

**TUBULINA TIROSINA LIGASA DE RATA:
AISLAMIENTO DEL ADN_c, ANÁLISIS DE SU
EXPRESIÓN E INFLUENCIA EN EL CICLO CELULAR**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

POR

CARLOS RUBÉN MAS

Centro de Investigaciones en Química Biológica
(CIQUIBIC-CONICET)
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

1999

Director de Tesis: Dr. Héctor S. Barra

Comisión de Tesis: Dr. Miguel A. Vides

Dr. José L. Bocco

Dr. Carlos E. Argaraña

*A mis padres y mi
hermana*

Quisiera agradecer enormemente la colaboración aportada por todos aquellos que contribuyeron en alguna medida a que este trabajo de tesis fuera posible.

Agradezco:

Al Dr. Héctor Barra por su guía y dirección, por confiar en mi desempeño y brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Instituto que él dirige: CIQUIBIC-Dpto. de Química Biológica.

Al Dr. Carlos Arregui, con quien trabajé codo a codo en los primeros años de mi tesis, por contribuir enormemente en mi formación académica y brindarme apoyo en momentos difíciles.

Al Dr. Carlos Argaraña por su apoyo y las sugerencias recibidas a lo largo de todo este trabajo.

A los miembros de la comisión de tesis: Dr. Miguel Vides y Dr. José Bocco por las sugerencias recibidas tanto en la parte experimental de mi trabajo como en la escritura de este manuscrito.

A CONICET por la ayuda económica recibida mediante el sistema de becas.

A la Dra. Marta Hallak por su apoyo “maternal”.

Profundamente a mis amigos Juan Sironi y Gonzalo de Arriba por haber sido los pilares afectivos mas importantes para mi cuando llegué a este departamento.

También a Alejandra Alonso por su amistad y tantos momentos **ALE**gres brindados.

A Susana y Daniela (la Flaca) especialmente por *entenderme*.

A Seba, Adrián, José y Mauricio, por su compañerismo y la diaria buena onda.

A mis amigos de todos los días, Guillermo Fabricius, Nelson Nuñez y Cristian Monetti, por muchas cosas.

A toda la gente del CIQUIBIC por hacer que este lugar sea más que un lugar de trabajo.

A mis Padres, por su sacrificio.

A TODOS!!!!!!.

MIL GRACIAS!!!

Abreviaturas usadas	1
Resumen	2
INTRODUCCIÓN	4
Filamentos de actina	5
Filamentos Intermedios	6
Microtúbulos	7
Proteínas asociadas a microtúbulo (MAPs)	11
Tubulina	13
Modificaciones post-traducción de la tubulina	15
a) Acetilación de la α -tubulina	15
b) Fosforilación de la α/β -tubulina	17
c) Poliglutamilación de la α/β -tubulina	18
d) Poliglicinación de la α/β -tubulina	19
e) Detirosinación-Tirosinación de la α -tubulina	19
Tubulina tirosina ligasa: propiedades	23
TTL y ciclo celular	24
OBJETIVOS	25
RESULTADOS	26
CAPITULO I	27
EXPRESION DE LA TUBULINA TIROSINA LIGASA EN MUSCULO ESQUELTICO DE RATA	27
Introducción	28
Subclonado de los fragmentos Lig 1 y Lig 2 del ADNc de la TTL de rata	28
Sobreexpresión del polipéptido recombinante TTL-glutación S-transferasa en la cepa de E. Coli DH5 α	31
Caracterización del anticuerpo policlonal anti-TTL	33
Determinación de los niveles de TTL en músculo esquelético de rata mediante "Inmunoblot"	34
Análisis mediante hibridización "in situ" del ARNm de la TTL en músculo esquelético de rata	35
Hibridización In Situ para el ARNm de la TTL en cultivos	

<i>primarios de músculo esquelético de rata</i>	37
<i>Análisis del grado de tirosinación de la tubulina en cultivos primarios y criocortes de músculo esquelético de rata mediante inmunohistoquímica</i>	38
CAPITULO II.....	40
CLONADO DEL ADNc DE LA TTL DE RATA Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS.....	40
<i>Introducción</i>	41
<i>Clonado y secuencia de nucleótidos del ADNc de la TTL de bulbo olfatorio de rata</i>	41
<i>Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la TTL de rata</i>	43
<i>Análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos y de la TTL, comparación con otras secuencias</i>	45
<i>Alineamiento múltiple de las secuencias de TT-ligasas teóricas y caracterizadas</i> ...	48
<i>Búsqueda de motivos conservados entre las secuencias de TT-ligasas</i>	51
CAPITULO III.....	54
EXPRESIÓN EN CÉLULAS EN CULTIVO DE UN ARN ANTISENTIDO Y UNA MUTANTE DOMINANTE NEGATIVA DEL GEN DE LA TUBULINA TIROSINA LIGASA.....	54
<i>Introducción</i>	55
<i>Construcciones en plásmidos con ADNc de la TTL para la expresión de: TTL normal (sentido), TTL mutante dominante negativa y ARN antisentido de la TTL mutante dominante negativa</i>	55
<i>Análisis mediante inmunocitoquímica de la expresión de la TTL de secuencia completa (sentido) y la mutante dominante negativa en cultivo de células CHO-K1</i>	60
<i>Análisis del nivel de tirosinación de los microtúbulos en las células transfectadas con ADNc de la TTL mutante dominante negativa y con un ADNc antisentido</i>	61
<i>Efecto de la expresión de la TTL mutante dominante negativa y ARN antisentido sobre la proliferación celular</i>	64
<i>Análisis inmunocitoquímico de la proliferación de células transfectadas con ADNc de la mutante dominante negativa y ADNc antisentido</i>	65
DISCUSIÓN.....	67

<i>Regulación de la expresión de la TTL en músculo esquelético de rata</i>	68
<i>Clonado del ADNc de la TTL de rata y análisis de su secuencia de nucleótidos</i>	71
<i>Expresión en células en cultivo de un ARN antisentido y una mutante dominante negativa del gen de la TTL</i>	74
MATERIALES Y METODOS	80
<i>Soluciones</i>	81
<i>Anticuerpos primarios</i>	81
<i>Anticuerpos secundarios</i>	81
<i>Fragmentos de ADNc de la TTL (Lig1 y Lig2)</i>	82
<i>Detección de la TTL mediante "inmunoblot"</i>	83
<i>Inmunocitoquímica en tejido muscular</i>	84
<i>Cultivo primario de tejido muscular</i>	84
<i>Preparación de sondas de ARN</i>	85
<i>Hibridizaciones in situ</i>	85
<i>Rastreo en una librería de ADNc de bulbo olfatorio de rata construida en el vector λZAP II (Stratagene)</i>	86
<i>Síntesis de sondas radioactivas. Marcado de un fragmento de PCR con α-dATP-[P³²]</i>	87
<i>Escisión in vivo de los clones positivos encontrados usando el sistema EXASSIST™/ SOLR™</i>	87
<i>Secuenciamiento del ADNc</i>	88
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	88
<i>Subclonados de fragmentos de ADN en plásmidos</i>	89
<i>Transfecciones de células CHO-K1 con plásmidos</i>	90
<i>Obtención de extractos citosólicos de células transfectadas</i>	91
<i>Determinación de la actividad tirosina ligasa</i>	91
<i>Medición de la radioactividad presente en el material insoluble en tricloroacético</i> ...	91
<i>Purificación de Tubulina</i>	92
<i>Análisis de homologías del ADNc de la TTL de rata con otros genes</i>	92
<i>Alineamiento de las secuencias de aminoácidos</i>	93
<i>Búsqueda de motivos de aminoácidos compartidos entre las TT-ligasas</i>	94
<i>Alineamiento de los motivos</i>	94
<i>Bibliografía</i>	95

Abreviaturas usadas

BCIP: Sal de p-toluidina 5-Bromo-4cloro-3-indolilfosfato

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés: **Green Fluorescent Protein**)

IPTG: Isopropil tio-galactósido

kb: kilobases

kDa: kiloDalton

LB: L Broth . Medio de cultivo para bacterias (ver soluciones en Materiales y Métodos)

NBT: Cloruro de tetrazolio nitroazul

OLB: Mezcla de marcación. Del Inglés:"Oligo Labelling" (ver Materiales y Métodos)

pb: pares de bases

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: **Polymerase Chain Reaction**)

TTL: Tubulina tirosina ligasa

TCPasa: Tubulina carboxipeptidasa

Resumen

En el presente trabajo se realizaron estudios moleculares y funcionales acerca de la enzima tubulina tirosina ligasa (TTL) de rata.

En primer lugar se analizó si los niveles de proteína y ARNm se correspondían con los de actividad enzimáticamente previamente determinados. Con esta finalidad se produjo un anticuerpo anti-TTL y una sonda de ARN correspondiente a una región codificante de la enzima. Mediante el empleo del anticuerpo se encontró que los niveles de TTL son elevados en estadios tempranos del músculo esquelético de rata y disminuyen durante el desarrollo del animal. El análisis de la cantidad de proteína TTL para distintas edades del animal mostró un nivel que se correspondía con el encontrado para la actividad de dicha enzima.

Para determinar si la disminución de los niveles de la proteína TTL es acompañada por un cambio en la expresión de su ARNm, éste fue determinado mediante hibridización *in situ*. Estos experimentos detectaron en tejido embrionario y post-natal, que la cantidad de ARNm fue claramente superior a la del tejido adulto, indicando que la regulación de la actividad de la TTL, estaría a nivel de la transcripción del gen.

Con el fin de examinar si los cambios en la expresión de la TTL ocurren en las células precursoras de las fibras musculares (mioblastos) independientemente de la influencia sistémica o de factores ambientales, se realizaron cultivos primarios de mioblastos a partir de tejido de rata neonatal. Se encontró que tanto en estadios tempranos, donde aun no hay fusión de los mioblastos, como en estadios avanzados de maduración de los miotubos, la expresión del ARNm de la TTL se mantuvo aproximadamente constante. Esto sugiere que los mecanismos que regulan la disminución de la expresión de la TTL *in vivo*, no estarían presentes en el cultivo de células *in vitro*.

Posteriormente, con la finalidad de llevar a cabo estudios relacionados a la funcionalidad de la TTL se aisló su ADNc de una biblioteca de expresión de bulbo olfatorio de rata. De un total de 300.000 clones analizados, se encontró un clon positivo que contenía un inserto de 4,5 kb. Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la TTL y se detectó un marco de lectura abierto de 377 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos mostró ser altamente homóloga

(aproximadamente 91%) con las secuencias de TT-ligasas bovina y porcina ya publicadas.

Con el propósito de indagar acerca del papel funcional de la TTL, se utilizó el ADNc de la enzima para desarrollar una TTL mutante dominante negativa y un ADNc antisentido. Estos fragmentos fueron subclonados en un vector de expresión eucariota y utilizados para transfectar células de la línea CHO-K1, con el propósito de disminuir los niveles de la TTL de dichas células. En contra de lo esperado, el nivel de tubulina detirosinada de los microtúbulos de las células transfectadas, tanto con la TTL mutante como con la secuencia de nucleótidos antisentido, fue similar al encontrado en células transfectadas con el vector sin inserto. Sin embargo la actividad de la TTL determinada en extractos de células transfectadas fue significativamente menor que la encontrada en células controles.

Se realizaron estudios para determinar si la transfección de estas construcciones tenían alguna influencia sobre la división de células en cultivo. Para ello se comparó, luego de 72 hs post-transfección, la cantidad total de células presente en la cápsula con células transfectadas con la mutante dominante negativa y con ADN anti-TTL con respecto a la cantidad presente en la cápsula con células transfectadas con el plásmido sin inserto (control). Los resultados obtenidos indicaron que el número de células presente en las cápsulas con células transfectadas con la mutante y con el ADN antisentido fue superior al de las controles. Se discute la posibilidad de que el aumento en el número de células se deba a un aumento en la velocidad de división de las células transfectadas o que estas afecte, mediante algún mecanismo aun no dilucidado, la proliferación de células vecinas no transfectadas.

INTRODUCCIÓN

La compartimentalización celular de las actividades genéticas y metabólicas de los organismos eucariotas impuso una de las mayores diferencias evolutivas de sus antecesores procariotas. Uno de los compartimentos más relevantes por su tamaño y complejidad es el núcleo el cual, separado del citoplasma mediante una doble capa de membranas, contiene casi la totalidad del ADN celular. Este es el sitio principal de síntesis de ADN y ARN. El espacio circundante al núcleo, el citoplasma, contiene el citosol y organelas citoplasmáticas. En el citosol se lleva a cabo la síntesis de proteínas y las reacciones del metabolismo celular intermedio, reacciones por las cuales pequeñas moléculas son degradadas y otras sintetizadas para generar los componentes de las macromoléculas. Dentro del citoplasma se extiende una compleja red de filamentos proteicos los cuales no solo sirven de soporte y transporte de las organelas que dentro de él se hallan sino que le confieren a la célula importantes propiedades tales como su arquitectura y dinamismo. Esta red de filamentos se denomina citoesqueleto y está compuesta básicamente por tres tipos de filamentos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Cada tipo de filamento está compuesto por una proteína cuantitativamente importante y una serie de proteínas asociadas las cuales le confieren diversas propiedades en cuanto a su estabilidad, dinamismo e interacción con otros componentes celulares.

A continuación se menciona un breve comentario sobre filamentos intermedios y microfilamentos y se discutirá en mayor detalle en lo que se refiere a microtúbulos, tubulina y las modificaciones post-traducción que esta última puede sufrir.

Filamentos de actina

Los filamentos proteicos de actina o microfilamentos son polímeros proteicos de 7-9 nm de diámetro formados principalmente por actina. La motilidad y cambio de forma de la célula se debe en gran medida al ensamblaje dinámico de esta estructura. La actina es una de las proteínas más conservadas entre los eucariotas [1] y existe en dos estados: uno globular, denominado actina-G, ó en la forma polimerizada formando filamentos (actina-F), actualmente denominado microfilamentos. En la célula, la actina-G se encuentra en equilibrio con los polímeros de la actina, los cuales se visualizan en forma de red o en forma de manojos ("bundles"). Funcionalmente los manojos y la red tienen roles idénticos en la célula, ambos sirven como marco de apoyo a la membrana plasmática y por lo tanto determinan la forma de la célula. Sin embargo su organización estructural es diferente. En las cercanías de los extremos de

la membrana plasmática la red, conformada por un entrecruzamiento de los filamentos de actina, adopta una estructura bidimensional. Hacia el interior de la célula la red filamentosa toma una forma tridimensional confiriéndole al citoplasma características gelatinosas. Los manojos difieren estructuralmente de la red, principalmente en la organización de los filamentos de actina. En los manojos, los filamentos están estrechamente empaquetados en arreglos paralelos. Tanto en los manojos como en la red, los filamentos de actina están unidos mediante proteínas que sirven de puente entre ellos. Estas proteínas denominadas en inglés "actin-cross-linking protein" poseen sitios de unión a filamentos de actina y presentan longitud y rigidez variable. Las propiedades de estas proteínas determinan en gran medida la formación de manojos o una red. La forma característica de ciertas porciones que adopta la membrana celular tales como "microspikes", filopodias y lamelipodias no solo depende en la organización de estas estructuras sino también de proteínas que conectan los filamentos a las membranas ("membrane-microfilament binding protein"). Estas proteínas sirven de anclaje de la membrana plasmática al citoesqueleto subyacente. En resumen, la diversificación de las propiedades de la actina en relación a la forma y al movimiento celular se debe en gran medida al conjunto de proteínas que interactúan con ella [2].

Filamentos Intermedios

Los filamentos intermedios (FIs) constituyen una superfamilia de proteínas que poseen estructura de alfa hélice y tienen la propiedad de polimerizar formando filamentos de 10 nm de diámetro. Este tipo de filamentos se los ha encontrado en la mayoría de las células eucariotas excepto en hongos y otros eucariotas inferiores. A diferencia de los microfilamentos y los microtúbulos (ver más adelante), los FIs no poseen un rol en la motilidad celular. Es decir, no se conocen movimientos celulares dependientes de estos filamentos ni de proteínas motoras que se desplacen a lo largo de ellos. Algunas de las funciones celulares en las que este tipo de filamento participa son: soporte de la membrana nuclear interna, conexiones célula-célula y célula-matriz extracelular vía el anclaje a desmosomas y hemidesmosomas y en las células musculares, mantención de la citoarquitectura de los unidades sarcoméricas. [3]. La propiedad bioquímica más notable de los FIs es su estabilidad ya que a diferencia de los microfilamentos y los microtúbulos, los FIs permanecen polimerizados aun cuando a una célula se la trata con soluciones que poseen detergentes o alta fuerza iónica.

Las proteínas que forman los FIs se las han clasificado en cinco grupos distintos sobre la base de la homología en su secuencia de aminoácidos. La expresión de cada proteína de FIs es característica de ciertos tejidos o tipo celular. Por ejemplo filamentos de queratinas en células epiteliales, filamentos de vimentina en células mesenquimales, filamentos de desmina en células musculares, filamentos de proteína ácida fibrilar glial en algunas células gliales, neurofilamentos en células neuronales y filamentos de lamina en la lámina nuclear de las células eucariotas. Estas proteínas suelen utilizarse como marcadores celulares debido a su patrón de expresión específica en ciertos tipos de células. Además de compartir la propiedad de formar filamentos de 10 nm en diámetro todas las subunidades proteicas de los FIs poseen tres dominios moleculares bien diferenciados. Un “core” central en estructura de α -hélice, y dominios terminales amino y carboxilo con estructura globular. Esta disposición molecular y las características de su secuencia de aminoácidos hace que estas proteínas se unan entre sí en forma antiparalela formando dímeros, los cuales forman distintas estructuras de polimerización intermedias para finalmente formar un filamento el cual no posee una polaridad determinada. Al igual que los filamentos de actina y microtúbulos, los FIs poseen un conjunto de proteínas asociadas las cuales hacen posible su interacción con otros componentes celulares. Así, la proteína plectina representa un fuerte candidato a la interacción entre los tres tipos de filamentos: FIs, microfilamentos y microtúbulos [4, 5, 6], y desmoplaquina quien media la interacción entre los filamentos de queratina y la placa electrodensa de los desmosomas [7].

Microtúbulos

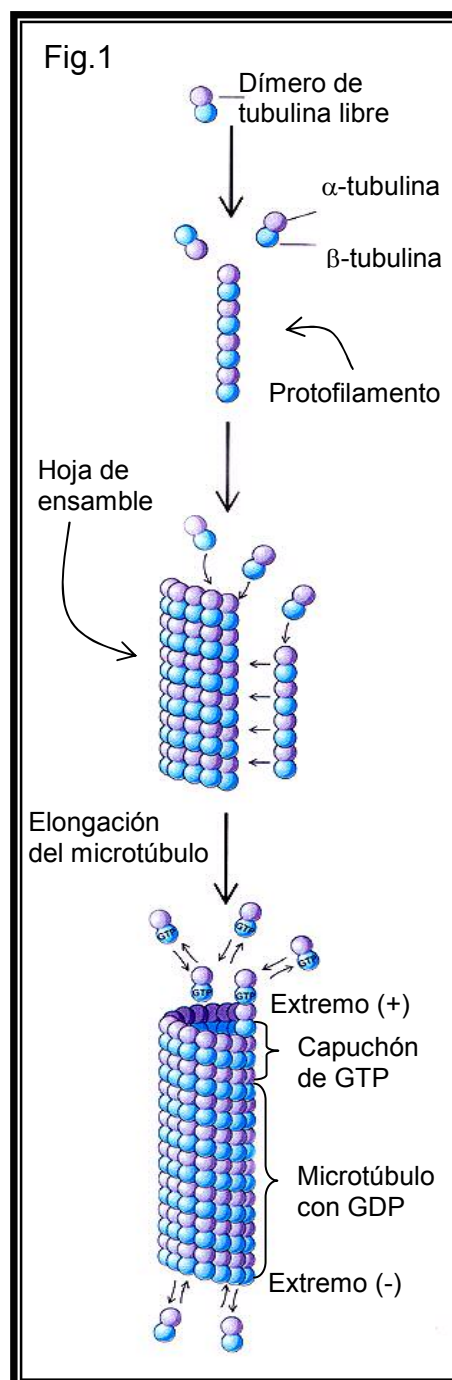
Los microtúbulos son polímeros cilíndricos huecos de 24 nm de diámetro formado por subunidades de la proteína globular *tubulina* (ver Fig. 1). La tubulina es un heterodímero formado por una subunidad α y una subunidad β . Para la formación de un microtúbulo la tubulina debe formar primeramente protofilamentos lineales los cuales se forman con la unión de la subunidad β del dímero con la subunidad α del siguiente dímero de tubulina, es decir el protofilamento se forma con dímeros de tubulina unidos de manera cabeza-cola. Un corte transversal de un microtúbulo muestra trece protofilamentos [8] (aunque se han descrito *in vivo* excepciones de microtúbulos de 12, 14 y 15 protofilamentos [9, 10, 11]) ordenados en forma paralela

formando un cilindro alrededor de un “core” central vacío. Debido a que todos los protofilamentos están ordenados en una misma dirección (determinada por la orientación de la unión de las subunidades de tubulina), el microtúbulo es una estructura polar. Esta proteína se la encuentra en todos los organismos eucariotas. En el tejido nervioso de animales superiores la tubulina representa alrededor del 10-20% de las proteínas totales.

La tubulina puede ensamblarse *in vitro* incubando a 37°C un extracto proteico soluble de cerebro en presencia de GTP, Mg^{2+} y un agente quelante de Ca^{+2} (EGTA). Los microtubulos formados pueden aislarse mediante centrifugación y desensamblarse por incubación a 0°C quedando la tubulina en condiciones de ensamblar nuevamente. Esta dependencia de la polimerización con la temperatura, resultó ser de gran utilidad como método de purificación de la tubulina. Varios ciclos de ensamble y desensamble de tubulina permite obtener preparaciones altamente enriquecidas en tubulina y proteínas que poseen una interacción selectiva con la misma.

El microtúbulo posee un extremo denominado “+”, cuya velocidad de crecimiento por adición de tubulina es más rápido que el extremo “-

”. El heterodímero de tubulina une dos moléculas del nucleótido GTP. Un sitio de unión se encuentra en la subunidad α donde el GTP no es hidrolizable, mientras que el segundo sitio, localizado en la β -tubulina, une GTP reversiblemente que puede ser hidrolizado a GDP. Con respecto a la cinética de polimerización de la tubulina, se ha observado *in vitro* que la formación de microtúbulos es dependiente de la concentración del dímero de tubulina presente en el medio. Esta concentración se denomina concentración crítica C_c . Por encima de esta concentración la tubulina se ensambla, por debajo de la misma se desensambla. Tanto el ensamble como el



desensamblable, tienen lugar preferentemente sobre el extremo “+” de los microtúbulos. El GTP presente en la β -tubulina es hidrolizado a GDP luego que el dímero de tubulina se adiciona a los extremos de un microtúbulo en crecimiento. Así el extremo de un microtúbulo consistirá transitoriamente de subunidades de tubulina que contienen GTP mientras que el centro del microtúbulo estará enriquecido en tubulina-GDP. Uno de los parámetros que determina la estabilidad de un microtúbulo es la velocidad a la cual la tubulina-GTP se adiciona al extremo “+”.

Una variedad de experimentos en diferentes tipos de células han demostrado que mientras algunos tipos de microtúbulos crecen, simultáneamente otros se depolimerizan. Mas aún, un microtúbulo puede oscilar temporalmente entre fases de crecimiento y acortamiento. Este comportamiento complejo de los microtúbulos se ha denominado *inestabilidad dinámica* [12]. Los parámetros que describen el modelo de inestabilidad dinámica son cuatro: La velocidad de polimerización, la velocidad de depolimerización, la frecuencia de rescate del microtúbulo (transición de depolimerización a polimerización) y la frecuencia de catástrofe (transición de polimerización a depolimerización). Dos condiciones modulan la inestabilidad: la concentración de tubulina, y el tipo de nucleótido (GTP o GDP) unido a la β -tubulina en el extremo “+” del microtúbulo. Un microtúbulo se convierte en inestable y se depolimeriza rápidamente (catástrofe) si la concentración de tubulina está por debajo de la C_c o si el extremo “+” posee subunidades de β -tubulina con GDP. Esta última situación puede darse cuando un microtúbulo se acorta rápidamente exponiendo GDP-tubulina en el extremo ó cuando el microtúbulo crece muy lentamente de forma que el GTP-tubulina se hidroliza antes de que nuevas unidades de GTP-tubulina se adicionen. Sin embargo el microtúbulo que se esta depolimerizando puede volver a ensamblarse y crecer si la concentración de tubulina esta por encima de la C_c o si nuevas unidades de GTP-tubulina se adicionan al extremo “+” antes de que el GTP se hidrolice. El acortamiento y crecimiento es una propiedad intrínseca de los microtúbulos. Muchos factores pueden interferir en las distintas fases del dinamismo de los mismos, entre ellos la participación de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (ver más adelante). Existen dos tipo de mecanismos que explican el comportamiento dinámico de los microtúbulos. Uno es el mecanismo de “inestabilidad dinámica” mencionado anteriormente y otro es el denominado “treadmilling”. Históricamente este último fue el primer modelo propuesto para el estudio de la

cinética de formación de los microtúbulos. Básicamente el modelo propone que la invariabilidad de la masa poblacional de microtúbulos en estado estacionario es la resultante de la sumatoria de equilibrios en los microtúbulos individuales. Así el ensamblaje de subunidades en el extremo “+” de cada microtúbulo es compensado por la pérdida de subunidades en el extremo “-“ [13]. Estudios con tubulina marcada con biotina demostraron que la mayoría de los microtúbulos de las células en interfase se comportan según el modelo de la inestabilidad dinámica. Sin embargo recientemente se han mostrado evidencias de que existen numerosos microtúbulos que no se encuentran unidos al centrosoma [14, 15, 16] y que se comportan según el modelo de “treadmilling” [16].

Un elemento importante para la formación de microtúbulos en células eucariotas lo constituye el *centro organizador de microtúbulos* (COMT). La mayoría de los microtúbulos citosólicos están dispuestos de tal forma que sus extremos (-) se encuentran concentrados espacialmente en el COMT y desde allí se dispersan en la célula quedando los extremos “+” en la periferia celular. [17, 18]. El COMT se encuentra en la periferia nuclear y al microscopio electrónico se lo observa como un material amorfo denso y oscuro. El rol principal del COMT es ser el centro desde el cual se ensamblan la mayoría de los microtúbulos. La evidencia de que el MOTC es el material que une los microtúbulos en formación fue demostrada *in vitro* [12]. La adición de centrosomas purificados (centrosoma y COMT son denominaciones equivalentes para la mayoría de las células animales en interfase) a una solución que contiene tubulina, permite la formación de microtúbulos cuyos extremos “-“ permanecen asociados con el centrosoma [12]. Además de las isoformas α y β tubulina se ha descrito la tubulina γ la cual no forma parte de microtúbulos. Se la ha encontrado fundamentalmente en el COMT [19] donde actuaría como sitio de nucleación en la formación de microtúbulos. La γ -tubulina también existe como parte de un agragado citoplasmático cuyo tamaño y complejidad varía en cada organismo. El COMT puede contener un par de centríolos en su centro. Cada centríolo es una pequeña organela cilíndrica de aproximadamente 0,2 μm de ancho y 0,4 μm de largo. La paredes del centríolo están formadas por nueve grupos de tres microtúbulos fusionados (tripleto). Los centríolos a menudo existen de a pares formando un ángulo recto entre si y se hallan presentes en la mayoría de células animales pero están ausentes en hongos y plantas. Como se mencionó anteriormente los centríolos

permanecen en el centro del centrosoma pero no hacen contacto directo con los extremos de los microtúbulos citosólicos. Juegan un papel importante durante la división celular y participan del anclaje de los microtúbulos de las ciliias y flagelos.

A diferencia de los microtúbulos de ciertas estructuras especializadas tales como ciliias, flagelos y axones, la mayoría de los microtúbulos de las células en interfase son dinámicos, es decir intercambian subunidades de tubulina rápidamente con la población de tubulina no ensamblada [20, 21]. Los microtúbulos dinámicos son esenciales para procesos intracelulares rápidos tales como la reorganización del citoesqueleto en el cambio de estado de interfase a mitosis, durante las distintas fases de la división celular, durante la diferenciación celular, etc.

Proteínas asociadas a microtúbulo (MAPs)

Numerosos trabajos se han realizado para identificar proteínas que regulan el dinamismo de los microtúbulos. Dos clases de proteínas con distintas propiedades interaccionan con los microtubulos: proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, del inglés *Microtubule-associated proteins*) y proteínas motoras. En contraste con las moléculas motoras (kinesinas, dineínas, etc), las MAPs se unen al microtúbulo de una manera independiente de nucleótidos; estimulan la nucleación y estabilizan el polímero. A través de ciclos de ensamblaje de la tubulina y desensamble de los microtúbulos se ha observado que las MAPs copolimerizan con estos últimos en relaciones estequiométricas constantes [para review ver 22]. De los estudios *in vitro* varias MAPs han sido clasificadas como promotoras de ensamblaje *in vitro*. Entre estas podemos citar a la familia de proteínas MAP1, MAP2, y tau en neuronas y MAP4 en células no neuronales. Las MAPs neuronales afectan el dinamismo de los microtúbulos principalmente porque suprimen la frecuencia de catástrofe e incrementan la frecuencia de rescate. Débilmente incrementan la velocidad de polimerización. Su presencia reduce la velocidad de recambio de los microtúbulos [23].

Existen tres proteínas MAP1, estas son MAP1A (350 kDa), MAP1B (320 kDa) y MAP1C ó Dineína citosólica (constituida por 3 subunidades de 470-540 kDa). La MAP1C es considerada como una proteína motora y posee propiedades bioquímicas diferentes del resto de las MAP1. Las proteínas MAP1A y MAP1B poseen patrones de expresión complementario a lo largo del desarrollo del tejido cerebral de la rata [24].

La MAP1B es predominantemente axonal aunque hay excepciones. Se ha propuesto que MAP1B juega un papel vital en regular la dinámica del ensamblaje del microtúbulo durante el crecimiento neurítico [25]. La expresión de MAP1A es generalmente escasa en las fibras axonales en desarrollo, moderada en los axones maduros y alta en dendritas en desarrollo y maduras [26, 27, 28]. Con respecto a la MAP1A, debido a su expresión tardía, a su presencia en axones y dendritas maduras y a su ausencia en axones y dendritas inmaduras se ha sugerido que esta proteína actuaría como estabilizante de los procesos neuríticos.

El conjunto de proteínas denominadas MAP2 comprenden las proteínas MAP2a (280 kDa), MAP2b (200 kDa) y MAP2c (42 kDa) [29, 30, 31, 32]. Son proteínas termoestables, altamente fosforiladas [33] y que se generan del procesamiento alternativo de un único ARNm [34]. La localización subcelular de estas proteínas es principalmente dendrítica [35]. Cada molécula de MAP2 posee en el terminal carboxilo de su secuencia de aminoácidos, tres dominios separados entre sí por trece aminoácidos, con capacidad de unión a tubulina. La proporción relativamente alta de esta proteína en los microtúbulos y su interacción con varias subunidades de tubulina le confiere estabilidad y rigidez a los microtúbulos [36]. Experimentos con ADNc antisentido contra el ARNm de la MAP2 en una línea celular con diferenciación semejante a un neuroblastoma (P19) han demostrado tener severas consecuencias en la formación de procesos neuríticos [37, 38]. Un resultado similar fue obtenido con oligonucleótidos antisentido en cultivos primarios de neuronas de cerebelo. Estos ensayos han sugerido que la MAP2 podría tener un rol relevante en la iniciación de los procesos neuríticos.

La proteína MAP4 (210 kDa) es una proteína conservada evolutivamente desde drosófila hasta humanos y se la ha detectado tanto en tejido neuronal como no neuronal [ver review 39]. La MAP4 promueve el ensamblaje *in vitro* aunque, de un modo distinto al de las otras MAPs neuronales. Esta proteína incrementa la frecuencia de rescate sin disminuir la frecuencia de catástrofe [40]. Los análisis genéticos de disrupción del gen de la MAP4 en Drosófila no mostraron un cambio significativo en el fenotipo, lo que sugiere que esta proteína en esta especie podría tener un solapamiento funcional con otras MAPs [41, 42].

Otra MAP extensamente estudiada por su relación con la enfermedad de Alzheimer es la proteína tau. Esta proteína fue una de las primeras proteínas descripta que se asocia con los microtúbulos [43]. En humanos tau posee seis isoformas que

derivan del procesamiento alternativo de un único ARNm. Una de estas isoformas se encuentra hiperfosforilada y es el componente principal de los pares de filamentos helicoidales que se halla presente en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer [44, 45]. Las proteínas tau poseen un dominio carboxilo terminal con unión a microtúbulo (motivos de 31 o 32 aminoácidos dispuestos en forma repetida) y una proyección N-terminal la cual determina el espaciamiento entre los microtúbulos adyacentes [46]. La unión de la tau a los microtúbulos disminuye su inestabilidad dinámica reduciendo las transiciones entre fases de crecimiento y acortamiento de microtúbulos [47]. En microtúbulos individuales la tau ejerce la función de incrementar la velocidad de polimerización e inhibir la velocidad de transición a la fase catastrófica de acortamiento [48]. Numerosos experimentos de bloqueo de la expresión de la tau en células neuronales y expresión de la misma en células no neuronales, sugieren que la morfología axonal podría ser dependiente de la expresión de esta proteína pero aun es motivo de controversia si juega o no un papel crucial en el establecimiento de la polaridad neuronal [49, 50, 51, 52].

