

Tesis de Posgrado

Propiedades bioquímicas de los microtúbulos : Asociación de componentes lipídicos y actividades enzimáticas relacionadas

Daleo, Gustavo Raúl

1976

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Daleo, Gustavo Raúl. (1976). Propiedades bioquímicas de los microtúbulos : Asociación de componentes lipídicos y actividades enzimáticas relacionadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1511_Daleo.pdf

Cita tipo Chicago:

Daleo, Gustavo Raúl. "Propiedades bioquímicas de los microtúbulos : Asociación de componentes lipídicos y actividades enzimáticas relacionadas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1976.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1511_Daleo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LOS MICROTUBULOS

ASOCIACION DE COMPONENTES LIPIDICOS Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS
RELACIONADAS

Autor: Gustavo Raúl Daleo

Director: Dr. Romano Piras

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones
Bioquímicas "Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR-ORIENTACION
QUIMICA BIOLOGICA

1976

1976
1976

A mis padres

A Cristina y Alejandro

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Romano Piras por sus enseñanzas, constante apoyo y crítica, que posibilitaron la realización de este trabajo.

A los Dres. Luis Federico Leloir y Carlos E. Cardini por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A la Dirección del Instituto por haber provisto los medios para la continuación y finalización de este trabajo.

A la Dra. Marta Piras por su ayuda y consejo.

A los Dres. Marcelo Dankert, Juan C. Vidal, Eduardo H. Charreau y E. Lapetina por haberme orientado en distintas etapas del trabajo.

A mis queridos amigos Roberto Couso, Oscar Burrone, Guillermo Echandi y Pedro Romero por su constante apoyo en el trabajo y fuera de él.

A todos los miembros del Instituto por su cooperación y críticas.

A Soledad de Giménez y Margarita Mazzardi por su valiosa colaboración.

ABREVIATURAS

AP	Acido fosfatídico
ATC	Acido tricloroacético
ATP	5' Adenosina trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
cAMP	3'5' Adenosina monofosfato
CTP	5' Citidina trifosfato
DG	Diglicérido
DGQ	Diglicérido quinasa
DOC	Deoxicolato de sodio
EDTA	Acido etilen diamin tetraacético
EGTA	Acido etilen glicol bis (2-aminoetil) N,N' tetraacético
α -G1-P	α -glicerofosfato
GPC	Giceril fosforil colina
GTP	5' Guanosina trifosfato
MES	Acido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
PC	Fosfatidil colina
PE	Fosfatidil etanolamina
PG	Fosfatidil glicerol
PGP	Fosfatidil glicerol fosfato
PI	Fosfatidil inositol
Pi	Fosfato inorgánico
PM	Peso molecular
PrQ	Proteína quinasa
PS	Fosfatidil serina
S	Unidades Svedberg de sedimentación
tARN	Acido ribonucleico de transferencia

SDS
Tris
UTP

Dodecil sulfato de sodio
Tris (hidroximetil amino)metano
5' Uridina trifosfato

RESUMEN

En este trabajo se muestra que los microtúbulos de diversas fuentes y obtenidos por distintos métodos tienen asociados lípidos fosforilados, identificados como fosfolípidos, entre los cuales el más abundante es la lecitina.

Además de fosfolípidos, los microtúbulos tienen asociada una actividad de diglicérido quinasa, capaz de fosforilar, a partir de ATP, diglicéridos también asociados a las preparaciones microtubulares o bien exógenos, para dar ácido fosfatídico.

Esta diglicérido quinasa no es una parte de la actividad del sobrenadante, y sus propiedades son muy semejantes a las de otras diglicérido quinasa.

La diglicérido quinasa asociada a microtúbulos no presenta propiedades diferentes a la proteína quinasa de la misma fuente, pero los sitios activos de ambas actividades serían diferentes.

La alteración en la estructura o contenido en fosfolípidos asociados a microtúbulos por diversos tratamientos producen alteraciones que no se deben a desnaturalización en el desarrollo de turbidez o viscosidad de las preparaciones microtubulares, indicando que estos fosfolípidos pueden tener algún papel en la reacción de polimerización.

INDICE

INTRODUCCION

I. LOS MICROTUBULOS

Definición	1
Distribución	1
Variabilidad morfológica	2
Clasificación	2
Estructura	4
Funciones	5
1) Movimiento de los cromosomas durante la mitosis	6
2) Organización intracelular, transporte de material y secreción	7
3) Desarrollo y conservación de la forma celular	8
4) Motilidad celular	9
5) Transducción sensorial	9
6) Regulación de la topología de la membrana	10
Propiedades bioquímicas	10
a) Métodos de purificación	11
b) Peso molecular - Subunidades	12
c) Asociación con nucleótidos de guanina	13
d) Interacción con drogas	15
Colchicina	15
Podofilotoxina	16
Griseofulvina	16
Alcaloides de <u>Vinca rosea</u>	17
Isopropil N-fenil carbamato	17
e) Fosforilación y actividad de proteína quinasa de la tubulina	18
f) Otras actividades enzimáticas	20

Polimerización	22
1. In vivo	22
a) Antecedentes	22
b) Centros de nucleación de la polimerización	24
2. In vitro	25
a) Antecedentes	25
b) Métodos para medir polimerización	26
c) Polaridad y nucleación	27
d) Condiciones para la reacción	29

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION 31

MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS	34
Preparación de γ - ³² P-ATP y GTP	34
2. ENZIMAS	35
Preparación de proteína quinasa de embrión de pollo	35
3. METODOS ANALITICOS	36
a) Determinación de concentración de proteínas	36
b) Determinación de fósforo	36
c) Cromatografía en papel	36
d) Cromatografía en capa delgada	37
e) Electroforesis en papel	37
f) Electroforesis en gel de poliacrilamida	37
g) Gradientes de sacarosa	38
h) Medida de la actividad de enzimas	38
- Fosfolipasa A	38
- Fosfolipasa C	38
- Fosfolipasa D	39
- Tripsina	39

4.	PREPARACION DE MICROTUBULOS	39
	a) Precipitación con vinblastina	39
	b) Polimerización	40
	c) Cromatografía en DEAE-celulosa	41
	d) Obtención de microtúbulos marcados in vivo	41
	- Células HeLa	41
	- Cerebro de embrión de pollo	41
5.	EXTRACCION DE LIPIDOS MICROTUBULARES	41
6.	ACTIVIDADES ENZIMATICAS MICROTUBULARES	42
	a) Fosforilación in vitro	42
	b) Proteína quinasa	42
	c) Diglicérido quinasa	43
	d) Unión de colchicina	43
	e) Actividad de Adenosina trifosfatasa (ATPasa)	43
7.	MEDIDA DE POLIMERIZACION IN VITRO	44
	a) Viscosimetría	44
	b) Turbidimetría	44
	c) Microscopía electrónica	45
	- Tinción negativa	45
	- Inclusión	45

RESULTADOS

I.	Asociación de lípidos marcados con ^{32}P con los micro- túbulos	47
	Evidencias de la asociación de material lipofílico con los microtúbulos	47
	Identificación del material radioactivo obtenido por marcación in vivo con ^{32}P	50
	a) Saponificación	50
	b) Incubación con fosfatasa alcalina	52
	c) Cromatografía en capa delgada	53

II. Asociación de una actividad enzimática fosforilante con los microtúbulos	55
Evidencias de una actividad enzimática fosforilante de lípidos asociada a los microtúbulos	55
Identificación del producto de la reacción in vitro	57
a) Saponificación	58
b) Incubación con fosfatasa alcalina	59
c) Cromatografía en capa delgada	61
Confirmación de la existencia de una diglicérido quinasa en microtúbulos	61
a) Preincubación con fosfolipasa C	61
b) Adición de diglicéridos exógenos	65
Proporción de diglicérido quinasa unida a microtúbulos	65
III. Caracterización de la diglicérido quinasa de microtúbulos	67
1. Diferencias con la actividad del sobrenadante	67
a) Comportamiento frente a diversas adiciones	67
b) Efecto del pH	68
c) Centrifugación en gradientes de sacarosa	69
2. Otras propiedades de la diglicérido quinasa de microtúbulos	71
a) Influencia de la concentración de magnesio	71
b) Especificidad hacia nucleótidos	73
c) Dependencia de la fosforilación con respecto al tiempo	73
d) Dependencia con la concentración de nucleótidos	75
e) Influencia del agregado de una alta concentración de nucleótido frío	76
f) Propiedades de sedimentación de la diglicérido quinasa y otras actividades enzimáticas microtubulares	78

3. Diferencias entre la diglicérido quinasa y proteína quinasa microtubulares	79
a) Efecto de detergentes y etanol sobre ambas actividades	79
b) Efecto de preincubación a distintas temperaturas	80
c) Efecto de preincubación con tripsina	81
d) Efecto del substarto de una enzima sobre la actividad de la otra	82
IV. Influencia de los fosfolípidos en la reacción de polimerización de microtúbulos	84
1. Medida de la polimerización por turbidimetría	84
a) Controles	84
b) Efecto de detergentes	86
c) Efecto de preincubación con fosfolipasas	87
d) Efecto de preincubación con lípidos exógenos	92
e) Polimerización de microtúbulos preparados en presencia de detergentes	93
2. Medida de la polimerización por viscosimetría	95
3. Efecto del Nonidet P-40 sobre actividades fosforilantes y unión de ³ H-colchicina	102

DISCUSION

Asociación de lípidos fosforilados con los microtúbulos	104
Asociación de una actividad enzimática fosforilante de lípidos con los microtúbulos	106
Caracterización de la diglicérido quinasa de microtúbulos	108
Influencia de los fosfolípidos en la reacción de polimerización microtubular	111

CONCLUSIONES

- I. Asociación de lípidos con los microtúbulos 115
- II. Asociación de una diglicérido quinasa con los microtúbulos 115
- III. Caracterización de la diglicérido quinasa asociada a microtúbulos 115
- IV. Influencia de los fosfolípidos en la polimerización microtubular 116

BIBLIOGRAFIA 118

INTRODUCCION

I. LOS MICROTUBULOS

Definición

Los microtúbulos (1,2) son componentes subcelulares de prácticamente todas las células eucariotes. En general, este nombre se aplica a estructuras en forma de largos cilindros generalmente rectos, de unos 24 nm de diámetro con un hueco interior de unos 15 nm; su longitud puede alcanzar varios micrones. Las paredes de 5 nm de espesor están formadas por alrededor de 13 filamentos compuestos de subunidades de una proteína globular que ha sido llamada tubulina.

Distribución

La presencia de microtúbulos fue detectada sistemáticamente en casi todos los tipos celulares recién a partir de 1950, cuando se introdujo el glutaraldehído como fijador para microscopía electrónica (3).

Forman la típica estructura 9 + 2 en cilias, flagelos y colas de espermatozoides (4,5), en el axostilo (6) y aparato oral (7) de protozoarios. También se encuentran en centriolos y cuerpos basales (8) y forman los filamentos del huso mitótico en células animales y vegetales (9, 10, 11). Además, se encuentran en el citoplasma sin asociarse a ninguna estructura determinada.

En células animales aparecen dispuestos en forma paralela a extensiones celulares (12-15) y también han sido hallados en

sistemas en desarrollo en los que se producen cambios en la morfología celular (16-23) y asociados a receptores sensoriales (24), es decir, asociados a alguna función o estructura específica.

En células vegetales se les ha atribuido la definición del plano de clivaje de la célula (25-27), formación de la placa celular (28), desarrollo de la pared celular (29) y conservación de la forma celular específica (10, 23).

Variabilidad morfológica

Existe una amplia variabilidad morfológica en estas organelas, según el sistema en que hayan sido estudiadas. Los diámetros varían entre 18 y 34 nm (2), y el lumen central, que generalmente aparece vacío, en neuronas (12, 31), células sanguíneas (32) y flagelos (33, 34) parece contener material denso.

En algunos casos pueden observarse proyecciones o "brazos" sobre la superficie externa (30, 35-41), y en otros, se ha encontrado que la pared está compartida entre dos túbulos (8).

Clasificación

Por su sensibilidad a distintos tratamientos, como drogas antimitóticas, presión, temperatura, etc., se los ha clasificado en lábiles y estables arbitrariamente (42). Los lábiles se encuentran en el citoplasma de células animales y vegetales, en el huso mitótico y en axones y dendritas del sistema nervioso central. Generalmente se acepta que esta clase de microtúbulos se encuentra en estado de equilibrio dinámico (43): un pool citoplasmático de tubulina está en equilibrio con microtúbulos polimerizados, lo que implica una capacidad celular para controlar la asociación y disociación de las subunidades. Los estables no parecen hallarse en este estado de equilibrio; a esta clase pertenecen los microtúbulos de cilias y flagelos,

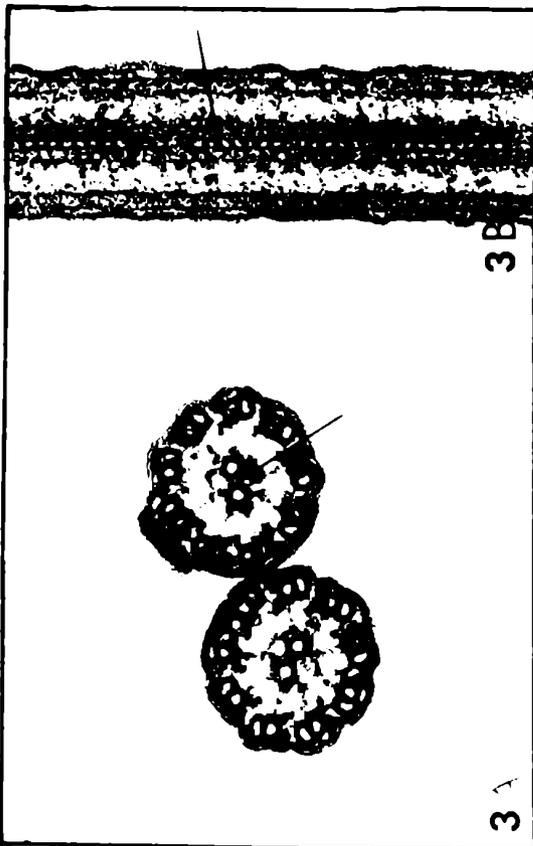


Figura 1: Distribución de los microtúbulos. 1) Microfotografía del huso mitótico donde pueden apreciarse los microtúbulos que lo forman. 2) Corte longitudinal de un axón mostrando abundantes microtúbulos paralelos al eje del mismo. 3A) Corte de un flagelo en forma transversal donde se ve la estructura formada por 9 pares de microtúbulos externos y un par central. 3B) Corte longitudinal de un flagelo. Las flechas indican la ubicación del par central. 4) Microtúbulos citoplasmáticos.

centríolos y axostilos. Estos pueden aislarse como estructuras intactas y resisten la baja temperatura, alta presión y ciertos agentes químicos que despolimerizan o destruyen a los lábiles (44).

Estructura

La sección transversal de preparaciones de microtúbulos fijadas con glutaraldehído y teñidas con osmio, revela al microscopio electrónico un anillo de material denso que limita un espacio interno cuya densidad es baja o nula. El diámetro externo del anillo es de unos 23-25 nm, y el interno es de 13-15 nm de modo que la pared tiene, en promedio, 5 nm. El aspecto de la misma sugiere que está formada por subunidades globulares de 5 nm de diámetro (33, 45).

Las mejores microfotografías de microtúbulos de diversas fuentes (45, 46) permiten apreciar 13 subunidades estrechamente asociadas lateralmente para formar el anillo. Sin embargo, existe discrepancia entre los datos, ya que el número de subunidades observado depende de la orientación del espécimen en el haz electrónico. Estas observaciones dieron origen a modelos en los que se propone que las subunidades se disponen longitudinalmente en 13 protofilamentos paralelos al eje del microtúbulo. La observación en forma longitudinal de microtúbulos intactos teñidos negativamente también sugiere que la pared de los túbulos esta formada por protofilamentos de 5 nm de diámetro constituidos por subunidades globulares (4, 47-59). Dado que las subunidades de filamentos adyacentes aparecen desplazadas en dirección axial, se observa una periodicidad de unos 8 nm, que podría tener su origen en una hélice que formaría un ángulo de 10° con el plano perpendicular al eje del túbulo. Las observaciones son consistentes con modelos de filamentos paralelos en que las subunidades están desplazadas lateralmente o con aquéllos que implican hélices con 12 a 13 subunidades por vuelta.

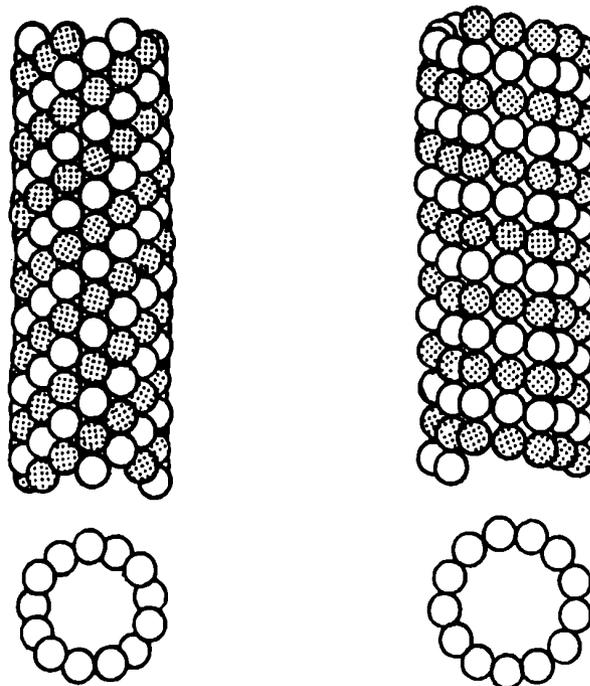


Figura 2 : Modelos que muestran dos estructuras probables de microtúbulos. En ambas la hélice puede tener un sentido de giro contrario al representado. El sombreado diferencia las distintas tubulinas.

Los datos de difracción de rayos X confirman en general los de microscopía electrónica para el caso de túbulos flagelares aislados (50); para microtúbulos citoplasmáticos los resultados fueron algo diferentes (51), lo que puede reflejar diferencias reales entre microtúbulos flagelares (estables) y citoplasmáticos (lábilés) o bien diferencias en la preparación de las muestras.

Funciones

Los microtúbulos aparecen asociados con una variedad de funciones, como si tuvieran una gran versatilidad. En general se han seguido dos criterios para atribuirles determinadas funciones

nes: un criterio farmacológico, aprovechando la reactividad de la tubulina con drogas químicamente diferentes y de distinta especificidad; si dos drogas que reaccionan con los microtúbulos actúan sobre la función, y una tercera que no debe reaccionar con ellos no altera la función, el proceso probablemente involucre a los microtúbulos. El segundo criterio, morfológico, implica la observación de suficiente número de microtúbulos cuya orientación sea adecuada para la función. Las principales funciones que se les atribuyen son las siguientes:

1) Movimiento de los cromosomas durante la mitosis

El cúmulo de evidencias sobre el papel fundamental de los microtúbulos en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y meiosis es apreciable. La destrucción de los microtúbulos del huso con drogas antimitóticas, baja temperatura, alta presión, o irradiación con un micro haz de luz ultravioleta, trae como consecuencia que estos movimientos no tengan lugar (52, 53). Se han propuesto varios mecanismos para explicar la forma en que los microtúbulos pueden estar involucrados en el movimiento de los cromosomas (9, 43, 54) sin que se haya logrado acuerdo.

Los modelos propuestos aceptan en general que los microtúbulos del huso están constituidos por subunidades que permanecen en equilibrio entre el estado polimerizado y el libre. Uno de los modelos (43) propone que la orientación de los cromosomas está determinada por los microtúbulos del huso y que aquéllos se mueven hacia los polos de la célula durante la anafase como resultado de despolimerización de los microtúbulos que entonces se acortan. Otro modelo (54) postula que los puentes entre microtúbulos actúan como unidades mecanoquímicas y funcionan como los puentes entre fibras musculares, empujando un túbulo por encima de otro. Así, la configuración de la metafase es una estructura automantenida cuya geometría está de-

terminada por la disposición de los sitios iniciadores de túbulos; los primeros movimientos durante la anafase son provocados por deslizamiento de los túbulos, que repone los sitios de iniciación, y la elongación de los mismos es consecuencia de la repolimerización de subunidades en estos sitios.

2) Organización intracelular, transporte de material y secreción

Gran cantidad de datos sugieren que los microtúbulos intervienen en varios tipos de movimientos ordenados en las células. En general, se ha observado que tratamientos que destruyen los microtúbulos interfieren en el transporte axoplásmico en neuronas (55, 56), movimiento saltatorio de partículas en células en cultivo (57), movimientos ordenados de núcleos en sincicios inducidos por virus (58), de gránulos de melanina en melanocitos (59) y endosomas en macrófagos (60). También se ha encontrado que varios tratamientos que interfieren con los microtúbulos influyen en la movilización de materiales en procesos secretorios, como la liberación de histamina (61), y son abundantes los datos que sugieren una activa participación de estas estructuras en la secreción de insulina (62).

También hay pruebas experimentales de inhibición de secreción de colágeno en cultivos de hueso de embrión de pollo y fibroblastos de ratón por colchicina y vinblastina (63). Contrariamente a lo que ocurre en los sistemas mencionados, la colchicina, vinblastina y podofilotoxina estimulan la secreción de hormonas esteroideas por células Y-1 de tumor adrenal a niveles comparables con los que produce la máxima estimulación con ACTH (64); además, el agua pesada, que estabiliza los microtúbulos, inhibe la estimulación de secreción de esteroideas por vinblastina, ACTH o cAMP.

3) Desarrollo y conservación de la forma celular

Los microtúbulos tienen una importante función como citoesqueleto, según muestran numerosos estudios. Se les ha asignado este papel en primer lugar por su orientación, y en segundo lugar porque la destrucción de los mismos como consecuencia de diversos tratamientos produce cambios morfológicos (39). La baja temperatura, alta presión, colchicina, urea, o iones metálicos aplicados al heliozoario *Actinosphaerium* destruyen los microtúbulos que constituyen el axonema radial involucrado en el movimiento y alimentación del animal y provocan retracción de los axopodios (39, 65). El proceso es completamente reversible, y el agua pesada, que estabiliza los microtúbulos, impide esta ruptura de los axopodios por frío o presión (66). En otros sistemas, tales como eritrocitos, células de neuroblastoma o del cristalino, en que los microtúbulos presentan una orientación adecuada, las células elongadas o elipsoidales se transforman en esféricas al destruir los microtúbulos (16,67).

Estas estructuras están además implicadas de alguna manera en el desarrollo de la forma celular: el agua pesada, la presión o la colchicina bloquean la morfogénesis celular durante el desarrollo de embriones de *Arbacia* (40); la colchicina o vinblastina inhiben la elongación del tejido del cristalino en desarrollo (16), la extensión de apéndices neuronales (18, 67), la transformación inducida por cAMP de varias líneas celulares a formas elongadas (68), formación de microtúbulos, los cambios de forma asociados con neurulación (20, 21) y espermatogénesis (30). Por último, el isopropil fenil carbamato, inhibidor del huso mitótico en células vegetales, inhibe la elongación de células germinativas en desarrollo (69).

4) Motilidad celular

Los microtúbulos se encuentran en forma de estructuras ordenadas en cilias, flagelos y colas de espermatozoides, pero la forma en que participan en el proceso de movilidad no se conoce, aunque hay varias hipótesis. Uno de los modelos propuestos implica no la contracción de los mismos sino el deslizamiento de unos sobre otros, generando una curvatura propulsora (70, 71). Este proceso requiere presumiblemente hidrólisis de ATP, que podría tener lugar en la ATPasa (dinefina) asociada a los dobletes externos en estas estructuras (38, 72). Otro tipo de movimiento en el que los microtúbulos citoplasmáticos parecen estar involucrados en el movimiento ameboide de células en cultivo (13). La colchicina, que destruye estos microtúbulos, produce la desaparición de todo movimiento orientado. Este se caracteriza por una actividad localizada en cierta zona de la membrana que se desordena (ruffling) (73). Al tratar con antimitóticos, la región desordenada se extiende y generaliza a todo el borde celular, proceso acompañado por cesación o desorientación inmediata del movimiento, ya que las células tratan de moverse en todas direcciones a un tiempo, con un resultado neto de inmovilidad.

5) Transducción sensorial

En los órganos sensoriales se ha descrito la existencia de microtúbulos, generalmente como cilias modificadas, pero sólo en el caso de los microtúbulos del mecanorreceptor de cucaracha se ha probado que la destrucción de los mismos por colchicina trae como consecuencia la imposibilidad de generar potenciales de acción en las neuronas receptoras cuando hay movimiento (24). Se ha sugerido que cuando una fuerza externa mueve los microtúbulos de las cilias del mecanorreceptor, se genera un cambio químico que puede desencadenar la transmisión neuronal.

6) Regulación de la topología de la membrana

Estudios muy recientes (74, 75) dieron lugar a hipótesis que explican la interacción de microtúbulos con las membranas, especialmente con las proteínas de la misma. Las partículas intramembranas o receptores superficiales, por ejemplo los de inmunoglobulinas en la superficie de los linfocitos o los de concanavalina A ven alterada su distribución cuando se trata a las células con antimitóticos (76, 77).

El modelo (77) postula un acoplamiento entre microtúbulos citoplasmáticos y partículas intramembranas o receptores. Cuando estas proteínas están libres, pueden difundir libremente en el plano de la matriz lipídica, y cuando están ligados en forma directa o indirecta con los microtúbulos, su movimiento estaría impedido. Los tratamientos que destruyen microtúbulos traen como consecuencia la transición del estado ligado al estado libre para estas partículas, permitiéndoles agregarse o dispersarse según que los microtúbulos las mantuvieran separadas o juntas (78).

Propiedades bioquímicas

Los primeros sistemas en que se aisló la proteína constitutiva de los microtúbulos fueron cilias, flagelos y colas de espermatozoides. Como único componente se aisló una proteína de peso molecular 60.000 aproximadamente (38, 79), que en electroforesis en geles de poliacrilamida-urea a baja concentración de proteínas migraba como dos bandas de movilidad casi idéntica. En sistemas de microtúbulos látiles la caracterización de la proteína tubular fue más dificultosa y se consiguió gracias a la afinidad específica del antimitótico colchicina por esta proteína. Taylor (80) había demostrado que la acción antimitótica de esta droga se debía precisamente a que se unía a la subunidad microtubular. Esto se comprobó en varios sistemas (81-

83) y se demostró que la droga se unía a una partícula cuyo coeficiente de sedimentación era 6 S y peso molecular 110.000; se comprobó la naturaleza proteica de la misma y la reversibilidad de la reacción. Entonces se utilizó la colchicina tritiada para seguir la purificación de esta proteína a partir de cerebro de cerdo (84). Se obtuvo así una proteína dimérica de peso molecular 120.000 y 6 S, que podía disociarse en dos monómeros de 60.000. Estas propiedades eran similares para la fracción derivada de cerebro de pollo (85) y células de neuroblastoma (86), así como la de cilias y flagelos (87).

Finalmente, los estudios de la proteína microtubular del huso mitótico (87-89) permitieron identificarla por sus propiedades con la hallada en cilias y flagelos y tejido neuronal.

Se propuso entonces el nombre de tubulina (90) para la proteína nativa de peso molecular 110.000-120.000 y coeficiente de sedimentación 6 S, que sería dimérica, y α -tubulina y β -tubulina a los protómeros de peso molecular 55.000-60.000 obtenidos por desnaturalización de la misma, designando como β al de mayor movilidad electroforética.

a) Métodos de purificación

La tubulina se ha obtenido por métodos comunes de purificación de proteínas, utilizando colchicina tritiada para seguir la proteína. En términos generales, se la ha preparado por fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex, de los cuales eluye a alta fuerza iónica (0,5-0,8 M de ClK) por tratarse de una proteína muy ácida (84). Posteriormente, el método fue modificado para disminuir contaminaciones de ácidos nucleicos y carbohidratos (91, 92).

Otro alcaloide, la vinblastina, se ha utilizado para precipitar la tubulina a partir de preparaciones crudas o parcialmente

purificadas (86, 93, 94). La especificidad de esta precipitación ha sido cuestionada ya que también precipitan otras proteínas acídicas y ácidos nucleicos (94).

Más recientemente se han desarrollado métodos de purificación basados en la reacción de polimerización, que ocurre a temperaturas de alrededor de 37°C, revierte a 0°C y es favorecida por el agregado de glicerol o sacarosa (89, 95). El método consiste en calentar un sobrenadante de 100.000 x g de cerebro para inducir polimerización, centrifugar a 37°C para separar en el precipitado a los microtúbulos polimerizados. Estos se resuspenden y enfrían para despolimerizarlos y se vuelven a centrifugar en frío para eliminar contaminaciones. Esto puede repetirse varias veces, con pérdidas apreciables, pero se obtiene tubulina muy pura, capaz de polimerizar, de unir colchicina y de precipitar con vinblastina.

También se ha desarrollado un método de aislamiento por cromatografía de afinidad en columnas de Sepharosa a la que se ha unido covalentemente un derivado de la colchicina. Sembrando en la columna un sobrenadante de 100.000 x g de cerebro de ratón, la tubulina queda retenida y puede eluirse luego con un buffer de baja fuerza iónica (96).

b) Peso molecular - Subunidades

Por diversos métodos, como equilibrio de sedimentación (87, y filtración en geles (83, 91, 92), se han obtenido valores de peso molecular entre 110.000 y 130.000 para tubulinas de todas las especies estudiadas.

Cuando se trata la tubulina con agentes disociantes como SDS, urea o clorhidrato de guanidina, se pierde la capacidad de polimerización y de unir drogas. Además, el peso molecular disminuye a la mitad, 55.000-60.000, demostrando la naturaleza dimerica de la proteína. Por electroforesis en gel de poliacril

amida conteniendo SDS se han podido separar los protómeros. Los valores obtenidos de pesos moleculares para éstos varían mucho, de 43.000 a 63.000, como resultado de utilizar diferentes condiciones (88, 91, 92, 97, 98). Sin embargo, un análisis cuidadoso de datos obtenidos a distintos valores de pH y fuerza iónica (99), parece indicar que la separación se debe sólo a la carga y que ambos protómeros tienen el mismo peso molecular, de alrededor de 52.000.

Los datos disponibles de secuencia de aminoácidos muestran muy poca variabilidad entre protómeros α de distintas especies, y lo mismo ocurre con los β ; sin embargo, hay bastante variabilidad entre α y β de la misma especie, aunque casi todas las diferencias observadas hasta ahora son consecuencia de cambios en una sola base del triplete codificante para el aminoácido en cuestión (87).

La estequiometría con que se encuentran ambos protómeros se ha determinado aprovechando el diferente contenido en cisteína de ambos, con ácido iodoacético tritiado. Así se obtuvo una estequiometría 1:1 para las tubulinas estudiadas (91, 92, 97, 100). Todos estos datos llevaron a proponer que la tubulina es un heterodímero $\alpha\beta$ (91, 97), aunque sin evidencia experimental concluyente.

c) Asociación con nucleótidos de guanina

Durante los trabajos de aislamiento y caracterización de la proteína microtubular en cilias y flagelos, se encontró que había nucleótidos de guanina unidos a ella (101). También en microtúbulos lábiles se demostró la asociación de la proteína microtubular con nucleótidos de guanina. La tubulina purificada de cerebro reveló poseer 0,6-0,8 moles de nucleótido por mol de dímero $\alpha\beta$. Los estudios por diálisis al equilibrio con ^3H -GTP indicaron finalmente que la proteína

era capaz de unir dos moles de nucleótido por mol de 6 S: un mol fuertemente unido, no intercambiable con nucleótido del medio, y otro intercambiable en un tiempo medio de 15 minutos (84); estos resultados fueron posteriormente confirmados (102).

Los microtúbulos aislados de cerebro de ternera tenían alrededor de 0,6 moles de nucleótido de guanina por mol de 6 S, de los cuales el 70-80 % era GDP, y el resto GTP. La incubación con ^3H -GTP reveló la capacidad de unir 0,4-0,7 moles adicionales de GTP por mol de dímero 6 S, no intercambiables con el nucleótido ya unido. Aunque variaba con las preparaciones, la relación entre nucleótido no intercambiable e intercambiable era siempre cercana a 1, y la tubulina podía unir colchicina en forma equimolar con el GTP intercambiable. También se demostró, con GTP doblemente marcado con ^3H y ^{32}P , que el GDP unido al sitio no intercambiable podía aceptar el γ -P del GTP, y que la reacción se producía sin liberación previa del GDP, es decir, probablemente ocurría sobre la proteína. La precipitación de la tubulina con vinblastina provocaba la liberación total del nucleótido no intercambiable, si se encontraba como trifosfato, mientras que el intercambiable no se liberaba. La precipitación con Cl_2Mg o con Cl_2Ca liberaba ambos tipos de nucleótidos (102).

