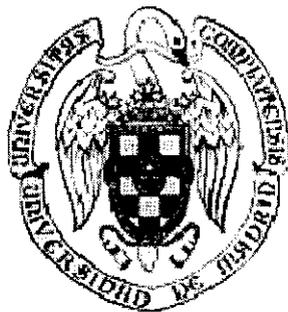


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR II



INTERACCIONES DE MICROTUBULOS CON
TAXOIDES FLUORESCENTES

TESIS DOCTORAL

JUAN ÁNGEL EVANGELIO PALOMO

MADRID, 1999

Dirigida por el Dr. José Manuel Andreu Morales,
Profesor de Investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas,
CSIC, MADRID.

Índice

Índice	I
Abreviaturas	VI
Resumen	VIII
1.-INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Microtúbulos.	2
1.2.- Tubulinas.	3
1.2.1.- α y β -tubulinas.	3
1.2.2.- Estructura tridimensional.	4
1.2.3.- γ -tubulinas.	6
1.3.- Proteínas asociadas con microtúbulos.	6
1.3.1.- MAPs	6
1.3.2.- Proteínas motoras.	7
1.3.2.1.- Dineínas.	8
1.3.2.2.- Quinesinas.	9
1.3.3.3.- Auto-organización de microtúbulos y motores.	9
1.4.- Estructura de los microtúbulos.	10
1.5.- Hojas de Zn.	14
1.6.- Dinámica de microtúbulos.	15
1.6.1.- Ensamblaje de microtúbulos.	15
1.6.2.- Inestabilidad dinámica.	17
1.6.3.- “GTP-cap”	17
1.6.4.- Inestabilidad dinámica de microtúbulos celulares.	19
1.6.5.- Regulación de la inestabilidad dinámica.	20
1.7.- Taxol.	21
1.7.1.- Estructura química y obtención.	22
1.7.2.- Sitio de unión del taxol a la molécula de tubulina.	23
1.7.3.- Taxoides fluorescentes.	24
OBJETIVOS	25

2.-MATERIALES Y METODOS	28
2.1.- Proteínas.	29
2.2.- Nucleotidos y otros materiales.	30
2.3.- Taxoides.	30
2.3.1.- Taxol, [³ H]taxol, docetaxel.	30
2.3.2.- Taxoides fluorescentes.	30
2.3.3.- Solubilidad de taxoides fluorescentes.	33
2.3.4.- Espectroscopía de absorción de taxoides fluorescentes.	35
2.3.5.- Determinación espectrofotométrica del pKa aparente de ionización de Flutax.	37
2.4.- Ensamblaje de microtúbulos.	39
2.4.1.- Equilibrado de proteína.	39
2.4.2.- Monitorización del ensamblaje por aumento de turbidez.	40
2.4.3.- Medida de polimerización de tubulina por sedimentación.	40
2.4.4.- Determinación espectrofluorométrica de la concentración de taxoide unido a microtúbulos.	41
4.5.- Visualización de microtúbulos.	43
2.5.- Unión de taxoides a tubulina en distintas formas de polimerización.	43
2.5.1.- Unión de taxoides a microtúbulos de proteína microtubular.	43
2.5.2.- Unión de taxoides a GDP-tubulina no ensamblada.	44
5.3.- Unión de taxoides a microtúbulos de GDP tubulina.	45
5.4.- Análisis de los datos.	46
2.6.- Competición de dos ligandos por su sitio de unión.	48
2.6.1.- Competición entre Flutax y taxol a saturación de sitios de unión.	48
2.6.2.- Competición entre taxoides a baja saturación fraccional de sitios.	49
2.6.3.- Análisis de los datos.	51
2.7.- Velocidad de sedimentación.	54
2.7.1.- Velocidad de sedimentación de GDP tubulina en presencia de taxoides.	54
2.7.2.- Análisis de datos de velocidad de sedimentación.	54

3.-RESULTADOS	57
3.1.- TAXOIDES FLUORESCENTES COMO SONDA DEL SITIO DE UNIÓN DEL TAXOL.	58
3.1.1.- Interacción de taxoides fluorescentes con microtúbulos.	58
3.1.1.1.- Polimerización de microtúbulos inducida por taxoides fluorescentes.	58
3.1.1.2.- Unión de Flutax y Rotax a microtúbulos.	61
3.1.1.3.- Influencia de las variables de la solución en la polimerización de microtúbulos inducida por taxoide.	64
3.1.1.4.- Visualización de microtúbulos por microscopía de fluorescencia.	66
3.1.2.- Interacción de microtúbulos con derivados más solubles y fotoestables de Flutax.	68
3.1.2.1.- Polimerización de microtúbulos inducida por Flutax 2 y Flutax 3.	68
3.1.2.2.- Unión de Flutax 2 y Flutax 3 a microtúbulos.	70
3.1.2.3.- Influencia del pH y la actividad de Mg^{2+} en la polimerización de microtúbulos inducida por Flutax 2 y Flutax 3.	70
3.1.3.- Comparación en la unión a microtúbulos de los taxoides empleados.	70
3.1.3.1.- Unión de taxoides a microtúbulos de MTP.	70
3.1.3.2.- Competición de taxoides por su sitio de unión a microtúbulos de MTP.	75
3.1.3.3.- Cambios en la estructura de los microtúbulos inducidos por taxoide.	80
3.2.- DIFERENCIAS EN LA UNIÓN DE TAXOIDES FLUORESCENTES A MICROTÚBULOS Y A TUBULINA.	83
3.2.1.-Cambios en el espectro de absorción de taxoides fluorescentes unidos a tubulina y microtúbulos.	83
3.2.1.1.- Cambios en el espectro de absorción de Flutax.	83

3.2.1.2.- Cambios en el espectro de absorción del Flutax 2 y Flutax 3.	88
3.2.1.3.- Cambios en el espectro de absorción de Flutax, Flutax 2 y Flutax 3 en presencia de glicerol.	88
3.2.2- Interacción de taxoides fluorescentes con tubulina.	91
3.2.2.1.- Velocidad de sedimentación de tubulina con taxoides fluorescentes.	91
3.2.2.2.- Unión de taxoides a tubulina y a microtúbulos.	99
 4.-DISCUSION.	 103
4.1.- TAXOIDES FLUORESCENTES COMO SONDAS DEL SITIO DE UNIÓN DE TAXOL.	104
4.1.1.- Polimerización de microtúbulos inducida por taxoide fluorescente	104
4.1.2.- Microscopía electrónica de microtúbulos inducidos por taxoide.	106
4.1.3.- Tinción de microtúbulos <i>in vitro</i> con taxoides fluorescentes.	107
4.1.3.1.- Aplicaciones y perspectivas.	108
4.1.4.- Unión de taxoides fluorescentes a microtúbulos.	110
4.1.4.1.- Sitios de unión de taxoides a microtúbulos.	110
4.1.4.2.- Cambios espectroscópicos asociados.	112
4.1.4.3.- Aplicaciones y perspectivas.	113
4.2.- DIFERENCIAS EN LA UNIÓN DE TAXOIDES FLUORESCENTES A TUBULINA Y A MICROTÚBULOS.	116
4.1.- Cambios espectroscópicos de los taxoides fluorescentes.	116
4.2.- Unión de taxoides fluorescentes a tubulina.	118
 CONCLUSIONES.	 120
 BIBLIOGRAFIA	 123

ABREVIATURAS:

a.-	Actividad iónica media.
ATP.-	Trifosfato de adenosina.
BSA.-	Albúmina de suero bovino.
ca.-	<i>circa</i> .
CD.-	Dicroísmo circular.
col.-	Colaboradores.
Cr.-	Concentración crítica.
dmol.-	Decimoles
EDTA.-	Ácido etilén diamino tetraacético.
EGTA.-	Ácido etilén glicol bis(β aminoetiléter)N,N,N',N'-tetraacético.
DMSO.-	Sulfóxido de dimetilo.
g.-	Aceleración estándar de la gravedad (9.807 m seg ⁻²)
GMPCPP.-	Metilén difosfato de guanosina.
GDP.-	Difosfato de guanosina.
GTP.-	Trifosfato de guanosina.
HPLC.-	Cromatografía líquida de alta resolución.
K _{p,app} .-	Constante de elongación aparente de los microtúbulos.
min.-	Minutos.
MAPs.-	Proteínas asociadas a microtúbulos.
MARKs.-	Quinasas reguladoras de la afinidad por los microtúbulos.
MPF.-	Factor promotor de la metafase.
PAGE.-	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PEDTA.-	Tampón fosfato 10 mM con EDTA 1 mM.
PEMG.-	Tampón fosfato 10 mM con EDTA 1 mM y MgCl ₂ 7 mM
PM.-	Peso molecular.
r.-	Radio.
R.-	Constante de los gases (8.3145 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
RMN.-	Resonancia magnética nuclear.
rpm.-	Revoluciones por minuto.
s ₂₀ .-	Coefficiente de sedimentación a 20° C

s_{20}^0 -	Coeficiente de sedimentación a 20° C y corregido a dilución infinita.
S.-	Svedbergs ($10^{-13} \text{ seg}^{-1}$).
SDS.-	Dodecil sulfato sódico.
seg.-	Segundos.
t.-	Tiempo.
T.-	Temperatura.
TFA.-	Ácido trifluoroacético.

Resumen

Los microtúbulos son polímeros filamentosos componentes del citoesqueleto involucrados en numerosos procesos en células eucariotas, entre ellos la división celular. Por esta razón, son el blanco de numerosas drogas antimitóticas, como la colchicina o el taxol. Están formados fundamentalmente por la unión no covalente de subunidades de tubulina, proteína heterodimérica que une nucleotido. Además de los microtúbulos, la tubulina forma polímeros laminares cuando se ensambla en presencia de Zn, que se han utilizado recientemente para obtener un modelo de la estructura tridimensional de la tubulina.

El taxol es una droga antitumoral que inhibe la división celular mediante la supresión de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Aunque el taxol ha sido una de las drogas antimitóticas más estudiadas, el mecanismo preciso por el cual induce la polimerización de la tubulina y estabiliza los microtúbulos permanece desconocido. En este sentido, unos taxoides marcados fluorescentemente pueden ser una poderosa herramienta para el estudio de la interacción de los microtúbulos y de la tubulina soluble con el taxol. En este trabajo se caracterizan las interacciones de una serie de derivados fluorescentes del taxol con la tubulina y los microtúbulos y se evalúa su utilidad como sondas del sitio de unión del taxol.

1.- Taxoides fluorescentes como sonda del sitio de unión del taxol.

1.1.- Interacción de taxoides fluorescentes con microtúbulos.

El análogo fluorescente del taxol 7-O-[N-(Fluoresceín-4'-carbonil)-L-alanil] taxol (Flutax) es capaz de inducir el ensamblaje tanto de la GTP-tubulina como de la GDP-tubulina, que es la forma inactiva de la molécula, con una constante de elongación aparente igual a la mitad de la del taxol y con una cinética algo más lenta. Se une competitivamente con taxol con una estequiometría igual a la de éste (0.97 ± 0.08).

La tubulina polimerizada con Flutax une un ión adicional de Mg^{2+} con relación a la polimerizada con taxol. El efecto del pH es ligeramente menos pronunciado con Flutax, mientras que la dependencia de temperatura es mayor.

Como control negativo de polimerización se ha usado el 2'-O-acetil 7-O-[N-(Fluoresceín-4'-carbonil)L-alanil]taxol (2' acetil Flutax), en el que se ha acetilado la posición 2' del taxol, que resulta esencial para su actividad en la polimerización de microtúbulos. Se ha probado que el 2'acetil Flutax es incapaz de inducir la polimerización de la tubulina. También se ensayó el taxol unido a la fluoresceína pero mediante un espaciador más largo (Hexaflutax). Este taxoide fue incapaz de polimerizar la GDP tubulina.

También se ha estudiado el análogo fluorescente del taxol 7-O-[N-(tetrametilrodamin-4'-carbonil)-L-alanil]taxol (Rotax). Se ha demostrado que también induce la polimerización de GDP-tubulina, con una constante de elongación aparente cuatro veces menor que la del taxol. Sin embargo, su pequeña solubilidad limita su caracterización bioquímica detallada.

1.2.- Interacción de microtúbulos con derivados más solubles y fotoestables de Flutax.

Aunque la solubilidad de Flutax es mucho mayor que la de Rotax, también presenta una solubilidad limitada en las condiciones de trabajo, asociada al estado de ionización de la molécula de fluoresceína. Únicamente la forma dianiónica de este fluoróforo ($pK_a = 6.33$) es soluble, por lo que en condiciones de ensamblaje de tubulina, el Flutax se encuentra parcialmente en forma monoaniónica insoluble. Para paliar este problema, se usaron derivados fluorescentes del Flutax con un pK_a para el dianión muy alejado del pH de trabajo, en concreto un derivado con dos átomos de F en las posiciones 2 y 7 de la fluoresceína (Flutax 2) y el mismo derivado difluorado con un grupo sulfónico en lugar del grupo carbonilo (Flutax 3). Ambos compuestos son capaces de inducir la polimerización de GDP-tubulina con una constante de elongación aparente similar a la del taxol. Su estequiometría de unión a su sitio específico en los microtúbulos es respectivamente de 1.04 ± 0.08 y de 1.14 ± 0.08 , igual a la del taxol.

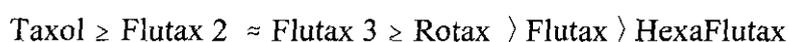
1.3.- Visualización de microtúbulos.

La observación por microscopía electrónica de microtúbulos de GDP tubulina inducidos por taxoides fluorescentes muestra que éstos presentan al menos dos protofilamentos más que los inducidos por taxol.

Estos derivados fluorescentes se ha utilizado también para visualizar mediante microscopía de fluorescencia microtúbulos ensamblados *in vitro*. Se han observado reproduciblemente tanto microtúbulos aislados como entrecruzados en formaciones similares a ásteres o en haces densos de microtúbulos. También se ha observado que el Flutax es capaz de teñir microtúbulos preformados en un tiempo inferior a un minuto, lo que indica que el sitio de unión del taxol se encuentra bastante accesible al solvente.

1.4.- Medida de afinidad de taxoides por su sitio de unión al microtúbulo.

Se ha medido una unión específica de taxoides fluorescentes al sitio de unión del taxol al microtúbulo con constantes de equilibrio de disociación del orden de micromolar. Al mismo tiempo, se ha detectado una unión no específica que ocurre a concentraciones libres de taxoide por encima de $10 \mu M$. Por otro lado, se ha diseñado un ensayo de competición de dos ligandos a su sitio de unión al microtúbulo. Estos dos tipos de experimento permiten ordenar la afinidad de los taxoides del modo siguiente:



2.- Diferencias en la unión de sondas fluorescentes a tubulina y a microtúbulos.

2.1.- Cambios en el espectro de absorción de taxoides fluorescentes.

Cuando están unidos al microtúbulo, tanto el Flutax como sus dos derivados más solubles experimentan un cambio apreciable en su espectro de absorción. Todos ellos sufren

un desplazamiento de 3-4 nm en la posición de su máximo de absorción cuando están en presencia de microtúbulos. Al mismo tiempo, el Flutax experimenta un desplazamiento de unas - 0.2 unidades en su pKa aparente cuando se une al microtúbulo. Todo esto indica un micro-entorno catiónico entorno a la sonda fluorescente en los microtúbulos, a la par que sugiere cambios en el número y/o en la fuerza de los puentes de hidrógeno que forma la fluoresceína.

Estos cambios son diferentes a los que sufren estas sondas en presencia de tubulina soluble. La posición del máximo de absorción del Flutax apenas varía, pero el coeficiente de extinción varía en un 40% y su pKa aparente de ionización para el dianión varía en + 0.5 unidades. Los derivados más solubles del Flutax sufren un cambio en la posición de su espectro de absorción de 8 nm hacia el rojo. Esto indica un sitio de unión al dímero distinto al del microtúbulo.

2.2.-Interacción de taxoides fluorescentes con tubulina.

Para ver si estas sondas se unen a la tubulina no ensamblada se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación de tubulina en presencia de taxoides. Todos los derivados cosedimentan en su mayor parte con la tubulina, aunque con un coeficiente de sedimentación algo mayor que el de la proteína, y de forma no desplazable por el taxoide acromático docetaxel. Esto indica que se unen a la tubulina, aunque a sitios de unión distintos al sitio de unión al microtúbulo. El análisis de la distribución de coeficientes de sedimentación ($g(s^*)$) muestra para la tubulina un pico asimétrico, que indica heterogeneidad, y que los taxoides se unen a las especies con un coeficiente de sedimentación mayor que el del heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina.

Se ha medido la unión del Flutax y derivados tanto a la tubulina soluble. El hecho de que esta unión no sea saturable en nuestras condiciones de trabajo dificulta el análisis, pero se observa una unión de los ligandos a múltiples sitios en la molécula de tubulina. La comparación entre la unión a la tubulina y a los microtúbulos muestra que la polimerización dificulta la unión de taxoides fluorescentes a la tubulina.

1.-Introducción

1.1.- Microtúbulos.

Los microtúbulos son polímeros filamentosos que componen, junto con los filamentos de actina y los filamentos intermedios, el citoesqueleto de células eucariotas (Amos y Amos, 1991), donde desempeñan múltiples funciones, como son:

- Motilidad celular, formando parte de los cilios y los flagelos (Song y Mandelkow, 1995)
- Transporte de vesículas del retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Lippincott-Schwartz, 1998) y transporte a lo largo del axón (Bloom y Goldstein, 1998)
- Mantenimiento de la forma celular (Matus, 1991) y crecimiento del axón en células nerviosas (Baas, 1997).
- Segregación de cromosomas durante la mitosis (Inoué y Salmon, 1995; Hyman y Karsenti, 1996; Waters y Salmon, 1997; Joshi, 1998; Walczak *et al.*, 1998) formando el huso mitótico. Precisamente por esta función en la división celular, son el blanco de numerosas drogas antimitóticas (Jordan y Wilson, 1998), como la colchicina (Hastie, 1991) y el taxol (Horwitz, 1992).

Están formados principalmente por la unión no covalente de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina (Bryan y Wilson, 1971), que ensamblan de forma orientada en 11-16 protofilamentos que se disponen de forma paralela formando el microtúbulo (Desai y Mitchison, 1997; Wade y Hyman, 1997; Downing y Nogales, 1998a). Esta forma ordenada de ensamblarse la tubulina confiere una polaridad intrínseca al microtúbulo, de forma que presenta un extremo (+) o distal de crecimiento rápido y un extremo (-) o proximal de crecimiento lento. Estos extremos del microtúbulo se orientan en el interior de la célula eucariótica de forma que el extremo negativo se sitúa en los centrosomas, que son los orgánulos citoplasmáticos encargados de nuclear el ensamblaje de los microtúbulos (Mitchison y Kirschner, 1984a). En células en interfase, el centrosoma se sitúa en el centro de la célula, de modo que los microtúbulos se orientan formando una disposición radial con el extremo (+) emanando desde el interior hacia la periferia (Joshi, 1998). Durante la mitosis, el centrosoma se duplica en dos, que migran hacia polos opuestos de la célula para que los microtúbulos establezcan el huso mitótico, con el extremo negativo más próximo a los centrosomas (Karsenti *et al.*, 1996). En células que carecen de centrosomas, como las plantas y muchos sistemas meióticos, la organización de

los microtúbulos se lleva a cabo por los cinetocoros de los cromosomas (Waters y Salmon, 1997). En los axones y en cilios y flagelos el extremo negativo se sitúa hacia el cuerpo celular y el extremo positivo va a la parte distal (Baas, 1997).

Asociadas con la tubulina, e interaccionando con ésta, los microtúbulos presentan otros tipos de proteínas (Mandelkow y Mandelkow, 1995) entre las que destacan las MAPs, o proteínas asociadas a microtúbulos (Lee, 1993; Hirokawa, 1994; Drewes *et al.*, 1998) y las proteínas motoras (Walker y Sheetz, 1993; Vale y Fletterick, 1997; Hirokawa *et al.*, 1998). Las MAPs son moléculas que se asocian a la tubulina estabilizando y promoviendo el ensamblaje de los microtúbulos. Las proteínas motoras son proteínas que transportan orgánulos, vesículas o macromoléculas en el citoplasma, utilizando los microtúbulos como “raíles” para llevar a cabo el transporte. Además, la célula presenta una serie de proteínas reguladoras de la dinámica de los microtúbulos, como la estatmina (Jourdain *et al.*, 1997) y la catanina (Shiina *et al.*, 1995).

1.2.-Tubulinas.