Tubulina

En cada especie, la tubulina posee varios isotipos genéticos tanto para la subunidad α como la subunidad β ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \dots; \beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots$). El grado de homología es moderado entre las subunidades α y β (35-40% de identidad) y alto dentro de los miembros de cada subunidad. La abundancia de estos isotipos y el grado de homología que existe entre sus miembros hace que a cada subunidad se la considere como una familia de proteínas.

La estructura tridimensional del dímero α/β tubulina fue recientemente dilucidada luego de varios años de trabajo [53]. El análisis de su estructura indicó que posee una alta similitud con la proteína de división bacteriana FtsZ [54, 55]. Se ha observado que la estructura del monómero es muy compacta pero se puede dividir en tres dominios funcionales: un sitio N-terminal el cual posee una región de unión a GTP, un dominio intermedio de unión a la droga taxol (droga antimitótica ampliamente usada como estabilizante de microtúbulos), y un dominio C-terminal el cual constituye la superficie de unión para proteínas motoras y MAPs [53].

La tubulina es una familia de proteínas que posee múltiples isotipos genéticos y la cantidad de miembros varían según la especie viviente que se trate. Así por ejemplo

en hongos existen dos isotipos de α -tubulina y dos β -tubulina, cuatro de cada uno en *Drosófila* y de cinco a siete en animales vertebrados [56, 57, 58, 59, 60, 61]. Si bien el patrón de expresión de las tubulinas es complejo, se pueden realizar las siguientes generalizaciones:

a) Una (o más) iso especie se expresa mayoritariamente en varios tejidos y a lo largo del desarrollo de la especie mientras que las otras isoformas suelen estar restringidas a cierto tipo de células (tejidos) y/o con bajos niveles de expresión. Excepcionalmente, una iso especie minoritaria en la mayoría de los tejidos puede ser la iso especie predominante en un tipo específico de célula tal como es el caso de una iso especie de β -tubulina en el tejido hematopoyético de vertebrados [62, 63].

b) En eucariotas superiores las iso especies que están en mayor proporción poseen una estructura conservada mientras que las que están en menos proporción son más divergentes [64, 65, 63].

c) No hay un programa de coordinación aparente para la expresión de un par determinado de α/β -tubulina. Así la diversidad genética de las iso especies hace que la heterogeneidad a nivel del heterodímero sea mucho mayor que la cantidad de genes individuales.

d) La diversidad de las iso especies, debido a la presencia de distintos genes, se encuentra además incrementada por modificaciones post-traducción tanto sobre la α -tubulina como sobre la β -tubulina (ver más adelante).

De una vasta cantidad de estudios llevados a cabo para investigar la funcionalidad de las distintas iso especies, dos tipos de observaciones sostienen la idea de que isoformas de tubulina podrían tener funciones diferentes [66, 67, 68, 69]. Una de ellas lo constituye el patrón fuertemente regulado de expresión temporoespacial de determinadas isoformas conjuntamente con la regulación de los patrones de modificaciones post-traducción. El grado de similitud (respecto a la secuencia de aminoácidos) entre las distintas iso especies en un organismo determinado es menor que el grado de similitud de iso especies equivalentes entre diferentes organismos. Estas observaciones sugieren que la selección a lo largo de la evolución ha operado selectivamente para mantener las características funcionales específicas de un isotipo particular [39].

Como se mencionó anteriormente, además de la α y β tubulina existe la γ tubulina. Esta proteína fue descubierta rastreando proteínas que interaccionan con la β -tubulina

en el hongo *Aspergillus nidulans* [70, 71]. Desde entonces ha sido extensivamente estudiada y clonado su ADNc en diferentes especies. Si bien a nivel de la secuencia de aminoácidos presenta una moderada homología con las α y β -tubulina (28-35 % en identidad y aproximadamente 60 % de similitud) las γ -tubulinas son altamente conservadas y ampliamente distribuidas en los eucariotas [71]. Así, la secuencia de aminoácidos en humanos posee un 98 % en identidad con la secuencia de *Xenopus laevis* lo cual sugiere que esta iso especie debe cumplir una función básica en el funcionamiento celular [72, 73].

Modificaciones post-traducción de la tubulina

Varias modificaciones post-traducción afectan a la tubulina, lo cual suma diversidad a la causada por la heterogeneidad genética del dímero [para review ver 74]. Todas las modificaciones descritas hasta el presente son llevadas a cabo por enzimas, lo que sugiere la posibilidad de que las modificaciones sean rápidas y reversibles. Todas, las modificaciones de la tubulina excepto una, se llevan cabo en la región terminal carboxilo, la cual posee mayor variabilidad en la secuencia. A pesar de que las modificaciones post-traducción se han investigado ampliamente, sus roles funcionales aun se desconocen. Sin embargo los promisorios avances en metodologías de clonado, disrupción y silenciamiento de los genes encargados de estas modificaciones podrían en un futuro próximo mayor información sobre los eventos celulares en que las modificaciones podrían participar. Una de estas estrategias se llevó a cabo en este trabajo de tesis.

Las modificaciones post-traducción de la tubulina caracterizadas hasta el presente son: a) Acetilación de α -tubulina, b) Fosforilación de (α/β)-tubulina, c) Poliglutamilación de (α/β)-tubulina, d) Poliglicinación de (α/β)-tubulina, e) Detirosinación -Tirosinación de α -tubulina.

a) Acetilación de la α -tubulina

La acetilación de la tubulina fue identificada por primera vez en organismos unicelulares flagelados cuando se observó que una de las tubulinas de *Polytomella* migraba hacia posiciones más ácidas de lo que lo hacían el resto de las tubulinas en geles bidimensionales [75]. Años más tarde se determinó que se trataba de una modificación post-traducción de la α -tubulina. La modificación consiste en la adición

de un grupo acetilo en el grupo de ϵ -amino de un residuo de lisina ubicado en la posición 40 de la proteína. También se encontró esta iso especie durante la morfogénesis flagelar en *Chlamydomonas* [76]. Se demostró que dicha modificación se lleva a cabo por una acetiltransferasa específica para tubulina y que actúa preferencialmente sobre la tubulina polimérica asociándose fuertemente sobre los axonemas [77]. Se ha observado que durante la reabsorción del flagelo de este protozoo, la tubulina acetilada se desacetila en el citoplasma [77].

La acetilación tiene lugar sobre los microtúbulos mientras que la desacetilación ocurre sobre la tubulina monomérica [78]. Luego que Piperno y colaboradores [79] prepararon anticuerpos monoclonales específicos contra la tubulina acetilada de *Chlamydomonas* encontraron que dicha iso especie poseía una amplia distribución filogenética. Se encontró tubulina acetilada en la mayoría de las células eucariotas de mamíferos, insectos, plantas, helmintos [80, 81, 82, 83]. Varios estudios inmunocitoquímicos utilizando el anticuerpo monoclonal 6-11-B1 demostraron que la tubulina acetilada se encuentra en microtúbulos estables, de apariencia sinuosa y generalmente resistentes a depolimerización inducida por drogas [84, 85, 86, 87].

Dos ensayos de mutaciones genéticas en la lisina 40 de la α -tubulina, uno en *Chlamydomonas reinhardtii* y otra en *Tetrahymena thermophila*, fueron realizados para investigar el rol funcional de esta iso especie de tubulina [88,89]. En el primer caso, se transformó una cepa de *Chlamydomonas* con una α -tubulina incapaz de ser acetilada. Sin embargo en los clones donde la α -tubulina mutante alcanzó a representar el 70 % de la α -tubulina flagelar, no se observaron diferencias en diversos parámetros morfológicos con respecto a las cepas controles. A pesar de estos resultados se sugirió que la tubulina acetilada podría tener un efecto sutil en la estabilidad o motilidad de la estructura flagelar que no es detectado bajo las condiciones de trabajo. Para el caso de *Tetrahymena*, se reemplazo la lisina de la posición 40 de la α -tubulina por arginina y las cepas obtenidas expresaban la totalidad de esta iso especie. Semejante al caso de *Chlamydomonas*, no se encontraron diferencias morfológicas con las cepas controles. Este último ensayo permitió afirmar que la acetilación de la lisina 40 en la α -tubulina no es esencial para la vida del organismo aunque no se descarta la posibilidad que esta reacción sea importante para modular estados fisiológicos no detectados por la metodología de análisis utilizada. El bloqueo de la expresión de la acetil-transferasa probablemente permitiría

acercarnos más a determinar el rol funcional *in vivo* de esta modificación post-traducción.

b) Fosforilación de la α/β -tubulina

Al presente, se conoce que cinco tipos de quinasas fosforilan la tubulina: (a) quinasa dependiente de cAMP, (b) quinasa estimulada por Ca^{2+} /calmodulina, (c) caseína quinasa I (d) caseína quinasa II y (e) tirosina quinasa.

Para la primera enzima se sabe que se trata de una quinasa que es estimulada por cAMP y que copurifica con tubulina a través de ciclos de ensamblaje y desensamblaje [90]. *In vivo* se ha observado que dicha quinasa fosforila ambas subunidades de la tubulina, aunque α -tubulina incorpora aproximadamente dos veces más fosfatos que la subunidad β . Se ha determinado que la fosforilación se lleva a cabo sobre un residuo serina de la subunidad β . A diferencia de lo observado *in vivo*, se ha determinado que *in vitro* la tubulina es capaz de fosforilarse en varios residuos serina [90].

La fosforilación endógena de la tubulina por quinasas dependientes del sistema calcio-calmodulina ha sido más ampliamente estudiada [91, 92, 93]. En preparaciones de terminales de nervios presinápticos se ha identificado una quinasa sensible a Ca^{2+} cuya reacción de fosforilación es bloqueada por el inhibidor de la calmodulina trifluorperazine [93]. Estos estudios demostraron además que existe una correlación entre la modificación de la tubulina y el metabolismo de neurotransmisión. El análisis de la quinasa purificada indica que se trata de un multímero de aproximadamente 600 kDa de PM. La fosforilación llevada a cabo por esta enzima tiene lugar principalmente sobre la β -tubulina en residuos treoninas (60%) y serina (40%) y alcanza aproximadamente 0,8 mol de fosfato por mol de sustrato [94]. Otra quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina fue identificada en cerebro de rata, la cual fosforila *in vitro* a ambas subunidades de la tubulina aunque en mayor proporción a la β -tubulina [95]. La sobreexpresión de esta quinasa mediante ensayos de transfección en líneas celulares de neuroblastoma Neuro2a, NG108-15 y células H-7 promueve el crecimiento neurítico e incrementa la motilidad de los conos de crecimiento [96, 97, 98], sin embargo los autores de los trabajos mencionados no dieron evidencias directas de que el efecto fuese debido a la fosforilación de la tubulina o vía fosforilación de alguna proteína asociada a microtúbulo [99]. Se ha demostrado que la inducción del crecimiento neurítico en la línea celular N115 (neuroblastoma) va

acompañada de la fosforilación de un isotipo de tubulina denominada β -tubulina III [100, 101]. Se sabe que esta fosforilación es llevada a cabo por caseína quinasa II en el residuo serina 444. Los análisis *in vitro* de esta proteína han demostrado que este isotipo de tubulina interacciona más débilmente con la MAPs de lo que lo hacen el resto de los isotipos (I,II,IV) y su fosforilación regula su incorporación al microtúbulo [101].

c) **Poliglutamilación de la α/β -tubulina**

La glutamilación de la tubulina constituye el agregado de residuos glutámicos (1-20) sobre residuos glutámicos ubicados en la región C-terminal de las subunidades α -tubulina y β -tubulina [102,103]. Se piensa que diferentes enzimas glutamilan tanto la α como la β -tubulina y que tanto la forma soluble como polimérica de la tubulina son sustratos de la reacción aunque la glutamilación se lleva a cabo preferencialmente en microtúbulos [104]. Se ha demostrado que el grado de glutamilación no tiene efecto sobre la tirosinación-detirosinación de la tubulina, aunque la influencia de esta última modificación sobre la primera aun no ha sido analizada [105]. La glutamilación de la tubulina es una modificación reversible que se halla ampliamente distribuida a lo largo de la evolución: desde *Giardia lamblia* hasta mamíferos superiores [102, 104, 106, 107, 108]. La tubulina de cerebro de animales vertebrados ha mostrado ser la que mayor glutamilación posee, en comparación con tubulina de pulmón, bazo y testículos [109]. Se ha demostrado la presencia de tubulina poliglutamilada en microtúbulos estables distribuidos en estructuras subcelulares especializadas tales como los microtúbulos de procesos neuronales, cilias, flagelos y centríolo [110, 111]. Si bien la tubulina poliglutamilada posee un patrón de distribución muy semejante a la tubulina acetilada, en células de Sertolli algunos microtúbulos se hallan glutamilados pero no acetilados lo que sugiere una diferencia funcional entre ambos tipos de microtúbulos [109]. La glutamilación de los microtúbulos de las células no-neuronales está restringida principalmente a los microtúbulos de los centríolos [112]. Estudios de microinyección de un anticuerpo contra este isotipo de tubulina mostraron que esta modificación es crítica para la estabilidad de los microtúbulos del centríolo [113].

d) Poliglicinación de la α/β -tubulina

La poliglicinación de la tubulina consiste de la adición post-traducción de 3-34 residuos de glicina sobre el carboxilos γ del ácido glutámico del C-terminal de la α - y β -tubulina [114, 115]. El empleo de anticuerpos específicos contra esta modificación, mostró que la misma está ampliamente distribuída filogenéticamente [116]. La tubulina poliglicinada es detectada en arreglos de microtúbulos muy estables tal como los del axonema de ciliás y flagelos [114, 117, 118]. En el citoplasma de *Paramecium* la tubulina posee de uno a dos residuos de glicina tanto en la α como en la β -tubulina mientras que en los microtúbulos del axonema la α -tubulina posee entre 1 y 5 residuos y la β entre 2 y 9. Esto sugiere la existencia de mecanismos regulatorios de la función de la tubulina debido a esta modificación [119]. Si bien la enzima que glicila aun no ha sido aislada, esta actuaría preferentemente como sustrato al microtúbulo. Diferentes ensayos indicarían que la enzima deglicilante residiría en el citoplasma [119]. No se conoce el papel funcional de esta modificación.

e) Detirosinación-Tirosinación de la α -tubulina

Una de las modificaciones más ampliamente estudiada es la reacción de tirosinación-detirosinación de la tubulina [120, 121, 122]. La reacción fue inicialmente descrita en extractos crudos de cerebro de rata y posteriormente se la detectó en otros organismos y tejidos [123, 124]. La modificación post-traducción comienza con la eliminación de un residuo de tirosina ubicado en el extremo C-terminal de la subunidad α . Esta reacción es catalizada por la acción de la enzima tubulina carboxipeptidasa (TCPasa) [125]. Debido a esta reacción, la α -tubulina expone ahora ácido glutámico como aminoácido C-terminal de la cadena. Otra enzima, denominada tubulina tirosina ligasa, tiene la capacidad de adicionar un residuo tirosina sobre el ácido glutámico de dicha subunidad (Ver Fig. 2) [120]. En conjunto estas reacciones hacen que se genere una reacción cíclica tirosinación-detirosinación sobre la tubulina, cuyo significado funcional hasta el presente se desconoce.

In vitro, se ha observado que la reacción que cataliza la TTL requiere

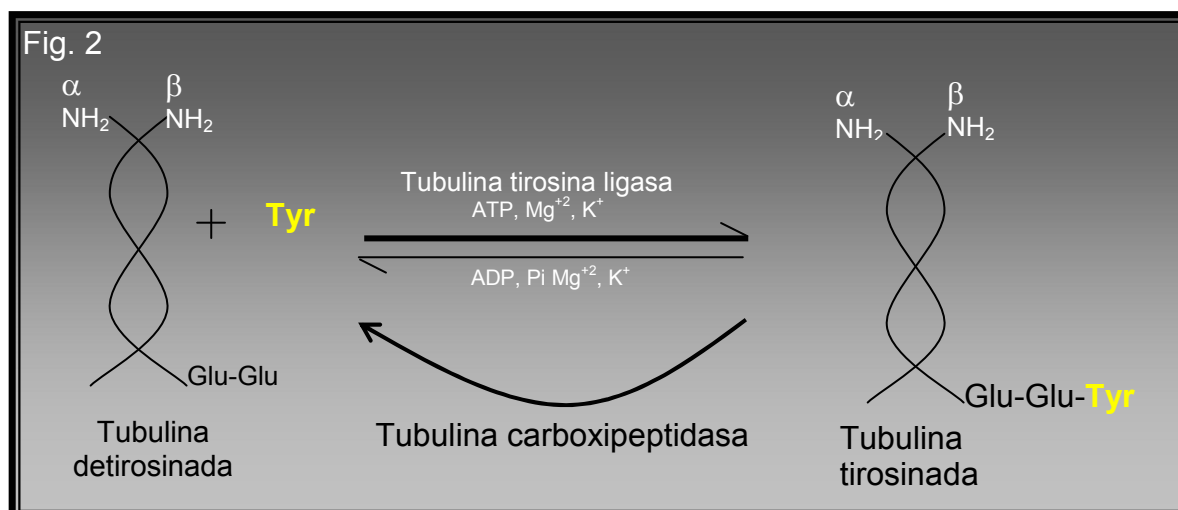
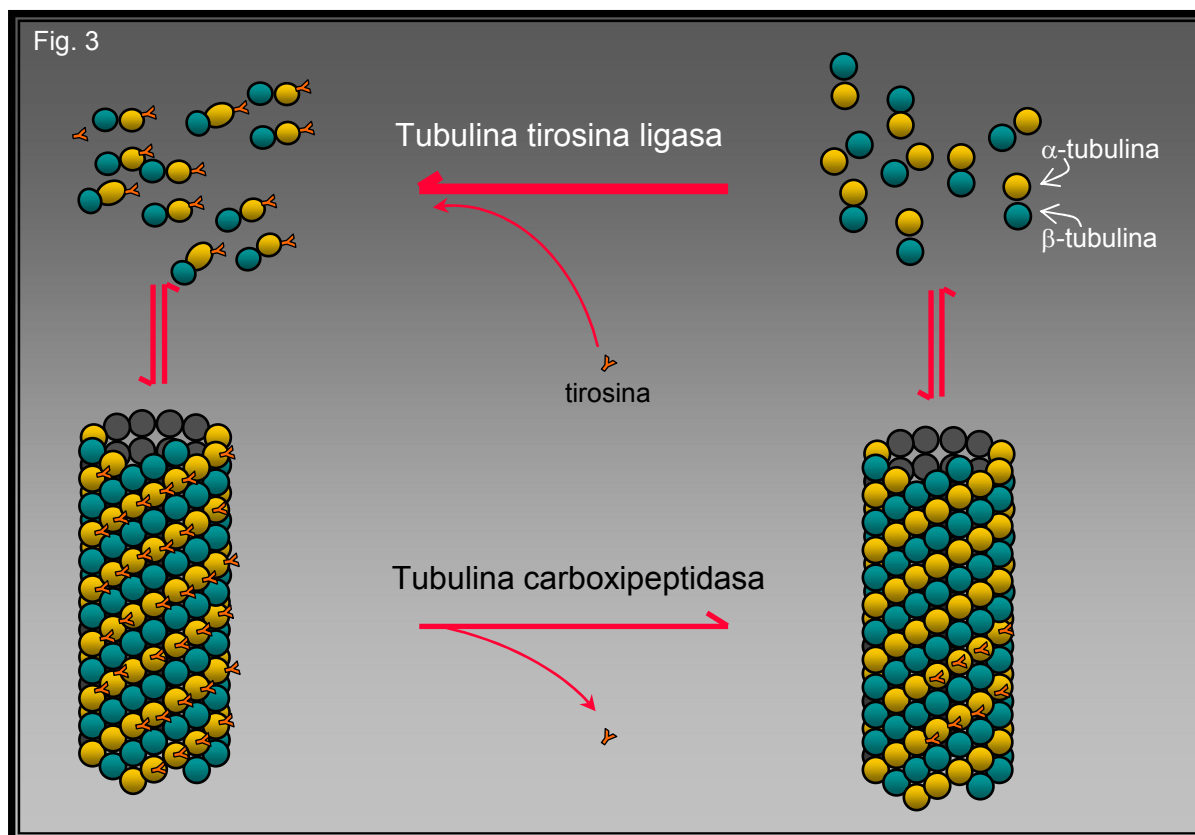


Fig. 2. Representación esquemática de la reacción de tirosinación-detirosinación post-traducción sobre la α -tubulina.

ATP, Mg⁺² y K⁺ como cofactores. Varios estudios han demostrado que el estado de agregación de la tubulina es un factor fundamental para que ambas reacciones se lleven a cabo. Se ha observado que la población de tubulina no ensamblada es el principal sustrato de la TTL [126, 127, 128, 129, 130, 131], mientras que la forma polimérica de la tubulina es el sustrato de preferencia de la TCPasa [131, 132, 133, 134] (Ver Fig. 3). Cabe mencionar que la presencia o ausencia de tirosina en el terminal carboxilo de la subunidad α -tubulina no es indicativo de que la tubulina ha sido modificada post-traduccionalmente ya que se ha observado que la mayoría de los isotipos genéticos codifican para la tirosina C-terminal. Sin embargo algunas isoformas codifican para ácido glutámico en su C-terminal [135]. El aminoácido terminal carboxilo de la α -tubulina puede ser tirosina, ácido glutámico ó bien el aminoácido que le precede al glutámico debido a una posterior modificación post-traducción que se detalla a continuación. El estado de tirosinación de la tubulina, es decir la proporción de moléculas de tubulina que están tirosinadas, fue por mucho tiempo determinado bioquímicamente por métodos enzimáticos [122, 136]. Utilizando esta metodología se encontró que en cerebro de rata la tubulina tirosinada y detirosinada no da cuenta del total de tubulina. Esta diferencia es mayor cuanto mayor es la edad del animal. [137, 138]. Estos resultados llevaron a concluir que debía encontrarse en estos tejidos otra isoforma de tubulina incapaz de ser tirosinada. Años más tarde Paturle y colaboradores lograron purificar dicha isoforma y determinar que se trataba de α -tubulina que carecía de tirosina y ácido glutámico en el



terminal carboxilo [139, 140]. A esta isoforma se la denominó tubulina- $\Delta 2$ por carecer de los dos aminoácidos terminales. Barra y colaboradores determinaron que esta isoforma representa aproximadamente el 50 % de la tubulina de cerebro de ratas maduras [137] y que está ausente en tejido muscular [141]. El estudio de la reacción de tirosinación-detirosinación de la tubulina fue en gran medida favorecida por el desarrollo de anticuerpos que reconocen específicamente las isoformas tirosinada y detirosinada de la tubulina [142, 143, 144, 145]. El empleo de estos anticuerpos contribuyeron considerablemente a esclarecer aspectos relacionados a la distribución subcelular de las isoformas de tubulina [144]. Con ellos se ha demostrado que en una célula eucariota pueden coexistir microtúbulos tirosinados, detirosinados y parcialmente detirosinados. Sin embargo, los innumerables ensayos inmunocitoquímicos han revelado de manera general que la tubulina tirosinada es la isoforma predominante en la mayoría de los microtúbulos de las células en interfase y en proliferación. La distribución de la isoforma detirosinada está restringida a microtúbulos de determinadas estructuras subcelulares especializadas tales como cilia, flagelos, axones, dendritas y centrosomas [144, 131]. Kreis y colaboradores, mediante ensayos de microinyección de tubulina marcada encontraron que los

microtúbulos tirosinados son estructuras muy dinámicas mientras que los detirosinados son más estables, es decir de recambio lento [145]. Estudios posteriores confirmaron esta observación y mostraron además que la estabilidad de los microtúbulos no es una causa de detirosinación sino mas bien una consecuencia [146, 147]. Numerosos trabajos se han llevado a cabo a fin de determinar si las especies tirosinadas y detirosinadas tienen propiedades diferenciales, ya sea a nivel bioquímico ó celular. Las determinaciones *in vitro* como *in vivo* de parámetros cinéticos de polimerización de las tubulina no mostraron diferencias significativas entre una y otra iso especie. Tampoco se encontró una asociación preferencial de las MAPs a microtúbulos formados con una u otra iso especie. Sin embargo trabajos recientes realizados en células en cultivo mostraron que los microtúbulos detirosinados interaccionan con la red de filamentos intermedios de vinmentina [148, 149] y que dicha interacción es dependiente de kinesina, proteína motora responsable de transporte anterógrado de vesículas [150]. Otro posible rol funcional asignado a los microtúbulos detirosinados proviene de correlaciones temporo-espaciales de formación de microtúbulos detirosinados con el reensamble del aparato de Golgi luego de la disrupción de la red de microtúbulos con drogas [151]. Estos resultados sugieren que podría existir una interacción selectiva entre el aparato de Golgi y los microtúbulos detirosinados.

Si bien se han realizado varios intentos, la tubulina carboxipeptidasa aun no ha sido purificada a homogeneidad. Por tal motivo, hasta el presente no se ha podido generar un anticuerpo contra la enzima ni conocer tampoco la secuencia del gen(es) que la codifican. Sin embargo se ha determinado la actividad de la TCPasa en distintos sistemas: líneas celulares, células primarias, oocitos, eritrocitos tejidos muscular y nerviosos [152, 153, 154, 155, 156, 157]. La enzima ha manifestado tener asociación con los microtúbulos tanto *in vitro* [132] como en *in vivo* [152]. Estudios llevados a cabo con la TCPasa de cerebro de rata indicaron que dicha asociación esta modulada por mecanismos dependientes de fosforilacion [152]. La actividad de la TCPasa al igual que de la TTL son reguladas durante desarrollo en músculo esquelético de rata y en retina y cerebro de pollo. Ambas actividades enzimáticas se hallan presentes en altos niveles en estadíos tempranos del desarrollo de estos tejidos y alcanzan niveles basales en estadíos adultos [155, 156]. La máxima actividad se observa en los períodos de diferenciación celular.

Tubulina tirosina ligasa: propiedades

Con respecto a la TTL se han obtenido importantes resultados desde la detección de su actividad en preparaciones solubles de cerebro de rata [120, 158,122]. Debido a que esta enzima se logró purificar a homogeneidad [159], en 1993 Ersfeld y colaboradores, secuenciaron la proteína bovina y mediante oligonucleótidos lograron clonar el ADNc de la TTL de cerebro embrionario porcino [160]. El clonado de la misma dejó abierta la posibilidad de poder manipular su expresión con el propósito de indagar su rol fisiológico celular. Se ha determinado la actividad de esta enzima en una amplia variedad de especies, desde protozoos hasta eucariotas superiores lo que sugiere que la enzima posee una función conservada e importante a lo largo de la evolución [161]. Numerosos trabajos han demostrado que la enzima no solo es capaz de adicionar tirosina ($K_m=0,02$ mM) al extremo terminal de la α -tubulina sino también, aunque con menor afinidad, fenilalanina ($K_m=1,2$ mM) y 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ($K_m=0,16-1,2$) [162]. Un reciente trabajo ha mostrado que el derivado de tirosina, 3-nitro-tirosina, también puede ser incorporado sobre la α -tubulina en células en cultivo e inducir alteraciones severas en la integridad del citoesqueleto [163]. Aunque este derivado de la tirosina, originado por la vía de producción del radical $\cdot NO$, se halla presente en concentraciones 1-120 μM en distintas órganos afectados por patologías humanas [164], aun no se han mostrado evidencias directas en relación a la presencia tubulina nitro-tirosinada en dichos tejidos.

En cuanto a la caracterización molecular de la TTL, se ha determinado, que se trata de una proteína monomérica con un peso molecular aproximado de 40 kDa y que forma un complejo equimolecular con la tubulina [165, 166]. Dicho peso molecular fue confirmado experimentalmente por la traducción de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la TTL la cual mostró que se trata de una proteína con 379 aminoácidos cuyo peso molecular teórico es 43,3 kDa [160]. Ensayos de proteólisis controlada y mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra distintas regiones de la proteína se ha demostrado que en la porción N-terminal (30 kDa) de dicha enzima se encuentran los sitios de unión a ATP y a la subunidad β -tubulina, mientras que el dominio C-terminal (14 kDa) contiene el sitio catalítico [167]. Teniendo en cuenta que la actividad de la TTL se lleva a cabo sobre tubulina no ensamblada, se especula que el sitio de la β -

tubulina que interacciona con la TTL no se encuentra accesible en los microtúbulos [167].

TTL y ciclo celular

Se ha observado que la actividad de la TTL está regulada no solo a lo largo del desarrollo de tejidos tales como hígado, músculo, cerebro y retina, sino también a lo largo de las distintas fases del ciclo celular [168]. Así, en el cultivo sincronizado de la línea celular CHO se ha observado que la TTL muestra un máximo de actividad durante la fase de síntesis del ADN, tres veces superior a la observada en G1, y alcanza un mínimo durante la fase G2 y mitosis [168]. En este y otros trabajos se ha especulado con la posibilidad de que la TTL participe de alguna forma en el ciclo de división celular o en la regulación de mecanismos de proliferación [169]. Al respecto, y durante el desarrollo de este trabajo de tesis, se ha publicado un trabajo en el cual se postula a la TTL como una proteína supresora de tumores [170] En el, los autores muestran que la expresión de la TTL es fuertemente inhibida en células tumorales. Este comportamiento es semejante al que manifiestan las proteínas supresoras de tumores las cuales, controlan la actividad de los genes encargados de estimular la proliferación celular (proto-oncogenes) [171, 172]. La posibilidad de que la TTL participe en el proceso de división celular fue estudiada en el presente trabajo de tesis mediante la expresión en células en cultivo de un ARN antisentido, del gen de la TTL. Nuestros resultados no están en desacuerdo con lo observado por los autores de dicho trabajo aunque numerosos ensayos restan por realizarse para corroborar si existe una relación directa entre la actividad de la TTL y la formación de tumores. Sería de gran importancia para determinar la función de la TTL en la supresión de tumores, la obtención de un animal “knock out” para el gen de la TTL como así también realizar una expresión forzada de la misma en un sistema tumoral.

OBJETIVOS

El presente estudio tuvo como objetivo general estudiar algunos aspectos moleculares y funcionales de la TTL de rata. Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- a) Llevar a cabo el clonado de la TTL de rata
- b) Estudiar la regulación de su expresión a lo largo del desarrollo del músculo esquelético de rata
- c) Realizar estudios tendientes a conocer el rol funcional de esta enzima

RESULTADOS

CAPITULO I

EXPRESION DE LA TUBULINA TIROSINA LIGASA EN MUSCULO ESQUELTICO DE RATA

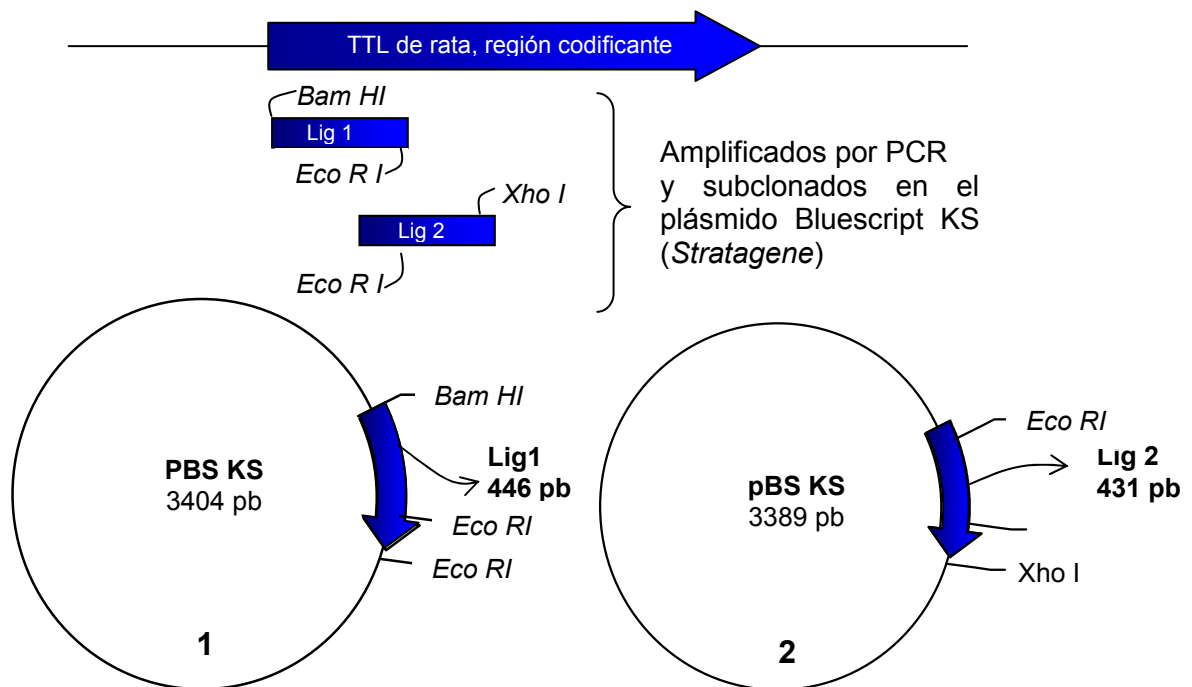
Introducción

Resultados previos de este laboratorio mostraron que la actividad de la TTL del músculo esquelético de rata disminuye notablemente con el desarrollo del animal. Con el propósito de estudiar esta disminución de la actividad y de investigar a que nivel se encuentra dicha disminución, nos propusimos desarrollar un anticuerpo anti-TTL y sondas de ARN que nos permitieran determinar los niveles de proteína y ARNm en este tejido, respectivamente. Los resultados siguientes muestran los patrones de biosíntesis de la TTL así como de hibridaciones *in situ* para su ARNm en función del desarrollo del músculo esquelético de rata. También se muestran los pasos realizados para la producción y caracterización del anticuerpo anti-TTL.