Todos estos datos parecían indicar que, como en el caso de la actina, la unión y posterior hidrólisis del GTP podría ser importante en la reacción de polimerización. Los experimentos de polimerización in vivo (87) e in vitro (89) mostraron la necesidad de la presencia de GTP para que la reacción se produjera. Era esperable entonces que, como en la actina, se produjera la hidrólisis del fosfato terminal del nucleótido trifosfato durante la misma. Sin embargo, se demostró que puede ocurrir polimerización in vitro en ausencia de GTP si se agrega al medio glicerol o sacarosa (103). Esto probaba que el GTP no intercambiable no era necesario, y que tampoco era impres-

cindible que el no intercambiable se encontrara como trifosfato, de manera que la hidrólisis del mismo no debía estar involucrada. Sin embargo, la velocidad de polimerización aumentaba en presencia de GTP, de modo que la asociación del mismo con la tubulina probablemente contribuya a la regulación del proceso. Esto puede ocurrir por estabilización de la configuración de la proteína (84, 85, 101), ya que se sabe por ejemplo que el GTP estabiliza la tubulina contra la desnaturalización térmica.

d) Interacción con drogas

Tal como ya se ha indicado, los alcaloides de origen vegetal colchicina y vinblastina son conocidos desde hace tiempo como agentes antimitóticos, o sea como venenos del huso mitótico. Estas drogas, juntamente con la podofilotoxina, la griseofulvina y el isopropil fenil carbamato ejercen su acción por interferir con la función microtubular. Sus estructuras son bastante diferentes, y actualmente se sabe que sus mecanismos bioquímicos de acción son distintos.

Colchicina: La afinidad que por la tubulina tiene este alcaloide, obtenido de la planta Colchicum autumnale, permitió aislar y caracterizar a esta proteína. La reacción de unión a tubulina soluble tiene un pH óptimo de 6,8-7,0 es máxima a 37°C y se produce a fuerza iónica moderada (81, 85, 104). La unión de colchicina a equilibrio indica que la saturación de los sitios de la tubulina se produce cuando se une 1 mol de colchicina por mol de dímero de peso molecular 110.000 (84, 104). La reacción de unión es muy lábil y decae rápidamente, aunque el agregado de GTP reduce la velocidad de decaimiento (84, 85, 105) sin embargo, el complejo ya formado es bastante estable (81, 83). Cuando se investigó la capacidad de binding para la tubulina de espermatozoide de erizo marino se encontró para las sub

unidades provenientes del par central, pero no para las derivadas de los dobletes externos (106). Posteriormente se pudo demostrar para éstos también la unión de colchicina, cuando se la estabilizó por el agregado de vinblastina, o bien controlando las condiciones de solubilización de los microtúbulos en cuanto a pH y fuerza iónica (81, 101, 104, 107). Esta clase de tubulina se comporta entonces de la misma manera frente a la colchicina que las formas solubles.

Dado que los agentes desnaturalizantes destruyen la capacidad de unir alcaloide, no se sabe a cuál de las dos subunidades se une éste, y todo parece indicar que la reacción requiere tubulina en su configuración nativa.

Podofilotoxina: Este alcaloide se une a la proteína microtubular en el mismo sitio que la colchicina (83, 85): cuando se agregan ambos compuestos en cantidades equimoleculares, la unión de colchicina tritiada se inhibe en un 50%; sin embargo, no es capaz de desplazar a la colchicina ya unida. Esto se probó en tubulina de huevo de erizo de mar (104), con tubulina de dobletes externos flagelares (107) y con tubulina de cerebro de embrión de pollo (108).

Griseofulvina: Las propiedades antimitóticas de este alcaloide son indistinguibles al microscopio óptico, de las de colchicina. Aunque se ha propuesto que actúa en forma similar a la colchicina, no influye en la unión de la misma, de manera que si se une, debe hacerlo en un sitio diferente (85). Estudios realizados al microscopio electrónico sobre el efecto de griseofulvina en la polimerización de microtúbulos in vitro sugieren que no bloquea esta reacción. Si bien la mitosis de células HeLa se bloquea por la droga, las microfotografías electrónicas no revelan alteración en la morfología ni en la orientación de los microtúbulos (109). Este hecho sugiere que la griseofulvina podría inhibir algún aspecto de la función microtubular.

Alcaloides de Vinca rosea: Estos alcaloides producen in vivo una destrucción del huso mitótico (110), con disolución de los microtúbulos y agregación de las subunidades en cristales hexagonales (111). La interacción in vitro con la tubulina no es afectada por la presencia de colchicina; incluso se ha conseguido precipitar cuantitativamente el complejo con vinblastina, indicando que ambas drogas se unen a sitios diferentes (86, 93, 94). Se ha encontrado que los cristales formados in vivo contienen 1 mol de vinblastina por mol de dímero de tubulina, que además conserva 2 moles de nucleótido de guanina, de modo que los sitios de unión serían diferentes (104). Los mecanismos de interacción con vinblastina parecen ser diferentes in vivo e in vitro. Cuando se la utiliza como agente precipitante in vitro parece actuar como catión; produce precipitación de otros componentes celulares como ácidos nucleicos y proteínas acídicas, por ejemplo actina y proteínas de membrana de eritrocito, que son precipitables por iones calcio (109). Además, se ha demostrado que en este caso se produce liberación de GTP (102), que in vivo no ocurre. Estos resultados permiten proponer que la vinblastina se uniría in vitro a sitios de baja afinidad, capaces de interaccionar con calcio, y que in vivo interaccionaría con un sitio de alta afinidad, dando lugar a ruptura de los microtúbulos y formación de cristales (108).

Isopropil N-fenil carbamato: Esta droga, inhibidora del huso mitótico en células vegetales, afecta específicamente la reaparición de cierto tipo de microtúbulos en *Ochromonas*, altera el número funcional de centros organizadores de microtúbulos, y afecta la orientación del ficoplasto, una clase de microtúbulos citoplasmáticos, en *Oedogonium* (112). Su mecanismo de acción se desconoce, aunque estudios recientes muestran que no se une a la tubulina y que a concentraciones entre 0,1 y 1 mM no afecta la polimerización in vitro, de manera que se supone

que no produce su efecto a través de interacción con los microtúbulos, sino probablemente con los centros organizadores de los mismos (113).

e) Fosforilación y actividad de proteína quinasa de la tubulina.

La tubulina purificada puede fosforilarse en presencia de proteína quinasa estimulable por cAMP, pero además posee intrínsecamente esta actividad (98, 114). La fosforilación se produce en serina, y la estabilidad del producto indica que no hay actividad de fosfatasa asociada. La determinación del fósforo unido a tubulina requirió la obtención de proteína altamente pura. Sometiendo la tubulina ^{32}P a digestión con tripsina o pepsina, se obtuvo sólo un péptido marcado con ^{32}P , descartándose así la presencia de un contaminante proteico superfosforilado (115).

En preparaciones sin niveles detectables de impurezas se halló que la tubulina contiene $0,8 \pm 0,2$ moles de fosfato inorgánico por mol de dímero de peso molecular 110.000. Se demostró además que el fósforo se encuentra unido a serina de la β tubulina (92, 114). También se encontró fosforilación en serina para el caso de células HeLa cultivadas en presencia de ^{32}Pi , cortes de músculo y cerebro de embrión de pollo incubados con el mismo isótopo, y músculos y cerebro de embriones de pollo inyectados con ^{32}Pi (114).

En cuanto a la actividad de proteína quinasa, ha sido detectada en tubulina de cerebro porcino, bovino y de rata; en células HeLa y en músculo de embrión de pollo (98, 114, 116, 117, 118). Estas proteínas quinasas son capaces de fosforilar a la misma tubulina, en la cadena β , a partir de ATP o GTP, y a substratos exógenos, como protamina, caseína, histona, y según los casos fosfovitina (98, 114, 119); la cantidad de producto formado varía linealmente con la concentración de tubulina, tiene pH óptimo, no se inhibe por colchicina o vinblastina y

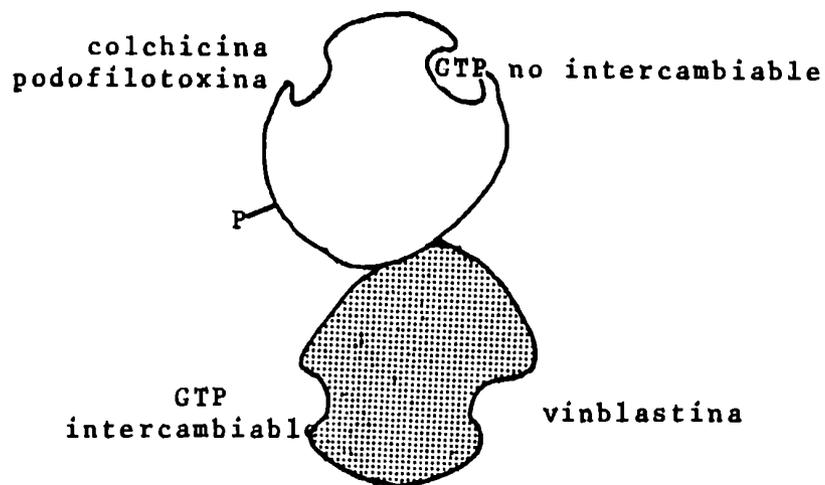


Figura 3: Representación esquemática del dímero de tubulina
La asignación de sitios a una subunidad determinada, así como la ubicación de los mismos es arbitraria, salvo para el caso del P unido covalentemente, localizado en la subunidad β .

no es estimulable por nucleótidos cíclicos. En el caso de cerebro de rata, la actividad se encontró sólo en grandes agregados y no en el dímero de tubulina (119), llevando a la conclusión que ésta no es una proteína quinasa sino que la actividad está asociada a ella. Sin embargo, dado que siempre se obtiene actividad de proteína quinasa en microtúbulos, es muy posible que esta asociación tenga importancia en la fosforilación de tubulina observada in vivo y cuyo significado aún se desconoce (119).

Los estudios realizados con tubulina de músculo de embrión de pollo muestran que la actividad de proteína quinasa eluye de una columna de gel en una posición correspondiente al peso molecular del monómero, 54.000 (114). En células HeLa se encontró que durante el ciclo celular varía el contenido en fósforo de la tubulina. Además, hay una variación similar en la actividad de proteína quinasa asociada, mientras que la del citosol correspondiente no varía; esto permite suponer que la fosforilación de tubulina y la proteína quinasa son importantes en la función microtubular (117).

f) Otras actividades enzimáticas

En microtúbulos aislados de fibroblastos de embrión de pollo y células HeLa se detectó actividad de ATPasa, que es lábil, no inhibible por ouabaína y no actúa sobre otros nucleótidos trifosfato (120).

También se ha descrito la incorporación de tirosina y fenil alanina al extremo C-terminal de una proteína soluble de cerebro de rata. Esta reacción requiere ATP, Mg^{++} y K^+ , pero no tARN; ambos aminoácidos se excluyen mutuamente y uno inhibe la incorporación del otro. La proteína a la que se incorporan es los aminoácidos presenta varias características comunes con la tubulina: tiene un peso molecular de 54.000, forma dímeros de peso molecular 110.000, que eluyen en columnas de Sephadex G-200

en la misma posición que el complejo tubulina-colchicina ^3H , así como de columnas de DEAE-Sephadex A-50; además, precipita con viblastina. Si bien no hay evidencia morfológica, es muy probable que se trate efectivamente de una propiedad de la tubulina (121).

En el transcurso de la realización de esta Tesis se ha descrito la existencia en microtúbulos de una enzima relacionada con el metabolismo de fosfolípidos, la fosfatidil inositol fosfodiesterasa, asociada a la cadena (122). Esta enzima, del tipo de la fosfolipasa C, libera inositol fosfato a partir de fosfatidil inositol. Ha sido hallada en varios sistemas, incluyendo páncreas, hígado, mucosa intestinal, tiroides y cerebro. El fraccionamiento de sobrenadantes de cerebro de rata por cromatografía en DEAE-Sephadex se encontró que uno de los picos de actividad de esta enzima se encuentra asociado a una proteína capaz de unir colchicina. Cuando este pico se sembró en gradientes de sacarosa, analizando una de las fracciones activas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se encontró que sólo contenía las dos bandas de α y β tubulina y una tercera banda identificada presuntivamente como la forma monomérica de la enzima. Por agregado de tubulina de ratón doblemente marcada in vivo con ^3H y ^{32}P e igual cantidad de marcada con ^{32}P por tratamiento con (γ - ^{32}P)-ATP al sobrenadante de cerebro de rata, se halló parte de la actividad enzimática asociada con la tubulina agregada, que fue identificada como la subunidad β de la tratada con (γ - ^{32}P)-ATP en base a la relación $^3\text{H}:^{32}\text{P}$. La subunidad de la tubulina exógena no tratada con ATP no estaba asociada a la actividad enzimática (122).

Polimerización

1. In vivo

a) Antecedentes

Los primeros estudios del huso mitótico en células vivas se llevaron a cabo por microscopía con luz polarizada. La birrefringencia que se observaba durante la mitosis se atribuyó a componentes fibrosos que en preparados fijados se encontraban asociados a los cromosomas. La colchicina destruía la birrefringencia, por lo cual se postuló que bloqueaba los movimientos cromosomales por alterar de alguna manera el estado de polimerización de los componentes fibrosos birrefringentes (52). Estos fueron identificados posteriormente como microtúbulos, y las variaciones en la birrefringencia durante la mitosis se atribuyeron a cambios en el estado de polimerización de los mismos. También a desplazamientos del equilibrio monómero-polímero se atribuye la destrucción del huso mitótico que se produce al disminuir la temperatura, aumentar la presión, o por el agregado de otras drogas antimitóticas (52, 53, 123).

La modificación experimental de la birrefringencia del huso por variación de la temperatura ha permitido calcular parámetros termodinámicos que indican que el proceso de polimerización es endotérmico, involucra un gran aumento de entropía y - a temperaturas fisiológicas - una variación de energía libre bastante pequeña (43).

El agua pesada estabiliza el huso mitótico frente a la acción de la colchicina o la baja temperatura (43, 124, 125). Esto indicaría que durante la polimerización se produce una pérdida de agua estructurada (lo que explicaría el gran aumento de entropía), ya que se acepta que las moléculas de agua pesada permanecen unidas entre sí más fuertemente que las de agua ordinaria (126), y al reemplazar a ésta el equilibrio se desplaza hacia el polímero (43, 127).

Este concepto de desplazamiento del equilibrio se vio reforzado por estudios realizados en presencia de inhibidores de la síntesis proteica. La reaparición de la birrefringencia en husos despolimerizados por colcemida, después de eliminada ésta, se producía a la misma velocidad y en igual grado en ausencia o en presencia de actinomicina D, puromicina o cloranfenicol, de modo que la reformación del huso se producía a expensas de los monómeros liberados durante la despolimerización (43).

Durante la interfase y la mitosis se observó que la cantidad total de proteína capaz de unir colchicina permanece relativamente constante, pero varía su distribución entre fracciones particuladas y solubles (128).

Todos estos datos apoyan la existencia de un estado de equilibrio que se altera en forma natural durante la formación del huso y llevaron a postular la teoría del equilibrio dinámico. Según ésta, el principal mecanismo de control celular de la formación de microtúbulos consiste en la alteración del equilibrio monómero-polímero, sin mediar recambio (síntesis y degradación) de monómero, del cual existiría un pool precursor.

La teoría del equilibrio dinámico se ha aplicado también a otros sistemas, como el axonema de Actinosphaerium (Echinospaerium), a la regeneración ciliar y flagelar y varios tipos de elongación celular (65, 66). En todos estos sistemas los microtúbulos despolimerizados por diversos tratamientos vuelven a formarse aunque esté inhibida la síntesis proteica, pero no en presencia de colchicina (16, 67, 129, 130). Sin embargo, en otros casos se ha postulado que el pool precursor no existe, en base a requerimientos de síntesis proteica para que se formen estructuras microtubulares (18, 131)

También se obtuvieron datos sobre un flujo constante de monómero a polímero por irradiación con un micro haz de luz ultravioleta del huso mitótico en metafase, con el resultado de una

pérdida local de birrefringencia, que migra lentamente hacia el polo y es reemplazada por material birrefringente. Esto se interpreta como un flujo de monómero hacia la fibra en el centrómero y eliminación del mismo en el polo (132).

En resumen, el concepto de equilibrio dinámico explica razonablemente la mayoría de los procesos que involucran la polimerización de microtúbulos in vivo. Sin embargo, todavía se ignora cómo se regula este equilibrio, aunque ciertas observaciones han llevado a pensar en la existencia de sitios iniciación u organizadores de la polimerización.

b) Centros de nucleación de la polimerización

Son abundantes los datos que parecen indicar que los quince tococos cromosomales y los centriolos podrían estar involucrados en la polimerización y conservación de las fibras del huso mitótico de células animales, aunque no en vegetales (133, 134). De la misma manera, hay evidencias que indican que la polimerización durante el crecimiento de cilias y flagelos se produce por adición de material a cuerpos basales preexistentes (135-137). Para todas estas estructuras especializadas que se asocian a la localización de los microtúbulos se ha propuesto el nombre de "centros organizadores de microtúbulos".

En cuanto a los microtúbulos citoplasmáticos, hay muy pocas evidencias de la existencia de centros que puedan estar involucrados en la nucleación, aunque se ha mencionado frecuentemente la asociación de microtúbulos con numerosas estructuras (9, 39). Algunos autores sugieren que en ciertos casos el proceso de polimerización puede iniciarse al azar, por ejemplo a causa de altas concentraciones locales de monómero, pero este mecanismo es improbable en la formación de estructuras particulares (30, 40).

2. In vitro

a) Antecedentes

Con el objeto de analizar los mecanismos que podrían regular la polimerización de microtúbulos in vivo, se ha intentado desarrollar sistemas de polimerización in vitro para estudiar los problemas de iniciación, crecimiento y equilibrio.

Los primeros intentos se llevaron a cabo con subunidades purificadas de cilias y flagelos. Al principio se obtuvieron sólo grandes agregados que no eran microtúbulos, e independiente mente de la temperatura y presencia de colchicina (138, 139). Más adelante, se obtuvieron estructuras que morfológicamente eran microtúbulos, en condiciones muy definidas de pH y fuerza iónica, y los intentos de purificar el sistema por centrifugación revelaron la posible necesidad de sitios particulados de nucleación (140). Sin embargo, esta polimerización no era inhibible por baja temperatura o colchicina, propiedades características de la formación de microtúbulos in vivo.

Posteriormente comenzaron los estudios con microtúbulos citoplasmáticos. Con subunidades purificadas de cerebro porcino se obtuvo un sistema de polimerización en que ésta dependía de la temperatura, se inhibía por colchicina, requería específicamente la presencia de GTP y no necesitaba del agregado de fracciones particuladas como núcleo. Sin embargo, los productos de la polimerización eran aberrantes: filamentos o esferas de tamaño irregular y muy pocos microtúbulos (141). Poco después se obtuvo un sistema que producía microtúbulos idénticos a los observados in vivo, y que permitió definir algunas condiciones para que la reacción de polimerización tenga lugar. Homogeneizando los cerebros de rata en frío y centrifugando, se obtenían en el sobrenadante subunidades provenientes de la despolimerización. Agregando a éste GTP y EGTA para eliminar el calcio, se obtenía polimerización simplemente elevando la tem-

peratura a 37°C, despolimerización al disminuirla o agregar colchicina. Además, los microtúbulos formados eran indistinguibles de los observados in vivo al microscopio electrónico, y este proceso no parecía requerir nucleación (89). Estos resultados fueron rápidamente confirmados para microtúbulos de cerebro porcino, pero se evidenció la necesidad de agregar material particulado a sobrenadantes de alta velocidad de centrifugación, en los que se encontraban las subunidades puras para que se produjera polimerización (95). Observando al microscopio electrónico la fracción particulada se encontraron estructuras en forma de disco que desaparecían durante la polimerización y reaparecían al despolimerizar; esto sugería que dichas estructuras se incorporaban a los microtúbulos y que podrían actuar como centros de nucleación.

b) Métodos para medir polimerización

Todos estos estudios preliminares recurrían a la microscopía electrónica o a la ultracentrifugación, procedimientos engorrosos, que consumían mucho tiempo y no permitían medir la cinética de polimerización.

Posteriormente se comenzó a utilizar la viscosimetría, la turbidimetría y el aumento en la fluorescencia intrínseca del triptofano.

La viscosidad de una solución de tubulina aumenta a medida que se van formando microtúbulos. Por este método se comprobó que al transferir la solución de 0° a 37°C, la viscosidad va aumentando con el tiempo; que el agregado de colchicina bloquea este aumento, y que si la temperatura se baja nuevamente a 0°C la viscosidad disminuye rápidamente al valor inicial. Los controles realizados tomando muestras y observándolas al microscopio electrónico mostraron que realmente se estaban formando mi

cro-túbulos, de manera que la reacción de polimerización in vitro es similar a la estudiada in vivo para microtúbulos citoplasmáticos y del huso mitótico (142-144).

La turbidimetría permite también medir esta reacción. La turbidez de la solución es proporcional a la masa total de subunidades que se encuentran en el polímero. Este método es ventajoso en cuanto a la rapidez de las mediciones, su continuidad, y la facilidad con que pueden variarse las condiciones del ensayo; sin embargo, no permite obtener datos de la longitud del polímero como la viscosimetría. Los resultados obtenidos por esta metodología confirman en general los de viscosimetría, y han permitido calcular parámetros termodinámicos con los cuales se ha podido definir ciertas restricciones a los modelos de polimerización y despolimerización (145).

La variación de la fluorescencia intrínseca debida al triptofano de la tubulina ha sido utilizada como medida de la polimerización. Sin embargo, este método sólo mide cambios conformacionales en la proteína, y tampoco da información sobre la longitud de los polímeros (146).

c) Polaridad y nucleación

Un problema básico del mecanismo de polimerización es la polaridad del crecimiento tubular, es decir, si la adición de subunidades se produce en ambos extremos o en uno solo del microtúbulo en crecimiento. En flagelos parece que la adición de subunidades se produce al extremo distal de la organela (147). Cuando se utilizaron trozos de flagelos como núcleos para polimerización de subunidades de cerebro, la adición se verificaba también en el extremo distal (143). Si para el mismo sistema de cerebro se utilizaban como núcleos trozos de microtúbulos de cerebro a los que se había pegado DEAE-dextrano por su carga positiva (lo que permitía distinguirlos al microscopio electróni-

co del túbulo en crecimiento) se vio crecimiento unidireccional en extractos crudos y bidireccional en tubulina purificada a altas concentraciones de proteína, aunque éste se producía preferentemente en una dirección (143, 148).

En cuanto a la existencia de centros de nucleación, ya se mencionó la posible participación de estructuras en forma de espiral o anillo en la iniciación de la polimerización (95). Algunos datos termodinámicos obtenidos por turbidimetría podrían explicarse suponiendo la existencia de un paso lento en la iniciación, que consistiría en la activación de un iniciador, por ejemplo, el pasaje de un anillo cerrado a espiral abierta. Esta hipótesis se vio en parte confirmada al observarse que inmediatamente después de la polimerización predominaban las espirales sobre los anillos, y varias horas después, la relación se invertía; además, la repolimerización es mucho más rápida en el primer caso que en el segundo. Como ya se ha mencionado, el dímero de tubulina tiene un coeficiente de sedimentación de 6 S, y estos anillos o espirales lo tienen de 36 S, pero están constituidos por α y β tubulina, según se ve por electroforesis en geles de poliácridamida luego de disgregarlos con ClNa. Estos componentes de 36 S unen poca colchicina y su formación es insensible a la presencia de ésta (149, 150). Hay varias explicaciones probables para estas observaciones: una es que los componentes de 6 S y 36 S están formados por proteínas distintas; la segunda, que algún cofactor se encuentre unido a alguno de los componentes, impidiendo su transformación en el otro; la tercera, que la tubulina de un componente pueda modificarse, por ejemplo por fosforilación o acetilación, permitiendo su transformación en el otro.

Todas estas observaciones llevaron a proponer un modelo para la polimerización, en el cual se supone que el componente

36 S, formado por unas 50 subunidades 6 S, es un protofilamento incapaz de unirse lateralmente a otros, pero que en condiciones de polimerización puede elongarse por adición de unidades 6 S, que sí son capaces de dar uniones laterales y conducir a la formación del túbulo.

d) Condiciones para la reacción

En extractos crudos de cerebro porcino se ha encontrado que el rango óptimo de pH para la polimerización es 6,7-6,9, y que a valores menores de 5,8 o mayores de 7,6 no se produce aumento en la viscosidad. El valor de viscosidad final alcanzada muestra una dependencia lineal con la concentración proteica por encima de una concentración crítica (4-12 mg/ml); a concentraciones menores no se produce polimerización. Los cationes monovalentes Na^+ y K^+ inhiben completamente el aumento de viscosidad a concentraciones de 150 mM; también la inhiben totalmente el Mg^{++} 10 mM y el Ca^{++} 1 mM. En cuanto a los nucleótidos trifosfatos, los extractos preparados en ausencia de GTP experimentan un cierto aumento en la viscosidad al incrementar la temperatura; sin embargo, la variación en la velocidad, viscosidad final alcanzada y estabilidad de la misma, permiten suponer que ésto se debe a diferentes niveles de GTP unido a tubulina en las diferentes preparaciones. A una concentración de GTP de 2 mM la polimerización es máxima y el nivel es estable. Este nucleótido puede ser reemplazado parcialmente por ATP, CTP o UTP, o bien por GDP o GMP (142).

En preparaciones purificadas, las condiciones óptimas son similares, aunque se requieren niveles mayores de cationes para inhibir la polimerización. El Mg^{++} es necesario para que ésta se produzca, y la activación es máxima a concentraciones estequiométricas con las de tubulina. Para que se produzca máxima polimerización, es suficiente agregar cantidades estequiométri-

cas de GTP, que puede ser reemplazado por los otros nucleótido trifosfatos, pero no por nucleótidos mono o difosfato, o trifosfatos cuyo γ -P no sea hidrolizable (151).

Como ya se ha mencionado, el ion calcio es un potente inhibidor de la polimerización de tubulina de cerebro (89, 142), y su adición produce la despolimerización de microtúbulos polimerizados (144). El 50% de inhibición se produce con concentraciones del orden de 1 mM (146). Esta extrema sensibilidad frente a la concentración de calcio explica las dificultades para obtener polimerización de microtúbulos in vitro. Los estudios realizados parecen indicar que este ion afecta la velocidad de polimerización (146) y la longitud de los microtúbulos formados (142). Puesto que el calcio actúa como regulador en varias funciones biológicas, esta sensibilidad de la reacción a la concentración del mismo sugiere que el equilibrio de polimerización in vivo podría estar regulado por este ion, aunque todavía ello no se ha probado.

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Las diversas funciones atribuidas a los microtúbulos exigen que éstos se encuentren polimerizados o que sean capaces de polimerizar y despolimerizar según la situación fisiológica de la célula. Los datos termodinámicos disponibles parecen indicar que la unión entre subunidades durante el proceso de polimerización es de carácter hidrofóbico. Por lo tanto, una alteración de este carácter de la tubulina podría ser el mecanismo para controlar la asociación y disociación de la misma. Una modificación covalente (fosforilación, glicosilación, etc) de la tubulina y/o la asociación de ciertos cofactores a la misma podrían cambiar dicho carácter hidrofóbico y así intervenir en la regulación del proceso de polimerización. La asociación de GTP a tubulina y la fosforilación de ésta en una de sus subunidades eran las dos únicas modificaciones descritas al iniciarse este trabajo, pero para ninguna de las dos se han encontrado evidencias concluyentes que permitan responsabilizarlas de la regulación del proceso de polimerización.

Durante el estudio de la fosforilación de microtúbulos en diversos sistemas de células enteras (114), se observó que parte de la radioactividad incorporada a partir de ^{32}P a microtúbulos se podía extraer con solventes orgánicos. La fosforilación de materiales hidrofóbicos asociados a tubulina les conferiría propiedades anfifílicas, y ésto podría tener influencia sobre el estado de polimerización microtubular. Se consideró por lo tanto conveniente explorar esta posibilidad.

Los antecedentes inmediatos de los que se disponía (Tabla I) eran que los microtúbulos aislados con vinblastina de preparados de músculo de embrión de pollo incubados con ^{32}P eran radioactivos. Aproximadamente el 50% de la radioactividad era soluble en ATC 5%, y gran parte de la misma era debida a GTP.

En cuanto a la radioactividad insoluble en ATC 5%, casi el 80% podía extraerse con cloroformo-metanol (2:1) o n-butanol saturado con agua; el resto era fosfato unido covalentemente a tubulina.

TABLA I: Distribución de la incorporación de ^{32}P a fracciones microtubulares marcadas in vivo e in vitro.

Fracción	Incorporación de ^{32}P (%)	
	In vivo	In vitro
Directo	100	-
Precipitable por ATC 5%	50	100
Tubulina	10	80
Extracto butanólico	40	20

Por otra parte, cuando se incubaban in vitro microtúbulos con (γ - ^{32}P -) ATP, se incorporaba ^{32}P a material precipitable por ATC 5% (Tabla I). También en este caso, parte de la radioactividad podía extraerse con solventes orgánicos, aunque la relación entre las marcas de tubulina y material liposoluble era aproximadamente la inversa que la obtenida in vivo. Esto indicaba la posible asociación de la tubulina con una actividad enzimática capaz de transferir el P- γ del ATP a lípidos endógenos.

De acuerdo con estos resultados, se juzgó interesante determinar, en primer término, que tanto el material liposoluble marcado en la célula entera, como la eventual actividad enzimática estaban realmente siempre asociados a los microtúbulos. En caso afirmativo, había que evidentemente identificar el material liposoluble asociado a microtúbulos, como asimismo identificar el producto de la reacción enzimática responsable de

la fosforilación de los mismos, sería entonces importante - por las razones expuestas más arriba - comprobar su influencia sobre la reacción de polimerización.

MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

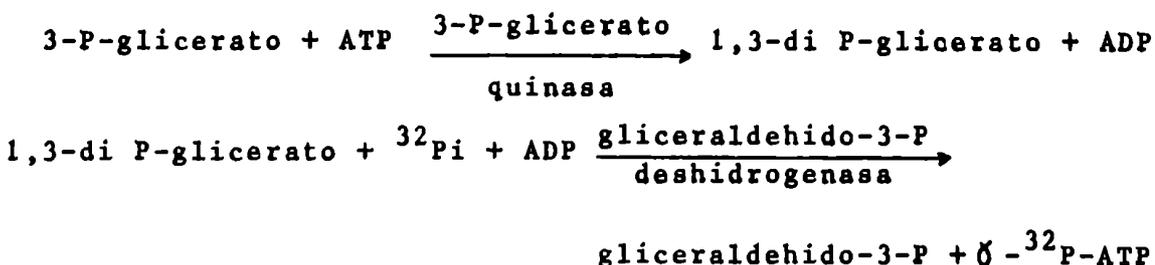
Los reactivos utilizados fueron en general de origen comercial y de grado reactivo.

La caseína utilizada como sustrato de proteína quinasa fue previamente tratada para eliminar el fósforo (152).

La vinblastina fue un regalo de Eli Lilly & Co. de Argentina.

Preparación de γ - 32 P-ATP o -GTP

Ambos nucleótidos marcados se prepararon enzimáticamente (153, 154), según las siguientes reacciones:



La mezcla de incubación, en un volumen final de 5 ml, contiene buffer Tris-ClH 50 mM pH 8, MgCl₂ 6 mM, cisteína 2 mM, 3-P-glicerato 1 mM, 20mCi de 32 Pi en solución clorhídrica libre de portador, ATP 2 mM, 1 mg (40 U) de gliceraldehido-3-P deshidrogenasa de músculo de conejo y 0,1 mg (100 U) de 3-P-glicerato quinasa. Luego de incubar a 30°C durante 4-5 horas, se detiene la reacción agregando 0,5 ml de ClH 1 N, se agita y luego se agrega una mezcla de 54 mg de carbón activado Norit-A y 42 mg de Polvo de celulosa Whatman. El tubo se agita varias veces y su contenido se vierte sobre un embudo con

filtro de vidrio frito, al que se aplica succión mediante una bomba de vacío. Se lava con dos volúmenes de agua destilada fría para eluir el $^{32}\text{P}_i$ que no reaccionó y luego se eluye el $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ con dos volúmenes de Etanol 50%- NH_3 0,15 N. El eluido se lleva a sequedad en evaporador rotatorio y se resuspende lavando con cuatro porciones de 0,5 ml cada una de agua destilada. La actividad específica se calcula midiendo la radioactividad sobre una alícuota y la concentración de nucleótido sobre una dilución 1:100 por su Absorbancia a 259 nm, considerando un coeficiente de extinción para el ATP de $15,4 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$, y para el GTP de $13,7 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ a 252 nm. Los controles de pureza se llevan a cabo por cromatografía sobre papel Whatman 1 con Etanol-Acetato de amonio 1M pH 7.4 (2.5:1) como solvente de desarrollo.

