la formación incompleta de los heterodímeros de tubulina, alteraciones en la polimerización del microtúbulo, interacciones alteradas entre las MAP o las proteínas motoras y los microtúbulos, daño en el transporte axonal o los cambios en las propiedades dinámicas intrínsecas de los microtúbulos (3).

Isotipo de tubulina	TUBA1A	TUBA8	TUBB2B	TUBB3 (a)	TUBB3 (b)	TUBB5
Espectro clínico						
Trastorno clínico	Lisencefalia (desde agiria hasta paquigiria)	Síndrome PMGOH	Polimicrogiria asimétrica	MDC[6] (Paquigiria)	Síndrome CFEOM3	Polimicrogiria focal
Deficiencia intelectual y social	Generalmente severa	Severa	Generalmente severa	Moderada a severa	Normal a moderada (mutación dependiente)[3]	Generalmente severa
Epilepsia	Presente/ Ausente[4]	Presente	Presente/ Ausente[4]	Presente/ Ausente[4]	Ausente	
Estrabismo	Comitante[1] o ausente	No	Presente/Ausente	Comitante[1] o ausente	Incomitante[2] (raramente ausente)	
Circunferencia craneal	Microcefalia	No	Microcefalia	<3-50%	Generalmente normal (mutación dependiente)	Microcefalia
Neuropatía periférica degenerativa	No	Sí	No	No	Mutación dependiente	No
Neuroimagen						
Córtex	Agiria completa hasta malformación lisencefálica moderada	Polimicrogiria bilateral generalizada	Polimicrogiria bilateral o asimétrica	Lisencefalia a desorganización cortical	Generalmente normal	Polimicrogiria asimétrica
Localización cortical	Difusa, posterior, perisilviana o frontal	-	Lóbulos frontales, parietales y temporales	Perisilviana y frontoparietal	No	
Cuerpo calloso	Agenesia a disgenesia moderada	Agenesia o disgenesia	Agenesia a disgenesia moderada	Agenesia a normal	Agenesia a normal	Disgenesia
Ganglios basales	Dismórficos a normales	-	Dismórficos a normales	Dismórficos a normales	Dismórficos a normales	Dismórficos
Cerebelo	Hipoplasia generalizada, ocasionalmente normal	-	Hipoplasia generalizada	Hipoplasia generalizada	Displasia moderada a normal	
Tronco encefálico	Hipoplasia a normal	Hipoplasia	Hipoplasia a normal	Hipoplasia a normal	Hipoplasia a normal	Hipoplasia[5]

Tabla 3. Fenotipos clínicos y radiológicos encontrados en los trastornos de los genes de tubulina (4).

[1] *El estrabismo comitante (estrabismo no paralítico) es cuando el ángulo del estrabismo es el mismo en todas las direcciones. Ambos ojos pueden moverse bien y todos los músculos que controlan sus movimientos funcionan adecuadamente. Sin embargo, los dos ojos siempre están desalineados hasta el mismo punto.*
[2] *El estrabismo incomitante (estrabismo paralítico) es cuando el ángulo del estrabismo varía. En una dirección no hay estrabismo, pero cuando los ojos miran hacia la otra dirección quedan desalineados.*
[3] *La afectación cognitiva y social variará en función del tipo de mutación que afecte a TUBB3.*
[4] *Se han encontrado individuos con episodios epilépticos, así como otros sin crisis.*
[5] *Hipoplasia, subdesarrollo o desarrollo incompleto o insuficiente de un tejido.*
[6] *MDC, Malformaciones del desarrollo cortical*

VII. Mutaciones en TUBA1A

En este apartado estableceremos la naturaleza de los trastornos de la migración neuronal causados por mutaciones en TUBA1A. En varios casos, estos defectos pueden atribuirse a fallos en las interacciones en la vía de ensamblaje *de novo* de los heterodímeros de tubulina.

En este contexto, es importante señalar que el heterodímero de tubulina no se puede ensamblar de forma espontánea. Una vez sintetizados los monómeros de α y β-tubulina, primero deben interactuar con varias chaperonas moleculares. La vía implica al menos siete proteínas o complejos diferentes, la mayoría de los cuales juegan un papel indispensable en la formación del heterodímero. Entre ellas se incluyen: prefoldina (PFD, un complejo formado por seis subunidades diferentes) (147), CCT/TRIC, la chaperonina citosólica que es un complejo de ocho subunidades diferentes aunque relacionadas (148) y cinco proteínas que actúan como chaperonas moleculares denominadas cofactores del plegamiento de tubulinas (149) que funcionan en conjunto para formar el heterodímero de α- y β tubulina (ninguna de las dos subunidades es capaz de existir como entidad estable independiente). La naturaleza esencial de esta vía y sus numerosos componentes ofrece una multitud de oportunidades para que los cambios genéticos puedan resultar en un ensamblaje comprometido del heterodímero. Recientemente se ha descubierto que todas las chaperonas que capturan intermediarios de plegamiento de α- y ß-tubulinas y las ensamblan en heterodímeros de tubulina funcionales son esenciales para la vida en eucariotas superiores (180).

Las mutaciones en el gen TUBA1A han sido estudiadas para determinar con exactitud el mecanismo molecular responsable de la patología, y se ha encontrado a diferentes niveles: interacción defectuosa con prefoldina, una reducción de la eficiencia en la generación de los intermedios de plegamiento como resultado de una interacción ineficiente con la chaperonina citosólica (CCT), y, en varios casos, un fallo en la interacción con TBCB (una de las cinco chaperonas específicas de tubulina que actúan en la ruta poschaperonina) (146).

En los estudios in vitro e in vivo han sido identificados una serie de defectos que pueden contribuir a la reducción en la formación de heterodímeros en el caso de estos mutantes. En primer lugar, se observa un mayor rendimiento del complejo α-tubulina/PFD en las células salvajes (sin mutaciones). La PFD funciona presentando

polipéptidos de tubulina recién sintetizados a CCT, transportando dichos substratos e impidiendo interacciones no deseadas (147). En los estudios in vitro se observa que en las células en las que se provocaron reacciones de translación/transcripción en el residuo R402C aparece una reducción de los niveles del complejo α-tubulina/CCT en comparación con las células salvajes. En segundo lugar, se ha visto una eficiencia reducida en el plegamiento por CCT en el caso de células con mutaciones en I188L, I238V y especialmente en L397P y R402C, sugiriendo que estos polipéptidos tienen comprometida su capacidad para adquirir la estructura del sitio-N del bolsillo de unión a GTP. En tercer lugar, en el caso de las mutaciones provocadas en V303G y L397P, se detectaron problemas de interacción entre los intermedios en los que participan CCT y TBCB.

Por lo tanto, todas las chaperonas que capturan intermediarios de plegamiento tanto de α como de ß-tubulina para ensamblarlos en heterodímeros de tubulina funcionales son esenciales para la vida en organismos eucariotas superiores (150, 151). Es así que se podría esperar que interacciones defectuosas con estas chaperonas como resultado de mutaciones tanto en α como en β pueda dar lugar a diferentes patologías como los que describiré a continuación (146).

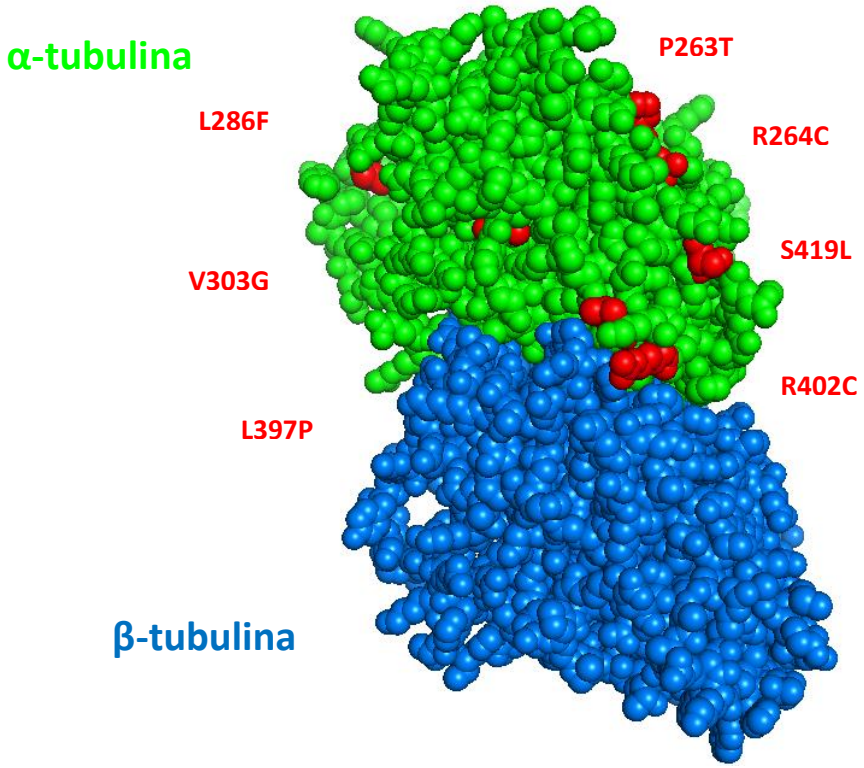

Figura 6. Localización de algunos residuos mutados dentro de la estructura de α-tubulina. La figura muestra la localización superficial de siete aminoácidos [R264C, P263T, L286F, V303G, L397P, R402C y S419L]. Existen otras dos mutaciones asociadas a enfermedad situados en I188L y I238V que no se muestran en la figura debido a que están enterrados en el interior de la molécula pudiendo afectar a la estabilidad del monómero (146).

Aunque varios isotipos de α-tubulina se expresan en el cerebro de los mamíferos, la codificada por TUBA1A es especialmente dominante en este órgano (Tabla 1). Cualquier mutación que resulte en una disminución de este isotipo competente para la formación del heterodímero podría tener un impacto en los niveles totales de tubulina, consecuentemente con una escasez en el número de microtúbulos que pueda comprometer la migración neuronal y su diferenciación.

Las mutaciones en TUBA1A encontradas en humanos a lo largo de varios estudios eran todas esporádicas. Se han descrito 23 mutaciones sin sentido heterocigóticas en este gen. Los sujetos con dichas mutaciones presentan de forma constante microcefalia, discapacidad intelectual, alteraciones motoras graves y convulsiones. Además, pueden ir asociados otros signos como son el estrabismo concomitante o una debilidad a nivel de la musculatura facial. La mayoría de los niños que albergan estas mutaciones padecen algún grado de lisencefalia (4).

La laminación cortical reducida, junto con una formación hipoplásica del tronco cerebral, el cerebelo, el hipocampo, los tractos corticoespinales y los ganglios basales (cápsula interna) y una posible agenesia del cuerpo calloso, son los responsables del importante déficit neurológico en estas personas (4).

VIII. Mutaciones en TUBA8

Se ha descrito recientemente una mutación en el gen de tubulina TUBA8 que da lugar a un síndrome autosómico recesivo reconocible caracterizado por polimicrogiria generalizada en asociación con hipoplasia del nervio óptico denominado PMGOH.

Como habíamos mencionado en el apartado de los isotipos de tubulina, el TUBA8 es un caso atípico evolutivamente dentro de la familia de las tubulinas (155) ya que curiosamente sus dos regiones más divergentes de la secuencia se ha visto en los otros miembros de la familia que son susceptibles a modificaciones postraduccionales importantes para el desarrollo neurológico. La primera de estas modificaciones es la escisión específica y religación de un residuo de tirosina C-terminal cuyo estado modula la unión de algunas proteínas a la punta de los microtúbulos que influyen en los procesos morfológicos durante la diferenciación neuronal. Pero TUBA8 es poco probable que sea susceptible a esta escisión/religación, aunque mantiene la secuencia consenso (-EEY/F) para la interacción con un dominio CAP-Gly, dado que su último residuo C-terminal es la fenilalanina (156). La segunda modificación comprende la acetilación de la lisina 40, un residuo conservado en todas las α-tubulina excepto en TUBA8. Por último, la localización del gen TUBA8 es digna de mención puesto que es el gen más próximo a la secuencia repetitiva cuya delección es responsable del Síndrome de DiGeorge (microdelección en 22q11.2). Cabe destacar que una pequeña proporción de niños con este síndrome presentan además polimicrogiria, y, de hecho, ésta es probablemente la causa más común de polimicrogiria. Pero TUBA8 no se vio deleccionado en este síndrome, hecho que hace pensar que la posición de TUBA8 está relacionada con la asociación entre el Síndrome de DiGeorge y la polimicrogiria (157).