Las tubulinas son una superfamilia de proteínas compuesta por las α y β tubulinas, que forman el heterodímero de α - β -tubulina, subunidad estructural básica de los microtúbulos (Monasterio *et al.*, 1995), y las γ -tubulinas, que se encuentran en el centrosoma formando núcleos de polimerización (Joshi *et al.*, 1994). Recientemente se ha descrito un análogo procariota de la tubulina, la Ftsz (*filamentation temperature sensitive Z*), que es una proteína implicada en la división de bacterias y arqueobacterias (Lutkenhaus y Addinal, 1997).

1.2.1.- α y β tubulinas

Las α y β tubulinas son una familia de proteínas de ca. 450 residuos que unen nucleotido (Carrier, 1991) y se encuentran muy conservadas en la evolución. Se presentan en células eucariotas como isotipos diferencialmente expresados en distintos tejidos, aunque todavía no está totalmente establecido si los isotipos tienen significado funcional. En mamíferos se han descrito 6 isotipos para α -tubulina y 7 para β -tubulina (Sullivan, 1988,

Ludueña, 1998). La tubulina también sufre numerosas modificaciones postraduccionales, como son la tirosinación y detirosinación de α -tubulina, la acetilación y deacetilación de α -tubulina, la fosforilación de determinados isotipos de β -tubulina, la poliglutamilación de α - y β -tubulina, la poliglicilación en axonemas de cilios y flagelos de *Paramecium* y otras especies, y la generación de α -tubulina sin sus dos últimos residuos, y por tanto incapaz de sufrir tirosinación/detirosinación (McRae *et al.*, 1997, Ludueña, 1998). Todas estas modificaciones, excepto la acetilación, se localizan en el extremo carboxilo terminal de la molécula. Este hecho, unido a que los últimos residuos de la secuencia también son los de mayor variabilidad entre isotipos, (Redeker *et al.* 1992), y a que el extremo carboxilo terminal se ha propuesto como sitio de unión de las MAPs (Serrano *et al.*, 1984; Chau *et al.*, 1999) y de motores citoplasmáticos (Paschal *et al.*, 1989; Marya *et al.*, 1994; Larcher *et al.*, 1996) sugiere un papel funcional para el extremo carboxilo terminal de la tubulina (de Pereda *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 1999).

Ambas subunidades presentan un sitio de unión de nucleotido, que es no intercambiable en la subunidad α (sitio N, Spiegelman *et al.*, 1977) e intercambiable en la subunidad β (sitio E, Weisemberg *et al.*, 1968). El GTP unido a la subunidad β se hidroliza irreversiblemente a GDP durante el proceso de ensamblaje a microtúbulos (Angelastro y Purich, 1990). La tubulina con el sitio de unión de nucleotido de la subunidad β completamente intercambiado por GDP (GDP tubulina) y a altas concentraciones de Mg^{2+} ensambla en estructuras anulares (anillos de tubulina, Díaz *et al.*, 1994).

Para ensamblar en microtúbulos, la tubulina necesita de la presencia de iones Mg^{2+} (Lee y Timasheff, 1977). La tubulina presenta dos sitios de alta afinidad para el magnesio: uno en el sitio E de la β -tubulina, asociado al GTP, que se libera al medio junto con el fosfato tras la hidrólisis del nucleotido (Correia *et al.*, 1987), y otro en el sitio N, asociado a la estabilidad del dímero de la tubulina (Menéndez *et al.*, 1998).

1.2.2.- Estructura tridimensional de α - y β -tubulinas.

Se ha propuesto un modelo de estructura tridimensional de la tubulina a 3.7 Å de resolución a partir de cristalografía de electrones sobre hojas de Zn, polímeros laminares que

se obtienen cuando la tubulina se encuentra en presencia de iones Zn^{2+} (Nogales *et al.*, 1998). En esta estructura se observa un núcleo formado por dos láminas β flanqueadas por doce α -hélices. Se pueden distinguir tres dominios distintos (ver figura 1.1):



Figura 1.1.- Modelo de estructura tridimensional de la tubulina (Nogales *et al.*, 1998). La orientación corresponde aproximadamente a una vista del dímero desde el interior de un microtúbulo que estaría en sentido vertical y con el extremo positivo en la parte de arriba de la figura. Las dos hélices C-terminal de la tubulina no se observan en la figura al encontrarse en la parte de atrás de la molécula. Se muestran los diagramas de bolas de las moléculas de GTP y GDP, y del docetaxel (ver apartado 7.1 de esta Introducción) en el sitio de unión del taxol.

- Un dominio N terminal, estructuralmente homólogo al sitio de unión de nucleotido de Ras y de otras proteínas G (Erickson, 1998), constituido por láminas beta paralelas que alternan con α -hélices.
- Un dominio intermedio que contiene el sitio de unión del taxol en la subunidad β .
- Un dominio carboxilo terminal, que contiene dos α -hélices que pueden contener el sitio de unión de MAPs y de motores, unidas por un giro que puede estar involucrado en la unión con el siguiente monómero a lo largo del microtúbulo.

En este modelo de estructura tridimensional no se recogen los últimos residuos del extremo carboxilo terminal de la tubulina, correspondientes a la región hipervariable entre isotipos (Redeker *et al.*, 1992).

Recientemente se ha descrito un homólogo procariota de la tubulina, la FtsZ, una proteína de bacterias y arqueobacterias que interviene en la

división celular (Bramhill, 1997, Lutkenhaus y Addinal, 1997). Esta proteína ensambla en

forma de polímeros filamentosos similares a microtúbulos en presencia de GTP de forma dependiente de Mg^{2+} (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998). La estructura tridimensional de la FtsZ también ha sido resuelta recientemente (Löwe y Amos, 1998). A pesar de su escasa homología de secuencia, la comparación entre los dos modelos muestra que tienen un núcleo estructural común de plegamiento idéntico, lo que confirma la idea de la homología entre las dos proteínas. Sin embargo, la FtsZ tiene una extensión amino terminal ausente en la tubulina, mientras que las dos hélices carboxilo terminales de α y β -tubulina no se encuentran en la proteína procariota. Estas observaciones sugieren que ambas proteínas han evolucionado de un precursor ancestral de FtsZ (Egelman, 1998, Faguy y Doolittle, 1998).

1.2.3.- γ -tubulinas.

Las γ -tubulinas se expresan en la célula en una cantidad mucho menor que las α y β tubulinas, con las que presentan una homología de entre el 28 y el 35%. Están presentes en el material pericentriolar del centrosoma, aunque también se encuentran en centriolos, y en el cuerpo basal de cilios y flagelos (Oakley, 1992; Joshi, 1994). En el centrosoma forman parte de complejos anulares formados por diez o más unidades de γ -tubulina y otras proteínas asociadas, que sirven de punto de nucleación para los microtúbulos (Moritz *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995). Erickson y Stofler (1996) han propuesto un modelo en el que las γ -tubulinas forman una espiral que se prolonga tangencialmente en un protofilamento recto que serviría de núcleo de polimerización al que se añadirían subunidades de α - β tubulina para formar el microtúbulo. Curiosamente, se ha demostrado recientemente que las γ -tubulinas también se expresan en la célula como formas isotópicas (Ludueña, 1998).

1.3.-Proteínas asociadas con microtúbulos.

1.3.1.-MAPs.

Son una clase heterogénea de proteínas que estabilizan y promueven el ensamblaje de microtúbulos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Drewes *et al.*, 1998). Se pueden purificar

conjuntamente con la tubulina tras varios ciclos de ensamblaje y desensamblaje. Al conjunto de MAPs más tubulina se le denomina proteína microtubular (MTP).

Las principales MAPs identificadas hasta el momento son MAP1A, 1B, 2A, 2B, 2C, MAP4 y tau. Las MAP2, (1828 aminoácidos), MAP4 (1072 aminoácidos) y tau (432 aminoácidos) están compuestas por una región amino terminal y una región carboxilo terminal que contiene de 3 a 4 regiones de 18 aminoácidos que constituyen el motivo de unión de estas MAPs a microtúbulos (Gustke *et al.*, 1994; Coffey y Purich, 1995). En la MAP1B este motivo está compuesto por 21 repeticiones de 4 aminoácidos (Lys, Lys, Glu, X, siendo X cualquier residuo) cerca del centro de la molécula (Noble *et al.*, 1989).

Las MAPs presentan una diferente distribución en los tejidos: MAP1, MAP2 y tau son específicas de tejido nervioso, mientras que MAP4 se distribuye en todos los tejidos. Además, MAP1 se encuentra en dendritas y axones, MAP2 predominantemente en dendritas y tau sobre todo en axones (Hirokawa, 1994). Esta distribución preferencial, unida al hecho de que las MAPs son componentes de puentes moleculares entre microtúbulos y entre microtúbulos y otros orgánulos, hace pensar que las MAPs pueden estar involucradas en la morfogénesis neuronal (Matus, 1991).

Las proteínas tau tienen importancia en la enfermedad de Alzheimer: en pacientes afectados por esta demencia neurodegenerativa, tau se hiperfosforila, perdiendo la afinidad por los microtúbulos y formando filamentos helicoidales aberrantes que sirven de marcadores indicativos de esta enfermedad (Mandelkow y Mandelkow, 1998).

1.3.2.- Proteínas motoras.

Son proteínas que transportan orgánulos o macromoléculas en el interior de la célula mediante deslizamiento a lo largo de los microtúbulos. Para desempeñar su función, interaccionan con la superficie de los microtúbulos, y transforman la energía de la hidrólisis del ATP en energía mecánica que produce el desplazamiento. El transporte mediado por las proteínas motoras es direccional, de forma que puede dirigirse hacia el extremo (+) o distal de los microtúbulos (en este caso se denomina transporte centrípeto o anterógrado) o hacia el extremo (-) o proximal (centrífugo o retrógrado) (Walker y Sheetz, 1993, Hirokawa *et al.*,

1998).

Los microtúbulos utilizan estas proteínas para posicionarse en la célula y para la separación de los centrosomas hacia los dos extremos del huso mitótico (Karsenti *et al.*, 1996; Walczak *et al.*, 1998). En la figura 1.2 se muestra cómo los centrosomas se separan mediante fuerzas de empuje ejercidas por transportadores que se deslizan hacia el extremo positivo de

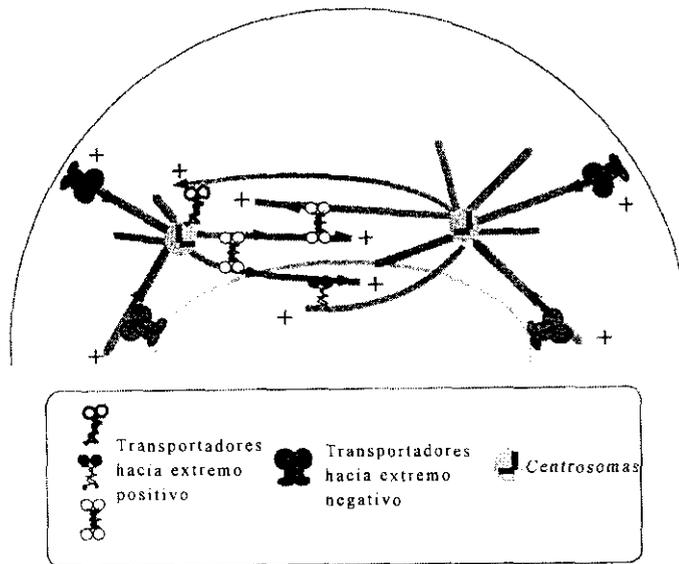


Figura 1.2.- Separación de los centrosomas y formación del huso mitótico mediante fuerzas ejercidas por motores citoplasmáticos sobre los microtúbulos. Tomada de Karsenti *et al.* (1996).

microtúbulos que crecen desde centrosomas opuestos, o por fuerzas de arrastre de proteínas motoras dirigidas al extremo negativo asociadas a la membrana. Los motores retrógrados asociados a la membrana nuclear también colaboran en mantener al centrosoma cerca del núcleo. La célula también utiliza las proteínas motoras, junto con fuerzas de crecimiento y decrecimiento de los microtúbulos, para el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (ver apartado 6.4 de esta Introducción).

Los principales tipos de proteínas motoras están representados por la familia de las dineínas y la familia de las quinesinas.

1.3.2.1.- Dineínas.

Se encargan del transporte de moléculas y vesículas hacia el extremo (-). Pueden distinguirse dineínas de axonemas, que mueven cilios y flagelos, y dineínas citoplasmáticas, que se encargan del tráfico de vesículas en células en interfase, transporte retrógrado en el axón de células nerviosas, de la organización de centrosomas durante la mitosis y de migración nuclear en hongos (Milisav, 1998).

Tienen un peso molecular de más de 10^6 Da., y están formadas por varias cadenas pesadas, intermedias y ligeras que se disponen en dos cabezas globulares de tamaño y forma similar, conectadas a una base globular de menor tamaño. El sitio de unión de la dineína a los microtúbulos está separado de las cabezas globulares mediante dos cadenas que se disponen de forma antiparalela formando una doble hélice superenrollada de ca. 10-12 nm que separa las cabezas de la dineína del microtúbulo (Gee y Vallee, 1998). Este “tronco” de unión parece estar implicado en la transmisión de señales entre el microtúbulo y las cabezas de la dineína (Vallee y Gee, 1998).

1.3.2.2.- Quinesinas.

Son una familia de proteínas que se encargan del transporte hacia el extremo distal de los microtúbulos (Vale y Fletterick, 1997), aunque existen proteínas relacionadas con la quinesina que se mueven hacia el extremo negativo, como la ncd (“*non claret disjunctional*”; Sablin *et al.*, 1996). El monómero de quinesina está formado por dos cadenas proteicas, una ligera y una pesada, que se disponen en tres dominios. El más estudiado es el dominio globular que constituye la “cabeza” de quinesina. Este dominio es el responsable de la generación de fuerza, por lo que también se le denomina “dominio motor” (Yang *et al.*, 1990). La estructura tridimensional del dominio motor se conoce por cristalografía de rayos X (Kull *et al.*, 1996; Kozielski *et al.*, 1997). Además, presenta una región intermedia helicoidal y una región terminal o “cola” que contiene la cadena ligera.

Las quinesinas se encuentran normalmente en la naturaleza en forma de dímeros que contienen dos cabezas, unidas entre sí por las regiones adyacentes al dominio motor, denominadas “cuello”. Los cuellos interactúan entre sí formando dobles hélices superenrolladas, capaces por sí mismas de mantener la unión entre las cabezas. (Kozielski *et al.*, 1997; Romberg *et al.*, 1998).

Una característica importante de las quinesinas es la “procesividad”: una molécula individual puede moverse continuamente a lo largo del microtúbulo grandes distancias (varias micras), avanzando varios pasos sin disociarse. Un modelo sencillo de explicar este comportamiento es que las dos cabezas de la quinesina se unen sucesivamente a la pared

microtubular, de modo que la primera cabeza no se separa hasta que no se una la segunda, es decir, al menos una de ellas debe mantenerse permanentemente unida al microtúbulo (Hancock y Howard, 1998; Marx *et al.*, 1998). El cuello de la quinesina también juega un papel importante, aunque no esencial, en la motilidad de las cabezas a lo largo del microtúbulo (Romberg *et al.*, 1998). El movimiento de la quinesina a lo largo del microtúbulo está regulado por la hidrólisis del GTP (Mandelkow y Johnson, 1998).

1.3.2.3.- Autoorganización de microtúbulos y proteínas motoras.

La tubulina y los motores citoplasmáticos tienen capacidad autoorganizativa. Los microtúbulos, en presencia de motores retrógrados forman disposiciones polares de forma radial (ásteres), en ausencia de centrosoma (Joshi, 1998; Hyman y Karsenti, 1996). Un conjunto de motores dirigidos al extremo proximal o (-), asociados en forma multimérica, pueden interaccionar con dos microtúbulos y moverse hacia su extremo negativo, donde se acumulan. Si son más de dos los microtúbulos involucrados en el proceso, se genera una disposición radial de microtúbulos denominada “áster”, con los microtúbulos orientados con el extremo negativo hacia el centro (Verde *et al.*, 1991), como se ha demostrado en extractos de huevo de *Xenopus* con microtúbulos estabilizados con taxol.

Las quinesinas también pueden formar ásteres con microtúbulos orientados con el extremo positivo hacia el centro (al contrario que las disposiciones radiales fisiológicas). Nédelec *et al.* (1997) generaron este tipo de ásteres con un sistema consistente únicamente en construcciones de quinesina con múltiples cabezas (varias cabezas de quinesina asociadas mediante eslabones de biotina-estreptavidina) y microtúbulos estabilizados con taxol.

Waters y Salmon (1997) han propuesto un modelo en el que los microtúbulos son capaces de formar el huso mitótico en ausencia de centrosomas, como ocurre en células de plantas y en muchos sistemas meióticos. Los motores dirigidos al extremo proximal actuarían nucleando microtúbulos por su extremo negativo, como se ha descrito para extractos de huevo de *Xenopus*, mientras que los motores dirigidos al extremo positivo actúan de forma parecida a la descrita en la figura 1.2, actuando de puente entre microtúbulos que proceden de polos opuestos. Heald *et al.* (1996) consiguieron obtener disposiciones bipolares de microtúbulos

semejantes al huso mitótico alrededor de partículas recubiertas de DNA en ausencia de centrosomas a partir de extractos de huevo de *Xenopus*.

1.3.3.- Proteínas reguladoras de la dinámica de los microtúbulos.

Son proteínas que colaboran con las MAPs en la regulación celular del comportamiento dinámico de los microtúbulos (ver apartado 6 de esta Introducción). La estatmina (Jourdain *et al.*, 1997) se une a dos moléculas de heterodímeros de tubulina formando un complejo ternario (Belmont y Mitchison, 1996) y aumenta la frecuencia de catástrofe o depolimerización rápida de los microtúbulos. También se han descrito proteínas que actúan seccionando microtúbulos durante la metafase (Shiina *et al.*, 1995), como la catanina (MacNally y Vale, 1993), el factor de elongación α -1 (Shiina *et al.*, 1994) y una proteína oligomérica de 56 Kda identificada como p-56 (Shiina *et al.*, 1992).

1.4.- Estructura de los microtúbulos.

La estructura tridimensional de los microtúbulos se conoce por reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de microtúbulos flagelares (Amos y Eagles, 1987), difracción de rayos X en fibras (Beese *et al.*, 1987), dispersión de rayos X en solución (Andreu *et al.*, 1992, 1994) y por microscopía electrónica de microtúbulos naturales (Wade y Chrétien, 1993; Hirose *et al.*, 1997) o decorados con el dominio motor de la quinesina o con la proteína motora relacionada con la quinesina ncd (Sosa y Milligan, 1996; Sosa *et al.*, 1997; Amos y Hirose, 1997; Hirose *et al.*, 1998; Wade *et al.*, 1998). La resolución alcanzada por la combinación de diferentes métodos de reconstrucción de imágenes de criomicroscopía electrónica es de 2 a 4 nm, mientras que por dispersión de rayos X de microtúbulos en solución se obtiene una resolución de 3 nm (Díaz *et al.*, 1994).

Los microtúbulos son polímeros cilíndricos de típicamente 25 nm de diámetro. El diámetro interno del tubo es de ca. 15 nm, y el grosor de la pared de unos 5 nm. Están formados por alineamiento de 11 a 16 protofilamentos paralelos de $\alpha\beta$ -tubulina. El número más frecuente de protofilamentos en microtúbulos celulares es de 13 (Wade *et al.*, 1990),

aunque se han descrito microtúbulos naturales de distinto número de protofilamentos (Burton *et al.*, 1975; Chalfie y Thomson, 1982; Eichenlaub-Ritter y Tucker, 1984). El heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina se dispone a lo largo del protofilamento de forma orientada, de forma que la subunidad β va al extremo positivo (Mitchison, 1993; Fan *et al.*, 1996; Hirose *et al.*, 1997). En la figura 1.3 se muestra la reconstrucción tridimensional de un microtúbulo a partir de fotografías de criomicroscopía electrónica.