2. ENZIMAS

Las fosfolipasas A purificadas de páncreas bovino y porcino fueron un generoso regalo del Dr. Juan C. Vidal.

La fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*, la fosfolipasa C de *Clostridium welchii*, la fosfolipasa D de repollo y la lipasa de germen de trigo eran preparaciones de Sigma Chemical Company (EUA). También se utilizaron fosfolipasa D de Calbiochem y lipasa de Mann Research (EUA).

Preparación de proteína quinasa de embrión de pollo

Se disecan los músculos de las patas de embriones de pollo de 11 días, liberándolos de piel y huesos. Se diluye en 3 volúmenes de buffer fosfato de potasio 5 mM-EDTA 4 mM pH 7.0. Se homogeneiza suavemente en baño de hielo en un homogeneizador de vidrio con pistón de Teflon. El homogenato se centrifuga durante 30 minutos a 4°C y a 15.000 rpm. El sobrenadante

te se filtra por lana de vidrio, se mide el volumen y se agrega $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hasta una concentración final de 0,39 g/ml en baño de hielo y durante 30 minutos. Se deja reposar 30 minutos más y se centrifuga durante 20 minutos a 11.500 rpm a 4°C. El precipitado se resuspende en 1/5 del volumen inicial de buffer fosfato de potasio 5 mM EDTA 2 mM pH 7,0. Luego se dializa durante una noche contra el mismo buffer y se centrifuga durante 40 minutos a 100.000 x g. El sobrenadante se cromatografía en columna de DEAE-celulosa (5 ml de volumen de DEAE-celulosa en la columna/g de músculo). La columna se lava con 2,5 volúmenes de buffer y luego se conecta un gradiente lineal de 1.500 ml de buffer fosfato 5 mM-EDTA 2 mM a fosfato 500 mM-EDTA 2 mM. Se colectan fracciones de 20 ml, con un flujo de 1,6 ml/minuto.

3. METODOS ANALITICOS

a) Determinación de concentración de proteínas

Se llevó a cabo por el método de Lowry (155).

b) Determinación de fósforo

La materia orgánica se mineralizó por tratamiento con 20 μl de ClO_4H 70% y 50 μl de SO_4H_2 , calentando a llama directa. Luego se agregaron 0,25 ml de agua y se midió el fósforo liberado por desarrollo de color con verde de malaquita (156).

c) Cromatografía en papel

Se utilizó papel Whatman N°1. Los sistemas de solventes empleados fueron los siguientes:

(I) Isopropanol-Acido acético-Agua 27:4:9

(II) Butanol-Piridina-Agua 6:4:3

(III) Isopropanol-Amoníaco-Agua 7:2:1

(IV) Fenol saturado con agua conteniendo amoníaco concentrado 0,12% V/V

Los compuestos fosforilados se revelaron con el reactivo de Burrows (157), y los radioactivos mediante un radiocromatógrafo Packard.

d) Cromatografía en capa delgada

Sobre placas de vidrio de 20 x 5 cm se distribuyó, mediante un extensor Desaga, una capa de 0,75 mm de espesor de los medios indicados a continuación:

(V) Silica Gel H 21g en 56 ml de agua con $(\text{COO})_2\text{K}_2$ 1%

(VI) 20 g de Silica Gel H en 45 ml de agua con CO_3Na_2 1 mM

Como sistemas de solventes se emplearon:

(V) Cloroformo-Metanol-Amoníaco 4 N 9:7:2

(VI) Cloroformo-Metanol-Amoníaco-Agua 24:12:1:1

Los lípidos se detectaron colocando la placa en atmósfera de yodo.

e) Electroforesis en papel

Se realizó sobre papel Whatman N°1, en buffer Piridina-Acido Acético pH 6,5, durante 2 horas y con una diferencia de potencial de 20 V/cm

f) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se llevó a cabo en geles de poliacrilamida 10%, N,N'-metilen-bis acrilamida 0,3% en buffer Tris-GlH 0,2 M pH 8,8 conteniendo dodecil sulfato de sodio 0,1%. En los compartimentos electródicos se colocó buffer Tris 0,05 M-glicina 0,4 M-EDTA 2 mM pH 8,3, con dodecilsulfato de sodio 0,1%. Luego de 4 horas de corrida a 10 V/cm, los geles se colorearon con Coomassie Blue.

g) Gradientes de sacarosa

Se prepararon gradientes de sacarosa 10-30% en buffer fosfato 5 mM pH 7 conteniendo EDTA 2 mM en un volumen de 11,5 ml para centrifugaciones en rotor SW 40 en las condiciones que se indicarán. Finalizada la centrifugación, los gradientes se fraccionaron en 45 fracciones de 0,25 ml, permaneciendo éstas en baño de hielo hasta la determinación de las actividades enzimáticas.

Los pesos moleculares se estimaron por el método de Martin y Ames (158). A partir de estos datos se determinaron los pesos moleculares promedio (159).

h) Medida de la actividad de enzimas

- Fosfolipasa A

La reacción se llevó a cabo en buffer glicilglicina 0,01 M pH 8,95, conteniendo Cl_2Ca 5 mM Tween 20 1 %, lecitina 10 mM y 0,14 mg/ml de rojo cresol, en un volumen final de 1 ml. La mezcla se colocó en una cubeta de espectrofotómetro y se agregó la solución de enzima, registrando la variación en la absorbancia a 546 nm contra agua destilada, proporcional a la concentración de ácido graso liberado. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de producir una variación en la absorbancia de 0,11/minuto en estas condiciones.

- Fosfolipasa C

Se midió en buffer Tris-ClH 0,04 M pH 7,4, con Cl_2Ca 5 mM, lecitina 10 mM, albúmina 0,2% y 10 μ l de solución de enzima en un volumen total de 1,5 ml. Luego de incubar a 37°C durante 30 minutos, se agregaron 1,5 ml de ATC 5%, se centrifugó y se midió en el sobrenadante el fósforo total liberado, por el método de Fiske y Subbarow (160). La cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ mol de P/min es equivalente a 1 unidad.

- Fosfolipasa D

La actividad enzimática se determinó en una mezcla con buffer MES 0,1 M, Cl_2Mg 0,5 mM, GTP 1 mM, pH 6,5, conteniendo deoxicolato de sodio 0,1 % y FNa 10 mM. Luego de añadir la solución de enzima se incubó a 37°C durante 10 minutos, deteniendo la reacción por agregado de 0,5 ml de ATC 5 %. Se centrifugó y el sobrenadante se extrajo tres veces con 1 ml de éter etílico. En la fase acuosa se midió la colina liberada por el método de Appleton et al. (161). La unidad enzimática es la cantidad de enzima que produce la liberación de 1 μ mol de colina/hora.

- Tripsina

A 2 ml de solución de benzoil-arginil-etil-éster 0,01 M en buffer Tris-ClH 0,01 M pH 7,75, conteniendo Cl_2Ca 0,05 M y ClK 0,1 M, se agregan 0,1 ml de solución de tripsina 10 mg/ml o de la enzima cuya actividad tripsínica se quiere determinar. En función del tiempo de incubación se mide el consumo de HONa 0,1 M necesario para mantener el pH de la solución en 7,8 (162).

4. PREPARACION DE MICROTUBULOS

a) Precipitación con vinblastina (114)

Los músculos de las patas de embriones de pollo de 11 días se separan cuidadosamente de piel y huesos. Se homogeneizan a 0°C en un volumen igual de buffer fosfato 0,01 M, Cl_2Mg 0,01 M, sacarosa 0,24 M, pH 6,5. El material particulado se elimina por centrifugación a 45.000 x g durante 15 minutos a 0°C y otra a continuación de 1 hora a 150.000 x g. Al sobrenadante límpido que se obtiene se agrega vinblastina hasta una concentración final de 1 mM. Luego de mantener

la suspensión durante una hora a 0°C, se la centrifuga 30 minutos a 100.000 x g. El precipitado se resuspende por homogeneización, en un homogeneizador de vidrio con pistón de teflon, con el buffer mencionado al que se añade 1 mM vinblastina. La suspensión se centrifuga nuevamente a 100.000 x g durante 30 minutos. Finalmente, el precipitado se resuspende por homogeneización en el mismo buffer sin vinblastina y se dializa.

b) Polimerización (163)

Se matan ratas de 200-300 g de peso por decapitación, se extraen inmediatamente los cerebros y se los coloca en un vaso sobre hielo. Se los homogeneiza en homogeneizador de vidrio con pistón de teflon en igual volumen de buffer MES 0,1 M, EGTA 1 mM, Cl_2MgO , 5mM, GTP 1 mM, pH 6,5 a 4°C. El homogenato se centrifuga a 100.000 x g durante una hora a 4°C. El precipitado se descarta y al sobrenadante se agrega un volumen igual de glicerol 8 M. Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se centrifuga a 75.000 x g durante una hora a temperatura ambiente. El precipitado se resuspende en aproximadamente 1/20 del volumen del homogenato inicial del mismo buffer, por homogeneización en frío con un homogeneizador de vidrio Dounce. Se coloca la suspensión en baño de hielo durante 30 minutos y luego se centrifuga a 75.000 x g durante 1 hora a 4°C. Se descarta el precipitado, que contiene la proteína desnaturalizada, y el sobrenadante se utiliza (microtúbulos de 1 ciclo) o se continúa purificando por nuevo agregado de glicerol, etc. (microtúbulos de 2 ó 3 ciclos). En los casos en que se preparan microtúbulos en presencia de detergente, éste se añade junto con el primer agregado de

glicerol. La concentración de proteínas de la fracción microtubular de 1 ciclo es del orden de 14-18 mg/ml.

c) Cromatografía en DEAE-celulosa (164)

Cerebros de rata o embrión de pollo se homogeneizan en 2 volúmenes de buffer fosfato de sodio 10 mM, Cl_2Mg 10 mM, sacarosa 0,22 M, GTP 0,1 M pH 6,5. El homogenato se centrifuga durante 1 hora a 150.000 x g, y 2,5 ml del sobrenadante se siembran en una columna de 15 ml de DEAE-celulosa equilibrada con el mismo buffer pero sin GTP. La mayoría de las proteínas eluyen con el mismo buffer al que se agrega $ClNa$ 0,25 M. Luego se conecta un gradiente lineal de buffer con $ClNa$ de 0,3 a 1 M; la proteína microtubular eluye a 0,3 M.

d) Obtención de microtúbulos marcados in vivo

- Células HeLa (114)

Las células cultivadas en monocapa se incuban en medio de Hanks-hidrolizado de lactalbúmina con 5 % de suero bovino y ^{32}Pi . Luego se aíslan los microtúbulos por los métodos ya descriptos.

- Cerebro de embrión de pollo

Se inyecta ^{32}Pi en solución isotónica libre de portador en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo de 10 días y al día siguiente se aíslan los microtúbulos.

5. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS MICROTUBULARES

Se utilizó una modificación del método de Bligh y Dyer (165). A 1 ml de suspensión de tubulina de primer ciclo se agregaron 3,75 ml de metanol-cloroformo 2:1. La mezcla se agitó intermitentemente durante 30 minutos, centrifugó y el sobrenadante

se transfirió a otro tubo. El precipitado se extrajo nuevamente con 4,75 ml de metanol-cloroformo-agua 2:1:0,8 y centrifugó. Los extractos combinados se diluyeron con 2,5 ml de cloroformo y 2,5 ml de agua, produciéndose la separación en dos fases, se centrifugó y separó la fase clorofórmica. Esta se diluyó agregando igual volumen de benceno y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 30°C.

6. ACTIVIDADES ENZIMATICAS MICROTUBULARES

a) Fosforilación in vitro

La mezcla de incubación contiene 10-20 μ g de proteína microtubular, α -glicerofosfato de sodio 10 mM pH 6,8, FNa 25 mM, acetato de magnesio 40 mM y ATP ó GTP (γ -³²P) 0,15 mM (0,5-2 Ci/mol) en un volumen final de 0,1 ml. Luego de incubar a 30°C durante 10 minutos, la reacción se detiene por agregado de 0,025 ml de albúmina 50 mg/ml, EDTA 0,1 M y 2 ml de TCA 5% frío. La proteína precipitada se centrifuga a 1200 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se aspira y el precipitado se lava 2 veces con TCA, se redisuelve en 0,3 ml de PO_4HNaNH_4 1M y se precipita con TCA. El procedimiento se repite una vez más y precipitado se resuspende en 0,15 ml de n-butanol saturado con agua, se enfría y centrifuga, y la capa butanólica se transfiere a otro tubo. Se repite la extracción con 0,1 ml y 0,05 ml de butanol, y los extractos butanólicos reunidos se lavan con 0,05 ml de agua saturada en butanol. Se mide la radioactividad incorporada en el extracto butanólico y en el precipitado extraído, previa disolución del mismo en 0,1 ml de HONa 1 N, en viales con líquido centelleador de Bray (166).

b) Proteína quinasa

La incubación se lleva a cabo a 30°C en una mezcla que contiene glicerofosfato de sodio 100 mM pH 6,4, FNa 20 mM, EGTA 1 mM, (teofilina 2 mM), acetato de magnesio 6,6 mM, ATP

(γ - ^{32}P) 6 mM 0,05 Ci/m mol, 11 mg/ml de caseína defosforilada y 10-20 μg de proteína microtubular, en un volumen final de 0,15 ml. Luego de la incubación se procede de la forma indicada en el punto anterior, omitiendo en general las extracciones con butanol.

c) Diglicérido quinasa

El medio de incubación es el mismo que para fosforilación, salvo que antes de agregar la proteína microtubular y el nucleótido marcado se suspende en él DL-dipalmitina o dioleína por sonicación, en una concentración final de 5 mM. Luego se procede de la misma forma que para medir fosforilación.

d) Unión de colchicina

Se ensayó por el método de Weisenberg et al. (84). Las muestras que contenían 40-50 μg de proteína se incubaron por 1 hora a 30°C con 24 p moles de colchicina- ^3H (5 Ci/mmol) en un volumen final de 0,2 ml y se filtró a través de papeles de DEAE-celulosa. La radioactividad retenida se midió colocando los filtros en viales con mezcla centelleadora de Bray.

e) Actividad de Adenosina trifosfatasa (ATPasa)

Se realiza una incubación idéntica a la del ensayo de fosforilación in vitro de substratos endógenos. La reacción se detiene agregando 25 μl de solución de albúmina 50 mg/ml EDTA 0,1 M y 2 ml de ATC 5% frío. Se centrifuga a 1200 x g durante 10 minutos. Del sobrenadante se toman 10 μl a los que se agrega 1 ml de agua destilada. Luego de agitar se toman dos alícuotas de 0,1 ml y se transfieren a viales para medir la radioactividad total soluble. Al resto se agrega una punta

de espátula de carbón activado, se agita varias veces y se centrifuga a 1200 x g durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman dos alícuotas de 0,1 ml y se mide la radioactividad, correspondiente al P liberado. Como control, en algunas ocasiones se midió la radioactividad retenida por el carbón, que correspondía al ATP- γ - 32 P remanente. Los resultados se comparan con los de un blanco incubado en las mismas condiciones pero sin microtúbulos.

Cuando se deseaba medir la actividad fosfatásica de otras enzimas, se las incubaba con el buffer utilizado en los experimentos de polimerización in vitro al que se agregaba GTP- γ - 32 P. Luego de incubar durante 10 minutos a 37°C, se continuaba en la forma recién descrita.

7. MEDIDA DE POLIMERIZACION IN VITRO

a) Viscosimetría

Los ensayos se llevaron a cabo en un viscosímetro Cannon modelo 100 B210 sumergido en un baño de agua termostatzado a 37°C. Por medio de una pipeta Pasteur se introduce rápidamente 0,5 ml de extracto mantenido hasta entonces a 0°C y se miden las variaciones de la viscosidad a medida que transcurre el tiempo. En los casos en que se midió reversibilidad del aumento de viscosidad a 37°C, se transfirió el viscosímetro con la muestra a un baño de agua y hielo.

b) Turbidimetría

Se utilizó un espectrofotómetro registrador Unicam SP 8000, cuyo soporte para las cubetas se termostatzó a 37°C. Las mediciones se efectuaron a 350 nm. En las cubetas de cuarzo, de 10 mm de paso óptico, se colocaban 0,45 ml de buffer reagregación y aquéllas se introducían en el soporte, permitiendo que alcanzaran la temperatura deseada. Las muestras se in

cubaban previamente 10 minutos a 37°C en condiciones que se indicarán en cada caso, en un volumen final de 0,15 ml. Luego se transferían a un baño de hielo durante 5 minutos para permitir la despolimerización, y se introducían rápidamente, por medio de una micropipeta, en la cubeta con el buffer a 37°C, agitando vigorosamente. Inmediatamente se comenzaba el registro gráfico del aumento de turbidez en función del tiempo.

Cuando las mediciones se realizaron con extractos crudos, se colocaban en la cubeta 0,3 ml de glicerol 8 M, y la muestra se agregaba en un volumen final de 0,3 ml.

c) Microscopía electrónica

- Tinción negativa

El extracto de microtúbulos polimerizados se diluye 10 veces en el mismo buffer utilizado en la polimerización precalentado a 37°C. Se deposita una gota de la dilución sobre una grilla recubierta con Formvar, y el líquido se filtra a través de la misma tocando su parte inferior con papel de filtro. Se tiñe con 5 gotas de acetato de uranilo 1 %, repitiendo el filtrado después de la aplicación de cada gota.

- Inclusión

El extracto se fija agregando 10 volúmenes de glutaraldehído 3% precalentado a 37°C y se centrifuga a 10.000 x g durante 30 minutos. El precipitado se corta con una hoja de afeitar en trozos de aproximadamente 1 mm³. Los trocitos se lavan varias veces con agua y se fijan nuevamente con tetróxido de osmio 1,5% en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora en hielo. Se lava varias veces con el mismo buffer y se deshidrata por tratamientos sucesivos de 10 minutos cada uno con

acetona 50, 75, 90 y 100%. Luego se infiltra y posteriormente incluye en resina Epon. Los bloques se cortan y los cortes se tiñen con uranilo y sales de plomo, montándolos luego sobre grillas.

RESULTADOS

Los resultados preliminares de incorporación de ^{32}P expuestos en la Introducción (TABLA I), mostraban la presencia de lípidos fosforilados in vivo en la fracción microtubular, como asimismo que esta fracción tenía asociada una actividad enzimática fosforilante de lípidos.

Se emprendió entonces la verificación de estos datos previos y la identificación de los productos radioactivos formados in vivo e in vitro.

I. Asociación de lípidos marcados con ^{32}P con los microtúbulos

Evidencias de la asociación de material lipofílico con los microtúbulos

Estos resultados de incorporación de ^{32}P a material liposoluble correspondían a microtúbulos aislados por precipitación con vinblastina a partir de músculos de embrión de pollo incubados con ^{32}Pi . Ante la posibilidad que se tratara de un artefacto producido durante el aislamiento o una particularidad del tejido empleado como fuente, se investigó la presencia de este material en microtúbulos de otros orígenes y aislados por distintos métodos (TABLA II).

En todos los casos se observó que la fracción microtubular contenía una proporción importante de radioactividad extraíble con solventes orgánicos, aunque la proporción con respecto a la incorporación total variaba con los distintos teji-

dos y métodos de aislamiento (23 a 78 %). En efecto, cuando los homogenatos de músculo se sometieron a sonicación antes de precipitar con vinblastina, no se producía variación en la

TABLA II: Incorporación a proteína y extractos butanólicos de microtúbulos de diferentes tejidos marcados con ^{32}P

Tejido de origen	Ruptura de células	Aislamiento de microtúbulos	Radioactividad cpm/mg tubulina	
			Tubulina	Fase orgánica
Músculo	Homogeneización	Vinblastina	36.300	51.000
Músculo	Homog.+Sonic.	Vinblastina	37.500	52.700
Cerebro	Homogeneización	Vinblastina	8.200	15.300
Cerebro	Homog.+Sonic.	Vinblastina	7.700	27.700
Cerebro	Homogeneización	Polimerizac.	6.900	4.400
HeLa	Sonicación	Vinblastina	105.000	32.500

Los tejidos fueron marcados con ^{32}Pi , y luego de homogeneizados y/o sonicados, se aislaron los microtúbulos y se determinó la radioactividad en la fracción proteica y en la liposoluble. Los detalles experimentales se indican en Métodos.

proporción de la radioactividad incorporada a la fase orgánica y a tubulina. En cambio, mientras que en cerebro variaba poco la incorporación a tubulina, la radioactividad de la fase orgánica era mayor. Esta era menor si el aislamiento de los microtúbulos se realizaba por polimerización, y también en el caso de células HeLa. Cabe finalmente destacar que si la tubulina de cerebro es aislada por cromatografía en DEAE-celulosa, también hay radioactividad en la fase orgánica(115).

Para confirmar la naturaleza lipofílica del material presente en la fase orgánica, los extractos butanólicos de microtúbulos marcados in vivo se cromatografiaron sobre papel

en diversos sistemas de solventes: en todos los casos la radioactividad migraba con el frente. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos con extracto butanólico de la fracción microtubular de células HeLa.

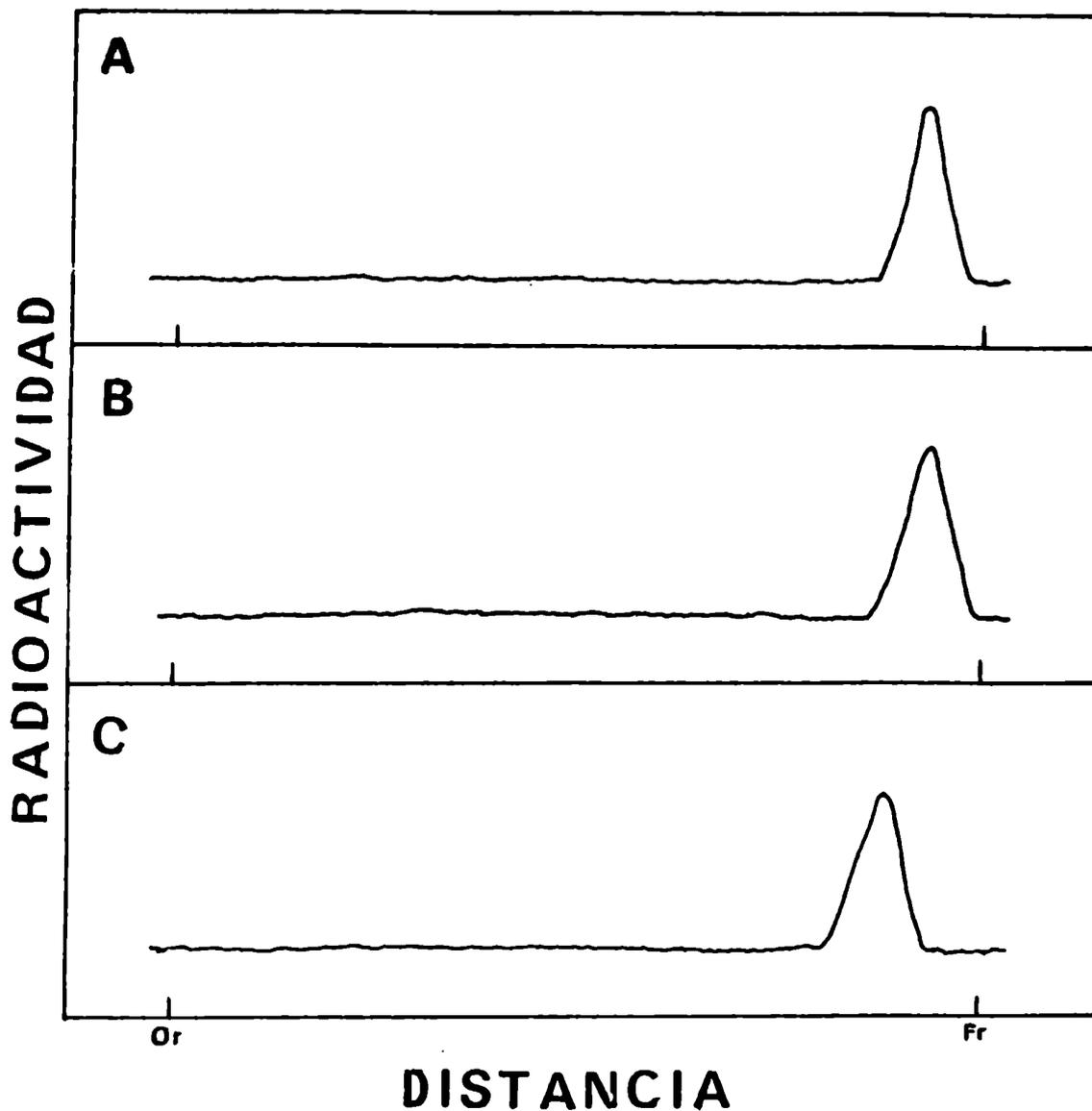


Figura 4: Radiocromatogramas en papel de extractos butanólicos de microtúbulos marcados in vivo. Los extractos de microtúbulos de células HeLa aislados por precipitación con vinblastina se cromatografiaron en los siguientes sistemas: A) Isopropanol - ácido acético-agua (27:4:9); B) Butanol-piridina-agua (6:4:3) C) Fenol saturado en agua con 0,12 % v/v de amoníaco concentrado.

Identificación del material radioactivo obtenido por marcación in vivo con ^{32}P

Con el objeto de identificar este material, se lo sometió a diversos tratamientos, como saponificación, tratamiento con fosfatasa alcalina y cromatografía en capa delgada.

Los experimentos de marcación in vivo se llevaron a cabo con células He La y embriones de pollo, dado que en el primer caso la incorporación se obtiene simplemente agregando ^{32}P al medio de cultivo, y en el segundo, inyectando el isótopo radioactivo en la membrana corioalantoides (ver Métodos). La fracción microtubular de las células o de los músculos de embrión se aislaron por precipitación con vinblastina, y la de cerebro de embrión por ciclos de polimerización-despolimerización. Los tratamientos descritos a continuación se aplicaron a todas las fracciones mencionadas con idénticos resultados, si bien se muestran los correspondiente a alguna en particular.

a) Saponificación

La deacilación en medio alcalino suave de los extractos butanólicos, seguida de una partición en fase clorofórmica y acuosa dio como resultado que el 75 % de la radioactividad se encontrara en la fase acuosa (TABLA III).

TABLA III: Efecto de tratamiento alcalino sobre la solubilidad del material fosforilado

Tratamiento	Radioactividad (cpm)	
	Fase clorofórmica	Fase acuosa
Ninguno	81.400	0
HOLi 0,1 N, 30°C, 30 min.	21.000	60.000

Los datos corresponden a microtúbulos de células HeLa.

Cuando la fase acuosa se cromatografió sobre papel se obtuvo una serie de componentes radioactivos, el mayor de los cuales migraba como gliceril fosforil colina, producto obtenido al someter lecitina al mismo tratamiento (Figura 5, B).

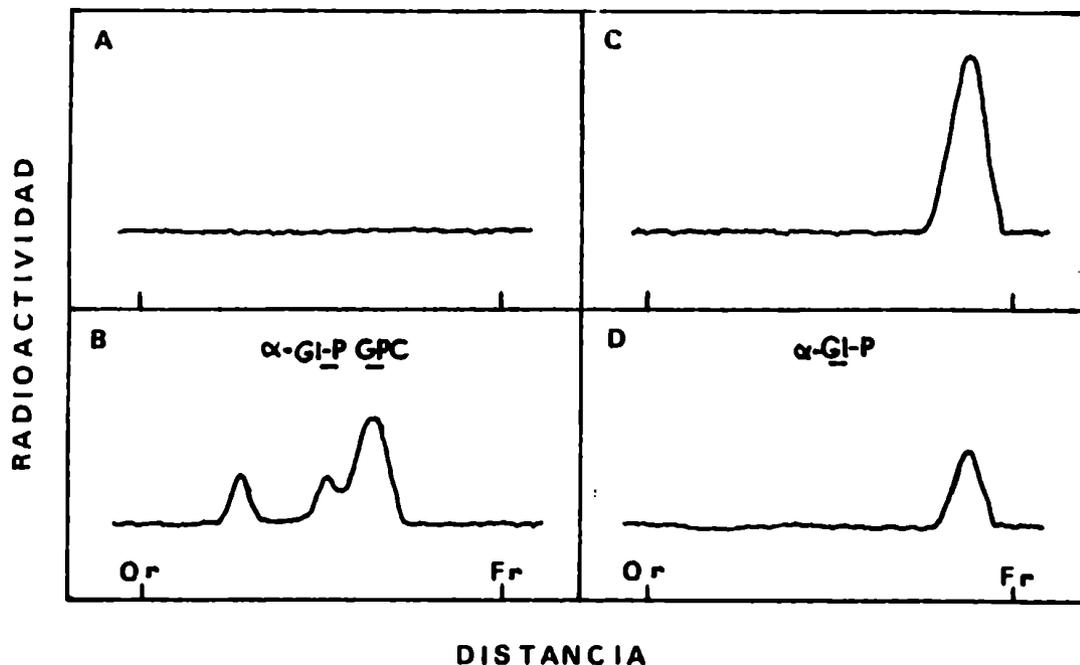


Figura 5: Radiocromatogramas correspondientes a los productos del tratamiento alcalino. Extractos butanólicos de fracción microtubular de células HeLa marcadas in vivo fueron tratados según se indica en la TABLA III y los productos se cromatografiaron sobre papel, con isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9) como solvente de desarrollo. A) fase acuosa luego de particionar el extracto butanólico, antes del tratamiento alcalino B) la misma fase después del tratamiento C) fase clorofórmica antes y D) después del tratamiento.

En electroforesis sobre papel, todo el material radioactivo de la fase acuosa se comportaba como la gliceril fosforil colina o la glucosa, de manera que el pequeño desplazamiento hacia el electrodo negativo es atribuible a la electroendósmosis, correspondiendo al comportamiento de sustancias neutras (Figura 7 A)

b) Tratamiento con fosfatasa alcalina

Por incubación con fosfatasa alcalina del extracto butanólico no se produjo liberación de ^{32}Pi , aunque el standard interno de UMP fue completamente degradado a uridina y Pi (Fig. 6).

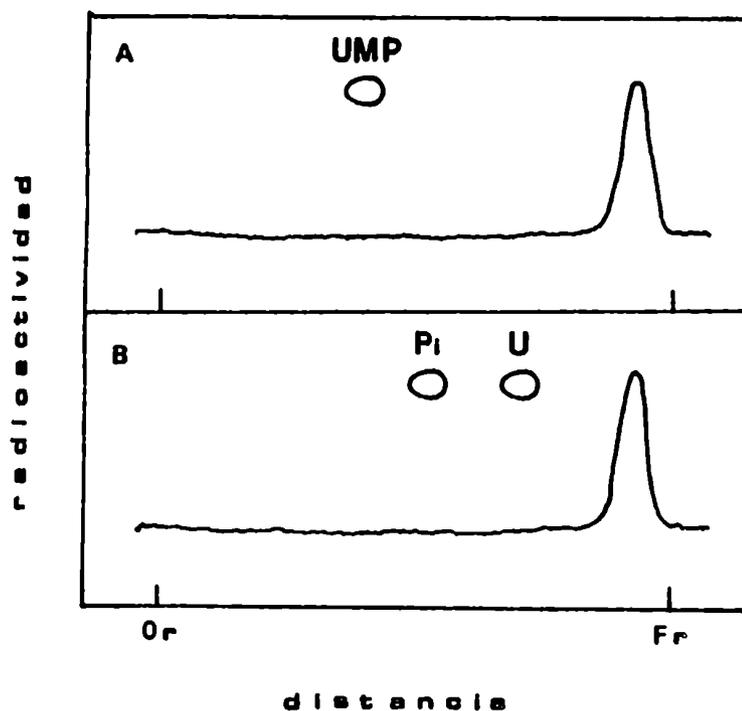


Figura 6: Cromatografía en papel del extracto butanólico de microtúbulos marcados in vivo tratado con fosfatasa alcalina. El extracto butanólico (20 μl) se llevó a sequedad a 30°C bajo corriente de N_2 y se resuspendió en 40 μl Metanol + 30 μl buffer Tris - ClH^2O , 2 M, pH 8,2 conteniendo 0,5 μmoles de UMP. A, incubado sin enzima. B, luego de incubar durante 4 horas a 37°C con 2 μg de fosfatasa alcalina. Solvente: Isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9).