Subclonado de los fragmentos Lig 1 y Lig 2 del ADNc de la TTL de rata

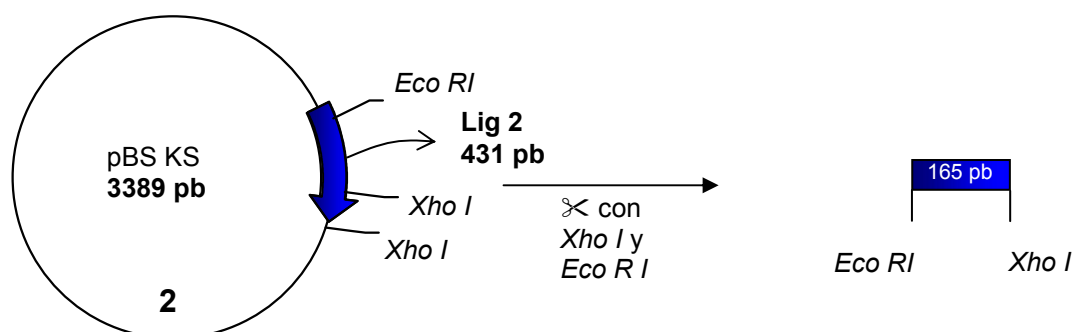
Con el propósito de generar un anticuerpo contra la TTL de rata se decidió sobreexpresar en *E. Coli*, el polipéptido que codifican la fusión de los fragmentos de ADNc Lig 1 y Lig 2. La expresión de estos ADNc en bacterias, permite una gran producción proteica de dicho polipéptido. Este polipéptido fue finalmente inyectado en conejos para generar respuesta inmunitaria contra una porción de la proteína TTL. Los ADNc Lig1 y Lig2 fueron amplificados, por el Dr. Carlos Arregui, a partir de ADNc de cerebro de rata mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la PCR se utilizó oligonucleótidos homólogos a la secuencia de ADNc porcina [160] y se subclonó cada una de las secuencias Lig1 y Lig2 en el plásmido pBluescrip KS, (ver esquema I). Para llevar a cabo entonces, la sobreexpresión en bacterias, estos fragmentos fueron ligados apropiadamente entre si para obtener mayor cantidad de aminoácidos correspondientes a la secuencia de la TTL y formar así el fragmento Lig1-Lig2. Finalmente el fragmento Lig1-Lig2 fue subclonado dentro de en un vector de expresión procariota.

Esquema I

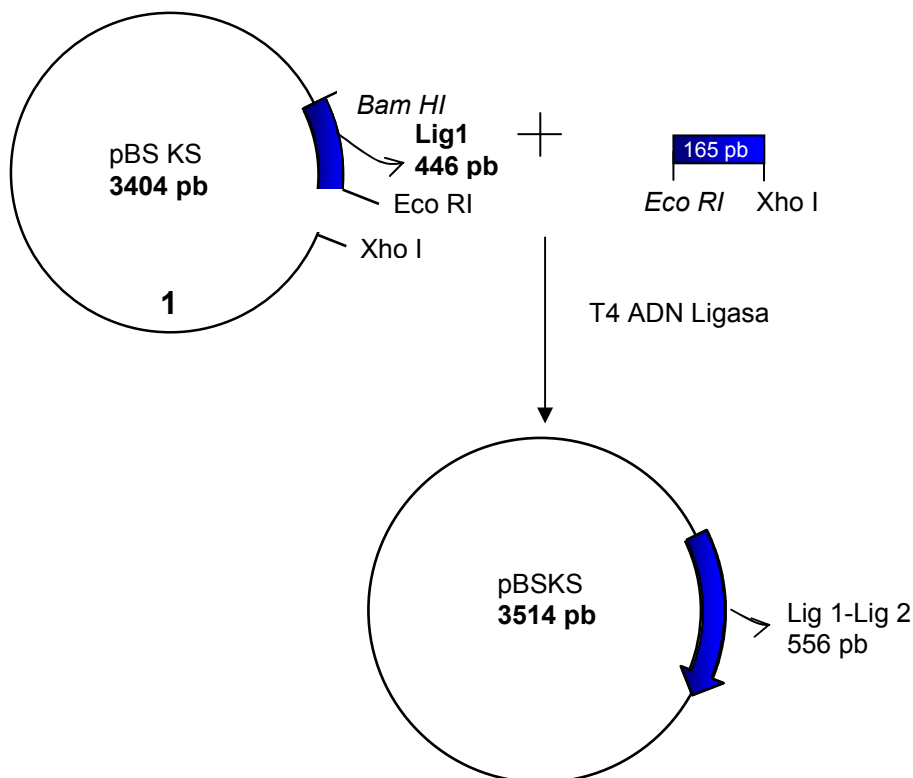


El fragmento Lig1-Lig2 de 556 nucleótidos fue obtenido realizando primero la digestión del vector pBS KS con el fragmento Lig2 con las enzimas *Xho I* y *Eco R I* (ver esquema II):

Esquema II

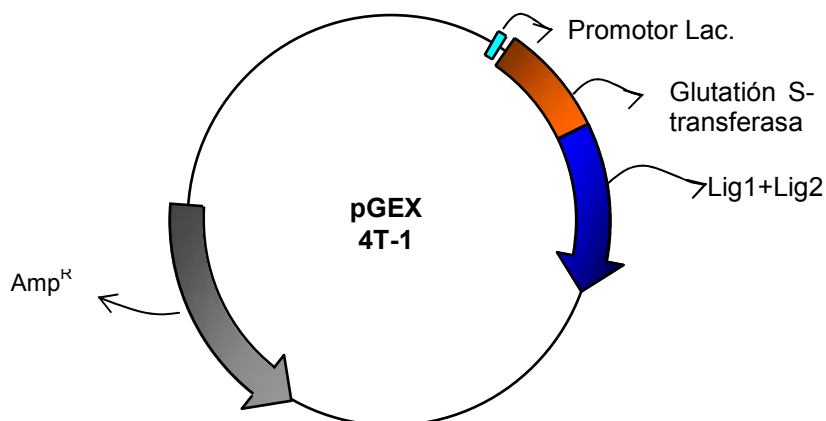


El producto de esta digestión liberó el fragmento de 165 pb el cual se ligó al plásmido que posee subclonado el fragmento Lig1. Este último plásmido fue previamente digerido con las mismas enzimas: *Eco R I* y *Xho I* (Esquema III).

Esquema III

El producto de ligado (Lig1-Lig2), el cual codifica para los primeros 185 aminoácidos de la TTL, fue escindido del vector pBS KS mediante la digestión con la enzima Bam HI y Xho I y subclonado dentro del marco de lectura correcto en el vector de expresión procarionta pGEX 4T-1 (*Pharmacia*). La correcta inserción fue verificada mediante secuenciamiento de la región de clonado. El vector pGEX 4T-1 posee subclonado, "upstream" del sitio de clonado, el gen de la enzima Glutación S-transferasa (GST). Esta enzima se expresa fusionada a los insertos subclonados en este vector, con el propósito de facilitar la purificación del polipeptido de interés, en nuestro caso el fragmento proteico parcial (Lig1-Lig2) de la TTL (esquema IV). El vector posee además un promotor inducible (promotor del operon Lac) el cual dirige la síntesis del polipéptido recombinante GST-Lig1-Lig2. Este promotor responde al agregado del inductor artificial IPTG (Isopropil tiogalactosido).

Esquema IV



Sobreexpresión del polipéptido recombinante TTL-glutación S-transferasa en la cepa de *E. Coli* DH5 α

El fragmento parcial de ADNc de la TTL (Lig1-Lig2), subclonado en el vector pGEX 4T-1, fue introducido en la cepa de *E. Coli* DH5 α e inducida su expresión mediante el agregado de IPTG al medio de cultivo. Luego de transcurrido el tiempo de inducción, las bacterias fueron cosechadas. La presencia de la proteína de fusión en un extracto proteico en estas bacterias, fue determinada mediante electroforesis en SDS-PAGE. Análisis preliminares indicaron que la proteína de fusión no se encontraba en la fracción soluble del extracto lo que indicó que la proteína de fusión se comporta en *E. Coli* en los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados de ARN y material proteico que contienen la mayor cantidad de la proteína expresada [173].

La figura 5 muestra el producto de la expresión analizado mediante SDS-PAGE. El carril 1 muestra el perfil proteico del extracto bacteriano total cuando la cepa es inducida durante 5 horas con IPTG. La proteína de fusión, señalada con una flecha negra (TTL-Glutación S-transferasa), migró de acuerdo al peso molecular esperado (47 kDa). Al tratar el extracto proteico inducido con TX-100 al 0.5%, el polipéptido recombinante no se solubilizó y permaneció en la fracción particulada (Fig. 1, carril 3, estrella roja). La fracción soluble de la preparación anterior fue sembrada en el carril 2. La misma cepa bacteriana, transformada con el plásmido sin el fragmento de la TTL, expresa la enzima Glutación S-Transferasa (27 kDa) de manera soluble (carril 6,

asterisco verde), ya que en la fracción particulada no se observa (carril 7). El carril 5 contiene el extracto proteico total de esta cepa.

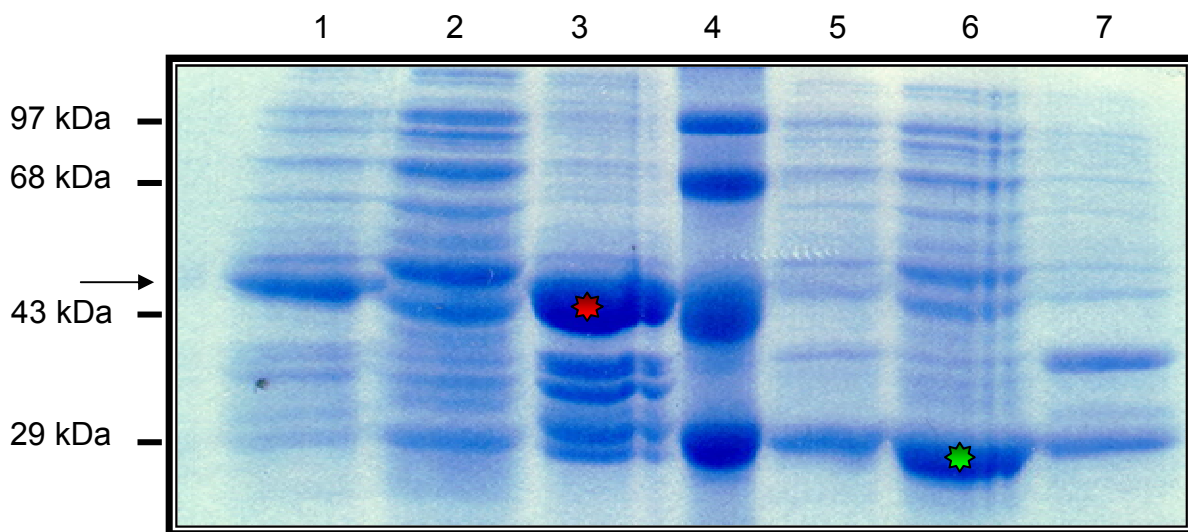


Fig. 1. Análisis de la sobreexpresión en DH5 α de 556 pb del ADNc de la ligasa fusionados a la enzima Glutación transferasa (GST) en el plásmido pGEX 4T-1. Carril 1,2 y 3: extractos proteicos de la cepa transformada con el plásmido con la GTS-Lig1-Lig2. Carril 1: extracto total; carril 2: fracción soluble del extracto tratado con Tx-100 0,5% (v/v); carril 3: fracción particulada del extracto tratado con Tx-100 0,5% (v/v). Carril 4: Marcadores de peso molecular. Carril 5, 6 y 7: extractos proteicos de la cepa transformada con el plásmido sin ligasa. Carril 5: extracto total; carril 6: fracción soluble del extracto tratado con Tx-100 0,5% (v/v); carril 7: fracción particulada del extracto tratado con Tx-100 0,5% (v/v).

Experimentos realizados con concentraciones más elevadas de TX-100 no lograron solubilizar la proteína de fusión. Este es un comportamiento característico de los cuerpos de inclusión. Dado que nuestro propósito era obtener una cantidad importante del polipéptido parcial de la TTL, libre de proteínas de la bacteria y de ser posible, libre de la secuencia de la Glutación S-transferasa, se intentó solubilizar estos agregados con agentes disgregantes tales como: fuerza iónica, tratamientos con DNAsa I, RNAsa H I y concentraciones muy bajas del detergente SDS. Estos ensayos fueron diseñados con el propósito de no perturbar el sitio de reconocimiento de la GST a su sustrato, el glutación reducido, el cual sería utilizado para purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad. Los intentos practicados no lograron conciliar la solubilidad de la proteína recombinante con la alteración del sitio de reconocimiento de la GST a su sustrato. Por esto, se decidió como paso alternativo aislar del gel de poli(acrilamida), la banda correspondiente al polipéptido TTL-GST y electroeluir la

proteína recombinante del gel mediante un equipo de Bio-rad diseñado para tal fin. La concentración del material electroeluido fue estimado mediante electroforesis analítica en geles de poliacrilamida donde se comparó la intensidad de la banda de la proteína de fusión con marcadores de peso moleculares de masa conocida.

Caracterización del anticuerpo policlonal anti-TTL

El suero de los conejos inmunizados fue colectado a los 40, 47 y 54 días posteriores a la primera inmunización. La presencia del anticuerpo anti-TTL se determinó mediante “inmunoblot”, utilizando como fuente de TTL un extracto citosólico de cerebro de rata y una preparación de la enzima parcialmente purificada (ver Materiales y Métodos). En la figura 2, carril 1, se muestra la inmunotinción que revela el suero frente a un extracto citosólico de cerebro de rata. Se puede observar una banda de peso molecular de 43 kDa, que coincide con el peso molecular descrito para la TTL porcina [160]. Cuando se empleó un preparado enriquecido en TTL, la inmunoreactividad de la banda señalada aumentó significativamente (carril 2). Dicha banda no se detectó en ensayos realizados con el suero pre-inmune (carril 3). Estos resultados indican que el suero anti-TTL generado a partir de la TTL recombinante, es capaz de reconocer a la TTL sintetizada *in vivo*. Cabe aclarar que los sueros colectados a los diferentes días dieron todos una inmunoreactividad semejante frente a la proteína TTL.

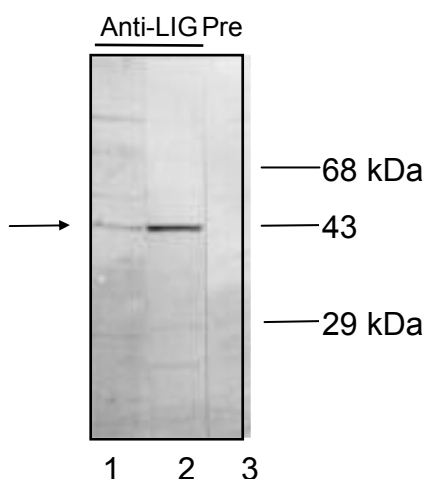


Fig. 2: Caracterización por “inmunoblot” del anticuerpo anti-ligasa. Proteínas (10 μ g) de extractos citosólicos de cerebro de rata fueron separados mediante SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa. Los filtros fueron incubados con un suero inmune contra la proteína recombinante (TTL-GST). Los inmunocomplejos fueron detectados con un anticuerpo de cabra anti-IGg de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, seguido de la incubación con los sustratos NBT/BCIP. Carril 1, proteínas citosólicas de cerebro de rata; carril 2, ligasa parcialmente purificada; carril 3, proteínas citosólicas incubadas con el suero preinmune. La flecha indica la posición de la TTL.

Determinación de los niveles de TTL en músculo esquelético de rata mediante "Inmunoblot"

En estudios previos de nuestro laboratorio se encontró que los niveles de la actividad de la TTL en músculo esquelético de rata disminuyen durante el desarrollo del animal [155]. Utilizando el anticuerpo anti-TTL realizamos estudios a fin de determinar si esta disminución de la actividad se debía a una disminución de los niveles de proteína TTL o a una inactivación de la enzima. Para tal fin se obtuvieron extractos citosólicos de músculo de la pata trasera de ratas de distintas edades. Estas preparaciones se sometieron a electroforesis y se determinó la TTL mediante inmunodetección utilizando el suero anti-TTL. Los niveles de proteína TTL en diferentes estadios del desarrollo del animal fueron determinados mediante "inmunoblot", revelados con proteína A- ^{125}I seguido de autoradiografía y análisis densitométricos. En las fracciones citosólicas de músculo de animales de 1 día post-natal, se observó la mayor cantidad de TTL detectada por el anticuerpo (Fig. 3A). En

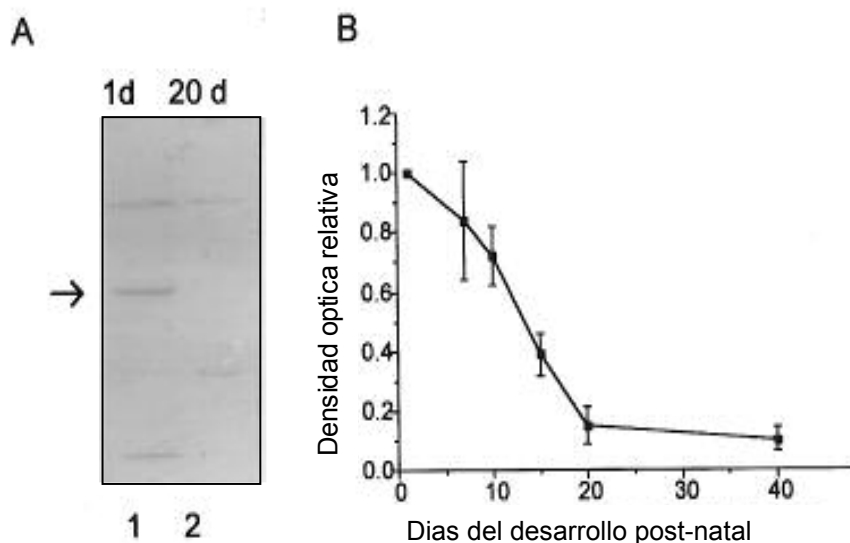


Fig. 3: Determinación de los niveles de proteína ligasa en extractos citosólicos musculares usando el anticuerpo anti-ligasa. Panel A: "inmunoblot" visualizado por el sistema de detección de la fosfatasa alcalina. Carril 1, proteínas de rata de un día; Carril 2, proteínas de rata de 20 días. La flecha indica la posición de la ligasa. Panel B: cantidades relativas de proteína ligasa a diferentes edades post-natal. La ordenada representa valores densitométricos \pm SD de tres experimentos diferentes que fueron revelados con proteína A- ^{125}I seguido de autoradiografía.

contraste, la cantidad de TTL disminuye gradualmente con el desarrollo del animal, alcanzando a los 20 días post-natal una cantidad aproximadamente 10 veces menor a

aquella observada al día 1. Entre los 20 y 40 días la cantidad de TTL se mantiene prácticamente constante (Fig. 3B).

Estos resultados muestran una muy buena correlación con los perfiles de actividad de la TTL medidos en preparaciones citosólicas de músculo esquelético de rata [155], indicando que los niveles de la proteína serían responsables de dicha actividad.

Análisis mediante hibridización "in situ" del ARNm de la TTL en músculo esquelético de rata

Para determinar si la disminución de los niveles de la proteína TTL en músculo esquelético de rata va acompañada en un cambio en la expresión de su ARNm de la TTL se analizó mediante hibridización *in situ* el nivel del ARNm correspondiente en músculo esquelético de rata. Con este objetivo se sintetizaron ribosondas anti-TTL de aproximadamente 400 bases marcadas con UTP-digoxigenina (ribonucleótido de UTP modificado unido al esteroide de digoxigenina, *Bhoeringer-Manheim*) que se usaron para detectar la expresión y localización del ARNm de la TTL en criosecciones de músculo de animales de distintas edades.

El análisis a baja magnificación de miembros traseros de embriones de rata de 19 días de gestación (Fig. 4, panel A) mostró una intensa señal de hibridización en los diferentes paquetes musculares (Fig. 4 panel A, ⇔) y una débil marca en el tejido conectivo (Fig. 4, panel A, ◻). En las fibras musculares de ratas de un día, la señal de hibridización fue intensa (Fig. 4, panel C), semejante a la marca obtenida en las fibras de los embriones. En fibras musculares de rata de 30 días, la intensidad de hibridización fue notablemente inferior (Fig. 4, panel D) . Nótese la distribución uniforme del ARNm y la fuerte intensidad de hibridización en la fibras de ratas de un día post-natal comparada con la marca periférica observada en las fibras de ratas de 30 días.

Los experimentos controles realizados con la sonda sentido en embriones de rata de 19 días, prácticamente no mostraron hibridización (Fig. 4, panel B). Con propósitos comparativos se realizaron hibridizaciones *in situ* con ribosondas contra el ARNm de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa para los dos estadios posnatales mencionados más arriba (Fig 4, panel E). Se observó que la intensidad de la señal de hibridización para el mensajero de la gliceraldehido 3-fosfato

deshidrogenasa fue elevada a lo largo de la fibra en ratas de 30 días. Estas observaciones indicarían que el ARNm de la TTL disminuye específicamente.

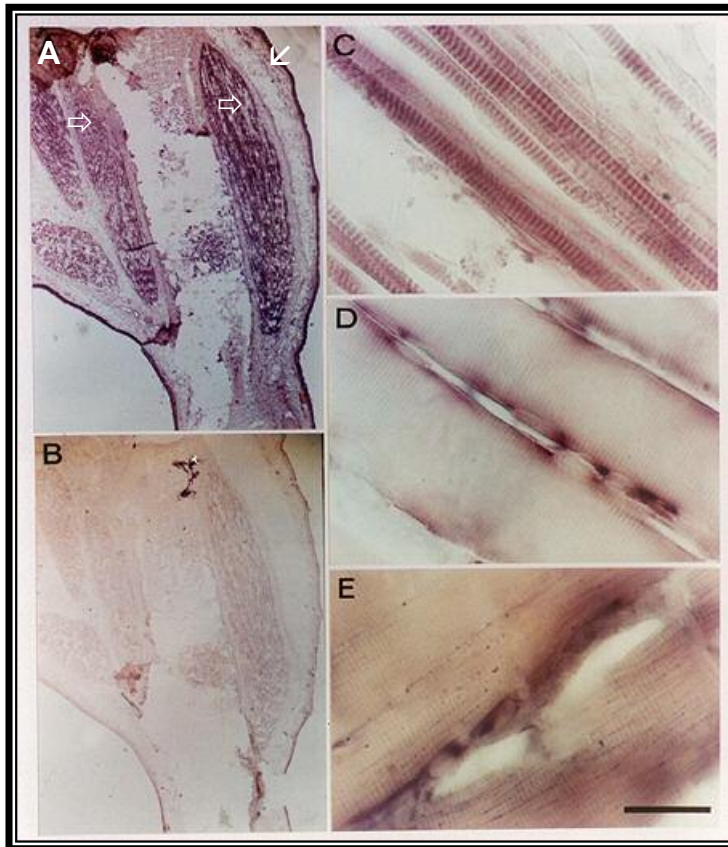


Fig. 4: Expresión del ARNm de la ligasa en músculo de rata. Hibridización *in situ* en criosecciones de extremidades traseras de ratas de distintas edades.

Embrión de 19 días (A, con sonda antisentido y B, con sonda sentido).

rata de 1 día post-natal (C).

rata de 30 días post-natal (D).

Hibridización con una sonda para el ARNm de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en la fibras musculares de rata de 30 días (E).

La longitud de la barra equivale a 2 mm en A y B y 35 μm en C, D y E.

Hibridización In Situ para el ARNm de la TTL en cultivos primarios de músculo esquelético de rata

Con el fin de examinar si los cambios en la expresión de la TTL ocurren en las células precursoras de las fibras musculares (mioblastos) independientemente de la influencia sistémica o de factores ambientales, se realizaron cultivos primarios de mioblastos a partir de tejido de rata neonatal. En cultivos de mioblastos de dos y tres días se observó abundantes mioblastos con una fuerte hibridización (Fig. 5A). Puede observarse una fuerte tinción en mioblastos (▶) y una débil marca de hibridización sobre los fibroblastos (➡). Luego de tres días en cultivo, la fusión de los mioblastos se hizo claramente evidente y al séptimo día se observan largos miotubos multinucleados los cuales mantuvieron altos niveles de hibridización para el mensajero de la enzima (Fig. 5B y 5C).

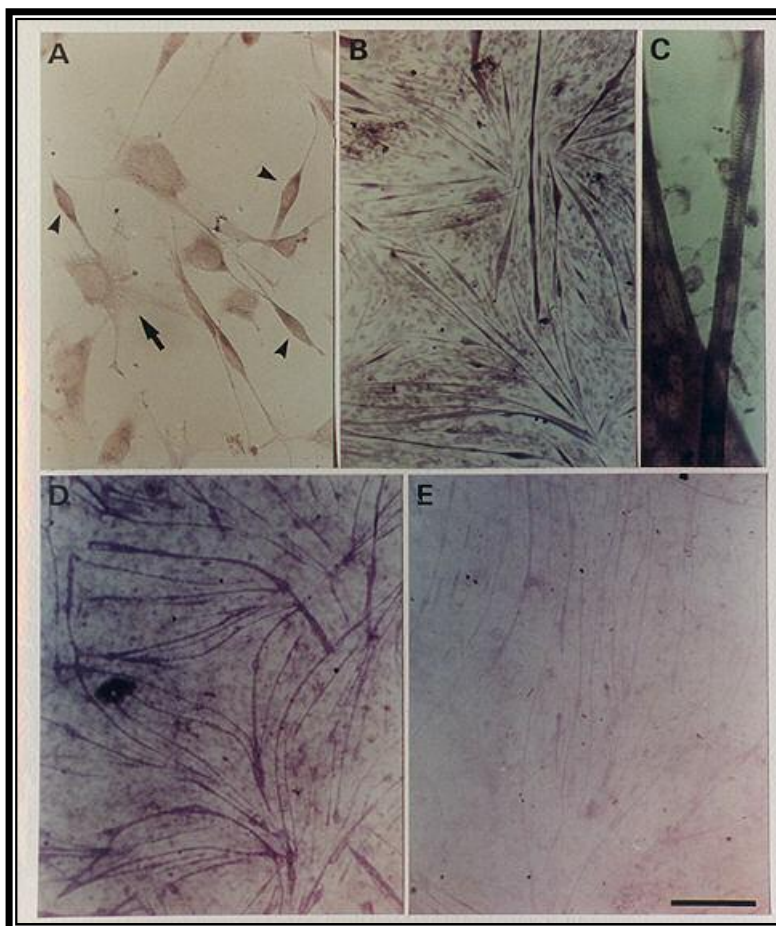


Fig. 5: Expresión del ARNm de la TTL determinada mediante hibridación *in situ* en mioblastos y miotubos a diferentes tiempos de cultivo. Se utilizaron como fuente de mioblastos, músculos de las extremidades traseras de rata recién nacidas.

A) Células cultivadas dos días *in vitro*.

B) Mioblastos y miotubos (7 días *in vitro*).

C) Mioblastos y miotubos (7 días *in vitro*) a mayor magnificación que B).

D) y E) Cultivo de miotubos (18 días *in vitro*).

E) hibridación con la sonda sentido.

La barra en A y C representa 60 μm , en B, D y E 650 μm .

Luego de 18 días de diferenciación *in vitro*, Se observó al microscopio óptico que los miotubos poseían patrones morfológicos estriados y frecuentes contracciones intermitentes, lo que indica un grado de maduración avanzado de los mismos. Estos

miotubos de gran longitud mostraron aun una significativa señal de hibridización para el ARNm de la TTL. El análisis de expresión de la TTL en miotubos en el estado de diferenciación de 18 días *in vitro*, no difiere de situaciones analizadas anteriormente. Vale decir, que los altos niveles de ARNm de la TTL encontrados tanto en mioblastos no fusionados como en miotubos con un avanzado grado de maduración, sugieren que no habría una relación entre los eventos de fusión y expresión de la TTL.

Análisis del grado de tirosinación de la tubulina en cultivos primarios y criocortes de músculo esquelético de rata mediante inmunohistoquímica

La disminución de la proteína TTL durante el desarrollo del músculo esquelético podría afectar el estado de tirosinación de la tubulina en la maduración de las fibras. Para examinar esta posibilidad se analizó mediante inmunofluorescencia el patrón de marcación de la tubulina tirosinada y detirosinada en secciones de músculo de rata de 1 y 30 días de edad. Se utilizaron los anticuerpos TUB-1A2 (anti-Tir) y anti-Glu los cuales reconocen específicamente tubulina tirosinada [145] y tubulina detirosinada [144], respectivamente. La inmunoreactividad del anticuerpo anti-Tir fue casi nula en fibras musculares de ratas de 1 y 30 días post-natal. La escasa marca observable estuvo restringida principalmente a células de morfología alargada subyacentes entre las fibras musculares (flecha delgada en Fig. 6 panel A y D) y en la conglomeración de células mesenquimales (flecha gruesa en A), no así las fibras musculares (asterisco en A). En músculo de animales maduros, este anticuerpo reconoce el tejido conectivo que rodea a la fibra muscular. El patrón de tinción con el anti-Glu fue complementario al del anticuerpo anti-Tir. La inmunofluorescencia anti-Glu fue intensa en la fibra muscular (cabeza de flecha en B).

Con el fin de observar si *in vitro* la tubulina tirosinada se expresa en mioblastos fusionados y no fusionados, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-Tir y anti-Glu en mioblastos de 4 días de cultivos *in vitro*, estadio donde se hallan presentes ambas estructuras morfológicas (mioblastos y miotubos). Las figuras 6G y 6H muestran la inmunofluorescencia anti-tubulina tirosinada y detirosinada respectivamente, con la correspondiente imagen de contraste de fase (Fig. 6I). Se pueden observar que los mioblastos y miotubos de formación temprana poseen una débil pero evidente marca con el anticuerpo anti-Tir (flecha y cabeza de

flecha en G, respectivamente). La tinción con anti-Glu fue muy débil en mioblastos aunque intensa sobre los miotubos (flecha negra en H).

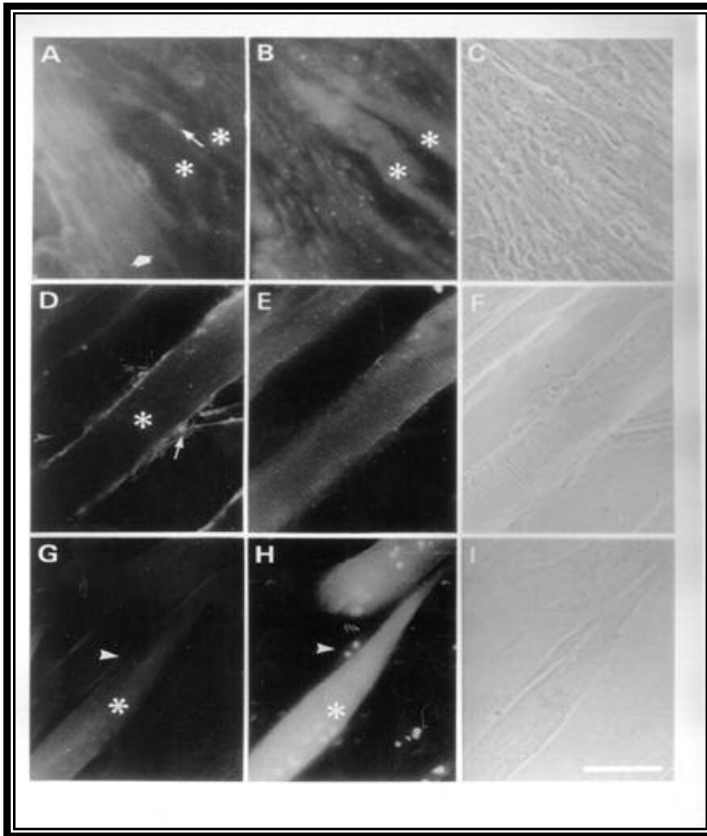


Fig. 6: Distribución de tubulina tirosinada y detirosinada en fibras musculares, *in situ* e *in vitro*.

Crio secciones de fibras musculares Ratas de 1 día (A-C) y 30 días (D-F).

Mioblastos en cultivo con 4 días *in vitro* (G-I).

(A), (D) y (G) tubulina tirosinada inmunoteñida con anticuerpo monoclonal anti-tir TUB-1A2; (B), (E) y (H) tubulina detirosinada inmunoteñida con anticuerpo policlonal de conejo anti-Glu.

(C), (F) e (I) Imágenes de contraste de fase a de las correspondientes inmunofluorescencias.

Para detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

Los resultados mostrados en este capítulo fueron motivo de la siguiente publicación:
“Tubulin Tyrosine Ligase: Protein and mRNA Expression in Developing Rat Skeletal Muscle” Carlos O. Arregui, Carlos R. Mas, Carlos E. Argaraña, Héctor S. Barra(1997). *Development Growth and Differentiation* **39** (2), 167-178.