Estudios del patrón de expresión de TUBA8 en el cerebro humano en desarrollo han vislumbrado que se expresa ampliamente en el desarrollo de las estructuras cerebrales. De hecho, se ha observado que tanto TUBA8 como TUBB2B se expresan en las neuronas corticales postmitóticas de la placa cortical y placa de conexión cerebral, y apenas se expresa en otras regiones como la zona marginal, zona ventricular y zona intermedia, así como TUBA1A sí se expresa fuertemente en las neuronas de la zona intermedia. De modo que, TUBA8 se expresa de forma más fuerte en las placas corticales II-III y V y en las placas de conexión mientras que la expresión de TUBB2B disminuye en el córtex postnatal (158), lo que hace pensar que TUBA8 tiene un papel en la migración neuronal de las neuronas de la capa más profunda y su organización cortical (que no se ha visto ni en TUBA1A ni TUBB2B), pero su expresión es mucho menor una vez las células alcanzan el plano cortical (6).

Se han estudiado 4 hijos de dos familias consanguíneas de origen paquistaní que presentaban características clínicas similares: profundo deterioro neurológico, retraso severo del desarrollo, hipotonía y convulsiones. Ninguno presentaba dimorfismos, pero todos desarrollaron una hipoplasia del nervio óptico. En los estudios de neuroimagen se pone de manifiesto una amplia polimicrogiria bilateral generalizada, cuerpo calloso displásico o ausente y patrones anormales en el tronco encefálico (Figura 7).

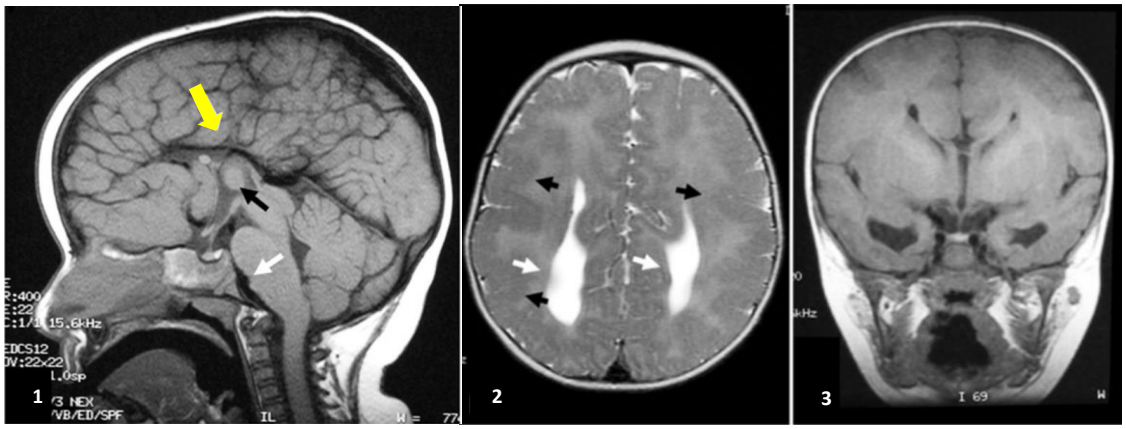

Figura 7. Resonancia magnética nuclear (RMN) de un individuo afectado por la mutación en TUBA8, corte sagital (1), axial (2) y coronal (3). 1) Cuerpo calloso ausente, al igual que la circunvolución cingulada (flecha amarilla). Pliegues desorganizados que irradian hacia el tercer ventrículo. Se aprecia una masa prominente flecha negra). Malformación del tronco encefálico con la pérdida de la unión ponto-medular (flecha blanca). 2) La corteza se engrosa y el patrón de circunvoluciones es anormal. La polimicrogiria (flechas negras) y la agenesia del cuerpo calloso dan lugar a una colpocefalia (flechas blancas). 3) Corte coronal a nivel del tercer ventrículo, demostrando la ausencia de cuerpo calloso dando lugar a una configuración en "casco de Viquingo" (6).

La secuenciación de los miembros afectados de las dos familias reveló una delección homocigótica de 14 pb en el intrón 1 de TUBA8 (Figura 8). Esta delección se sitúa a 5' del sitio de unión con el exón 2, eliminando gran parte del tracto polipirimidina del sitio aceptor, por lo que esta mutación podría interferir en el correcto empalme del exón 2.

Esto supone una perturbación en la transcripción del gen y, por lo tanto, unos niveles de proteína reducidos de forma importante. Sin embargo, se sospecha la existencia de otras mutaciones asociadas que den este cuadro clínico completo que aún se están investigando (159).

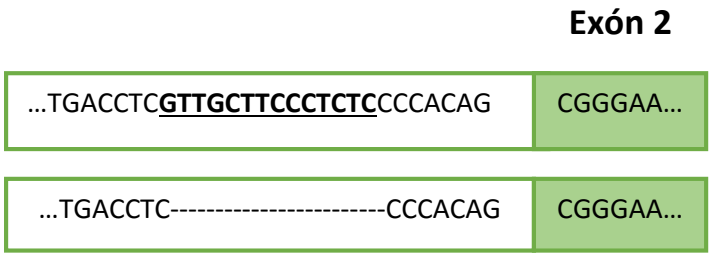

Figura 8. Mutación del gen TUBA8 en individuos afectos de PMGOH. Esquema que muestra el sitio y la extensión de la delección de las 14 pb (6).

IX. Mutaciones en TUBB3

Han sido estudiadas veintitrés mutaciones sin sentido en humanos heterocigotos en los genes que codifican para las tubulinas TUBB2B y TUBB3 (161). La correlación fenotipo-genotipo apoya la relación entre el isotipo mutado y los fenotipos neurológicos resultantes. Las mutaciones en TUBB3 dan lugar a un variado espectro de malformaciones neurológicas y discapacidades cognitivas, algunos de ellos segregados a partir de determinadas sustituciones de aminoácidos (80, 81).

Las mutaciones en TUBB3, gen que se expresa en las neuronas postmitóticas diferenciadas, pero no en la glía radial, dan lugar a dos grupos fenotípicos distintos (161,162).

Se han observado sustituciones en ocho aminoácidos en diferentes casos que dan como resultado un síndrome de fibrosis congénita de los músculos extraoculares, denominado CFEOM (Congenital Fibrosis of the Extraocular Muscles), una disfunción completa o parcial del nervio motor ocular común (par craneal III) junto con una atrofia de los músculos inervados por éste (5). Se trata de un trastorno congénito en el que el mal desarrollo de los axones de los nervios craneales conduce a la ptosis (párpados caídos) y a movimientos oculares restringidos (164). Un conjunto de mutaciones en este gen, por otro lado, cursan además con una debilidad facial, intelectual y discapacidades sociales y sensorimotoras con una progresiva neuropatía periférica. A nivel central se han descrito fallos en la génesis de los tractos axonales, hipoplasia de los tractos corticoespinales y ganglios basales dismórficos (80). Las pruebas de neuroimagen en humanos revelaron la hipoplasia del nervio craneal y un modelo de ratón de la TUBB3 con una sustitución de R262C sugiere que esto se debe a la mala orientación axón craneal. Ni las pruebas de neuroimagen ni el modelo ratón han identificado defectos de

laminación cortical, lo que indica que estas mutaciones causantes de CFEOM conducen a una denervación axonal primaria (161,163).

El segundo grupo de mutaciones en TUBB3 incluye seis sustituciones de aminoácidos que generan un espectro de displasias corticales colectivamente denominadas malformaciones del desarrollo cortical (MCD), incluyendo la desorganización y simplificación de los pliegues y polimicrogiria, una displasia que, como ya sabemos, resulta en una migración neuronal deteriorada y se caracteriza por la poca profundidad de los surcos o un número excesivo de circunvoluciones en la superficie del cerebro (165). Estos individuos presentan polimicrogiria predominantemente frontal, al verse alterados diferentes residuos de aminoácidos con respecto al anterior grupo, hipoplasia del tronco encefálico y del cerebelo y, compartiendo con el resto de mutaciones en TUBB3, disgenesia del cuerpo calloso y del tracto corticoespinal y dismorfismos de los ganglios basales, dato que parece característico de estos trastornos asociados a tubulinas (81).

Estos pacientes con MCD tienen discapacidades intelectuales y motoras y pueden además tener estrabismo comitante (no paralítico), pero no padecen CFEOM. Las pruebas de imagen confirmaron la hipoplasia del cuerpo calloso y haces de fibras de la cápsula interna desorganizadas (162).

X. Mutaciones en TUBB2B

Ocho sustituciones de aminoácidos en TUBB2B, que está altamente expresado en las neuronas y glía, se han reportado como las causantes de defectos en el plegamiento de las tubulinas. En estos casos aparece una completa alteración de la migración neuronal durante el desarrollo y defectos en la glía radial. La glía radial es la célula bipolar que abarca todo el ancho de la corteza en el desarrollo del sistema nervioso central y que, durante el mismo, es empleada por las neuronas recién formadas a modo de guía para desplazarse a lo largo de las fibras gliales radiales con el fin de llegar a sus destinos finales (79).

El resultado de este defecto es la evolución cerebral hacia la polimicrogiria, que suele predominar en estos niños en los lóbulos frontales y temporales bilateralmente y de forma asimétrica. De igual modo que en las mutaciones de TUBA1A, también se asocia una disgenesia del cuerpo calloso, dimorfismos de los ganglios basales y cerebelo y la hipoplasia del tronco encefálico (4). Los sujetos con dichas alteraciones continúan presentando un cuadro de microcefalia, discapacidad intelectual y motora junto con convulsiones.

Se han asociado estas mutaciones con niveles reducidos de TUBB2B, lo que sugiere que esta tubulina puede ser esencial para la migración neuronal adecuada al generar polimicrogiria debido a la disminución de su expresión (158).

Mutaciones heterocigóticas en TUBB2B como causa de CFEOM y discapacidad intelectual

Por otro lado, ha sido identificada una nueva mutación en TUBB2B en humanos heterocigóticos que produce CFEOM, polimicrogiria bilateral y una escasez de conexiones callosas homotópicas, es decir, interhemisféricas (166). La incógnita en este momento es si los portadores de esta mutación pueden cursar con denervación axonal primaria, y por qué sólo un subconjunto de mutaciones en TUBB2B causa CFEOM.

La secuenciación de los genes TUBA1A y TUBB2B desvelaron una sustitución de nucleótidos c.1261G>A en el exón 4 de TUBB2B que produce la sustitución de una lisina cargada positivamente que es cambiada por un ácido glutámico cargado negativamente en el residuo 421 de TUBB2B (E421K). El residuo E421 se ha conservado evolutivamente en los isotipos de β-tubulina desde la levadura hasta los humanos. Junto con E410 y D417, E421 se encuentra en el C-terminal H12 de la hélice α de la β-tubulina y es crucial para las interacciones de los microtúbulos con las quinesinas (167). Esto es un importante hallazgo ya que previamente ya habían sido identificados síndromes CFEOM causados por sustituciones de aminoácidos situados en los residuos E410 y D417 de TUBB3 (161).