Cuando este tratamiento se aplicó al producto de deacilación soluble en agua, no se modificaron las propiedades electroforéticas del mismo, aunque la enzima atacó el standard de UMP (Fig. 7B).

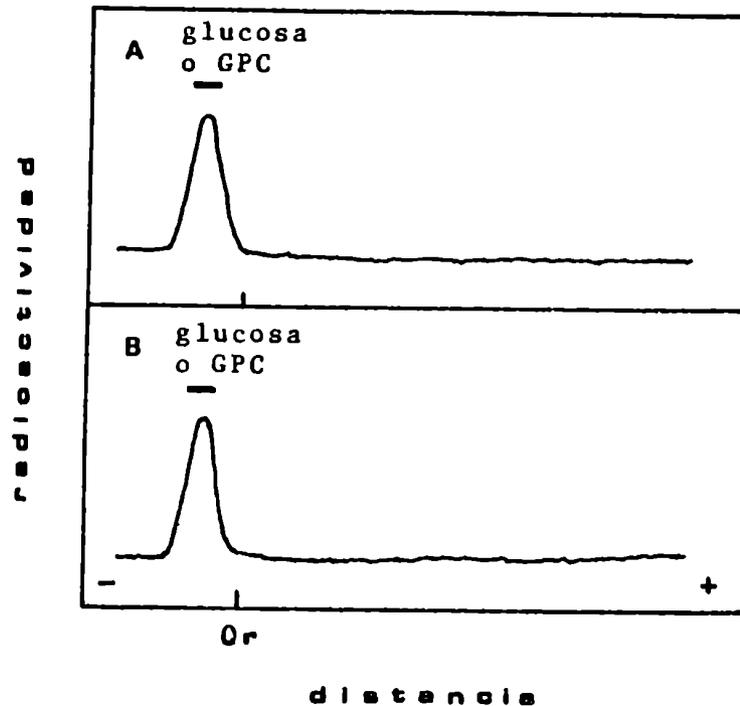


Figura 7: Electroforesis en papel de la fase acuosa antes y después del tratamiento con fosfatasa alcalina. Electroforesis en buffer Piridina-ácido acético pH 6,5 durante 2 horas a 20 V/cm, de la fase acuosa antes (A) y después (B) de incubar con fosfatasa alcalina.

Estos datos indicaban que el fosfato no se encontraba expuesto al ataque por la enzima.

Los resultados obtenidos llevaron a suponer que la radioactividad extraíble con butanol de los microtúbulos marcados in vivo se debía fundamentalmente a fosfolípidos asociados con ellos y que probablemente el que más se marcaba era lecitina.

c) Cromatografía en capa delgada

Este método permitió comprobar las suposiciones anteriores. En efecto, cuando se cromatografiaron extractos butanólicos de microtúbulos marcados, se obtuvieron varios picos radioactivos,

el mayor de los cuales migraba como fosfatidil colina; los otros componentes migraban como fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol y fosfatidil serina (Fig. 8).

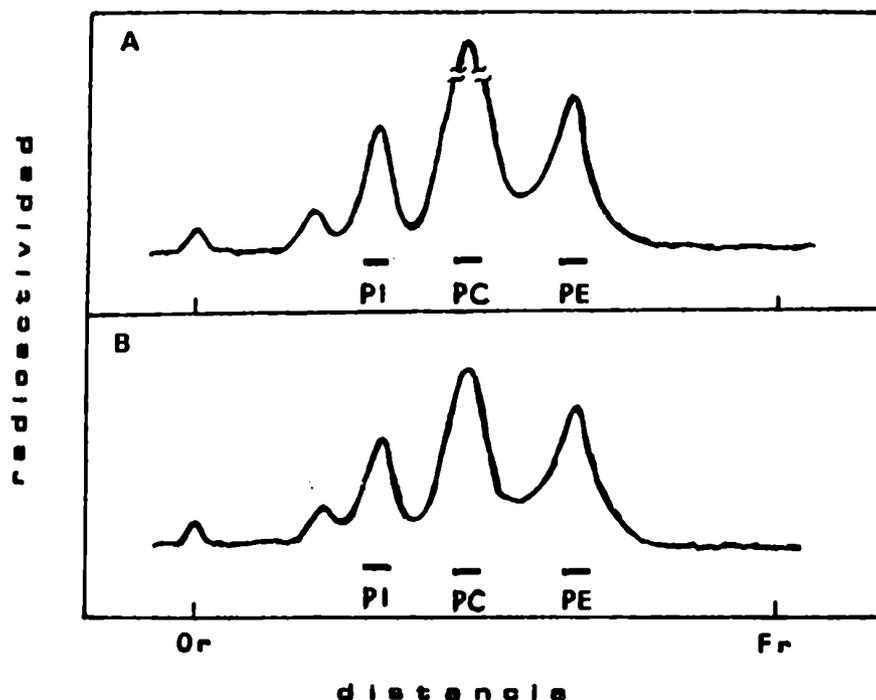


Figura 8: Cromatografía en capa delgada de extractos butanólicos de microtúbulos y del sobrenadante correspondiente marcados *in vivo*. Cromatografía en Silica Gel H con 1% de oxalato de potasio de extracto de microtúbulos (A) y sobrenadante de centrifugación a 150.000 xg (B) marcados *in vivo*. Solvente: cloroformo-metanol-amoniaco 4 N (9:7:2).

Con el objeto de determinar si la marcación de los fosfolípidos asociados a microtúbulos era fundamentalmente diferente o no de la de los que están presentes en el citoplasma, se cromatografió en capa delgada una alícuota del sobrenadante de 150.000. Puede observarse en la Figura 8B que la composición en fosfolípidos de este sobrenadante y la del material microtubular es semejante.

II. Asociación de una actividad enzimática fosforilante con los microtúbulos.

Evidencias de una actividad enzimática fosforilante de lípidos asociada con los microtúbulos.

De la misma manera que se trató de confirmar los datos preliminares de la Tabla I referentes a la asociación de fosfolípidos con los microtúbulos mediante el experimento descrito en la Tabla II, se estudió entonces la eventual generalidad de la asociación con una enzima capaz de transferir in vitro fósforo a lípidos.

Para estos estudios se utilizaron microtúbulos de músculo de embrión de pollo aislados por precipitación con vinblastina, que pueden guardarse congelados durante una o dos semanas sin perder actividad enzimática. Los microtúbulos de músculo no pueden aislarse por polimerización puesto que se produce también polimerización de actina, que copurifica con aquéllos.

Cuando se incubaron γ -³²P-ATP y microtúbulos de diversos orígenes y purificados por distintos métodos se observó que, en todos los casos, parte la radioactividad incorporada a material insoluble en ATC 5% podía extraerse con n-butanol (Tabla IV). Esto sugería que, además de la fosforilación de tubulina por una proteína quinasa endógena (114), se producía la fosforilación de un aceptor lipofílico endógeno.

Cuando se cromatografiaron los extractos butanólicos en diversos sistemas toda la radioactividad migraba con el frente del solvente (Figura 9), confirmando que el ³²P se incorporaba a un aceptor lipofílico.

TABLA IV: Incorporación de ^{32}P in vitro a proteína y extractos butanólicos de microtúbulos de diferentes tejidos.

Tejido de origen	Ruptura de células	Aislamiento de microtúbulos	Radioactividad incorporada	
			pmol/min/mg Tubulina	tubulina Fase orgánica
HeLa	Sonicación	Vinblastina	30	15
Músculo	Homogeneización	Vinblastina	15	12
Músculo	Homog.+Sonicación	Vinblastina	17	15
Cerebro	Homogeneización	Vinblastina	28	26
Cerebro	Homog.+Sonicación	Vinblastina	30	28
Cerebro	Homogeneización	Polimerización	25	10
Cerebro	Homogeneización	DEAE-celulosa	27	8

Microtúbulos aislados por los métodos indicados se incubaron con γ - ^{32}P -ATP en condiciones standard y se midió la incorporación a tubulina y fase orgánica según se indica en Métodos .

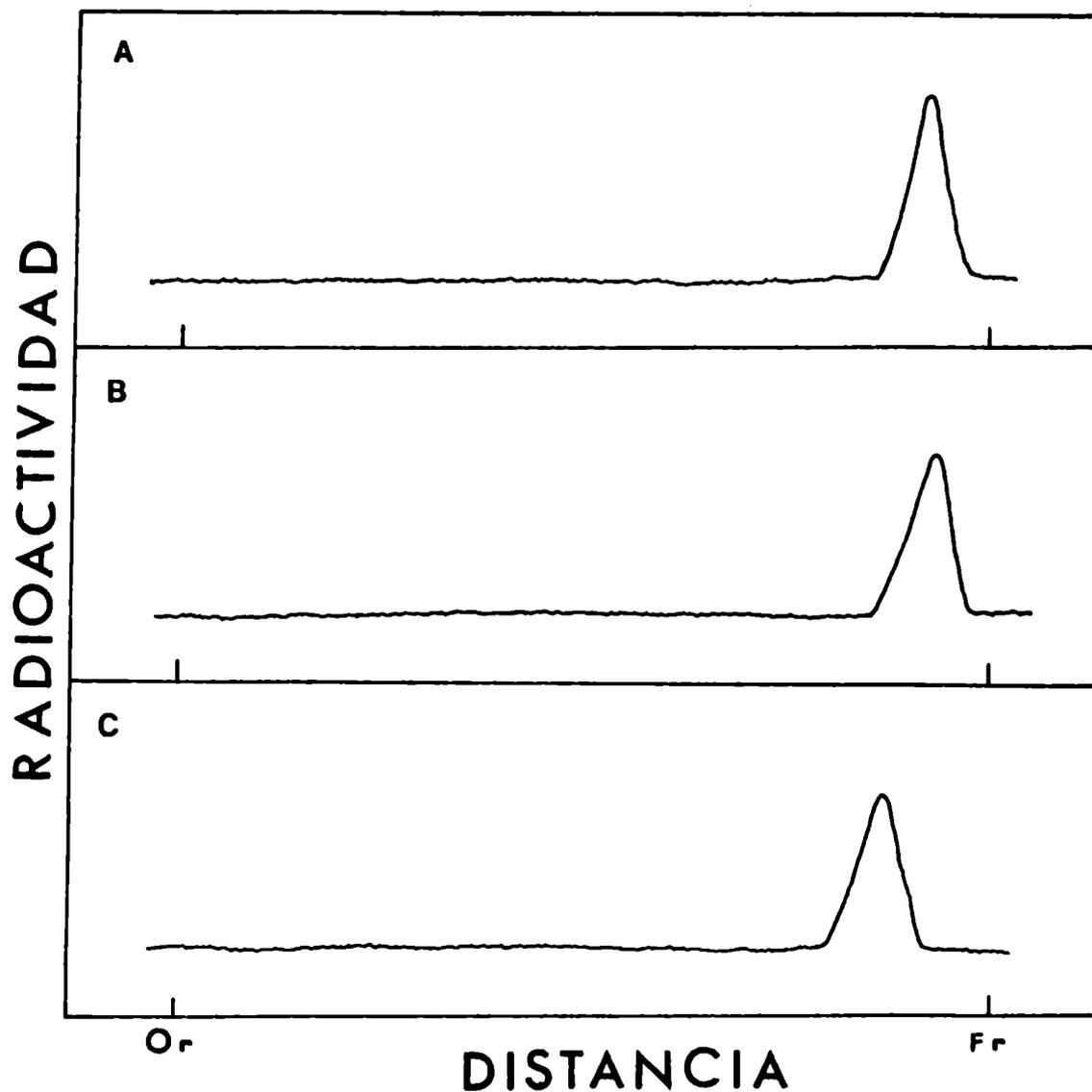


Figura 9: Cromatografía en papel de extractos butanólicos de microtúbulos marcados in vitro. A, Isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9). B, Butanol-piridina-agua (6:4:3). C, Fenol saturado en agua con 0,12% v/v de amoníaco concentrado.

Identificación del producto de la reacción in vitro

Esta se realizó esencialmente en la misma forma que para los productos obtenidos por marcación in vivo.

a) Saponificación

Por deacilación del extracto butanólico y posterior partición en las condiciones ya indicadas, casi el 100% de la radioactividad pasaba a la fase acuosa (Tabla V).

TABLA V: Efecto de tratamiento alcalino sobre la solubilidad del material fosforilado in vitro.

Tratamiento	Radioactividad (cpm)	
	Fase clorofórmica	Fase acuosa
Ninguno	21.300	0
HOLi 0,1 N, 30°C, 30 min	350	22.400

Por cromatografía y electroforesis, en esta fase se detectó un solo componente radioactivo que migraba en todos los casos como α -glicero fosfato (Fig. 10 y 12 A).

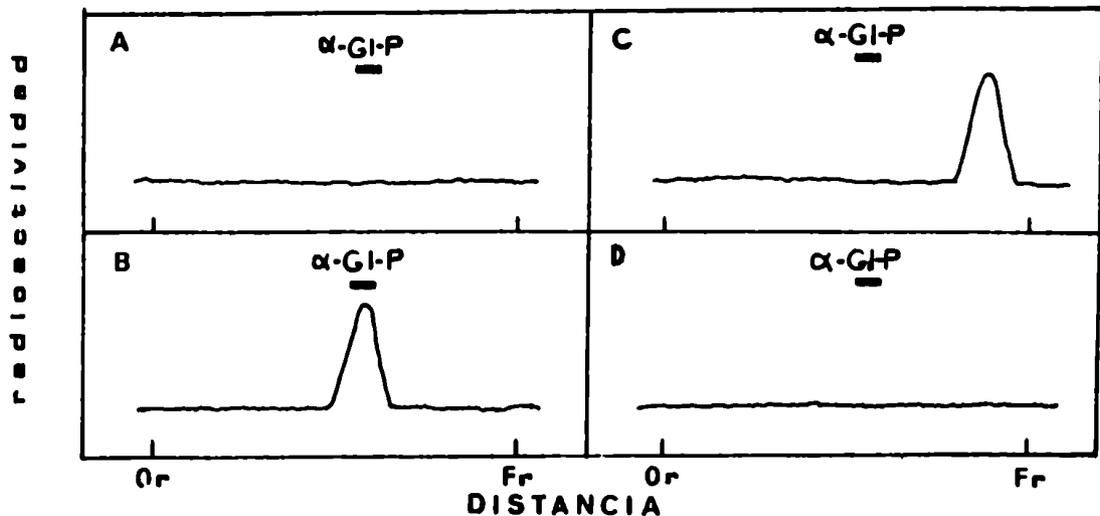


Figura 10: Cromatografía en papel de los productos del tratamiento alcalino. El sistema de solventes utilizado fue Isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9) A, fase acuosa luego de particionar el extracto butanólico antes del tratamiento alcalino. B, la misma fase después del tratamiento. C, fase clorofórmica antes del tratamiento. D, la misma fase después del tratamiento.

En otros sistemas de solventes, como fenol saturado con agua conteniendo 0,12% (v/v) NH_3 concentrado, Isopropanol-amoniaco-agua (7:2:1) y Butanol-piridina-agua (6:4:3), el único componente radioactivo co-cromatografiaba con α -glicero fosfato.

b) Incubación con fosfatasa alcalina

Tampoco en este caso se produjo liberación del ^{32}P al incubar directamente el extracto butanólico con fosfatasa alcalina, cuya actividad se manifestó por el ataque al standard interno de UMP (Fig. 11).

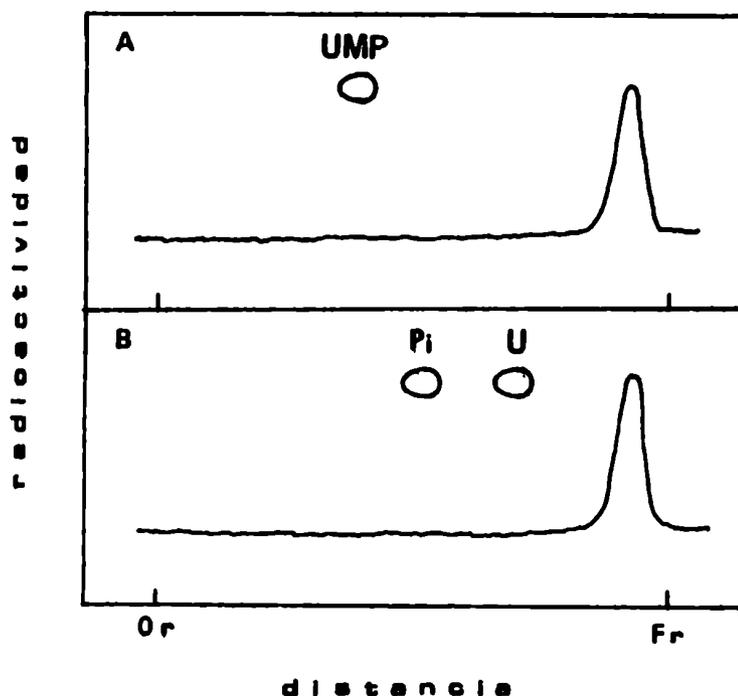


Figura 11: Cromatografía en papel de extracto butanólico de microtúbulos marcados in vitro tratado con fosfatasa alcalina. El extracto butanólico (20 μl) se llevó a sequedad bajo N_2 y se resuspendió en 40 μl Metanol + 30 μl de buffer Tris- ClH , 2M pH 8,2 conteniendo 0,5 μmoles de UMP. A, Incubado sin enzima. B, después de incubar durante 4 horas a 37°C con 2 μg de fosfatasa alcalina. Solvente de desarrollo: Isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9).

Sin embargo, cuando se trató con esta enzima el producto de deacilación soluble en agua, desaparecía prácticamente toda la marca que migraba en electroforesis como α -glicerofosfato, que pasaba a comportarse como ^{32}P . (Fig. 12B). Esto reforzó la idea que el producto de deacilación soluble en agua era α -glicero fosfato, e hizo suponer que el producto formado in vitro por incubación de microtúbulos con ATP- γ - ^{32}P era ácido fosfatídico.

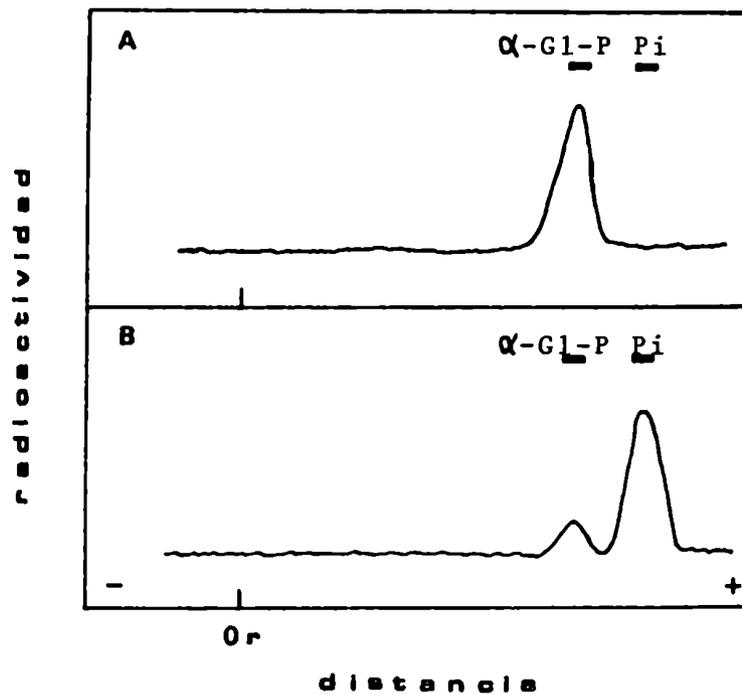


Figura 12: Electroforesis en papel de la fase acuosa antes y después del tratamiento con fosfatasa alcalina. Electroforesis en papel en buffer piridina-ácido acético pH 6,5 durante 2 horas a 20 v/cm de la fase acuosa antes (A) y después (B) de incubar con fosfatasa alcalina.

c) Cromatografía en capa delgada

Por esta técnica, el extracto butanólico dio en todos los casos un solo pico que co-cromatografiaba con ácido fosfatídico (Fig. 13), confirmando así la suposición anterior.

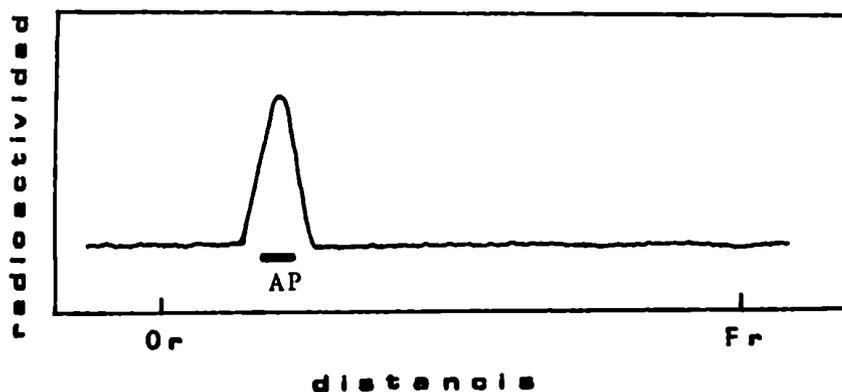


Figura 13: Cromatografía en capa delgada de extracto butanólico de microtúbulos marcados in vitro. Cromatografía en Sílica Gel H con CO_3Na_2 1 mM. Solvente: cloroformo-metanol-amoniaco-agua (24:12:1:1).

Este resultado indica que los microtúbulos tienen asociados tanto el sustrato como la enzima necesarios para formar ácido fosfatídico, o sea que hay diglicéridos endógenos y una actividad de diglicérido quinasa.

Confirmación de la existencia de una diglicérido quinasa en microtúbulos

a) Preincubación con fosfolipasa C

Puesto que se habían encontrado fosfolípidos asociados a microtúbulos, se pensó que una preincubación con fosfolipasa C estimularía la incorporación al ácido fosfatídico del fósforo del ATP, por producir in situ un aumento en la concentración de diglicéridos. Efectivamente, una vez realizado este tratamiento, se producía una gran estimulación de la incorporación

de ^{32}P (Tabla VI).

TABLA VI: Efecto de preincubación con fosfolipasa C y adición de diglicéridos exógenos sobre la incorporación de ^{32}P a lípidos.

Adiciones o tratamientos	Incorporación de ^{32}P (pmol/min/mg)	
	Tubulina	Lípidos
Ninguno	99	24
Preincubación con Cl_2Ca 5 mM	96	22
Preincubación con Cl_2Ca 5 mM + 5 μg PLC	97	380
1,2 dipalmitina 5 mM	80	202
1,2 dioleína 5 mM	76	180

40 μg de microtúbulos se pre incubaron durante 5 minutos a 30°C en buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,5 con fosfolipasa C y/o Cl_2Ca en un volumen de 0,05 ml; luego se diluyó hasta 0,1 ml con el buffer de fosforilación, se agregó γ - ^{32}P -ATP y se incubó durante 10 minutos a 30°C , o bien se incubó en las mismas condiciones con los diglicéridos indicados suspendidos por sonicación en el buffer de fosforilación, procediendo luego como se indica en Mé todos para determinar la radioactividad incorporada en proteínas y fase orgánica.

Como puede observarse en la Figura 14, la incorporación a la fase orgánica era lineal con el tiempo durante unos 30-40 minutos por lo menos.

La cromatografía en capa delgada del producto de reacción con γ - ^{32}P -ATP, obtenido luego de preincubar con fosfolipasa C, permitió determinar que el gran aumento en la incorporación de ^{32}P se debía efectivamente a una mayor formación de ácido fosfatídico (Fig. 15 B).

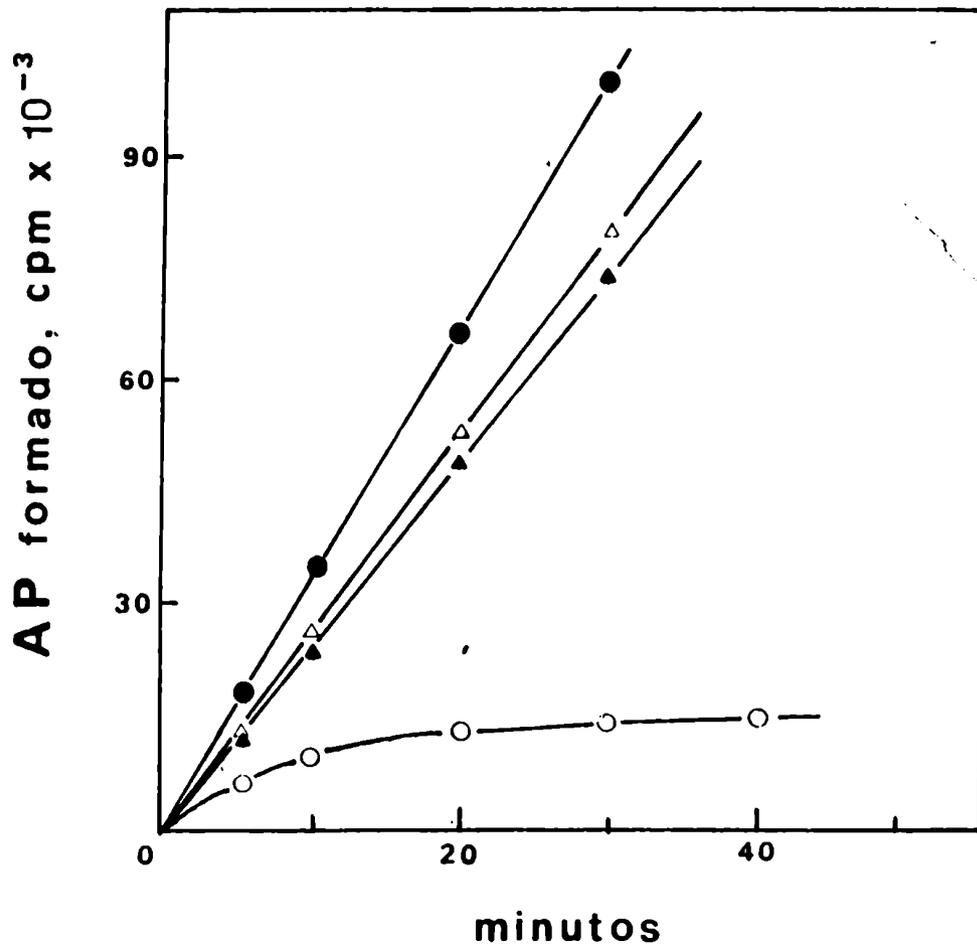


Figura 14: Curva de tiempo de incorporación de ³²P a lípidos. Se incubaron 40 μg de microtúbulos en las condiciones usuales, directamente (o—o), preincubando con fosfolipasa C (Δ—Δ), en presencia de 5 mM de 1,2 dipalmitina (●—●) o de 5 mM de 1,2 dioleína (▲—▲). Las condiciones son las indicadas en la TABLA VI.

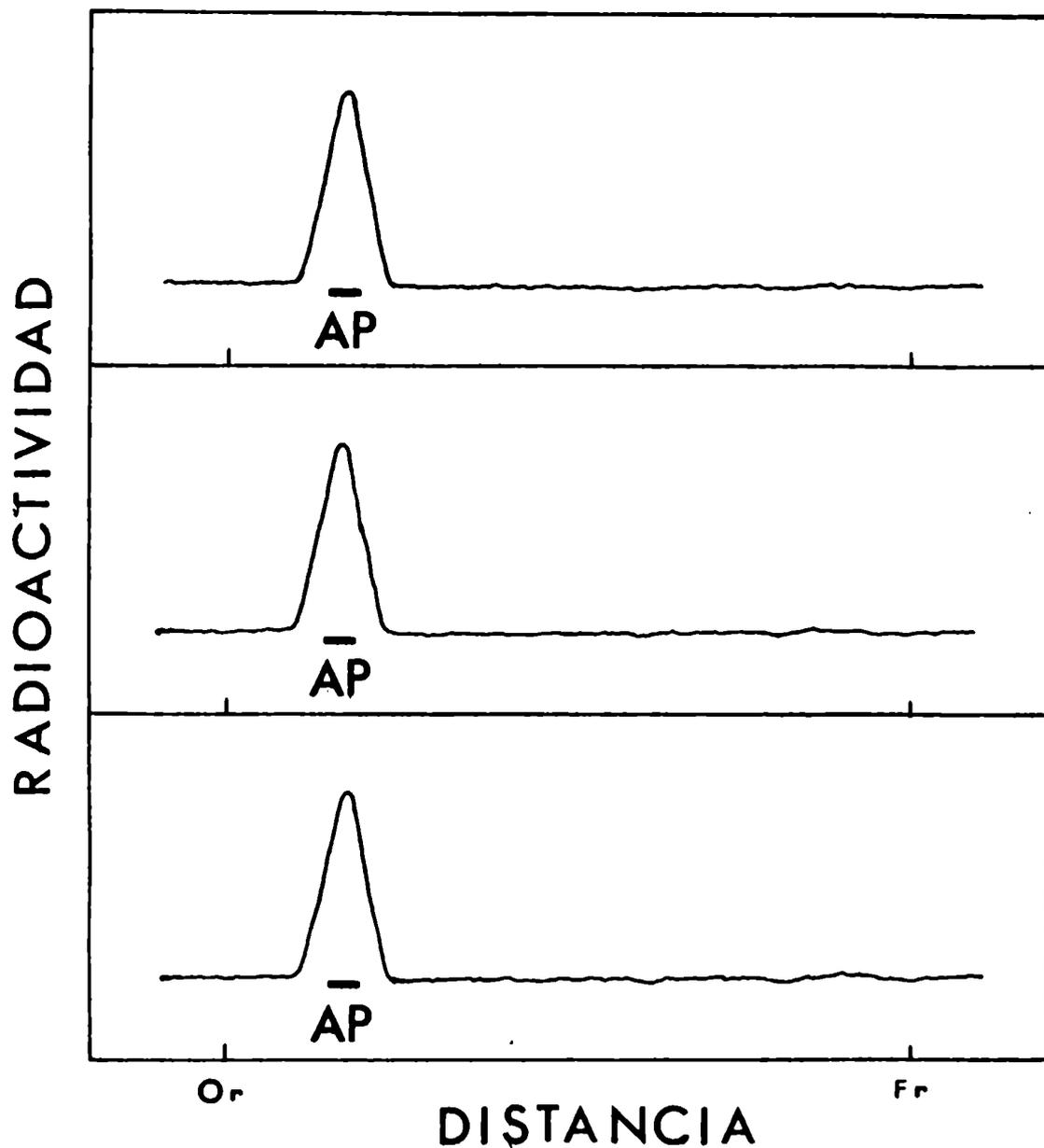


Figura 15: Cromatografía en capa delgada de extracto butanólico de microtúbulos marcados in vitro luego de preincubación con fosfolipasa C o en presencia de diglicéridos exógenos. Cromatografía en SilicaGel H con CO_3Na_2 1 mM. Solvente: cloroformo-metanol-amoniaco-agua (24:12:1:1). A, sin tratamientos. B, preincubación con fosfolipasa C. C, en presencia de 1,2 dipalmitina. En las tres placas se sembró la misma cantidad de radioactividad.

b) Adición de diglicéridos exógenos

Cuando se incubaron microtúbulos con γ - ^{32}P -ATP y una suspensión de 1,2 dipalmitina o 1,2 dioleína, se observó nuevamente una gran estimulación de la incorporación de ^{32}P al material soluble en butanol (Tabla VI). La incorporación en este caso es también lineal con el tiempo (Fig. 14), y el producto idéntico al obtenido con los diglicéridos endógenos (Fig. 15 C). Cuando se utilizó 5 mM 1,3-dioleína con 15% de 1,2-dioleína, la incorporación fue aproximadamente un 15% de la obtenida con 5 mM de 1,2 dioleína pura.

Proporción de diglicérido quinasa unida a microtúbulos.

La incorporación de ^{32}P a diglicéridos exógenos permite medir la cantidad de enzima presente en cada etapa de la purificación de los microtúbulos, al eliminarse la posibilidad de eventuales cambios en los niveles de diglicéridos endógenos. Utilizando este ensayo se determinó la actividad de diglicérido quinasa en las diversas fracciones del proceso de purificación de los microtúbulos (Tabla VII).