CAPITULO II

CLONADO DEL ADN_c DE LA TTL DE RATA Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

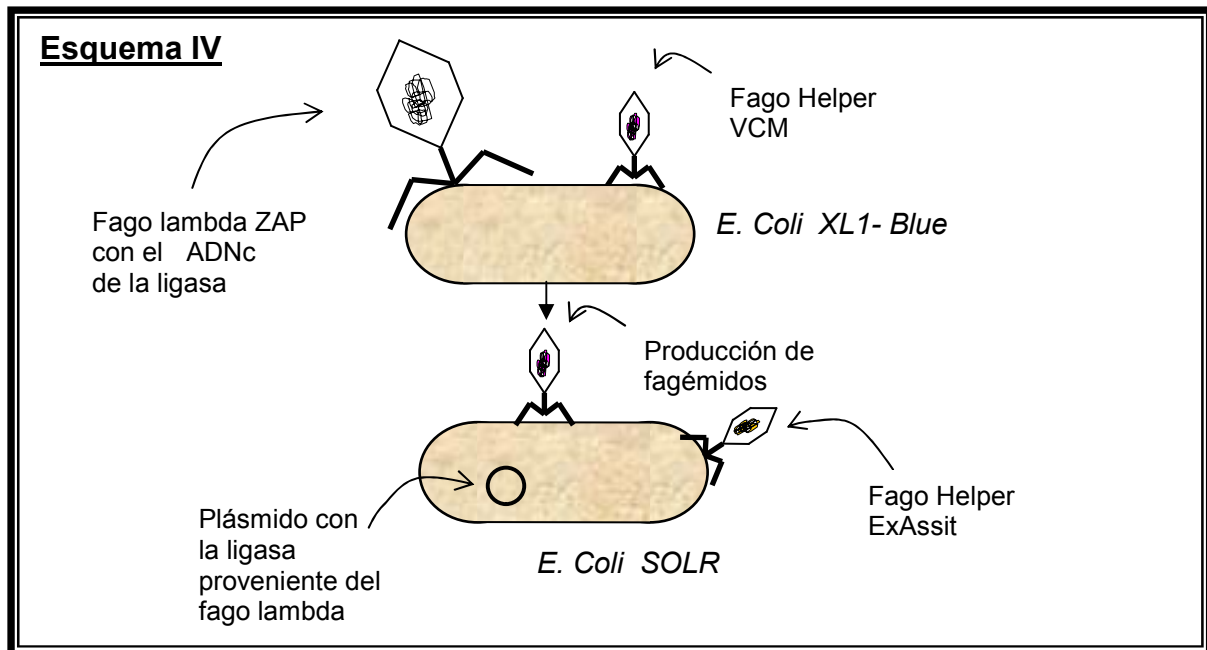
Introducción

Uno de los objetivos planteados para esta tesis fue el de obtener el ADNc de la TTL de rata a partir de una librería de expresión. Del conocimiento de la secuencia de nucleótidos de la TTL se puede inferir su secuencia de aminoácidos y con ello contribuir al conocimiento en lo que se refiere tanto a la estructura molecular del gen como así también a la relación que guarda con las secuencias de TT-ligasas presentes en los bancos de genes. En una etapa posterior esta secuencia fue utilizada en la modificación de la expresión de la TTL en cultivo de células.

Los resultados siguientes describen la estrategia utilizada en clonado del ADNc de esta enzima y la comparación de su secuencia de aminoácidos con la de otras TT-ligasas caracterizadas y otras de existencia hipotética de acuerdo a datos de comparación de secuencias.

Clonado y secuencia de nucleótidos del ADNc de la TTL de bulbo olfatorio de rata

La obtención del ADNc de la TTL se realizó rastreando una genoteca de bulbo olfatorio de rata construida en el vector viral λ ZAPII (*Stratagene*). Para ello se sintetizó una sonda de ADN con la secuencia correspondiente al fragmento de ADNc Lig1 mediante marcación al azar con oligonucleótidos, nucleótidos fríos y α -ATP- ^{32}P [200,201]. En una primera búsqueda, sobre 300.000 clones analizados, se obtuvieron cuatro clones positivos luego de rastreos secundarios y terciarios, de los cuales tres resultaron ser falsos positivos. Finalmente tres clones positivos aislados del rastreo terciario se utilizaron para obtener fagémidos, fagos filamentosos secretados fuera de la bacteria, obtenidos coinfectando la cepa XL1-Blue con el fago λ aislado de la librería y un fago “helper” filamentosos denominado ExAssist (esquema IV).



La combinación de estos fagos, Lambda ZAP y Fago Helper VCM, con la bacteria XL1-Blue genera fagémidos que llevan en su genoma de simple hebra el inserto clonado proveniente del fago lambda. Cuando estos fagémidos son incubados con la cepa de *E. coli* SOLR, la infectan y su genoma es convertido a doble hebra dentro de ella. Dicho material posee características de material genético de un bacteriófago filamentoso como así también de plásmido el cual puede ser propagado, manipulado y amplificado por métodos convencionales descritos en la literatura.

Se aislaron 4 colonias de la cepa SOLR y se realizaron minipreparaciones de su ADN plasmídico para conocer el tamaño del fragmento clonado por medio de análisis de restricción. El ADN aislado se sometió a digestión con la enzima BamH I, la cual produce un solo corte dentro del vector. Los fragmentos liberados fueron analizados en geles de agarosa al 0,7 % (p/v). La migración de los mismos se comparó con fragmentos del marcador de pesos moleculares (ADN del fago lambda digerido con la enzima *Hind III*) y con el vector linearizado sin inserto. La tinción del gel reveló solamente una sola banda a la altura de aproximadamente 7,5 Kb en los cuatro ADNs de las distintas colonias analizadas, lo que equivale aproximadamente a 4,5 Kb de inserto ya que 2958 pb corresponden al vector (Fig. 7).

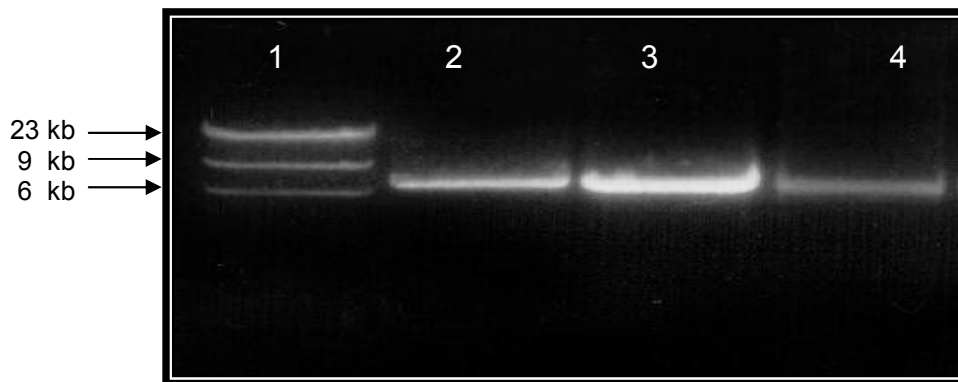


Fig. 7. Digestión con la enzima *Bam HI* de cuatro plásmidos distintos obtenidos de la cepas SOLR. Carril 1: Marcadores de peso moleculares (Vector λ digerido con Hind III), Carril 2, 3 y 4: plásmidos de los clones. El producto de la digestión dió solamente una banda de alrededor de 7,5 Kb.

Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la TTL de rata

El secuenciamiento del ADNc se llevó a cabo utilizando el Kit Sequenase versión 2.0 (*Pharmacia*) el cual está basado en el método descrito por Sanger *et. al.* [202]. Para avanzar en la lectura de la secuencia se diseñaron oligonucleótidos, sobre la base de la secuencia de la TTL, a medida que se obtenía información de la misma. La secuencia de bases de estos oligos está indicada por la longitud que abarcan las flechas situadas en la secuencia (Fig. 8). La orientación de las flechas indica la dirección de lectura sobre la secuencia (Fig. 8). La secuencia de nucleótidos obtenida fue procesada mediante el programa de computación DNAsis Versión 3.0 (*Hitachi Engineering Co.*). Este programa fue utilizado para encontrar los posibles marcos de lectura abiertos de la secuencia y para deducir la secuencia de aminoácidos. En el esquema V se muestra un diagrama de las distintas regiones del ADNc aislado. Del secuenciamiento se encontró que 1139 pb corresponden a la región traducida y codifican para 377 aminoácidos. De las regiones 5' y 3' no traducidas se secuenciaron 141 y 112 pb respectivamente.

Esquema V

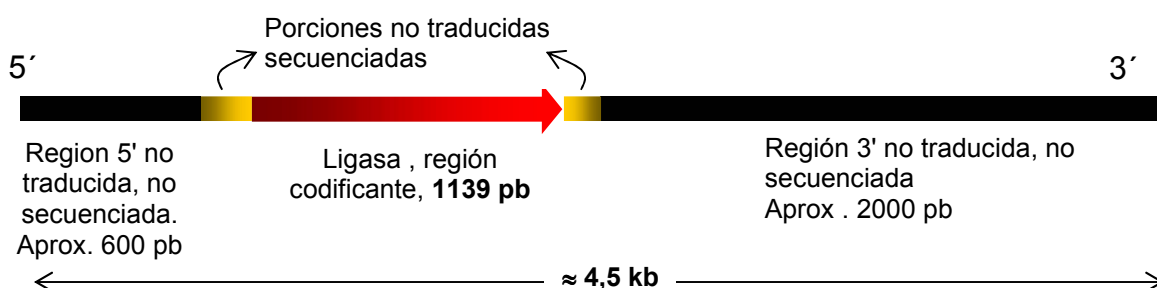







Fig. 8 Secuencia de nucleótidos del ADNc de la tubulina tirosina ligasa de rata y de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos

	0	
	CCCAGGGCAGACACTAGATAATCCGGAG	-30
	CGCGGCCCTGGAATTGGGCAGACAGCGGGACTGAGACTGAAGCTGGGGCAGTGAGCACGC	-82
	GGAGACCGCCGTCCTTGGACTACGGCTTGTGGCGGCTGCGGGGCGCGCTGCCCTTCGCC	-141
1	ATGTACACCTTCGTGGTGCGCCAGGAGAATAGCAGCGTCTACGCCGAGGTCTCCCGGCTG	60
1	M Y T F V V R Q E N S S V Y A E V S R L	20
61	CTGCTGGCCACCGCTACTGGAAGAGGCTGCGGCGGGACAACCCAGGTTCAACCTGATG	120
21	L L A T G Y W K R L R R D N P R F N L M	40
121	CTGGGCGGAAGGAACCGACTGCCTTTCGGGAGACTAGGACACGAACCTGGGCTGGCACAG	180
41	L G G R N R L P F G R L G H E P G L A Q	60
181	CTGGTGAACTACTACAGGGGGCCGACAACTGTGCCGCAAAGCTTCCTTAGTGAAGCTA	240
61	L V N Y Y R G A D K L C R K A S L V K L	80
241	GTCAAGACCAGTCCGGAAGTGTCTGAGTCTGCTCATGGTTCCTCCGAGTCTATGTGATT	300
81	V K T S P E L S E S C S W F P E S Y V I	100
301	CATCCAATAACCTCAAGACGCCAGTCGCTCCAGCGCAGAATGGCATCCAGCTTCCGGTC	360
101	H P T N L K T P V A P A Q N G I Q L P V	120
361	AGTAACTCCAGGACAGATGAGAGAGAATTTCTTGGCTTCTTATAACAGAAAGAAAGAG	420
121	S N S R T D E R E F F L A S Y N R K K E	140
421	GACGGGAAGGCAACGTTTGGATTGCAAAGTCATCAGCTGGTGCCAAAGGCGAAGGCATC	480
141	D G E G N V W I A K S S A G A K G E G I	160
481	CTCATCTCCTCAGAGGCGTCAGAGCTTCTGGATTTTATAGACAACCAGGGCCAAGTGCAC	540
161	L I S S E A S E L L D F I D N Q G Q V H	180
541	GTGATCCAGAAATACCTCGAGCACCTCTGCTCCTCGAGCCCGGTACCCGCAAGTTTGAC	600
181	V I Q K Y L E H P L L L E P G H R K F D	200
601	ATTCGAAGCTGGGTCCTGGTTGACCACCAGTATAACATCTACCTCTACAGAGAGGGTGTG	660
201	I R S W V L V D H Q Y N I Y L Y R E G V	220
661	CTTCGAAGCTGCTTCAGAACCATATCATGTTGATAACTTCCAAGATAAGACCTGCCATCTG	720
221	L R T A S E P Y H V D N F Q D K T C H L	240
721	ACCAATCACTGCATTCAGAAAGAGTACTCAAAGAACTATGGAAAATACGAAGAAGGGAAC	780
241	T N H C I Q K E Y S K N Y G K Y E E G N	260
781	GAAATGTTCTTCGAAGAGTTCAATCAGTACCTAACAAGCGCTCTGAACATTACCTAGAA	840
261	E M F F E E F N Q Y L T S A L N I T L E	280
841	AATAGCATCTTGCTGCAAATCAAACACATAATAAGGAGCTGCCTCATGAGCGTGGAGCCC	900
281	N S I L L Q I K H I I R S C L M S V E P	300
901	GCCATCAGCACCAAGCACCTCCCTTACCAGAGCTTCCAGCTCCTGGCTTTGACTTCATG	960
301	A I S T K H L P Y Q S F Q L L G F D F M	320
961	GTGGATGAGGAGCTGAAAGTCTGGCTCATTGAGGTCAACGGTGCCCTGCGTGTGCCAG	1020
321	V D E E L K V W L I E V N G A P A C A Q	340
1021	AAGCTCTATGCAGAACTGTGTGAGGGCATCGTGGACATAGCCATATCCAGCGTCTTCCCA	1080
341	K L Y A E L C Q G I V D I A I S S V F P	360
1081	CCCCAGACACGGAGCAGGTGCCGAGCAGCCGGCTGCTTTCATGAAGCTGTGAAGGACT	1140
361	P P D T E Q V P Q Q P A A F M K L *	347
1141	GGAAGGCAGAGCCACCTTGGGAAATGTATGGGGTCTGCTCCAGAGGAACGTGAGATGG	1200
1201	CTGGACTGCTCCTGACCAAGGCATCTGGGGAACAGATGTCAGGAA	1246

Fig. 8. En la secuencia de aminoácidos de la TTL se ha resaltado con colores algunas regiones. Estas pertenecen a posibles sitios de modificación post-traduccion sobre la proteína. Estos sitios fueron encontrados analizando la secuencia de aminoácidos mediante un banco de motivos estructurales <http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>. Se hallaron diez sitios potenciales de modificaciones post-traduccion para cinco modificaciones distintas. Estas son:

N-glicosilaciones	
Sitio de fosforilación por Quinasas dependientes de cAMP y cGMP.....	
N-miristoilación	
Sitio de fosforilación por Quinasa C:	
Sitio de fosforilación por Caseína quinasa II	

Análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos y de la TTL, comparación con otras secuencias

La secuencia de aminoácidos de la TTL de rata fue analizada también mediante el programa Multiple Sequence Alignment V 1.0.1.1 (*Copyright © 1998, InforMax, Inc.*) el cual arrojó datos referentes a la proteína según se muestra en la

Tabla I

Análisis	Proteína
Longitud	377 aa
Peso Molecular	43114,85 gr/mol
1 µg =	23,194 pMoles
Coefficiente de Extinción Molar	52330
1 A _[280]	0,82 mg/ml
Punto Isoeléctrico	6,30
Carga a pH 7	-3,29

El análisis de homología de la secuencia de nucleótidos de la TTL de rata con las secuencias presentes en los Bancos GenBank y EMBL, fue obtenido mediante el programa búsqueda “**Blast**”(174), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Se observó que la única secuencia de nucleótidos que presentó un alto grado de homología con la TTL de rata fue el ADNc de la TTL de cerdo [160]. En la figura 9 se muestra solamente el resultado de la comparación de homología de la secuencia de los ADNc de la TTL de cerdo versus la de rata. Este alineamiento presentó un porcentaje de homología del 86%. Las demás secuencias de nucleótidos obtenidas por BLAST no reflejaron una homología considerable con la secuencia del ADNc de rata por lo cual no se presentan en el presente análisis.

Fig.9

Comparación del ADNc de la ligasa de rata con el de cerdo

```

Rata: 111 CGGCTTGTGGCGGCTGCGGGCGCGCTGCCCTTCGCCATGTACACCTTCGTGGTGCGCCA 170
      |||
Cerdo: 163 CGGCTGCAGGGGTGGCCCCGGCGCGCGGCCCTTCACCATGTACACCTTCGTGGTGCGCCA 222

Rata: 171 GGAGAATAGCAGCGTCTACGCCGAGGTCTCCCGGCTGCTGCTGGCCACCGGCTACTGGAA 230
      |||
Cerdo: 223 CGAGAACAGCAGCGTTTACGCCGAGGTCTCCCGGCTGCTGCTGCCACCGGCCACTGGAA 282

Rata: 231 GAGGCTGCGGGCGGACAACCCAGGTTCAACCTGATGCTGGGCGGAAGGAACCGACTGCC 290
      |||
Cerdo: 283 GAGGCTACGGCGGGACAATCCAGGTTCAACCTGATGCTGGGAGAAAGGAACCGGCTGCC 342

Rata: 291 TTTTCGGGAGACTAGGACACGAACCTGGGCTGGCACAGCTGGTGAACACTACTACAGGGGGGC 350
      |||
Cerdo: 343 CTTTCGGGAGACTGGGTACAGCCTGGATTGATGCAGTTGGTGAATTACTACCGGGGGCG 402

Rata: 351 CGACAAACTGTGCCGCAAAGCTTCCTTAGTGAAGCTAGTCAAGACCAGTCCGGAACCTGTC 410
      |||
Cerdo: 403 CGACAAACTGTGTCGCAAAGCTTCCTTAGTGAAGCTCATCAAGACCAGCCAGAACTGGC 462

Rata: 411 TGAGTCTGCTCATGGTTCGCCGAGTCTATGTGATTTCATCCAACTAACCTCAAGACGCC 470
      |||
Cerdo: 463 TGAGTCTGCACGTGGTTCGCCGAGTCTATGTGATTATCCAACTAACCTCAAGACCCC 522

Rata: 471 AGTCGCTCCAGCGCAGAATGGCATCCAGCTTCCGGTCAGTAACTCCAGGACAGATGAGAG 530
      |||
Cerdo: 523 AGTTGCTCCAGCTCAGAATGGAATCCACCCACCAATCCACAGCTCCAGGACAGATGAAAG 582

Rata: 531 AGAATTCTTCTGGCTTCTTATAACAGAAAGAAAGAGGACGGGGAAGGCAACGTTTGGAT 590
      |||
Cerdo: 583 AGAATTTTCTGACTTCTTACAACAAAAGAAAGAAGATGGAGAGGGCAATGTTTGGAT 642

Rata: 591 TGCAAAGTCATCAGCTGGTGCCAAAGGCGAAGGCATCCTCATCTCCTCAGAGGCGTCAGA 650
      |||
Cerdo: 643 TGCAAAGTCATCGGCTGGAGCCAAAGGTGAAGGCATCCTCATCTCCTCAGAGGCTACAGA 702

Rata: 651 GCTTCTGGATTTTATAGACAACCAGGGCCAAGTGCACGTGATCCAGAAATACCTCGAGCA 710
      |||
Cerdo: 703 GCTGCTGGATTCATAGACAACCAGGGCCAGGTGCACGTGATCCAGAAAGTACCTTGAGCG 762

Rata: 711 CCCTCTGCTCCTCGAGCCCGGTACCCGCAAGTTTGACATTGCAAGCTGGGTCTCGTTGA 770
      |||
Cerdo: 763 CCCTCTGCTGCTGGAGCCAGGCCATCGCAAGTTTGACATCAGAAGCTGGGTCTTGGTGA 822

Rata: 771 CCACCAGTATAACATCTACCTCTACAGAGAGGTGTGCTTCGAACTGCTTCAGAACCCATA 830
      |||
Cerdo: 823 TCATCAGTATAACATCTACCTCTACAGAGAAGGTGTGCTTCGGACTGCTTCAGAACCCGTA 882

Rata: 831 TCATGTTGATAACTTCCAAGATAAGACCTGCCATCTGACCAATCACTGCATTGAGAAAGA 890
      |||
Cerdo: 883 CCATACAGATAATTTCCAAGCAAAACCTGCCATTTGACCAATCACTGCATTGAGAAAGA 942

Rata: 891 GTACTIONAAGAACTATGGAAAATACGAAGAAGGGAACGAAATGTTCTTCGAAGAGTTCAA 950
      |||
Cerdo: 943 GTACTIONAAGAAATATGGAAAGTATGAAGAAGGGAATGAAATGTTCTTTGAGGAGTTCAA 1002

Rata: 951 TCAGTACCTACAAGCGCTCTGAACATTACCTAGAAAATAGCATCTTGCTGCAAAATCAA 1010
      |||
Cerdo: 1003 TCAGTACCTCACAAGTCTTTGAACATTACCTGGAAGTAGTATCTTACTACAAATCAA 1062

Rata: 1011 ACACATAATAAGGAGCTGCCTCATGAGCGTGGAGCCCGCCATCAGCACCAAGCACCTCCC 1070
      |||
Cerdo: 1063 ACATATAATAAGGAGCTGCCTCCTGAGCGTGGAGCCCGCCATCAGCACCCGGCACCTGCC 1122

Rata: 1071 TTACCAGAGCTTCCAGCTCCTTGGCTTTGACTTCATGGTGGATGAGGAGCTGAAAGTCTG 1130
      |||
Cerdo: 1123 TTACCAGAGCTTCCAGCTCCTCGGCTTCGACTTCATGGTGGATGAGGACCTGAAGGTGTG 1182

Rata: 1131 GCTCATTGAGGTCAACGGTGCCCTGCGTGTGCCAGAAAGCTCTATGCAGAACTGTGTCA 1190
      |||
Cerdo: 1183 GCTCATCGAAGTCAACGGCGCCCCGGCTTGTGCTCAGAAGCTCTACGCTGAGCTGTGTCA 1242

Rata: 1191 GGGCATCGTGGACATAGCCATATCCAGCGTCTTCCCACCCCGAGACACGGAGCAGGTGCC 1250
      |||
Cerdo: 1243 AGGCATCGTGGACATAGCCATAGCCAGTGTCTTCCCGCCCCGGATGCAGAGCAGCAGCA 1302

Rata: 1251 GCAGCAGCC 1259
      |||
Cerdo: 1303 GCAGCAGCC 1311
    
```

El análisis del grado de homología de la secuencia de aminoácidos de la TTL de rata con las secuencias de las TT-ligasas presente en los bancos de proteínas fue realizado utilizando nuevamente el programa "BLAST" (ver condiciones de búsqueda en Materiales y Métodos). Los resultados de esta búsqueda indicaron que la TTL de rata posee una alta homología con las TT-ligasas de cerdo, bovina, y de ratón publicadas por Ersfeld et. al. [160]. Se observó además una homología considerable (ver Tabla II más abajo) con secuencias de proteínas de existencia hipotética deducidas teóricamente mediante análisis computacional a partir de la secuencia de nucleótidos de ADN genómico o de ADNc. La búsqueda indicó homología con tres proteínas teóricas para la especie *Caenorhabditis elegans*, tres para *Homo sapiens* y una para *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. La Tabla II muestra los datos del porcentaje del grado de identidad (columna 3) y similitud química (aminoácidos conservados ya sea en igual numero de carga o hidrofobicidad o propiedades ácido base, etc), entre las secuencias de aminoácidos de las TT-ligasas de diversas especies en comparación con la de rata. En la columna 4 se indican la cantidad de aminoácidos de la/s ligasa/s de cada especie y entre paréntesis el origen de la secuencia.

Tabla II

No de acceso a bancos de genes o proteínas	Especie	Porcentaje de identidad-similitud qca.	Cantidad de aminoácidos en cada secuencia
(Sp) P38160	Cerdo (secuenciada)	92-96%	379 (deducida del ADNc)
(Sp) P38584	Bovino (secuenciada)	91-95%	377 (secuencia de la proteína)
(Sp) P38585	Ratón (secuenciada)	95-98%	63 (deducida del ADNc)
(Emb)CAA16151	Humana (I) (teórica)	28-47%	278 (deducida de ADN genómico)
(Dbj) BAA11490	Humana (II) KG-21 (teórica)	27-45%	1199 (deducida del ADNc)
(Emb) CAB39176.1	Humana (III) (teórica)	27-44%	423 (deducida de ADN genómico)
(Emb)CAB02862	C. elegans (I) (teórica)	26-45%	1203 (deducida de ADN genómico)
(Emb) CAA87778	C. elegans (III) (teórica)	26-50%	662 (deducida de ADN genómico)
(Emb) CAA87425	C. elegans (II) (teórica)	25-44%	640 (deducida de ADN genómico)
(Emb) CAA49508	S. cerevisiae (teórica)	24-41%	753 (deducida de ADN genómico)
(Sp) Q10438	S. pombe (teórica)	28-43%	403 (deducida de ADN genómico)

Un alineamiento múltiple de todas las secuencias, que poseen un grado considerable de homología con la TTL se muestra más abajo. El alineamiento de las TT-ligasas, realizado por el programa de computación "Multiple Sequence Alignment V 1.0.1.1 (Copyright © 1998, InforMax, Inc.)", se confeccionó considerando las porciones más homólogas entre todas las secuencias. Cabe señalar que ciertas secuencias no comienzan en el primer aminoácido de cada proteína. Las porciones restantes, terminales amino, no poseen homología en absoluto con el resto de las secuencias. Las condiciones del alineamiento se explican en Materiales y Métodos.

Alineamiento múltiple de las secuencias de TT-ligasas teóricas y caracterizadas

		1		50
ele1200	(596)	-----LTFK-----MMS-DSRLIRTMCHSH		
ele640	(172)	-----PARKIQAR--LT-WCHNSLLPIVMRQTLAA		
ele662	(310)	-----QOTCQSAIFTSPLILKKRRIKVYADDTQLTEHLK		
porcina	(1)	-----MYTFVVR-----DENS SVYAEVSRLLLAT		
bovina	(1)	-----MYTFVVR-----DENS SVYAEVSRLLLAT		
rata	(1)	-----MYTFVVR-----QENS SVYAEVSRLLLAT		
human1	(594)	-----ERVEKLPWEQRKLLR-WKMS TVTPNIVKQTIGR		
human2	(1)	-----		
human3	(1)	-----MAGKVK-----WVTDIKSVLINNFEKR		
cere	(121)	HLLGELKLT EEEENLSKTNNLIVVSIDPMEYIYKPLTHALKKYL PQVEIV		
pombe	(1)	-----MSSTKKDIKVYVNYRDEYAEPKII SALKNS		
		51		100
ele1200	(617)	GFMQCSSK---NPSVNVIMGAPVKSVRMR ELPW-----QRLNQFPR		
ele640	(200)	SHFTVVD E---SLFYVGYWGRH-LKSAQYRALQPH-----QKVNHPG		
ele662	(345)	NHKVEYVDD---IKKADVIMIKHFDYKQLSEENP-----CGMINQFPF		
porcina	(25)	GHWKRLRRD---NPRFNLM LGER-NR LPFGR LGHEPGLM---QLVNY YRG		
bovina	(25)	GHXKRLRRD---NPRFNLM LGER-NR LPFGR LGHEPGLM---QLVNY YRG		
rata	(25)	GYWKRLRRD---NPRFNLM LGR-NR LPFGR LGHEPGLA---QLVNY YRG		
human1	(627)	SHFKISK R---NDDLGCWGHH-MKSPSFRSIREH-----QKLNHPG		
Human2	(1)	-----		
Human3	(24)	GWVQVTEN---EDWNFYWMSV-QTIRNVFSVEAGYRLSDDQIVNHPN		
cere	(172)	SNLPEFDNGGCEKEMKVFHYGDYEQLDMDKLMELPN-----NYFTNSYIY		
pombe	(31)	GKELTFTNS---AKEANFQWAQYEDIDFDEVYKNPK-----TKLCCSYVI		
		101		150
ele1200	(657)	STELTKKDRLYENIERSKSI FGES-----FDFIPEFYVTP		
ele640	(267)	AFHIGRKDRLWMHIRKQERFEG-----E-----FDIMPFTYILP		
ele662	(387)	ESCITVKDLLAACAMRDPKN-----DWYQLTYNLN		
porcina	(68)	ADKLCRKASLVKLIKTSPELAESCT---WFPES---YVIYPTNLKTP		
bovina	(68)	ADKLCRKASLVKLIKTSPELAESCT---WFPES---YVIYPTNLKTP		
rata	(68)	ADKLCRKASLVKLVKTSPELSESCS---WFPES---YVIHPTNLKTP		
human1	(666)	SFQIGRKDRLWRNLSRMQSRFGKK-----E-----FSFPQSFILP		
Human2	(14)	TTKLTRKDKLAKHLKHMRMYGT-----SL-----YQFIPLTFVMP		
human3	(68)	HYELTRKDLVKNIKRYRKELEKEGSP LAEKDENGYLYLDFVPVTYMLP		
cere	(217)	RKALIRKHF LSHTIQTYTAKNPES-----ILKKAYLESFTID		
pombe	(73)	RKALIRKEYLWRITVITYLAKHPDS-----ILSKSVPEAYSL E		

* *

GSHasa	(157)	DIILKP
BC	(155)	PVILKA
DD-Ligasa	(140)	PVIVKP

		151		200
ele1200	(692)	R	ENR-----K	MENAEV
ele640	(274)	T	D-----R---	Q
ele662	(418)	T	Q	L-----P
porcina	(109)	V	A	Q
bovina	(109)	V	A	Q
rata	(109)	V	A	Q
human1	(702)	Q	D-----A---	K
Human2	(50)	N	D	Y
human3	(118)	A	D	Y
cere	(254)	L	D	Y
pombe	(110)	L	D	Y

		* *
GSHasa	(167)	GGASI
BC	(165)	GGRGM
DD-Ligasa	(180)	SSVGM

				250
ele1200	(730)	Q	K	G
ele640	(300)	R	G	T
ele662	(448)	R	G	M
porcina	(156)	K	G	E
bovina	(156)	K	G	E
rata	(156)	K	G	E
human1	(728)	R	G	I
Human2	(82)	R	G	R
human3	(144)	Q	G	K
cere	(292)	K	G	Q
pombe	(153)	R	A	Q

		* **		*
GSHasa	(17)	AQNYL	(27)	GDKR
BC	(22)	MEKYL	(30)	RHVE
DD-Ligasa	(16)	IEKWL	(23)	PEFT

		251		300
ele1200	(748)	---	P	L
ele640	(489)	---	A	T
ele662	(460)	---	T	G
porcina	(178)	---	Q	V
bovina	(178)	---	Q	V
rata	(178)	---	Q	V
human1	(645)	---	R	P
Human2	(99)	---	D	M
human3	(175)	---	K	E
cere	(342)	N	I	S
pombe	(200)	V	I	S

		301		350
ele1200	(786)	S	E	G
ele640	(356)	D	Q	G
ele662	(513)	N	R	F
porcina	(217)	R	E	G
bovina	(217)	R	E	G
rata	(217)	R	E	G
human1	(784)	S	D	G
Human2	(138)	Q	E	G
human3	(215)	K	L	G
cere	(387)	D	R	M
pombe	(242)	N	E	M

```

                                     351                                     400
ele1200 (830) MSSEDLGHKWTLLGALLRYVENE-GKDAKL-LMLRIEDLIVKSLLSIQNSV
ele640 (395) VANKPV-PKWTLLHHLWEHFDEM-GVDREK-IQREIEEVIIKAFISTEKPI
ele662 (240) MKCEN----FIETIEKAYPRIQ-WSEVQKDI NLTIRKAI EAAAKEEAPRG
porcina (255) KYEEGN-EMFFEEFNQYLTSAI-NITLESSILLQIKHII RSCLLSVEPAI
bovina (255) KYEEGN-EMFFEEFNQYLTSAI-NITLESSILLQIKHII RSCLLSVEPAI
rata (255) KYEEGN-EMFFEEFNQYLTSAI-NITLENSILLQIKHII RSCLLSVEPAI
human1 (928) MACQG--HKWAL KALWNYLSQK-GVNSDA-IWEKIKDVVVKTIISSEPYV
Human2 (179) VIGHG--CKWTL SRFFSYLRSW-DVDDL-LWKKIHRMVILTILAIAPSV
human3 (254) HIHGG--KWTVSNLRLLYLESTRGKEVTSKLFDEIHWIIVQS LKAVAPVM
cere (429) DKDSS---VLEFDSIEEIPNER-KSNLKEQIHSITNDVFLAAVNVNRLNF
pombe (276) NVEQS----SIRDFWNTSIEN-KDDIFKSI LNIGDVFEAAATTQGIHF

```

```

                                     *   *                               **  *
GSHasa (57) GLDIIGDR (65) LTEIN
BC (59) TFEFLFEN (71) FLEMN
DD-Ligasa (59) RIDVMLDS (72) LLEAN

```

```

                                     401                                     450
ele1200 (878) ATASRTNLRFACTNFELFGFDVLVD---QALKPWLLLEVNLSPSLACDAP
ele640 (580) REHMSRFLEQEFICYELFGIIDIILD---EDYKPWLLLEVNI SP SLHSGTP
ele662 (285) VAPN-----VQSRAMYGV DIMLQHGDNVDIKSTLLEINFMDTTRACQ
porcina (303) STRH----LPYQSFQLF GFD FMVD---EDLKVWLLIEVNGAPACAQ--K
bovina (303) STKH----LPYQSFQLF GFD FMVD---EELKVWLLIEVNGAPACAQ--K
rata (303) STKH----LPYQSFQLL GFD FMVD---EELKVWLLIEVNGAPACAQ--K
human1 (280) TSLALKMYVRRPYSCHELF GFD IMLD---ENLKPWLLLEVNI SP SLHSSSP
Human2 (225) PFAA-----NCFELFGFDIILID---DNLKPWLLLEVNI SP ALTLDCS
human3 (301) NNDK-----HCFECYGYDI I ID---DKLKPWLLIEVNASP SLTSSTA
cere (475) QPLP-----NAFETYGVDFLID---SNYEVKLLIEINAFDFKQTGK
pombe (320) QPLE-----NCFEIFGVD FLVD---CESQVYLLLEVNI SYDFKQTGK

```

```

                                     451                                     500
ele1200 (924) LDSLLKTRLIADLLNLACV--PLLDRKIID-----
ele640 (488) LDVSVKAPLAKDVLNLAGVYVPPSFDKLS---DADYSTRPRNGRKNREQL
ele662 (638) YYPDFA-DTVEFTLFLDEID-PTKVTPPI-----
porcina (342) LYAELC-QGIVDIA-TASVFP PDAEQQQPPPAAFIKL-----
bovina (342) LYAELC-QGIVDIA-TASVFP PDAEQQP--QPATFIKL-----
rata (342) LYAELC-QGIVDIA-TSSVFP PDTEQVP--QPAAFMKL-----
human1 (920) LDISIKGQMIRDLLNLAGFVLPNAEDIIS---SPSS-----
Human2 (263) TDVLVKRRKLVHDIIDL-----
human3 (339) NDRI LKYNLINDTLNLAVPNGEIPDCKWN--KSPKPEVLGNYEILYDEEL
cere (513) DLKNLIDELFDDTVKYCVTPIFNENRNKT DDETDPNFVKVIDYTSNGW--
pombe (358) NLSNITENLFSAVVETAIPPFESSTKRNVDSKLT LAKKLQLFGR-----

```

```

                                     501                                     537
ele1200 (952) -----
ele640 (535) IKEASWVAAYKDQLG-VIDNRI FKRLTP-----
ele662 (664) -----
porcina (380) -----
bovina (378) -----
rata (378) -----
human1 (953) -----
Human2 (279) -----
human3 (387) AQGDGADRELRSRQGQSLGPRAGRSRDSGRAVLTTWK
cere (561) -----
pombe (404) -----

```

Los colores utilizados en el alineamiento tienen el siguiente significado:

- D aminoácidos con identidad de 100%,
- D aminoácidos conservados (D, aminoácido genérico)
- D similitudes en bloques
- D aminoácidos con una débil similitud

Se ha publicado que la TTL posee homología en ciertos aminoácidos de su secuencia con los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de ATP y unión de

Mg⁺² [6] existentes en la familia de proteínas que catalizan una reacción con formación de ADP [175]. Recordemos que la TTL utiliza ATP en la catálisis de la reacción de tirosinación (ver Introducción Fig. 1). En el trabajo que se menciona más arriba [175] se compararon las secuencias de las TT-ligasas bovina, porcina y 5 teóricas a saber: *C. elegans* 1200, *C. elegans* 640, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y TTL humana deducida de ADNc. Todas mostraron una alta homología con residuos específicos que unen ATP y Mg⁺². Los aminoácidos involucrados en dicho reconocimiento fueron obtenidos de datos de cristalografía de las proteínas de la glutatión sintetasa y proteínas relacionadas tales como acetil-CoA carboxilasa y D-alanina:D-alanina TTL, ambas de *Escherichia coli*. En el alineamiento múltiple se muestra además que otras dos nuevas secuencias no incluidas en la publicación mencionada también mantienen homología. Estas secuencias son: la secuencia teórica de la especie humana (III) y la de *C. elegans* (III) (secuencia 6 y 7 respectivamente, ver tabla más arriba). Los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de ATP y Mg⁺², pertenecientes a la familia de enzimas que catalizan reacciones con formación de ADP, están señalados con asteriscos encima de sus secuencias. Estas secuencias están alineadas con las secuencias de la TT-ligasas. Del alineamiento se puede observar que existen regiones de alta homología, las cuales comprenden los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de ATP y Mg⁺², y regiones con un grado de homología moderado.