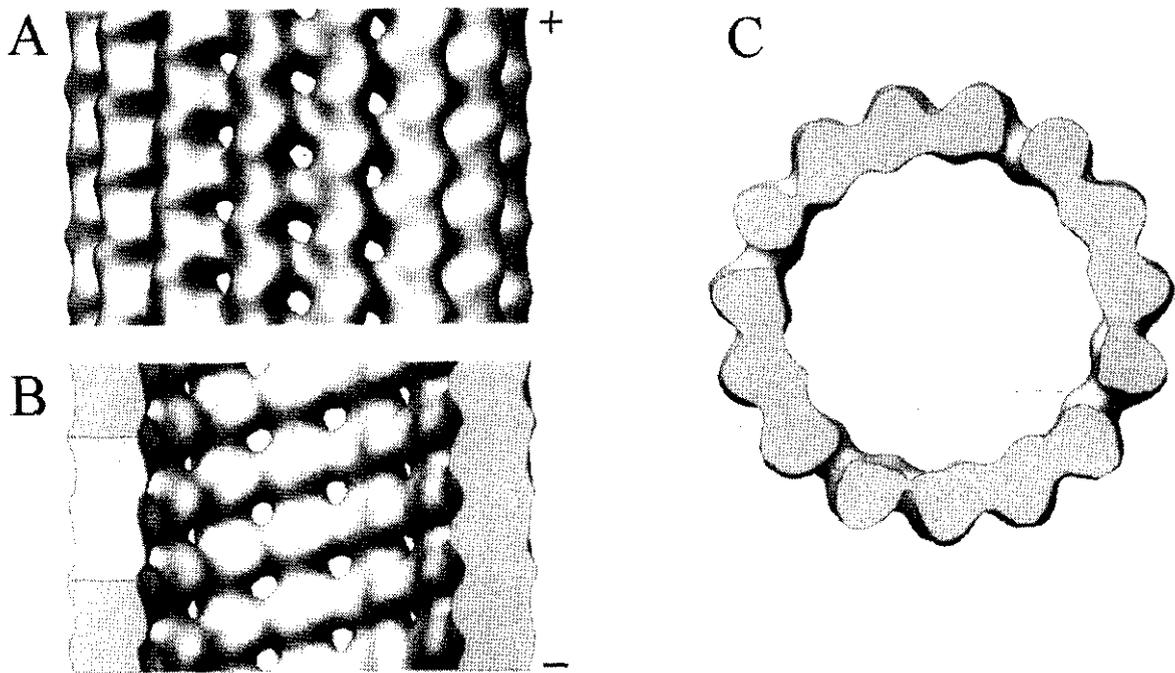


Figura 1.3.- Vista tridimensional de un microtúbulo. La estructura se ha reconstruido a partir de criomicroscopía electrónica de microtúbulos de 15 protofilamentos. A, vista del exterior del microtúbulo. B, vista desde el interior. La sección transversal en gris más claro señala un dímero (80 Å de longitud). La orientación en A y en B es tal que el extremo positivo está en la parte de arriba de la figura. C, corte transversal de un microtúbulo visto desde el extremo negativo. Nótese que las subunidades de tubulina están ligeramente inclinadas en el sentido de las agujas del reloj. La figura está tomada de Downing y Nogales, (1998a).

Pueden establecerse dos tipos de contactos laterales entre filamentos: tipo A, en el que los contactos interfilamentos entre subunidades de tubulina son del tipo $\alpha\beta$, y tipo B, donde los principales contactos laterales entre filamentos son entre subunidades del mismo tipo ($\alpha\alpha$ o $\beta\beta$) (ver figura 1.4). A lo largo del microtúbulo, cada protofilamento se encuentra ligeramente desplazado con respecto al anterior, de forma que los monómeros adyacentes se disponen en hélices transversas al microtúbulo (ver figura 1.4, paneles centrales). Una hélice

que parta de un monómero en un protofilamento cualquiera de referencia, tras una vuelta completa al microtúbulo, alcanza al mismo protofilamento S monómeros más arriba. Esto quiere decir que se necesitan S hélices transversales para rellenar una red microtubular. Se dice que la red tiene S comienzos de hélice. Este número S sirve para clasificar las redes microtubulares (Wade y Chrétien, 1991; Hyman *et al.*, 1995; Wade y Hyman, 1997).

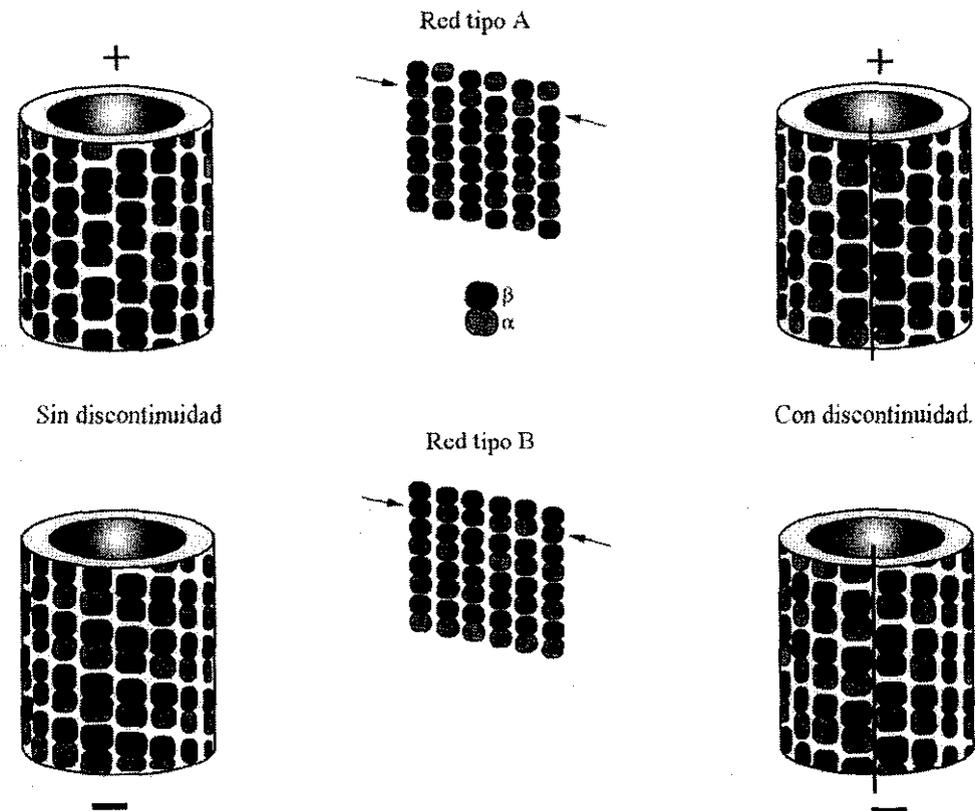


Figura 1.4.- Red de la pared de los microtúbulos. La red tipo A (paneles superiores) y B (paneles inferiores) se muestran en el plano (paneles centrales) y enrolladas en microtúbulos (paneles de los extremos). A la izquierda se representan las redes sin discontinuidad, y a la derecha con discontinuidad. Las flechas en los paneles centrales muestran hélices transversales al microtúbulo de subunidades adyacentes. La figura está tomada de Wade y Hyman (1997).

Los microtúbulos más frecuentes son los de 13 protofilamentos ordenados de la forma B (Song y Mandelkow, 1995). Esta organización de los protofilamentos implica que los microtúbulos presentan una discontinuidad (“costura”) longitudinal en la que los contactos son tipo A (ver figura 1.4). La presencia de esta “costura” depende del tipo de red, del número de

protofilamentos N y del número S de comienzos de hélice (Wade y Hyman, 1997). Se ha observado también en microtúbulos de 11, 12, 14 y 15 protofilamentos (Sosa y Milligan, 1996). Su significado funcional se desconoce, aunque podría estar relacionado con el proceso de polimerización/despolimerización del microtúbulo: se ha mostrado por criomicroscopía electrónica con resolución temporal que los microtúbulos crecen por elongación de hojas abiertas que después se cierran en microtúbulos (Chrétien *et al.*, 1995).

Para acomodarse a los tipos de redes descritos, los protofilamentos generalmente sufren pequeñas torsiones, de forma que no son completamente paralelos al eje del microtúbulo (Wade *et al.*, 1990). Estas torsiones hacen que las superposiciones de los protofilamentos sobre los de la cara opuesta del microtúbulo no sean continuas, sino que formen un patrón de franjas característico que se observa cuando se visualizan microtúbulos por microscopía electrónica. Este patrón depende del número de protofilamentos, de la distancia entre ellos, del número S de comienzos de hélice y del desplazamiento transversal de unos protofilamentos sobre otros (Chrétien y Wade, 1991; Wade y Chrétien, 1993; Hyman *et al.*, 1995).

Recientemente se ha desarrollado un método para determinar la polaridad de los microtúbulos analizando los patrones de franjas basado en que estos patrones tienen forma de punta de flecha que señala hacia el extremo positivo en microtúbulos con torsión de protofilamentos en sentido antihorario, y hacia el extremo negativo en microtúbulos con torsión de los protofilamentos en el sentido de las agujas del reloj (Sosa y Milligan, 1996). Esta disposición está relacionada con la inclinación que se observa en las subunidades de tubulina en las reconstrucciones tridimensionales de tubulina, en las que se ve cómo la tubulina está inclinada en sentido horario cuando se observa desde el extremo negativo del microtúbulo (Sosa y Chrétien, 1998, ver figura 1.3).

1.5.-Hojas de Zn.

Además de los microtúbulos, la tubulina polimeriza en polímeros laminares (“hojas de Zn”) cuando se encuentra en presencia de iones Zn^{2+} (Larsson *et al.*, 1976). Estas hojas tienen una estructura en protofilamentos similares a los de los microtúbulos, salvo que en una

disposición antiparalela, es decir, con la polaridad de los protofilamentos adyacentes opuesta (Amos y Baker, 1978; MacEwen *et al.*, 1983). Las hojas de Zn pueden curvarse y cerrarse en tubos (“macrotubos”) de 300 a 500 nm de diámetro. Estos macrotubos tienden a formarse en ausencia de MAPs, de forma dependiente de pH, y tienen la misma organización de protofilamentos que las hojas de Zn, salvo que se encuentran cerrados y desplazados un ángulo de 23 a 27° con respecto al eje del tubo (Wolf *et al.*, 1993).

Las hojas de Zn también se han observado por microscopía electrónica a baja resolución (15 Å, Baker y Amos, 1978) y su estructura se ha comparado con imágenes de microtúbulos naturales (Hirose *et al.*, 1997) encontrando que los protofilamentos tienen la misma estructura en ambos polímeros. Wolf *et al.* (1996) también compararon la estructura de los protofilamentos en hojas de Zn y en microtúbulos por tres procedimientos diferentes: superpusieron su modelo de tubulina obtenido a partir de cristalografía de electrones sobre hojas de Zn con una reconstrucción helicoidal de imágenes de microtúbulos obtenidas por criomicroscopía electrónica (Kikkawa *et al.*, 1995); comparando datos de difracción de electrones de haces de microtúbulos estabilizados con taxol y embebidos en hielo con datos de difracción de hojas de Zn; y correlacionando los protofilamentos de hojas de Zn con los protofilamentos obtenidos a partir de una reconstrucción de microtúbulos de axonemas abiertos de *Chlamydomonas*. Estas comparaciones muestran que la estructura secundaria de la tubulina y la organización general de los protofilamentos es la misma en microtúbulos y en hojas de Zn. Sin embargo, la superposición de imágenes de reconstrucciones helicoidales de microtúbulos con el modelo de tubulina en hojas de Zn muestra que el grosor del protofilamento es menor en hojas de Zn que en microtúbulos (50 Å frente a 60 Å). Una explicación a esta diferencia podría ser que la conformación de la tubulina en los protofilamentos de hojas de Zn es más compacta. Este cambio en la conformación molecular puede ser debido a la unión del Zn, o bien a que los contactos inter-filamentos son diferentes. Estos contactos laterales en las hojas de Zn, donde los protofilamentos se alinean de forma antiparalela, pueden ser diferentes a los de los microtúbulos, en los que los protofilamentos adyacentes son paralelos.

Estas hojas de Zn se han empleado para obtener cristales bidimensionales de tubulina apropiados para tratar por cristalografía de electrones. A partir de estos cristales se ha obtenido

un modelo tridimensional de la tubulina a alta resolución (hasta 3.7 Å; Wolf *et al.*, 1993,1996; Nogales *et al.*, 1995; Nogales *et al.*, 1998).

1.6.- Dinámica de microtúbulos.

Cuando la tubulina se encuentra por encima de una determinada concentración, denominada concentración crítica (Oosawa y Aakura, 1975), y en condiciones apropiadas de composición del medio y temperatura, ensambla reversiblemente en microtúbulos (Desai y Mitchison, 1997). Esta concentración crítica (Cr) depende de las condiciones de la disolución en que se encuentre la proteína (Lee y Timasheff, 1977). Durante el proceso de ensamblaje, el GTP unido a la subunidad β se hidroliza a GDP. Una vez unida la tubulina al polímero, el GDP unido al microtúbulo no se intercambia con el GTP en solución (Weisenberg *et al.*, 1976).

1.6.1.- Ensamblaje de microtúbulos.

La polimerización de tubulina en microtúbulos presenta dos fases: una fase de nucleación, en que la tubulina se asocia en forma lineal para formar núcleos de polimerización, y una fase de elongación o crecimiento del polímero, en que las subunidades se asocian a los microtúbulos crecientes en forma cooperativa (Andreu y Timasheff, 1986). En la fase de nucleación las subunidades se van adicionando unas sobre otras, de forma que sólo se establece un contacto intersubunidades. Las reacciones que tienen lugar son del tipo:



Donde n es el número de subunidades en el núcleo de polimerización. La constante de asociación para cada paso (K_n) será:

$$K_n = \frac{[P_i]}{[P_{i-1}][P_1]} \quad (1.2)$$

Siendo los valores de K_n para cada paso idénticos y pequeños.

En la fase de crecimiento la adición de cada subunidad tiene lugar de forma cooperativa, e implica la formación de contactos laterales con una o más subunidades en el polímero.



La constante de equilibrio para cada paso (K_g) será

$$K_g = \frac{[P_{n+j+1}]}{[P_{n+j}][P_1]} \quad (1.4)$$

Siendo los valores de K_g idénticos para cada paso y grandes en comparación con K_n .

En condiciones de polimerización, K_g es mucho mayor que K_n , y la constante de elongación aparente de los microtúbulos ($K_{p,app}$) se puede igualar a K_g . La tubulina ensambla en microtúbulos hasta que se alcanza un equilibrio en el que la concentración de proteína soluble es igual a la concentración crítica, y la concentración de polímero es igual a la concentración total de tubulina menos la concentración crítica. Oosawa *et al.* (1975) mostraron que, con bastante aproximación, la concentración crítica es igual a la inversa de la constante aparente de elongación. Esta aproximación es completamente rigurosa cuando se ensamblan microtúbulos a partir de GDP tubulina (Díaz y Andreu, 1993).

1.6.2.- Inestabilidad dinámica.

Los microtúbulos polimerizados a partir de GTP tubulina no están realmente en equilibrio, sino que se encuentran en estado estacionario creciendo y decreciendo estocásticamente en una situación conocida como “inestabilidad dinámica” (Mitchison y Kirschner, 1984b), consumiendo continuamente energía en forma de hidrólisis del GTP de las subunidades que se van adicionando al microtúbulo. Este comportamiento se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* (Kirschner y Mitchison, 1986; Mandelkow y Mandelkow, 1992; Cassimeris, 1993; McNally, 1996; Desai y Mitchison, 1997). Los microtúbulos alternan entre fases de crecimiento lento y despolimerización rápida (o “catástrofe”). Los microtúbulos en fase de catástrofe pueden volver a fase de crecimiento en un proceso denominado “rescate”. La frecuencia de alternancia entre estas fases es diferente en los dos extremos del microtúbulo, siendo la tasa neta de elongación mayor en el extremo (+) (Walker *et al.*, 1988). Recientemente, se ha propuesto la existencia de un intermedio cinético metaestable entre los estados de elongación y decrecimiento (Tran *et al.*, 1997).

1.6.3.- “GTP-cap.”

El comportamiento dinámico de los microtúbulos está regulado por la hidrólisis del GTP. Hemos visto cómo tras la incorporación de la tubulina al microtúbulo, el GTP se hidroliza irreversiblemente a GDP, de forma que las subunidades quedan incorporadas al polímero en forma de GDP-tubulina. Sin embargo, la hidrólisis del GTP no es necesaria para el ensamblaje de los microtúbulos, aunque sí para generar un polímero dinámico: los microtúbulos ensamblados en presencia de análogos del GTP que no se hidrolizan tras la unión de la tubulina al polímero, como el GMPCPP (metilén difosfato de guanosina) son capaces de ensamblar, pero no muestran inestabilidad dinámica (Caplow, 1992; Hyman *et al.*, 1992; Caplow *et al.*, 1994a).

La explicación más razonable a este fenómeno es que la hidrólisis del GTP y la incorporación de monómeros al microtúbulo están sujetas a regulación diferente: en condiciones de ensamblaje, la tasa de hidrólisis es más lenta que la tasa de unión de tubulina

(Hill y Carlier, 1989), de forma que los polímeros en crecimiento presentan una capa de subunidades de GTP tubulina en sus extremos. Esta capa recibe el nombre de “GTP-cap”. Los microtúbulos continúan creciendo mientras tengan una “GTP-cap” en sus extremos. En el momento en que ésta desaparece, entran en fase de catástrofe. Aunque éste es el modelo más razonable, todavía no se ha detectado la presencia de GTP tubulina en los extremos del microtúbulo, y el tamaño de la “GTP-cap” se desconoce. Se ha propuesto que una monocapa de GTP tubulina sería suficiente para estabilizar los microtúbulos (Drechsel y Kirschner, 1994; Chrétien *et al.*, 1995; Caplow y Shanks, 1996).

Para explicar este comportamiento, y las diferentes propiedades mecánicas que presentan los microtúbulos ensamblados con nucleótidos lentamente hidrolizables (Vale *et al.*, 1994; Hyman *et al.*, 1995) se ha propuesto un modelo en el que el dímero de tubulina existe en equilibrio entre dos conformaciones: una “rígida”, inducida por la presencia de GTP en el sitio E, que es la forma activa de la tubulina, y por tanto favorable a la polimerización en microtúbulos, y una “curvada” inactiva inducida por la hidrólisis del nucleótido, favorable a la catástrofe (Melki *et al.*, 1989, 1990; Díaz *et al.*, 1994; Barbier *et al.*, 1998). La GDP-tubulina en el interior del microtúbulo se mantiene en conformación próxima a la rígida gracias a la fuerza de los contactos laterales entre los protofilamentos (Chrétien *et al.*, 1998). La hidrólisis del nucleótido en la “GTP-cap” haría que se debilitaran estos enlaces interfilamentos y que el microtúbulo comenzara a depolimerizar (Drechsel y Kirschner, 1994). Se ha observado por microscopía electrónica que los protofilamentos de microtúbulos en fase de catástrofe se despegan en forma curvada (Mandelkow *et al.*, 1991), lo que parece ser indicador de una conformación curvada de la GDP-tubulina. Sin embargo, se ha propuesto recientemente que esta curvatura de los protofilamentos despegándose del microtúbulo puede ser debida simplemente a un cambio en la fuerza de los enlaces laterales interfilamentos, más que a un cambio en la estructura de la tubulina (Jánosi *et al.*, 1998).

1.6.4.- Inestabilidad dinámica de microtúbulos celulares.

Los microtúbulos celulares son mucho más dinámicos que los microtúbulos obtenidos *in vitro* (Simon *et al.*, 1992). Esto es debido a que la célula utiliza la inestabilidad dinámica

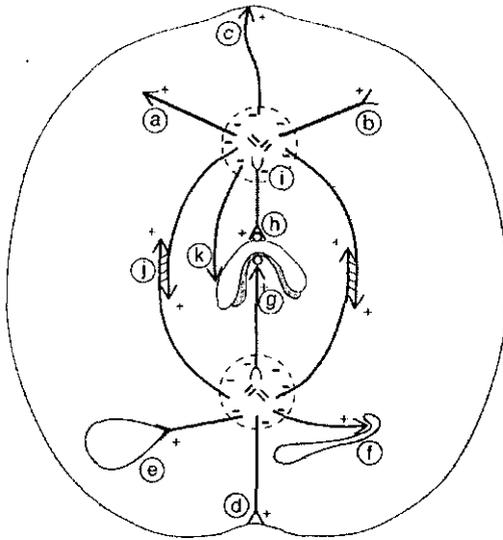


Figura 1.5.- Generación de fuerzas en el citoplasma por la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. a y b, microtúbulos con el extremo (+) libre en fases de crecimiento y catástrofe, respectivamente. c y d, microtúbulos anclados a la membrana que utilizan la fuerza de crecimiento o decrecimiento para deformar la misma o para mover el centrosoma. e, f, microtúbulos con el extremo positivo anclado a orgánulos citoplasmáticos. g, h, i, microtúbulos interactuando con el cinetocoro y el centrosoma, utilizando la inestabilidad dinámica para mover el cromosoma. j, microtúbulos que se entrecruzan vía motores y utilizan la fuerza de elongación para separar los centrosomas y formar el huso mitótico. k, microtúbulo empujando un brazo del cromosoma lejos del centro de la célula. Figura tomada de Inoué (1997).

para el movimiento de orgánulos en el citoplasma y para la organización celular durante la mitosis, en la que juega un papel esencial (Jordan *et al.*, 1996): durante la prometafase, la célula genera miles de microtúbulos por minuto a partir del centrosoma. Cada microtúbulo crece durante un período de tiempo hasta entrar en fase de catástrofe. Se piensa que la célula usa esta generación al azar de polímeros para explorar distintas configuraciones, algunas de las cuales se estabilizan vía interacción con los cinetocoros de los cromosomas, o con motores, o con otros microtúbulos, hasta formar el huso mitótico (Inoué y Salmon, 1995; Inoué, 1997). Durante la metafase, los cromosomas unidos a los microtúbulos oscilan entorno la región ecuatorial del huso, en concierto con crecimientos y decrecimientos de los microtúbulos, mientras que la tubulina se va añadiendo continuamente a los extremos de los microtúbulos unidos a los cromosomas al

mismo tiempo que se pierde de los extremos de los microtúbulos unidos al centrosoma. Durante la anafase, los microtúbulos unidos a los cromosomas decrecen, al mismo tiempo que otros microtúbulos en la zona media del huso crecen.