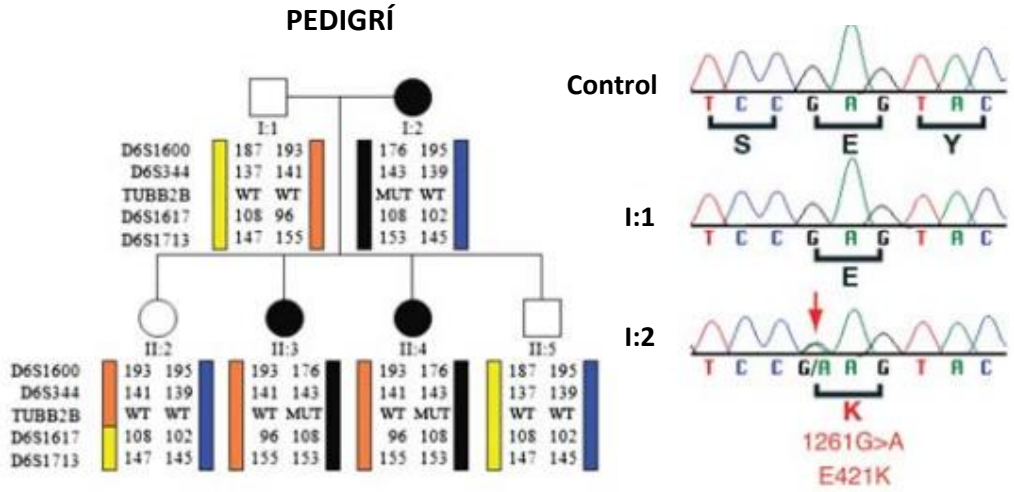

Figura 9. La mutación heterocigótica 1261G>A en TUBB2B (E421K) produce CFEOM y polimicrogiria. Pedigrí y análisis del cromosoma 6 dirigido a identificar un haplotipo en TUBB2B que segregue la enfermedad. Las formas sólidas indican individuos clínicamente afectados. 'MUT' indica la presencia de la mutación en TUBB2B, mientras que 'WT' indica el alelo TUBB2B de tipo salvaje. La secuenciación selectiva de los exones codificantes de TUBB2B y de los sitios de empalme revela una mutación heterocigótica 1261G>A (E421K) (flecha roja) que se encuentra en todos los individuos fenotípicamente afectados y no en las personas no afectadas del pedigrí (160).

Para estimar la frecuencia de variantes TUBB2B causantes de CFEOM, se secuenció el TUBB2B en 25 familias adicionales y 80 individuos negativos para la mutación productora de CFEOM y que no padecían otros tipos de denervación craneal congénita ni presentaban polimicrogiria. No fueron encontradas variantes adicionales asociadas a la enfermedad. En conjunto, estos datos apoyan la afirmación de que las mutaciones en TUBB2B suponen una causa rara de CFEOM.

Al introducir esta mutación en las neuronas corticales en desarrollo de ratones no se consiguió inducir fenotipos con polimicrogiria y fallos migratorios, pero sí se encontraron alteraciones en la conectividad, proporcionando así evidencia de un fenotipo de defecto axonal primario. El uso de ensayos celulares in vitro e in vivo dieron pie a encontrar que los αβ-heterodímeros que contienen la sustitución E421K se incorporan a los microtúbulos correctamente, pero alteran la inestabilidad dinámica y las interacciones específicas del microtúbulo con lasquinesinas. Además, la producción de estos heterodímeros puede verse disminuida (haploinsuficiencia). Estos fenotipos moleculares difieren de aquellos causados por mutaciones en TUBB2B que no conducen a un CFEOM (los que mencionamos inicialmente), proporcionando una explicación para la divergencia en sus respectivos fenotipos (160).

Estos datos demuestran que la sustitución E421K en el gen TUBB2B puede causar denervación axonal primaria, es decir, que no es secundaria a una displasia cortical o a una producción o migración neuronal anormal. Así es que la denervación axonal observada, de acuerdo con los hallazgos de neuroimagen obtenido en las personas estudiadas, parece ser un fenotipo primario y dominante (160).

Familia afectada por el síndrome caracterizado por CFEOM y discapacidad intelectual

Ha sido estudiada una familia de raza caucásica australiana, en la que la madre (44 años) y dos de sus cuatro hijos (21 y 20 años) tienen CFEOM (166). Todos tienen ptosis bilateral (párpados caídos), ambos ojos con la mirada fija hacia abajo y una posición compensatoria cabeza-barbilla para arriba. Los movimientos verticales de los ojos son muy limitados y tienen movimientos de convergencia desiguales, y los movimientos horizontales son variablemente restringidos. Sus dos hijas afectadas mostraron una discapacidad intelectual significativa (por debajo del percentil 1) en las pruebas neuropsicológicas, y tenía una circunferencia craneal por debajo del percentil 2, mientras que sus alturas y pesos eran normales (entre los percentiles 10 y 50). La madre, aunque no fue evaluada formalmente, sí que fue determinada su baja función intelectual con anterioridad. Una de las hijas tiene dificultades para la modulación de su comportamiento. Los exámenes restantes incluyeron la lámpara de hendidura (para la exploración de las estructuras de la porción anterior del ojo), fondo de ojo, reacción pupilar, la función del nervio craneal no oculomotor, la fuerza motora y el tono muscular, reflejos tendinosos profundos, modalidades y coordinación sensoriales y fueron todos normales. Ninguno ha perdido hitos del desarrollo, ni experimentado ataques o desarrollado síntomas de neuropatía periférica (160).

Fenotipo clínico	Circunferencia craneal	Microcefalia
	Discapacidad intelectual	Sí
	Epilepsia	No
	Función motora	Normal
	Movimientos oculares	CFEOM
	Movimientos faciales	Normal
	Neuropatía periférica	No
Neuroimagen	Patrón cortical	Polimicrogiria bilateral
	Localización PMG	Perisilviana a difusa
	Ganglios basales	Dismorfia asimétrica
	Cuerpo calloso	Hipoplásico
	Cerebelo	Displasia intermedia
	Tronco encefálico	Macroscópicamente normal
	Músculos oculares	Hipoplásicos (RM, RL, RS, OS)

Tabla 4. Tabla resumen de los hallazgos clínicos y neurorradiológicos de miembros de la familia afectados por el Síndrome CFEOM. Músculos oculares (músculos extrínsecos del ojo): Recto medial (RM), recto lateral (RL), recto superior (RS) y oblicuo superior (OS) (160).

Las imágenes obtenidas por resonancia (RMN) de las hijas a la edad de 4 y 9 años mostraron la hipoplasia variable de los músculos extraoculares afectados, y la imagen de la madre a la edad de 26 años habían revelado el adelgazamiento de los músculos rectos mediales y laterales y un músculo recto superior hipoplásico y el músculo elevador del párpado superior también hipoplásico, acorde con el síndrome CFEOM (166). Exploraciones anteriores de las hijas revelaron una polimicrogiria bilateral difusa, la dilatación del ventrículo lateral izquierdo con hipoplasia del núcleo caudado ipsilateral, y la fusión de la cabeza del núcleo caudado con el putamen subyacente (166). Ambos tienen un cuerpo calloso delgado comparativamente con el modelo control (Figura 10).

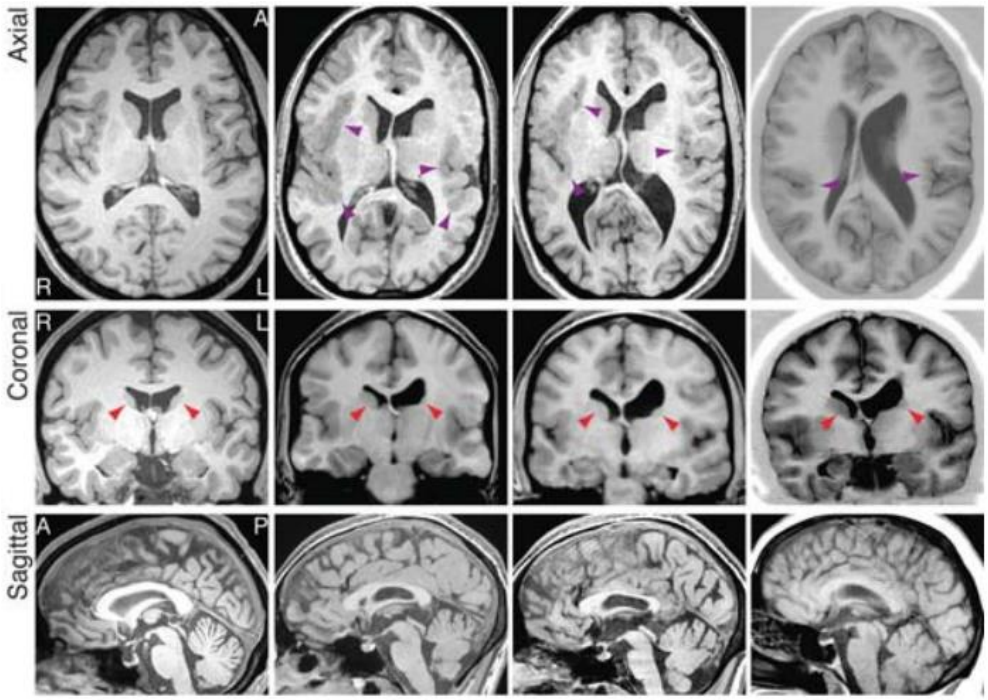

Figura 10. Los cortes axiales muestran el grado de polimicrogiria en estas pacientes (flechas moradas). Los cortes coronales demuestran el dimorfismo de los ganglios basales: displasia de la cabeza del núcleo caudado izquierdo, y un putamen mal definido (flechas rojas). Los cortes sagitales muestran la hipoplasia del cuerpo calloso (160).

Patogénesis de CFEOM

Mediante la definición de una serie de mutaciones causantes de CFEOM en TUBB3, y ahora en TUBB2B, emergen fuertes relaciones entre los fenotipos moleculares y la enfermedad.

Estructuralmente, las sustituciones que dan lugar al CFEOM alteran los residuos que interactúan directamente con MAPs incluyendo proteínas motoras, o residuos localizados en la superficie de interacción entre heterodímeros (161, 163). En teoría, estas sustituciones podrían alterar la dinámica de los microtúbulos al interferir directamente con las interacciones tubulina-tubulina, o cambiando la actividad de las proteínas que regulan el crecimiento y acortamiento de los microtúbulos, tales como las quinesinas (168).

Para despejar esta teoría se realizó un análisis de quinesinas citoplásmicas en un modelo de levadura que reveló que cinco de ocho mutaciones en TUBB3 productoras de CFEOM modificaban la localización normal de la quinesina reguladora Kip3p, la cual despolimeriza el microtúbulo, mientras que la quinesina Kip2p fue menos gravemente afectada. Esta tendencia sugiere que algunas mutaciones CFEOM alteran las moléculas reguladoras, lo que conduce a una dinámica de los microtúbulos defectuosa.

En este estudio, se elaboró también un modelo de una mutación CFEOM de un isotipo de tubulina humana diferente, TUBB2B, y de nuevo se encontró que la localización de Kip3p estaba más severamente afectada que la de Kip2p. La aparición de estos fenotipos moleculares en las mutaciones CFEOM argumenta que las propiedades bioquímicas son fundamentales para conocer la patogénesis y etiología molecular del síndrome CFEOM. Serán necesarios futuros estudios biofísicos y bioquímicos in vitro para determinar las cascadas moleculares precisas que conducen a la desorientación de los nervios craneales (169).

Patogénesis de las mutaciones E421K en TUBB2B

De acuerdo estos estudios previos, los resultados apoyan que la etiología del CFEOM es dominante genéticamente y que la sustitución E421K en TUBB2B da lugar al síndrome CFEOM, pero no con la mayoría de las otras sustituciones estudiadas en TUBB2B.