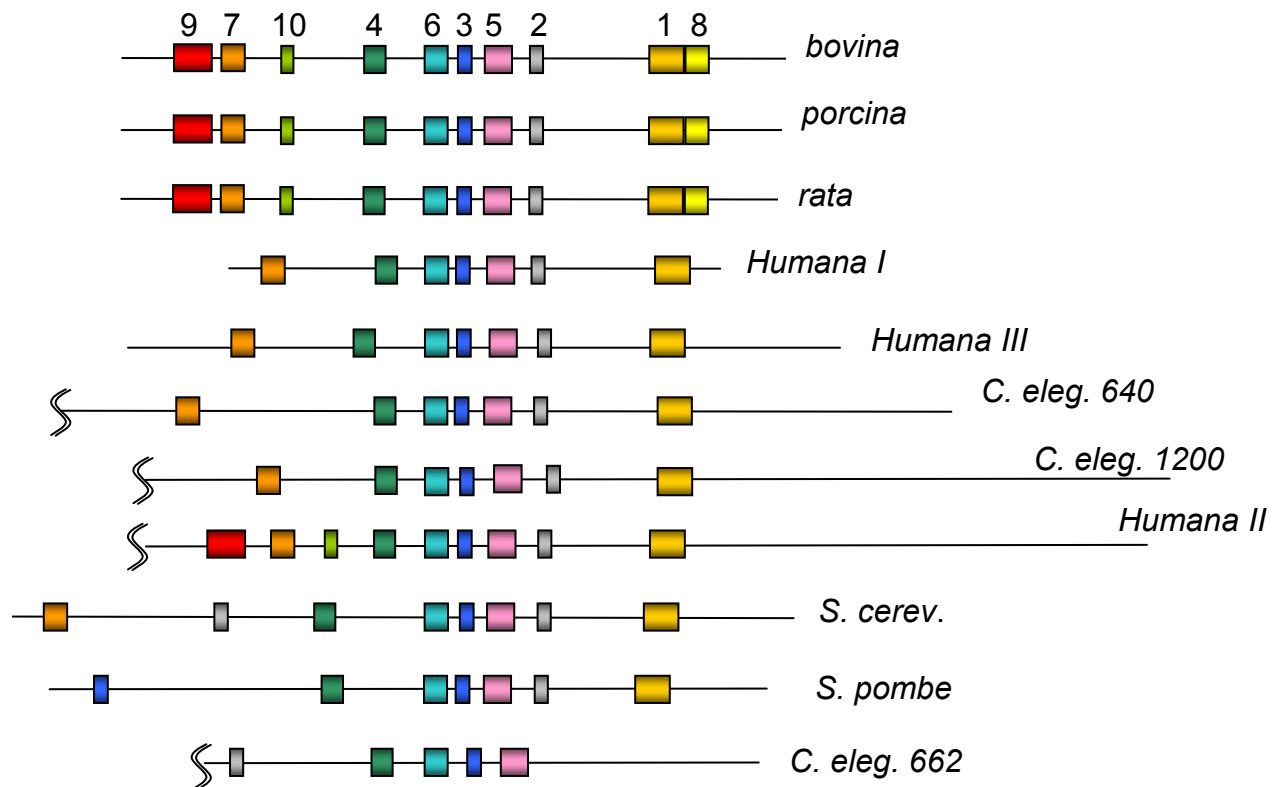
Búsqueda de motivos conservados entre las secuencias de TT-ligasas

Otra comparación que realizamos entre las secuencias de TT-ligasas teóricas y las caracterizadas, fue una búsqueda de bloques de motivos conservados entre todas las secuencias mediante programas de computación de libre acceso vía Internet. Uno de los programas utilizados fue: "THE MEME SYSTEM Multiple EM for Motif Elicitation Version 2.2 (1998)" [211] (<http://www.sdsc.edu/MEME>). El análisis computacional obtenido luego de haber enviado las secuencias a la dirección de Internet mencionada, permitió identificar los siguientes motivos estadísticamente significativos:

Motivo	Ancho	Mejor "mach" posible
1	22	FELFGFDFMVDEELKPWLVIEVN
2	8	HLTNHCIQ
3	8	KFDIRCWV
4	14	WIVKPSMCARGQGI
5	16	IYVYREGLCRFASEPY
6	12	VIQKYIERPLLL
7	15	QLVNHYPGADKLCRK
8	16	GAPACAQKLYAELCQG
9	24	RRDNPRFNLMLGERNRLPFGRLGH
10	8	CTWFPESY

Un alineamiento y búsqueda de posibles repeticiones de estos motivos dentro de una misma secuencia fue realizado por el programa MAST (Motif Alignment and Search Tool) (<http://www.sdsc.edu/MEME>) [212]. Abajo se muestra el alineamiento gráfico obtenido.

Representación esquemática del alineamiento de motivos sobre las secuencias de ligasas



Es interesante notar, especialmente para el caso de las secuencias teóricas, que además de la presencia de varios motivos dentro de una misma secuencia, en general, estos conservan el orden y en algunos casos el espaciado entre ellos, cuando se los compara con el orden que poseen en las secuencias de TTL ya secuenciadas (rata, bovina, porcina). La secuencia que menos cantidad de motivos posee es la secuencia de *C. elegans 662 pb*. Esta secuencia obtuvo el menor puntaje otorgado por Blast al momento de buscar secuencias homologas con la TTL de rata. El resultado del programa MAST muestra un detallado alineamiento de los motivos sobre las secuencias. En este caso se muestra solamente el resultado gráfico de los motivos.

CAPITULO III

**EXPRESIÓN EN CÉLULAS EN CULTIVO DE UN ARN ANTISENTIDO Y
UNA MUTANTE DOMINANTE NEGATIVA DEL GEN DE LA TUBULINA
TIROSINA LIGASA**

Introducción

Con el propósito de investigar el papel funcional de la TTL, realizamos experimentos tendientes a disminuir la actividad de esta enzima en células en cultivo y observar sus efectos sobre la morfología, estado de tirosinación de la tubulina y la división celular. Para llevar a cabo estos ensayos se acudió a estrategias de biología molecular utilizando el ADNc de la TTL obtenido previamente (ver Cap. II). Los resultados que se comentan a continuación muestran los efectos de la expresión de un ARN antisentido y una mutante dominante negativa para la TTL de rata en células CHO-K1 en cultivo.

Construcciones en plásmidos con ADNc de la TTL para la expresión de: TTL normal (sentido), TTL mutante dominante negativa y ARN antisentido de la TTL mutante dominante negativa

Ha sido demostrado que la TTL es una enzima que posee dos dominios bien definidos [167]. Uno de ellos es la porción de 30 kDa correspondiente a la región terminal amino. Esta porción está involucrada en el reconocimiento y unión de la enzima, de modo no covalente, a la subunidad β de la tubulina. El resto de la proteína, dominio terminal carboxilo de 14 kDa, posee el centro activo que cataliza la reacción de incorporación de tirosina sobre la subunidad α de la tubulina.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo de tesis fue indagar el papel funcional de la TTL inhibiendo su actividad en células en cultivo. Para ello utilizamos los datos referente a la TTL para construir un ADNc que exprese una TTL carente de la región catalítica. Esta TTL mutante expresada en un cultivo de células debería competir con la TTL endógena en lo que se refiere a la unión de ésta con la tubulina. Si en la célula existe actividad de la tubulina carboxipeptidasa la proporción de tubulina tirosinada debería verse disminuida. Este tipo de estrategia, utilizando una mutante dominante negativa, ha demostrado ser muy útil para investigar el rol funcional de diversas proteínas [176].

Otra vía alternativa que utilizamos para disminuir los niveles de actividad de la TTL, fue de expresar un fragmento del ARNm de la TTL, con orientación antisentido [177]. Para tal fin empleamos la secuencia de ADNc correspondiente a la TTL mutante dominante negativa la cual fue subclonada en sentido opuesto al de la mutante. Ambos ADN (mutante y antisentido) fueron clonados en el vector de expresión

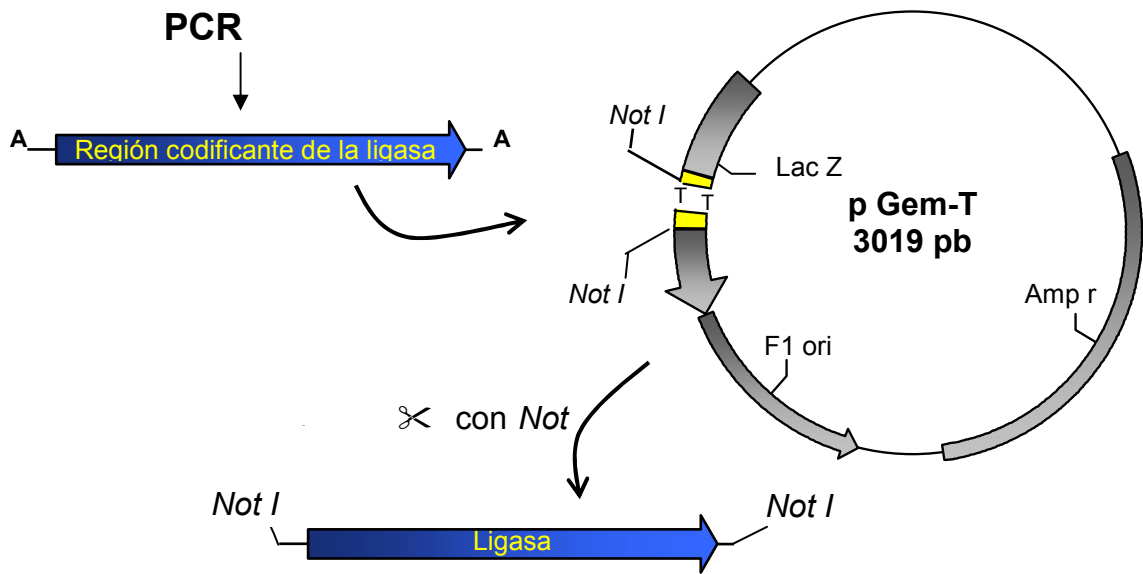
eucariota pTracer (*Invitrogen*) el cual dirige la expresión constitutiva de estos insertos utilizando el promotor viral de citomegalovirus (CMV).

Para llevar a cabo las construcciones mencionadas aislamos primero la región codificante de la TTL presente en el ADNc que habíamos aislado.

Para facilitar el subclonado del fragmento de PCR correspondiente a la región codificante de la TTL ($\cong 1,3$ kb), los “primers” utilizados fueron diseñados añadiendo sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Xba I (terminal amino) y Sma I (terminal carboxilo). Una vez obtenido el fragmento amplificado, se le practicaron reiterados tratamientos de corte con las enzimas de restricción Xba I y Sma I. A pesar de realizar varios intentos, no se logró subclonar el fragmento en un plásmido digerido con las mismas enzimas.

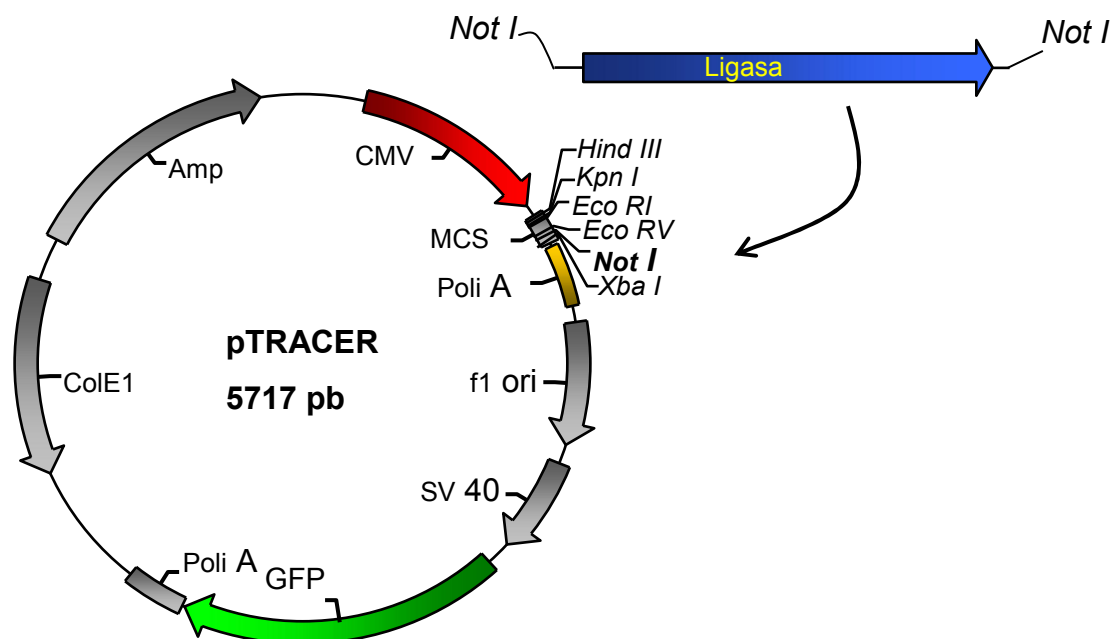
Dicho inconveniente fue superado subclonando el fragmento en el vector pGEM-T Easy (*Promega*) el cual es un vector específico para subclonar fragmentos de PCR. Este vector presenta la ventaja de que ciertas polimerasas (Taq, Tfi, Tth, Tli, Deep, Vent) a menudo agregan una única deoxiadenina, independientemente del templado, al extremo 3' de los fragmentos amplificados [178]. El vector pGEM-T Easy ha sido digerido con la enzima EcoR V y se le ha adicionado una timidina en los terminales 3' a fin de obtener terminales compatibles con los del fragmento amplificado. Estas timidinas 3' “protruyentes” en el sitio de inserción mejoran en gran medida la eficiencia de ligado previniendo la circularización del vector y proporcionando los extremos compatibles para los productos de PCR (ver esquema I)

Esquema I



El inserto subclonado (TTL 1,3 Kb) en este vector (pGEM-T) fue luego liberado mediante digestión con la enzima de restricción Not I (*Promega*) y luego subclonado en el vector de expresión eucariota pTracer (*Invitrogen*) con la orientación sentido (esquema II).

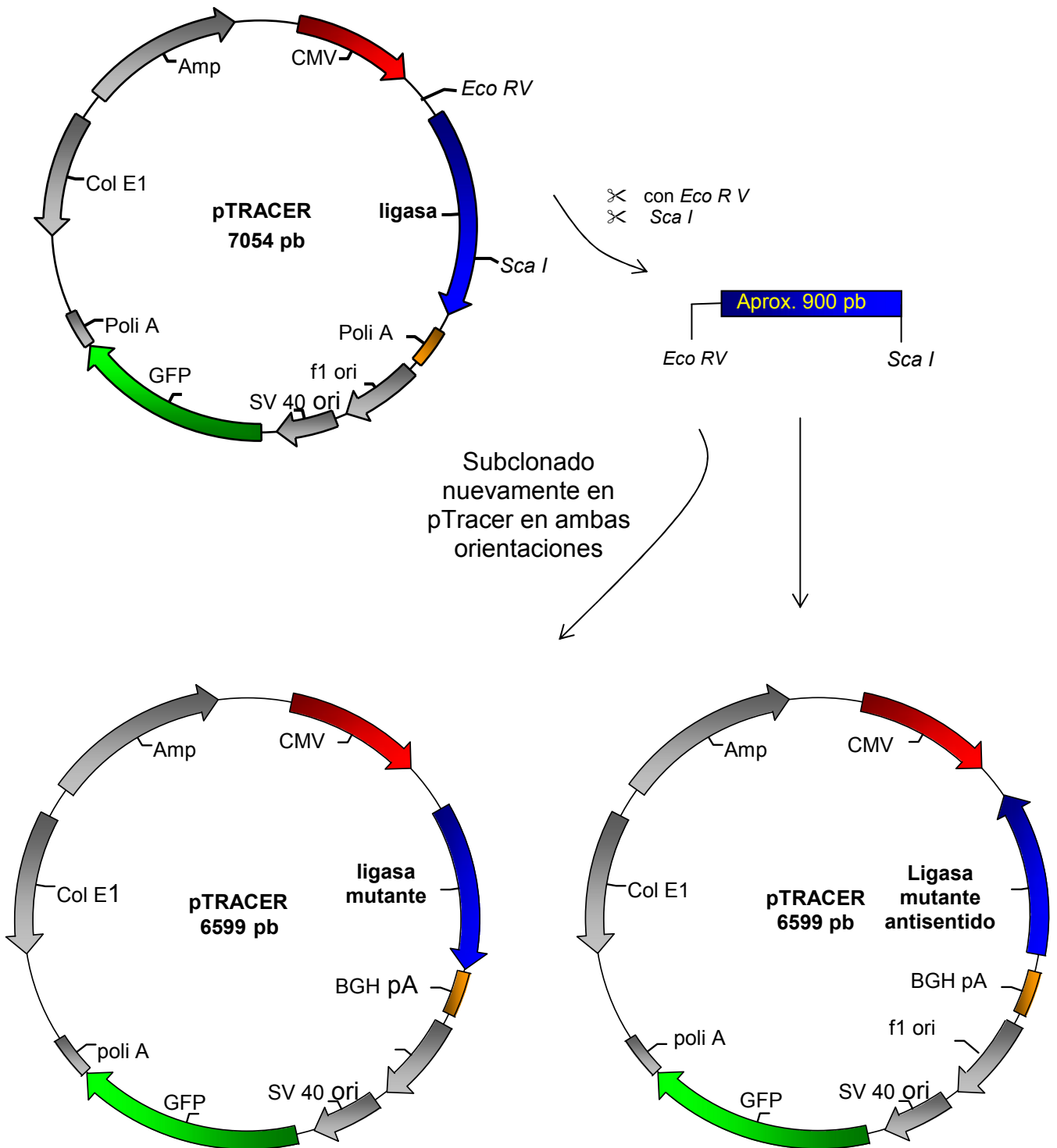
Esquema II



El plásmido pTracer posee una particularidad muy atractiva como vector de expresión, ya que posee subclonado el gen de la proteína "Green Fluorescent Protein" (GFP) [179]. La propiedad sobresaliente de esta proteína es la emisión de fluorescencia que manifiesta cuando es iluminada con luz UV (385 nm). La transcripción de este gen en el plásmido pTracer está dirigida por el promotor viral SV40 y se expresa de manera independiente a los fragmentos subclonados en este vector. Su expresión resulta de gran utilidad para experimentos de transfecciones transientes ya que permite identificar la célula que ha incorporado el plásmido cuando estas se observan en un microscopio de fluorescencia.

La secuencia de la TTL, subclonada en el vector pTracer, fue digerida con las enzimas Sca I y Eco RV para generar un fragmento de extremos romos de aproximadamente 900 pb. Este fragmento posee información para sintetizar una TTL carente de actividad, denominada mutante dominante negativa. Dicho fragmento fue subclonado nuevamente en el vector pTracer en ambas orientaciones: sentido y antisentido (ver esquema III). La orientación sentido codifica para la TTL mutante dominante negativa y la orientación antisentido genera ARN antisentido al ARNm de la TTL mutante. La síntesis de las secuencias de ARN antisentido y de la TTL mutante está gobernada por el promotor CMV, el cual produce elevados niveles de expresión en forma constitutiva.

Esquema III



Análisis mediante inmunocitoquímica de la expresión de la TTL de secuencia completa (sentido) y la mutante dominante negativa en cultivo de células CHO-K1

Si bien no tuvimos un interés especial en sobreexpresar la TTL sentido para estudiar el rol funcional de esta proteína, se llevó a cabo su expresión como control metodológico para los experimentos de expresión de la TTL mutante dominante negativa. La expresión de las TT-ligasas, sentido y mutante dominante negativa, fue verificada por métodos inmunocitoquímicos utilizando el anticuerpo policlonal contra la TTL. Luego de 48 hs post-transfección, las células fueron fijadas y procesadas para detectar la TTL (ver Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. En el panel A se observan las células presentes en el campo mediante microscopía de contraste de fase. En el panel B se puede identificar cual es la célula que ha sido transfectada a juzgar por la expresión de la GFP. En el panel C se muestra la inmunofluorescencia, para el mismo campo, obtenida con el anticuerpo anti-TTL. Se observa una fuerte intensidad de fluorescencia en la célula transfectada en comparación con células no transfectadas. La fotografía es una muestra representativa de los campos analizados. Estos resultados muestran que el vector pTracer recombinante, obtenido como se describió, expresa la enzima TTL cuando se introduce por transfección en células CHO-K1.

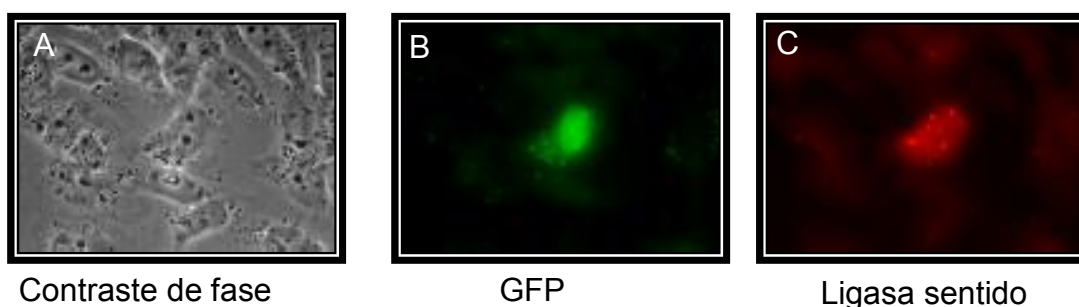


Fig. 1. Expresión de la ligasa mutante dominante negativa. Panel A: contraste de fase; Panel B: fluorescencia de la GFP; Panel C: inmunofluorescencia obtenida con el anticuerpo anti-ligasa.

La expresión de la TTL mutante dominante negativa, se verificó siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la TTL sentido, observando la correlación entre las células transfectadas y la intensidad de fluorescencia obtenida con el anticuerpo anti-TTL. En la figura 2, panel A, se muestra la imagen de las células presentes en el campo, mediante microscopía de contraste de fase. En el panel B se puede identificar

cual es la célula que ha sido transfectada a juzgar por la expresión de la GFP, y en el panel C la inmunofluorescencia para el mismo campo obtenida con el anticuerpo anti-TTL. La marcada intensidad de fluorescencia obtenida con el anticuerpo anti-TTL en la célula transfectada indica que la mutante dominante negativa se expresa en este tipo de células.

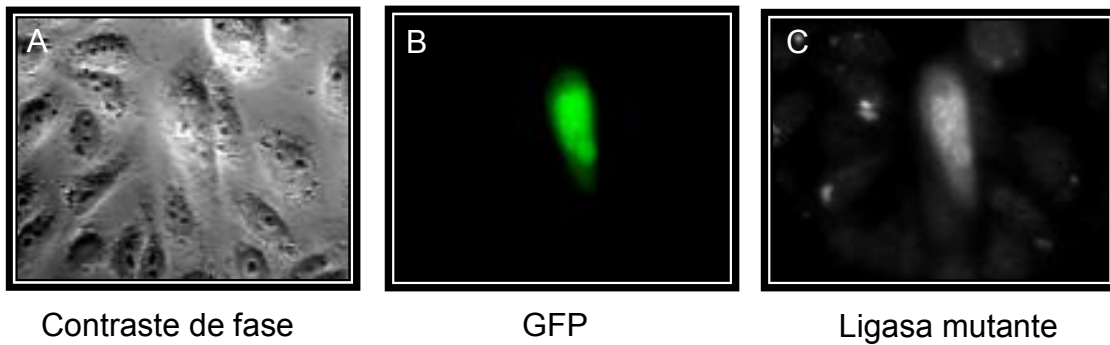


Fig. 2. Expresión de la ligasa mutante dominante negativa.

Panel A: contraste de fase; Panel B: fluorescencia de la GFP; Panel C: inmunofluorescencia obtenida con el anticuerpo anti-TTL

Análisis del nivel de tirosinación de los microtúbulos en las células transfectadas con ADNc de la TTL mutante dominante negativa y con un ADNc antisentido

Los efectos de la expresión en células en cultivo de la TTL mutante dominante negativa y del ARN antisentido fueron estudiados mediante inmunocitoquímica analizando el grado de detirosinación de los microtúbulos de las células transfectadas. Las células fueron fijadas 48 hs post-transfección y procesadas tal como se detalla en Materiales y Métodos. Para la inmunocitoquímica se utilizó un anticuerpo (anti-Glu) que reconoce la iso especie de tubulina detirosinada. En la figura 3, panel A, se observan dos células verde fluorescentes la cuales fueron transfectadas con el ADNc

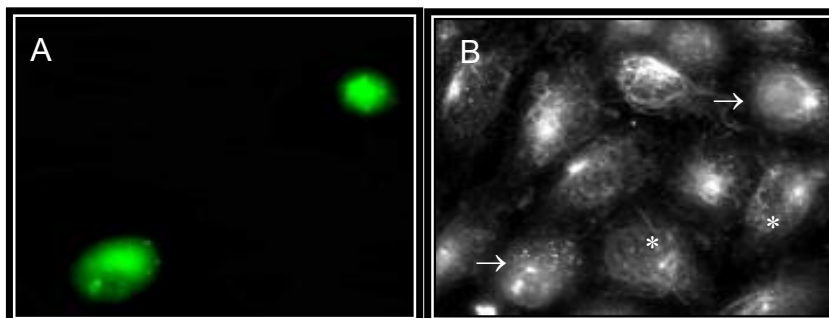





Fig. 3. Inmunofluorescencia para tubulina detirosinada en células transfectadas con ADNc para la ligasa mutante. Panel A, fluorescencia de la GFP; Panel B, inmunofluorescencia para tubulina detirosinada. Las flechas señalan las células transfectadas, el asterisco algunas células no transfectadas.

para la TTL mutante; en el panel B se muestra el grado de detirosinación de los microtúbulos de la células correspondiente al mismo campo. Se puede observar que el grado de detirosinación de los microtúbulos de las células transfectadas (Fig. 3B, ) , aparentemente, no difiere cualitativamente del de las células no transfectadas (Fig. 3 B,*). Debe señalarse que hay un considerable grado de variabilidad de la fluorescencia dentro de la población de las células transfectadas así como en las no transfectadas.

Una situación similar se observó con la expresión del ARN antisentido. Las células transfectadas con dicha construcción tampoco revelaron un aumento apreciable en el grado de detirosinación de los microtúbulos. En la figura 4, panel B, se puede observar que ninguna de las células transfectadas (ver Fig. 4, panel A, GFP positivas) con ADNc antisentido manifiestan un incremento apreciable en la detirosinación de sus microtúbulos (célula transfectada , célula no transfectada ).

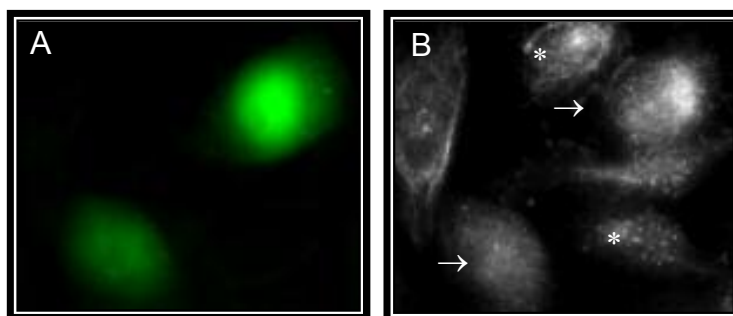




Fig. 4. Inmunofluorescencia para tubulina detirosinada en células transfectadas con ADNc antisentido. Panel A: fluorescencia de la GFP; Panel B: inmunofluorescencia para tubulina detirosinada. Células transfectadas () , algunas células no transfectadas ().

Medida de la actividad tirosina ligasa en extractos de células transfectadas con ADNc de: TTL sentido, TTL mutante dominante negativa y TTL mutante antisentido

Si bien en células transfectadas con la TTL mutante dominante negativa o TTL antisentido no se observó, mediante inmunocitoquímica, un aumento de la tubulina detirosinada, decidimos determinar si la actividad de la TTL estaba afectada o no por estas construcciones. Para esto, se midió la actividad tirosina ligasa en condiciones de velocidad inicial en los extractos citosólicos de las células transfectadas con las construcciones antisentido, mutante dominante negativa y TTL sentido. Las células

fueron entonces transfectadas y a las 48 hs post-transfección se cosecharon y procesaron para obtener la fracción citosólica siguiendo el procedimiento descrito por Forrest *et. al.* [168]. La actividad de la enzima se determinó midiendo la incorporación de tirosina- ^{14}C en tubulina. Para la reacción de incorporación se utilizó como sustrato tubulina agregada exógenamente a la mezcla de reacción. La tubulina fue obtenida de cerebros de ratas de tres meses, edad en que la iso especie detirosinada está enriquecida [137]. Los resultados de incorporación de la tirosina- ^{14}C en los extractos de las distintas células transfectadas se muestra en la figura 5.