En la figura 1.5 se muestra la forma en la que la inestabilidad dinámica de los microtúbulos se traduce en la generación de fuerzas en el interior de la célula para posicionar orgánulos citoplasmáticos y para el movimiento de los cromosomas y la deformación de la célula durante la mitosis.

1.6.5.- Regulación de la inestabilidad dinámica.

La participación directa de la inestabilidad dinámica en la formación del huso mitótico implica que debe estar sometida a múltiples factores de regulación, entre los que destacamos los siguientes:

- Interacción con MAPs: los microtúbulos celulares están estabilizados por MAPs durante la interfase (Hyman y Karsenti, 1996; MacNally, 1996). Cuando las MAPs están unidas a los microtúbulos, la fase de rescate es más frecuente que la fase de catástrofe, y los microtúbulos crecen continuamente desde el centrosoma. Esta modulación de la inestabilidad dinámica está regulada por fosforilación: en la entrada en mitosis, las MAPs se fosforilan, con lo que disminuye su afinidad por los microtúbulos (Itoh *et al.*, 1997), y éstos se vuelven más dinámicos. Las proteínquinasas más frecuentemente implicadas en la fosforilación de las MAPs son el MPF, o factor promotor de la metafase, que es la forma activa del complejo p34^{cdc2}/ciclina B (Ookata *et al.*, 1997) y las MARKs, o quinasas reguladoras de la afinidad por los microtúbulos (Drewes *et al.*, 1998).

- Interacción con el cinetocoro: cuando varios microtúbulos que crecen desde el centrosoma son capturados por un cinetocoro, forman las fibras del cinetocoro, que son los microtúbulos más estables del huso mitótico (Mitchison *et al.*, 1986). Esta estabilización no se produce por supresión de la fase de catástrofe, sino porque el cinetocoro impide que se separen los microtúbulos unidos a él.

En la interacción de los microtúbulos con el cinetocoro reside también el punto de control de la mitosis (Wells, 1996; Rieder y Salmon, 1998). En profase y prometafase, hay una serie de proteínas (proteínas MAD -*mitosis arrest deficient*- y proteínas BUB -*budding uninhibited by benzimidazol*-) que se localizan en el cinetocoro (Li *et al.*, 1996; Rudner y Murray, 1996; Straight, 1997). La unión correcta de los microtúbulos al mismo hace que estas proteínas se separen e inicien una serie de señales (entre ellas inactivación del MPF) que conducen al inicio de la anafase. Si se detectan defectos en ésta unión, el ciclo celular se detiene en metafase y la célula no continúa dividiéndose hasta que el defecto se corrige.

- Proteínas reguladoras, descritas en el apartado 3.3 de esta Introducción.

1.7.- Taxol.

Por su papel fundamental en la formación del huso mitótico, los microtúbulos son el blanco de numerosas drogas antimitóticas (Wilson y Jordan, 1994; Jordan y Wilson, 1998; Rowinski y Donehower, 1991). Se conocen numerosas drogas que inhiben la polimerización y desensamblan microtúbulos, como la colchicina (Hastie, 1990), la podofilotoxina (Cortese, 1977) y la vinblastina (Toso *et al.*, 1993).

El taxol (Horwitz, 1992; Kingston, 1994) difiere de las anteriores en que su mecanismo de acción es promover y aumentar el ensamblaje de los microtúbulos. Tiene la propiedad de ensamblar la tubulina en su forma inactiva (“GDP-tubulina”; Díaz y Andreu, 1993) y de suprimir la inestabilidad dinámica de los microtúbulos a concentraciones subestequiométricas (Derry *et al.*, 1995). Los microtúbulos ensamblados con taxol presentan propiedades características: tienen como promedio un protofilamento menos que los ensamblados con glicerol, con MAPs o con el análogo más soluble del taxol docetaxel (Andreu *et al.*, 1992, 1994). Además, el taxol induce un alargamiento del espaciado entre monómeros de tubulina a lo largo del protofilamento similar al observado en microtúbulos ensamblados con análogos no hidrolizables de GTP (Arnal y Wade 1995) y modifica la flexibilidad de los microtúbulos (Venier *et al.*, 1994; Mickey y Howard, 1995). Su mecanismo de acción molecular parece ser estabilizar los microtúbulos mediante modificación de contactos laterales entre filamentos y cambio de conformación de la tubulina de forma “curvada” (la que adopta cuando está en forma de GDP tubulina) a “rígida” (Díaz *et al.*, 1993, 1996; Downing y Nogales, 1998b).

El mecanismo de acción de taxol a nivel celular a altas concentraciones es bloquear la mitosis celular aumentando la cantidad de microtúbulos y formando estructuras aberrantes, como haces densos de microtúbulos y ásteres (Rowinsky *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1989). A bajas concentraciones de la droga, el huso mitótico que se forma es aparentemente normal, pero la supresión de la inestabilidad dinámica es suficiente para que la maquinaria del punto de control de la mitosis (ver apartado 6.5 de esta Introducción) detecte que el huso no ha sido apropiadamente formado y detenga el ciclo celular en metafase (Jordan *et al.*, 1993; Rieder *et al.*, 1995). Este bloqueo mitótico condiciona una salida anormal de la mitosis en un estado similar a la interfase en la que no ha habido citoquinesis, lo cual parece ser suficiente para

inhibir posteriores proliferaciones celulares e inducir muerte celular por apoptosis (Jordan *et al.*, 1996). Sin embargo, no hay que descartar otros efectos posiblemente implicados en la muerte celular por taxol (Parekh y Simpkins, 1997; Torres y Horwitz, 1998).

Actualmente se usa para el tratamiento del cáncer de mama (Hortobagyi *et al.*, 1994; D'Andrea y Seidman, 1997) y de ovario (Gore y Thompson, 1995; Markman *et al.*, 1997), aunque ha demostrado tener efecto sobre otros tipos de cáncer (Rowinski, 1994; Spencer y Faulds, 1994; Aisner y Cortes-Funes, 1997; Bunn, 1997).

1.7.1.-Estructura química y obtención

La molécula de taxol (PM=739 Da.) está constituida por un núcleo de taxano (ver figura 1.6) y la cadena lateral unida a la posición 13 del anillo. El taxol se obtuvo en principio de la corteza del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*, Wani *et al.*, 1971). Sin embargo, esta fuente tenía dos graves inconvenientes: el bajo rendimiento de la extracción, y que el proceso significaba la muerte del árbol. Actualmente, el taxol se obtiene por semisíntesis (Denis *et al.*, 1990; Kingston, 1991) a partir de la 10 deacetilbacatina III (ver figura 1.6), precursor del taxol que se extrae de las hojas del tejo europeo (*Taxus baccata*), que al contrario que la corteza son una fuente renovable de extracción. Recientemente se ha logrado la síntesis completa del taxol (Nicolaou *et al.*, 1994; Horwitz, 1994), aunque no parece probable que vaya a contribuir significativamente a la producción de taxol, ya que la semisíntesis resulta mucho más económica.

La molécula de taxol se ha caracterizado exhaustivamente, y actualmente se dispone de bastante información acerca de qué sustituyentes de la molécula son esenciales para su actividad y cuáles pueden sustituirse (Kingston, 1991,1994). En la figura 1.6 se resumen las relaciones estructura/actividad de los grupos más importantes. Como se observa, todas las sustituciones en la parte “sur” de la molécula tienen efectos importantes en su actividad, por lo que esta región parece ser el sitio de unión del taxol a la tubulina. Sin embargo, las variaciones estructurales en la parte “norte” no afectan significativamente a la actividad del taxol.

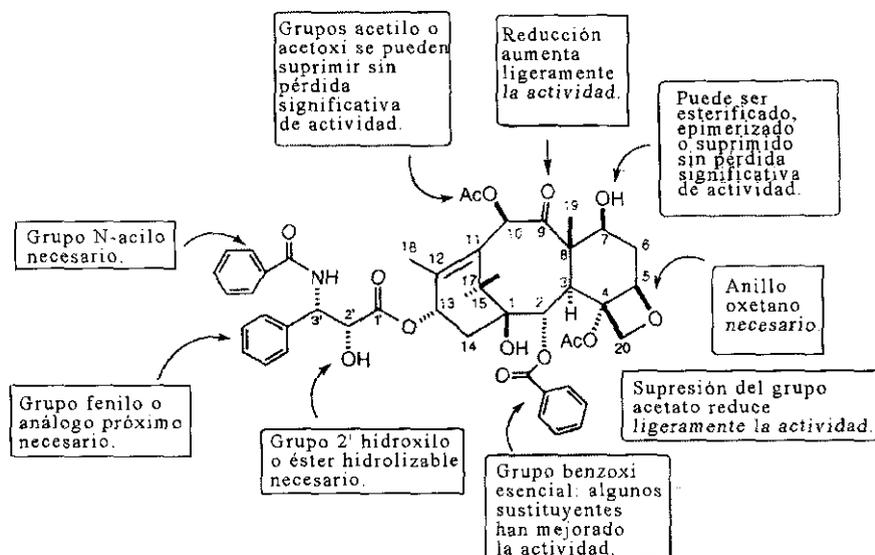


Figura 1.6.- Estructura-actividad del taxol. La molécula de 10 deacetil-baccatina está constituida por el anillo de taxano con un hidroxilo en la posición 13. El docetaxel presenta un grupo N-tercbutoxicarbonilo en lugar del grupo N-benzoilo del taxol, y carece del grupo 10 acetato. Tomada de Kingston, (1994).

1.7.2.- Sitio de unión del taxol en la molécula de tubulina.

El taxol se une a la subunidad beta de la tubulina. Se ha visto que derivados radioactivos de taxol fotomarcaban los fragmentos de la subunidad beta de la tubulina $\beta(1-31)$, (Rao *et al.*, 1994) y $\beta(217-231)$ (Rao *et al.*, 1995). Nogales *et al.* (1995) mediante cristalografía de electrones sobre hojas de Zn, situaron el taxol cerca de la superficie de contacto entre protofilamentos, pero lejos de los contactos inter-monómeros, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que el taxol estabiliza los microtúbulos por estabilización de los contactos inter-protofilamentos (Díaz *et al.*, 1993). En el modelo de estructura tridimensional de la tubulina (Nogales *et al.*, 1998) se observa que los anillos del carbono 3' del taxol se encuentra cerca del final de una α -hélice en el dominio N terminal de la tubulina, y el grupo benzoxi del carbono 2 en un giro que se encuentra entre dos hélices en el dominio intermedio con la tubulina, entre los residuos $\beta(212-222)$. Ambas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por fotomarcaje (Rao *et al.*, 1994;1995). El anillo de taxano se sitúa en un giro entre una lámina β y una α -hélice, también en el dominio intermedio de la tubulina

(ver figura 1.1). Este sitio de unión se encuentra situado hacia la parte interior o lumen del microtúbulo (Downing y Nogales, 1998b).

1.7.3.- Otras drogas estabilizadoras de microtúbulos.

Recientemente se han descrito nuevos compuestos que, a pesar de su pequeña semejanza estructural, se comportan de forma similar al taxol, es decir, estabilizan y promueven el ensamblaje de microtúbulos (Cowden y Paterson, 1997). Los macrólidos epotilona A y epotilona B, de la bacteria *Sorangium cellulosum* (Kowalski *et al.*, 1997) y la discodermolida, obtenida de la esponja marina *Discodermia dissoluta* (ter Harr *et al.*, 1996) arrestan el ciclo celular en mitosis, forman haces densos de microtúbulos en la célula y estabilizan e inducen la polimerización de la tubulina.

Las epotilonas inhiben competitivamente la unión de taxol a los microtúbulos (Kowalski *et al.*, 1997), lo que parece indicar que sus sitios de unión a la tubulina son el mismo o bien interaccionan con el del taxol.

1.7.4.- Taxoides fluorescentes.

A pesar de todos los estudios que se han realizado sobre el taxol, el mecanismo preciso por el cual se une y estabiliza a los microtúbulos permanece desconocido. Una estrategia válida para el estudio de la interacción de la droga con la tubulina sería preparar análogos del taxol con una sonda covalentemente unida que se excitara en un rango espectral distinto al de la tubulina y el taxol. Esto permitiría detectar cambios espectroscópicos en la droga tras su unión a su sitio en los microtúbulos. Además, si estos derivados fueran capaces de atravesar la membrana citoplasmática, permitirían visualizar microtúbulos celulares y localizar los blancos de la droga.

Con esta finalidad, se sintetizaron una serie de derivados fluorescentes del taxol (Souto *et al.*, 1995) obtenidos mediante conjugación del grupo amino libre del 7-O-(L-alanil)taxol con moléculas fluorescentes. En el presente trabajo se caracterizan funcionalmente estas sondas fluorescentes, y se evalúa su utilidad como sondas del sitio de unión del taxol.

En la figura 1.7 se muestra la superposición de tres moléculas de uno de los taxoides empleados en este trabajo (Flutax, en el que sobre la posición 7 de taxol se ha añadido una molécula de fluoresceína, ver Materiales y Métodos apartado 3.2). Se observa cómo el núcleo de taxol presenta una conformación definida, mientras que la fluoresceína puede adoptar diferentes orientaciones con respecto al esqueleto principal de la molécula.

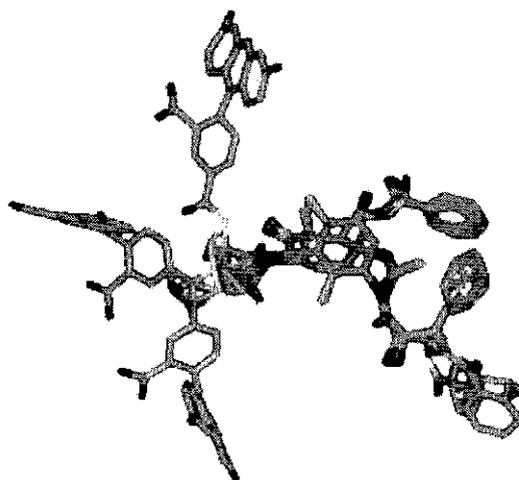


Figura 1.7.- Representación de estructura tridimensional de Flutax (7-O-[N-(Fluoresceín-4'-carbonil)-L-alani]taxol) a partir del análisis de los datos de RMN (Jiménez-Barbero *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

Los objetivos planteados durante el desarrollo de esta tesis han sido:

- Estudiar la capacidad de promover el ensamblaje de los microtúbulos de los taxoides fluorescentes en comparación con la del taxol, y comprobar si la introducción de las moléculas fluorescentes afecta significativamente a la actividad del taxol.
- Estudiar posibles cambios espectroscópicos que pudieran aparecer en las moléculas fluorescentes tras la unión de los derivados a su sitio en el microtúbulo, para evaluar su capacidad de actuar como sonda fluorescente del sitio al que se unen.
- Analizar los posibles cambios que pudieran ocurrir en la estructura de los microtúbulos ensamblados con los derivados fluorescentes de taxol, para comprobar si la molécula fluorescente interacciona con el microtúbulo.
- Evaluar la utilidad de los derivados fluorescentes para visualizar microtúbulos obtenidos *in vitro*, tanto inducidos por taxoide como polimerizados previamente a la adición del mismo, para comprobar su utilidad para teñir el citoesqueleto de las células.
- Medir la unión a microtúbulos preformados de los taxoides, para comprobar si el sitio de unión de los taxoides fluorescentes es el mismo del taxol y establecer un orden de afinidad de los derivados por dicho sitio.
- Medir posibles interacciones que pudieran ocurrir entre los derivados fluorescentes y la tubulina no ensamblada, y compararlas con las que ocurren con los microtúbulos.

2. Materiales y Métodos

2.1.- Proteínas.

La tubulina se purificó según el método de Weisemberg con modificaciones (Weisemberg *et al.*, 1968, Andreu *et al.*, 1984) y se almacenó en N₂ líquido hasta su uso. La concentración de tubulina se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción en tampón fosfato 10 mM, SDS 1%, pH 7.0 de $\epsilon_{275} = 107000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Andreu *et al.*, 1984).

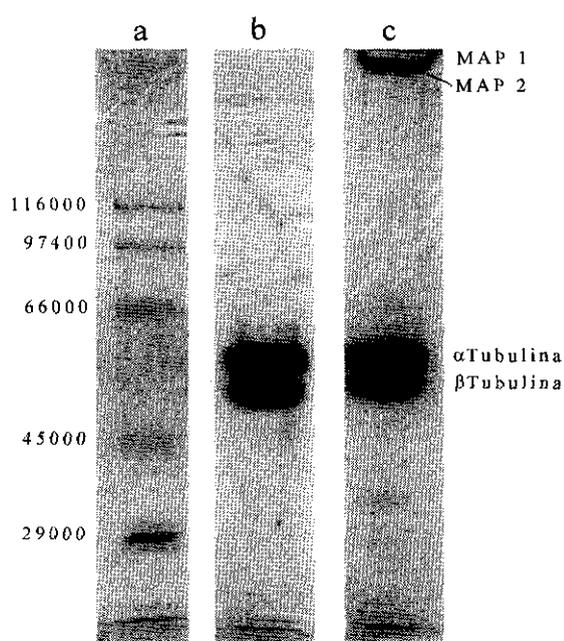


Figura 2.1.- SDS-PAGE 7% acrilamida de 5 μg de tubulina (calle b) y de MTP (calle c). Estándares de peso molecular (calle a) de SIGMA.

proteína se tiñeron con azul Coomassie (de la Viña *et al.*, 1988). Se cuantificaron a partir de densitometrados de geles con el programa Scion Image (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). La proporción de tubulina en la MTP resultó ser de un 81% (ver figura 2.1), mientras que la tubulina es 98% homogénea según este procedimiento.

La proteína microtubular (MTP) se preparó como se describe en de Pereda *et al.* (1995), almacenándose en N₂ líquido como sedimentos de microtúbulos. Su concentración se determinó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976), usando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar, y empleando un factor de rendimiento colorimétrico BSA/tubulina=1.2 (de Pereda *et al.*, 1995).

La proporción de tubulina en la MTP se determinó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con modificaciones (Best *et al.*, 1981) empleando geles de acrilamida al 7% a pH 8.5. Las bandas de

2.2.- Nucleotidos y otros materiales.

El GTP (sal de litio) fue de Boehringer. El GDP (sal sódica, GTP indetectable por HPLC) fue de Sigma (nº catálogo G 8012). Las concentraciones de nucleotido se determinaron mediante medida de absorción en HClO_4 0.5 M, usando un coeficiente de extinción a $\text{pH} \sim 1$ de $12400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Correia *et al*, 1987). El SDS fue de BioRad. El sephadex G-25 medium fue de Pharmacia. El metanol (grado HPLC), etanol, DMSO, TFA, glicerol, NaH_2PO_3 , Na_2HPO_3 y MgCl_2 , fueron de Merck grado analítico. El acetonitrilo (grado HPLC) fue de Scharlau. La BSA, la ovoalbúmina, el EGTA, el MES y el PIPES fueron de Sigma. El EDTA fue de Fluka.

2.3.- Taxoides.

2.3.1.- Taxol, [^3H]taxol y Docetaxel.