Los fenotipos axonales dominantes asociados con la mutación E421K en TUBB2B podrían ser generados a través de diversos mecanismos. La mutación E421K podría bloquear la vía de plegamiento de la tubulina mediada por chaperonas y dar lugar a una disminución global de los niveles de formación de heterodímeros de tubulina, suceso que también fue mencionado para las otras mutaciones en TUBB2B (158). Alternativamente, los αβ-heterodímeros mutantes podrían incorporarse al polímero y alterar la función de los microtúbulos, como sucedía en las mutaciones en TUBB3 que causan CFEOM (161).

Como ya se ha mencionado, en la sustitución E421K-TUBB2B subyace un síndrome caracterizado por CFEOM y discapacidad intelectual. El uso de la resonancia magnética con DTI (una técnica especial de imágenes por resonancia magnética combinada con un análisis de imágenes realizado por ordenador), permitió describir en la familia afectada la presencia de polimicrogiria, unos ganglios basales dismórficos asimétricos y la escasez de conexiones homotópicas (interhemisféricas) en el cuerpo calloso. El análisis DTI mostró que las hijas afectadas desarrollan un patrón aberrante de la trayectoria de las fibras comisurales del cuerpo calloso que no es común en los otros pacientes con polimicrogiria (Figura 11).

El estudio en ratones de la sobreexpresión de E421K en las neuronas de proyección del cuerpo calloso mostró que impedía el desarrollo normal de la conectividad homotópica e inervación, sin alterar la migración celular. Esta sobreexpresión no impide a los axones de las neuronas del cuerpo calloso cruzar la línea media pero sí que interrumpe su desarrollo a medida que van atravesándola. Por otra parte, a pesar del crecimiento relativamente normal del axón primario, las neuronas que expresan E421K no generan ramas intersticiales apropiadamente y envían ramas promiscuas en la capa VI de la corteza ipsilateral, mientras que sus axones no pueden inervar regiones del lado contralateral (171).

En levaduras, los microtúbulos con tubulinas que albergan la sustitución E421K se observó que habían aumentado sus tasas de polimerización y despolimerización además de una reducción de Kip3p en sus extremos + (160). Funcionalmente, las levaduras que expresan este alelo han aumentado la estabilidad de sus microtúbulos, precisamente lo opuesto a lo observado en las levaduras con otras mutaciones en TUBB2B, que producían haploinsuficiencia. Estudios funcionales previos apoyan que las otras mutaciones en TUBB2B producen haploinsuficiencia porque las proteínas mutantes se pliegan e incorporan mal. Además, las neuronas corticales de la rata con menores niveles de expresión de TUBB2B presentan defectos migratorios (158), proporcionando un fuerte vínculo entre la haploinsuficiencia de TUBB2B y la polimicrogiria.

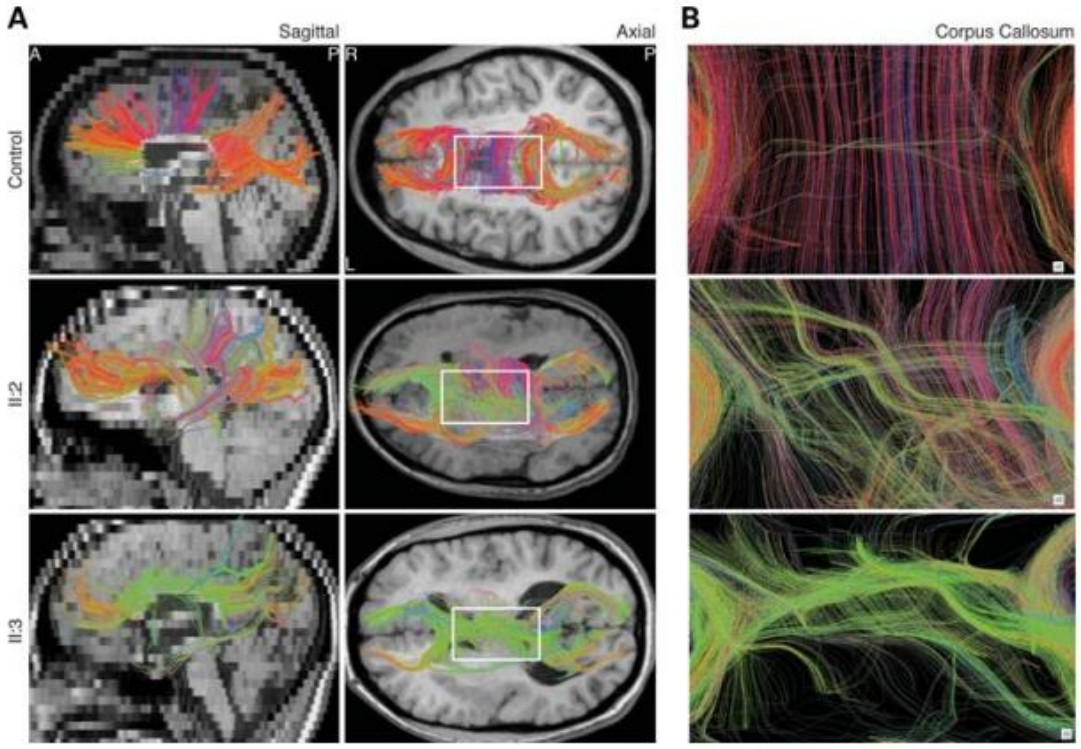

Figura 11. Imágenes segmentadas mediante la técnica DTI de las fibras comisurales del cuerpo calloso. Se muestra la conectividad homotópico anormal del cuerpo calloso asociada con la mutación E421K en TUBB2B. En el paciente control sano muchas fibras se colorean en rojo, mientras que en los pacientes con la mutación muchas fibras comisurales son de color verde, lo que indica una falta de conectividad homotópica (interhemisférica) normal. Código de colores: rojo, derecha-izquierda; verde, anterior-posterior; azul, inferior-superior (160).

Habíamos mencionado ya que la sustitución E421K no altera significativamente la incorporación de los heterodímeros a los polímeros. Por lo tanto, una explicación posible de que E421K pueda causar la polimicrogiria es la haploinsuficiencia que genera. Otra explicación plausible es la expresión en humanos de TUBB2B en las neuronas posmitóticas y en los progenitores, incluyendo la glía radial. El mal desarrollo de las neuronas corticales de la guía radial, necesaria para la migración neuronal, puede ser el responsable de la polimicrogiria. De hecho, las sustituciones en D417N y E421K en

TUBB2B causan polimicrogiria mientras que sustituciones en D417N/H y E410K en TUBB3, que no se expresa en la glía radial, no causan polimicrogiria (161,170).

En conjunto, estos datos demuestran que las mutaciones en TUBB2B definitivamente inducen la denervación axonal de forma primaria y el desarrollo de polimicrogiria, proporcionando una mayor comprensión de la base genética, molecular y celular donde subyace el espectro de fenotipos neurológicos relacionados con las modificaciones en las tubulinas y abren camino un amplio campo de investigación clínicamente significativo.

Diferencias entre los síndromes CFEOM causados por TUBB2B y TUBB3

Hay diferencias claras entre CFEOM causados por mutaciones en los isotipos β-tubulina TUBB2B y TUBB3.

La primera de ellas es la frecuencia de la mutación que causa CFEOM, parece ser mucho más alta en TUBB3 que en TUBB2B. Se han encontrado 29 personas con CFEOM originado por mutaciones en TUBB3, pero sólo tres con la mutación en TUBB2B. En segundo lugar, la mutación en TUBB2B, además de presentar un trastorno de denervación cortical congénito, se asociaba con polimicrogiria, mientras las mutaciones en TUBB3 no todas ellas causan malformaciones corticales (recordemos que existía un subgrupo que sí lo padecía), pero puede asociarse con la disfunción del nervio craneal (nervio oculomotor o par III), polineuropatía axonal progresiva y anomalías en la sustancia blanca central (161).

Estas aparentes diferencias parecen deberse a los distintos patrones de expresión entre TUBB2B y TUBB3. La expresión de TUBB2B, pero no en el caso de TUBB3, en progenitores mitóticos (incluyendo la glía radial) puede explicar la prevalencia de la polimicrogiria constante asociada a TUBB2B, pero de forma uniforme a TUBB3. Sin embargo, las mutaciones en TUBB3 sí que resultan en malformaciones corticales en un subgrupo de sujetos, e incluso a polimicrogiria, pero estas mutaciones descritas previamente dentro del apartado de mutaciones en TUBB3 no cursan simultáneamente con CFEOM (162). Así, estas mutaciones podrían seguir una mecánica diferente a las mutaciones causantes de CFEOM.

Las diferencias de expresión de los isotipos también pueden explicar que las mutaciones en TUBB2B generalmente suelan ser más deletéreas que las mutaciones en TUBB3, lo que lleva a una mayor incidencia de letalidad embrionaria y una escasez de mutaciones en TUBB2B. Por último, la asociación de las mutaciones -D417N/H y -E410K en el gen TUBB3 con la polineuropatía axonal sensitiva periférica es reflejo de la elevada expresión de TUBB3, pero no de TUBB2B, en el sistema nervioso periférico (172).

Las diferencias fenotípicas de CFEOM causado por TUBB2B y TUBB3 también se pueden explicar por las diferencias en las funciones del isotipo. Aunque los isotipos de β-tubulina muestran una conservación de más del 90% en la secuencia de aminoácidos, existen diferencias fundamentales, como ya sabemos, especialmente en la cola C-terminal, que se sabe que regulan la unión de las diferentes MAPs. Los microtúbulos con

composiciones de diferentes isotipos también exhiben diferentes en su perfil dinámico. Curiosamente, se informó recientemente que una sustitución de novo en D417N de TUBB2B resultó en una polimicrogiria simétrica, pero no acompañada de CFEOM (170). Este hallazgo podría sugerir que el residuo D417 tiene funciones divergentes en isotipos distintos. Sin embargo, la sustitución D417N en TUBB3 resulta en un fenotipo leve con CFEOM y neuropatía axonal progresiva con una expresividad variable, y no en polimicrogiria (161). Por lo tanto, tendrán que ser identificados más personas con sustituciones D417N en TUBB2B a fin de determinar si esta sustitución también puede resultar en un CFEOM.

XI. Mutaciones en TUBB

Como hemos ido viendo a lo largo de esta revisión, la importancia de los microtúbulos que componen el citoesqueleto en los pasos implicados en la migración y la diferenciación neuronal se refleja en el hallazgo de mutaciones en varios genes de tubulina responsables de una variedad de anormalidades estructurales en el cerebro, y otro de ellos es el gen TUBB.

Los pacientes con mutaciones en TUBB comparten anomalías cerebrales estructurales junto con las enfermedades descritas anteriormente (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3…). La característica más distintiva de la enfermedad en TUBB es la asociación con una marcada microcefalia, más constante que en las otras mutaciones y que se explica por el alto nivel de expresión de TUBB en los progenitores neuronales. Esto contrasta con TUBA1A, TUBB2B y TUBB3, genes cuya expresión se restringe a las neuronas postmitóticas en el cerebro en desarrollo. TUBB puede tener una función específica en las células mitóticamente activas (173).

Por lo tanto, este gen está altamente expresado en la corteza cerebral en desarrollo y la mutación en el mismo, causa en los individuos afectados microcefalia junto con una serie de anomalías cerebrales estructurales que incluyen ganglios basales dismórficos, disgenesia del cuerpo calloso, hipoplasia del tronco cerebral, y polimicrogiria focal (174).

Se examinaron un grupo de pacientes con una variedad de malformaciones cerebrales, dando como resultado la identificación de tres pacientes con microcefalia, no relacionados entre sí, todos con mutaciones de novo en TUBB en los residuos M301V, V355EI y E411K. Cada individuo presentaba microcefalia, los ganglios basales dismórficos, anomalías en el cuerpo calloso y el deterioro cognitivo y motor con retraso del lenguaje. Dos de los pacientes (M301V y V355I) comparten un patrón inusual de la sustancia blanca con una orientación radial a través del núcleo lenticular, así como hipoplasia del tronco cerebral (173).