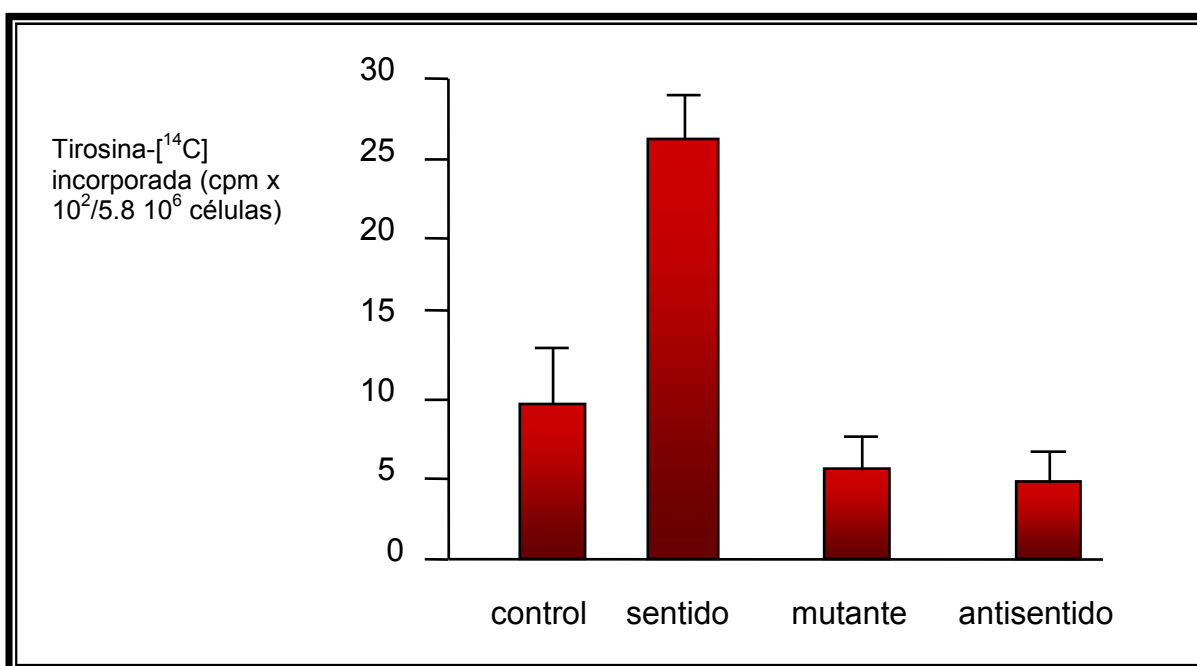


Fig. 5. Determinación de la actividad tirosina ligasa en extractos solubles de células CHO K-1 transfectadas. Células CHO-K1 transfectadas con el vector sin inserto (control), con ADNc de: la ligasa sentido (sentido), la ligasa mutante dominante negativa (mutante), ligasa mutante con orientación antisentido (antisentido) fueron procesadas como se describe en Materiales y Métodos para obtener sus extractos citosólicos. Las barras representan el valor promedio de tres determinaciones independientes con sus respectivas desviaciones estándar .

Como se observa en el gráfico, los niveles de actividad ligasa de los extractos citosólicos de las células transfectadas con ADN antisentido y con la mutante dominante negativa muestran una menor actividad de la tirosina ligasa con respecto al control (células transfectadas con el plásmido sin inserto). Si la disminución de la actividad de la TTL va acompañada de un menor grado de tirosinación de la tubulina, este efecto no fue detectado por la técnica de inmunocitoquímica.

Efecto de la expresión de la TTL mutante dominante negativa y ARN antisentido sobre la proliferación celular

En el transcurso de nuestras investigaciones, un equipo de investigadores franceses y alemanes publicaron un trabajo en el que presentan algunas evidencias de que la TTL podría ser una proteína supresora de tumores [170]. Los genes supresores de tumores son una familia de proteínas reguladoras de la proliferación celular cuya pérdida de su función predispone, al desarrollo de tumores [180,171]. Una de las funciones importantes de las proteínas supresoras de tumores es la de regular la actividad de los genes encargados de estimular la proliferación celular (proto-oncogenes) [181]. El bloqueo de la expresión de los genes supresores de tumores estimulan la proliferación celular.

Dado que encontramos una disminución de la actividad de la TTL en los extractos citosólicos de las células transfectadas con ADNc antisentido como así con ADNc de la mutante dominante negativa, decidimos verificar si la TTL posee la función de una proteína supresora de tumores para lo cual examinamos el fenómeno de proliferación celular en las células transfectadas. A 72 hs post-transfección, observamos que el color de los medios de cultivo se tornaba amarillo en las células transfectadas con TTL antisentido y con la TTL mutante dominante negativa, no así en las células controles. El color amarillo del medio de cultivo es debido a un cambio del pH hacia la acidez. Este fenómeno de cambio de pH es característico en los medios de cultivo cuyas células se encuentran con alta actividad de división celular. El color del medio de cultivo de las células controles permanecía con un ligero color fucsia, el cual indica un pH cercano a 7. Ante esta observación decidimos averiguar si esta diferencia de coloración en el medio de cultivo se correspondía con un aumento en el número de células. Para ello se procedió a contar en una cámara de Neubauer, el número de células presente en cada cápsula utilizando el colorante de viabilidad Tripan-Blue. En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos.

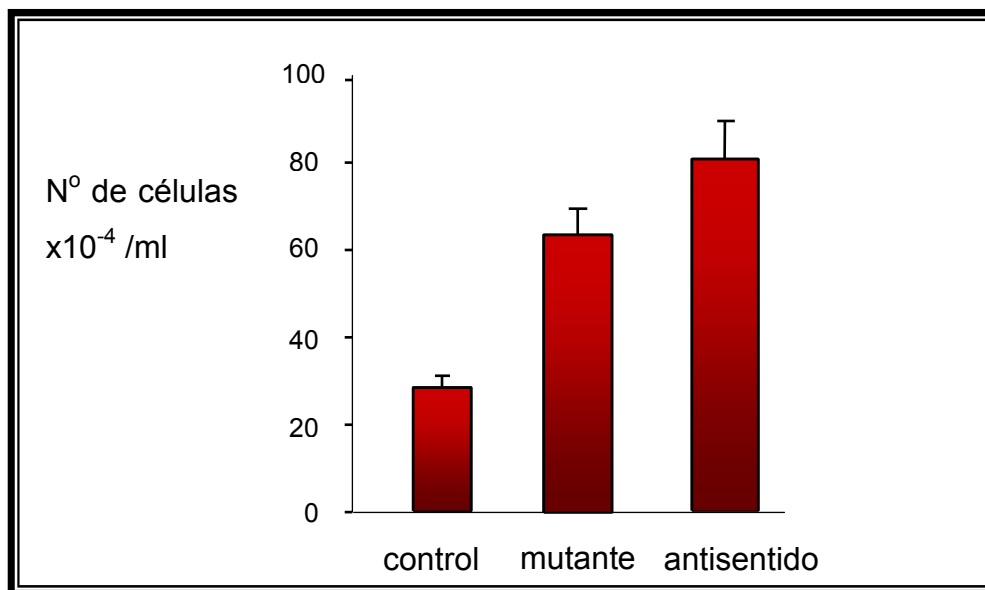


Fig. 6. Efecto de la expresión de ligasa mutante y antisentido sobre la proliferación celular. Células CHO-K1 transfectadas con: vector pTracer solamente (control), ADNc de la ligasa mutante dominante negativa (mutante) y ADNc antisentido de la ligasa mutante (antisentido). Los valores de las barras representan el promedio de tres determinaciones independientes y su desviación estándar.

Los resultados obtenidos muestran que el número de células transfectadas con ADNc de la mutante dominante negativa o ADNc antisentido es superior al número de células transfectadas con el vector solamente, después de 72 hs de cultivo.

Análisis inmunocitoquímico de la proliferación de células transfectadas con ADNc de la mutante dominante negativa y ADNc antisentido

Dado que encontramos un aumento en el número total de células presentes en las cápsulas de células transfectadas con ADNc anti-TTL como así con ADNc de la TTL mutante dominante negativa con respecto al de las células controles, quisimos conocer si a 72 hs posttransfección había aun células en división celular en los casos de transfecciones con ADNc antisentido o mutante. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-tubulina el que, en caso de división celular permite observar la presencia del huso mitótico.

Los ensayos de inmunofluorescencia realizados a 72 hs post-trasfección mostraron que las células que expresan tanto ARN de TTL antisentido (Fig.7, panel A)

como la mutante dominante negativa (panel B) mantenían un marcado efecto de proliferación en comparación con las células controles (Fig. 7, panel C). Las flechas blancas en los paneles de la Fig. 7 indican células en mitosis.

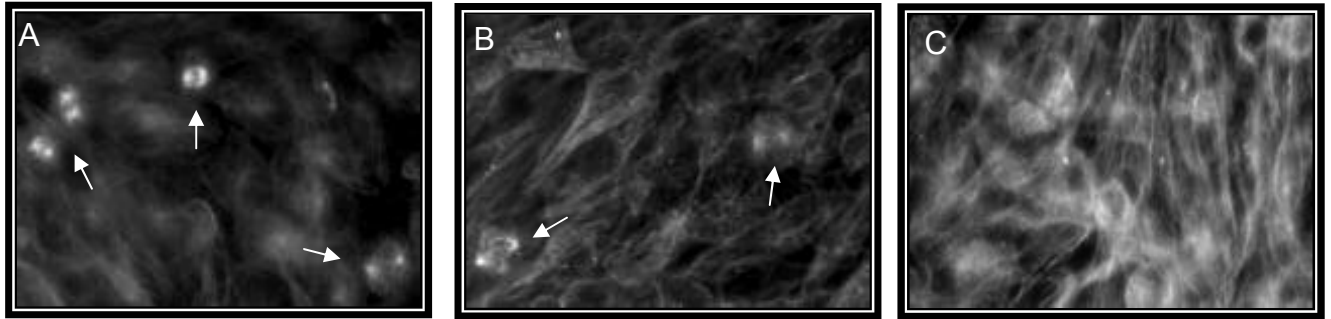


Fig. 7. Inmunofluorescencia contra tubulina 72 hs post-transfección. A: células transfectadas con ligasa antisentido; B: células transfectadas con la ligasa mutante; C: células transfectadas con el vector sin inserto. Las flechas blancas indican células en mitosis.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se realizaron estudios moleculares y funcionales acerca de una de las enzimas que participa en la reacción de tirosinación postraducción de la tubulina, la tubulina tirosina ligasa (ver Introducción, Fig. 2 y 3). Los aspectos experimentales más importantes de este trabajo fueron los siguientes: a) obtención de un anticuerpo anti-TTL; b) determinación inmunocitoquímica de los niveles de proteína TTL en músculo esquelético de rata durante el desarrollo del animal; c) determinación de la expresión y distribución del ARNm de la enzima en tejido muscular mediante hibridización *in situ*, d) aislamiento del gen de la TTL de rata e) determinación del efecto de la inhibición de la actividad de la TTL endógena en células en cultivo transfectadas con distintas construcciones plasmídicas, sobre el estado de tirosinación de la tubulina y la división celular.

Regulación de la expresión de la TTL en músculo esquelético de rata

Los experimentos relacionados a los aspectos de los puntos a), b) y c) fueron llevados a cabo con el propósito de completar estudios previos relacionados con la actividad de la enzima TTL en el tejido muscular [155]. En la mayoría de los tejidos de las especies donde la actividad de la TTL fue determinada, se ha observado que ésta es elevada en estadios tempranos y disminuye paulatinamente a lo largo del desarrollo del animal [169]. Si bien en animales adultos, el cerebro es el tejido con mayor actividad de TTL, en estadios embrionarios el tejido muscular posee niveles superiores para dicha actividad [169]. Por otra parte en nuestro laboratorio se encontró que la actividad de la TTL de músculo esquelético de rata, es máxima a un día de edad y decrece continuamente hasta alcanzar un valor constante a partir del mes de vida del animal [155]. Otros autores [169] han observado que la actividad de la TTL de músculo esquelético de pollo, posee un pico de actividad alrededor del día 12 de gestación. A partir de ese día, los valores de actividad disminuyen marcadamente. También, fue demostrado [169] que la baja actividad de la TTL en pollo adulto no es debido a la presencia de inhibidores presentes en el extracto de músculo. En conjunto, estos resultados y los obtenidos por nuestro laboratorio sugieren que la actividad de la TTL es de importancia en estadios tempranos del desarrollo del tejido muscular. Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue estudiar cual es la causa del descenso de la actividad de la TTL en función del desarrollo del tejido muscular. Para esto se determinaron las variaciones en los niveles de la proteína TTL y de su ARNm en el

tejido muscular de rata durante el desarrollo, a fin de comparar estas variaciones con los valores de la actividad enzimática determinada previamente en extractos solubles. Para tal fin propósito, fue necesario inicialmente contar con las herramientas moleculares, tales como un anticuerpo anti-TTL y sondas de ADN o ARN, que nos permitieran determinar el nivel de la proteína tubulina tirosina ligasa y de su ARNm respectivamente.

La producción de un anticuerpo policlonal anti-TTL se llevó a cabo inyectando en conejos un polipéptido recombinante de 185 aminoácidos correspondientes a la porción terminal amino de la secuencia codificante de la TTL, fusionado a la secuencia de aminoácidos completa de la glutatión S-transferasa. Los resultados obtenidos demuestran que el suero de los animales inmunizados reconoce a la TTL de rata (ver Fig. 2 del capítulo II). Este suero anti-TTL se utilizó para determinar los niveles de la proteína TTL en músculo esquelético de rata durante el desarrollo del animal. Los resultados obtenidos mostraron que la variación en los niveles de proteína TTL son semejantes a los obtenidos por medición la actividad enzimática de dicha proteína [155]. Este resultado muestra que los niveles de actividad enzimática de la TTL son directamente proporcional a los niveles de proteína correspondiente. Para conocer si la disminución en los niveles de proteína con el desarrollo era o no debido a una disminución en el nivel de ARNm, realizamos hibridaciones *in situ* en criocortes de músculo de la pata trasera de animales de distintas edades. Los resultados indicaron que en períodos embrionarios y post-natales, los niveles detectados del ARNm de la TTL fueron claramente superior que en el tejido adulto (ver Fig. 4 del capítulo II). Tomados en conjunto, estos resultados indicarían que la actividad de la TTL, en tejido muscular, estaría regulada a nivel de la transcripción del gen.

El máximo de actividad de la TTL en músculo de pollo puede ser correlacionado con el momento en que las células precursoras del tejido muscular (mioblastos) cesan de proliferar para fusionarse y formar miotubos. Para conocer si la disminución de la TTL está relacionada al evento de fusión celular o si es debida a la influencia del entorno tisular, determinamos la expresión de la TTL en mioblastos cultivados *in vitro*. Con el transcurso de los días de cultivo, los mioblastos aislados tienden a fusionarse para formar miotubos. Uno de los parámetros morfológicos de maduración de estas estructuras es la actividad contráctil que manifiestan aproximadamente al séptimo día de cultivo. Con el propósito de conocer el grado de expresión de la TTL en este evento de fusión, se realizaron hibridaciones *in situ* en células cultivadas durante

diferentes períodos de tiempo. Se encontró que la expresión del ARNm de la TTL se mantuvo aproximadamente constante tanto en estadios tempranos, donde aun no hay fusión, como en estadios avanzados de maduración de los miotubos (ver Fig. 5 del capítulo II). Otros autores [86] describieron, en ensayos de fusión de una línea muscular de rata (L6), que la actividad de la TTL sufre un ligero incremento en estadios de miotubos con respecto al estadio de mioblasto. En conjunto, estos resultados sugieren que los mecanismos que provocan la caída de la expresión de la TTL *in vivo*, no estarían presentes en el cultivo de células *in vitro*. Además, la regulación negativa de la expresión de la TTL observada *in vivo* sería debido, probablemente, a factores no asociados al evento de fusión. Similarmente, se ha observado que el patrón de expresión de varios isotipos de proteínas propias de tejido muscular como troponina, miosina y actina en el cultivo de miotubos, también difiere del observado *in vivo*, lo que sugiere que el cultivo de mioblastos carece de uno o más componentes esenciales para reproducir el fenotipo observado *in vivo* [182, 183, 184, 185]. Esta discrepancia podría deberse al origen de las células que forman los miotubos *in vitro*. Muchas de las células que forman los miotubos *in vitro* provienen de células precursoras satélites, que podrían retener la capacidad de expresar el ARNm de la TTL aun después de fusionar. Esto sería consistente con la tinción observada para el mensajero de la TTL en células satélites localizadas en la periferia de las fibras musculares adultas (ver Fig. 4 del capítulo II).

Debido a la alta expresión del ARNm de la TTL encontrada en estadios tempranos de la maduración del tejido muscular, la TTL podría ser requerida en este tejido para mantener a la tubulina en su forma tirosinada, una característica típica de los microtúbulos dinámicos [145, 186, 205, 187]. Hemos observado que el citoesqueleto de los mioblastos en cultivo posee tubulina tirosinada, no así el de los miotubos (ver Fig. 7 del capítulo II). Los mioblastos de la línea celular L6 poseen una densa red de microtúbulos tirosinados [86] sensibles a drogas depolimerizantes, lo cual coincide con la presencia de microtúbulos dinámicos. Sin embargo, cabe mencionar que la tirosinación o detirosinación de la tubulina no parece ser la causa de la dinámica del microtúbulo. Mas bien, el dinamismo de los microtúbulos junto con las actividades relativas de la enzimas TTL y tubulina carboxipeptidasa, determinarían el grado de tirosinación de la tubulina. La detirosinación de la tubulina es un evento asociado con la estabilización del microtúbulo y con el ensamblaje de citoesqueletos diferenciados. En mioblastos la TTL podría ser esencial para la función de los

microtúbulos dinámicos mientras que su expresión es solo marginal en citoesqueletos con una alta proporción de microtúbulos detirosinados.

Clonado del ADNc de la TTL de rata y análisis de su secuencia de nucleótidos

Para llevar a cabo estudios tendientes a dilucidar el rol funcional de la TTL en células en cultivo, se decidió en primer lugar aislar su ADNc. Con esta herramienta se realizaron construcciones que tenían por finalidad disminuir la actividad de la TTL en el citoplasma de células en cultivo. Para el rastreo del ADNc de la TTL de rata en una librería de expresión de bulbo olfatorio, se utilizó una sonda que consistió de 385 pb 5' del codón de inicio de la traducción ATG, obtenida mediante RT-PCR con oligonucleótidos homólogos a la TTL de cerdo. A partir de 300.000 clones se detectó un clon positivo, lo que refleja un bajo nivel de expresión del gen en las células de este tejido.

La confirmación de que el ADNc aislado correspondía al de la TTL fue realizada mediante comparación del grado de homología de la secuencia de nucleótidos de la TTL de rata con la de cerdo [160]. Se observó una alta homología entre estos ADNc (86%). El tamaño de ADNc aislado correspondiente a la TTL fue de aproximadamente 4,5 kb del cual se secuenciaron 1246 pb correspondientes a la región codificante. Merece destacarse la presencia de regiones no traducidas de gran tamaño respecto a la región codificante. De los 4,5 kb de este ADNc, aproximadamente 3,3 Kb corresponden a secuencias no traducidas. No hemos realizados experimentos tendientes a conocer cuanto corresponden a las regiones 5' y 3'. En cerebro porcino, el ADNc de la TTL posee aproximadamente 3 Kb de región 3' no traducida [160]. Se ha observado que secuencias 3' no traducidas largas, presentes en algunos ARNm, están involucradas en funciones tales como transporte del mensajero a regiones específicas del citoplasma, estabilidad y regulación de la traducción [ver reviews 188, 189] . Si el ARNm de la TTL incluye en la porción no traducida algunas de las funciones mencionadas, queda aun por determinarse.

La secuencia de aminoácidos de la TTL (377 aminoácidos) que hemos determinado en este estudio, fue comparada con las secuencias de las TT-ligasas porcina, bovina y una pequeña porción de secuencia traducida del ADNc de ratón [160]. Se vió que la TTL de rata posee una alta homología (alrededor del 91%) con

cualquiera de las tres TT-ligasas mencionadas. Solamente los 15 residuos de la región terminal carboxilo de la TTL de rata presenta una divergencia moderada con respecto a las secuencias de cerdo y bovina (ver alineamiento múltiple en el capítulo II). Los datos de homología de la secuencia de aminoácidos de la TTL indican que es una enzima muy conservada en eucariotas superiores con lo que se podría especular que su función podría ser de importancia.

La secuencia del aminoácidos de la TTL también se analizó con programas de computación que detectan diferentes motivos de secuencias consenso, presentes en el bancos de motivos "Prosite", para posibles modificaciones post-traducción. El resultado de la búsqueda mostró que la proteína posee varios sitios potenciales para modificaciones post-traducción. Estas modificaciones son: N-glicosilación, fosforilación por quinasas dependientes de cAMP o cGMP, por proteína quinasa C, y por caseína quinasa II. Incluye además sitios internos de miristoilación. Al presente no se han estudiado ninguna de estas potenciales modificaciones post-traducción mencionadas.

En la búsqueda en bancos de genes de proteínas homólogas a la secuencia de aminoácidos de la TTL de rata se encontraron ocho secuencias de aminoácidos (teóricas) con homología al gen de la TTL de rata: tres secuencias en humanos, dos deducidas de ADN genómico y una de ARNm de la línea celular mieloide KG-1, tres para *C. elegans* y una para *Saccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*, respectivamente. De estos genes sin caracterizar aun, algunos poseen una porción terminal amino de longitud variable que no conservan homología en absoluto con el gen de la TTL de rata. Tal es el caso de los tres genes del nemátodo *C. elegans*, una secuencia humana y la secuencia de la levadura *S. cerevisiae*. Estas porciones fueron eliminadas al momento de realizarse un alineamiento múltiple entre todas las secuencias de las TT-ligasas.

La presencia de una proteína con actividad de tirosina ligasa en levaduras, inferida del secuenciamiento del genoma de las levaduras de *S. pombe* y *S. cerevisiae*, es motivo de controversia por lo que se requerirán más experimentos para descartar o demostrar su existencia. Los estudios en *S. cerevisiae* [190] fueron incapaces de detectar actividad de esta enzima. Aparentemente en levaduras no existe actividad de la tubulina carboxipeptidasa [191]. La ausencia de esta enzima dejaría sin sentido la expresión de la TTL ya que los dos genes de la α -tubulina de esta levadura codifican para la tirosina en su C-terminal.

La alineación múltiple de las secuencias de las TT-ligasas parciales teóricas (SLPT) y las caracterizadas, reveló que las SLPT poseen una homología en bloques entre ellas y con las TT-ligasas caracterizadas. Debido a esto, empleamos un programa que busca motivos conservados entre las secuencias en estudio. El programa no incluyó búsqueda de estos motivos teniendo en cuenta las separaciones o “gaps” por lo que es probable que puedan existir más de los obtenidos, teniendo en cuenta que pueden haber motivos con ligeras inserciones o deleciones en comparación con las demás secuencias. Se detectaron 10 motivos en la mayoría de las SLPT los que en general conservan el orden y el espaciamiento que existe en las TT-ligasas caracterizadas. Esto contribuye a reforzar la hipótesis de que las secuencias teóricas correspondan a las verdaderas secuencias de la “TT-ligasas” de las especies en cuestión.

La TTL, en la reacción de tirosinación de la tubulina, hidroliza una molécula de ATP y requiere además de los iones Mg^{2+} y K^+ . Si bien los aminoácidos de la TTL involucrados en el reconocimiento de ATP no han sido identificados, se ha encontrado en ensayos de “cross-linking” con ATP radiactivo que esta molécula se une a la porción de la TTL que reconoce a la β -tubulina. En relación a esto, una publicación reciente [175] ha mostrado, mediante alineamiento múltiple, que tanto las TT-ligasas caracterizadas como algunas teóricas comparten motivos estructurales con proteínas que forman ADP, tal como la glutatión sintetasa. Estos motivos estructurales están involucrados en el reconocimiento de la molécula de ATP y el ion Mg^{2+} . Esto fue determinado utilizando datos de cristalografía de rayos X en proteínas de esta familia [175]. Los aminoácidos claves para la interacción con la molécula de ATP y/o con el ion Mg^{2+} están indicados en el alineamiento múltiple con asteriscos sobre los aminoácidos de las proteínas que forman ADP tal como la glutatión sintetasa (GSHasa), biotína carboxilasa (BC) y D-alanina-D-alanina ligasa (DDLigasa) (ver alineamiento múltiple en el capítulo II). Estas secuencias están alineadas sobre el alineamiento múltiple de las secuencias de las TT-ligasas. En el alineamiento se puede observar que los aminoácidos marcados con asteriscos se conservan también en tres secuencias no incluidas en ese trabajo [175]. Estas son: la secuencia de 662 pb del nemátodo *C. elegans*, la secuencia humana (II) y humana (III). En estas secuencias se puede observar en el alineamiento múltiple que de 13 aminoácidos claves para el reconocimiento de ATP/ Mg^{2+} se conservan el 85 % de los residuos para las dos primeras secuencias y el 92 % para la última. De los 13 aminoácidos, 5 de

ellos se encuentran en la región catalítica de la enzima. Teniendo en cuenta los ensayos de “cross-linking” con ATP radiactivo no se puede descartar la posibilidad de que estos últimos residuos contribuyan principalmente a la interacción con el ion Mg^{2+} . Otro aspecto del análisis de estos últimos 5 aminoácidos es que se encuentran conservados en la secuencia de 662 pb del nemátodo *C. elegans*. Se debe tener presente que el genoma de *C. Elegans* ha sido completamente secuenciado y que la actividad de la TTL ha sido detectada en este organismo [192].

Considerando el grado de homología de las secuencias teóricas con las secuencias de las TT-ligasas caracterizadas (de rata, cerdo y bovina) y el hecho de que existen más de una secuencia en *C. elegans* y en humanos, cabe la posibilidad de que puedan existir dos o más isoformas de esta enzima dentro de un mismo organismo.

Expresión en células en cultivo de un ARN antisentido y una mutante dominante negativa del gen de la TTL

El clonado del ADNc de la TTL nos permitió realizar construcciones en un vector de expresión tendientes a investigar el papel funcional de la TTL dentro de la célula. Se realizaron estudios para observar si la disminución de la actividad de la TTL tiene alguna influencia sobre la morfología, grado de tirosinación de la red microtubular y división celular. Con este objetivo se diseñó un procedimiento experimental que incluyó la construcción de una mutante dominante negativa y un ADN antisentido anti-TTL para transfectar células en cultivo. La mutante dominante negativa fue diseñada para competir con la TTL endógena por la tubulina detirosinada. La construcción antisentido impediría la traducción del ARNm de la TTL en las células. Estas construcciones fueron subclonadas en un plásmido de expresión eucariota (*pTracer*) y ensayadas en la línea celular CHO-K1 mediante experimentos de transfección. La verificación de la expresión de la TTL mutante (ver Fig. 2 del capítulo III) se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica tomando como control positivo la expresión de la TTL de secuencia completa (ver Fig. 1 del capítulo III).

En contra de lo esperado, el nivel de tubulina detirosinada (determinada mediante inmunocitoquímica) de los microtúbulos de las células transfectadas con la TTL mutante, fue similar al encontrado en células transfectadas con el vector sin inserto. Las células transfectadas fueron identificadas por la expresión de la proteína

verde fluorescente (ver Fig. 2 del capítulo III). Un resultado semejante fue obtenido con las células que fueron transfectadas con el ADN anti-TTL.

Los resultados obtenidos parecieran indicar que la actividad de la TTL no fue significativamente afectada. Sin embargo, esto podría no ser así. Es conocido que la carboxipeptidasa es una enzima relativamente poco activa, mientras que la TTL es muy activa. De modo que si la inhibición de la TTL fue solo parcial, cabe la posibilidad de que la célula disponga aun de suficiente TTL como para mantener el “pool” de tubulina a un nivel de tirosinación similar al encontrado en células no transfectadas. Por esta razón se resolvió determinar *in vitro*, la actividad de la TTL en extractos citosólicos de cada una de las siguientes condiciones de transfección: a) mutante dominante negativa, b) ADN anti-TTL, c) TTL de secuencia sentido y d) plásmido sin inserto. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de la TTL en extractos de células transfectadas con la mutante dominante negativa y ADN anti-TTL fue significativamente menor que la encontrada en células controles (ver Fig. 4 del capítulo III). Si esta caída en la actividad de la TTL afecta el estado de detirosinación de la tubulina, esto no pudo ser observado por el método inmunocitoquímico.

Tal como se mencionó, en el transcurso de este trabajo, un grupo de investigadores alemanes y franceses encontraron algunas evidencias experimentales donde muestran que la TTL podría tener el rol de proteína supresora de tumores [170]. Los autores muestran que la expresión de la TTL se encuentra notablemente inhibida en tejidos tumorales. Este comportamiento es característico de las proteínas supresoras de tumores. Los genes supresores de tumores son una familia de proteínas reguladoras cuya pérdida de su función, predispone al tejido celular donde se encuentran, al desarrollo de tumores [171]. Las proteínas supresoras de tumores regulan negativamente el sistema de control del ciclo celular, ya que operan de manera opuesta a la actividad de los genes encargados de estimular la proliferación celular (proto-oncogenes) [193]. Los genes supresores de tumores son genes de carácter recesivo, es decir, dentro de una célula ambas copias del gen en cuestión deben estar ausentes o mutadas para que la célula manifieste el fenotipo tumoral [172].

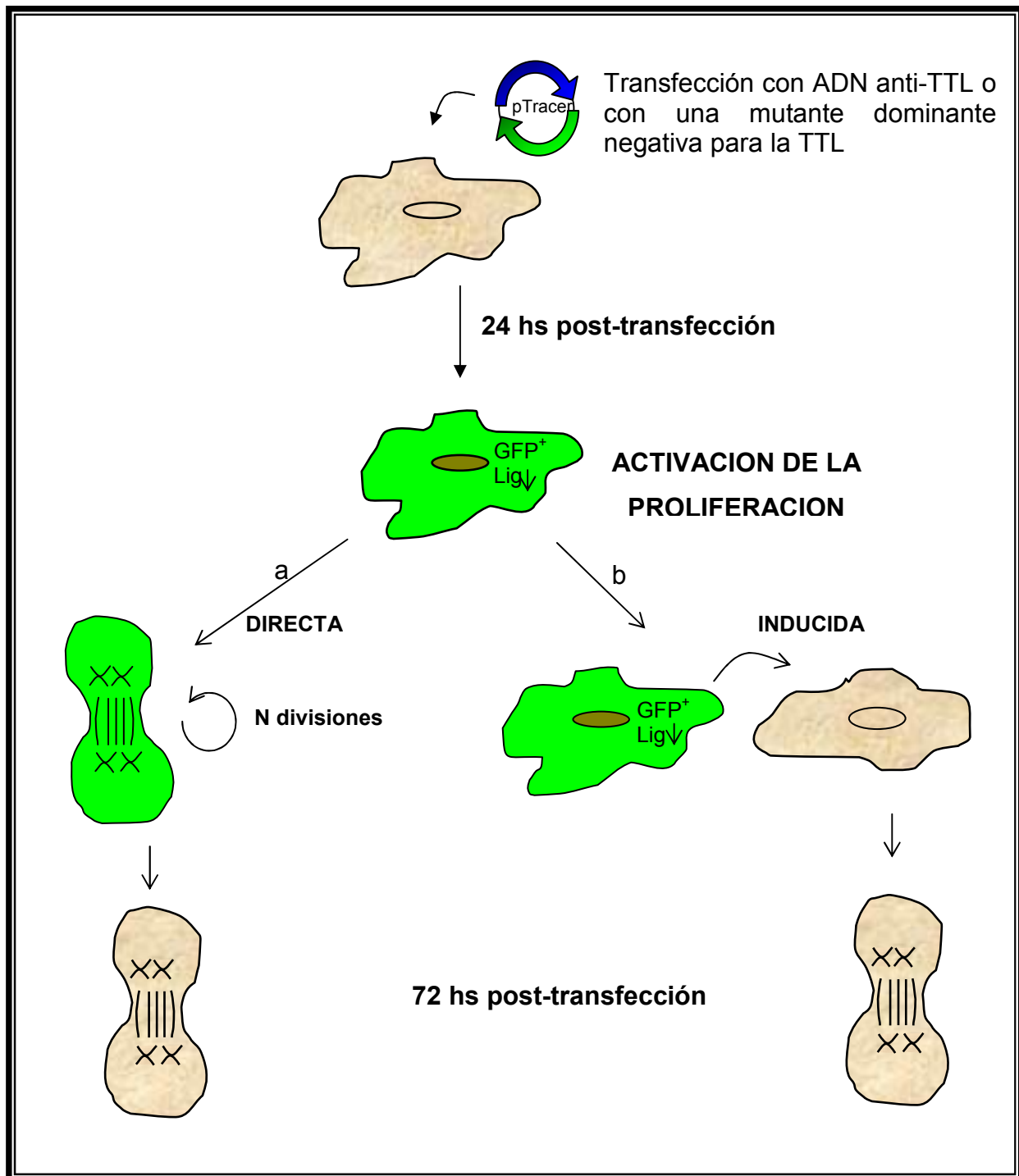
Sobre la base de estos resultados y el hecho de haber encontrado una significativa disminución de la actividad TTL en extractos de células transfectadas con la mutante dominante negativa y ADN anti-TTL, se resolvió determinar si estas transfecciones afectaban la proliferación celular. Para ello la cantidad de células

transfectadas con la mutante dominante negativa y con ADN anti-TTL, después de 72 hs postransfección, fue comparada con la cantidad de células transfectadas con el plásmido sin inserto. El resultado obtenido (ver Fig. 6 del capítulo III) indica que, efectivamente, la cantidad de células presentes en las condiciones de transfección con ADN anti-TTL o con la mutante dominante negativa es notoriamente superior a la obtenida con células transfectadas con el plásmido sin inserto (control). La cantidad de células obtenidas en cada caso se correlaciona de manera inversa con los valores de actividad de la TTL. Si el incremento de la proliferación celular se debe a una menor actividad de la TTL para incorporar tirosina en tubulina, es claro que su efecto no es detectado mediante la determinación de tubulina detirosinada de los microtúbulos por el método de inmunocitoquímica. Especulativamente, la inhibición parcial de la TTL en el citoplasma de las células transfectadas origina una acumulación de tubulina detirosinada en un determinado tiempo; ¿podría participar esta iso especie de tubulina en alguna medida en el fenómeno de proliferación celular?. Otra especulación, aunque más improbable, sería que la TTL actúe sobre otros componentes celulares aun no descritos. Estos componentes, los cuales censarían con gran precisión los niveles de la disminución de la actividad tirosina ligasa en la célula, actuarían como segundos mensajeros en el fenómeno de proliferación celular. Nuestros resultados acerca del fenómeno de proliferación celular, no están en contraposición con la hipótesis de que la TTL posea la función de una proteína supresora de tumores.