El taxol fue de Bristol-Myers-Squibb, Pinceton, N. J., el propietario de la marca registrada. El docetaxel fue de Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia. Ambos ligandos fueron almacenados disueltos en DMSO a -20°C , y su concentración fue determinada espectrofotométricamente usando coeficientes de extinción de $\epsilon_{273} = 1700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en metanol para el taxol (Wani *et al*, 1971) y $\epsilon_{273} = 936 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en etanol para el docetaxel (Díaz y Andreu, 1993). El [^3H] taxol (actividad específica $2.29 \times 10^{14} \text{ Bq mol}^{-1}$) fue un regalo de los Drs. I. Ringel, The Hebrew University (Jerusalén) y S. B. Horwitz, Albert Einstein College of Medicine (Bronx, N. Y.) y fue almacenado en metanol a una concentración de 0.16 mM a -70°C . Se tomó una alícuota y se diluyó en taxol frío hasta una actividad específica de $1.15 \times 10^{13} \text{ Bq mol}^{-1}$, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.3.2.- Taxoides fluorescentes.

El Flutax (7-O-[N-(Fluorescein-4'-carbonil)-L-alanil]taxol, $\text{PM}=1282 \text{ Da}$), el 2' acetil Flutax (2'-O-acetil-7-O-[N-(Fluorescein-4'-carbonil)-L-alanil]taxol, $\text{PM}=1325 \text{ Da}$), el

HexaFlutax (7-O-[N-(Fluoresceín-4'-carboxamido-n-hexanoil)-L-alanil]taxol, PM=1396 Da), el Flutax 2 (7-O-[N-(2,7-Difluorofluoresceín-4'-carbonil)-L-alanil]-taxol, PM=1319 Da), el Flutax 3 (7-O-[N-(2,7-Difluorosulfofluoresceín-4'-carbonil)-L-alanil]taxol, PM=1355 Da), el Rotax (7-O-[N-(tetrametilrodamin-4'-carbonil)-L-alanil]taxol, PM=1337 Da), el X-Rotax (7-O-[N-(X-rodamin-4'-carbonil)-L-alanil]taxol, PM=1442 Da) y el α -SulfoRotax (7-O-[N-(sulforodamin-4'-sulfonil)-L-alanil]taxol, PM=1466 Da) (ver figura 2.2) fueron sintetizados por el Dr. André A. Souto según se describe para el Flutax en Souto et al., (1995), usando los fluoróforos correspondientes de Molecular Probes. El β -SulfoRotax (7-O-[N-(sulforodamin-4'-sulfonil)- β -alanil]taxol, PM=1487 Da) fue amablemente cedido por el Dr. K. C. Nicolaou.

La pureza de los taxoides se determinó mediante HPLC de fase reversa en columnas C-4 (Rotax, X-Rotax, α - y β -SulfoRotax) y C-18 (taxol, Flutax, 2' acetil Flutax, HexaFlutax, Flutax 2 y Flutax 3) mediante un gradiente del 20 al 80% de acetonitrilo en agua -0.05% de TFA- durante 60 minutos, monitorizado a 228 y a 325 nm. Se utilizó un equipo de cromatografía LC-10AD de Shimadzu con columnas C-18 de Supelco y C-4 de Vydac. Este sistema de cromatografía permite resolver la mayoría de los taxoides empleados en éste trabajo, como se muestra en la figura 2.3. Las purezas determinadas a 228 nm fueron de un 91% para el Flutax (0.3% de taxol), 89% para el 2' acetil Flutax (taxol indetectable, 0.8% de Flutax), 94% para el Flutax 2 (0.2% de taxol), 94% para el Flutax 3 (taxol indetectable), 97.7% para el HexaFlutax (taxol indetectable), 95 % para el Rotax (taxol indetectable), 98% para el X-Rotax, 86.4% para el α SulfoRotax (taxol indetectable) y 98% para el β -SulfoRotax. Se observó que aumentaba el contenido de taxol en el Flutax aproximadamente un 1% por año de almacenamiento en DMSO a - 20° C. Tanto la fluoresceína como la fluoresceína alanina se resuelven por este sistema de cromatografía, no encontrándose en ninguno de los cromatogramas analizados, por lo que el contenido máximo de impurezas fluorescentes presentes se estimó en un 0.2%.

Los coeficientes prácticos de extinción molar que se determinaron por dilución gravimétrica en tampón fosfato 50 mM pH 7.0 con un 0.5% de SDS fueron de $\epsilon_{458} = 23100 \pm 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Flutax), $\epsilon_{458} = 16600 \pm 600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (2'-acetil Flutax), $\epsilon_{458} = 24200 \pm 600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HexaFlutax), $\epsilon_{496} = 49100 \pm 1100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Flutax 2), $\epsilon_{502} = 55500 \pm 2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

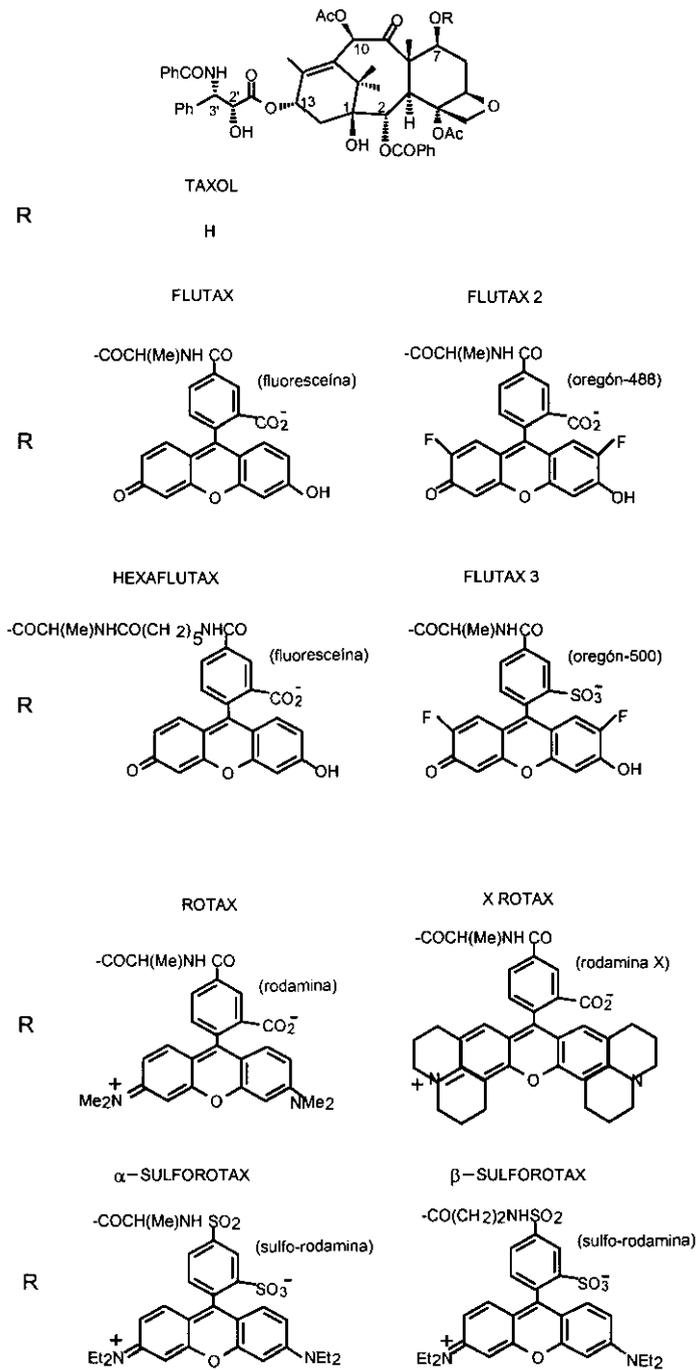


Figura 2.2.- Estructura química de los taxoides empleados en este trabajo. El 2' acetil Flutax es igual al Flutax, salvo que con la posición 2' del taxol acetilada. El docetaxel presenta el mismo anillo de taxano del taxol, salvo que con un grupo N-tercbutoxicarbonilo en lugar del grupo N-benzoilo, y carece del grupo 10 acetato.

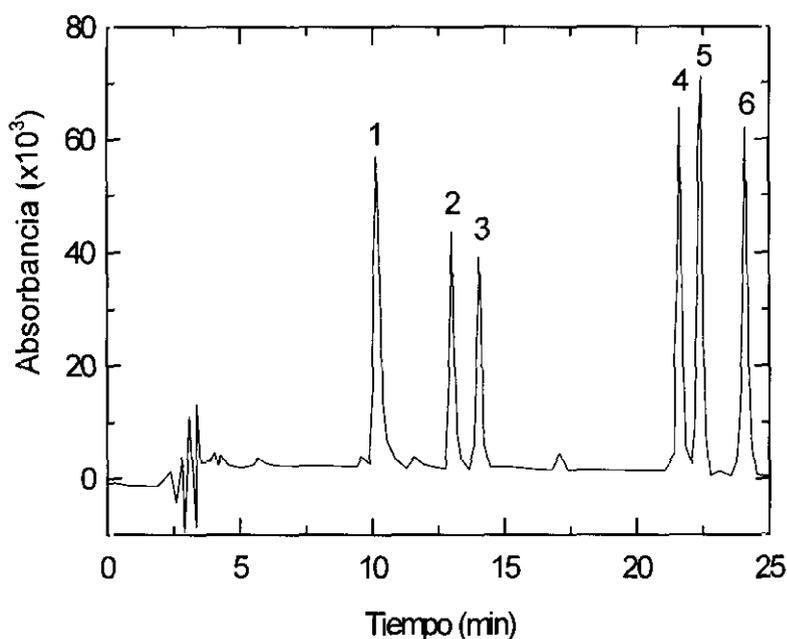


Figura 2.3.- HPLC de taxoides en un gradiente del 50 al 70% de acetonitrilo en H₂O - 0.05% TFA- en 20 minutos más 5 minutos más al 70%, monitorizado a 228 nm, en columna C-18 de Supelco. 1, Flutax 3 12.5 μ M. 2, docetaxel 30 μ M. 3, taxol, 10.8 μ M. 4, Flutax 7.5 μ M. 5, Flutax 2 12.5 μ M. 6, 2' acetil Flutax, 12.5 μ M. El volumen de inyección fue en todos los casos de 20 μ L.

(Flutax 3). Para el Rotax (máximo absorción 555 nm), X-Rotax (580 nm), y α - y β - SulfoRotax (575 nm) se usó un coeficiente de extinción en el máximo de 80000 M⁻¹ cm⁻¹.

2.3.3.- Solubilidad de los taxoides fluorescentes.

La solubilidad aparente de los taxoides se determinó mediante ultracentrifugación de alícuotas de 0.2 mL en un rotor TL100 a 50000 rpm (100000 g) durante 10 minutos a 25° C, y midiendo espectrofotométricamente la concentración en la parte de arriba y de abajo del tubo después de diluir en tampón fosfato 50 mM pH 7.0 con SDS 0.5%.

La solubilidad de los taxoides en los que el fluoróforo es la fluoresceína está

relacionada con el estado de ionización de esta molécula. En nuestras condiciones de trabajo, la fluoresceína se encuentra en equilibrio entre las formas monoaniónica y dianiónica de la molécula (Diehl y Horchak-Morris, 1987; ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). La forma monoaniónica es insoluble, mientras que la forma dianiónica es soluble. Por tanto la concentración de Flutax, HexaFlutax, y 2' acetil Flutax que permanece disuelto está condicionada por la proporción de forma monoaniónica en la solución. Ésta, a su vez, depende del pH, de la concentración de taxoide y de la presencia de Mg^{2+} en el medio. Todo esto hace que sea muy difícil determinar una solubilidad del Flutax, por lo que nos referimos siempre a concentración de taxoide en el sobrenadante tras 10 minutos de centrifugación a 100000 g.

En la práctica el Flutax y el 2' acetil Flutax son completamente solubles hasta 200 μM en tampón acuoso a pH por encima de 8.5. En tampón PEDTA pH 7.0 un 85% del Flutax permanece en el sobrenadante tras 10 minutos de centrifugación a 100000g. El Mg^{2+} y el la disminución del pH disminuyen la concentración de Flutax que permanece en el sobrenadante, de modo que en PEMG pH 6.6 la máxima concentración de taxoide en el sobrenadante a concentraciones totales de hasta 100 μM de Flutax fue 20 μM . La presencia de tubulina y el glicerol mejoran la solubilidad aparente del Flutax. En tampón con PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, EGTA 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, GTP 1 mM pH 6.5, entorno al 12% del Flutax total precipita, hasta una concentración total de Flutax de 12 μM . En el mismo tampón sin glicerol a pH 6.9, el porcentaje de Flutax que permanece en el sobrenadante varía de forma dependiente de concentración del 50 al 30%.

El HexaFlutax también presenta una solubilidad limitada en tampones acuosos, si bien la dependencia de concentración, del pH y de la presencia de Mg^{2+} son mayores que en el caso del Flutax. En PEMG a pH 6.6, la solubilidad máxima alcanzada fue de 10 μM . A pH 7.0, y a 20 μM de HexaFlutax, aproximadamente 15 μM permanece en el sobrenadante tras 10 minutos de centrifugación a 100000 g en ausencia de $MgCl_2$ 7 mM.

Para solventar los problemas debidos al estado de ionización de Flutax se sintetizaron derivados de taxol en los que se sustituyó la fluoresceína por un análogo de esta molécula con dos átomos de F en las posiciones 2 y 7 (Oregón green 488, siendo el taxoide resultante el Flutax 2) y por el mismo derivado difluorado con un grupo sulfónico en lugar del grupo carbonilo (Oregón green 500, Flutax 3). El pKa del dianión de estos cromóforos (4.3 para el

Oregón green 488 -Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, 1998-) es mucho más bajo que el pH habitual de trabajo, por lo que ambos derivados de taxol son completamente solubles en el rango de pH de 6.6 a 7.0 ($\geq 200 \mu\text{M}$). Además, estos cromóforos son más fotoestables que la fluoresceína, por lo que los derivados de taxol obtenidos resultan más indicados para visualizar microtúbulos.

El Rotax y el X-Rotax sólo son aparentemente solubles hasta un máximo de $1 \mu\text{M}$ en presencia de tubulina y en tampón PIPES 100 mM pH 6.5, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl_2 1 mM. Del α - y β -SulfoRotax sólo se consiguió un máximo de $0.14 \mu\text{M}$ de taxoide en el sobrenadante partiendo de hasta $1 \mu\text{M}$ de taxoide total.

De forma similar al taxol (Song *et al*, 1996), todos estos taxoides se adsorben parcialmente al recipiente que los contiene, ya sea plástico, vidrio o cuarzo. En ausencia de SDS en el tampón, de un 15 a un 25% de Flutax o Flutax 2 entre 2 y $20 \mu\text{M}$ queda adsorbido en las paredes de una cubeta de cuarzo. La presencia de tubulina en la solución evita esta adsorción. En el caso del Rotax, en tampón PIPES 100 mM pH 6.5, glicerol 3.4 M, MgCl_2 1 mM, GTP 1 mM, EGTA 1 mM, y en presencia de MTP 0.15 mg/mL, aproximadamente la mitad del taxoide hasta una concentración de $1 \mu\text{M}$ queda adsorbido a las paredes del recipiente. Medidas puntuales del X-Rotax muestran que se adsorbe de forma similar al Rotax.

2.3.4.- Espectroscopía de absorción de taxoides fluorescentes.

Los espectros de absorción se adquirieron en espectrofotómetros Hitachi U2000 y Varian Cary 3E termostatizado usando celdas de paso óptico de 0.1, 0.5 y 1.0 cm. Las concentraciones de taxoide fluorescente se determinaron espectrofotométricamente después de diluir la muestra en tampón fosfato 50 mM pH 7.0 con SDS 0.5%. Los espectros de taxoide en presencia de tubulina se obtuvieron diluyendo el ligando a una concentración de $20 \mu\text{M}$ en una solución con tubulina $25 \mu\text{M}$ equilibrada como se describe en el apartado (4.1) en tampón PEDTA pH 6.6 o 7.0 con GDP 1 mM, o en el mismo tampón con MgCl_2 7 mM a 4°C . Los espectros en presencia de microtúbulos de GDP tubulina se obtuvieron ensamblando la proteína con el taxoide elegido en tampón PEDTA, GDP 1mM, MgCl_2 7 mM a pH 6.6 o 7.0 como se describe en el apartado (4), y adquiriendo el espectro a 37°C , o bien polimerizando

microtúbulos de MTP en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, MgCl_2 7 mM, EGTA 1 mM, pH 6.5 a 37 °C y añadiendo el taxoide después del ensamblaje. En los espectros de taxoide en presencia de microtúbulos se corrigió la absorción debida a la dispersión de luz por extrapolación doble-logarítmica de turbidez frente a longitud de onda de 600 a 550 nm (Andreu y Timasheff, 1986). En estos espectros no es posible determinar un coeficiente de

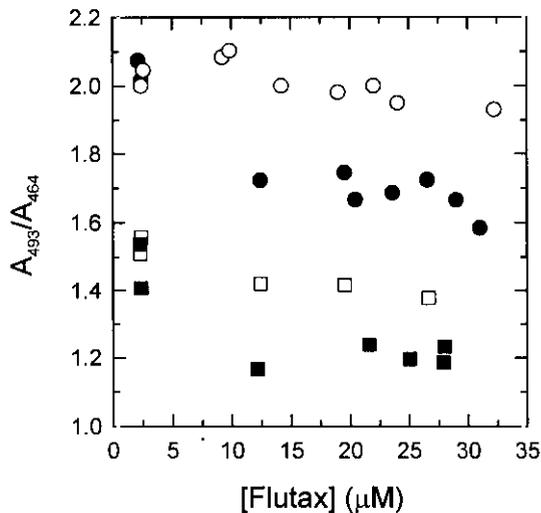


Figura 2.4.- Relación entre valores de absorción a 493 nm y a 464 nm de Flutax en tampón PEDTA pH 7.0 (○), en el mismo tampón más MgCl_2 7 mM (●), en PEDTA pH 6.6 (□) y en el mismo tampón con MgCl_2 7 mM (■).

extinción, ya que sólo se pueden adquirir en un determinado rango de concentraciones (el que permite obtener un 90% de proteína polimerizada), por lo que se usa un coeficiente de absorción aparente a la concentración de ligando total a la que se adquirió el espectro.

La forma del espectro de absorción de Flutax en agua es dependiente de su concentración, de modo que no se puede establecer un coeficiente extinción en solución acuosa, salvo a concentraciones por debajo de 2 μM . Además, depende del estado de ionización de la molécula, de forma que se puede

seguir la transición entre formas moleculares por la relación entre los valores de absorción a distintas longitudes de onda (Diehl, 1989; ver apartado 2.5 de Materiales y Métodos). La presencia de Mg^{2+} en la solución cambia la forma del espectro a concentraciones por encima de 2 μM . Sin embargo, ésta es independiente de la presencia de Ca^{2+} 1 mM. En la figura 2.4 se muestra la relación entre valores de absorción a 493 nm y a 464 nm en función de la concentración de taxoide en tampón acuoso con y sin MgCl_2 a pH 7.0 y a pH 6.6.

La forma de los espectros de absorción en tampón acuoso de Flutax 2 y de Flutax 3 es independiente de pH en el rango de 6.6 a 7.0, de la concentración de taxoide (hasta 40 μM)

y de la presencia de cationes.

2.3.5.- Determinación espectrofotométrica del equilibrio de ionización de Flutax.