La secuenciación de genes conocidos causantes de microcefalia (MCPH1, CD5KRAP2, WDR62, ASPM) y de genes de tubulina causantes de enfermedades neurológicas similares (TUBA1A, TUBB2B y TUBB3) no sirvió para identificar en estos individuos variantes patógenas descritas ya conocidas. Una búsqueda en bases de datos genómicas disponibles públicamente mostró que las mutaciones en M229V, V355I, E411K no están

presentes en la población general (173). De hecho, la selección de individuos controles étnicamente relevantes (francés/caucásicos, 238; vietnamita, 115; indio, 252) no pudo identificar estas variantes. Un análisis de homología mostró que estos residuos están altamente conservados en todos los isotipos de β-tubulina humanos.

En este punto, se mapeó la localización de estos residuos afectados en el heterodímero. El residuo M301 se encuentra en un bucle que está seguido de la hélice 9, con una cadena lateral que se introduce en un bolsillo hidrofóbico. El residuo V355 se encuentra en la superficie intradimérica, mientras que E411 precede a la hélice 12 y se sitúa en la superficie de la cara interdimérica. Este residuo está en la proximidad de un bucle (aa 98–104) que es crítico para la unión de los nucleótidos (175) y que puede ser reorientado al sufrir una sustitución con una lisina. Las tres mutaciones tienen el potencial de comprometer o bien las reacciones dependientes de chaperonas que son esenciales para el montaje del heterodímero o bien el comportamiento dinámico de los microtúbulos (176) (Figura 12).

Para abordar exactamente las consecuencias de estas alteraciones, se analizó la expresión y el plegamiento de las proteínas mutantes en reticulocitos de conejo. El resultado fue que las mutaciones V355I y M301V no afectaban a la capacidad de los polipéptidos mutantes para ensamblarse e incorporarse en los microtúbulos, aunque sí es cierto que la estabilidad del microtúbulo en el caso de M301V podía verse comprometido. Por otro lado, la mutación en E411K daba lugar a una grave supresión de la función de TUBB, ya que resulta en un fracaso masivo del montaje del heterodímero al alterar la vía de plegamiento mediada por chaperonas, suponiendo la incapacidad de la proteína mutante para incorporarse a los microtúbulos (173).

Para examinar el efecto de estas mutaciones in vivo, se utilizó la técnica de electroporación in vivo para sobreexpresar las formas mutantes de TUBB en el cerebro en desarrollo de un ratón. Aunque estos resultados son difíciles de interpretar, mostraron que estas mutaciones tienen un efecto a largo plazo sobre la posición neuronal, alterando la generación y posterior migración de las neuronas y reflejándose en una arquitecturaalterada del cerebro.

Las tres mutaciones son propensas a actuar por diferentes mecanismos moleculares. El deterioro en el montaje del heterodímero observado en el caso de la E411K y la pérdida de rendimiento en la mutación de M301V sugieren que actúan por la pérdida de función de la proteína. En resumen, es posible que los polipéptidos mutantes en E411K y M301V cinéticamente estancados tengan un efecto perjudicial sobre el plegamiento de la tubulina mediado por chaperonas, mientras que la mutación V355I puede alterar las propiedades dinámicas de microtúbulos o comprometer la unión de una o más proteínas asociada a microtúbulos (177).

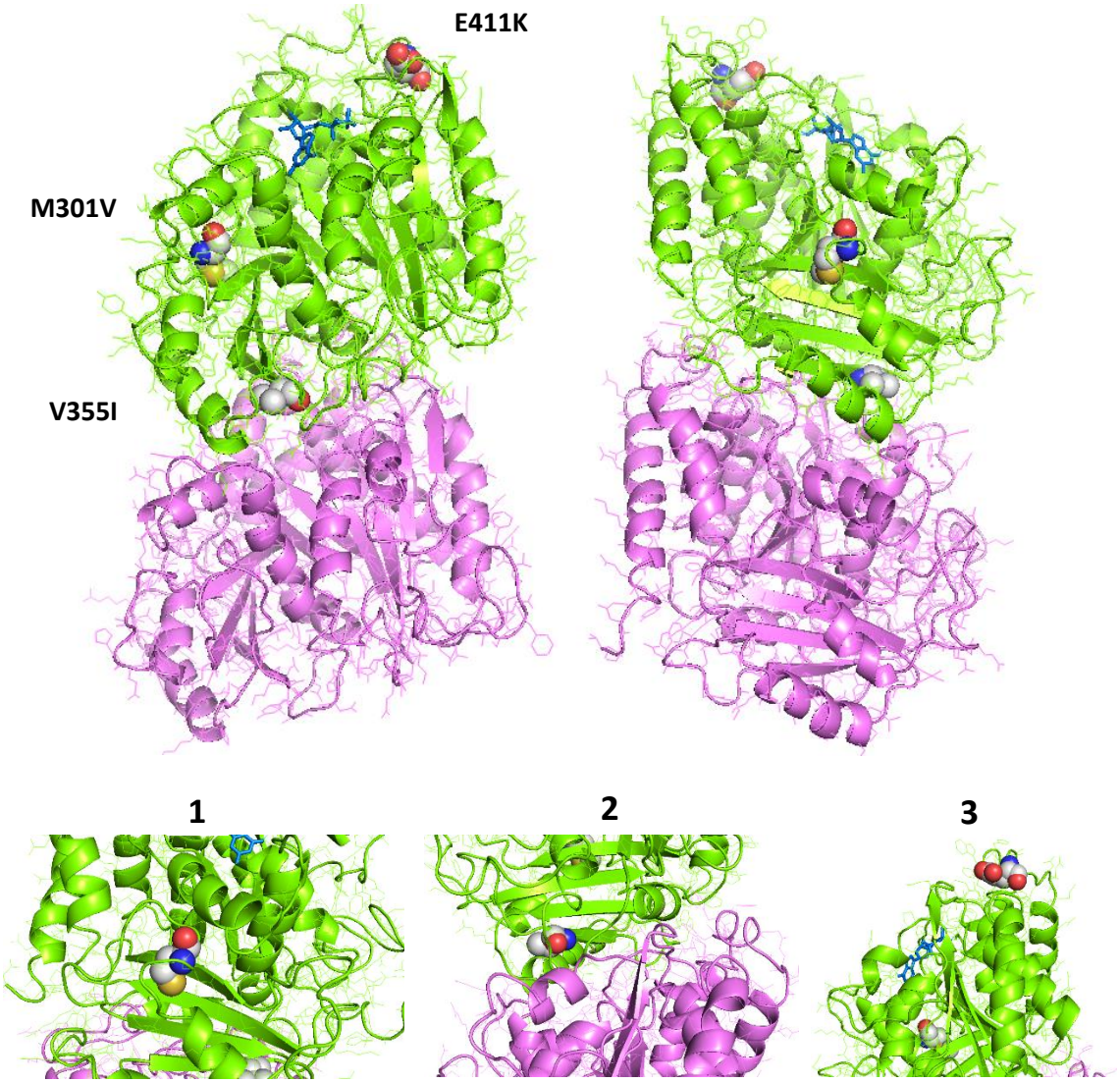

Figura 12. Representación estructural del heterodímero de tubulina destacando las posiciones de los residuos mutados (1, 2, 3) dentro de la estructura tridimensional. El residuo M301 tiene una localización céntrica y se asocia con un bolsillo hidrofóbico. El residuo V355 se encuentra en la superficie intradimérica. El residuo E411, por el contrario, se sitúa en la cara interdimérica. 1) La cadena lateral de M301 está rodeado de residuos hidrófobos que podrían ser alterados si se sustituye por una valina. 2) E411 se encuentra cerca de un bucle (98 - 104) que es crítico para la unión del GTP (color azul) (176).

La patología celular subyacente es probable que sea igual de compleja. Se ha demostrado que tanto la supresión de la expresión de TUBB como su sobreexpresión dan como resultado un aumento del índice mitótico. Esto es posible debido a que probablemente se produce un alargamiento de la fase M, lo que retrasa la progresión del ciclo celular y la generación de neuronas (178). En segundo lugar, es posible que las células progenitoras hiperproliferen y den lugar a un menor número de progenitores intermedios, y en consecuencia una reducción global de las neuronas postmitóticas. En tercer lugar, la detención del ciclo en la fase M puede posteriormente dar lugar a aumento de la apoptosis. Serán necesarios futuros estudios centrados en el ciclo celular y los factores que influyen en él para establecer cuál de los mecanismos antes mencionados son los responsables de estos cuadros clínicos.

CONCLUSIONES:

El ciclo de la organización interna, la forma, la motilidad y la vida de las células eucariotas es controlado por una compleja red de filamentos proteicos, llamado citoesqueleto, que incluye, quizás entre otros menos conocidos, filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. En la mayoría de las células, los microtúbulos están involucrados en el transporte intracelular, posicionamiento de orgánulos, la forma celular y la motilidad celular. Las neuronas son notables ejemplos de células con un alto grado de complejidad morfológica y funcional en las que son esenciales los microtúbulos. Cabe destacar la complejidad particular del citoesqueleto en las neuronas por ser células que no se dividen y extremadamente largas lo que implica por un lado que no requiere reorganizar su Citoesqueleto para la división celular pero por el otro, que tiene que transportar macromoléculas y estructuras a largas distancias.

A pesar de su diversidad funcional, todos los microtúbulos se ensamblan a partir de heterodímeros de α-tubulina y β-tubulina, dos proteínas muy conservadas que se encuentran en todos los eucariotas. Su dinámica y su función son moduladas por las interacciones con otras proteínas, proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), junto con una serie de modificaciones posteriores a la traducción (MPT) que será uno de los principales retos en el futuro cercano de la investigación en el campo de los microtúbulos.

El descubrimiento de mutaciones en los genes que codifican la α -tubulina y la β-tubulina, que se asocian con la aparición de trastornos de la migración neuronal, refuerza la importancia que tienen los microtúbulos como condición crítica en este proceso. La organización del cerebro de los mamíferos depende de acontecimientos relacionados con una extensa migración de las neuronas durante el desarrollo embrionario, todo ello bajo la coordinación de una dinámica red de microtúbulos. En general, en la mayoría de estas mutaciones aparecen una serie de malformaciones en los pliegues cerebrales que sugieren una grave afectación a nivel molecular.

Las células generan diferentes subtipos de microtúbulos a través de la expresión de isotipos de tubulina distintos. Algunos de los fenotipos que resultan de estas alteraciones genéticas son compartidos por mutaciones diferentes en varios isotipos de tubulina; otros, sin embargo, aparecen en mutaciones de un isotipo específico de tubulina. Esto nos orienta hacia la idea de que los isotipos pueden desempeñar funciones específicas distintas en las neuronas relevantes para sus funciones celulares, con un papel especialmente decisivo durante el desarrollo y la maduración neuronal, y continúan siendo claves para su mantenimiento y modelado durante toda la vida. Este es un ejemplo de la importancia de la variedad de isotipos de tubulina y su especificidad funcional.

Son muchas las incógnitas que quedan por solucionar con respecto a cómo las mutaciones en α- y β-tubulina dan lugar a tan amplio espectro de trastornos neurológicos y tan severas malformaciones estructurales del cerebro humano. Por el momento, existe evidencia de que son capaces de alterar las propiedades dinámicas y las funciones de los microtúbulos de varias maneras. Entre ellas, se incluyen la pérdida de funcionalidad de los heterodímeros de tubulina, alteración en la unión a GTP,

interferir en las interacciones con MAPs necesarias para mantener la estabilidad y la dinámica del microtúbulo, alteraciones longitudinales y laterales del protofilamento, reducción de la afinidad a las proteínas motoras, dineínas y quinesinas, y cambios en las respuestas a las señales ambientales que determinan la polaridad del microtúbulo y, consecuentemente, la dirección del crecimiento axonal. Existen regiones de la tubulina altamente conservadas en la evolución debido a su importante papel funcional, por lo que la sustitución de un único aminoácido a este nivel puede tener consecuencias de enorme calibre.