Para conocer si aun existían células en estado proliferativo a las 72 hs postransfección, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica empleando el anticuerpo anti-tubulina que permite identificar los microtúbulos del huso mitótico de las células en división. Los resultados mostrados en la Fig. 7 del capítulo III indican que, en efecto, a las 72 hs post-transfección aun permanecen células en estado de proliferación celular. Cabe aclarar que las células CHO-K1 alcanzaron a las 72 hs de cultivo la confluencia celular pero esto no les representa un impedimento para seguir proliferando ya que son células transformadas y no manifiestan inhibición por contacto [194]. La frecuencia de células en proliferación fue considerablemente mayor tanto en células transfectadas con anti-TTL como con la mutante dominante negativa en comparación con las células controles.

Un dato de la inmunocitoquímica que merece ser señalado es el siguiente: no se encontraron diferencias en la cantidad de células en división que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) en los casos de células transfectadas con ADNc

antisentido y mutante dominante negativa, en comparación con las células en división de la células transfectadas con el plásmido sin inserto (control). Cabe recordar que las células transfectadas podían ser identificadas mediante la expresión de la GFP (ver esquema II del capítulo III). En el control se encontraron pocas células en división y en un número relativamente escaso de ellas se observó la expresión de la GFP. En la condición con anti-TTL y mutante dominante negativa se encontraron más células en división y proporcionalmente un mayor número de ellas expresaban la GFP. Es decir, cualquiera sea la condición de transfección, la expresión de la GFP en las células en división era proporcional al número de las mismas. La ausencia de un mayor número de células en división que expresen la GFP para el caso de las células transfectadas con anti-TTL o con la mutante dominante negativa podría deberse a las siguientes razones: Las células transfectadas fueron estimuladas a dividirse y, debido a las sucesivas divisiones, no fue posible observar la expresión de la GFP a las 72 hs posttransfección.



- a) Las células transfectadas (GFP⁺) fueron estimuladas a dividirse y, debido a las sucesivas divisiones, no fue posible observar la expresión de la GFP a las 72 hs post-transfección.
- b) Las células transfectadas (GFP⁺) inducen a las células no transfectadas (GFP⁻) a dividirse
- c) Que operen ambas posibilidades: a y b.

Una representación esquemática de estas posibilidades se muestra a continuación.

Corroborar cual es el mecanismo por el cual se manifiesta el fenómeno de división celular sería un resultado esclarecedor para apoyar o descartar la hipótesis de que la TTL sea una proteína supresora de tumores. El mecanismo (a) sería el que apoyaría dicha hipótesis mientras que el (b) sería un mecanismo en contra de la misma ya que, al presente, no se conocen proteínas supresoras de tumores que actúen por un mecanismo en *trans*.

Existen antecedentes experimentales que indican que cuando se bloquea la actividad de la TTL en células en cultivo, se acumula la isoforma detirosinada de la tubulina [147]. Los autores de este trabajo microinyectaron células en cultivo, con un anticuerpo anti-TTL. Posteriormente realizaron una inmunotinción las células con un anticuerpo que reconoce a la tubulina detirosinada. El resultado de este experimento mostró una célula en mitosis con un inusual huso mitótico enriquecido en tubulina detirosinada. Debido a lo expuesto, los autores sugirieron que la TTL no sería una proteína esencial para la división celular. Este resultado está relacionado en alguna medida con los resultados que se muestran en el presente informe. Si bien el experimento de microinyección mencionado anteriormente no fue realizado con rigor estadístico, resulta probable, a la luz de las evidencias experimentales actuales, que los mecanismos de control de la división celular de la célula microinyectada hayan sido afectados.

Previamente se había mostrado [168] que en extractos proteicos de las células CHO-K1, la actividad de la TTL determinada *in vitro* incrementa durante la fase G1, alcanza un máximo en la fase de síntesis de ADN, disminuye en la fase S tardía y G2 y alcanza un mínimo en la mitosis. Este resultado, publicado en 1978 muestra que la TTL podría participar en la división celular aunque en ese momento fue correlacionado con la expresión de la tubulina. Actualmente, a la luz de las recientes evidencias experimentales, se convierte en un antecedente más que suma a las sospechas de que la TTL tiene un rol activo en la división celular.

MATERIALES Y METODOS

Soluciones

"Buffer" SM: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) solución acuosa conteniendo Mg_2SO_4 10 mM, NaCl 100 mM, gelatina 0,01% (p/v).

Buffer de ligasa: Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) conteniendo $MgCl_2$ 15 mM, KCl 100 mM, leupetina 5 μ g/ml y PMSF 10 μ g/ml.

Denhard't 50 X: solución acuosa conteniendo Ficoll 1% (p/v), albúmina sérica bovina 1% (p/v), polivinilpirrolidona 1% (p/v).

Solución de hibridización: Solución de prehibridización conteniendo la sonda.

LB: NaCl 1% (p/v), caseína 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v).

LB-agar: LB conteniendo agar 1,2% (p/v).

OLB: Tris-HCl 250 mM (pH 8) conteniendo $MgCl_2$ 0,25 mM, Hepes 1 M, β -Mercaptoetanol 50 mM, 100 mM de c/u de los dNTP excepto dATP, 150 ng/ μ l de hexadeoxinucleótidos.

PBS: Fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) conteniendo NaCl 150 mM.

Solución desnaturalizante: Solución NaOH 20 mM conteniendo NaCl 1,5 M.

Solución neutralizante: Acetato de amonio 1 M, NaOH 20 mM.

Solución de prehibridización: Formamida 50% (v/v), Denhardht 5% (v/v), SSC 4X, ADN de esperma de salmón 250 μ g/ml.

SSC 20 X: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M (pH 7).

TBE: Tris Base 89 mM, Ac. Bórico 890 mM, EDTA 2 mM.

Anticuerpos primarios

Los anticuerpos que se mencionan a continuación fueron utilizados en ensayos de "inmunoblot" ó inmunofluorescencia.

Anti-tubulina tirosinada (YL1/2): anticuerpo monoclonal de rata (*Sera-Lab England*).

Anti-tubulina tirosinada (TUB1A2): anticuerpo monoclonal de ratón (*Sigma*).

Anti-tubulina detirosinada (Anti-Glu): anticuerpo policlonal desarrollado en este laboratorio siguiendo el método de Gundersen et. al. [144].

Anticuerpos secundarios

Para revelar los anticuerpos primarios se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugados con FITC y rodamina, respectivamente; anti-IgG de rata conjugado a rodamina (*Jackson Immunoresearch*

Labs, Inc. West Grove, PA); anti-IgG de conejo hecho en cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma).

Fragmentos de ADNc de la TTL (Lig1 y Lig2)

Los fragmentos de ADN denominados Lig1 y Lig2, cuyas secuencias se muestran más abajo, corresponden a la porción terminal amino de la enzima TTL de rata. Los mismos fueron amplificados mediante PCR por el Dr. Carlos O. Arregui y fue la herramienta molecular de partida para iniciar este trabajo de tesis. El fragmento Lig1 comienza desde el ATG correspondiente al marco de lectura abierto de la TTL de rata y codifica desde el aminoácido 1 hasta el 148. La secuencia Lig2 codifica desde el aminoácido 76 hasta el 220.

Lig1:

```
ATGTACACCT TCGTGGTGCG CCAGGAGAAT AGCAGCGTCT ACGCCGAGGT CTCCCGGCTG
CTGCTGGCCA CCGGCTACTG GAAGAGGCTG CGGCGGGACA ACCCCAGGTT CAACCTGATG
CTGGGCGGAA GGAACCGACT GCCTTTCGGG AGACTAGGAC ACGAACCTGG GCTGGCACAG
CTGGTGAACT ACTACAGGGG GGCCGACAAA CTGTGCCGCA AAGCTTCCTT AGTGAAGCTA
GTCAAGACCA GTCCGGAAct GTCTGAGTCC TGCTCATGGT TCCCGAGTC CTATGTGATT
CATCCAActA ACCTCAAGAC GCCAGTCGCT CCAGCGCAGA ATGGCATCCA GCTTCCGGTC
AGTAACTCCA GGACAGATGA GAGAGAATTC TTCTTGGCTT CTTATAACAG AAAGAAAGAG
GACGGGGAAG GCAACGTTTG GATTGC
```

Lig 2:

```
AGTGAAGCTA GTCAAGACCA GTCCGGAAct GTCTGAGTCC TGCTCATGGT TCCCGAGTC
CTATGTGATT CATCCAActA ACCTCAAGAC GCCAGTCGCT CCAGCGCAGA ATGGCATCCA
GCTTCCGGTC AGTAACTCCA GGACAGATGA GAGAGAATTC TTCTTGGCTT CTTATAACAG
AAAGAAAGAG GACGGGGAAG GCAACGTTTG GATTGCAAAG TCATCAGCTG GTGCCAAAGG
CGAAGGCATC CTCATCTCCT CAGAGGCGTC AGAGCTTCTG GATTTTATAG ACAACCAGGG
CCAAGTGCAC GTGATCCAGA AATACCTCGA GCACCTCTG CTCCTCGAGC CCGGTCACCG
CAAGTTTGAC ATTCGAAGCT GGGTCCTGGT TGACCACCAG TATAACATCT ACCTCTACAG
AGAGGGTGTG C
```

Expresión de tubulina tirosina ligasa recombinante y producción de un anticuerpo anti-TTL

Se generó un anticuerpo policlonal contra una proteína recombinante de la porción terminal amino de la tubulina TTL fusionada a la enzima glutatión S-transferasa. Para la expresión de esta porción de la secuencia de la TTL, de 185 aminoácidos, los fragmentos de PCR Lig1 y Lig2 fueron ligados entre si y subclonados en el marco de lectura correcto entre los sitios Bam HI y Xho I del plásmido pGEX-4T-1 (*Pharmacia*). Dicho vector fue usado para transformar la cepa de *E. coli* DH5 α e inducir la expresión de la proteína recombinante en 0,1 mM de IPTG durante 5 horas a 37°C. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 14.000xg a 4°C, lavadas con PBS y lisadas mediante sonicación en presencia de lisozima 300 μ g/ml y PMSF 1mM. Luego de incubaciones secuenciales a 37°C durante 30 min con RNAsa y DNAsa (20 μ g/ml) y con 1% (v/v) de TX-100 (30 min a 37°C), el material fue centrifugado a 10000xg durante 5 min. Las proteínas del sobrenadante y precipitado fueron analizados por SDS-PAGE. La proteína de fusión (fragmento de TTL más Glutatión S-transferasa) de 47 kDa se encontró en el precipitado. Para inmunizar conejos se utilizó aproximadamente 0,5 mg de la proteína recombinante, obtenida por electroelución de un SDS-PAGE preparativo, con adjuvante de Freund (1:1 v/v). Una inyección de refuerzo (0,25 mg proteína recombinante, adjuvante de Freund en relación 1:1 v/v) fue administrada al mes posterior a la primera inmunización. El suero inmune fue obtenido luego de los primeros 10 días del refuerzo y periódicamente cada semana.

Detección de la TTL mediante "inmunoblot"

Para la metodología de "inmunoblot", el tejido en estudio se homogeneizó en frío en PBS conteniendo PMSF 2 mM. Luego de centrifugar a 100000xg durante 60 min a 4°C, se separó la fracción sobrenadante y se determinó la cantidad de proteína utilizando el método de ensayo proteico cuantitativo de Bio-Rad (No de Catálogo 500-0006. Bio-Rad laboratories, Mississauga, Ontario). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% [195], transferidas a filtros de nitrocelulosa y ensayadas con el anticuerpo policlonal anti-TTL (dilución de 1/600) durante 12 hs a 4°C. Los inmunocomplejos fueron detectados usando un anticuerpo

secundario anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina (1/200) y sustratos BCIP/NBT [196,197].

Inmunocitoquímica en tejido muscular

Para los experimentos de inmunocitoquímica en tejido muscular, las extremidades traseras de ratas de 1 y 30 días postnatal fueron disecadas y el tejido fue fijado durante 12 hs en paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS a 4°C. Luego los tejidos fueron lavados en PBS, incubados 24 horas a 4°C en sacarosa 30% y embebidas en Tissue-Tex O.C.T. Compound (Miles Inc.) a -70°C. Criocortes de 15 µm de espesor fueron colocados en cubreobjetos cubiertos con polilisina, lavados con PBS, permeabilizados con TX-100 en PBS durante 5 min y bloqueadas con albúmina de suero bovina al 3% en PBS durante 60 min. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante 60 min a 37°C. Para detectar la tubulina tirosinada se utilizó el anticuerpo monoclonal TUB-1A2 diluido a una concentración de trabajo de 1/600. Para determinar tubulina detirosinada se utilizó el anticuerpo policlonal, preparado en este laboratorio (dilución de 1/100). Se emplearon los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugados con rodamina y FITC, respectivamente. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados a una dilución de 1/70. Las preparaciones fueron incubadas durante 60 min a 37°C. Los portaobjetos fueron montados en glicerol/Tris-HCl 1 M (pH 8). La visualización de los preparados fue llevado a cabo usando un microscopio de fluorescencia Axioplan (*Carl Zeiss, Inc.*).

Cultivo primario de tejido muscular

El músculo de las extremidades traseras de ratas recién nacidas fue separado de la piel, tejido conectivo y hueso y colocado en buffer. El tejido muscular fue cortado en pequeñas porciones, tratado con tripsina al 0,12 % (p/v) durante 20 min a 37°C y disociado mecánicamente usando una pipeta pasteur. Luego de agregar un volumen de suero fetal bovino, las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio Dulbecco suplementado con 10% suero fetal bovino (Gibco BRL, Burlington, Ontario). Las células fueron sembradas en cubre objetos cubiertos con laminina (4 mg/cm²) a una densidad de aproximadamente 10⁶ células/ml. El medio de cultivo fue renovado cada dos días. Para obtener cultivos ricos en miotubos y fibras contráctiles,

los cultivos fueron mantenidos en estas condiciones por 1 a 2 semanas previo al análisis.

Preparación de sondas de ARN

Sondas de ARN con orientación sentido y antisentido a la secuencia del fragmento de PCR Lig1 fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro*. La secuencia del fragmento Lig1, subclonada en el vector pBluescript, esta flanqueada en su extremo 3' por el promotor viral T3 y en su extremo 5' por el promotor T7. Dichos promotores fueron los que determinaron la orientación sentido o antisentido de la sonda de ARN. Para la síntesis de dichas sondas se utilizaron dos ARN polimerasas una de ellas reconoce específicamente el promotor T3 y otra el promotor T7. La reacción de transcripción fue llevada a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µg de plásmido linealizado, Tris-HCl 40 mM (pH 8), MgCl₂ 6 mM, DTT 10 mM, spermidina 2 mM, NaCl 10 mM, RNAsin 0,1U/µl, rATP 1 mM, rGTP 1 mM, rCTP 1 mM, rUTP 0,65 mM, DIG-UTP (DIG-UTP equivale a digoxigenina acoplado a UTP) 0,35 mM y 40 U de T3 ó deT7 ARN polimerasa (*Promega*). Luego de incubar la mezcla durante dos horas a 37°C, el rendimiento de la reacción de marcación se determinó analizando el producto mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa [198]. Las sondas fueron utilizadas a una concentración de 300 ng/ml.

El ADNc clonado de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH,1.2 kb) [199], utilizado para hacer sondas de ARN de esta enzima, fue provisto por la Dra. Lisa McKerracher (McGill University, Montreal).

Hibridizaciones in situ

Para las hibridizaciones *in situ* en secciones, se disecaron las extremidades traseras de embriones de rata de 19 días, y de animales de 1 y 30 días postnatal. Las secciones se fijaron y colectaron como se describió anteriormente. Las secciones fueron permeabilizadas con TX-100 0,2% en PBS durante 10 min, lavadas con PBS y digeridas con 10 µg/ml de proteinasa K (*Sigma*) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente, las secciones fueron incubadas con 2 mg/ml de glicina en PBS y luego con ácido acético 20% durante 15 min. Las muestras fueron prehibridizadas en una cámara húmeda con solución de prehibridización (ver soluciones) durante tres horas a 65°C. La hibridización se realizó a 65°C durante 12

hs en una solución de igual composición que la solución de prehibridización, excepto que el ADN de esperma de salmón fue sustituido por 300 ng/ml de la sonda marcada con digoxigenina. Los cubreobjetos fueron lavados una vez con SSC 2X durante 20 min, dos veces en SSC 0,2X y dos veces en SSC 0,1X a la misma temperatura de hibridización. Luego de bloquear los cubreobjetos con una solución de BSA al 3% en TBS durante 90 min, los mismos fueron incubados a 37°C durante 60 min con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1/1000). Los anticuerpos no unidos fueron eliminados mediante lavados con TBS. El producto de la reacción fue visualizado usando los sustratos NBT/BCIP de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Gibco BRL).

Para las hibridaciones "*in situ*" de células en cultivo, las células fueron previamente lavadas con PBS y luego fijadas durante 20 min en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, permeabilizadas durante 10 min con TX-100 0,2% en PBS e incubadas con solución de prehibridización. Los pasos de prehibridización, hibridización, lavados y detección inmunológica se llevaron a cabo tal como se describió para los tejidos.

Rastreo en una librería de ADNc de bulbo olfatorio de rata construida en el vector λ ZAP II (*Stratagene*)

Para el aislamiento del ADNc de la TTL se utilizó una genoteca de expresión de bulbo olfatorio de rata construida en lambda ZAPII utilizando oligonucleótidos de secuencia al azar y de politimina. La genoteca contiene $2 \cdot 10^{10}$ unidades formadoras de placa por ml, con un tamaño promedio de inserto de 1,2 kb. El protocolo seguido para este rastreo, fue el que se describe en las instrucciones del fabricante y en la literatura [198]. En resumen, 5 ml de la cepa BB4 de *E. Coli*, crecida en medio LB a saturación, fueron centrifugados y el precipitado resuspendido nuevamente en 2 ml de medio LB en presencia de Mg_2SO_4 10 mM, y maltosa 0,02% (p/v). Seguidamente las células se infectaron con la genoteca para generar aproximadamente $5 \cdot 10^4$ unidades formadoras de placa (pfu) sobre cápsulas de petri (150 mm) con medio de cultivo LB y agar al 1,2%. Posteriormente las cápsulas fueron incubadas a 37°C durante 4-5 hs. Transcurrido dicho tiempo se apoyaron sobre la superficie del medio de cultivo filtros de nitrocelulosa (0,45 μ m). Cada uno de los filtros fue sumergido durante 5 min en las siguientes soluciones: solución desnaturante, solución neutralizante y buffer SSC

6X. Luego los filtros fueron secados entre papeles Whatman 3MM y se calentaron en estufa a 80°C durante 90 min. Como sonda para el rastreo del ADNc de la TTL, se utilizó el fragmento de PCR Lig1 marcado radioactivamente con α -dATP-[³²P] (ver más abajo). Los filtros de nitrocelulosa se prehibridizaron a 42°C durante 4 hs en solución de prehibridización, luego se hibridizó durante 12 hs a la misma temperatura, en 20 ml de solución de prehibridización conteniendo la sonda radioactiva ($1,7 \cdot 10^6$ cpm/ml).

En un primer rastreo se analizaron 300.000 clones. La confirmación de los clones positivos detectados en el rastreo primario se realizó mediante rastreos secundarios y terciarios a baja densidad de unidades formadoras de placas. Los clones positivos se conservaron en buffer SM a 4°C en presencia de cloroformo.

Síntesis de sondas radioactivas. Marcado de un fragmento de PCR con α -dATP-[P³²]

La marcación radioactiva se llevó a cabo siguiendo el método de "oligo marcación" del ADN descrito por Freinberg et. al. 1983 y 1984 [200; 201]. El fragmento Lig1, utilizado como sonda, fue purificado de geles de agarosa de bajo punto de fusión. El sistema de incubación para el marcado contenía: 64 ng del fragmento precalentado a 95-100°C, OLB 10 μ l (ver soluciones), gelatina 2 μ l (0,8 mg/ml), Klenow 2 unidades, α -dATP-[³²P] (50 μ Ci) en un volumen final de 50 μ l; la mezcla se incubó a 37°C durante 4 horas. Posteriormente se midió la incorporación del nucleótido radioactivo a la sonda siguiendo el método de precipitación de ácidos nucleicos descrito según Maniattis et. al [198] .

Escisión in vivo de los clones positivos encontrados usando el sistema EXASSIST™/ SOLR™

Para el protocolo de escisión de los clones positivos de lambda ZAPII se siguió estrictamente las indicaciones del fabricante de la genoteca (Stratagene). Brevemente, las cepas de *E. coli* XL1Blue MRF' y SOLR fueron crecidas a saturación en medio LB. Ambos cultivos se diluyeron 1/100 y se volvió a crecer hasta OD₆₀₀ = 1. La cepa XL1Blue (200 μ l) fue infectada con el fago positivo ($1 \cdot 10^5$ partículas de fago) conjuntamente con el fago "helper" VCM. ($1 \cdot 10^6$ pfu/ml). La mezcla fue incubada a 37°C durante 15 min. Seguidamente se le agregó 2 ml de medio LB y fue incubada

por 3 hs más. El preparado se centrifugó durante 15 min a 2000xg y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo el cual fue calentado a 70°C durante 15 min y centrifugado nuevamente a 4000xg durante 15 min. El sobrenadante contenía fagémidos con el ADNc clonado. Para la obtención del plásmido con el inserto clonado, 200 µl de células SOLR fueron incubadas a 37°C durante 15 min con 10 µl de los fagémidos y un fago "helper" denominado ExAssist (1.10⁶ pfu/ml). De esta mezcla se "plaqueó" 50 µl en cápsulas de petri con 50 µg/ml de ampicilina. Las colonias que crecieron en ellas fue debido a la resistencia otorgada por el vector Bluescript SK⁻, indicando la recuperación del inserto de interés en dicho plásmido. Este vector posee el inserto dentro del sitio de clonaje entre dos sitios Eco R I.

Secuenciamiento del ADNc

La determinación de la secuencia de nucleótidos se llevó a cabo según el método de terminación de la síntesis de cadena por el agregado de dideoxinucleótidos descrito por Sanger [202]. Para esto se utilizó el "kit" "Sequenase, version 2.0" (USB) y como deoxinucleótido radioactivo, α -dATP-[³⁵S]. El protocolo seguido fue el descrito en el "kit". Los oligonucleótidos o "primers" utilizados para el secuenciamiento fueron inicialmente los utilizados en la amplificación por PCR de los fragmentos Lig1 y Lig2 y posteriormente "primers" diseñados sobre la base de la secuencia del ADNc que se iba determinando. Una vez finalizadas las reacciones, las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 90°C y se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-bisacrilamida 5,7%-0,3%, respectivamente y urea 7 M. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TBE a 50-55 W y una vez finalizada, los geles fueron colocados sobre papel Wattman 3MM y se secaron en vacío. Los geles se expusieron a placas radiográficas durante 24-36 horas a temperatura ambiente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa [203] fue utilizada para la amplificación de los siguientes fragmentos: Lig1, Lig2 y la porción codificante completa del ADNc de la TTL.

Oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento Lig1 (446 pb):

5' ATGTACACCTTCGTGGTG 3'

5' GCAATCCAAACATTGCCCTC 3'

La reacción de amplificación de este fragmento se realizó con 35 ciclos cada uno en las siguientes condiciones: calentamiento de la mezcla de reacción a 94° C durante 60 segundos, enfriamiento a 55° C durante 30 segundos y calentamiento a 72° C durante 90 segundos.

Oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento Lig2 (431 pb):

5' TAGTGAAGCTCATCAAGACCAC 3'

5' GCACACCTTCTCTGTAGAGGTA 3'

La reacción de amplificación de este fragmento se realizó con 35 ciclos cada uno en las siguientes condiciones: calentamiento de la mezcla de reacción a 94° C durante 60 segundos, enfriamiento a 57° C durante 30 segundos y calentamiento a 72° C durante 90 segundos.

Oligonucleótidos utilizados para amplificar la región codificante completa (1272 pb):

5' CAGACTCTCTAGATAATCCGGAGC 3'

5' TTTCCCGGGGTGGCTCTGTGCCTT 3'

La reacción de amplificación de este fragmento se realizó con 33 ciclos cada uno en las siguientes condiciones: calentamiento de la mezcla de reacción a 94° C durante 60 segundos, enfriamiento a 55° C durante 60 segundos y calentamiento a 72° C durante 120 segundos.

Cada una de las reacciones se llevó a cabo con aproximadamente 50 ng de ADN templado, 15 pmoles de primers, 2,5 U de taq ADN polimerasa y una concentración final de 200 µM de cada uno de los deoxinucleótidos.

Subclonados de fragmentos de ADN en plásmidos

Los pasos de subclonados fueron realizados utilizando los procedimientos básicos descritos según Sambrook et. al. [198].

Transfecciones de células CHO-K1 con plásmidos

Para las transfecciones de las células CHO-K1, se utilizó el liposoma catiónico lipofectamina (*Life technologies*, BRL) como compuesto de internalización de los complejos liposoma-ADN. El protocolo empleado en esta metodología fue el recomendado por el fabricante. Brevemente, las células se sembraron en cubres objetos dentro de cápsulas de 35 mm a una densidad celular de 80%. En cada mezcla de transfección se utilizaron por cada cápsula 2 µg de ADN purificados por el kit de purificación "Wizard Minipreps" (*Promega*) y 6 µl de lipofectamina. La mezcla de transfección carecía de suero y antibióticos, los que fueron añadidos 5 horas más tarde. Luego de transcurrido 24 horas de incubación, el medio de transfección fue removido y reemplazado por medio de cultivo fresco. Las células transfectadas se procesaron a las 48 y 72 horas postransfección para ensayos inmunocitoquímicos.

Inmunocitoquímica en células CHO-K1 en cultivo

Células transfectadas con ADN anti-TTL o con ADNc de la mutante dominante negativa o con el vector pTracer sin inserto, fueron lavadas con PBS, y posteriormente fijadas durante 7 min a -20°C con metanol. Seguidamente las células fueron lavadas nuevamente con PBS y bloqueadas con una solución de albúmina sérica bovina (*Sigma*) al 5% en PBS a 37°C durante 90 min. Luego las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante 12 hs a 4°C en las siguientes diluciones en PBS-albúmina 5%: YL1/2 (específico contra tubulina tirosinada [204]) (dilución de 1:700), anti-Glu (específico contra tubulina detirosinada [205]) (dilución de 1:300) y anti-TTL [206] (dilución de 1:600). Luego de incubar las células con los anticuerpos secundarios estas fueron lavadas con PBS-Tween 0,5% e incubadas durante 1 h a 37°C con los siguientes anticuerpos secundario: anti-IgG de rata conjugados a fluoresceína y anti-IgG conejo conjugados a rodamina. Los anticuerpos secundarios fueron lavados con PBS y PBS/tween 0,5%. Posteriormente, los cubreobjetos fueron montados en glicerol/Tris-HCl 1 M, (pH 8). Los preparados fueron observados usando un microscopio de fluorescencia Axioplan (*Carl Zeiss, Inc.*). Se tomaron fotografías de los preparados con una cámara sensible a la luz fluorescente (*Princeton Inc.*) acoplada al microscopio Axioplan (*Carl Zeiss, Inc.*) y las mismas fueron procesadas por el programa de análisis de imágenes *Metamorph* Versión 3.0 (1997, *Universal Imaging Corporation, USA*).

Obtención de extractos citosólicos de células transfectadas

Los extractos citosólicos de las células transfectadas con las distintas construcciones fueron obtenidos 48 horas post-transfección. Las células transfectadas se resuspendieron a una concentración de $21 \cdot 10^6$ células/ml en el siguiente buffer: Tris-HCl (pH 7,4) 0,05M, $MgCl_2$ 0,015M KCl 0,1M, leupeptina 5 μ g/ml y PMSF 10 μ g/ml (Buffer de TTL). Seguidamente las células fueron sonicadas sobre un baño de hielo durante 20 segundos en el nivel 0,8 del microtip y luego se centrifugaron a 10000xg durante 60 min a 4°C. El sobrenadante, extracto citosólico de las células, fue utilizado como fuente de TTL.

Determinación de la actividad tirosina ligasa

Para la determinar la actividad de esta enzima, la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 200 μ l: 100 μ l del extracto citosólico de las células transfectadas, tubulina (200 μ g), ATP 4 mM, tirosina¹⁴C (New England), 0,2 μ Ci, buffer de TTL hasta completar 200 μ l. Luego de incubar la mezcla a 37°C durante 15 min la reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de ácido tricloroacético al 5% (v/v). La radioactividad unida a proteínas se determinó como se indica en el punto siguiente.

Medición de la radioactividad presente en el material insoluble en tricloroacético

La tirosina[¹⁴C] unida a tubulina se determinó midiendo la radioactividad presente en el material insoluble en tricloroacético al 5%. Luego de efectuar la reacción de incorporación, se adicionó al sistema 2 ml de ácido tricloroacético al 5% (v/v) y se incubó a 90°C durante 20 min. Luego de enfriar la mezcla a temperatura ambiente el material precipitado fue recogido en discos de papel Whatman N° 1. El material retenido fue lavado con 10 ml tricloroacético al 5% para eliminar la tirosina[¹⁴C] soluble. Luego los papeles fueron colocados en un recipiente adecuado, se les adicionó liquido de centelleo y se les determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

Purificación de Tubulina

Para medir la actividad de la TTL se utilizó como sustrato tubulina de cerebro de rata adulta. La tubulina fue purificada mediante dos ciclos de ensamblaje/desensamblaje [207]. Brevemente, los cerebros se homogeneizaron en el siguiente buffer: Mes 100 mM (pH 6,8) conteniendo EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, PMSF 1 mM y leupeptina 10 µg/ml. Posteriormente el homogeneizado se centrifugó a 100000xg durante una hora a 4°C. La tubulina, presente en el sobrenadante, se sometió al primer ciclo de polimerización durante 30 min a 37°C con el agregado de GTP 1 mM (concentración final). Los microtúbulos formados fueron centrifugados a 100000xg durante 45 min a 37°C. Los microtúbulos presentes en el precipitado se depolimerizaron mediante resuspensión a 4°C en el buffer de homogeneización. Los microtúbulos estables al frío que no se depolimerizaron se eliminaron centrifugando la mezcla a 4°C. La tubulina presente en el sobrenadante se sometió nuevamente a un segundo ciclo de polimerización; la tubulina obtenida fue resuspendida en el buffer de la TTL. Luego del segundo ciclo, la tubulina se resuspendió en el buffer de la TTL. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas de este preparado mediante el método de Lowry [208].

Análisis de homologías del ADNc de la TTL de rata con otros genes

La búsqueda de ADNs homólogos al ADNc de la TTL de rata en los bancos de datos de genes GenBank y EMBL se realizó utilizando el programa BLASTN (V. 2.0) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Los parámetros utilizados para esta búsqueda se muestran en la Tabla I. Estos mismos parámetros fueron utilizados por el programa BLASTP (V. 2.0,8 05-01-1999) [209] para buscar secuencias de proteínas homólogas a la secuencia de aminoácidos de la TTL de rata en los bancos de datos de secuencias de proteínas tal como SWISS-PROT y TrEMBL.