El fluoróforo fluoresceína puede encontrarse en solución como distintas formas prototrópicas: forma protonada (H_3Fl^+), neutra (H_2Fl), monoaniónica (HFl^-) y dianiónica (Fl^{2-}), cada una de las cuales presenta un espectro de absorción diferente, y siendo los pKa calculados para cada equilibrio de $pK_{H_3Fl^+}=2.2$, $pK_{H_2Fl}=4.2$, $pK_{HFl^-}=6.3$ (Diehl y Markuszewski, 1989; Klonis *et al*, 1998). En nuestras condiciones de trabajo, la fluoresceína se encuentra en equilibrio entre las formas monoaniónica (con el grupo carboxilo ionizado) y dianiónica (con los grupos carboxilo e hidroxilo ionizados, ver figura 2.2) de la molécula, siendo la forma dianiónica la que más contribuye al espectro de emisión de la fluoresceína, por presentar mayor coeficiente de extinción y mayor rendimiento cuántico (Klonis *et al.*, 1998). Por tanto, Flutax también experimenta dicho equilibrio:



Donde HFl^- es la forma monoaniónica de Flutax y Fl^{2-} es la forma dianiónica. La constante ácida de ionización (K_a) de este equilibrio es:

$$K_a = \frac{[Fl^{2-}][H^+]}{[HFl^-]} \quad (2.2)$$

Luego,

$$pK_a = pH - \log \frac{[Fl^{2-}]}{[HFl^-]} \quad (2.3)$$

Definimos F_D como la fracción molar de la molécula en forma dianiónica, y F_M como la fracción molar de monoanión.

$$F_D = \frac{[Fl^{2-}]}{[Fl^{2-}] + [HFl^-]} = \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad (2.4)$$

$$F_M = \frac{[HF^{l-}]}{[F^{l2-}] + [HF^{l-}]} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (2.5)$$

Dividiendo la ecuación (9) por la (8) tenemos que:

$$\frac{F_M}{F_D} = \frac{[H^+]}{K_a} = 10^{pK_a - pH} \quad (2.6)$$

La absorción de Flutax a cada longitud de onda λ_i se debe a la contribución de las dos formas de ionización, de modo que:

$$A^{\lambda_i} = [(\epsilon_D^{\lambda_i} F_D) + (\epsilon_M^{\lambda_i} F_M)] C \quad (2.7)$$

Donde A^{λ_i} es la absorbancia total a la longitud de onda i , $\epsilon_D^{\lambda_i}$ y $\epsilon_M^{\lambda_i}$ son respectivamente los coeficientes de extinción del dianión y del monoanión, y C es la concentración total del Flutax. Luego el coeficiente de extinción aparente a cada longitud de onda será:

$$\epsilon^{\lambda_i} = \epsilon_D^{\lambda_i} F_D + \epsilon_M^{\lambda_i} F_M \quad (2.8)$$

Donde se observa que el coeficiente de extinción a cada longitud de onda depende de la fracción molar del dianión y del monoanión de Flutax. Para determinar el pKa de Flutax en tampón PEDTA se midieron las relaciones entre valores de absorbancia (que son iguales a las relaciones entre valores de coeficiente de extinción) a 493 nm y 464 nm a distintos pH. Se eligieron estas longitudes de onda porque 493 nm es la longitud de onda del máximo de absorción del dianión en tampón acuoso neutro, y 464 nm es la longitud de onda para la que el coeficiente de absorción del monoanión y el del dianión coinciden para la fluoresceína (Diehl, 1989). Se representaron los valores de relación entre coeficientes de extinción a las dos longitudes de onda en función del pH y sobre los datos experimentales se ajustó la ecuación (2.9) (Albert y Serjeant, 1984; Pilar Lillo, comunicación personal) mediante un algoritmo de

Marquadt-Levenberg, (Press *et al.*, 1989, pags. 572-580) usando el programa SigmaPlot® 1.02.

$$\frac{A^{493}}{A^{464}} = \frac{D - M}{1 + C10^{pKa - pH}} + M \quad (2.9)$$

Esta expresión se puede deducir a partir de las ecuaciones (2.6) y (2.8).

$$M = \frac{\epsilon_M^{493}}{\epsilon_M^{464}}, D = \frac{\epsilon_D^{493}}{\epsilon_D^{464}} \text{ y } C = \frac{\epsilon_M^{464}}{\epsilon_D^{464}} \cdot \frac{\epsilon_M^{464}}{\epsilon_D^{464}} \text{ para la fluoresceína es } \sim 1 \text{ (Diehl, 1989), por lo}$$

que en principio se iguala el valor C a 1. Se comprobó que variaciones de un 10% en el valor de C producían cambios en el valor calculado de pKa de 0.05 unidades de pH.

2.4.- Ensamblaje de microtúbulos.

2.4.1.- Equilibrado de la proteína.

Para el ensamblaje de microtúbulos de GDP-tubulina primero se preparó ésta a partir de GTP tubulina como se describe en Díaz y Andreu (1993), mediante dos cromatografías sucesivas en columnas G-25 equilibradas en tampón PEDTA, GDP 1 mM, pH 7.0. El intercambio de nucleótido se comprobó por precipitación de la proteína y análisis del nucleótido por HPLC (Díaz y Andreu, 1993), siendo del 95 ± 3 %. Se tomaron las fracciones más concentradas de la columna, se centrifugaron a 100000 g durante 10 minutos a 4° C, se llevaron a la concentración deseada y se les añadió MgCl₂ hasta la concentración de trabajo (7 mM, excepto donde se indica). Tras la adición de MgCl₂, el pH de la disolución baja a 6.6. Alternativamente se ajustó el pH tras la adición de catión al valor deseado (de 6.0 a 7.0). Posteriormente se añadió el taxoide a la concentración deseada (en una relación tubulina/taxoide 1:1.2, excepto donde se indica).

En el caso de proteína microtubular se resuspendieron sedimentos de microtúbulos de MTP en tampón PIPES 100 mM, con o sin glicerol 3.4 M, EGTA 1 mM, GTP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 6.5 (excepto en el caso del Flutax cuando está en tampón sin glicerol, en

el que se ajustó el pH a 6.9) y se dejaron despolimerizar durante 20' a 4° C con agitación constante. Posteriormente se centrifugó la proteína durante 30 minutos a 100000 g a 4° C y se midió la concentración de proteína en el sobrenadante.

2.4.2.- Monitorización del ensamblaje por aumento de turbidez.

El ensamblaje de la tubulina en microtúbulos se monitorizó turbidimétricamente a 350 nm o a 400 nm en un espectrofotómetro Varian 635. Se usó una cubeta de 1 cm de paso óptico termostalizada a la temperatura deseada mediante un baño Lauda RC6, un baño Haake D8GH y un juego de llaves de tres vías. La polimerización se inició poniendo la cubeta a 37° C. La reversibilidad de la polimerización se comprobó enfriando a 4° C. El aumento de turbidez es proporcional a la concentración de microtúbulos, de forma que puede medirse la concentración crítica de polimerización representando el aumento de turbidez debido a polimerización de tubulina a distintas concentraciones frente a la concentración de proteína total. El corte con el eje x nos da la concentración crítica (Andreu y Timasheff, 1986).

2.4.3.- Medida de polimerización de tubulina por sedimentación.

Las muestras a polimerizar se incubaron a 37° C durante 2 h (excepto donde se indica) y se centrifugaron durante 10 minutos a 50000 rpm (100000 g) en un rotor TL100 precalentado a la temperatura de polimerización. Se separaron sobrenadante (que contiene proteína soluble) y sedimento (que contiene proteína polimerizada), y éste último se resuspendió en un volumen igual al inicial en tampón PEDTA pH 7.0 frío o en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 SDS 0.25%. La concentración de proteína en el sobrenadante y en el sedimento se determinó por dilución en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 SDS 0.25% y medida de emisión de fluorescencia del triptófano a 320 nm con longitud de onda de excitación de 280 nm. Las medidas se realizaron en un fluorímetro Shimadzu RF 540, usando cubetas de 0.5 x 1 cm de paso óptico termostalizadas a 20° C, con rendijas de excitación de 2 nm y de emisión de 5 nm, utilizando como estándares muestras de proteína de concentración conocida. El rango de concentraciones de proteína para medir en estas condiciones varió desde 20 hasta 300 nM (ver

figura 2.5). La concentración de tubulina en el sobrenadante es constante, y es igual a la concentración crítica de polimerización (inversa de la constante aparente de elongación). La representación de proteína en el sedimento (proteína polimerizada) frente a tubulina total da una recta de pendiente 1 cuyo corte con el eje x señala la concentración crítica (Oosawa y Asakura, 1975; Andreu y Timasheff, 1986).

2.4.4.- Determinación espectrofluorométrica de la concentración de taxoide unido a los microtúbulos.

Los microtúbulos polimerizados en presencia de taxoides fluorescentes se separaron de la tubulina soluble por sedimentación como se describe en el apartado (4.3). La concentración de taxoides fluorescentes se determinó en el sobrenadante y en el sedimento fluorométricamente sobre la misma dilución empleada para medir la concentración de tubulina, usando estándares de concentración conocida. El Flutax, el HexaFlutax y el 2' acetil Flutax se determinaron a una longitud de onda de excitación de 486 nm y midiendo la emisión a 522 nm. El Flutax 2 y el Flutax 3 se midieron a una longitud de onda de excitación de 494 nm y a 502 nm, respectivamente, y midiendo la emisión a 522 nm. El Rotax se midió a una longitud de onda de excitación de 560 nm y midiendo la emisión a 576 nm. El X-Rotax se midió a longitudes de onda de excitación de 585 nm y de emisión de 596 nm. El Rotax y α - y β -SulfoRotax se midieron a longitudes de onda de excitación de 575 nm y de emisión de 587 nm. Las concentraciones de taxoide fluorescente que se pueden detectar cómodamente en las condiciones indicadas abarcan desde 5 hasta 600 nM (ver figura 2.5).

La concentración de taxol se determinó desecando volúmenes conocidos de sedimento y del sobrenadante con docetaxel a concentración conocida como estándar interno. Los taxoides se resuspendieron en metanol, se centrifugaron durante 2 minutos en microfuga para eliminar la proteína en suspensión y se determinó la concentración de taxol mediante medida del área del pico en HPLC de fase reversa usando un gradiente de acetonitrilo del 50 al 70% en H₂O (ambos solventes con un 0.05% TFA) en columna C-18 de Supelco con precolumna C-18 de Applied Biosystems.

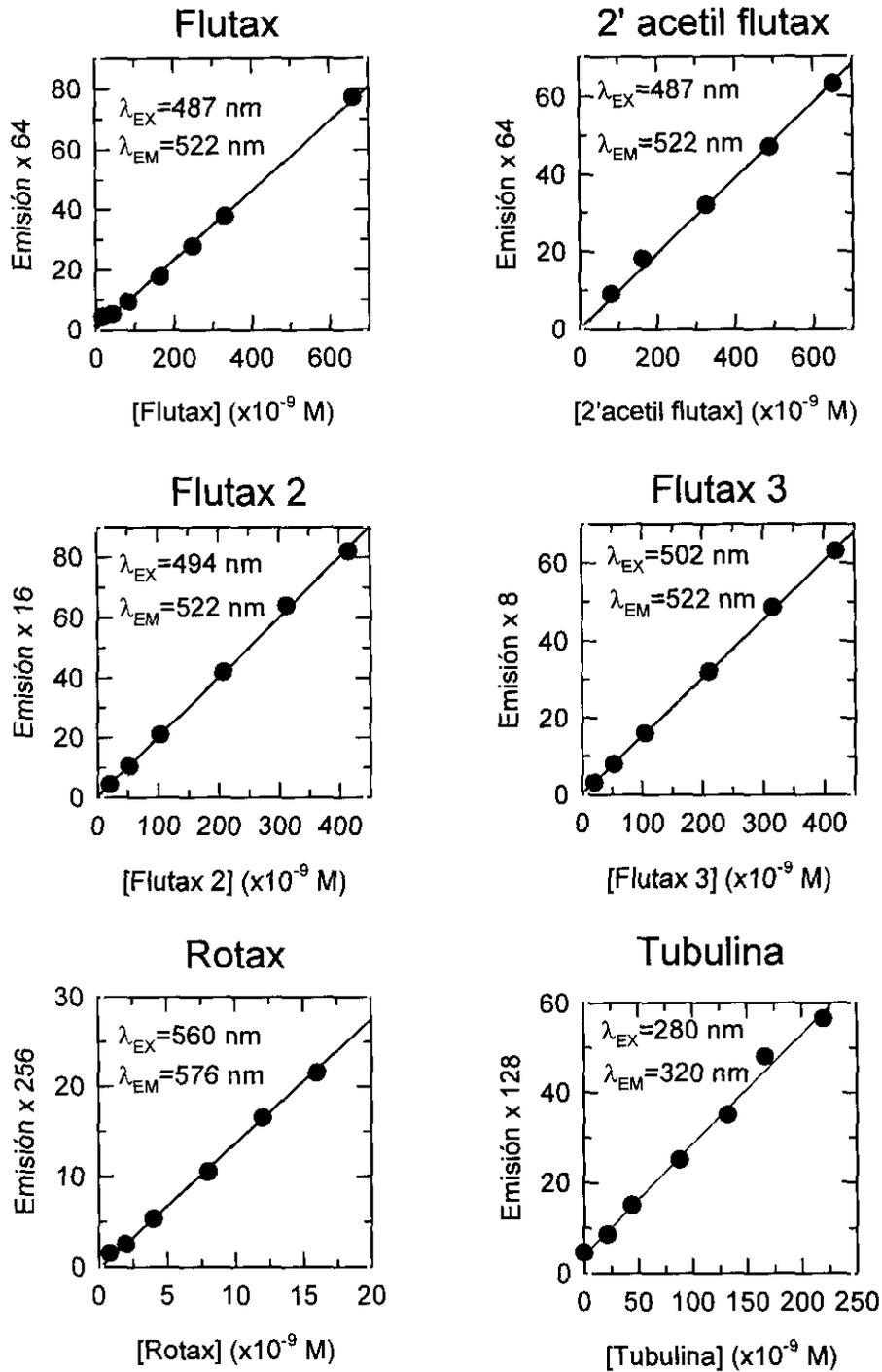


Figura 2.5.- Intensidad de emisión de fluorescencia de tubulina y taxoides fluorescentes en el rango de concentraciones empleado para medidas fluorométricas en el presente trabajo, en tampón fosfato 10 mM, SDS 0.25%, pH 7.0.

2.4.5.- Visualización de microtúbulos.

Los microtúbulos obtenidos se observaron por microscopía electrónica. Para ello se adsorbieron las muestras con proteína polimerizada durante 10-30 segundos a rejillas de cobre recubiertas con formvar y carbón. A continuación se tiñeron negativamente durante dos minutos con acetato de uranilo al 2% en H₂O, se eliminó el exceso de acetato de uranilo mediante adsorción del líquido a papel y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se observaron en microscopios electrónicos Philips EM 300 o EM 420.

También se visualizaron microtúbulos mediante microscopía óptica de epifluorescencia. Para la visualización de microtúbulos de GDP-tubulina se ensambló la proteína como se describe en (4.1). Tras la polimerización se depositaron 10 µL entre porta y cubre sellando la separación entre cristales con vaselina. Alternativamente, se dejaron ensamblar los microtúbulos entre porta y cubre a temperatura ambiente.

Para la visualización de microtúbulos de MTP se equilibró la proteína como se describe en (4.1) y se ensambló a 4 mg/mL, durante 1 h a 37° C. Posteriormente se añadió Flutax 40 micromolar, se diluyó la muestra 10 veces en tampón caliente y se dispuso entre porta y cubre sellados con vaselina. Para comprobar la especificidad de la unión de taxoides fluorescentes se diluyó la muestra tras añadir el Flutax en tampón con docetaxel 80 µM.

Las muestras así preparadas se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan usando objetivos Plan-Apochromat y Plan-Neofluar 63x. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD refrigerada Photometrics 200 KAF-1400 utilizando software IPLab Spectrum®, y se editaron e imprimieron con Adobe Photoshop®.

2.5.- Unión de taxoides a tubulina en distintas formas de polimerización.

2.5.1.- Unión de taxoides a microtúbulos de proteína microtubular.

Para medir la unión de taxoides a microtúbulos, se diseñó un experimento en el que

la unión fuera prácticamente independiente de la polimerización, para lo que se buscaron unas condiciones en las que la adición de taxoide no alterase significativamente la concentración de polímero formado. Por eso se eligió medir la unión de taxoides a proteína microtubular ensamblada previamente a la adición de taxoide. La proteína se equilibró como se describe en (4.1), en tampón PIPES 100 mM, con o sin glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6.5 (excepto en el caso de la unión de Flutax en tampón sin glicerol, en el que el pH es 6.9), se ajustó la concentración a 4 mg/mL en tampón sin glicerol o a 2 mg/mL en tampón con glicerol y se dejó ensamblar la proteína durante una hora a 37° C. Posteriormente al ensamblaje se añadieron a alícuotas de 0.1 mL concentraciones crecientes de taxoide. Se dejaron durante 30 minutos más para que se alcanzara la situación de equilibrio y se centrifugaron a 50000 rpm durante 10 minutos en un rotor TL100 precalentado a 37° C. Las concentraciones de proteína y ligando en el sobrenadante y en el sedimento se midieron como se ha descrito en (4.3) y en (4.4). Se comprobó que la cantidad de proteína polimerizada se mantuvo prácticamente constante tras la adición de taxoide: en tampón sin glicerol la concentración crítica disminuyó de 0.4 a 0.2 mg/mL tras la adición de taxoide, y en tampón con glicerol se mantuvo constante entorno a 0.2 mg/mL. La concentración de Flutax y de 2' acetil Flutax en el sedimento se corrigió por la precipitación inespecífica de ligando.

2.5.2.- Unión de taxoides a GDP tubulina no ensamblada.

La unión a GDP-tubulina se determinó añadiendo concentraciones crecientes de taxoide ([³H]taxol, Flutax, 2' acetil Flutax, Flutax 2 y Flutax 3) a proteína a una concentración 20 μM (excepto con Flutax, tubulina a 10 μM) en tampón PEDTA 10 mM, GDP 20 μM, pH 7.0. La proteína se equilibró como se describe en (4.1), salvo que con GDP 20 μM en la segunda columna, de la misma forma que para experimentos de velocidad de sedimentación (ver apartado 7.1). Para medir la unión a GDP tubulina en las mismas condiciones que en velocidad de sedimentación se intentó reproducir el mismo experimento en centrífuga preparativa. Para ello se simuló la posición radial en función del tiempo que tendría el frente de sedimentación de la tubulina (s= 6.0 S) en un tubo de rotor TL100 de centrífuga preparativa que proporcionase la misma aceleración centrífuga a la que se somete a la tubulina en un

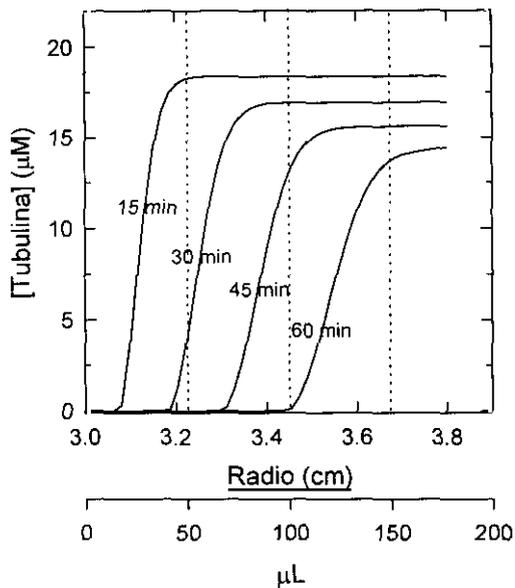


Figura 2.6.- Simulación de sedimentación de tubulina $20 \mu\text{M}$ a lo largo del tiempo en un tubo de centrifuga de 0.2 mL de un rotor TL100 girando a 85000 rpm (280000 g) durante una hora. El coeficiente de sedimentación empleado fue de 6.0 . Las líneas de puntos verticales representan la fracción del tubo que se recoge

en (4.3) y (4.4). La concentración de $[^3\text{H}]$ taxol se determinó por medida de centelleo en un espectrómetro LKB1219. Se comprobó que las dos fracciones superiores contienen sólo ligando libre, mientras que en las dos últimas se encuentra la proteína en equilibrio con el ligando.

2.5.3.- Unión de taxoides a microtúbulos de GDP tubulina.

Para medir la unión de ligando a microtúbulos de GDP-tubulina, la tubulina se equilibró como se describe en (4.1), se le añadió MgCl_2 hasta 7 mM , se ajustó el pH a 7.0 y se añadieron a alícuotas de 0.2 mL concentraciones crecientes de taxoide. Se incubaron a 37°C

experimento de velocidad de sedimentación en una ultracentrífuga analítica (ver figura 2.6). Esta simulación se realizó mediante el programa SIMCEN10, cedido por el Dr. Allen P. Minton (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.) En la figura 2.6 se observa que tras una hora de centrifugación a 85000 rpm (280000 g) la parte superior del tubo debe estar completamente deplecionada de tubulina. Por lo tanto, se centrifugaron las muestras (0.2 mL) durante una hora a 20°C en un rotor TL100, se dejó parar el rotor sin freno para no perturbar el gradiente formado y se recogieron cuatro fracciones de $50 \mu\text{L}$ desde la parte superior del tubo. La concentración de proteína y de taxoides fluorescentes en cada fracción se determinó mediante dilución en SDS 0.25% y medida de la emisión de fluorescencia como se describe

y se centrifugaron durante 10 minutos a 50000 rpm (100000 g) en un rotor TL100 precalentado a 37° C. La concentración de proteína y de taxoide en el sobrenadante y en el sedimento se midieron como se describe en (4.3) y (4.4).