No obstante, cada mutación puede alterar varios de estos procesos, por lo que es difícil predecir el resultado fenotípico de las mismas. Existen fenotipos, como son la lisencefalia, el déficit cognitivo o la polineuropatía, que son comunes a mutaciones en varios de los isotipos.

La tubulina codificada por TUBA1A es especialmente abundante en el tejido cerebral y mutaciones en este gen desencadenan, además de microcefalia y como consecuencia discapacidad intelectual, alteraciones motoras graves y convulsiones.

El isotipo de tubulina TUBA8 interviene en la migración de las neuronas de las capas corticales más profundas y en su organización. La mutación en este gen da lugar a cuadro sindrómico caracterizado por una amplia polimicrogiria bilateral e hipoplasia del nervio óptico denominado PMGOH, y generalmente asociado a otras alteraciones orgánicas del sistema nervioso central.

El gen TUBB3 se expresa en las neuronas postmitóticas diferenciadas y sus mutaciones generan dos fenotipos diferentes; por un lado el síndrome de fibrosis congénita de los músculos extraoculares (CFEOM) que incluye una disfunción del nervio motor ocular común y, consecuentemente, de los nervios que de él dependen, discapacidad intelectual y neuropatía periférica motora y sensitiva; por otro, existe una serie de displasias corticales generadas por alteraciones en este mismo gen, denominadas conjuntamente malformaciones del desarrollo cortical (MCD). Estas displasias afectan al individuo con profundas discapacidades intelectuales y del sistema motor resultado de la polimicrogiria que aparece en el lóbulo frontal de estas personas, junto con otras alteraciones en estructuras como el tronco del encéfalo, los ganglios basales y el cuerpo calloso, compartidas con el resto de mutaciones en TUBB3.

Las alteraciones en el gen TUBB2B suponen defectos en la glía radial, componente fundamental para la orientación de las neuronas de nueva formación durante el desarrollo del sistema nervioso central que nuevamente origina defectos en el patrón de los surcos y circunvoluciones cerebrales. Esto se refleja en una polimicrogiria, discapacidad intelectual y motora y convulsiones.

Los pacientes con mutaciones en TUBB afectan a células mitóticamente activas y se asocian de forma constante a microcefalia e hipoplasia de ganglios basales, cuerpo calloso, deterioro motor, cognitivo y alteraciones del lenguaje.

En conjunto, estas mutaciones confieren defectos en las propiedades del microtúbulo que alteran la función del mismo y que se relacionan con toda una serie de trastornos del neurodesarrollo cuyo mecanismo aún no se entiende completamente. Esto nuevamente nos conduce a la importancia de desarrollar nuevas líneas de investigación con el objetivo de estudiar en mayor profundidad la función de los diferentes isotipos de tubulina y de este grupo de graves enfermedades que a ellos se relacionan.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. John Boyle. Molecular Biology of the Cell. 5a Ed. Garland Science; November 16, 2008.

2. Zhang R, Alushin GM, Brown A, Nogales E. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. Cell. 2015 Aug 13;162(4):849-59.

3. Scott T. Brady, George J. Siegel, Robert Wayne Albers. Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology. 8ª ed. Elsevier; 2012.

4. Max A. Tischfield, PhD, Gustav Y. Cederquist, BA, Mohan L. Gupta Jr., PhD and Elizabeth C. Engle, MD. Phenotypic spectrum of the Tubulin-related Disorders and Functional Implications of Disease-causing Mutations. Curr Opin Genet Dev. 2011 June; 21(3): 286–294.

5. Boston Childrens' Hospital [homepage en Internet]. Longwood Avenue, Boston: Boston Children's Hospital HIM Department [actualizada January 18 2016; consultada 25 Enero 2016]. Disponible en: childrenshospital.org

6. Mohammad R. Abdollahi, Ewan Morrison, Tamara Sirey, Zoltan Molnar, Bruce E. Hayward, Ian M. Carr, Kelly Springell, C. Geoff Woods, Mushtaq Ahmed, Louise Hattingh, Peter Corry, Daniela T. Pilz, Neil Stoodley, Yanick Crow, Graham R. Taylor, David T. Bonthron, and Eamonn Sheridan. Mutation of the Varianta-Tubulin TUBA8 Results in Polymicrogyria with Optic Nerve Hypoplasia. Am J Hum Genet. 2009 Nov 13; 85(5): 737–744.

7. Tito Fojo, MD, PhD, editors. The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology. 1ª ed. Bethesda: Humana Press; 2008.

8. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. TUBB tubulin beta class I Homo sapiens (human) [database on the Internet]. Bethesda MD. [Acceso el 15 de Enero 2016]. Gene ID: 203068, updated on 10-Jan-2016. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/203068

9. The Human Protein Atlas [Base de datos]. Knut & Alice Wallenberg foundation. 2015 - [Acceso el 16 de Diciembre 2015]. Disponible en: http://www.proteinatlas.org

10. The GeneCards human gene database [Base de datos]. Weizmann Institute of Science. 1996-2016. Build 12. [Acceso el 15 de Diciembre 2016]. Disponible en: http://www.genecards.org

11. Erin Turk, Airon A. Wills, Taejoon Kwon, Jakub Sedzinski, John B. Wallingford, Tim Stearns. Zeta-Tubulin Is a Member of a Conserved Tubulin Module and Is a Component of the Centriolar Basal Foot in Multiciliated Cells. Curr Biol. 2015 Aug 17;25(16):2177-83.

12. Smrzka, O.W., Delgehyr, N., and Bornens, M. Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian delta-tubulin. Curr. Biol.10, 2000;413–416.

13. Chang, P., and Stearns, T. Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosomestructure and function. Nat. Cell Biol. 2000; 2, 30–35.

14. Findeisen, P., Mu¨hlhausen, S., Dempewolf, S., Hertzog, J., Zietlow, A., Carlomagno, T., and Kollmar, M. (2014). Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. Genome Biol. Evol.6, 2274–2288.

15. Kato, A., Nagata, Y., and Todokoro, K. (2004).d-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis. Dev. Biol.269, 196–205.

16. Dutcher, S.K., Morrissette, N.S., Preble, A.M., Rackley, C., and Stanga, J. (2002). Epsilon-tubulin is an essential component of the centriole. Mol. Biol. Cell13, 3859–3869.

17. Bryan J, Wilson L. Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? Proc Nat Acad Sci USA. 1971;68:1762–1766.

18. Ludueña RF, Shooter EM, Wilson L. Structure of the tubulin dimer. J Biol Chem 1977;252:7006–7014.

19. Ponstingl H, Krauhs E, Little M, Kempf T. Complete amino acid sequence of α-tubulin from porcine brain. Proc Nat Acad Sci USA 1981;78:2757–2761.

20. Krauhs E, Little M, Kempf T, Hofer-Warbinek R, Ade W, Ponstingl H. Complete amino acid sequence of β-tubulin from porcine brain. Proc Nat Acad Sci USA 1981;78:4156–4160.

21. Behnke O, Forer A. Evidence for four classes of microtubules in individual cells. J Cell Sci 1967;2:169–192.

22. Fulton C, Simpson PA. Selective synthesis and utilization of flagellar tubulin. The multi-tubulin hypothesis. In: Goldman R, Pollard T, Rosenbaum J, eds. Cell Motility Vol. 3. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press 1976; 987–1005.

23. Perry B, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, Hallworth R. Differential expression of βtubulin isotypes in gerbil vestibular end organs. J Assoc Res Otorhinolaryngol (JARO) 2003;4:329–338.

24. Littauer UZ, Giveon D, Thierauf M, Ginzburg I, Ponstingl H. Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. Proc Nat Acad Sci USA 1986;83:7162–7166.

25. Fujii T, Koizumi Y. Identification of the binding region of basic calponin on α- and β-tubulins. J Biochem 1999;125:869–875.

26. Karabay A, Walker RA. Identification of Ncd tail domain-binding sites on the tubulin dimer. Biochem Biophys Res Commun 2003;305:523–528.

27. Hoyle HD, Hutchens JA, Turner FR, Raff EC. Regulation of β-tubulin β3 function and expression in Drosophilaspermatogenesis. Dev Genet 1995;16:148–170.

28. Keskin O, Durell SR, Baahar I, Jernigan RL, Covell DG. Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. Biophys J 2002;83:663–680.

29. Van Buren V, Odde DJ, Cassimeris L. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice. Proc Nat Acad Sci USA 2002;99:6035–6040.

30. Ludueña RF. The multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. Int Rev Cytol 1998;178:207–275.

31. Roach MC, Boucher VL, Walss C, Ravdin PM, Ludueña RF. Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of β-tubulin. The βisotypes of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues. Cell Motil Cytoskeleton 1998;39:273–285.

32. Wang D, Villasante A, Lewis SA, Cowan NJ. The mammalian β-tubulin repertoire:hematopoietic expression of a novel heterologous β-tubulin isotype. J Cell Biol 1986;103:1903–1910.

33. Lewis SA, Lee MGS, Cowan NJ. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. J Cell Biol 1985;101:852–861.

34. Monteiro MJ, Cleveland DW. Sequence of chicken cβ7 tubulin. Analysis of a complete set of vertebrate β-tubulin isotypes. J Mol Biol 1988;199:439–446.

35. Woo K, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, Hallworth R. Differential expression of βtubulin isotypes in gerbil nasal epithelia. Cell Tissue Res 2002;309:331–335.

36. Yeh I-T, Ludueña RF. The βII isotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers. Cell Motil Cytoskeleton 2004;57:96–106.

37. Arai K, Shibutani M, Matsuda H. Distribution of the class II β-tubulin in developmental and adult rat tissues. Cell Motil Cytoskeleton 2002;52:174–182.

38. Dozier JH, Hiser L, Davis JA, et al. βclass II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. Breast Cancer Res 2003;5:R157–R169.

39. Woo K, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, Hallworth R. Differential expression of βtubulin isotypes in gerbil nasal epithelia. Cell Tissue Res 2002;309:331–335.

40. Sullivan KF, Cleveland DW. Sequence of a highly divergent βtubulin gene reveals regional heterogeneity in the βtubulin polypeptide. J Cell Biol 1984;99:1754–1760.

41. Banerjee A. NCBI Accession no. AAL28094, 2001.

42. Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA, Lewis SA, Sarkar S, Cowan NJ. Differential distribution of β-tubulin isotypes in cerebellum. EMBO J 1988;7:2311–2319.

43. Chen SS, Revoltella RP, Papini S, et al. Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems. Stem Cells 2003;21:281–295.

44. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. Class III β-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. J Child Neurol 2003;18:851–866.

45. Correa LM, Miller MG. Microtubule depolymerization in rat seminiferous epithelium is associated with diminished tyrosination of α-tubulin. Biol Reprod 2001;64:1644–1652.

46. Alexander JE, Hunt DF, Lee MK, et al. Characterization of posttranslational modifications in neuronspecific class III β-tubulin by mass spectrometry. Proc Nat Acad Sci USA 1991;88:4685–4689.

47. Panda D, Miller HP, Banerjee A, Ludueña RF, Wilson L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. Proc Nat Acad Sci USA 1994;91:11358–11362.

48. Lu Q, Ludueña RF. In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of αβII, αβIII, and αβIV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins. J Biol Chem 1994;269:2041–2047.

49. Matsuo N, Hoshino M, Yoshizawa M, Nabeshima Y. Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth. J Biol Chem 2002;277:2860–2868.

50. Evans J, Sumners C, Moore J, et al. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. J Neurophysiol 2001;87:1076–1085.

51. Ohuchi T, Maruoka S, Sakudo A, Arai T. Assay-based quantitative analysis of PC12 differentiation. J Neurosci Methods 2002;118:1–8.

52. Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. J Cell Biol 2002;158:541–549.