TABLA VII: Actividad de proteína quinasa y diglicérido quinasa de distintas fracciones de músculo de embrión de pollo.

Fracción	^{32}P incorporado (Femtomoles/min)			
	Aceptor endógeno		Aceptor exógeno	
	Proteína	Diglicérido	Caseína	Dipalmitina
Homogenato total	2.480	340	6.290	600
Sobrenadante 150.000 xg	2.430	290	6.200	850
Microtúbulos	171	23	470	75

Los ensayos se llevaron a cabo con alícuotas de cada fracción correspondientes a 10 mg de peso húmedo de tejido, en condiciones standard en ausencia de substratos exógenos, o bien con el agregado de caseína (10 mg/ml) o 1,2 dipalmitina (5mM).

Puede apreciarse que la diglicérido quinasa asociada a la fracción microtubular es un 8-9% de la actividad presente en el sobrenadante, tanto en ausencia como en presencia de dipalmitina. Este porcentaje es muy semejante al que se obtiene para la actividad de proteína quinasa, que se midió simultáneamente. Este hecho, juntamente con las observaciones que ambas actividades parecen siempre coexistir (ver más adelante), hizo necesario descartar que cualquier proteína quinasa pudiera tener actividad de diglicérido quinasa.

Para determinar si otras proteínas quinasas tenían actividad de diglicérido quinasa, se incubaron con (γ - ^{32}P)-ATP y dipalmitina dos isoenzimas de proteína quinasa de músculo de embrión de pollo, obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa de un sobrenadante análogo al utilizado para preparar los microtúbulos. De estas mismas enzimas se utilizaron alícuotas que dieran la misma incorporación a caseína que una alícuota de microtúbulos, y como puede observarse en la Tabla VIII, ninguna de las dos proteínas quinasas es capaz de catalizar la transferencia de ^{32}P a dipalmitina.

TABLA VIII: Comparación entre actividades de proteína quinasa y diglicérido quinasa de microtúbulos e isoenzimas de proteína quinasa de músculo.

Fracción	^{32}P incorporado (Femtomoles/min)			
	Aceptor endógeno		Aceptor exógeno	
	Proteína	Diglicérido	Caseína	Dipalmitina
Microtúbulos	171	23	470	75
Proteína quinasa I	-	-	475	0
Proteína quinasa III	-	-	465	0,3

Se utilizaron las mismas condiciones que en la Tabla VII. Se emplearon cantidades de proteína quinasa I y III y de microtúbulos como para obtener una incorporación a caseína semejante en los tres casos.

III. Caracterización de la diglicérido quinasa de microtúbulos.

1. Diferencias con la actividad del sobrenadante.

Aunque la actividad de diglicérido quinasa se detectó en microtúbulos preparados por diversos procedimientos (Tabla IV), se consideró conveniente estudiar en forma comparativa algunas propiedades de la enzima presente en microtúbulos y en el sobrenadante del cual éstos provienen, a fin de asegurarse que la primera no fuera una mera contaminación.

a) Comportamiento frente a diversas adiciones.

En un trabajo sobre la diglicérido quinasa de membrana de eritrocito (165) se sugirió que esta enzima podría formar parte de la ATPasa, de manera que se probó el efecto de diversos iones y de ouabaína además del de algunos detergentes, sobre la actividad del sobrenadante y de los microtúbulos (Tabla IX).

Se observa que el agregado de EDTA inhibe totalmente ambas actividades; el Ca^{++} inhibe aproximadamente en igual medida a las dos y que el Mn^{++} parece inhibir en mayor grado a la actividad del sobrenadante. Estos efectos parecen indicar que la reacción requiere Mg^{++} , por lo que se consideró como 100% a la actividad en presencia de este ion. Cuando además de Mg^{++} se agrega K^+ , se estimula la actividad microtubular pero no la del sobrenadante, mientras que el agregado de Na^+ estimula ambas por igual; sin embargo, si ambos iones se agregan juntos, se observa el mismo efecto que con K^+ únicamente. Cuando se agrega ouabaína sólo ese estimula la actividad de microtúbulos, pero si además se añaden Na^+ y K^+ , se estimula también, y en mayor grado, la actividad del sobrenadante. El Triton N-101 produce un incremento en la actividad de la enzima microtubular sin modificar la del sobrenadante, mientras que el deoxicolato estimula levemente las dos.

TABLA IX: Efecto de distintas adiciones sobre diglicérido quina
nasa de microtúbulos y sobrenadante

Adiciones	Actividad de diglicérido quinasasa (%)	
	Microtúbulos	Sobrenadante
EDTA 25 mM	2	0
Mg ⁺⁺ 10 mM	100	100
Ca ⁺⁺ 5 mM	60	50
Mn ⁺⁺ 10 mM	62	35
Mg ⁺⁺ 10 mM, Na ⁺ 100 mM	145	140
Mg ⁺⁺ 10 mM, K ⁺ 50 mM	160	100
Mg ⁺⁺ 10 mM, Na ⁺ 100mM, K ⁺ 50mM	165	100
Mg ⁺⁺ 10mM, ouabaína 0,2 mM	140	100
Mg ⁺⁺ 10 mM, ouabaína 0,2 mM, Na ⁺ 100 mM, K ⁺ 50 mM	145	180
Mg ⁺⁺ 10 mM, Triton N-101 0,5%	139	99
Mg ⁺⁺ 10 mM, Deoxicolato 0,1%	115	110

El ensayo se llevó a cabo en condiciones standard, con 10 μ l de fracción microtubular (2 mg proteína/ml) o de sobrenadante en presencia de dipalmitina 5 mM y con las adiciones indicadas. Se incubó a 30°C durante 10 minutos y se tomó como 100% la actividad en presencia de MgCl₂ 10 mM.

b) Efecto del pH

En la Figura 16 puede apreciarse que la actividad de ambas fracciones presenta una dependencia muy aguda con el pH, pero que ambas difieren en su pH óptimo; mientras el de la diglicérido quinasasa del sobrenadante es de 6,05, el de la microtubular es 6,4.

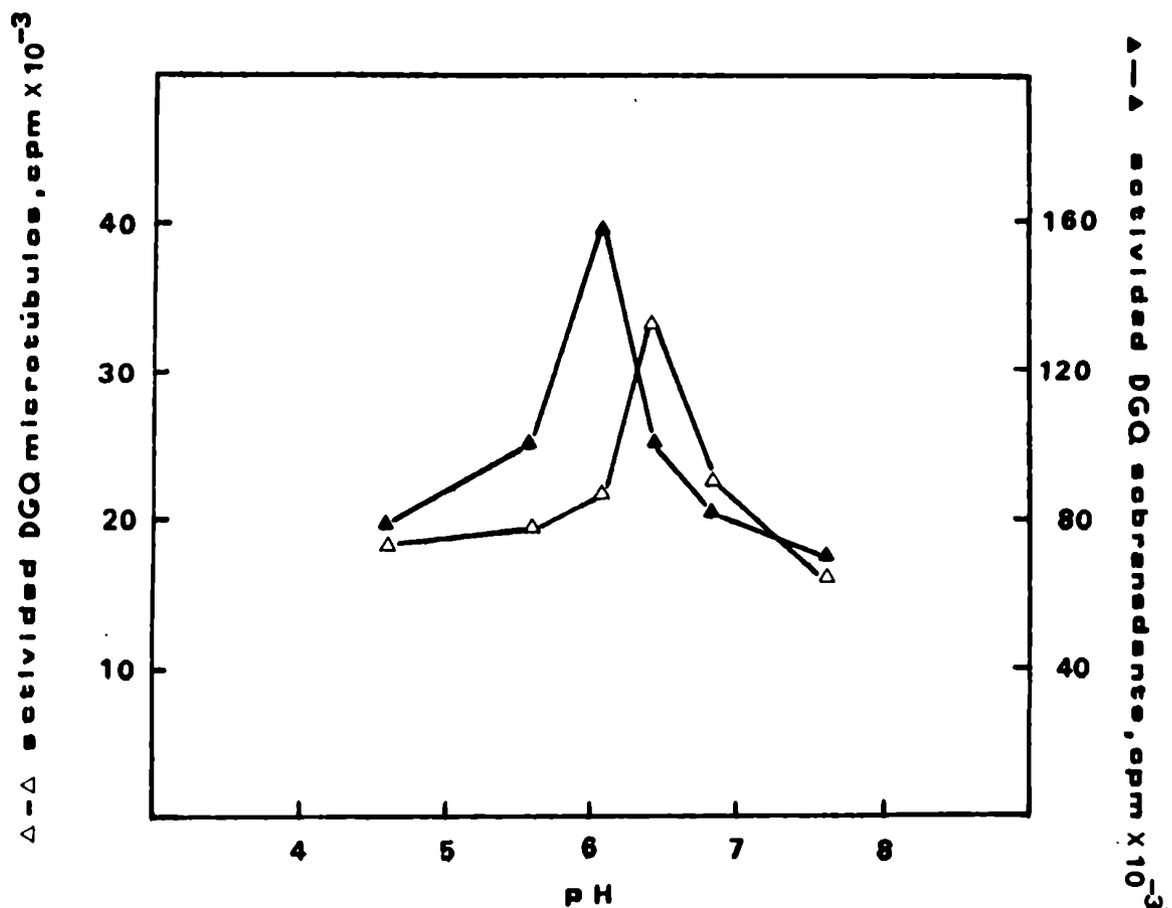


Figura 16: Efecto del pH sobre las actividades de diglicérido quinasa de microtúbulos y sobrenadante. Las mezclas de reacción contenían buffer α -glicerofosfato 10 mM de distintos pH, Fna 25 mM, Acetato de magnesio 40 mM, 10 μ l de microtúbulos o de sobrenadante y γ -³²P-ATP (2 Ci/mmol), se incubó a 30°C durante 1 hora,

c) Centrifugación en gradientes de sacarosa

Para comparar las propiedades de sedimentación de las actividades enzimáticas de microtúbulos y del sobrenadante, se llevaron a cabo centrifugaciones en gradientes de sacarosa 10-30%. En la Figura 17 A puede observarse que la actividad del sobrenadante sedimenta en forma de banda ancha y asimétrica, probablemente por la existencia de varias especies de enzima. El peso molecular de la actividad máxima es de 130.000. La actividad

asociada a microtúbulos, en cambio, sedimenta en forma de pico más agudo y simétrico, de manera que puede tratarse de una

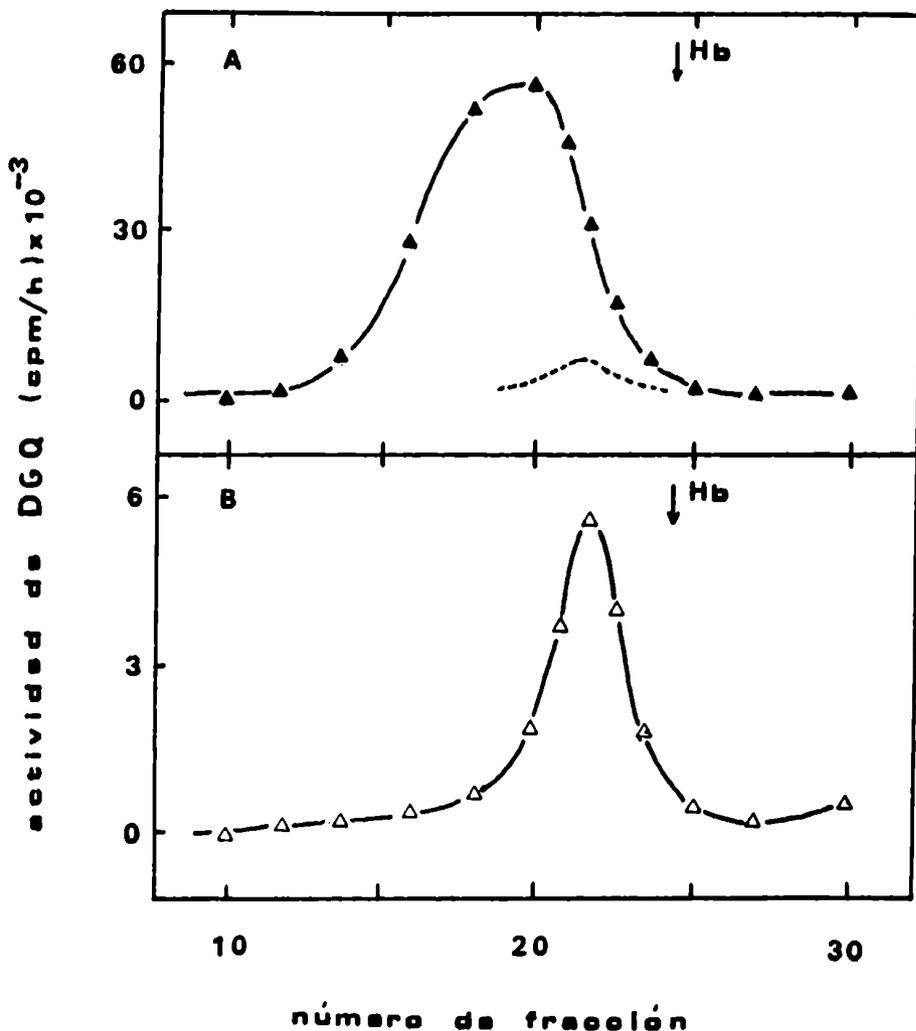


Figura 17: Sedimentación en gradientes de sacarosa de diglicérido quinasa de microtúbulos y sobrenadante. Sobre gradientes de sacarosa 10-30 % se sembraron 0,2 ml de sobrenadante o de microtúbulos (2 mg proteína/ml) y se centrifugó en un rotor Spinco S W 40 durante 13 horas a 35.500 rpm. Luego de fraccionado el gradiente se midió la actividad de diglicérido quinasa sobre alícuotas de 50 μ l de cada fracción, en condiciones standard. A) actividad del sobrenadante; en línea punteada se muestra, a la misma escala, la actividad microtubular B) actividad de la fracción microtubular. Hb representa la posición de sedimentación de la hemoglobina, utilizada como referencia interna.

sola especie, cuyo peso molecular sería de 95.000. Las diferencias entre los pesos moleculares son más notables si se comparan los pesos moleculares promedio: el de la actividad del sobrenadante es 170.000 y la de fracción microtubular casi la mitad, 90.000. Cuando ambas actividades se representan en la misma escala (Figura 17 A), puede verse que la actividad asociada a microtúbulos representa una parte muy específica de la actividad total, correspondiente a la fracción más liviana de la misma (línea punteada). El agregado de colchicina al material que se siembra no modifica la posición del pico de actividad enzimática.

En resumen, las diferencias en la sedimentación, comportamiento frente a ciertas adiciones y pH óptimo sugieren que la diglicérido quinasa de microtúbulos es una especie definida y no una alícuota de la actividad del sobrenadante.

2. Otras propiedades de la diglicérido quinasa de microtúbulos

a) Influencia de la concentración de magnesio

Las quinasas requieren para su actividad la presencia de iones divalentes (166) y la diglicérido quinasa no es una excepción. En la TABLA IX se mostró que el Mg^{++} era más efectivo que el Ca^{++} o el Mn^{++} , por lo cual se resolvió estudiar la influencia de su concentración sobre la formación de ácido fosfatídico. Para llevar a cabo este experimento, dado que los microtúbulos se suspenden en buffer que contiene 10 mM Cl_2Mg , se agregó EDTA en la misma concentración y luego se añadió la cantidad deseada de Cl_2Mg y la suspensión de dipalmitina.

En la Figura 18 se observa una estricta dependencia con la concentración de Mg^{++} a concentraciones menores de 1 mM y que

no hay efectos inhibitorios en el rango estudiado. A partir de 5 mM, que corresponde a una relación Mg^{++}/ATP de 25, no hay variación en la incorporación con la concentración de este ion.

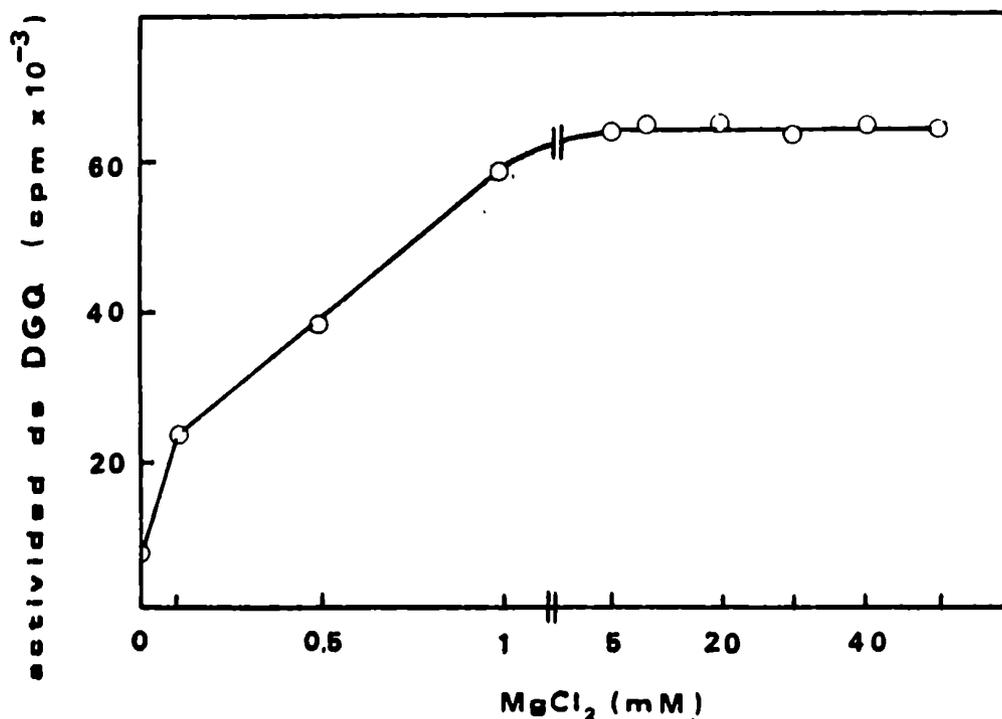


Figura 18: Influencia de la concentración de Mg^{++} sobre la actividad de diglicérido quinasa de microtúbulos. A cada tubo conteniendo 10 μ l de suspensión de microtúbulos (2 mg/ml) en buffer con Cl_2Mg 10 mM se agregaron 5 μ l de EDTA 20 mM y la cantidad de Cl_2Mg necesaria para alcanzar las concentraciones indicadas y buffer con 5 mM de 1,2-dipalmitina. Se incubó a 30°C durante 10 minutos.

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos para fosforilación de tubulina en condiciones análogas (114), los cuales indican que la incorporación no varía con la concentración de Mg^{++} entre 7 (Mg^{++}/ATP aproximadamente igual a 23) y 40 mM, pero es menor por debajo de este valor.

b) Especificidad hacia nucleótidos

Para determinar esta característica se agregó γ -³²P-ATP y se midió el efecto de la adición de nucleótidos fríos en una concentración 3-4 veces mayor. En la TABLA X se observa que todos los nucleótidos compiten con el ATP, aunque el CTP y el UTP mucho menos que el GTP, que puede reemplazar al ATP como dador, tanto en la actividad de diglicérido quinasa como de proteína quinasa microtubulares. Como control se muestra el efecto del agregado de ATP frío, que produce una disminución en la incorporación que se aproxima bastante a la esperada según el descenso en la actividad específica.

TABLA X: Especificidad hacia los nucleótidos de las actividades de diglicérido quinasa y proteína quinasa de microtúbulos

	Actividad (%)	
	Diglicérido quinasa	Proteína quinasa
γ - ³² P-ATP 0,6 mM	100	100
γ - ³² P-ATP 0,6 mM + GTP 2 mM	36	30
γ - ³² P-ATP 0,6 mM + CTP 2 mM	74	66
γ - ³² P-ATP 0,6 mM + UTP 2 mM	68	64
γ - ³² P-ATP 0,6 mM + ATP 2 mM	29	26

El ensayo se realizó en condiciones standard

Las pequeñas diferencias que se observan entre el comportamiento de la diglicérido quinasa y la proteína quinasa no son significativas, dado que no se reproducen de manera consistente en otros experimentos con la misma o diferente variación en la actividad específica del nucleótido marcado.

c) Dependencia de la fosforilación con respecto al tiempo

La incorporación de ^{32}P a lípidos endógenos y exógenos en función del tiempo y con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ como dador ya se ha mostrado en la Figura 11. Puesto que el GTP también parece funcionar como dador (TABLA X), se decidió estudiar en detalle la incorporación con ambos nucleótidos a los substratos endógenos, tubulina y diglicéridos.

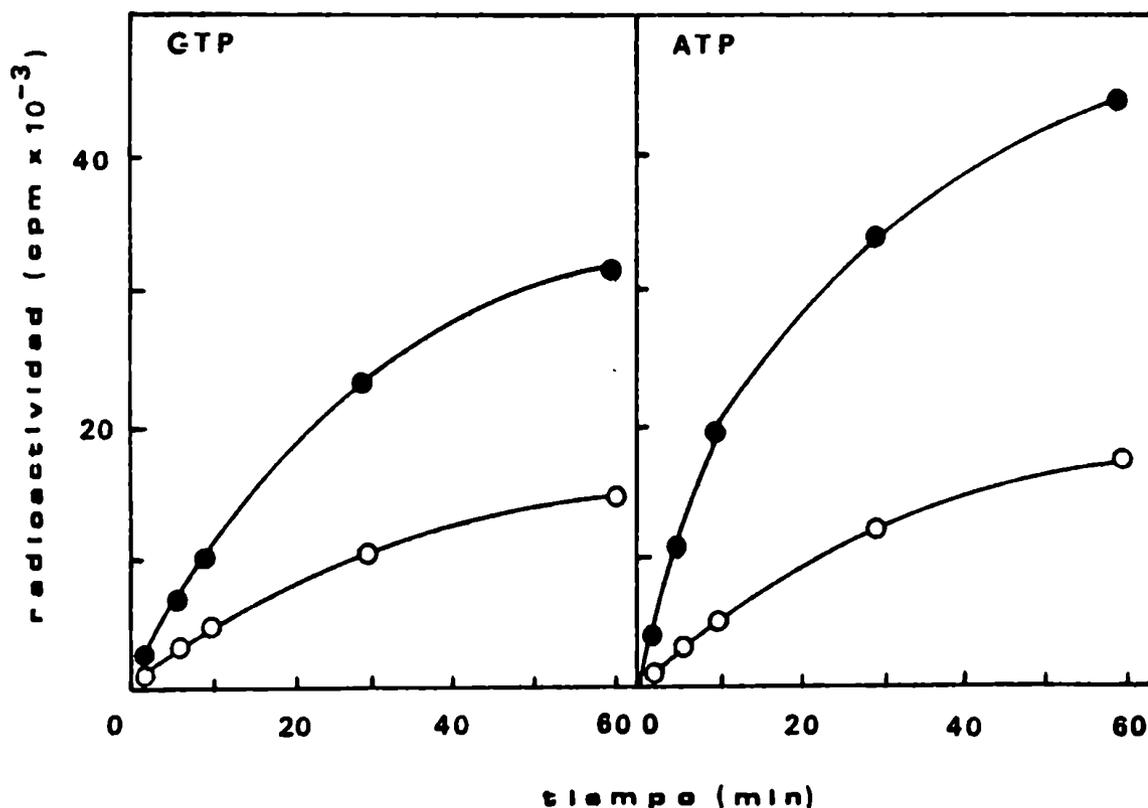


Figura 19: Incorporación de ^{32}P a substratos endógenos
 Los microtúbulos ($20\ \mu\text{g}$) se incubaron durante los tiempos indicados, a 30°C , con $30\ \text{mM}$ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ó -GTP ($2\ \text{Ci/mMol}$).
 (○—○) incorporación a lípidos; (●—●) incorporación a proteínas.

Puede observarse en la Figura 19 que, en las condiciones indicadas, la transferencia de ^{32}P a lípidos ocurre aproximadamente a la misma velocidad inicial con los dos nucleótidos, y

la fosforilación de tubulina se produce con ATP a una velocidad dos veces mayor que con GTP.

d) Dependencia con la concentración de nucleótidos

La Figura 20 muestra los resultados de incorporación a substratos endógenos a distintas concentraciones de γ - ^{32}P -ATP ó -GTP, en incubaciones de 5 minutos, de modo que corresponden a velocidades iniciales (ver Figura 19).

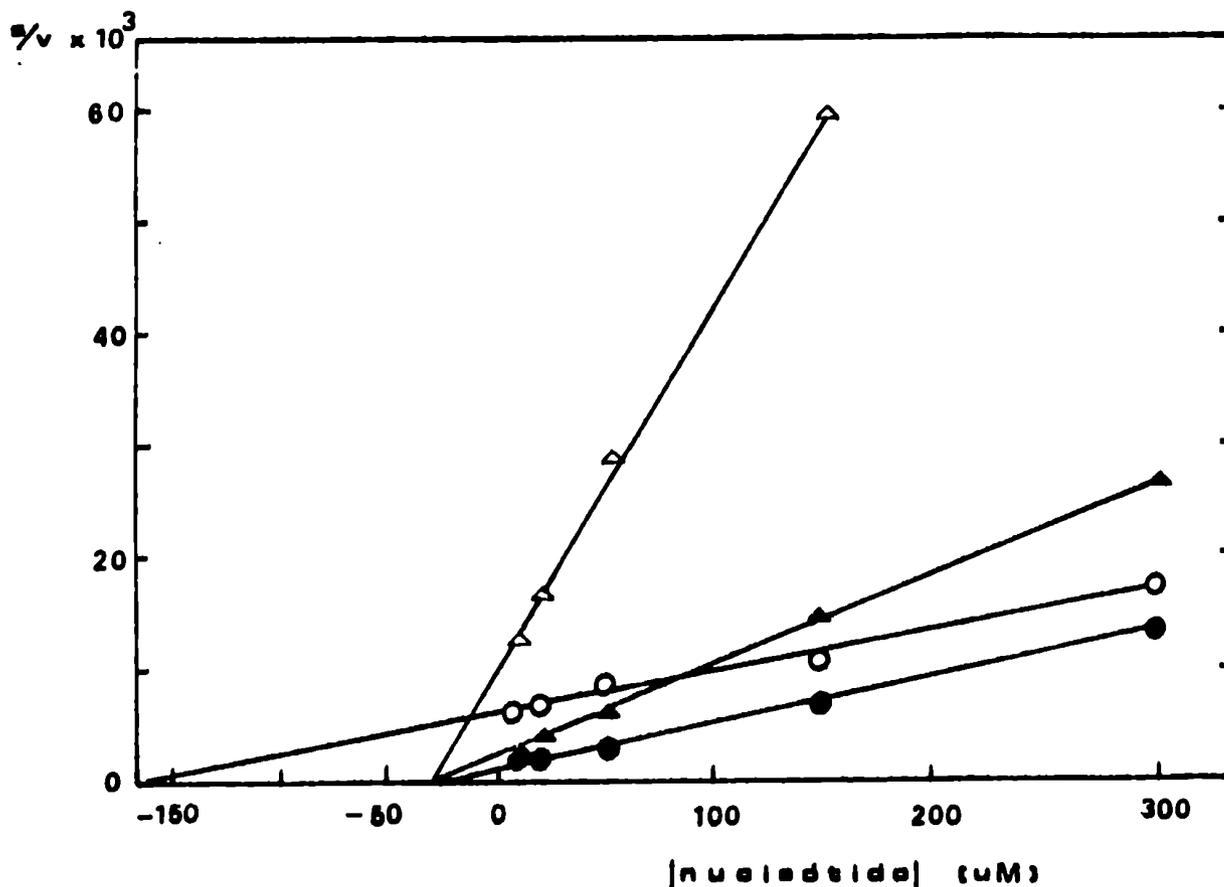


Figura 20: Efecto de la concentración de nucleótidos sobre la incorporación a substratos endógenos. Cada punto corresponde a incubaciones de 5 minutos a 30°C con diversas concentraciones de nucleótido radioactivo. (○ △) incorporación a lípidos (● ▲) incorporación a proteínas. △ ▲ :GTP, ○ ● :ATP

A partir de estos datos se calcularon los valores de Km y Vm

que se muestran en la TABLA XI. Puede verse que la diglicérido quinasas microtubular tiene una afinidad entre 5 y 6 veces mayor por GTP, mientras que la velocidad máxima en este caso es aproximadamente 1/4 que cuando se usa ATP. La actividad de transferencia de ^{32}P a tubulina es mayor con ATP, y la afinidad por este nucleótido es también ligeramente mayor que por GTP.

TABLA XI: Parámetros cinéticos de las actividades de incorporación a substratos endógenos

Substrato	Km (μM)		Vm (pmol/min/mg)	
	ATP	GTP	ATP	GTP
Tubulina	25	30	56	29
Diglicérido	160	30	40	8

Los datos se obtuvieron a partir de la Figura 20. Los valores de Km se leyeron directamente sobre el eje de abscisas cuando $s/v=0$, y los de Vm se obtuvieron calculando la inversa de la pendiente de la recta.

e) Influencia del agregado de una alta concentración de nucleótido frío

Tal como ya se ha dicho, algunos autores piensan que la diglicérido quinasas podría formar parte de la ATPasa. En combinación con una fosfatasa que hidrolizara el ácido fosfatídico formado, se obtendría un resultado neto de hidrólisis de ATP. Con el objeto de determinar hasta qué punto el ácido fosfatídico es un intermediario en esta u otra reacción, se comprobó el efecto de una incubación en presencia de una alta concentración de ATP frío sobre la incorporación a ácido fosfatídico. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 21

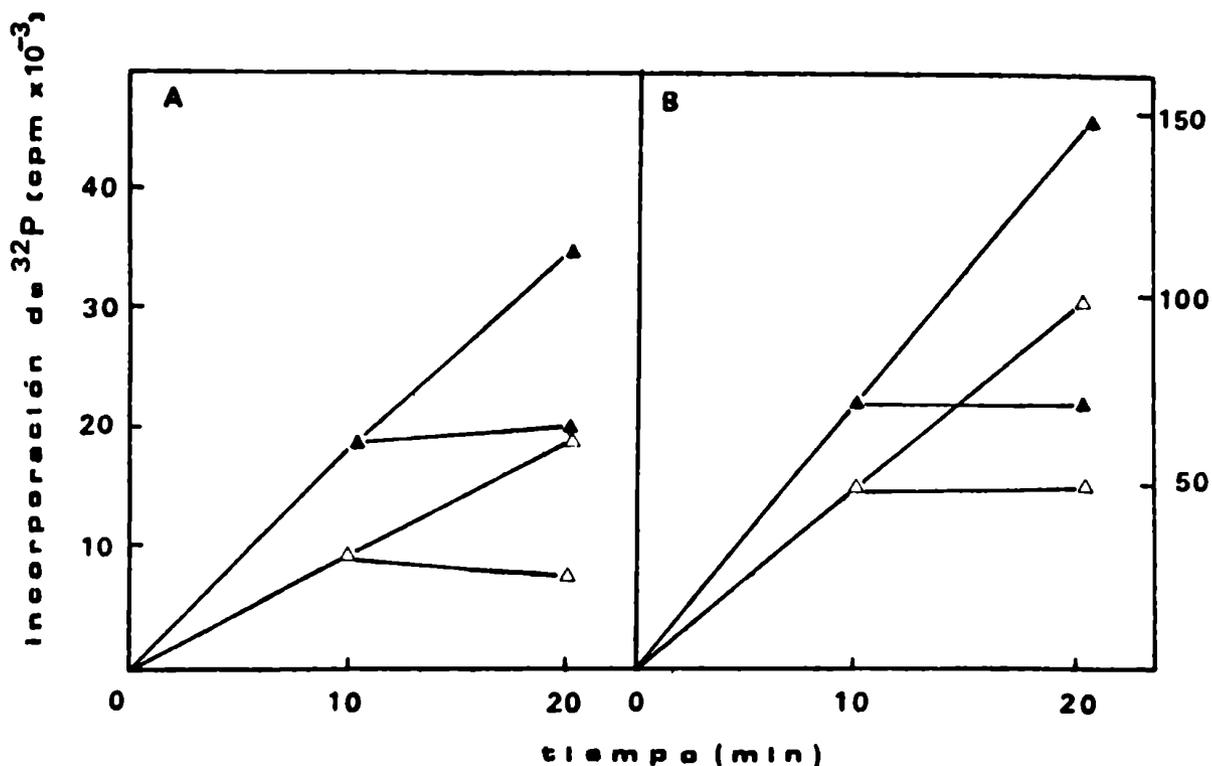


Figura 31: Efecto de disminución de la actividad específica del γ -³²P-ATP. Se incubaron tres series de tubos en condiciones standard: en una, la reacción se detuvo a los 10 minutos; en la segunda, a los 10 minutos se agregó 10 mM de ATP frío y se incubó durante 10 minutos más, deteniendo entonces la reacción; la tercera se incubó durante 20 minutos. La concentración de γ -³²P-ATP era 0,2 mM. (Δ—Δ) incorporación a lípidos; (▲—▲) incorporación a proteínas. A, substratos endógenos; B, substratos exógenos.