2.5.4.- Análisis de los datos.

La unión de un ligando a un solo sitio en una proteína puede expresarse de la forma:



Donde la constante de equilibrio de asociación (K_A) viene dada por:

$$K_A = \frac{[PA]}{[P][A]} \quad (2.11)$$

Para este caso, los moles de ligando unido por mol de proteína (fracción de saturación de sitios) son:

$$v = \frac{[PA]}{[P] + [PA]} \quad (2.12)$$

Y sustituyendo la ecuación (2.11) en la ecuación (2.12)

$$v = \frac{[A]K_A}{1 + [A]K_A} \quad (2.13)$$

Si cada macromolécula puede unir n moléculas de ligando, esta expresión resulta algo más complicada. Si todos los sitios son iguales e independientes (es decir, cada uno de los n sitios tiene la misma afinidad para el ligando que el resto, y la afinidad de cada sitio es independiente de si el resto de los sitios están ocupados), los moles de ligando unido por moles de proteína son (Van Holde, 1985, pags. 51-91):

$$v = n \frac{[A]K_A}{1 + [A]K_A} \quad (2.14)$$

Si la unión de un ligando a un sitio de una macromolécula afecta la afinidad de otros sitios, se dice que la unión es cooperativa. La cooperatividad puede ser positiva, si la unión a un sitio aumenta la afinidad del resto, o negativa, si la afinidad del resto de sitios disminuye.

Si suponemos un sistema tan altamente cooperativo que cada molécula, al aceptar un ligando, quedase tan activada que tuviese que llenar todos sus sitios antes de que comenzaran a llenarse otras moléculas, la ecuación (2.14) tomaría la forma:

$$v = n \frac{[A]^n K_A^n}{1 + [A]^n K_A^n} \quad (2.15)$$

En la práctica, esta máxima cooperatividad posible no se observa. En general, los casos de cooperatividad se describen usando relaciones semiempíricas análogas a estas ecuaciones, como:

$$v = n \frac{[A]^\alpha K_A^\alpha}{1 + [A]^\alpha K_A^\alpha} \quad (2.16)$$

Donde $1 \leq \alpha \leq n$ para casos de cooperatividad positiva. Esta ecuación puede expresarse en forma logarítmica de la forma:

$$v = n \frac{10^{\alpha(\log[A] + \log K_A)}}{1 + 10^{\alpha(\log[A] + \log K_A)}} \quad (2.17)$$

El parámetro α se conoce normalmente como constante de Hill. Es un índice de cooperatividad. Cuando $\alpha=n$, el sistema se comporta como perfectamente cooperativo, mientras que $\alpha=1$ indica no cooperatividad.

Las curvas de unión de taxoides a MTP se analizaron según un modelo de unión de un ligando a dos clases de sitios de unión (1 y 2), ajustando la ecuación (2.18) a los datos experimentales, usando un algoritmo de simplex modificado (Press *et al.*, 1989, pags. 326-331) en un programa cedido por el Dr. Allen P. Minton (National Institute of Health, Bethesda, USA).

$$v = n_1 \frac{10^{\alpha_1(\text{Log}[A] + \text{Log}K_{A1})}}{1 + 10^{\alpha_1(\text{Log}[A] + \text{Log}K_{A1})}} + n_2 \frac{10^{\alpha_2(\text{Log}[A] + \text{Log}K_{A2})}}{1 + 10^{\alpha_2(\text{Log}[A] + \text{Log}K_{A2})}} \quad (2.18)$$

Donde n_1 y n_2 son el número de sitios de unión de las dos clases de sitio, α_1 y α_2 son los coeficientes de Hill para los dos tipos de sitio, $[A]$ es la concentración libre de ligando, K_{A1} y K_{A2} son las constantes de asociación de los sitios de clase 1 y 2, respectivamente, y v son los moles de taxoide unido por 10^{-5} g de MTP.

Para medir la unión a GDP tubulina, se asumió un solo tipo de sitios de unión (a los que denominamos n_2 , ver apartado 2.2.2 de Resultados), por lo que los datos se ajustaron a la ecuación (2.17).

Para medir la unión a microtúbulos de GDP tubulina, se asumió un sitio de alta afinidad completamente ocupado con una estequiometría de un mol de taxoide por mol de proteína (n_1) (ver Resultados, apartado 2.2.2), y se quiso cuantificar la unión a los sitios de baja afinidad (n_2). Para ello, se restó a todos los valores de saturación de sitios de unión 1 (correspondiente al sitio ocupado de alta afinidad) y al resultado se le ajustó la ecuación (2.17) para calcular los valores de n_2 y K_A .

2.6.- Competición de dos ligandos por su sitio de unión.

2.6.1.- Competición entre Flutax y taxol a saturación de sitios de unión.

Para comprobar si el sitio de unión de Flutax a la tubulina es el mismo que el de taxol se diseñó un ensayo de competición de dos ligandos por el mismo sitio de unión en el que se ensambló tubulina a concentración constante en presencia de un exceso del 10% de taxoide total constante, variando la proporción entre los taxoides. Se polimerizó tubulina a una concentración de $45 \mu\text{M}$ en tampón PEMG pH 7.0 en presencia de distintas relaciones de taxol (taxoide A) y de Flutax (taxoide B) a una concentración de taxoide total de $50 \mu\text{M}$. Se incubaron las alícuotas durante 2 horas a 37°C y se centrifugaron a 100000 g durante 10 minutos en un rotor TL100 precalentado a 37°C . Tras la centrifugación se determinaron las concentraciones de tubulina y de taxoide en el sobrenadante y en el sedimento como se describe en (4.3) y (4.4). El porcentaje de tubulina ensamblada osciló entre un 75% y un 82%.

En estas condiciones, podemos asumir que nos encontramos a saturación de sitios de unión, y la relación entre las constantes de asociación de los dos taxoides pueden calcularse a partir en función de las concentraciones de Flutax unido y de taxoide total (ver Análisis de los datos, apartado 6.3.2).

2.6.2.- Competición entre taxoides a baja fracción de saturación de sitios.

Un ensayo de competición de unión es un método que puede aplicarse para comparar las propiedades de unión de un ligando con otros compuestos que se unan al mismo sitio (Minton, 1984). Por eso se quiso diseñar un experimento de competición que nos permitiera comparar la afinidad relativa de todos los taxoides fluorescentes disponibles en el laboratorio por su sitio de unión al microtúbulo. Para ello se diseñaron distintos tipos de experimento:

En principio se polimerizó tubulina 20 μM en tampón fosfato 10 mM, GTP 0.2 mM, MgCl_2 7 mM, pH 6.6 en presencia de taxol equimolecular y se intentó desplazar el taxol con los taxoides fluorescentes. El experimento no se pudo completar porque las concentraciones libres de ligando competidor necesarias para desplazar al taxol son superiores a las concentraciones a las que comienza la unión a la segunda clase de sitios de unión (sitios de baja afinidad, ver Resultados, apartado 1.3).

También se repitió el experimento descrito para el Flutax con el resto de los taxoides fluorescentes, ensamblando tubulina 18 μM en fosfato 10 mM pH 6.6, MgCl_2 7 mM, GTP 1 mM, a una concentración de taxoide total de 20 μM , para evitar la unión inespecífica. Este experimento tampoco tuvo éxito, porque las concentraciones libres de ligando obtenidas no eran suficientes para conseguir un ensamblaje de GDP tubulina efectivo con estequiometría de un mol de taxoide por mol de tubulina (no se alcanzaba saturación de sitios de unión).

Finalmente se eligió el ensayo clásico de competición en el que un ligando trazador a concentración constante (ligando A) se desplaza de su sitio específico por concentraciones crecientes de ligando competidor B. Se eligió medir la competición de dos taxoides a su sitio de unión a proteína microtubular. Esta elección se basó en que los microtúbulos de MTP son los microtúbulos ensamblados in vitro más similares a los microtúbulos celulares, y en que se puede trabajar a concentraciones relativamente bajas de proteína sin que varíe

sensiblemente la cantidad de proteína polimerizada con la adición de taxoide. Las condiciones del método se diseñaron usando los valores de constantes de unión calculadas en los experimentos de unión anteriormente descritos (apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Para evitar la unión de ambos taxoides a los sitios de baja afinidad (sitios no específicos) se trabajó a bajas concentraciones de proteína y de ligando total (proteína polimerizada entre 0.2-0.25 mg/mL, taxoide trazador $\sim 0.15 \mu\text{M}$, taxoide competidor libre menor de $10 \mu\text{M}$), y a condiciones de baja fracción de saturación de sitios.

Para medir fluorométricamente sobre la misma dilución las concentraciones del taxoide trazador y del taxoide competidor se necesita que sus máximos de emisión de fluorescencia estén suficientemente separados como para poder medirse simultáneamente sin interferir mutuamente entre sí. Por eso se eligieron los taxoides con máximos de absorción en la región del rojo como taxoides trazadores y los que presentan su máximo de absorción en la región del verde como taxoides competidores. Esta elección se debe además a que la baja solubilidad de Rotax, X-Rotax y α y β -SulfoRotax impide alcanzar concentraciones libres suficientemente altas para desplazar efectivamente al resto de taxoides, aunque ha sido suficiente para medir la unión específica de Rotax a proteína microtubular hasta 0.4 moles de taxoide unido por 10^5 g de proteína. En concreto se desplazó el Rotax a concentración constante con concentraciones crecientes de taxol, Flutax, HexaFlutax y Flutax 2. Para medir la afinidad relativa de los taxoides rojos se desplazaron Rotax, X-Rotax, y α - y β -SulfoRotax con Flutax 2. Se comprobó en todos los casos que la concentración de los taxoides empleados como trazadores y competidores pueden determinarse espectrofotométricamente en la misma dilución.

Para ello se ensambló MTP a 0.8 mg/mL en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, EGTA 1 mM, GTP 1 mM, MgCl_2 1 mM, pH 6.5 a 37°C durante una hora. Tras esa hora se diluyó la proteína con el mismo tampón a 37°C hasta 0.4 mg/mL. En estas condiciones, en ausencia de taxoide, la concentración de proteína polimerizada es de 0.2 mg/mL. Se comprobó que la presencia de taxoide aumenta la cantidad de proteína polimerizada en menos de 0.05 mg/mL. Se añadieron a distintas alícuotas el ligando trazador (Rotax, X-Rotax) a una concentración de $0.3 \mu\text{M}$ y ligando competidor (taxol, Flutax 2, Flutax y HexaFlutax) a una concentración variable desde 0.4 a $12 \mu\text{M}$. Se dejaron incubar durante 30 minutos más a 37°

C y se centrifugaron a 100000 g durante 30 minutos a 37° C. Las concentraciones de taxoide y de proteína en el sedimento y en el sobrenadante se determinaron como se describe en (4.3) y en (4.4). Tras la sedimentación, la concentración total de Rotax varió en cada experimento desde 0.2 hasta 0.09 μM dependiendo de la concentración de taxoide en el sobrenadante (este fenómeno se explica porque al aumentar la concentración de Rotax libre, aumenta la cantidad de Rotax que se adsorbe a las paredes (ver apartado 3.3), luego la concentración total de Rotax disminuye). La concentración de taxoide en el sedimento es la unida a microtúbulos, y la concentración en el sobrenadante se tomó como concentración libre. En efecto, se ha visto que concentraciones de Rotax entre 0.04 y 0.15 μM no cosedimentan con MTP soluble a 0.17 mg/mL a 270000 g durante 2 horas en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, MgCl_2 1 mM pH 6.5. Para los taxoides fluorescentes competidores, si se unieran a la MTP que queda en el sobrenadante con la misma afinidad que se unen a la GDP tubulina (ver figura 3.21) el 85% del taxoide en el sobrenadante estaría libre y el 15% estaría unido a MTP).

2.6.3.-Análisis de los datos.

2.6.3.1.- Generalidades.

La unión de dos taxoides a su sitio en los microtúbulos puede describirse como la unión de dos ligandos al mismo sitio de unión. Esta unión viene descrita por las ecuaciones:



Donde A y B son dos taxoides distintos y P es la proteína polimerizada. Las constantes de asociación de cada ligando vienen dadas por:

$$K_A = \frac{[PA]}{[A][P]} \quad (2.21)$$

$$K_B = \frac{[PB]}{[B][P]} \quad (2.22)$$

$$\frac{K_B}{K_A} = \frac{[PB][A]}{[PA][B]} \quad (2.23)$$

Donde K_A es la constante de equilibrio de asociación para el ligando A, K_B es la constante de asociación para el ligando B, $[PA]$ y $[PB]$ son respectivamente las concentraciones de ligandos A o B unidos a proteína polimerizada, y $[A]$, $[B]$ y $[P]$ son respectivamente las concentraciones libres de ligandos A y B y de proteína polimerizada. Las concentraciones de proteína total polimerizada ($[P]_0$) y ligando total ($[A]_0$ y $[B]_0$) pueden expresarse en función de las concentraciones libres y unidas:

$$[P]_0 = [P] + [PA] + [PB] \quad (2.24)$$

$$[A]_0 = [A] + [PA] \quad (2.25)$$

$$[B]_0 = [B] + [PB] \quad (2.26)$$

2.6.3.2.- Competición entre Flutax y taxol a saturación de sitios de unión.

Cuando se trabaja a saturación de sitios de unión de taxol (no hay sitios libres de proteína polimerizada, $[P] = 0$), las ecuaciones (2.24) a (2.26) se pueden expresar de la forma:

$$[A] = [A]_0 - [P]_0 + [PB] \quad (2.27)$$

$$[B] = [B]_0 - [PB] \quad (2.28)$$

$$[PA] = [P]_0 - [PB] \quad (2.29)$$

Y sustituyendo las ecuaciones (2.27), (2.28) y (2.29) en la ecuación (2.23) llegamos a la expresión:

$$\frac{K_B}{K_A} = \frac{[PB]([A]_0 - [P]_0 + [PB])}{([P]_0 - [PB])([B]_0 - [PB])} \quad (2.30)$$

La ecuación (2.30) se ajustó a los datos experimentales, fijando las concentraciones conocidas de $[A]_0$, $[P]_0$ y $[B]_0$ y variando los valores de relación K_B/K_A para obtener los valores de $[PB]$ que mejor se ajustaran a los datos experimentales (Díaz y Andreu, 1993),

utilizando un algoritmo de Marquardt-Levenberg (Press *et al.*, 1989, pags. 572-580) mediante el programa SigmaPlot® 1.02, Jandel Scientific.

2.6.3.3.- Competición entre taxoides a baja fracción de saturación de sitios.

En un experimento de competición la concentración de cada ligando unido depende de las concentraciones libres y de las constantes de equilibrio de asociación de ambos ligandos, de la forma (Wyman y Gill, 1990, pags. 33-42):

$$v_A = \frac{[PA]}{[P] + [PA] + [PB]} = \frac{K_A[A]}{1 + K_A[A] + K_B[B]} \quad (2.31)$$

$$v_B = \frac{[PB]}{[P] + [PA] + [PB]} = \frac{K_B[B]}{1 + K_A[A] + K_B[B]} \quad (2.32)$$

Para calcular las constantes de equilibrio de asociación de los taxoides a proteína microtubular se ajustó la ecuación (2.31) a los datos experimentales, fijando las concentraciones conocidas de [A] y [B] y variando los valores de K_A y K_B para obtener los valores de v_A (moles de ligando unido a 10^{-5} g de MTP) que mejor se ajustan a los datos experimentales, utilizando un algoritmo de Marquardt-Levenberg (Press *et al.*, 1989, pags. 572-580) en el programa SigmaPlot® 1.02 (Jandel Scientific).

Alternativamente se representaron los valores de v_A en función de las concentraciones totales de taxoide competidor, y se empleó un programa cedido por el Dr. Fernando Díaz (Medrano *et al.*, 1991) para resolver el sistema de ecuaciones (2.21) a (2.26) para los valores conocidos $[A]_0$, $[B]_0$, y K_A . Se tomaron sólo los puntos en los que $[A]_0$ presentaban menor variación entre sí, y se tomó la media estos valores como parámetro conocido $[A]_0$. Como K_A se empleó la determinada según el ajuste anterior. Se variaron los valores de K_B hasta encontrar el valor que minimizara la suma de los cuadrados de las desviaciones de los valores calculados de v_A con respecto a los datos experimentales.

2.7.-Velocidad de sedimentación.

2.7.1.- Velocidad de sedimentación de GDP tubulina en presencia de taxoides.

La GDP tubulina se equilibró como se describe en (4.1), salvo que la concentración de GDP en la segunda columna fue de 20 μM . Se comprobó el intercambio de nucleotido en estas condiciones, correspondiente a un $98 \pm 3 \%$.

La velocidad de sedimentación se midió en una ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman) equipada con un sistema de detección ultravioleta/visible. Las medidas se tomaron a 20° C y a 55000 o 60000 rpm en un rotor An60Ti usando celdas de doble sector de paso óptico 1.2 cm. Se midió la absorción en función del radio a intervalos de tiempo de 5 minutos a 295 nm (donde la mayor parte de la absorción es debida a la proteína) y en la región del visible (495 nm para el Flutax y 2' acetil Flutax, 557 nm para el Rotax, 515 nm para el Flutax 2 y 525 para el Flutax 3), donde toda la absorción es debida al ligando. En las muestras de tubulina que no llevaban taxoide se añadió DMSO 0.5%. La concentración de proteína (excepto donde se indica) fue de 20 μM . Para el análisis de los datos, tanto para el cálculo del coeficiente de sedimentación como para las representaciones del $g(s^*)$ (ver más adelante) sólo se utilizaron los perfiles correspondientes a los 40 primeros minutos del experimento.

2.7.2.- Análisis de datos de velocidad de sedimentación.

En un experimento de velocidad de sedimentación se somete una disolución inicialmente uniforme en una celda de centrífuga analítica a una velocidad angular suficiente para causar la sedimentación del soluto hacia el fondo de la celda. Esto produce una depleción del mismo en la parte superior y la formación de un frente de sedimentación entre la zona deplecionada y la zona de concentración uniforme de soluto. La velocidad con que se mueve el frente de sedimentación normalizada por la aceleración centrífuga a la que está sometido el rotor es el coeficiente de sedimentación (s) (Cantor y Schimmel, 1980; Ralston, 1993). El coeficiente de sedimentación de una molécula depende de su masa, de su densidad relativa con respecto al solvente, y de su coeficiente de fricción, que a su vez depende de su forma y su

tamaño. Por lo tanto, la medida de la velocidad de sedimentación se puede usar para caracterizar asociaciones macromoleculares, en principio, cuando la asociación implica cambios en alguna de estas tres propiedades (Steinberg y Schachman, 1966; Minton, 1990).

Los coeficientes de sedimentación de las especies en disolución se determinaron midiendo la posición radial del punto de inflexión (frente de sedimentación) frente al tiempo (Cantor y Schimmel, 1980; pags. 596-614, Ralston, 1993). La representación del logaritmo neperiano de la posición radial del frente de sedimentación en función del tiempo determina el coeficiente de sedimentación de la especie mayoritaria en la celda. La posición radial del frente se determinó mediante la derivada de la absorción con respecto al radio, usando el programa XLAVEL.