53. Fanarraga ML, Avila J, Zabala JC. Expression of unphosphorylated class III β-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. Eur J Neurosci 1999;11:517–527.

54. Lewis SA, Lee MGS, Cowan NJ. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. J Cell Biol 1985;101:852–861.

55. Dustin P. Microtubules. Springer-Verlag, Berlin, 1984:149.

56. Jensen-Smith HC, Ludueña RF, Hallworth R. Requirement for the βI and βIV tubulin isotypes in mammalian cilia. Cell Motil Cytoskeleton 2003;55:213–220.

57. Thazhath R, Liu C, Gaertig J. Polyglycylation domain of β-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in Tetrahymena. Nat Cell Biol 2002;4:256–259.

58. Italiano JE, Bergmeier W, Tiwari S, et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. Blood 2003;101:4789–4796.

59. Hartwig J, Italiano J. The birth of the platelet. J Thromb Haemostasis 2003;1:1580–1586.

60. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH. Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent β-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. Curr Biol 2001;11:579–586.

61. Miller FD, Naus CC, Durand M, Bloom FE, Milner RJ. Isotypes of α-tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. J Cell Biol 1987;105:3065–3073.

62. Przyborski SA, Cambray-Deakin MA. Developmental regulation of α-tubulin mRNAs during the differentiation of cultured cerebellar granule cells. Mol Brain Res 1996;36:179–183.

63. Stanchi F, Corso V, Scannapieco P, et al. TUBA8: a new tissue-specific isoform of α-tubulin that is highly conserved in human and mouse. Biochem Biophys Res Commun 2000;270:1111–1118.

64. Lowe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 A resolution. J Mol Biol. 2001; 313:1045–1057. [PubMed: 11700061].

65. Nogales E, Wang HW. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? Curr Opin Cell Biol. 2006; 18:179–184. [PubMed: 16495041].

66. Uchimura S, Oguchi Y, Katsuki M, Usui T, Osada H, Nikawa J, Ishiwata S, Muto E. Identification of a strong binding site for kinesin on the microtubule using mutant analysis of tubulin. EMBO J. 2006; 25:5932–5941. [PubMed: 17124495].

67. Uchimura S, Oguchi Y, Hachikubo Y, Ishiwata S, Muto E. Key residues on microtubule responsible for activation of kinesin ATPase. EMBO J. 2010; 29:1167–1175. [PubMed: 20224548].

68. Kikkawa M, Hirokawa N. High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. EMBO J. 2006; 25:4187–4194. [PubMed: 16946706].

69. Sui H, Downing KH. Structural basis of interprotofilament interaction and lateral deformation of microtubules. Structure. 2010; 18:1022–1031. [PubMed: 20696402].

70. Kumar RA, Pilz DT, Babatz TD, Cushion TD, Harvey K, Topf M, Yates L, Robb S, Uyanik G, Mancini GM, et al. TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. Hum Mol Genet. 2010; 19:2817–2827. [PubMed: 20466733] This recent paper presents a comprehensive phenotypic analysis of humans harboring many different TUBA1A mutations. Phenotype-genotype correlations and the functional significance of mutations are discussed.

71. Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R, Ledbetter DH. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. JAMA. 1993; 270:2838–2842. [PubMed: 7907669].

72. Chevalier-Larsen E, Holzbaur EL. Axonal transport and neurodegenerative disease. Biochim Biophys Acta. 2006; 1762:1094–1108. [PubMed: 16730956].

73. Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., Guerrini, R., and Dobyns, W.B. (2005). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. Neurology65, 1873–1887.

74. Lecourtois M, Poirier K, Friocourt G, Jaglin X, Goldenberg A, Saugier-Veber P, Chelly J, Laquerriere A. Human lissencephaly with cerebellar hypoplasia due to mutations in TUBA1A: expansion of the foetal neuropathological phenotype. Acta Neuropathol. 2010; 119:779–789. [PubMed: 20376468].

75. Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, Fallet-Bianco C, Pasquier L, Toutain A, Tuy FP, et al. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). Hum Mutat. 2007; 28:1055 1064. [PubMed: 17584854].

76. Morris-Rosendahl DJ, Najm J, Lachmeijer AM, Sztriha L, Martins M, Kuechler A, Haug V, Zeschnigk C, Martin P, Santos M, et al. Refining the phenotype of alpha-1a Tubulin (TUBA1A) mutation in patients with classical lissencephaly. Clin Genet. 2008; 74:425–433. [PubMed: 18954413].

77. Fallet-Bianco C, Loeuillet L, Poirier K, Loget P, Chapon F, Pasquier L, Saillour Y, Beldjord C, Chelly J, Francis F. Neuropathological phenotype of a distinct form of lissencephaly associated with mutations in TUBA1A. Brain. 2008; 131:2304–2320. [PubMed: 18669490].

78. Bahi-Buisson N, Poirier K, Boddaert N, Saillour Y, Castelnau L, Philip N, Buyse G, Villard L, Joriot S, Marret S, et al. Refinement of cortical dysgeneses spectrum associated with TUBA1A mutations. J Med Genet. 2008; 45:647–653. [PubMed: 18728072].

79. Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N, Fallet-Bianco C, Phan DinhTuy F, Kong XP, Bomont P, et al. Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat Genet. 2009; 41:746–752. [PubMed: 19465910].

80. Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, Chan WM, Andrews C, Demer JL, Robertson RL, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. Cell. 2010; 140:74–87. [PubMed: 20074521].

81. Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, Castelnau-Ptakhine L, Roubertie A, Attie-Bitach T, Desguerre I, et al. Mutations in the neuronal ss-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. Hum Mol Genet. 2010; 19:4462–4473. [PubMed: 20829227].

82. Carsten J., Jeannette C.B. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13. April 2012; 276.

83. Wilson, P. G. & Borisy, G. G. Evolution of the multitubulin hypothesis. Bioessays 19, 451 454 (1997).

84. Valenzuela, P. et al.Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by αand βtubulin mRNAs. Nature 289, 650–655 (1981).

85. Rogowski, K. et al.A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. Cell 143, 564–578 (2010).

86. Raybin, D. & Flavin, M. Enzyme which specifically adds tyrosine to the α chain of tubulin. Biochemistry 16, 2189–2194 (1977).

87. Paturle-Lafanechere, L. et al.Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. Biochemistry 30, 10523–10528 (1991).

88. Choudhary, C. et al.Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. Science 325, 834–840 (2009).

89. Chu, C.-W. et al.A novel acetylation of β-tubulin by San modulates microtubule polymerization via downregulating tubulin incorporation. Mol. Biol. Cell 22, 448–456 (2011).

90. Hubbert, C. et al.HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. Nature 417, 455–458 (2002). Demonstrates that a histone deacetylase, HDAC6, functions in cells to reverse acetylation of Lys40. 39. North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M. & Verdin, E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD+-dependent tubulin deacetylase. Mol. Cell 11, 437–444 (2003).

91. Ohkawa, N. et al.N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. Genes Cells 13, 1171–1183 (2008).

92. Redeker, V. Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. Methods Cell Biol. 95, 77–103 (2010).

93. Alexander, J. E. et al.Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III β-tubulin by mass spectrometry. Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 4685–4689 (1991).

94. Rüdiger, M., Plessman, U., Kloppel, K. D., Wehland, J. & Weber, K. Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. FEBS Lett. 308, 101–105 (1992).

95. Redeker, V. et al.Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. Science 266, 1688–1691 (1994).Describes the discovery of the polyglycylation PTM of tubulin.

96. Mukai, M. et al.Recombinant mammalian tubulin polyglutamylase TTLL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on β-tubulin through a random sequential pathway. Biochemistry 48, 1084–1093 (2009).

97. Rogowski, K. et al.Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. Cell 137, 1076–1087 (2009).

98. Wloga, D. et al.TTLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. Dev. Cell 16, 867–876 (2009).References 53 and 54 demonstrate that enzymes of the TTLL family carry out the polyglycylation PTM of tubulin. They further demonstrate the essential role of this PTM for the dynamics and stability of axonemes.

99. Van Dijk, J. et al.A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. Mol. Cell 26, 437–448 (2007).

100. Peris, L. et al.Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. J. Cell Biol. 174, 839–849 (2006).

101. Bieling, P. et al.CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. J. Cell Biol. 183, 1223–1233 (2008).Together, references 94–96 work out the complete mechanism for the specific recognition of tyrosinated microtubules by CAP-Gly.

102. Bulinski, J. C. & Gundersen, G. G. Stabilization of posttranslational modification of microtubules during cellular morphogenesis. Bioessays 13, 285–293 (1991).

103. Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C. Distribution of tyrosinated and nontyrosinated α-tubulin during mitosis. J. Cell Biol. 102, 1118–1126 (1986).

104. Ikegami, K. & Setou, M. TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8. FEBS Lett.583, 1957–1963 (2009).

105. Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. & Borisy, G. G. Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. Proc. Natl Acad. Sci. USA 84, 9040–9044 (1987).

106. Paturle-Lafanechere, L. et al.Accumulation of δ2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. J. Cell Sci. 107, 1529–1543 (1994).

107. Matsuyama, A. et al. In vivodestabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. EMBO J. 21, 6820–6831 (2002).

108. Tran, A. D. et al.HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. J. Cell Sci.120, 1469–1479 (2007).

109. Zilberman, Y. et al.Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. J. Cell Sci. 122, 3531–3541 (2009).

110. Sharma, N. et al.Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. J. Cell Biol. 178, 1065–1079 (2007).

111. Fliegauf, M., Benzing, T. & Omran, H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8, 880–893 (2007).

112. Goetz, S. C. & Anderson, K. V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. Nature Rev. Genet. 11, 331–344 (2010).

113. Brandt, R. Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. Cell Tissue Res. 305, 255–265 (2001).

114. Saxena, S. & Caroni, P. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. Prog. Neurobiol. 83, 174–191 (2007).

115. Kuehn, E. W., Walz, G. & Benzing, T. von HippelLindau: a tumor suppressor links microtubules to ciliogenesis and cancer development. Cancer Res. 67, 4537–4540 (2007).

116. Michaud, E. J. & Yoder, B. K. The primary cilium in cell signaling and cancer. Cancer Res. 66, 6463–6467 (2006).

117. Mialhe, A. et al.Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. Cancer Res. 61, 5024–5027 (2001).

118. Soucek, K. et al.Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of α-tubulin posttranslational modifications. Prostate 66, 954–965 (2006).

119. Wallingford, J. B. & Mitchell, B. Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. Genes Dev. 25, 201–213 (2011).

120. Lancaster, M. A., Schroth, J. & Gleeson, J. G. Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. Nature Cell Biol. 13, 702–709 (2011).

121. Lafanechère, L., C. Courtay-Cahen, T. Kawakami, M. Jacrot, M. Rüdiger, J. Wehland, D. Job, and R.L. Margolis. 1998. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. J. Cell Sci.111:171–181.

122. Mialhe, A., L. Lafanechère, I. Treilleux, N. Peloux, C. Dumontet, A. Brémond, M.H. Panh, R. Payan, J. Wehland, R.L. Margolis, and D. Job. 2001. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. Cancer Res.61:5024–5027.Murofushi, H. 1980.

123. Kato, C., K. Miyazaki, A. Nakagawa, M. Ohira, Y. Nakamura, T. Ozaki, T. Imai, and A. Nakagawara. 2004. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. Int. J. Cancer. 112:365–375.

124. Whipple, R.A., M.A. Matrone, E.H. Cho, E.M. Balzer, M.I. Vitolo, J.R. Yoon, O.B. Ioffe, K.C. Tuttle, J. Yang, and S.S. Martin. 2010. Epithelial-tomesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. Cancer Res.70:8127–8137.

125. Tischfield, M.A., G.Y. Cederquist, M.L. Gupta Jr., and E.C. Engle. 2011. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. Curr. Opin. Genet. Dev.21:286–294.