Puede observarse que la fosforilación de diglicéridos, especialmente exógenos, no disminuye apreciablemente luego de 10 minutos de incubación con el nucleótido frío, indicando que el ácido fosfatídico formado no pierde o transfiere el fosfato.

f) Propiedades de sedimentación de la diglicérido quinasa y otras actividades enzimáticas microtubulares

Como puede observarse en la Figura 22, la diglicérido quinasa sedimenta en una zona del gradiente distinta de la ATPasa y de la actividad ligante de colchicina, pero coincidente con la proteína quinasa. Además, ambas sedimentan en regiones que no corresponden a los pesos moleculares del monómero o del dímero de tubulina.

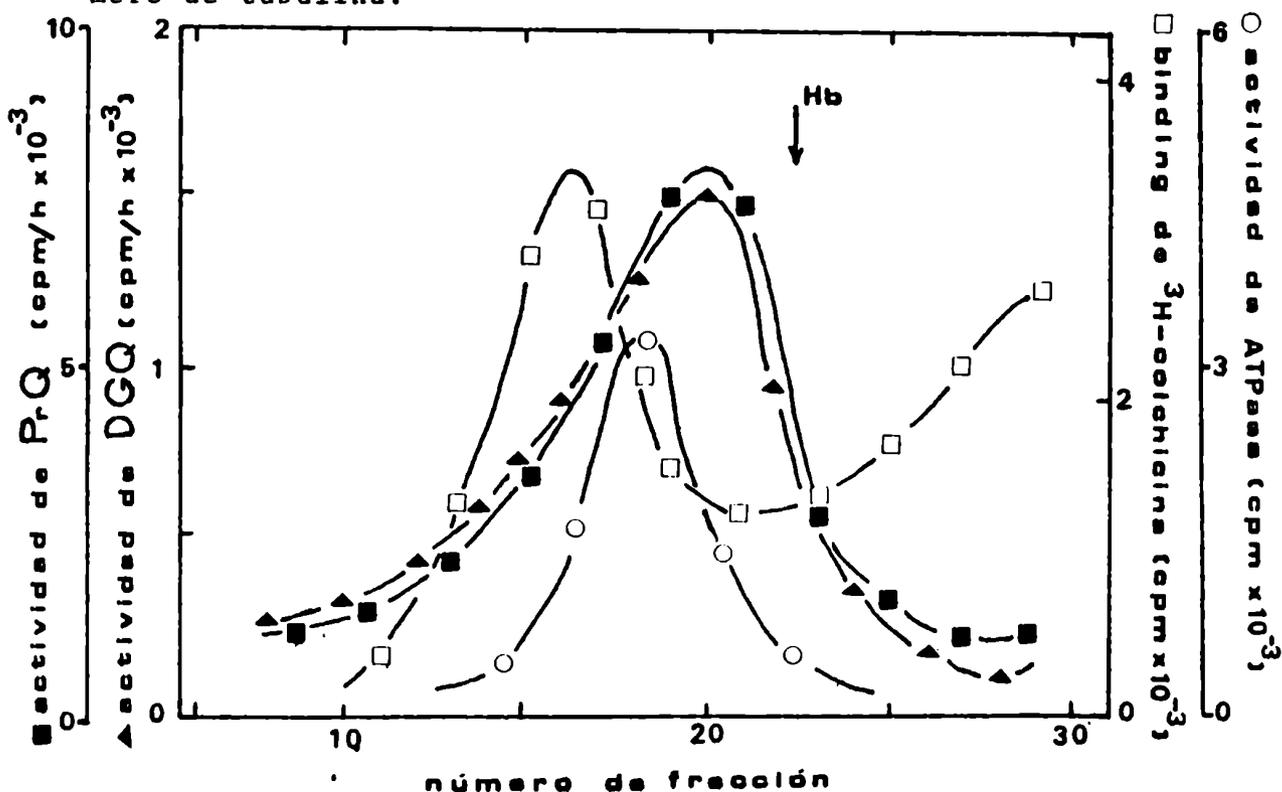


Figura 22: Sedimentación en gradiente de sacarosa de diglicérido quinasa, proteína quinasa, actividad ligante de colchicina y ATPasa de los microtúbulos. Se utilizaron las mismas condiciones que en la Figura 17, pero antes de sembrar la muestra se agregó 30 μ l de ³H-colchicina y 50 μ l de hemoglobina (90 unidades de Absorbancia a 404 nm). Las actividades se midieron sobre las fracciones en la forma indicada en Métodos, y la hemoglobina por Absorbancia a 404 nm.

En efecto, los pesos moleculares correspondientes a cada ac-

tividad son: proteína quinasa y diglicérido quinasa, 94.000; ATPasa, 115.000; para la actividad ligante de ^3H -colchicina, 140.000.

3. Diferencias entre la diglicérido quinasa y proteína quinasa microtubulares.

Si bien ya se mostró que otras proteína quinasas de músculo de embrión de pollo no tienen actividad de diglicérido quinasa (TABLA VIII), se consideró conveniente definir si la diglicérido quinasa asociada a microtúbulos se podía diferenciar de la proteína quinasa microtubular, dado que ambas actividades sedimentan en la misma posición en gradientes de sacarosa (Figura 22).

a) Efecto de detergentes y etanol sobre ambas actividades

Como se observa en la TABLA XII, si la incubación se realiza

en presencia de estas adiciones, se encuentran algunas diferencias significativas.

TABLA XII: Efecto de detergentes y etanol sobre las actividades de diglicérido quinasa y proteína quinasa microtubulares

Adiciones	Actividad (%)	
	Proteína quinasa	Diglicérido quinasa
Ninguna	100	100
Deoxicolato 0,05 %	78	75
Deoxicolato 0,2 %	75	85
Deoxicolato 0,5 %	43	70
Triton N-101 0,5 %	190	53
Triton N-101 1 %	150	68
Nonidet P-40 0,5 %	145	55
Nonidet P-40 1 %	130	46
Etanol 0,5 %	180	80
Etanol 1 %	180	75

Los ensayos se llevaron a cabo en la forma usual, con microtúbulos de embrión de pollo aislados por precipitación con vinblastina, y con las adiciones que se indican.

El deoxicolato inhibe en mayor grado a la proteína quinasa, y tanto el Triton N-101 como el Nonidet P-40 inhiben a la diglicérido quinasa, mientras que estimulan a la proteína quinasa. El etanol estimula a ésta última e inhibe un poco la incorporación a diglicéridos.

b) Efecto de preincubación a distintas temperaturas

Como puede apreciarse en la Figura 23, la estabilidad térmica de ambas actividades enzimáticas es muy semejante, aunque la diglicérido quinasa parece ser algo más lábil.

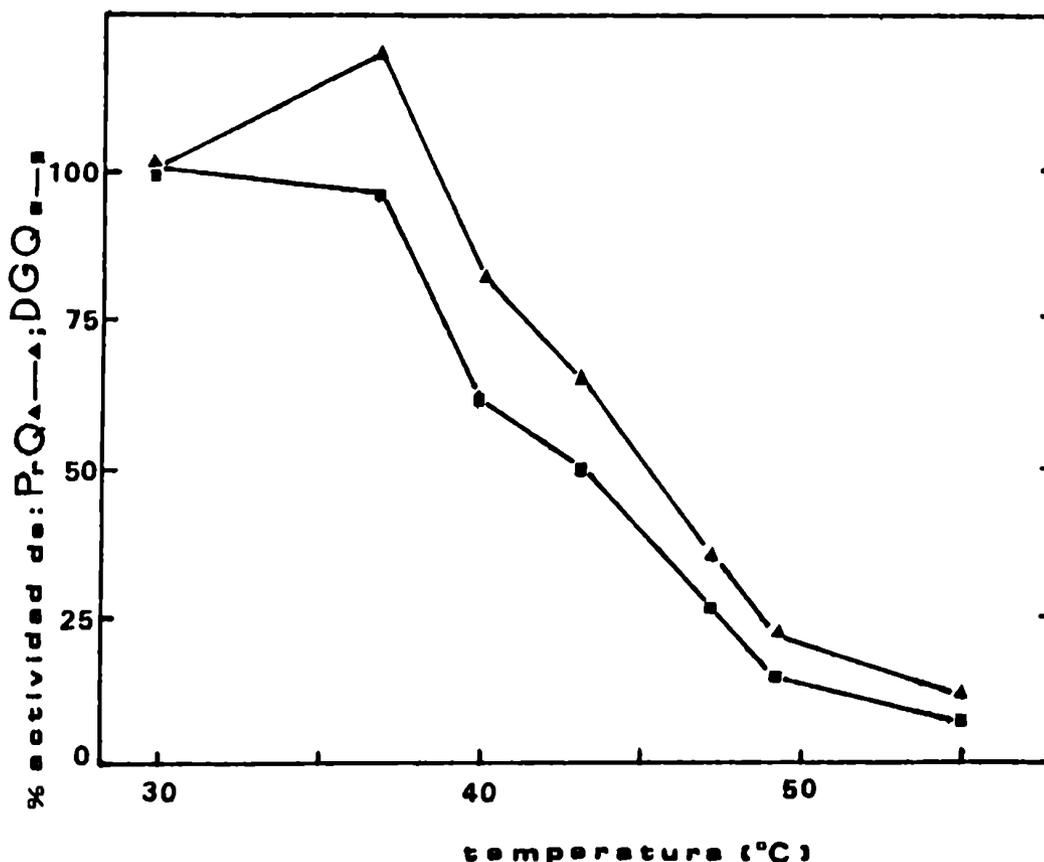


Figura 23: Efecto de preincubación a distintas temperaturas sobre la proteína quinasa y diglicérido quinasa de microtúbulos. Alícuotas de 10 μ l de fracción microtubular (20 μ g de proteína) se preincubaron durante 10 minutos a las temperaturas indicadas, y luego se agregó el resto de los reactivos para medir las dos actividades en condiciones standard, incubando durante 1 hora a 30°C.

c) Efecto de preincubación con tripsina

Se trató de diferenciar ambas actividades preincubando los microtúbulos con tripsina, en presencia o en ausencia de dipalmitina, para ver si el substrato de la diglicérido quinasa protegía esta actividad del ataque proteolítico. Los microtúbulos se preincubaron con tripsina durante 5 minutos, con o sin dipalmitina. Transcurrido este período, se agregó inhibidor de tripsina en una cantidad doble a la de enzima,

y se añadieron los sustratos en concentraciones adecuadas para medir las quinasa.

TABLA XIII: Efecto de preincubación con tripsina sobre las actividades de proteína quinasa y diglicérido quinasa microtubulares

Adiciones en preincubación	Actividad (%)	
	Proteína quinasa	Diglicérido quinasa
Ninguna	100	100
Dipalmitina, 5 mM	88	100
Tripsina, 5 µg	32	22
Dipalmitina 5 mM + +Tripsina 5 µg	36	25

20 µg de proteína microtubular en buffer α -glicerofosfato de sodio 10 mM pH 6,8 conteniendo 25 mM FNa y 40 mM acetato de magnesio, se preincubaron con las adiciones indicadas en un volumen de 40 µl, a 37°C durante 5 minutos, al fin de los cuales se agregaron 10 µg de inhibidor de tripsina, los sustratos y buffer necesarios para medir las actividades en forma standard incubando durante 10 minutos a 30°C, en un volumen final de 100 µl.

En la TABLA XIII se ve que este tratamiento afecta en forma similar a ambas actividades, y que la dipalmitina prácticamente no protege del ataque trípico.

d) Efecto del sustrato de una enzima sobre la actividad de la otra

En caso que ambas actividades fosforilantes fueran en realidad una sola enzima inespecífica, los sustratos deberían competir por la misma. Con esta idea se realizó un experimento donde se estudió el efecto de uno de los sustratos sobre la otra actividad enzimática.

TABLA XIV: Efecto de los substratos sobre diglicérido quinasa y proteína quinasa microtubulares

Adiciones o tratamientos	Incorporación de ^{32}P (pmoles/min/mg)	
	Acido fosfatídico	Proteína
Ninguno	24	99
Fosfolipasa C, 5 μg	380	97
1,2-dipalmitina 5mM	202	80
Caseína 10 mg/ml	25	310

Las condiciones del ensayo son las mismas que en la TABLA VI.

En la TABLA XIV se observa que el pretratamiento con fosfolipasa C o el agregado de dipalmitina, que estimulan la incorporación en ácido fosfatídico, no afectan la actividad de proteína quinasa. En efecto, la incorporación a proteína (97 y 80 pmoles/min/mg respectivamente) es prácticamente igual a la del control (99 pmoles/min/mg). Lo mismo ocurre con el experimento inverso: la adición de caseína no afecta la fosforilación de diglicéridos. Si ambas reacciones procedieran por vía del mismo sitio activo, se hubiera esperado una inhibición recíproca.

IV. Influencia de los fosfolípidos en la reacción de polimerización de microtúbulos

Las variadas funciones que cumplen los microtúbulos exigen que éstos se encuentren polimerizados o sean capaces de polimerizar, hecho éste que define la importancia de la reacción de polimerización-despolimerización. Se estudió entonces la posible influencia de los fosfolípidos asociados a microtúbulos sobre la polimerización de éstos. La reacción de polimerización in vitro requiere una temperatura cercana a 37°C y GTP, es estimulada por sacarosa o glicerol, se revierte al bajar la temperatura y se inhibe por el agregado de colchicina o calcio.

Puesto que los microtúbulos aislados por precipitación con vinblastina son incapaces de polimerizar, para esta parte del trabajo se utilizaron fracciones microtubulares preparadas mediante ciclos de polimerización y despolimerización, a partir de cerebro de rata, cuyo contenido en microtúbulos es alto y no contiene actina.

1. Medida de la polimerización por turbidimetría

Una de las formas de medir cuantitativamente la polimerización consiste en registrar el aumento de turbidez de una solución de proteína microtubular cuando se la transfiere de 0°C a 37°C.

a) Controles

En la Figura 24 se muestra la variación en la turbidez de una fracción microtubular en función del tiempo a 37°C. Si una vez alcanzado el nivel máximo de turbidez se baja la temperatura, aquélla disminuye rápidamente al valor inicial. Si antes de elevar la temperatura se añade colchicina, no se ob

serva aumento en la turbidez, y lo mismo ocurre si se agrega calcio, aunque la adición posterior de EGTA se traduce en el inmediato incremento de la turbidez, a la misma velocidad y alcanzando el mismo valor máximo que en ausencia de calcio.

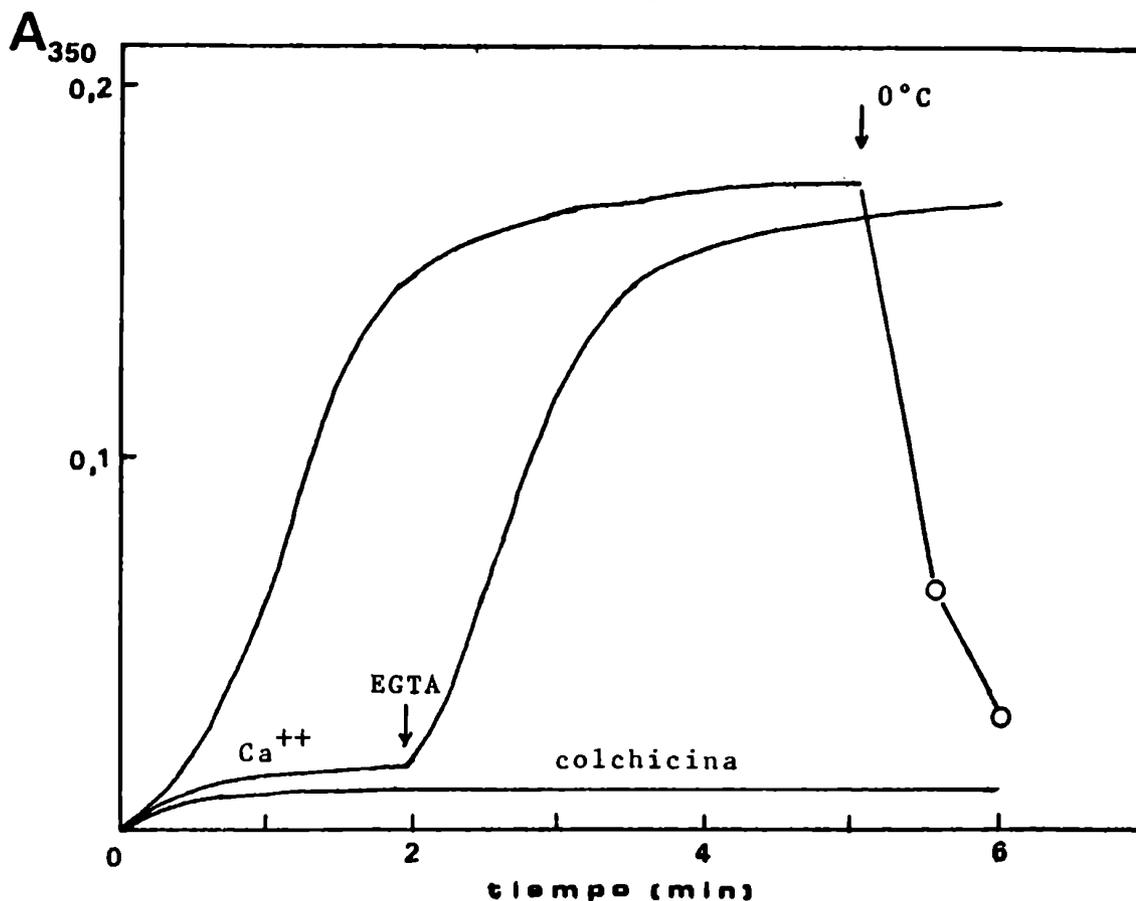


Figura 24: Cinética de polimerización microtubular medida por turbidimetría. Este experimento se llevó a cabo en la forma descrita en Métodos. En los casos indicados, antes de transferir la suspensión de microtúbulos de 0°C a 37°C, se agregó colchicina 0,1 mM, o Cl₂Ca 1mM y a los 2 minutos EGTA 2 mM. El dato de disminución de Absorbancia al pasar a 0°C se obtuvo transfiriendo la cubeta a baño de hielo y midiendo la Absorbancia luego de 30 segundos y 1 minuto a 0°C.

Estos resultados permiten afirmar que el aumento en la turbidez es realmente una medida de la polimerización microtubular.

b) Efecto de detergentes

En primer lugar se probó el efecto de preincubación con diversos detergentes, aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los resultados se encuentran en la TABLA XV, expresados como porcentajes del nivel máximo alcanzado y de la velocidad inicial de aumento de turbidez, con respecto a los correspondientes al ensayo sin adiciones.

TABLA XV: Efecto de preincubación con detergentes sobre el desarrollo de turbidez

Adiciones en la preincubación	% Abs. máx	% Vi
Ninguna	100	100
Deoxicolato 0,1 %	120	115
SDS 0,01 %	50	52
SDS 0,1 %	0	-
CTMA (Cetavlon) 0,1 %	0	-
Tween 20 0,6 %	104	110
Kyro 1 %	96	100
Lubrol 1 %	100	110
Nonidet P-40	120	150
Triton X-100	110	118

A 0,1 ml de solución de proteína microtubular (16 mg/ml) se agregaron los detergentes en las concentraciones finales indicadas; se incubó a 37°C durante 10 minutos y luego se transfirió el tubo a baño de hielo durante 5 minutos para permitir la despolimerización, agregando luego el contenido del mismo a la cubeta del espectrofotómetro, mantenida a 37°C con 0,5ml de buffer de reagregación, iniciando entonces el registro.

Como puede observarse, el cetil trimetil amonio (CTMA) y el dodecil sulfato de sodio producen una marcada inhibición de la turbidez; el Lubrol y el Tween 20 provocan un aumento en la velocidad sin influir en el valor máximo; el Triton, y especialmente el Nonidet P-40 estimulan la turbidez, au

mentando el valor máximo y la velocidad.

Puesto que el deoxicolato producía estimulación a una concentración relativamente baja, se decidió estudiar el efecto de la concentración del mismo.

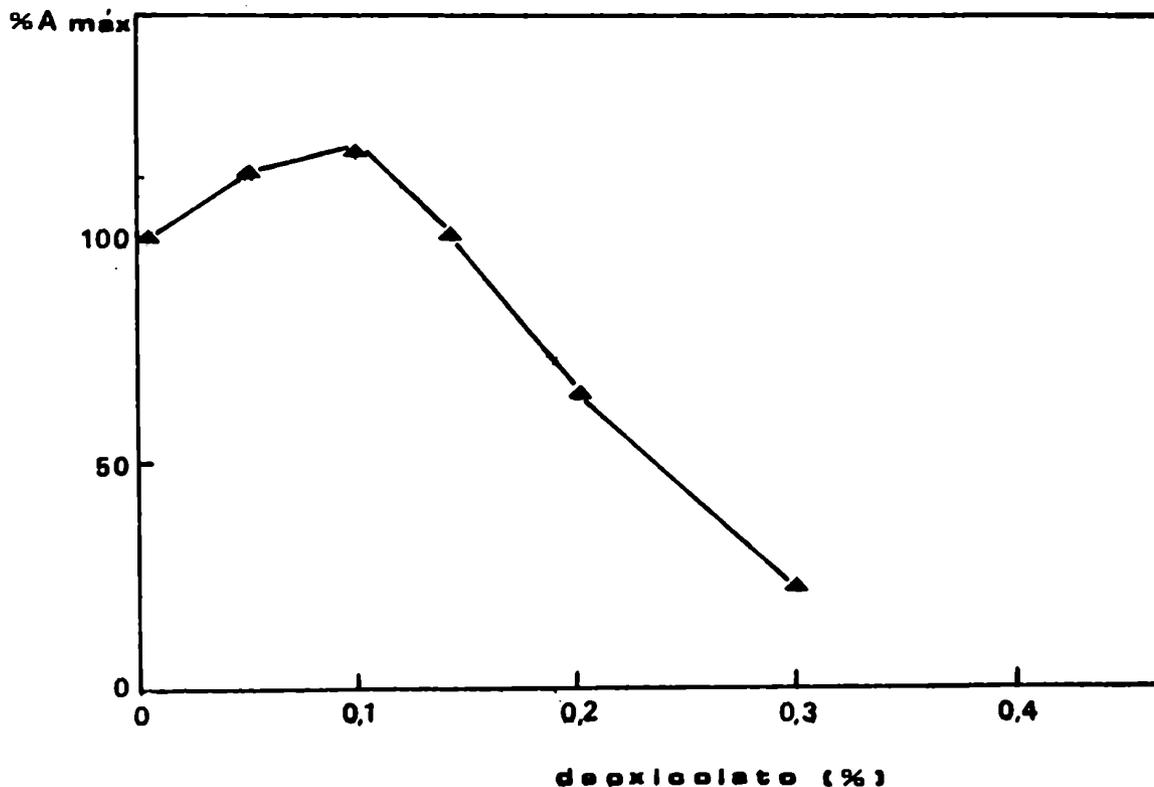


Figura 25: Efecto de la concentración de deoxicolato sobre la turbidez máxima El ensayo se efectuó en las condiciones indicadas en la TABLA XV.

En la Figura 25 puede verse que el efecto de estimulación se produce en un rango muy estrecho de concentración del detergente, y que éste inhibe el desarrollo de turbidez a concentraciones mayores.

c) Efecto de preincubación con fosfolipasas

En primer término se ensayó el efecto de preincubación con

fosfolipasa D (Figura 26), no observándose ninguna modificación en la cinética turbidimétrica. Sin embargo, cuando se preincubaba en presencia de fosfolipasa D y deoxicolato (a una concentración en que éste estimula la reacción), se producía una marcada inhibición, que podía impedirse si además se agregaba lecitina.

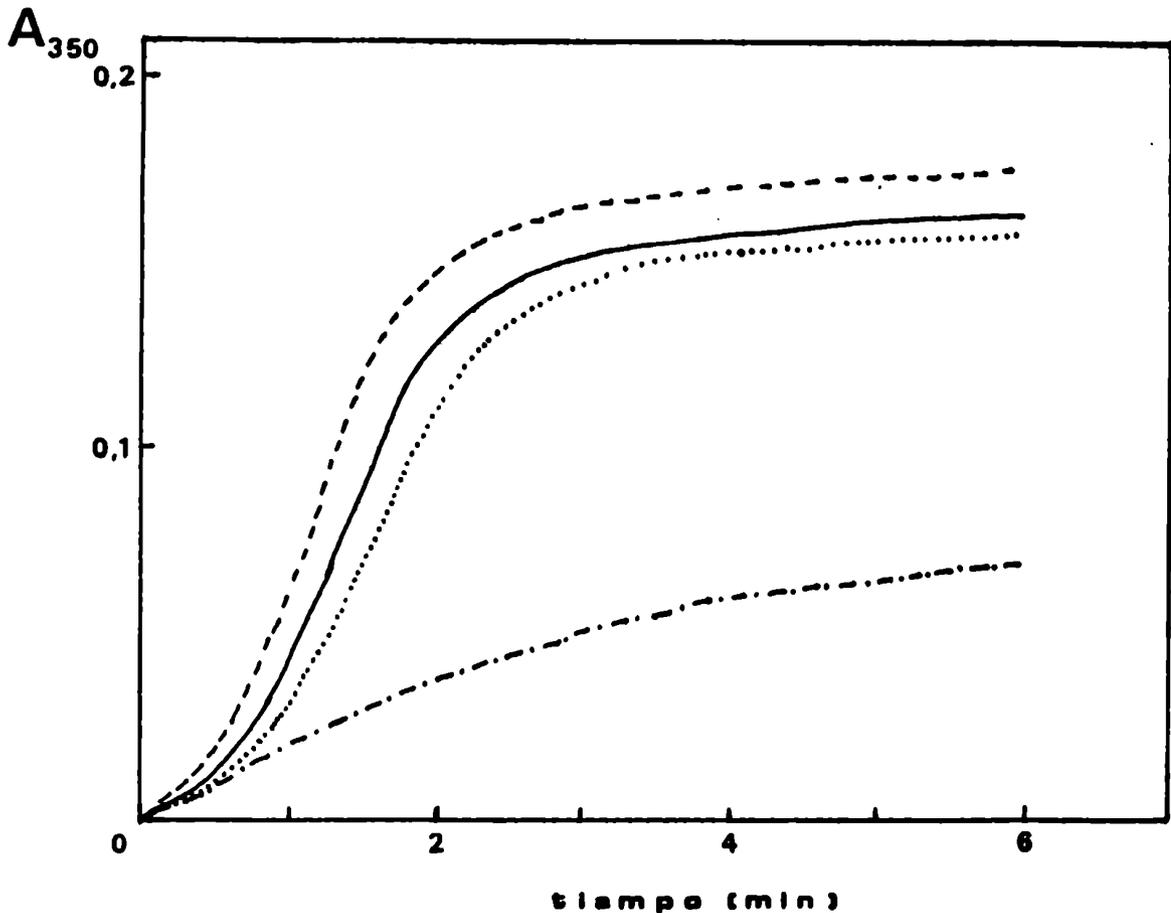


Figura 26: Efecto de preincubación con fosfolipasa D (Sigma) sobre la turbidimetría Las condiciones son las mismas que en la TABLA XV, con las siguientes adiciones en la preincubación: (—) ninguna; (---) deoxicolato de sodio 0,1 %; (.....) 1 U de fosfolipasa D sola, o bien además con lecitina 1,2 mM, deoxicolato 0,1 %; (-.-.-) 1 U de fosfolipasa D y deoxicolato 0,1 %.

Dado que las preparaciones comerciales de fosfolipasas (ésta

era de Sigma) son relativamente impuras, se consideró conveniente controlar que el efecto observado no se debiera a actividades enzimáticas contaminantes, a pesar de la "protección" por lecitina. Puesto que la polimerización requiere la presencia de GTP, se investigó la actividad de fosfatasa de la preparación, encontrándose que era bastante alta, pues hidrolizaba la totalidad del GTP en los 10 minutos de incubación (TABLA XVI). Se halló además que esta actividad fosfatásica se inhibía de manera substancial por el agregado de FNa 10 mM, que se agregó entonces en los ensayos, dado que prácticamente no afectaba la actividad de fosfolipasa.

TABLA XVI: Actividad de fosfatasa de la fosfolipasa D y su efecto sobre el desarrollo de turbidez microtubular

Adiciones en la preincubación	Actividad de fosfatasa (% GTP hidrol)	Actividad de fosfolipasa (% colina liberada)	Nivel de turbidez (% Abs. máx.)
Ninguna	0	-	100
1 U PLD	90	100	40
1 U PLD + FNa 5mM	70	98	63
1 U PLD + FNa 10mM	12	96	80
1 U PLD + FNa 20mM	5	80	77

Las actividades enzimáticas se midieron como se indica en Métodos, y la turbidez en las condiciones de la TABLA XV, con deoxicolato 0,1 % en todos los casos.

En estas condiciones (10 mM FNa), la inhibición de la turbidez producida por la fosfolipasa D disminuyó de un 60% (en ausencia de FNa) a sólo un 20 %.

Como era probable que la fosfolipasa estuviera además contaminada con proteasas, se probó el tratamiento con fenil metil sulfonil fluoruro, descrito como inhibidor de gran número de proteasas (167,168), pero los resultados fueron inconsistentes.

Entonces se preincubaron alícuotas de proteína microtubular con distintas preparaciones de fosfolipasas y se sembraron luego en geles de poliacrilamida (Figura 27).

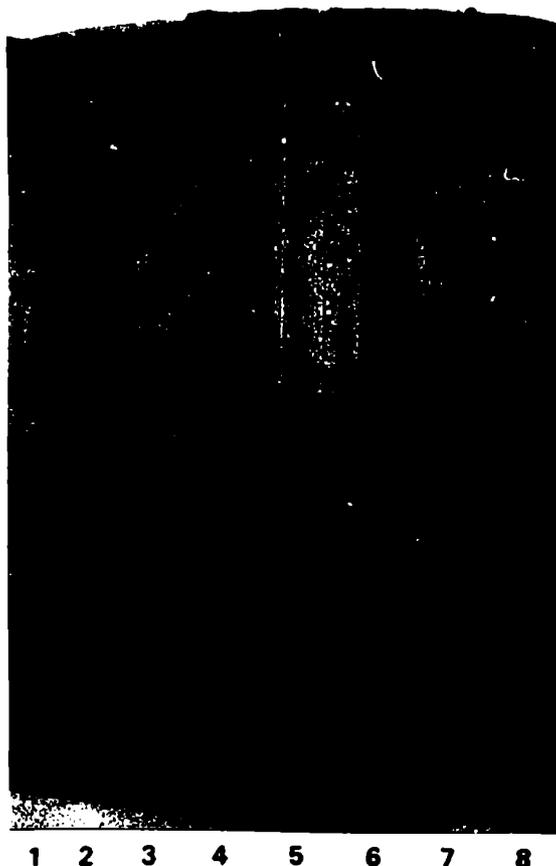


Figura 27: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de proteína microtubular tratada con diversas enzimas. Se sembraron 40 μ g de proteína microtubular preincubada con las enzimas que se indican. La electroforesis se realizó en las condiciones descriptas en Métodos. 1) Fosfolipasa D (Calbiochem); 2) microtúbulos preincubados con Fosfolipasa D (Calbiochem); 3) Fosfolipasa D (Sigma); 4) microtúbulos preincubados con Fosfolipasa D (Sigma); 5) lipasa de germen de trigo; 6) microtúbulos preincubados con lipasa; 7) microtúbulos; 8) microtúbulos preincubados con tripsina.

En la fotografía puede observarse que la preincubación con tripsina provoca la desaparición parcial de una de las bandas de tubulina, con la correspondiente aparición de otras de me-

nor peso molecular. La fosfolipasa D (Sigma) produce un efecto análogo, mientras que la de Calbiochem y la lipasa no modifican de manera evidente la movilidad o intensidad de las bandas proteicas.

Con estos antecedentes se probó el efecto de la preparación de fosfolipasa D (Calbiochem) sobre el desarrollo de turbidez, comprobándose que - en presencia de NaF 10 mM - no sólo no había inhibición en este parámetro (TABLA XVII), sino una activa ción de un 20 %.