Tabla I

Parámetros	Valores
<i>Expectación:</i>	10
<i>Matriz de apareamiento:</i>	<i>blosum 62</i>
<i>Filtros de baja complejidad:</i>	<i>ninguno</i>
<i>Costo por separaciones</i>	11
<i>Cociente de lambda</i>	1

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las TT-ligasas fue realizado por el programa "Multiple Sequence Alignment V 1.0.1.1 (Copyright © 1998, InforMax, Inc.)" usando el algoritmo de Clustal W [210]. Se procedió de la siguiente manera: se realizó inicialmente un alineamiento múltiple empleando las secuencias de aminoácidos completas de las todas las TT-ligasas. Este alineamiento se hizo con parámetros preestablecidos del programa. El resultado de este alineamiento mostró que una porción de algunas secuencias como TT-ligasas aun no caracterizadas experimentalmente aun, poseían homología con las TT-ligasas de secuencia ya conocida. Las porciones homólogas de aquellas TT-ligasas "potenciales" fueron aisladas y nuevamente realineadas entre todas las TT-ligasas con los siguientes parámetros:

Parámetros de alineamiento

Tipo de alineamiento.....	"Pairwise"
Tamaño del K-tuple	1
Número de las mejores diagonales.....	5
Tamaño de la ventana.....	5
Penalidad por separaciones.....	3

Condiciones de alineamiento múltiple

Penalidad en la generación de separaciones.....	3
Penalidad en la extensión de separaciones.....	0,05
Rango de penalidad en la separación de separaciones.....	8
Penalidad en la separación de separaciones en los extremos	No
Retraso en el alineamiento con una identidad menor del	40%
Matriz de resolución de residuos	blosum

Perfil de la proteína

Penalidad en las separaciones para residuos con un "core" de alfa helice.....	4
Penalidad en las separaciones para residuos con un "core" hebra.....	4

Penalidad en las separaciones para estructuras de términos.....2
Penalidad en separaciones para regiones con "loop".....1
Número de residuos dentro de la hélice para ser tratados como terminal.....3
Número de residuos fuera de la hélice para ser tratados como terminal..0
Número de residuos dentro de la hebra para ser tratados como terminal.....1
Número de residuos dentro de la hebra para ser tratados como terminal.....1

Búsqueda de motivos de aminoácidos compartidos entre las TT-ligasas

Para la búsqueda de motivos de aminoácidos compartidos entre las TT-ligasas se utilizó el programa MEME (Multiple EM for Motif Elicitation: Version 2.2) [211] (<http://www.sdsc.edu/MEME>). Los parámetros utilizados en esta búsqueda fueron los preestablecidos por el programa.

Alineamiento de los motivos

El alineamiento de los motivos fue realizado por el programa MAST (Motif Alignment and Search Tool: Version 2.2) [212] el cual comparte el mismo sitio en Internet que MEME. Los motivos arrojados por MEME fueron utilizados por MAST para realizar el alineamiento de los motivos en la secuencias de las TT-ligasas.

Bibliografía

- 1 Fyrberg EA, Bond BJ, Hershey ND, Mixer KS, Davidson N. (1981) The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. *Cell*; **24**: 107-16.
- 2 Bray D, Chapman K. (1985) Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *J Neurosci*; **5** :3204-13.
- 3 Fuchs E, Weber K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*; **63**:345-82.
- 4 Wiche G. Plectin: general overview and appraisal of its potential role as a subunit protein of the cytomatrix. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1989); **24**: 41-67
- 5 Wiche G, Gromov D, Donovan A, Castanon MJ, Fuchs. (1993) Expression of plectin mutant cDNA in cultured cells indicates a role of COOH-terminal domain in intermediate filament association. *J Cell Biol* ; **121**: 607-19
- 6 Svitkina TM, Verkhovsky AB, Borisy GG. (1996) Plectin side arms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol*; **135**: 991-1007.
- 7 Stappenbeck TS, Green KJ. (1992) The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells. *J Cell Biol*; **116**: 1197-209.
- 8 Tilney LG, Bryan J, Bush DJ, Fujiwara K, Mooseker MS, Murphy DB, Snyder DH. (1973) Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol*; **59**:267-75.
- 9 Burton PR, Himes RH J. (1978) Electron microscope studies of pH effects on assembly of tubulin free of associated proteins. Delineation of substructure by tannic acid staining. *Cell Biol*; **77** : 120-33.
- 10 Eichenlaub-Ritter U, Tucker JB. (1984) Microtubules with more than 13 protofilaments in the dividing nuclei of ciliates. *Nature* 5-11; **307**: 60-2.
- 11 Mogensen MM, Tucker JB, Stebbings H. (1989) Microtubule polarities indicate that nucleation and capture of microtubules occurs at cell surfaces in *Drosophila*. *J Cell Biol*; **108**: 1445-52.
- 12 Kirschner MW, Mitchison T. (1986) Microtubule dynamics. *Nature*; **324**: 621.
- 13 Margolis RL, Wilson L. (1978) Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state *in vitro*. *Cell*; **13**: 1-8.
- 14 Vorobjev IA, Svitkina TM, Borisy GG. (1997) Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci*; **110**: 2635-45.
- 15 Yvon AM, Wadsworth P. (1997) Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells. *J Cell Sci*; **110**: 2391-401.
- 16 Rodionov VI, Borisy GG. Microtubule treadmilling *in vivo*. *Science* (1997); **275**: 215-8.
- 17 Heidemann SR, Zieve GW, McIntosh JR. (1980) Evidence for microtubule subunit addition to the distal end of mitotic structures *in vitro*. *J Cell Biol*; **87**: 152-9.
- 18 Euteneuer U, McIntosh JR. (1981) Polarity of some motility-related microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **78**: 372-6.
- 19 Steven M. Murphy, Lenore Urbani, and Tim Stearns. (1998) The mammalian γ -tubulin complex

- contains homologues of the yeast spindle pole body components Spc97p and Spc98p *J. Cell Biol.* **141**: 663-674.
- 20 Saxton WM, Stemple DL, Leslie RJ, Salmon ED, Zavortink M, McIntosh JR. (1984) Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J Cell Biol*, **99**: 2175-86.
- 21 Schulze E, Kirschner M. (1986) Microtubule dynamics in interphase cells. *J Cell Biol*, **102** : 1020-31.
- 22 Olmsted JB. (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol*, **2**:421-57.
- 23 Desai A, Mitchison TJ. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**:83-117.
- 24 Matus A. (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci*; **11**:29-44.
- 25 Brugg B, Matus A J. (1988) PC12 cells express juvenile microtubule-associated proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Cell Biol*, **107**: 643-50.
- 26 Bloom GS, Luca FC, Vallee RB. (1984) Widespread cellular distribution of MAP-1A (microtubule-associated protein 1A) in the mitotic spindle and on interphase microtubules. *J. Cell Biol*; **98**: 331-40.
- 27 Huber G, Matus A. (1984) Immunocytochemical localization of microtubule-associated protein 1 in rat cerebellum using monoclonal antibodies. *J Cell Biol*; **98**: 777-81.
- 28 Riederer B, Matus A. (1985) Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; **82**:6006-9.
- 29 Murphy DB, Borisy GG. (1975) Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; **72**: 2696-700.
- 30 Sloboda RD, Rudolph SA, Rosenbaum JL, Greengard P. (1975) Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **72** : 177-81.
- 31 Burgoyne RD, Cumming R. (1984) Ontogeny of microtubule-associated protein 2 in rat cerebellum: differential expression of the doublet polypeptides. *Neuroscience*; **11**: 156-67.
- 32 Garner CC, Brugg B, Matus A. (1988) A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP2c), related to MAP2. *J Neurochem*; **50**: 609-15
- 33 Fellous A, Francon J, Lennon AM, Nunez. (1977) Microtubule assembly *in vitro*. Purification of assembly-promoting factors. *J Eur J Biochem*; **78**: 167-74.
- 34 Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC. (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem*; **66**: 1273-81.
- 35 Matus A .(1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci*; **11**:29-44.
- 36 Edson K, Weisshaar B, Matus A. (1993) Actin depolymerisation induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells. *Development*; **117**: 689-700.
- 37 Dinsmore JH, Solomon F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* **22**; **64** : 817-26 Dinsmore JH, Solomon F.
- 38 Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron*; **9**: 607-18.

- 39 Microtubule. Hyams y Lloyd 1994, New, New York: Wiley-Lis. 167-182
- 40 Ookata K, Hisanaga S, Bulinski JC, Murofushi H, Aizawa H, Itoh TJ, Hotani H, Okumura E, Tachibana K, Kishimoto T. (1995) Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol*; **128** : 849-62.
- 41 Pereira A, Doshen J, Tanaka E, Goldstein LS (1992) Genetic analysis of a Drosophila microtubule-associated protein. *J Cell Biol*; **116**: 377-83.
- 42 Wang XM, Peloquin JG, Zhai Y, Bulinski JC, Borisy GG. (1996) Removal of MAP4 from microtubules in vivo produces no observable phenotype at the cellular level. *J Cell Biol*; **132**: 345-57.
- 43 Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **72**: 1858-62.
- 44 Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **85**:4051-5.
- 45 Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **85**: 4506-10.
- 46 Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **17**; **360**: 674-7.
- 47 Bre MH, Karsenti E. (1990) Effects of brain microtubule-associated proteins on microtubule dynamics and the nucleating activity of centrosomes. *Cell Motil Cytoskeleton*; **15**: 88-98.
- 48 Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*; **3**: 1141-54
- 49 Caceres A, Kosik KS. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*; **343**: 461-3.
- 50 Caceres A, Potrebic S, Kosik KS. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci*; **11**: 1515-23.
- 51 Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L. (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol*; **114**: 725-33.
- 52 Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein *Nature*, **369**: 488-91.
- 53 Nogales E, Wolf SG, Downing KH. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*; **391**: 199-203.
- 54 Jan löwe and Linda A. Amos. (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein: FtsZ. *Nature* **391**, 203-206.
- 55 Pennisi E. (1998) Structure of key cytoskeletal protein tubulin revealed. *Science* **9**; 279: 176-7.
- 56 Raff EC. (1984) Genetics of microtubule systems. *J Cell Biol*; **99**(1 Pt 1):1-10.
- 57 Sullivan KF, Cleveland DW. (1986) Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **83**: 4327-31.

- 58 Sullivan KF. (1988) Structure and utilization of tubulin isotypes. In Palade GE, Alberts BM, Spudich JA (eds): Annual review of Cell Biology. Palo Alto, CA: Annual Reviews, Inc., pp 687-716.
- 59 Joshi HC, Cleveland DW. (1989) Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol*; **109**: 663-73.
- 60 Bialojan S, Falkenburg D, Renkawitz-Pohl R. (1984) Characterization and developmental expression of beta tubulin genes in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J*; **3**: 2543-8.
- 61 Matthews KA, Miller DF, Kaufman TC. (1989) Developmental distribution of RNA and protein products of the *Drosophila* alpha-tubulin gene family. *Dev Biol* ; **132**: 45-61.
- 62 Wallis KT, Machlin PS, Ratrie H 3d, Cleveland DW, Murphy DB. (1987) The sequence and expression of the divergent beta-tubulin in chicken erythrocytes. *J Biol Chem* **15**; **262**: 14305-12.
- 63 Monteiro MJ, Cleveland DW. (1988) Sequence of chicken c beta 7 tubulin. Analysis of a complete set of vertebrate beta-tubulin isotypes. *J Mol Biol*; **199**: 439-46.
- 64 Lewis SA, Gilmartin ME, Hall JL, Cowan NJ. (1985) Three expressed sequences within the human beta-tubulin multigene family each define a distinct isotype. *Mol Biol*; **182**: 11-20.
- 65 Lewis SA, Lee MG, Cowan NJ. (1985) Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol*; **101**: 852-61.
- 66 Schatz PJ, Solomon F, Botstein D. (1986) Genetically essential and non essential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol Cell Biol*; **6**: 3722-33.
- 67 Schatz PJ, Pillus L, Grisafi P, Solomon F, Botstein D. (1986) Two functional alpha-tubulin genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encode divergent proteins. *Mol Cell Biol*; **6**: 3711-21.
- 68 May GS, Gambino J, Weatherbee JA, Morris NR. (1985) Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*; **101**: 712-9.
- 69 Rudolph JE, Kimble M, Hoyle HD, Subler MA, Raff EC. (1987) Three *Drosophila* beta-tubulin sequences: a developmentally regulated isoform (beta 3), the testis-specific isoform (beta 2), and an assembly-defective mutation of the testis-specific isoform (B2t8) reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for beta-tubulin function. *Mol Cell Biol*; **7** : 2231-42.
- 70 Weil CF, Oakley CE, Oakley BR. (1986) Isolation of mip (microtubule-interacting protein) mutations of *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*; **6**: 2963-8.
- 71 Oakley CE, Oakley BR. (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*; **338**: 662-4
- 72 Zheng Y, Jung MK, Oakley BR. (1991) Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*; **65**: 817-23
- 73 Stearns T, Evans L, Kirschner M. (1991) Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell*; **65**: 825-36.
- 74 MacRae TH. (1997) Tubulin post-translational modifications enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem*; **244**: 265-78.
- 75 McKeithan TW, Rosenbaum JL. (1981) Multiple forms of tubulin in the cytoskeletal and flagellar microtubules of *Polytomella*. *J Cell Biol*; **91**(2 Pt 1):352-60.

- 76 McKeithan TW, Lefebvre PA, Silflow CD, Rosenbaum JL. (1983) Multiple forms of tubulin in *Polytomella* and *Chlamydomonas*: evidence for a precursor of flagellar alpha-tubulin. *J Cell Biol*; **96**: 1056-63.
- 77 Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL. (1986) The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol*; **103**: 571-9.
- 78 Piperno G, LeDizet M, Chang X. (1987) Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*; **104**: 289-302.
- 79 Piperno G, Fuller MT (1985) Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol*; **101**: 2085-94.
- 80 Warn RM, Harrison A, Planques V, Robert-Nicoud N, Wehland J. (1990) Distribution of microtubules containing post-translationally modified alpha-tubulin during *Drosophila* embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*; **17**: 34-45.
- 81 Huang RF, Lloyd CW. (1999) Gibberellic acid stabilises microtubules in maize suspension cells to cold and stimulates acetylation of alpha-tubulin. *FEBS Lett*; **443**: 317-20.
- 82 Walden PD, Blindt AB, Birkett CR, Cox RA, Gull K. (1989) Recognition of specific *Physarum* alpha-tubulin isotypes by a monoclonal antibody. Sequence heterogeneity around the acetylation site at lysine 40. *Eur J Biochem*; **185**: 383-9.
- 83 Schneider A, Sherwin T, Sasse R, Russell DG, Gull K, Seebeck T. (1987) Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same alpha-tubulin isoforms. *J Cell Biol*; **104** : 431-8.
- 84 Webster DR, Borisy GG. (1989) Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci*; **92**: 57-65.
- 85 Robson SJ, Burgoyne RD (1989) Differential localisation of tyrosinated, detyrosinated, and acetylated alpha-tubulins in neurites and growth cones of dorsal root ganglion neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*; **12**: 273-82.
- 86 Gundersen GG, Khawaja S, Bulinski JC. (1989) Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol*; **109**: 2275-88.
- 87 Jasmin BJ, Changeux JP, Cartaud J (1990) Compartmentalization of cold-stable and acetylated microtubules in the subsynaptic domain of chick skeletal muscle fibre. *Nature*; **344** 673-5.
- 88 Gaertig J, Cruz MA, Bowen J, Gu L, Pennock DG, Gorovsky MA. Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Biol* 1995; **129** : 1301-10.
- 89 Kozminski KG, Diener DR, Rosenbaum JL. (1993) High level expression of nonacetylatable alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil Cytoskeleton*; **25**: 158-70.
- 90 Reddington, M., Tan LP and Lagnado JR (1976). The phosphorylation of brain proteins microtubular *in situ* and *in vitro*. *J. Neurochemistry* **27**, 1229-1236.
- 91 Burke BE, DeLorenzo RJ. (1981) Ca^{2+} - and calmodulin-stimulated endogenous phosphorylation of neurotubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **78**: 991-5.
- 92 Burke BE, DeLorenzo RJ (1982) Ca^{2+} and calmodulin-dependent phosphorylation of endogenous synaptic vesicle tubulin by a vesicle-bound calmodulin kinase system. *J Neurochem*; **38** : 1205-18.
- 93 Burke BE, DeLorenzo RJ. (1982) Ca^{2+} and calmodulin-regulated endogenous tubulin kinase activity in presynaptic nerve terminal preparations. *Brain Res*; **236**: 393-415.

- 94 Larson RE, Goldenring JR, Vallano ML, DeLorenzo RJ (1985) Identification of endogenous calmodulin-dependent kinase and calmodulin-binding proteins in cold-stable microtubule preparations from rat brain. *Neurochem*; **44**: 1566-74.
- 95 Fukunaga K, Yamamoto H, Matsui K, Higashi K, Miyamoto E. (1982) Purification and characterization of a Ca^{2+} - and calmodulin-dependent protein kinase from rat brain. *J Neurochem*; **39**: 607-17.
- 96 Nomura T, Kumatoriya K, Yoshimura Y, Yamauchi T. (1997) Overexpression of alpha and beta isoforms of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in neuroblastoma cells H-7 promotes neurite outgrowth. *Brain Res*; **766**:129-41.
- 97 Yamauchi T, Yoshimura Y, Nomura T, Fujii M, Sugiura H. (1998) Neurite outgrowth of neuroblastoma cells overexpressing alpha and beta isoforms of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-effects of protein kinase inhibitors. *Brain Res Brain Res Protoc*; **2** : 250-8
- 98 Goshima Y, Ohsako S, Yamauchi T. (1993) Overexpression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in Neuro2a and NG108-15 neuroblastoma cell lines promotes neurite outgrowth and growth cone motility. *J Neurosci*; **13**: 559-67.
- 99 Diaz-Nido J, Serrano L, Mendez E, Avila J. (1988) A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B during neuroblastoma cell differentiation. *J Cell Biol*; **106**: 2057-65.
- 100 Gard DL, Kirschner MW 1985 A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol*; **100**: 764-74.
- 101 Ludueña RF, Zimmermann HP, Little M. (1988) Identification of the phosphorylated beta-tubulin isotype in differentiated neuroblastoma cells. *FEBS Lett*; **230**:142-6.
- 102 Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbryeres E, Gros F, Denoulet P. (1990) Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science*; **247**: 83-5.
- 103 Regnard C, Audebert S, Desbryeres, Denoulet P, Edde B. (1998) Tubulin polyglutamylase: partial purification and enzymatic properties. *Biochemistry*; **37**: 8395-404.
- 104 Audebert S, Desbryeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B. (1993) Reversible polyglutamylated alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol Biol Cell*; **4**: 615-26.
- 105 Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Prome JC, Desbryeres E, Gros F, Denoulet P (1992) Polyglutamylated alpha-tubulin can enter the tyrosination/detyrosination cycle. *Biochemistry*; **31**: 403-10
- 106 Rudiger M, Weber K. (1993) Characterization of the post-translational modifications in tubulin from the marginal band of avian erythrocytes. *Eur J Biochem* **15**; **218**: 107-16.
- 107 Delgado-Viscogliosi P, Brugerolle G, Viscogliosi E. (1996) Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*. *Cell Motil Cytoskeleton*; **33**: 288-97.
- 108 Weber K, Schneider A, Westermann S, Muller N, Plessmann U (1997) Posttranslational modifications of alpha- and beta-tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote. *FEBS Lett*; **419**: 87-91.
- 109 Wolff A, de Nechaud B, Chillet D, Mazarguil H, Desbryeres E, Audebert S, Edde B, Gros F, Denoulet P (1992) Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur J Cell Biol*; **59**: 425-32.

- 110 Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Gros F, Denoulet P, Edde B. (1994) Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci*; **107**: 2313-22.
- 111 Przyborski SA, Cambray-Deakin MA. (1997) Profile of glutamylated tubulin expression during cerebellar granule cell development *in vitro*. *Brain Res Dev Brain Res*; **100**: 133-8.
- 112 Bobinsec Y, Moudjou M, Fouquet JP, Desbroyeres E, Edde B, Bornens M (1998) Glutamylated of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton*; **39**: 223-32
- 113 Bobinsec Y, Khodjakov A, Mir LM, Rieder CL, Edde B, Bornens M (1998) Centriole disassembly *in vivo* and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol*; **143** : 1575-89.
- 114 Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, Le Caer JP, Rossier J, Adoutte A, Bre MH. (1994) Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*; **266**: 1688-91.
- 115 Vinh J, Langridge JI, Bre MH, Levilliers N, Redeker V, Loyaux D, Rossier J. (1999) Structural characterization by tandem mass spectrometry of the posttranslational polyglycylation of tubulin. *Biochemistry*; **38**: 3133-9.
- 116 Bre MH, Redeker V, Quibell M, Darmanaden-Delorme J, Bressac C, Cosson J, Huitorel P, Schmitter JM, Rossler J, Johnson T, Adoutte A, Levilliers N 1996 Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *J Cell Sci Apr*; **109**: 727-38.
- 117 Levilliers N, Fleury A, Hill AM. (1995) Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin. *J Cell Sci*; **108**: 3013-28.
- 118 Bressac C, Bre MH, Darmanaden-Delorme J, Laurent M, Levilliers N, Fleury A. (1995) A massive new posttranslational modification occurs on axonemal tubulin at the final step of spermatogenesis in *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* **67**: 346-55.
- 119 Bre MH, Redeker V, Vinh J, Rossier J, Levilliers N. (1998) Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* **9**: 2655-65.
- 120 Barra HS, Rodriguez JA, Arce CA, Caputto R. (1973) A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins [¹⁴C]arginine by a ribonuclease-sensitive system and [¹⁴C]-tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem*; **20**: 97-108.
- 121 Barra HS, Arce CA, Rodriguez JA, Caputto R. (1974) Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochem Biophys Res Commun*; **60**:1384-90.
- 122 Arce CA, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R. (1975) Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem*; **59**:145-9.
- 123 Greer, K. Y Rosenbaum, JL. (1989) Kinesin, Dynein, and microtubule Dynamics en Cell Movement, Vol 2, pp.47-66.
- 124 Thompson WC. (1982) The cyclic tyrosination/detyrosination of alpha tubulin. *Methods Cell Biol*; **24**: 235-55.
- 125 Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R. (1977) Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett*; **73**:147-50.

- 126 Arce CA, Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R. (1978) Capability of tubulin and microtubules to incorporate and to release tyrosine and phenylalanine and the effect of the incorporation of these amino acids on tubulin assembly. *J Neurochem* **31**: 205-10.
- 127 Beltramo DM, Arce CA, Barra HS. (1987) Tubulin, but not microtubules, is the substrate for tubulin:tyrosine ligase in mature avian erythrocytes. *J Biol Chem*; **262**: 15673-7.
- 128 Bre MH, Kreis TE, Karsenti E. (1987) Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J Cell Biol*; **105**: 1283-96.
- 129 Gundersen GG, Khawaja S, Bulinski JC. (1987) Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J Cell Biol*; **105**: 251-64.
- 130 Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG. (1987) Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J Cell Biol*; **105**: 265-76.
- 131 Wehland J, Weber K. (1987) Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J Cell Sci*; **88**: 185-203.
- 132 Arce CA, Barra HS. (1983) Association of tubuliny-tyrosine carboxypeptidase with microtubules. *FEBS Lett*; **157**: 75-8.
- 133 Arce CA, Barra HS. (1985) Release of C-terminal tyrosine from tubulin and microtubules at steady state. *Biochem J*; **226**: 311-7.
- 134 Sherwin T, Gull K (1989) Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in *Trypanosomes*. *Cell*; **57**: 211-21.
- 135 Sullivan KF (1988) Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol*; **4**: 687-716.
- 136 Raybin D, Flavin M (1977) Modification of tubulin by tyrosylation in cells and extracts and its effect on assembly *in vitro*. *J Cell Biol*; **73**: 492-504.
- 137 Barra HS, Arce CA, Caputto R. (1980) Total tubulin and its aminoacylated and non-aminoacylated forms during the development of rat brain. *Eur J Biochem*; **109**: 439-46.
- 138 Rodriguez JA, Borisy GG. (1978) Modification of the C-terminus of brain tubulin during development. *Biochem Biophys Res Commun*; **83**: 579-86.
- 139 Paturle L, Wehland J, Margolis RL, Job D. (1989) Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulation using affinity chromatography. *Biochemistry*; **28**: 2698-704.
- 140 Paturle-Lafanechere L, Edde B, Denoulet P, Van Dorsselaer A, Mazarguil H, Le Caer JP, Wehland J, Job D. (1991) Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry*; **30**: 10523-8.
- 141 Alonso AC, Arce CA, Barra HS. (1993) Tyrosinatable and non-tyrosinatable tubulin subpopulations in rat muscle in comparison with those in brain. *Biochim Biophys Acta*; **1163**: 26-30.
- 142 Kilmartin JV, Wright B, Milstein C. (1982) Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J Cell Biol*; **93**: 576-82.
- 143 Wehland J, Willingham MC, Sandoval IV (1983) A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization *in vitro*, and microtubule polymerization and organization in vivo. *J Cell Biol*; **97**: 1467-75.

- 144 Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. (1984) Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated α -tubulin are distributed differently in vivo. *Cell*; **38**: 779-89.
- 145 Kreis TE (1987) Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J*; **6**: 2597-606
- 146 Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC. (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol*; **106**: 141-9.
- 147 Webster DR, Wehland J, Weber K, Borisy GG. (1990) Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol*; **111**: 113-22.
- 148 Kreitzer G, Liao G, Gundersen GG. (1999) Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*; **10**: 1105-18.
- 149 Gurland G, Gundersen GG. (1995) Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol*; **131**: 1275-90.
- 150 Liao G, Gundersen GG. (1998) Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J Biol Chem*; **273**: 9797-803.
- 151 Skoufias DA, Burgess TL, Wilson L. (1990) Spatial and temporal colocalization of the Golgi apparatus and microtubules rich in detyrosinated tubulin. *J Cell Biol*; **111**: 1929-37.
- 152 Contin MA, Sironi JJ, Barra HS, Arce CA. (1999) Association of tubulin carboxypeptidase with microtubules in living cells. *Biochem J*; **339**: 463-71.
- 153 Barra HS, Modesti NM, Arce CA. (1987) Tyrosination-detyrosination of the COOH-terminus of alpha-tubulin in oocytes and embryos of *Bufo arenarum*. *Comp Biochem Physiol*; **87**: 151-5.
- 154 Webster DR, Modesti NM, Bulinski JC. (1992) Regulation of cytoplasmic tubulin carboxypeptidase activity during neural and muscle differentiation: characterization using a microtubule-based assay. *Biochemistry*; **31**: 5849-56.
- 155 Alonso AC, Arce CA, Barra HS. (1988) Relationship between the tyrosination state of tubulin and the activities of tubulin:tyrosine ligase and tubulin carboxypeptidase in rat muscle during development. *Eur J Biochem* **15**; **177**: 517-22.
- 156 Arregui C, Barra HS. (1989) Tyrosination state of tubulin and the activity of tubulin:tyrosine ligase and tubulin carboxypeptidase in the developing retina of the chick. *J Neurochem*; **52**: 1708-13.
- 157 Beltramo DM, Arce CA, Barra HS. (1989) Tyrosination-detyrosination of tubulin and microtubules during the development of chick erythrocytes. *Mol Cell Biochem*; **89**: 47-56.
- 158 Barra HS, Arce CA, Rodriguez JA, Caputto R. (1973) Uncorporation of phenylalanine as a single unit into rat brain protein: reciprocal inhibition by phenylalanine and tyrosine of their respective incorporations. *J Neurochem*; **21**: 1241-51.
- 159 Murofushi H J (1980) Purification and characterization of tubulin-tyrosine ligase from porcine brain. *Biochem*; **87**: 979-84.
- 160 Ersfeld K, Wehland J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K. (1993) Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol*; **120**: 725-32.
- 161 Preston SF, Deanin GG, Hanson RK, Gordon MW. (1979) The phylogenetic distribution of tubulin tyrosine ligase. *J Mol Evol*; **13**: 233-44.

- 162 Rodriguez JA, Barra HS, Arce CA, Hallak ME, Caputto R. (1975) The reciprocal exclusion by L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) and L-tyrosine of their incorporation as single units into a soluble rat brain protein. *Biochem J*; **149**: 115-21.
- 163 Eiserich JP, Estevez AG, Bamberg TV, Ye YZ, Chumley PH, Beckman JS, Freeman BA. (1999) Microtubule dysfunction by posttranslational nitro tyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**: 6365-70.
- 164 Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*; **113**: 147-56.
- 165 Raybin D, Flavin M (1977) Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin. *Biochemistry*; **16**: 2189-94.
- 166 Schroder HC, Wehland J, Weber K. (1985) Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J Cell Biol*; **100**: 276-81.
- 167 Wehland J, Weber K (1987) Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on beta-tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J Cell Biol*; **104**: 1059-67.
- 168 Forrest GL, Klevecz RR. (1978) Tyrosyltubulin ligase and colchicine binding activity in synchronized Chinese hamster cells. *J Cell Biol*; **78**: 441-50.
- 169 Deanin GG, Thompson WC, Gordon MW (1977) Tyrosyltubulin ligase activity in brain, skeletal muscle, and liver of the developing chick. *Dev Biol*; **57**: 230-3.
- 170 Lafanechere L, Courtay-Cahen C, Kawakami T, Jacrot M, Rudiger M, Wehland J, Job D, Margolis RL. (1998) Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci*; **111**: 171-81.
- 171 Haber, D. and Harlow, E. (1997). Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nature Genet.* **16**, 320-327.
- 172 AJ Levine. The Tumor Suppressor Genes. *Annu Rev Biochem* 1993 **62**: 623-651.
- 173 Schein, CH. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**: 1141-1149.
- 174 Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-10.
- 175 Dideberg O, Bertrand J (1998) Tubulin tyrosine ligase: a shared fold with the glutathione synthetase ADP-forming family, *Trends Biochem Sci* **23**: 57-8.
- 176 Herskowitz I. (1987) Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*; **329**: 219-22.
- 177 Inouye M. (1988) Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation--a review. *Gene*; **72**: 25-34.
- 178 Robles, J. And Doers, M. (1994) *Promega Notes* **45**, 19
- 179 Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., and Stemmer, W. P. C. (1996). Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling *Nature Biotechnology* **14**, 315-319.
- 180 Harris, H., Rawlins, J. and Sharps, J. (1996) A different approach to tumour suppression The Alexandra Kefalides Memorial Lecture. *J. Cell Sci.* **109**, 2189-2197.
- 181 Elkeles A, Juven-Gershon T, Israeli D, Wilder S, Zalcenstein A, Oren M. (1999). The c-fos proto-oncogene is a target for transactivation by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol*; **19**: 2594-

- 600.
- 182 Bader D, Masaki T, Fischman DA. (1982). Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Biol.*; **95**: 763-70.
- 183 Bandman E, Matsuda R, Strohman RC. (1982) Developmental appearance of myosin heavy and light chain isoforms *in vivo* and *in vitro* in chicken skeletal muscle. *Dev Biol*; **93**: 508-18.
- 184 Montarras D, Fiszman MY, Gros F (1982). Changes in tropomyosin during development of chick embryonic skeletal muscles *in vivo* and during differentiation of chick muscle cells *in vitro*. *J Biol Chem*; **257**: 545-8.
- 185 Cho M, Webster SG, Blau HM. (1993) Evidence for myoblast-extrinsic regulation of slow myosin heavy chain expression during muscle fiber formation in embryonic development. *J. Cell Biol.*; **121**: 795-810.
- 186 Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG. (1987). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **84**: 9040-4.
- 187 Li Y, Black M J. (1996) Microtubule assembly and turnover in growing axons. *Neurosci*; **16**: 531-44.
- 188 Jacobson A, Peltz SW. (1996) Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*; **65**: 693-739.
- 189 Keller W, Minvielle-Sebastia L (1997) A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing. *Curr Opin Cell Biol*; **9**: 329-36.
- 190 Raybin D, Flavin M. (1977) Modification of tubulin by tyrosylation in cells and extracts and its effect on assembly *in vitro*. *J Cell Biol*; **73**: 492-504.
- 191 Alfa CE, Hyams JS. (1991) Microtubules in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* contain only the tyrosinated form of alpha-tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton*; **18**: 86-93.
- 192 Gabius HJ, Graupner G, Cramer F (1983) Activity patterns of aminoacyl-tRNA synthetases, tRNA methylases, arginyltransferase and tubulin:tyrosine ligase during development and ageing of *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem*; **131**: 231-4.
- 193 The retinoblastoma protein and cell cycle control. Weinberg RA. *Cell* 1995; **81**: 323-3.
- 194 Hu T, Miller CM, Ridder GM, Aardema MJ. (1999) Characterization of p53 in chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutat Res*; **426**: 51-62.
- 195 Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**: 680-5.
- 196 Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC. (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **80**: 4045-9.
- 197 McGadey J. (1970) A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie*; **23**: 180-4.
- 198 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Second Edition, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 199 Piechaczyk, M., Blanchard, J. M., Marty, L., Dani, C., Panabieres, F., El Sabouty, S., Fort, P. and Jeanteur, P. (1984). Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucl. Acid Res.* **12**, 6951-6963.

- 200 Feinberg AP, Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*; **132**: 6-13
- 201 Feinberg AP, Vogelstein B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*; **137**: 266-7.
202. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 5463-5467.
- 203 Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (1990) PCR Protocols. Academic Press. Inc. California.
- 204 Kilmartin JV, Wright B, Milstein C (1982) Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J Cell Biol*; **93**: 576-82.
- 205 Arregui C, Busciglio J, Caceres A, Barra HS. (1991) Tyrosinated and detyrosinated microtubules in axonal processes of cerebellar macroneurons grown in culture. *J Neurosci Res*; **28**:171-81.
- 206 Arregui CO., Mas CR., Argaraña CE and Barra HS. (1997) Tubulin Tyrosine Ligase: Protein and mRNA Expression in Developing Rat Skeletal Muscle. *Development Growth and Differentiation* **39**, 167-178.
- 207 Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR. (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **70**: 765-8.
- 208 Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 209 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- 210 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; **22**: 4673-80.
- 211 Timothy L. Bailey and Charles Elkan, Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers, Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.
- 212 Timothy L. Bailey and Michael Gribskov, (1998) Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches, *Bioinformatics*, **14**:1, pp. 48-54.