126. Poirier, K., Y. Saillour, F. Fourniol, F. Francis, I. Souville, S. Valence, I. Desguerre, J. Marie Lepage, N. Boddaert, M. Line Jacquemont, et al. 2012. Expanding the spectrum of TUBA1A-related cortical dysgenesis to Polymicrogyria. Eur. J. Hum. Genet.

127. Rüdiger, M., U. Plessman, K.D. Klöppel, J. Wehland, and K. Weber. 1992. Class II tubulin, the major brain beta tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. FEBS Lett. 308:101–105.

128. Rogowski, K., J. van Dijk, M.M. Magiera, C. Bosc, J.C. Deloulme, A. Bosson, L. Peris, N.D. Gold, B. Lacroix, M.B. Grau, et al. 2010. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. Cell. 143:564–578.

129. Ikegami, K., M. Mukai, J. Tsuchida, R.L. Heier, G.R. Macgregor, and M. Setou. 2006. TTLL7 is a mammalian beta-tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites. J. Biol. Chem. 281:30707–30716.

130. Janke, C., K. Rogowski, D. Wloga, C. Regnard, A.V. Kajava, J.M. Strub, N. Temurak, J. van Dijk, D. Boucher, A. van Dorsselaer, et al. 2005. Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. Science. 308:1758–1762.

131. Sergouniotis, P.I., Chakarova, C., Murphy, C., Becker, M., Lenassi, E., Arno, G., Lek, M., MacArthur, D.G., Bhattacharya, S.S., Moore, A.T., et al.; UCLExomes Consortium (2014). Biallelic variants in TTLL5, encoding a tubulin glutamylase, cause retinal dystrophy. Am. J. Hum. Genet.94, 760–769.

132. Lee, J.E., Silhavy, J.L., Zaki, M.S., Schroth, J., Bielas, S.L., Marsh, S.E., Olvera, J., Brancati, F., Iannicelli, M., Ikegami, K., et al. (2012). CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. Nat. Genet.44, 193–199.

133. Kreis TE. Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. EMBO J 1987;6:2597–2606.

134. Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC. Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. J Cell Biol 1988;106:141–149.

135. Kierszenbaum AL. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. Mol Reprod Devel 2002;63:1–4.

136. Geimer S, Teltenkötter A, Plessmann U, Weber K, Lechtreck KF. Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga. Cell Motil Cytoskeleton 1997;37:72–85.

137. Mansir A, Justine JL. The microtubular system and posttranslationally modified tubulin during spermatogenesis in a parasitic nematode with amoeboid and aflagellate spermatozoa. Mol Reprod Devel 1998;49:150–167.

138. Mencarelli C, Bré MH, Levilliers N, Dallai R. Accessory tubules and axonemal microtubules of Apis melliferasperm flagellum differ in their tubulin isoform content. Cell Motil Cytoskeleton 2000;47:1–12.

139. Poole CA, Zhang ZJ, Ross JM. The differential distribution of acetylated and detyrosinated alphatubulin in the microtubular cytoskeleton and primary cilia of hyaline cartilage chondrocytes. J Anat2001;199:393–405.

140. Andrea E. Prota, Maria M. Magiera, Marijn Kuijpers, Katja Bargsten, Daniel Frey, Mara Wieser, Rolf Jaussi, Casper C. Hoogenraad, Richard A. Kammerer, Carsten Janke, and Michel O. Steinmetz. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. J Cell Biol. 2013 Feb 4;200(3):259-70.

141. Christopher P. Garnham, Annapurna Vemu, ..., Ronald A. Milligan, Antonina Roll-Mecak. Multivalent Microtubule Recognition by Tubulin Tyrosine Ligase-like Family Glutamylases. Cell. 2015 May 21;161(5):1112-23.

142. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. Nature 1984;312:237–242.

143. Carlier MF, Hill T, Chen YD. Interference of GTP hydrolysis in the mechanism of microtubule assembly: an experimental study. Proc Nat Acad Sci USA 1984;81:771–775.

144. Nogales E, Downing K, Amos L, Löwe J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. Nature Struct Biol 1998;5:451–458.

145. Sander C, Schneider R. Database of homology-derived structures and the structural meaning of sequence alignment. Proteins 1991;9:56–68.

146. Tian G1, Jaglin XH, Keays DA, Francis F, Chelly J, Cowan NJ. Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. Hum Mol Genet. 2010 Sep 15;19(18):3599-613.

147. Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J. Klein, H.L. and Cowan, N.J. (1998) Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin.Cell, 93, 863–873.

148. Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H. and Cowan, N.J. (1992) A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding.Cell, 69, 1043– 1050.

149. Tian, G., Lewis, S.A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C. and Cowan, N.J. (1997) Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. J. Cell Biol., 138, 821– 832.

150. Grishchuk, E.L. and McIntosh, J.R. (1999) Sto1p, a fission yeast protein similar to tubulin folding cofactor E, plays an essential role in mitotic microtubule assembly.J. Cell Sci., 112, 1979– 1988.

151. Steinborn, K., Maulbetsch, C., Priester, B., Trautmann, S., Pacher, T., Geiges, B., Kuttner, F., Lepiniec, L., Stierhof, Y.D., Schwarz, H.et al. (2002) The Arabidopsis PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth.Genes Dev., 16, 959– 971.

152. Uchimura, S., Oguchi, Y., Hachikubo, Y., Ishiwata, S. and Muto, E. Key residues on microtubule responsible for activation of kinesin ATPase. EMBO J., 29, 1167–1175.

153. Ayala, R., Shu, T. and Tsai, L.H. (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell, 128, 29–43

154. Vallee, R.B., Seale, G.E. and Tsai, J.W. (2009) Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones.Trends Cell Biol., 19, 347–355.

155. Stanchi, F., Corso, V., Scannapieco, P., Ievolella, C., Negrisolo, E., Tiso, N., Lanfranchi, G., and Valle, G. (2000). TUBA8: A new tissue-specific isoform of alpha-tubulin that is highly conserved in human and mouse. Biochem. Biophys. Res. Commun.270, 1111–1118.

156. Badin-Larcon, A.C., Boscheron, C., Soleilhac, J.M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Lafanechere, L., Bornens, M., and Job, D. (2004). Suppression of nuclear oscillations in Saccharomyces cerevisiae expressing Glu tubulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA101, 5577–5582.

157. Robin, N.H., Taylor, C.J., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H., Bingham, P., Collins, K.J., Earl, D., Gill, D., Granata, T., Guerrini, R., et al. (2006). Polymicrogyria and deletion 22q11.2 syndrome: window to the etiology of a common cortical malformation. Am. J. Med. Genet. A.140, 2416–2425.

158. Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., BahiBuisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P., et al. (2009). Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat. Genet. 41, 746–752.

159. Braun A, Breuss M, Salzer MC, Flint J, Cowan NJ, Keays DA. Tuba8 is expressed at low levels in the developing mouse and human brain. Am J Hum Genet. 2010 May 14;86(5):819-22; author reply 822-3.

160. Cederquist GY1, Luchniak A, Tischfield MA, Peeva M, Song Y, Menezes MP, Chan WM, Andrews C, Chew S, Jamieson RV, Gomes L, Flaherty M,Grant PE, Gupta ML Jr, Engle EC. An inherited TUBB2B mutation alters a kinesin-binding site and causes polymicrogyria, CFEOM and axon dysinnervation. Hum Mol Genet. 2012 Dec 15;21(26):5484-99.

161. Tischfield, M.A., Baris, H.N., Wu, C., Rudolph, G., Van Maldergem, L., He, W., Chan, W.M., Andrews, C., Demer, J.L., Robertson, R.L.et al. (2010) Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. Cell, 140, 74–87.

162. Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X.H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I.et al.(2010) Mutations in the neuronal ss-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects.Hum. Mol. Gen., 19, 4462–4473.

163. Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L. Jr and Engle, E.C. (2011) Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. Curr. Opin. Genet. Dev., 21, 286– 294.

164. Demer, J.L., Clark, R., Tischfield, M.A. and Engle, E.C. (2010) Magnetic Resonance Imaging Evidence Of an Asymmetrical Endophenotype in Congenital Fibrosis of Extraocular Muscles Type 3 Resulting from TUBB3 Mutations.Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 51, 4600– 4611.

165. Jaglin, X.H. and Chelly, J. (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. Trends Genet., 25, 555–566.

166. Flaherty, M.P., Grattan-Smith, P., Steinberg, A., Jamieson, R. and Engle, E.C. (2001) Congenital fibrosis of the extraocular muscles associated with cortical dysplasia and maldevelopment of the basal ganglia. Ophthalmology, 108, 1313–1322.

167. Li, H., DeRosier, D.J., Nicholson, W.V., Nogales, E. and Downing, K.H. (2002) Microtubule structure at 8 A resolution.Structure, 10, 1317–1328.

168. Hirokawa, N., Niwa, S. and Tanaka, Y. (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease.Neuron, 68, 610–638.

169. Gupta, M.L. Jr, Carvalho, P., Roof, D.M. and Pellman, D. (2006) Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. Nat. Cell. Biol., 8, 913–923.

170. Guerrini, R., Mei, D., Cordelli, D.M., Pucatti, D., Franzoni, E. and Parrini, E. (2012) Symmetric polymicrogyria and pachygyria associated with TUBB2B gene mutations.Eur. J. Hum. Genet., 20, 995– 998.

171. Kalil, K., Li, L. and Hutchins, B.I. (2011) Signaling mechanisms in cortical axon growth, guidance, and branching.Front. Neuroanat., 5, 62.

172. Jiang, Y.Q. and Oblinger, M.M. (1992) Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. J. Cell Sci., 103, 643–651.

173. Breuss M1, Heng JI, Poirier K, Tian G, Jaglin XH, Qu Z, Braun A, Gstrein T, Ngo L, Haas M, Bahi-Buisson N, Moutard ML, Passemard S, Verloes A,Gressens P, Xie Y, Robson KJ, Rani DS, Thangaraj K, Clausen T, Chelly J, Cowan NJ, Keays DA. Mutations in the β-tubulin gene TUBB5 cause microcephaly with structural brain abnormalities. Cell Rep. 2012 Dec 27;2(6):1554-62.

174. Ohnuma, S., and Harris, W.A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. Neuron 40, 199–208.

175. Löwe, J., Li, H., Downing, K.H., and Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 A resolution. J. Mol. Biol.313, 1045–1057.

176. Tian, G., Jaglin, X.H., Keays, D.A., Francis, F., Chelly, J., and Cowan, N.J. (2010). Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. Hum. Mol. Genet.19, 3599–3613.

177. Walsh, C.A., and Engle, E.C. (2010). Allelic diversity in human developmental neurogenetics: insights into biology and disease. Neuron68, 245–253.

178. Lizarraga, S.B., Margossian, S.P., Harris, M.H., Campagna, D.R., Han, A.P., Blevins, S., Mudbhary, R., Barker, J.E., Walsh, C.A., and Fleming, M.D. (2010). Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. Development137, 1907–1917.

179. Aillaud C, Bosc C, Saoudi Y, Denarier E, Peris L, Sago L, Taulet N, Cieren A, Tort O, Magiera MM, Janke C, Redeker V, Andrieux A, Moutin MJ. Evidence for new C-terminally truncated variants of α- and β-tubulins. Mol Biol Cell. 2016 Feb 15;27(4):640-53.

180. Nolasco S, Bellido J, Gonçalves J, Zabala JC, Soares H. Tubulin cofactor A gene silencing in mammalian cells induces changes in microtubule cytoskeleton, cell cycle arrest and cell death. FEBS Lett. 2005 Jul 4;579(17):3515-24.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, me gustaría agradecerle a mi profesor de Biología Molecular y tutor del presente trabajo, Juan Carlos Zabala, su pleno interés y su máxima disponibilidad, gracias por su generosa entrega y dedicación a este proyecto.

Un merecido agradecimiento a las personas que han hecho que todo este sea posible, mis padres, con especial mención a mi madre.