TABLA XVII: Efecto de preincubación con Fosfolipasa D en presencia de NaF sobre el desarrollo de turbidez

Adiciones en la preincubación	Turbidez	
	% máx Abs	% Vi
Ninguna	100	100
PLD (Sigma) (1U)	40	95
PLD (Calbiochem) (1U)	80	98
NaF 10 mM	100	98
" + PLD (Sigma) (1U)	80	118
" + PLD (Calbiochem) (1U)	120	125

Se utilizaron las mismas condiciones que en la Figura 26, con 0,1 % deoxicolato en todos los casos.

Estos resultados pueden explicarse en base a que el efecto inhibitorio observado inicialmente con la fosfolipasa D (Sigma) era en gran parte debido a, como se vio antes, la actividad de fosfatasa inhibible por NaF, y el resto a proteasa. Cuando se utiliza la preparación de Calbiochem, que no presenta actividad de proteasa (en geles de poliacrilamida) y cuya actividad de fosfatasa se puede inhibir con NaF, se revela el verdadero efecto de la fosfolipasa D, que es de estimulación. Los niveles de estimulación del desarrollo de turbidez que se obtienen dependen además del lote de fosfolipasa, como si la contaminación

con proteasa fuera variable.

En la TABLA XVIII se ven los efectos de preincubaciones en presencia de diversas enzimas degradativas de fosfolípidos. La lipasa de germen de trigo, fosfolipasa C y fosfolipasa D (Calbiochem) estimulan el desarrollo de turbidez; la fosfolipasa A de páncreas porcino no produce efecto y la bovina lo inhibe. Ambas preparaciones de fosfolipasa A son altamente purificadas y puede asegurarse la ausencia de proteasas y fosfatasa.

TABLA XVIII: Efecto de preincubación con distintas enzimas sobre el desarrollo de turbidez microtubular

Adiciones en la preincubación	Turbidez	
	% máx Abs.	% Vi
Ninguna	100	100
CaCl ₂ 1,8 mM	98	96
" + PLC 80 µg	137	162
" + PLD (Calbiochem) 1 U	126	130
" + PLA (bovina) 50 µg	56	51
" + PLA (porcina) 40 µg	99	98
Lipasa 40 µg	120	147

Las condiciones son las mismas que en la TABLA XVII. Antes de pasar al espectrofotómetro se agregó EGTA 4 mM a cada muestra.

d) Efecto de preincubación con lípidos exógenos

Dado que algunos detergentes y tratamientos con enzimas que actúan sobre los fosfolípidos alteran el desarrollo de turbidez microtubular, se probó sobre el mismo el efecto del agregado de lípidos exógenos.

En la TABLA XIX se ve que la lecitina no tiene efecto, mientras que la lisolecitina inhibe en forma dependiente con la concentración.

TABLA XIX: Efecto de preincubación con lípidos exógenos sobre el desarrollo de turbidez microtubular

Adiciones en la preincubación	Turbidez	
	% máx. Abs	% Vi
Ninguna	100	100
Lecítina 3mM	100	105
Lisolecítina 2 mM	80	110
" 10 mM	60	56
Cardiolipina 1 mM	20	87
" + Cl ₂ Mg 2 mM	22	89
Dipalmitina 1 mM	110	130
Dioleína 1 mM	98	98
Extracto lipídico microtúbulos	99	103

Las condiciones son las mismas que en la TABLA XV. El extracto lipídico de microtúbulos corresponde a 1,5 mg de proteína.

La cardiolipina produce también una notable inhibición, que no puede explicarse por un posible secuestro del Mg⁺⁺ necesario para la polimerización, pues si se agrega cardiolipina y una concentración de MgCl₂ que duplica la de aquélla, la inhibición también se verifica. Cuando se preincuba con dipalmitina se observa una ligera estimulación, mientras que el agregado de un extracto lipídico obtenido a partir de microtúbulos no produjo ningún efecto.

e) Polimerización de microtúbulos preparados en presencia de detergente.

Los resultados mostrados hasta el momento parecen indicar que los fosfolípidos tendrían un papel regulador en la polimerización de microtúbulos, más concretamente, de limitadores de la

misma. Con el objeto de comprobar esta presunción, se emprendió la preparación de microtúbulos en presencia de un detergente, para obtenerlos desprovistos de fosfolípidos, aunque fuera

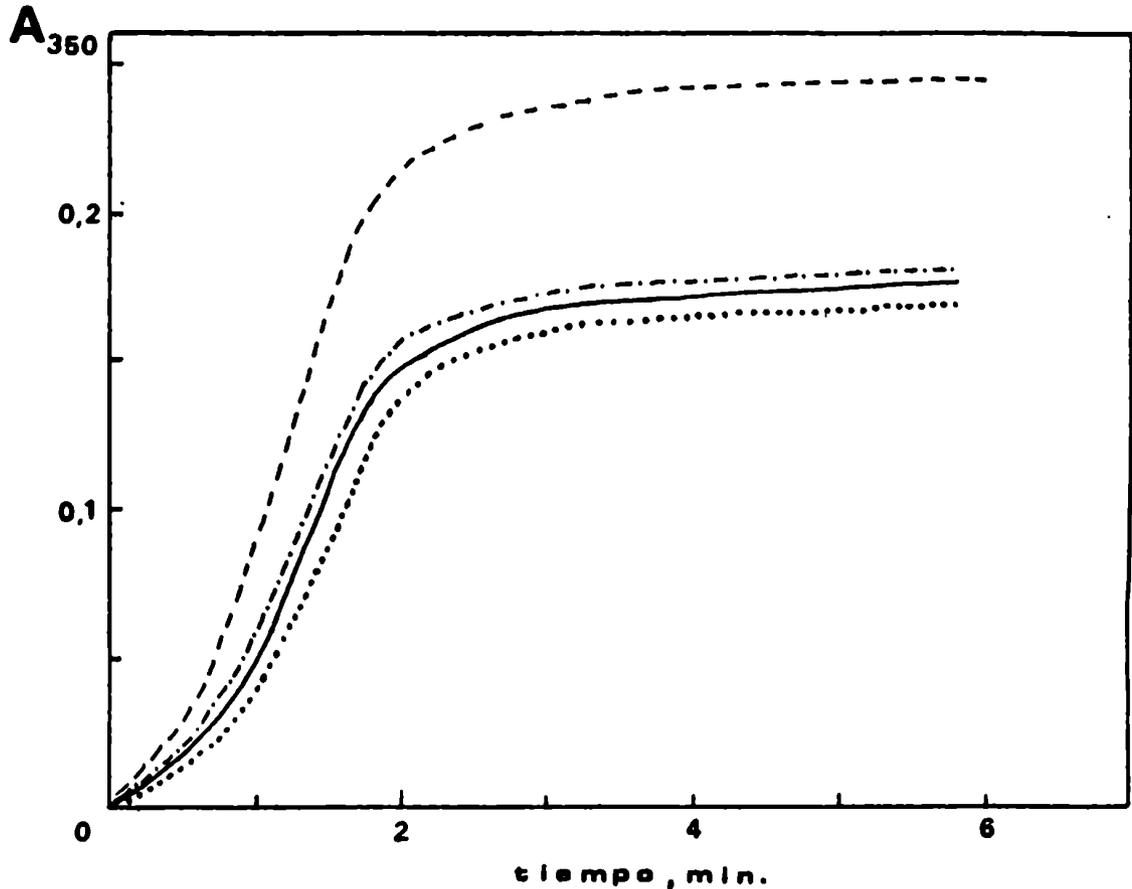


Figura 28: Turbidimetría de microtúbulos preparados con Nonidet P-40 1%. Las condiciones son las mismas que en la TABLA XIX. (—), microtúbulos standard; (.....), microtúbulos standard preincubados con extracto lipídico de microtúbulos; (---), microtúbulos Nonidet P-40; (-.-.-), microtúbulos Nonidet P-40 preincubados con extracto lipídico.

en forma parcial. Para ésto se eligió el Nonidet P-40, dado que es un detergente muy suave y su adición estimulaba el desarrollo de turbidez (TABLA XV). La preparación se llevó a cabo en la forma descripta en Métodos, agregando el detergente jun-

to con el glicerol, para eliminarlo del medio durante las centrifugaciones posteriores.

La cantidad de tubulina obtenida en preparaciones realiza - das en presencia y en ausencia del detergente es prácticamen - te la misma; la diferencia nunca fue mayor de un 10 % a favor de una u otra preparación. De todas maneras, para los experi mentos detallados a continuación, ambas soluciones de tubuli - na se diluyeron de manera tal que tuvieran exactamente la mis - ma concentración de proteínas (14-18 mg/ml según la prepara - ción).

Como se observa en la figura 28, la fracción microtubular ob - tenida en presencia de Nonidet P-40 alcanza una mayor turbidez y a mayor velocidad que la preparada en forma standard. Ade - más, la preincubación de las preparaciones con un extracto lí - pídico obtenido a partir de microtúbulos standard, destruye este efecto de estimulación de la turbidez en la fracción ob - tenida en presencia de detergente. Preincubando con lecitina se obtiene un resultado semejante (no incluido en la Figura).

2. Medida de la polimerización por viscosimetría

Dado que, como se discute en la Introducción, a) la turbidez depende de la masa de monómero que se encuentra polimerizada y no del largo del polímero y b) la masa total de tubulina obte - nida en ausencia o en presencia de detergente era prácticamen - te la misma en ambos casos (vide supra), si se producía un e - fecto sobre la polimerización, no podría detectarse por turbi - dimetría.

Un método que permite detectar variaciones en la longitud de los polímeros formados es la viscosimetría, y se juzgó que pro - bablemente el detergente incluido en la preparación afectara este parámetro.

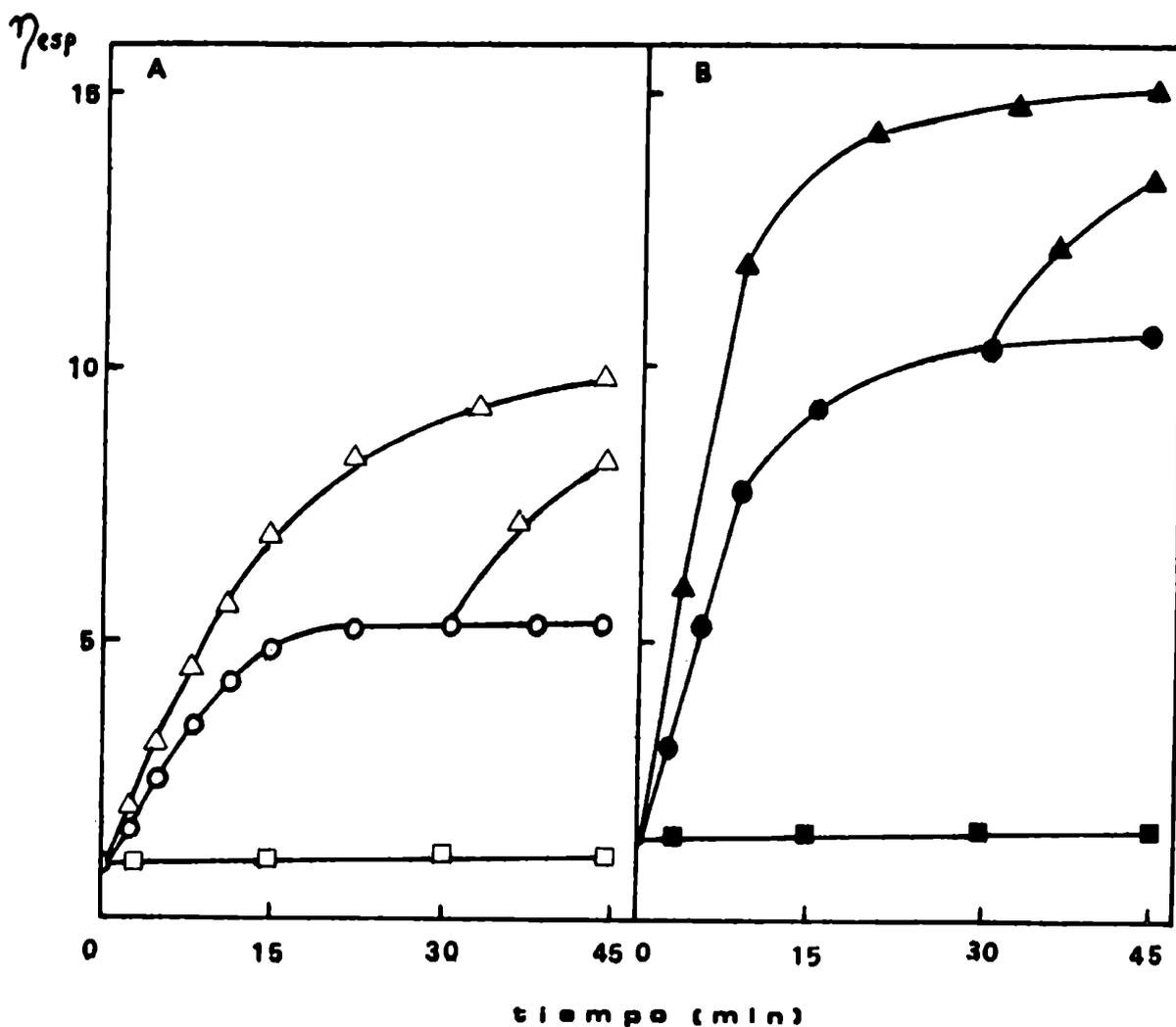


Figura 29: Desarrollo de viscosidad de microtúbulos preparados en ausencia (A) y en presencia (B) de Nonidet P-40 1%. Las mediciones de viscosidad de las preparaciones (15 mg/ml) se llevaron a cabo como se indica en Métodos, ya sea directamente (○, ●), en presencia de Nonidet P-40 1% (△, ▲) o de colchicina 0,1 mM (□, ■).

Los resultados de experimentos realizados con esta metodología se ven en la Figura 29 y están expresados como variaciones de la viscosidad específica en función del tiempo a 37°C. Es decir, toda vez que se midió viscosidad en presencia de algún agregado, detergente o colchicina por ejemplo, se com-

paró con el tiempo de escurrimiento del buffer al que se le hizo la misma adición.

Puede verse que la colchicina inhibe la polimerización de ambos extractos microtubulares, y que la presencia de Nonidet P-40 en el ensayo produce un aumento en la velocidad de desarrollo de viscosidad y prácticamente una duplicación del valor final alcanzado. Cuando el detergente se agrega al extracto ya polimerizado, o sea cuando la viscosidad es constante, ésta aumenta nuevamente. El desarrollo de viscosidad de microtúbulos preparados en presencia de Nonidet P-40 se produce a una velocidad mayor y alcanza un valor final también mayor que los obtenidos en forma standard. Si el ensayo se lleva a cabo además en presencia del detergente, se estimula aún más el desarrollo de viscosidad, y agregándolo sobre la preparación ya polimerizada, produce un nuevo aumento en la viscosidad. Todos estos desarrollos de viscosidad revierten a los valores iniciales si se enfría a 0°C.

Con el objeto de determinar si el efecto observado con la preparación incluyendo el Nonidet P-40 era exclusivo de este detergente o era más general, y si existía una correlación directa entre el contenido en fosfolípidos y la viscosidad desarrollada por las preparaciones, se prepararon microtúbulos en presencia de diversos detergentes cuyos efectos sobre el desarrollo de turbidez de preparaciones standard ya habían sido estudiados (TABLA XV).

En la TABLA XX se observa que el Nonidet P-40 es el más eficiente en cuanto a la extracción de fosfolípidos, y los microtúbulos preparados con él alcanzan la mayor viscosidad final.

El Kyro y el Triton N-101 no extraen los fosfolípidos de las preparaciones microtubulares respectivas, cuya viscosidad final no difiere de la alcanzada por la preparación standard. El Tween 20 tiene menor capacidad extractiva que el Nonidet P-40 y la preparación correspondiente alcanza una viscosidad menor que con aquél, pero substancialmente mayor que la standard.

TABLA XX: Viscosidad y contenido en fosfolípidos de tubulina purificada en presencia de diversos detergentes.

Tubulina	η esp.	Contenido en fosfolípidos nmoles P/mg proteína
Standard	4,9	0,71
Nonidet P-40 1 %	11,5	0,14
Tween 20 0,6 %	8,2	0,36
Triton N-101	5,6	0,71
Kyro 1 %	4,3	0,72

Se indican las concentraciones de detergente utilizadas durante la preparación. La concentración de proteínas de todas las preparaciones es de 15,3mg/ml. Se midió la viscosidad alcanzada luego de incubar las muestras a 37°C durante 40 minutos, cuando el valor de aquella ya es constante. Se extrajeron los fosfolípidos de alícuotas de las mismas muestras como se indica en Métodos y se midió fósforo liposoluble por el método de Hess y Derr (156).

Algunas de las características del efecto de detergentes se estudiaron con más detalle, para lo cual se utilizó la tubulina obtenida en presencia de Nonidet P-40, por ser ésta la que presenta el efecto máximo. En primer término se investigó si la acción del detergente se debía a que éste alteraba la proporción de alguna de las proteínas que acompañan a la tubulina durante su purificación y que pueden tener algún rol en su polimerización. Para ello se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio muestras de tubulina preparada en forma standard y con Nonidet P-40 (Figura 30). Los resultados obtenidos indican que no hay variaciones en las bandas proteicas correspondientes a material de alto peso molecular, cuya importancia en la reacción de polimerización está avalada por evidencias experimentales (169, 170).



Figura 30: Electroforesis en gel de 10 % poliacrilamida-SDS de fracciones microtubulares obtenidas sin y con Nonidet P-40. Se sembraron 40 μ g de proteina en ambos casos, y la corrida electroforética se llevó a cabo en la forma descripta en Métodos. 1) microtúbulos standard; 2) microtúbulos Nonidet P-40.

De la misma manera, por microscopía electrónica puede apreciarse que los microtúbulos polimerizados in vitro a partir de ambas preparaciones son idénticos, en su aspecto general y estructura fina (Figura 31).

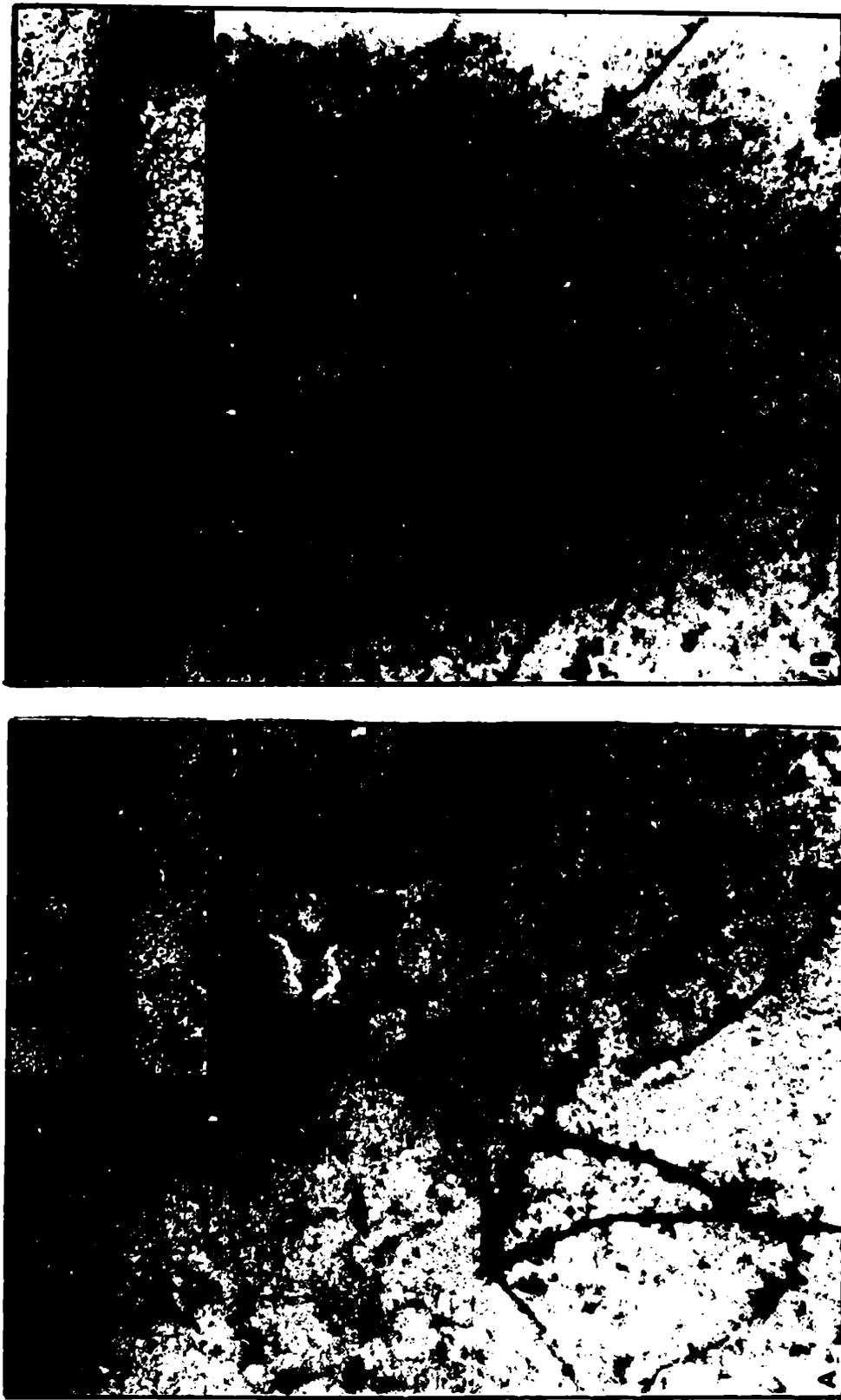


Figura 31: Microfotografías electrónicas de microtúbulos obtenidos a partir de preparaciones en ausencia (A) y en presencia (B) de Nonidet P-40 1%. Las preparaciones se diluyeron hasta una concentración de protefinas de 0,1 mg/ml y se polimerizaron incubando a 37°C durante 60 minutos, transcurridos los cuales se prepararon para su observación por tinción negativa como se indica en Métodos. Aumento: 40.000 X; inserción, 160.000X

Como ya se ha mencionado, las concentraciones proteicas de preparaciones microtubulares obtenidas en ausencia o en presencia de Nonidet P-40 diferían sólo en un 10 % y al azar. Dado que el mayor grado de viscosidad alcanzado por la preparación con detergente indicaría la formación de microtúbulos más largos, si la masa total de los mismos se mantenía igual que la de microtúbulos standard en las condiciones de la viscosimetría, se decidió profundizar este punto. Para ello se midió polimerización por sedimentación de los microtúbulos al mismo tiempo que por viscosimetría (TABLA XXI). Las condiciones de centrifugación son tales que los microtúbulos se sedimentan cuantitativamente, según Johnson y Borisy (171)

TABLA XXI: Medida de la polimerización microtubular por centrifugación y viscosimetría

Exp. N°	Tubulina	η esp.	Contenido en proteínas después de sedimentación	
			Precipitado mg	Sobrenadante mg
1	Standard	9,0	9,8	6,7
	Nonidet P-40	16,6	10,0	6,9
2	Standard	7,5	9,5	6,6
	Nonidet P-40	13,4	9,3	6,9

1 ml de fracción microtubular purificada en ausencia o en presencia de Nonidet P-40 (17 mg proteína/ml en el Experimento 1 y 16,5 mg/ml en el Experimento 2) se centrifugaron durante 20 minutos a 28.000 x g y a 35°C y se midió luego la cantidad de proteínas en el sobrenadante y el precipitado. Se midió además la viscosidad alcanzada por alícuotas de las mismas preparaciones luego de incubarlas a 37°C durante 40 minutos.

En ambos experimentos la viscosidad final alcanzada por la preparación con detergente prácticamente duplica la correspondiente a la preparación standard, pero no hay diferencias en la masa de proteínas que sedimenta al centrifugar.

Efecto del Nonidet P-40 sobre actividades fosforilantes
y unión de ³H-colchicina

Se ha mencionado la posible participación de las actividades enzimáticas asociadas a microtúbulos en la regulación de la polimerización (150). Dado que los microtúbulos preparados en presencia de Nonidet P-40 polimerizan en mayor grado, se midieron estas actividades en una preparación de este tipo, comparando con una preparación standard (TABLA XXII).

La presencia de Nonidet P-40 no afecta la fosforilación de la tubulina standard, aunque estimula la polimerización. La tubulina Nonidet P-40 se fosforila un 25 % menos que la standard, y el agregado ulterior de detergente disminuye aún más este valor. Algo similar se observa cuando se mide la actividad de proteína quinasa con caseína como sustrato. La capacidad de unir colchicina no se ve afectada.

El Nonidet P-40 agregado en el ensayo o durante la preparación inhibe la fosforilación de diglicéridos endógenos, probablemente porque los extrae. Efectivamente, los datos de fosforilación de diglicéridos exógenos muestran que la actividad de la enzima no está afectada en la tubulina Nonidet P-40 y que la presencia de detergente en el ensayo parece inhibirla.

Efecto del Nonidet P-40 sobre actividades fosforilantes
y unión de ³H-colchicina

Se ha mencionado la posible participación de las actividades enzimáticas asociadas a microtúbulos en la regulación de la polimerización (150). Dado que los microtúbulos preparados en presencia de Nonidet P-40 polimerizan en mayor grado, se midieron estas actividades en una preparación de este tipo, comparando con una preparación standard (TABLA XXII).

La presencia de Nonidet P-40 no afecta la fosforilación de la tubulina standard, aunque estimula la polimerización. La tubulina Nonidet P-40 se fosforila un 25 % menos que la standard, y el agregado ulterior de detergente disminuye aún más este valor. Algo similar se observa cuando se mide la actividad de proteína quinasa con caseína como sustrato. La capacidad de unir colchicina no se ve afectada.

El Nonidet P-40 agregado en el ensayo o durante la preparación inhibe la fosforilación de diglicéridos endógenos, probablemente porque los extrae. Efectivamente, los datos de fosforilación de diglicéridos exógenos muestran que la actividad de la enzima no está afectada en la tubulina Nonidet P-40 y que la presencia de detergente en el ensayo parece inhibirla.

TABLA XXII: Efecto del Nonidet P-40 sobre actividades microtubulares

Tubulina	Adiciones	Fosforilación endógena		Fosforilación exógena		Binding ³ H-colchicina cpm/mg
		Tubulina Diglicéridos pmol/mg	pmol/mg	Caseína Dipalmitina pmol/min/mg proteína	Caseína Dipalmitina pmol/mg	
Standard	Ninguna	90	30	160	22	1006
Standard	Nonidet P-40	94	14	170	11	1010
Nonidet P-40	Ninguna	71	17	120	33	1060
Nonidet P-40	Nonidet P-40	57	9	90	5	805

Sobre 80 µg de tubulina preparada en forma standard o con Nonidet P-40, adicionados o no con 1 % del mismo detergente, se midieron las actividades indicadas en la forma descrita en Métodos. Los datos de fosforilación endógena corresponden a una incubación de 20 minutos.

DISCUSION

El problema de la regulación de la polimerización microtubular ha sido estudiado desde diversos puntos de vista. Hay evidencias indicativas de la existencia de dos clases de subunidades microtubulares, cuya abundancia relativa y posibilidad de interconversión jugarían un papel importante en este fenómeno (149,150). La diferencia entre ambas clases podría deberse a modificaciones covalentes (fosforilación, glicosilación, etc.) o a la presencia de cofactores (GTP, iones), aunque no se han aportado pruebas definitivas acerca de la importancia relativa de cada uno de estos factores en la regulación in vivo de la polimerización y/o función de los microtúbulos.

Como se ha destacado en la Introducción, la interacción entre subunidades parece ser de tipo hidrofóbico, de manera que la presencia de cofactores que modificaran este carácter podría tener importancia en la regulación de la polimerización.

Asociación de lípidos fosforilados con los microtúbulos

El material lipídico marcado con ^{32}P que se encuentra en la fracción microtubular de músculo de embrión de pollo (TABLA I) está realmente asociado a los microtúbulos y no es una contaminación con material que copurifica con éstos. Así lo indican los resultados que se muestran en la TABLA II: los microtúbulos de distintos orígenes y purificados por varios métodos están siempre asociados con material lipídico marcado con ^{32}P . La naturaleza lipídica del material está indicada inequívocamente

por su comportamiento cromatográfico en distintos solventes (Figura 4).

Puesto que estos lípidos se marcaban con ^{32}P , era muy probable que se tratara de fosfolípidos, presunción que fue confirmada por los resultados obtenidos a partir de diversos tratamientos. a) se trata de lípidos saponificables (TABLA III) ; b) el producto marcado más abundante se comporta como gliceril fosforil colina en cromatografía y electroforesis (Figuras 5 y 7); c) el fósforo no está expuesto al ataque por fosfatasa alcalina, ya sea antes o después de saponificar (Figuras 6 y 7); d) por cromatografía en capa delgada en un sistema para fosfolípidos se observa que la mayoría de los componentes fosforilados se comporta de la misma forma que los patrones sembrados (Figura 8), y el más abundante migra como lecitina.

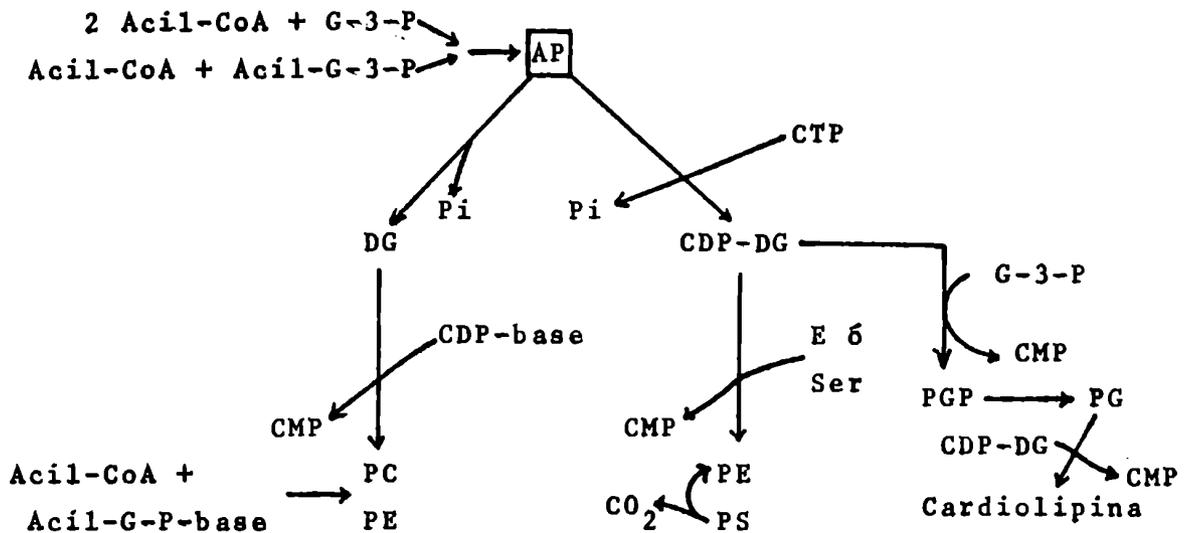
Durante la realización de estos trabajos, otros autores informaron sobre la presencia de fosfolípidos en preparaciones de microtúbulos. Uno de ellos comenta incidentalmente que durante la purificación de microtúbulos por cromatografía en DEAE-celulosa, junto con la fracción de tubulina se aíslan compuestos fosforilados extraíbles con cloroformo-metanol. Estos pueden separarse del dímero de tubulina por filtración en gel, y puesto que eluyen en el volumen muerto, se estima que forman micelas con un peso molecular aparente mayor que el del dímero (115). Otro autor obtuvo resultados similares con microtúbulos de embrión de pollo y células CHO marcadas con ^{32}P . Tratando de caracterizar el sitio de unión de la colchicina, mostró que esta droga o sus derivados marcados con ^3H se unen a tubulina y que luego de irradiar el complejo a 366 nm (lo que conduce a formación de lumicolchicina), quedan incorporadas a un material insoluble en ácido perclórico y soluble en cloroformo-metanol. El 90 % de la radioactividad precipitable con ácido perclórico es extraíble en condiciones en que lo son los fosfolípidos(182).

Asociación de una actividad enzimática fosforilante de lípidos con los microtúbulos

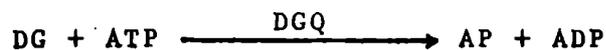
Al mismo tiempo que la asociación con material lipídico fosforilado, se observó que las fracciones microtubulares podían fosforilarse in vitro por incubación con γ - 32 P-ATP (TABLA I), lo que indica la presencia de una actividad enzimática fosforilante de material liposoluble. También en este caso la posibilidad de una contaminación parece poco probable, dado que esta actividad enzimática se encuentra en fracciones microtubulares de diversas procedencias y aisladas por distintos métodos (TABLA IV).

El producto formado luego de incubar en las condiciones mencionadas también es de naturaleza lipídica, como lo indica su solubilidad y propiedades cromatográficas (Figura 9). Se trata de un compuesto totalmente saponificable (TABLA V), la fracción fosforilada se encuentra en la fase acuosa luego de este tratamiento y se comporta como α -glicero fosfato en cromatografía y electroforesis (Figuras 10 y 12); además, el fosfato de este producto se libera por tratamiento con fosfatasa alcalina (Figuras 11 y 12). Todo lo anterior indica que el producto formado es ácido fosfatídico, tal como se ve además por cromatografía en capa delgada (Figura 13). Esto se confirma además por el hecho que cuando se incrementa la concentración de diglicéridos endógenos por preincubación con fosfolipasa C, o se agregan diglicéridos exógenos, el único producto formado es ácido fosfatídico (Figura 15).

De esta forma se comprueba que, además de fosfolípidos, asociados a los microtúbulos existen diglicéridos y una actividad enzimática responsable de la fosforilación de los mismos para dar ácido fosfatídico, precursor como aquéllos en la biosíntesis de fosfolípidos, esquematizada en el siguiente diagrama (172, 173):



El ácido fosfatídico (AP) que, como se ve, juega un papel clave en la biosíntesis de fosfolípidos, puede formarse además por fosforilación de diglicéridos con ATP, reacción catalizada por la enzima diglicérido quinasa:



Esta actividad enzimática ha sido descrita en varios sistemas, como cerebro de rata y cobayo (174-176), membranas de eritrocitos (165) y preparados de membrana de *Escherichia coli* (177-179), así como en homogenatos de glándula salina de aves marinas (180, 181).

La diglicérido quinasa es la segunda enzima relacionada con el metabolismo de los fosfolípidos que se encuentra asociada con los microtúbulos. Tal como se menciona en la Introducción, la primera actividad descrita fue la de fosfatidil inositol fosfodiesterasa (122), es decir, una enzima degradativa que conduce a la formación de diglicéridos. Aquí se muestra la asociación con una enzima clave en la biosíntesis de fos -

folípidos, capaz de catalizar la fosforilación de diglicéridos. El comportamiento de la diglicérido quinasa asociada a microtúbulos difiere de la fosfatidil inositol fosfodiesterasa en cuanto a sus propiedades de sedimentación en gradientes de sacarosa; el de ésta se ve alterado por la presencia de colchicina, lo que no ocurre con la diglicérido quinasa.

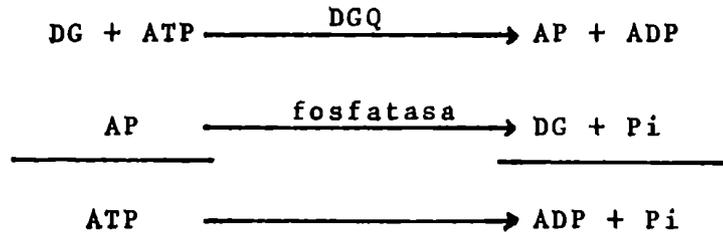
La presencia de ambas actividades cobra sentido al haberse demostrado además la asociación de fosfolípidos con los microtúbulos. Los fosfolípidos pueden ser importantes para alguna de las propiedades de los microtúbulos, tal como se discute más adelante.

Caracterización de la diglicérido quinasa de microtúbulos

Según se ve en la TABLA VII, el sobrenadante de centrifugación a 150.000 x g posee una considerable actividad de diglicérido quinasa, y la actividad hallada en microtúbulos hubiera podido ser una contaminación y no una asociación. Sin embargo, por su distinto comportamiento frente a diversas adiciones (TABLA IX) y distinto pH óptimo (Figura 16) esto no parece probable. Esta suposición se ve confirmada por el resultado de centrifugación en gradiente de sacarosa (Figura 17): en el sobrenadante parece haber varias especies, mientras que la actividad microtubular sedimenta como un solo componente correspondiente a la fracción más liviana de la actividad del sobrenadante.

Las propiedades de la diglicérido quinasa de microtúbulos que surgen de los resultados expuestos en la TABLA IX coinciden en general con las que se encuentran publicadas. Las diglicérido quinasa estudiadas requieren Mg^{++} (177, 178), son estimuladas por Na^+ y K^+ (165), tal como en este caso, y la ouabaina no las afecta (165, 180, 181) (ésta se activa). En algunos casos se sugirió que esta enzima podría formar parte

de la ATPasa inhibible por ouabaina, pues se encontró una fosfatasa asociada que requería Mg^{++} (165). Según las siguientes reacciones, por la acción combinada de ambas enzimas se obtendría un resultado neto de hidrólisis de ATP:



Este no parece ser el caso de la diglicérido quinasa asociada a microtúbulos. En primer lugar, los resultados obtenidos en el experimento de enfriamiento del ATP marcado (Figura 21) muestran que la fosforilación, especialmente de diglicéridos exógenos, no disminuye apreciablemente luego de 10 minutos de incubación, indicando que el producto de fosforilación in vitro (ácido fosfatídico) no es intermediario de otra reacción que implique transferencia del fosfato o su hidrólisis. Además, la ATPasa y la diglicérido quinasa microtubulares tienen distinto comportamiento de sedimentación, como se ve en la Figura 22.

La dependencia de la fosforilación con la concentración de Mg^{++} (Figura 18) se correlaciona con la observada para la fosforilación endógena de tubulina, como ya se discutió en la sección Resultados.

Tanto el ATP como el GTP funcionan como dadores en la reacción catalizada por la diglicérido quinasa (TABLA X), y mucho menos los otros nucleótidos trifosfato. Si bien la velocidad de incorporación a proteínas es mayor con ATP que con GTP, no se observan diferencias en las velocidades de incorporación a ácido fosfatídico con ambos nucleótidos (Figura 19). Es de ha

cer notar, sin embargo, que el bajo contenido en diglicéridos endógenos puede actuar como factor limitante en la incorporación, y tal vez por esta razón no se observa variación en las velocidades iniciales. La V_m para GTP es unas 5 veces menor que para ATP (TABLA XI), como en el caso de la diglicérido quinasa de membranas de *Escherichia coli* (179), aunque el K_m es también cinco veces menor. Si bien las concentraciones fisiológicas de ambos nucleótidos trifosfato (alrededor de 5 mM para el ATP y unas 10 veces menor para el GTP) superan en un orden de magnitud los valores obtenidos para K_m , la del GTP es bastante menor. Sin embargo, dado que siempre se encuentra GTP unido a los microtúbulos, es probable que la concentración local de este nucleótido sea mayor, y que también lo sea su importancia en la fosforilación de diglicéridos endógenos.

En las diversas etapas de purificación, el porcentaje de diglicérido quinasa con respecto a la actividad total exhibe un notable paralelismo con el de proteína quinasa microtubular (TABLA VII). Ambas actividades sedimentan en la misma zona de un gradiente de sacarosa (Figura 22), no muestran grandes diferencias en su sensibilidad a la temperatura (Figura 23), y la preincubación con tripsina parece afectarlas por igual (TABLA XIII). Estos resultados podrían indicar que se trata de una sola enzima capaz de catalizar ambas reacciones. Sin embargo, esta propiedad no podría extenderse a otras proteínas quinasas de la misma fuente. Las isoenzimas I y III de proteína quinasa que se encuentran en el citoplasma de músculo de embrión de pollo no catalizan la transferencia de ^{32}P de ATP a diglicéridos exógenos (TABLA VIII). Esto no elimina la posibilidad que la proteína quinasa asociada a microtúbulos posea además actividad de diglicérido quinasa.

El agregado de ciertos detergentes (TABLA XII) permite observar algunas diferencias entre la proteína quinasa y diglicérido quinasa de microtúbulos. Sin embargo, dado que estos trata

mientos que afectarían las actividades enzimáticas actúan además sobre la solubilidad de los substratos, no pueden tomarse como evidencia para diferenciar ambas actividades. Sólo puede afirmarse que es improbable que ambas actividades se verifiquen en el mismo sitio activo, puesto que no se observa competencia entre los substratos (TABLA XIV).

Estas actividades enzimáticas, proteína quinasa, diglicérido quinasa y ATPasa están evidentemente asociadas a microtúbulos y no son intrínsecas de la tubulina; ésto se puede deducir de los pesos moleculares calculados a partir de centrifugación en gradiente de sacarosa. Ninguna de estas actividades sedimenta en zonas del gradiente que correspondan al peso molecular del protómero o a múltiplos del mismo.

Se han dado diversas explicaciones para la asociación de actividades enzimáticas con la proteína microtubular. La presencia de la ATPasa estaría justificada por la posible hidrólisis de nucleótidos trifosfato durante la polimerización microtubular. La fosforilación de tubulina por una proteína quinasa endógena ha sido propuesta como posible mecanismo para la regulación de la polimerización, aunque no se podido comprobar lo experimentalmente. En cuanto a la diglicérido quinasa y la fosfatidil inositol fosfodiesterasa, su presencia se justifica porque hay fosfolípidos asociados a los microtúbulos. Estos fosfolípidos podrían estar involucrados en el proceso de regulación de la polimerización microtubular, por su carácter anfífilico que podría influir sobre la interacción entre subunidades, o/y, como postula Bryan (182), en la interacción con colchicina.

Influencia de los fosfolípidos en la reacción de polimerización microtubular

La cinética de polimerización microtubular se midió fundamentalmente por turbidimetría y viscosimetría; aunque ambos métodos son apropiados, se miden eventos diferentes. Por turbidimetría se obtiene una idea cuantitativa de la masa de monómero que se encuentra formando polímero, que es el responsable de la dispersión. Sin embargo, cualquier reordenamiento que implique conservación de la masa total de monómero en polímero no será detectado por esta metodología, y tampoco diferencias en la longitud de los polímeros si la masa total es la misma. Los controles realizados (Figura 24) indican que, efectivamente, el aumento en la turbidez se debe a polimerización microtubular. A pesar de esto y de las obvias ventajas de este método, debieron llevarse a cabo mediciones por viscosimetría, dado que el aumento en la viscosidad es una medida del largo de los polímeros formados, considerando constantes otros factores. También en este caso, los controles realizados previamente indican que el aumento en la viscosidad de los extractos es dependiente de la temperatura e inhibible por colchicina.

Los efectos producidos sobre el aumento de turbidez por la incubación con fosfolipasas (TABLA XVIII) o el agregado de detergentes (TABLA XV) y lípidos exógenos (TABLA XIX) indican que los fosfolípidos afectan los parámetros utilizados para medir polimerización.

En cuanto al efecto de preincubación con enzimas, se ha mostrado que las preparaciones comerciales están impurificadas con proteasas (Figura 27) y fosfatasas inhibibles por F^- (TABLA XVI), de manera que el efecto inhibitorio sobre el desarrollo de turbidez primeramente observado (Figura 26) se debe en realidad a estas actividades contaminantes. El verdadero efecto de la fosfolipasa D es de estimulación, y se pone de manifiesto en ausencia de aquéllas (TABLA XVII). En un trabajo sobre este mismo tema (183) el autor aporta eviden -

cias que los fosfolípidos son necesarios para la polimerización, dado que incubando con fosfolipasas de origen comercial observa inhibición de la polimerización. Además, cuando incubaba con un inhibidor sintético de fosfolipasas obtiene estimulación, lo que indicaría la presencia de una fosfolipasa endógena. Esta discrepancia con los resultados aquí mostrados podría atribuirse a las contaminaciones mencionadas en las preparaciones enzimáticas utilizadas por el citado autor.

Además de la fosfolipasa D, también estimulan el desarrollo de turbidez la fosfolipasa C y la lipasa, mientras que la fosfolipasa A inhibe (TABLA XVIII), lo que está de acuerdo con la inhibición por lisolecitina que se ve en la TABLA XIX. El desarrollo de turbidez está influido por las modificaciones del balance hidrofílico-hidrofóbico de los fosfolípidos asociados a microtúbulos que producen estas enzimas. En efecto, tanto las fosfolipasas C y D, que modifican la porción hidrofílica, como la lipasa y fosfolipasa A (bovina), que actúan sobre la hidrofóbica, producen alteraciones en el desarrollo de turbidez.

En cuanto al efecto de los detergentes, sólo en el caso de detergentes iónicos es posible deducir que las inhibiciones producidas por los mismos (Cetavlon, SDS, deoxicolato a concentraciones mayores de 0,2 %) se deben probablemente a desnaturalización (TABLA XV). Los detergentes no iónicos producen efectos difíciles de interpretar desde el punto de vista estructural, dado que algunos cuya estructura es semejante (Nonidet P-40 y Triton N-101) tienen distinto efecto sobre el desarrollo de viscosidad, mientras que éste es análogo con otros no relacionados estructuralmente, como el Tween 20 y el Nonidet P-40 (TABLA XX).

El aumento en la turbidez y viscosidad de los microtúbulos preparados en presencia de detergentes (Figuras 28 y 29) no se debe a desnaturalización de la tubulina, pues ambos desa-

rrillos revierten al disminuir la temperatura y son inhibidos por colchicina; además, en el caso de turbidez, el efecto de estimulación desaparece si se preincuban los microtúbulos con un extracto lipídico de microtúbulos o lecitina. Tampoco se debe a pérdida o enriquecimiento en las proteínas que copurifican con los microtúbulos (Figura 30), algunas de las cuales parecen tener importancia en la polimerización (169, 170), ni a la formación de microtúbulos anormales (Figura 31). Sin embargo, este efecto se obtiene sin que se produzcan variaciones en la masa total de polímero (TABLA XXI). El aumento en la viscosidad de las preparaciones obtenidas en presencia de Nonidet P-40 podría explicarse suponiendo que se forman microtúbulos más largos que en las preparaciones standard, pero en ese caso no debería ser mayor la turbidez, que mide la masa total de polímeros, independientemente de su longitud (145). Es probable que los microtúbulos así obtenidos hayan sufrido algún cambio en algún factor considerado constante en las mediciones, como el diámetro o la polarizabilidad, que podrían traducirse en un aumento en la turbidez sin que aumente la masa total de polímero. La remoción de los fosfolípidos (TABLA XX) y su reemplazo o no por moléculas de detergente puede producir microtúbulos estructuralmente diferentes, con alguna variación por ejemplo en el volumen hidrodinámico no detectable por microscopía electrónica, pero que altere la viscosidad y turbidez de la solución.

Los resultados aquí presentados indican que los fosfolípidos deben incluirse en la lista de los factores que pueden influir en la regulación de la polimerización microtubular, y que pueden tener un papel determinante de algún aspecto estructural de los microtúbulos polimerizados.

CONCLUSIONES

I. Asociación de lípidos con los microtúbulos

Los microtúbulos de diversas fuentes (células HeLa, cerebro y músculo de embrión de pollo y cerebro de rata) y obtenidos por distintos métodos (precipitación con vinblastina y polimerización) tienen asociados lípidos fosforilados. Estos han sido identificados como fosfolípidos, entre los cuales el más abundante es la lecitina.

II. Asociación de una diglicérido quinasa con los microtúbulos

Además de fosfolípidos, se demostró que los microtúbulos tienen asociada una enzima que cataliza la formación de ácido fosfatídico, por fosforilación con ATP de diglicéridos que también se encuentran en las preparaciones microtubulares de todas las fuentes estudiadas. Esta actividad enzimática puede fosforilar además diglicéridos exógenos.

III. Caracterización de la diglicérido quinasa asociada a microtúbulos

La actividad de diglicérido quinasa está asociada a microtúbulos y no es una parte de la actividad del sobrenadante del cual éstos provienen.

Sus propiedades son muy semejantes a las de otras diglicéridos

do quinasas estudiadas: requiere Mg^{++} , se activa por Na^+ y K^+ y también por ouabaína; funciona con ATP y GTP como dadores, aunque hay diferencias en los parámetros cinéticos obtenidos ambos nucleótidos; la Km es menor para GTP, pero también es menor la Vm.

Los resultados obtenidos permiten además afirmar que la diglicérido quinasa de microtúbulos no forma parte de la ATPasa de la misma fuente.

La diglicérido quinasa asociada a microtúbulos copurifica con la proteína quinasa microtubular y no presenta diferencias con ella en cuanto a las propiedades estudiadas. En caso que se tratara de la misma enzima con las dos actividades, éstas tendrían lugar en diferentes sitios activos. Este hecho no puede hacerse extensivo a otras proteína quinasas de citoplasma de músculo de embrión de pollo, que carecen absolutamente de actividad de diglicérido quinasa.

Tanto la diglicérido quinasa como la proteína quinasa y la ATPasa son actividades enzimáticas asociadas a los microtúbulos y no intrínsecas de la proteína microtubular.

IV. Influencia de los fosfolípidos en la polimerización microtubular

Los estudios realizados por turbidimetría y viscosimetría muestran que la alteración en la estructura o contenido de fosfolípidos asociados a microtúbulos por tratamiento con fosfolipasas, detergentes o adición de lípidos exógenos provoca variaciones en el desarrollo de turbidez de las preparaciones microtubulares en condiciones de polimerización. El aumento de turbidez de las preparaciones así tratadas cuando se las somete a condiciones de polimerización es inhibido por colchicina y revierte al disminuir la temperatura, de manera que no se debe a desnaturalización.

Los microtúbulos parcialmente desprovistos de fosfolípidos por la inclusión de detergentes en la purificación muestran un marcado aumento en la turbidez y especialmente en la viscosidad específica desarrolladas en condiciones de polimerización, dependientes de la temperatura e inhibibles por colchicina. No se afectan la masa total de proteína polimerizada ni el aspecto de los microtúbulos al microscopio electrónico, como tampoco el contenido en proteínas que copurifican con los microtúbulos y que pueden tener importancia en la regulación de la polimerización.

Estos resultados sugieren que los fosfolípidos asociados a microtúbulos pueden tener algún papel determinante de algún aspecto estructural de los microtúbulos polimerizados.

Biosa

Leal

BIBLIOGRAFIA

1. Ledbetter, M., Porter, K. (1963) *J. Cell Biol.* 19, 239-250.
2. Slautterback, D. (1963) *J. Cell Biol.* 18, 367-388.
3. Sabatini, D., Bensch, K., Barrnett, R. (1963) *J. Cell Biol.* 17, 19-58.
4. Grimstone, A., Klug, A. (1966) *J. Cell Sci.* 1, 351-362.
5. Allen, R. (1968) *J. Cell Biol.* 37, 825-831.
6. Grimstone, A., Cleveland, S. (1965) *J. Cell Biol.* 24, 387-400.
7. Tucker, J. (1972) *J. Cell Sci.* 10, 883-903.
8. Fulton, C. (1971) *Origin and continuity of cell organelles*, ed J. Reinert, H. Ursprung, 170-221. New York : Springer. 385 pp.
9. Luykx, P. (1970) *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 2, 173 pp.
10. Hepler, P., Palevitz, B. (1974) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 309-362.
11. Sanger, J., Holtzer, S., Holtzer, H. (1971) *Nature New Biol.* 229, 121-123.
12. Wuerker, R., Kirkpatrick, J. (1972) *Int. Rev. Cytol.* 33, 45-76.
13. Goldman, R., Follet, E. (1970) *Science* 169, 286-288.
14. Rudzinska, M. (1965) *J. Cell Biol.* 25, 459-477.
15. Tilney, L. (1971) *J. Cell Biol.* 51, 837-854.
16. Piatogirsky, J., Webster, H., Wollberg, M. (1972) *J. Cell Biol.* 55, 82-92.
17. Lyser, K. (1968) *Develop. Biol.* 17, 117-142.

18. Hier, D., Arnason, B., Young, M. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2268-2272.
19. Tilney, L., Gibbins, J. (1969) J. Cell Biol. 41, 227 - 250.
20. Handel, M., Roth, L. (1971) Develop. Biol. 25, 78-95.
21. Karfunkel, P. (1971) Develop. Biol. 25, 30-56.
22. McIntosh, J., Porter, K. (1967) J. Cell Biol. 35, 153 - 173.
23. Fischman, D. (1967) J. Cell Biol. 32, 557-575.
24. Moran, D., Varela, F. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 757-760.
25. Pickett-Heaps, J., Northcote, D. (1966) J. Cell Sci. 1, 109-120.
26. Pickett-Heaps, J., Northcote, D. (1966) J. Cell Sci. 1, 121-128.
27. Johnson, U., Porter, K. (1968) J. Cell Biol. 38, 403-425.
28. Hepler, P., Jackson, W. (1968) J. Cell Biol. 38, 437-446.
29. Bouck, G., Cronshaw, J. (1965) J. Cell Biol. 25, 79-95.
30. Turner, R. (1970) J. Cell Biol. 46, 220-234.
31. Peters, A., Vaughn, J. (1967) J. Cell Biol. 32, 113-119.
32. Behnke, O. (1967) J. Cell Biol. 34, 697-701.
33. Phillips, D. (1966) J. Cell Biol. 31, 635-638.
34. Shay, J. (1972) J. Cell Biol. 54, 598-608.
35. Wilson, H. (1969) J. Cell Biol. 40, 854-859.
36. Hepler, P., McIntosh, J., Cleland, S. (1970) J. Cell Biol. 45, 438-444.
37. Smith, D., Jarlfors, U., Beranek, R. (1970) J. Cell Biol. 46, 199-219.
38. Gibbons, I. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 1002-1010.
39. Tilney, L. (1971) Origin and continuity of cell organelles ed. J. Reinert, H. Ursprung, 222-260. New York: Springer.

40. Tilney, L., Byers, B. (1969) *J. Cell Biol.* 43, 148-165.
41. McIntosh, J. (1973) *J. Cell Biol.* 56, 324-339.
42. Behnke, G., Forer, A. (1967) *J. Cell Sci.* 2, 169-192.
43. Inoué, S., Sato, H. (1967) *J. Gen. Physiol. Suppl.* 50, 259-288.
44. Rosenbaum, J., Moulder, J., Ringo, D. (1969) *J. Cell Biol.* 41, 600-619.
45. Ledbetter, M., Porter, K. (1964) *Science* 144, 872-874.
46. Tilney, L., Bryan, J., Bush, D., Fujiwara, K., Mooseker, M., Murphy, D., Snyder, D. (1973) *J. Cell Biol.* 59, 267-275.
47. Kiefer, B., Sakai, H., Solari, A., Mazia, D. (1966) *J. Mol. Biol.* 20, 75-79.
48. Barton, R. (1969) *J. Cell Biol.* 41, 637-641.
49. Kirkpatrick, J. (1969) *J. Cell Biol.* 42, 600-602.
50. Cohen, C., Harrison, S., Stephens, R. (1971) *J. Mol. Biol.* 59, 375-379.
51. Erickson, H. (1974) *J. Cell Biol.* 60, 153-167.
52. Inoué, S. (1952) *Exp. Cell Res. Suppl.* 2, 305-318.
53. Zimmerman, A., Marsland, D. (1964) *Exp. Cell Res.* 33, 293-302.
54. McIntosh, J., Hepler, P., Van Wie, D. (1969) *Nature* 224, 659-663.
55. Dahlstrom, A., Heiwall, E., Haggendal, J., Saunders, N. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253, 507-516.
56. Fernandez, H., Burton, P., Samson, F. (1971) *J. Cell Biol.* 51, 176-192.
57. Freed, J., Lebowitz, M. (1970) *J. Cell Biol.* 45, 334-354.
58. Holmes, K., Choppin, P. (1968) *J. Cell Biol.* 39, 526-543.
59. Malawiata, S. (1971) *J. Cell Biol.* 49, 848-855.

60. Bhisey, A., Freed, J. (1971) *Exp. Cell Res.* 64, 430-438.
61. Gillespie, E. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253, 771-779.
62. Malaisse, W., Malaisse-Lagae, F., Van Obberghen, E., Somers, G., Devis, G., Ravazzola, M., Orci, L. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 253, 630-652.
63. Diegelmann, R., Peterkofsky, B. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 892-896.
64. Temple, R., Wolff, J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2691-2698.
65. Tilney, L., Porter, K. (1967) *J. Cell Biol.* 34, 327-343.
66. Marsland, D., Tilney, L., Hirshfield, M. (1971) *J. Cell. Physiol.* 77, 187-194.
67. Seeds, N., Gilman, A., Amano, T., Nirenberg, M. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 160-167.
68. Hsie, A., Puck, T. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 358-361.
69. Sanger, J., Jackson, W. (1971) *J. Cell Sci.* 8, 303-316.
70. Satir, P. (1968) *J. Cell Biol.* 39, 77-94.
71. Brokaw, C. (1972) *Science* 178, 455-462.
72. Gibbons, I., Fronk, E. (1972) *J. Cell Biol.* 54, 365-381.
73. Abercrombie, M., Heaysman, J., Pegrum, S. (1970) *Exp. Cell Res.* 60, 437-444.
74. Edelman, G. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1442-1446.
75. Berlin, R., Oliver, J., Ukena, T., Yin, H. (1974) *Nature* 247, 45-46.
76. Yahara, I., Edelman, G. (1973) *Exp. Cell Res.* 81, 143-155.
77. Yahara, I., Edelman, G. (1975) *Exp. Cell Res.* 91, 125-142.
78. Yahara, I., Edelman, G. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1579-1583.

79. Renaud, F., Rowe, A., Gibbons, I. (1968) *J. Cell Biol.* 36, 79-90.
80. Taylor, E. (1965) *J. Cell Biol.* 25, 145-160.
81. Borisy, G., Taylor, E. (1967) *J. Cell Biol.* 34, 525-533.
82. Borisy, G., Taylor, E. (1967) *J. Cell Biol.* 34, 535-548.
83. Wilson, L., Friedkin, M. (1967) *Biochemistry* 6, 3126-3135.
84. Weisenberg, R., Borisy, G., Taylor, E. (1968) *Biochemistry* 7, 4466-4479.
85. Wilson, L. (1971) *Biochemistry* 9, 4999-5007.
86. Olmsted, J., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 129-135.
87. Luduena, R., Woodward, D. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3594-3598.
88. Bibring, T., Baxandall, J. (1971) *J. Cell Biol.* 48, 324-339.
89. Weisenberg, R. (1972) *Science* 177, 1104-1105.
90. Mohri, M. (1968) *Nature* 217, 1053-1054.
91. Bryan, J., Wilson, L. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1762-1766.
92. Eipper, B. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2283-2287.
93. Marantz, R., Ventilla, M., Shelanski, M. (1969) *Science* 165, 498-499.
94. Wilson, L., Bryan, J., Ruby, A., Mazia, D. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 807-814.
95. Borisy, G., Olmsted, J. (1972) *Science* 177, 1196-1197.
96. Hinman, D., Morgan, J., Seeds, N., Cann, J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 752-758.
97. Feit, H., Slusarek, L., Shelanski, M. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2028-2031.

117. Piras, R., Piras, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1161-1165.
118. Goodman, D., Rasmussen, H., Di Bella, F., Guthrow, E. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 652-659.
119. Eipper, B. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1398-1406.
120. Nagayama, A., Dales, S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 464-471.
121. Barra, H., Arce, C., Rodríguez, J., Caputto, R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1384-1390.
122. Quinn, P. (1973) Biochem. J. 133, 273-281.
123. Malawista, S., Bensch, K., Sato, H. (1968) Science 160 770-771.
124. Cross, P., Spindel, V. (1960) Science 131, 37-39.
125. Marsland, D., Zimmerman, A. (1965) Exp. Cell Res. 38 , 306-313.
126. Sidgwick, N. (1950) Chemical elements and their compounds. Clarendon Press, Oxford 1, 44.
127. Marsland, D., Asterita, H. (1966) Exp. Cell Res. 42, 316-327.
128. Weisenberg, R. (1972) J. Cell Biol. 54, 266-278.
129. Auclair, W., Siegel, B. (1966) Science 154, 913-915.
130. Coyne, B., Rosenbaum, J. (1970) J. Cell Biol. 47, 777-781.
131. Rosenbaum, J., Carlson, K. (1969) J. Cell Biol. 40, 415-425.
132. Forer, A. (1965) J. Cell Biol. 25, 95-117.
133. Robinow, C., Marak, J. (1966) J. Cell Biol. 29, 129-151.
134. Kubai, D., Ris, H. (1969) J. Cell Biol. 40, 508-528.
135. Subblefield, E., Brinkley, B. (1966) J. Cell Biol. 30, 645-652.
136. Renaud, F., Swift, H. (1964) J. Cell Biol. 23, 339-354.

137. Outka, D., Kluss, B. (1967) J. Cell Biol. 35, 323-346.
138. Renaud, F., Rowe, A., Gibbons, I. (1966) J. Cell Biol. 31, 92 (Abstr.)
139. Stephens, R. (1968) J. Mol. Biol. 33, 517-519.
140. Stephens, R. (1971) Biol. Macromol. 4, 355-391.
141. Borisy, G., Olmsted, J., Klugman, R. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2890-2894.
142. Olmsted, J., Borisy, G. (1973) Biochemistry, 12, 4282-4289.
143. Borisy, G., Olmsted, J., Marcum, J., Allen, C. (1974) Federation Proc. 33, 167-174.
144. Kuriyama, R., Sakai, H. (1974) J. Biochem. 75, 463-471.
145. Gaskin, F., Cantor, C., Shelanski, M. (1974) J. Mol. Biol. 89, 737-758.
146. Staprans, I., Kenney, W., Dirksen, E. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 92-97.
147. Rosenbaum, J., Child, F. (1967) J. Cell Biol. 34, 345
148. Allen, C., Borisy, G. (1973) J. Cell Biol. 59, 5a.
149. Kirschner, M., Williams, R., Weingarten, M., Gerhart, J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1159-1163.
- 150 Weingarten, M., Suter, M., Littman, D., Kirschner, M. (1974) Biochemistry 13, 5529-5537.
151. Olmsted, J., Borisy, G. (1975) Biochemistry 14, 2996-3005.
152. Reiman, E., Walsh, D., Krebs, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1986-1995.
153. Glynn, I., Chapell, J. (1964) Biochem. J. 90, 147-149.
154. Walsh, D., Perkins, J., Brostrom, C., Ho, E., Krebs, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1968-1976.
155. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
156. Hess, H., Derr, J. (1975) Anal. Biochem. 63, 607-613.

157. Burrows, S., Grylls, F., Harrison, J. (1952) *Nature* 170, 800-801.
158. Martin, R., Ames, B. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
159. Stein, W. (1962) *Comprehensive Biochemistry* Vol. 2, Ed. M. Florkin, E. Stotz, pp. 219-282.
160. Fiske, C., Subbarow, I. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
161. Appleton, H., La Du, B., Levy, B., Steele, J., Brodie, B. *J. Biol. Chem.* 205, 803-813.
162. Walsh, K., Wilcox, P. Serine Proteases. En: *Methods in Enzymology* Vol. XIX, Ed. G. Perlman, L. Lorand (1970) pp. 31-41.
163. Bligh, E., Dyer, J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
164. Bray, G. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
165. Hokin, L., Hokin, M. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 470-484.
166. Benkovic, S. J., Schray, K. J. (1973) en *The Enzymes* vol. VIII, 3a. ed., 201-238. Ed. P.D. Boyer, Academic Press.
167. Fahrney, D., Gold, A. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 997-1000.
168. Polgar, L., Bender, M. (1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3153-3154.
169. Murphy, D., Borisy, G. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2696-2700.
170. Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S., Kirschner, M. (1975) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 72, 1858-1862.
171. Johnson, K., Borisy, G. (1974) *Federation Proc.* 33, 1231.
172. Van den Bosch, H. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43, 243-277.
173. Gatt, S., Barenholz, Y. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42, 61-90.

174. Hokin, M. R., Hokin, L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1381-1386.
175. Hokin, L., Yoda, A., Sandhu, R. (1966) Biochim. Biophys. Acta 126, 100-116.
176. Strickland, K. (1962) Can. J. Biochem. Physiol. 40, 247-259.
177. Pieringer, R., Kunnes, R. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2833-2838.
178. Pieringer, R., Kunnes, R. (1965) Federation Proc. 24, 476.
179. Weissbach, H., Thomas, E., Kaback, H. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 249-254.
180. Hokin, L., Hokin, M. (1963) Federation Proc. 22, 8-18.
181. Hokin, M., Hokin, L. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2116-2122.
182. Bryan, J. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci. 253, 247-259.
183. Bryan, J. (1974) Trans. N. Y. Acad. Sci. 36, 597 (N°8).