También se empleó el método del segundo momento de la distribución de concentración (Goldberg, 1953; Schachman, 1959), que da una información más completa de todas las especies presentes en la solución, especialmente cuando la derivada de la concentración frente al radio da un pico asimétrico. Este método da una posición radial del frente equivalente, es decir, la posición del punto de inflexión hipotético que se observaría en ausencia de difusión. A partir del movimiento de la posición del frente equivalente se calcula el coeficiente de sedimentación promedio para el sistema, que corresponde a la velocidad promedio de las partículas en la zona de concentración uniforme de soluto. En experimentos de velocidad de sedimentación, el coeficiente de sedimentación promedio suele dar valores algo mayores que el pico de la derivada de concentración frente al radio (Cantor y Schimmel, 1980, pags. 591-605). El coeficiente de sedimentación promedio se calcula de forma análoga al coeficiente de sedimentación de la especie mayoritaria, representando el logaritmo neperiano del radio de inflexión equivalente frente al tiempo (Cantor y Schimmel, 1980, pags. 591-605; Stafford, 1994). Para esta determinación se usó el programa VELGAMMA (Muramatsu y Minton, 1988). Tanto XLAVEL como VELGAMMA fueron suministrados por el Dr. Allen P. Minton (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

También se empleó el método desarrollado por Stafford (1992; 1994) para calcular la distribución aparente de coeficientes de sedimentación $g(s^*)$, donde s^* es el coeficiente de sedimentación para el caso de un componente único, hidrodinámicamente ideal, con coeficiente de difusión igual a cero (Stafford, 1992; 1994). La función $g(s^*)$ nos da la fracción

$g(s)ds$ que sedimenta con valores de coeficiente de sedimentación comprendidos entre s y $s + ds$, es decir, la forma de $g(s^*)$ nos da una idea de la distribución de los coeficientes de sedimentación de las especies presentes en la solución. Las distribuciones de coeficientes de sedimentación se determinaron mediante el programa DCDT (Stafford, 1992; 1994) que calcula $g(s^*)$ a partir de la derivada con respecto al tiempo de la distribución de concentración (dc/dt) a cada posición radial. Este método toma pares de perfiles de velocidad consecutivos y los sustrae entre sí para hallar la curva diferencia. Si la diferencia de tiempo entre cada perfil es suficientemente pequeña la curva diferencia es una buena aproximación de la derivada de la concentración con respecto al tiempo (dc/dt) para cada posición radial r . El uso de la derivada temporal supone una eliminación automática de la línea base. A partir de las representaciones de (dc/dt) frente a r , de (dc/dt) se deduce el $g(s^*)$, y del radio se calcula s^* (Stafford, 1992; 1994).

Para representar la distribución de los coeficientes de sedimentación a lo largo del tiempo se calculó $g(s^*)$ para cada cuatro espectros consecutivos (20 minutos).

3.-Resultados

3.1.-TAXOIDES FLUORESCENTES COMO SONDA DEL SITIO DE UNION DE TAXOL.

3.1.1.- Interacción de taxoides fluorescentes con microtúbulos.

3.1.1.1.- Polimerización de microtúbulos inducida por taxoides fluorescentes.

El taxoide fluorescente Flutax induce el ensamblaje de la GTP tubulina en presencia de glicerol para dar microtúbulos, aunque de una forma más lenta que el taxol, como se muestra en la figura 3.1. Se comprobó por microscopía electrónica que el material polimerizado eran microtúbulos (ver panel C de la figura), aunque se realizó posteriormente un examen más riguroso de la morfología de microtúbulos de GDP tubulina y de microtúbulos de MTP (ver apartado 1.3.3 de Resultados). Como control negativo de la polimerización se utilizó el 2'acetil Flutax, con el grupo 2' hidroxilo esencial para su actividad bloqueado (Jiménez Barbero *et al*, 1998). Se observa cómo el 2' acetil Flutax es incapaz de inducir la polimerización de la tubulina.

La polimerización de microtúbulos inducida por taxoide es un equilibrio de polimerización por condensación nucleada de proteína, en el que la concentración crítica (C_r , o mínima concentración a partir de la cual la proteína ensambla) es equivalente al inverso de la constante aparente de elongación del microtúbulo ($K_{p,app}$) (Oosawa y Asakura, 1975; Andreu y Timasheff, 1986). La representación del aumento de turbidez debida a la polimerización frente a la concentración inicial de tubulina indica que la concentración crítica de microtúbulos inducida por Flutax es algo mayor del doble de la de taxol (figura 3.1, panel B).

Un examen más severo de capacidad de inducción de ensamblaje de microtúbulos es la polimerización de GDP tubulina, que es la forma inactiva de la molécula. En la figura (3.2) se muestra cómo tanto Flutax como Rotax inducen la polimerización de tubulina con el sitio intercambiable de nucleotido totalmente sustituido por GDP.

El HexaFlutax se diseñó para ver si la presencia de un espaciador mayor entre la molécula de taxol y la fluoresceína influía en la actividad de Flutax. Sin embargo, este compuesto no induce la polimerización de la GDP tubulina (figura 3.2).

Se quiso probar en este mismo sistema el taxoide fluorescente descrito por Guy *et al*.

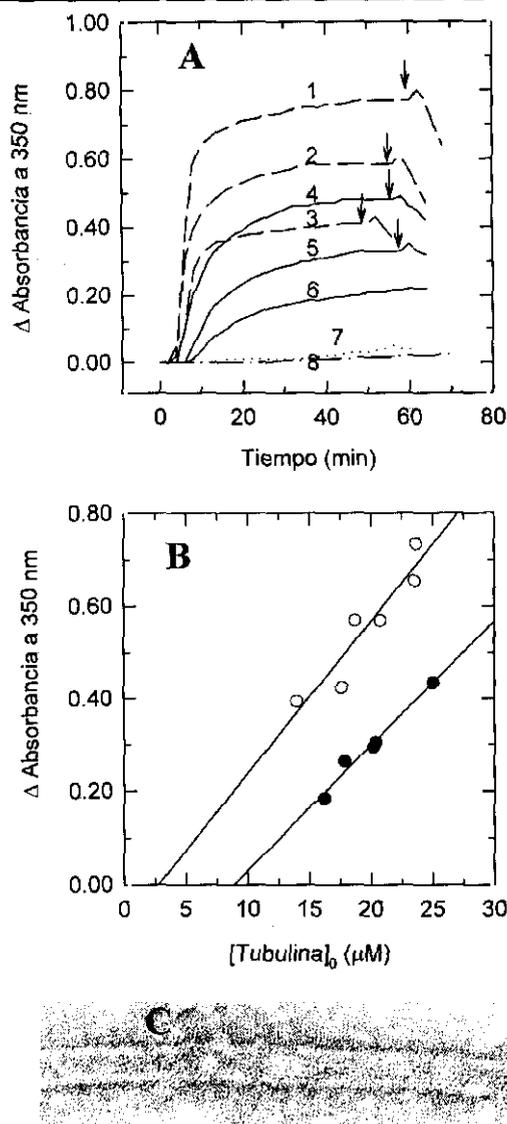


Figura 3.1.- Ensamblaje de microtúbulos inducido por taxoide. Panel A.- Curso de tiempo de ensamblaje monitorizado por aumento de turbidez a 350 nm de distintas concentraciones de tubulina en tampón MES 100 mM, GTP 0.1 mM, pH 6.5, inducido por taxol (curvas con línea discontinua) o por Flutax (curvas en línea continua). Las concentraciones de tubulina usadas fueron de 25 μ M (curvas 1 y 4), 20 μ M (curvas 2 y 5) y 15 μ M (curvas 3 y 6). Los taxoïdes se añadieron en un exceso del 10% sobre la concentración de tubulina. Las flechas indican el tiempo en que se enfrió la muestra a 4° C. La curva 7 muestra la tubulina a 20 μ M a la que se ha añadido 2' acetil Flutax 22 μ M. La curva 8 es tubulina 20 μ M con un 0.5% de DMSO. Panel B.- Medida de concentración crítica de polimerización de tubulina medida por aumento de turbidez. Los puntos blancos representan microtúbulos inducidos por taxol y los círculos negros, inducidos por Flutax. Las líneas representan el ajuste por regresión lineal de los datos. El punto de corte con el eje x nos da la concentración crítica (ver Materiales y Métodos, apartado 4.2). Se observa que la concentración crítica de polimerización inducida por taxol es aproximadamente la mitad de la inducida por Flutax. Panel C.- Micrografía electrónica de un microtúbulo obtenido con Flutax en el experimento representado. La barra representa 50 μ m.

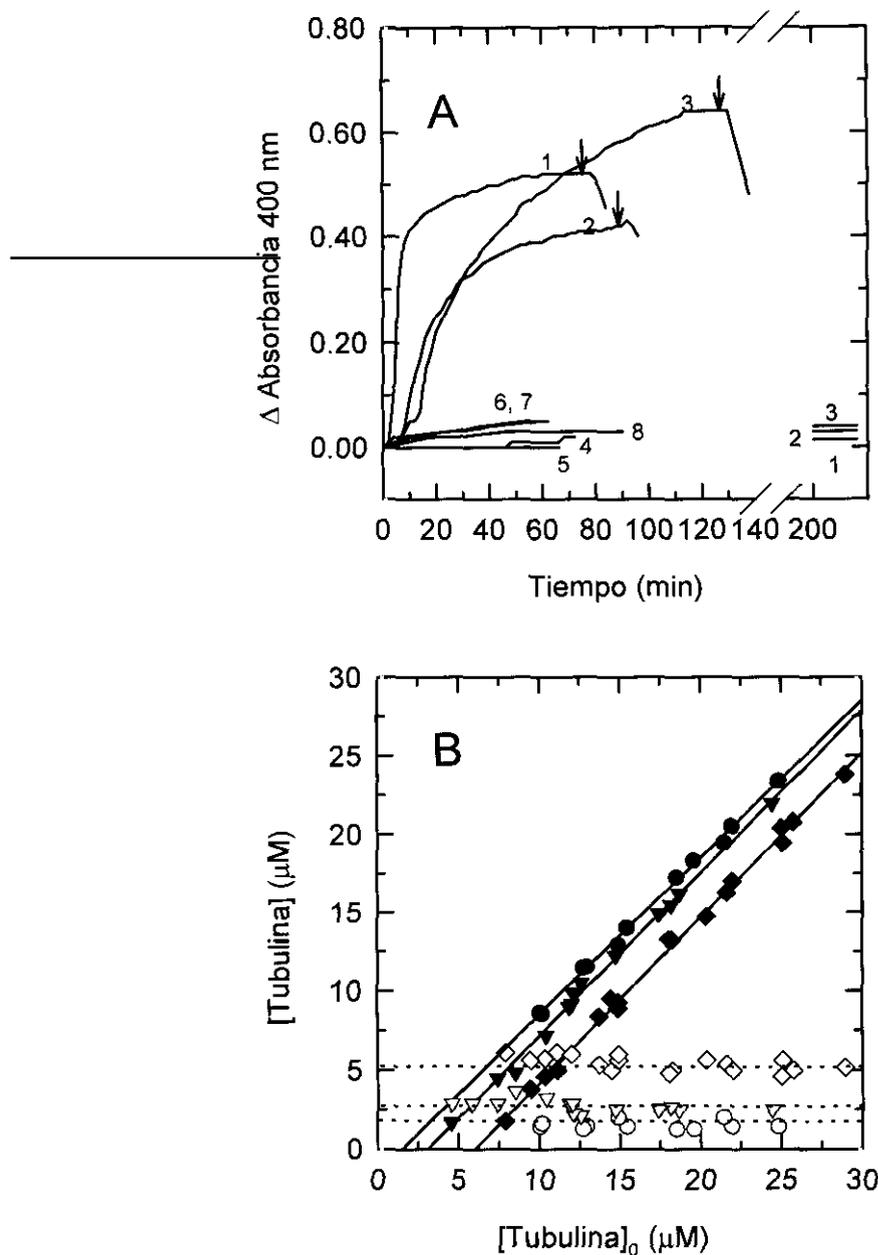


Figura 3.2.- Ensamblaje de microtúbulos inducido por taxoide. Panel A.- GDP-tubulina 25 μ M en tampón PEDTA, GDP 1 mM, MgCl_2 7 mM, pH 6.6 con un exceso de 1.2 de taxol (curva 1), Flutax (curva 2), Rotax (curva 3), fluoresceínalánina (curva 4), 2' acetil Flutax (curva 5), HexaFlutax (línea 6), SulfoRotax (línea 7) y β SulfoRotax (Línea 8). Las flechas indican el tiempo en que se enfrió la muestra a 4° C. Panel B.- Medida de concentración crítica (Ver Materiales y Métodos, apartado 4.3) de polimerización de GDP-tubulina en tampón PEDTA, GDP 1 mM, MgCl_2 7 mM, pH 6.6, inducida por taxol (O), Flutax (Δ) y Rotax (\diamond). Símbolos negros, concentración en el sedimento. Símbolos blancos, concentración en el sobrenadante.

(1996) - β -SulfoRotax- y un taxoide con el mismo fluoróforo pero con el espaciador utilizado para el resto de taxoides de este trabajo (α -SulfoRotax). Ninguno de los dos es capaz de inducir la polimerización GDP tubulina.

La representación de tubulina polimerizada y tubulina soluble frente a tubulina total (figura 3.2, panel B) muestra que la concentración crítica de polimerización de microtúbulos inducidos por Flutax y Rotax es respectivamente de dos veces y cuatro veces la del taxol.

3.1.1.2.- Unión de Flutax y Rotax a microtúbulos.

La polimerización de tubulina a concentración constante con concentraciones crecientes de Flutax y Rotax muestra que, de forma similar a la del taxol, la polimerización de tubulina aumenta linealmente con la concentración de ligando hasta alcanzar un máximo a relaciones algo superiores a una molécula de taxoide fluorescente por molécula de tubulina, lo que indica un sólo sitio de alta afinidad para el ligando en la tubulina polimerizada (ver figura 3.3). Las medidas de tubulina y taxoide sedimentados en distintas condiciones de polimerización (figura 3.4) dan una estequiometría de 0.97 ± 0.08 moléculas de Flutax por molécula de proteína, igual a la de taxol (Díaz y Andreu, 1993). La baja solubilidad del Rotax impide dar una buena medida de estequiometría de unión a tubulina.

El sitio de unión del Flutax a los microtúbulos es aparentemente el mismo que el de taxol, como demuestra un experimento de competición de Flutax con taxol, en el que se mantuvo constante la concentración de tubulina y de taxoide total y se varió la relación entre taxol y Flutax (figura 3.5). Se observa cómo aumenta la cantidad de ligando unido a cada molécula de tubulina al aumentar su relación con el otro taxoide en el sobrenadante, mientras que la suma de los dos permanece invariable. El experimento puede describirse mediante un modelo simple de competición entre dos ligandos por el mismo sitio de unión, en el que todos los sitios están ocupados (ver Materiales y Métodos, apartado 5). El mejor ajuste de la ecuación (2.30) a los datos experimentales da una relación entre constantes de equilibrio de asociación de $K_{\text{Flutax}}/K_{\text{taxol}}$ de 0.12, lo que indica que el taxol es aproximadamente ocho veces más afín que Flutax por su sitio de unión al microtúbulo.

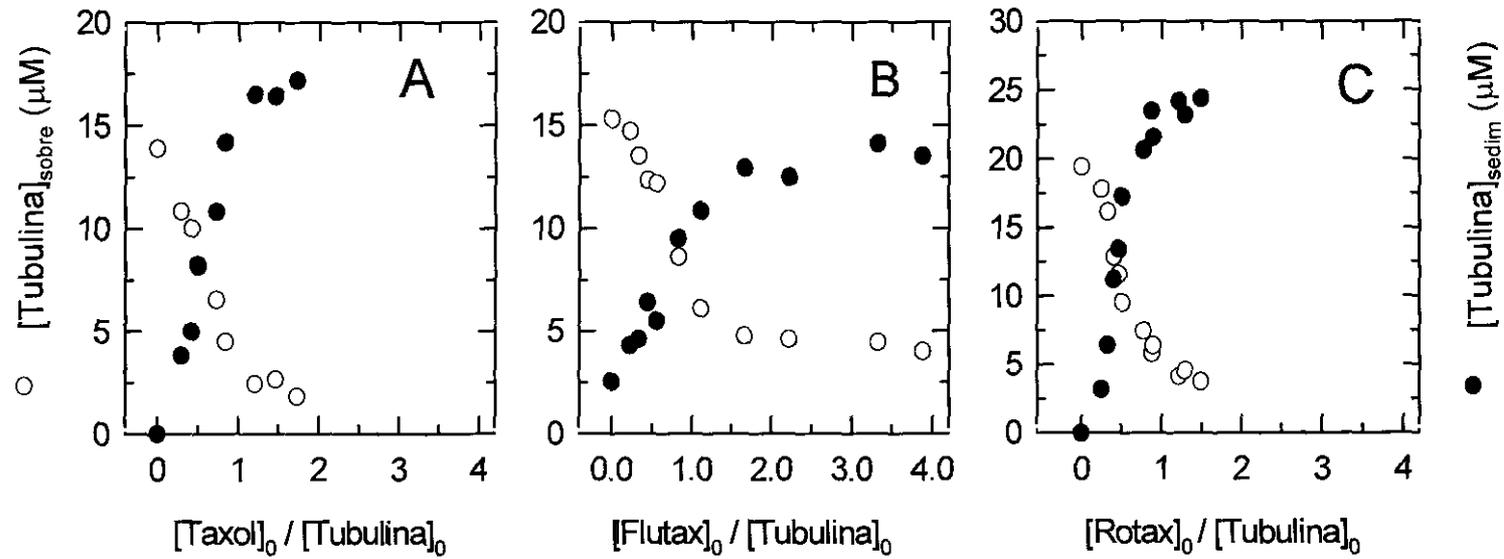


Figura 3.3.- Ensamblaje de tubulina en PEDTA, GDP 1 mM, MgCl₂ 7 mM, pH 6.6 a concentración constante de tubulina y relaciones crecientes taxoide / tubulina. Panel A, tubulina 20 μM , taxol. Panel B, tubulina 20 μM , Flutax. Panel C, tubulina 25 μM , Rotax. Los símbolos negros representan tubulina en el sedimento, y los símbolos blancos tubulina en el sobrenadante. Las concentraciones de tubulina están corregidas por la precipitación inespecífica de ligando.

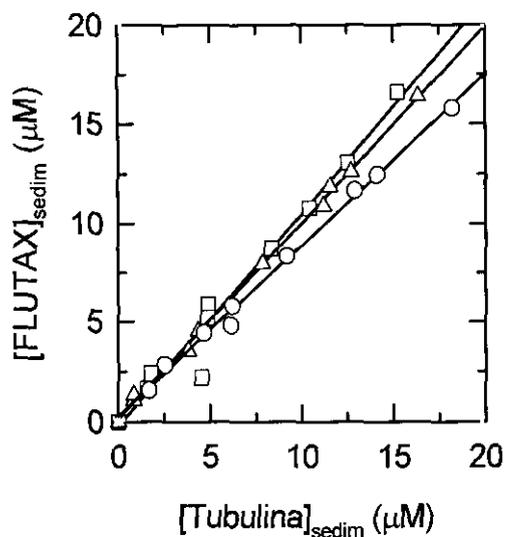


Figura 3.4.-Estequiometría de unión de Flutax a microtúbulos ensamblados en PEDTA, GDP 1 mM, MgCl_2 7 mM. (□), microtúbulos ensamblados con un 20% de exceso de Flutax sobre tubulina a pH 6.8, el Flutax en el sedimento está corregido por la precipitación inespecífica de ligando.(Δ), lo mismo, salvo que a pH 7.0. (○), tubulina en exceso a concentración constante y concentraciones crecientes de Flutax. La estequiometría promedio presenta un valor de 0.974 ± 0.083 .

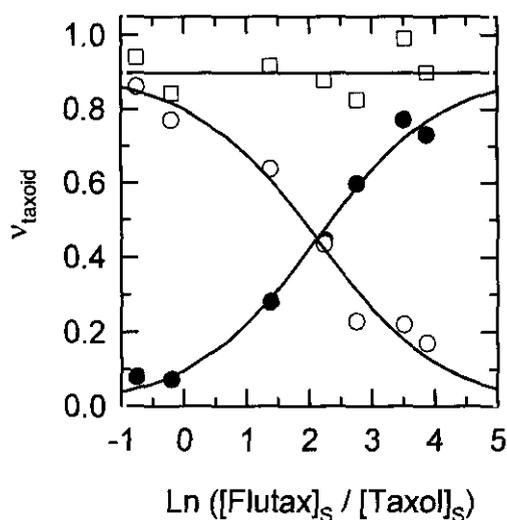


Figura 3.5.- Competición de Flutax (●) y taxol (○) por la unión a microtúbulos ensamblados en PEDTA, GDP 1 mM, MgCl_2 7 mM, pH 7.0 a partir de 45 μM GDP-tubulina y 50 μM taxoide total, variando la relación entre los dos taxoides. Las líneas son el mejor ajuste a un modelo sencillo de competición por un mismo sitio de unión según la ecuación (2.30).

3.1.1.3.- Influencia de las variables de la solución en la polimerización de microtúbulos inducida por taxoide.

Puesto que se requieren cationes divalentes para el ensamblaje de microtúbulos, se midió el efecto de la actividad de Mg^{2+} en la polimerización de la tubulina asistida por Flutax en comparación con taxol. En la figura 3.6A se observa cómo la influencia de la actividad de Mg^{2+} libre es más pronunciada en el ensamblaje de microtúbulos inducidos por Flutax que en los inducidos por taxol. En la representación de Wyman (Wyman y Gill, 1990) de la constante de elongación aparente de polimerización frente a la actividad de catión, la pendiente es igual a la diferencia entre las moléculas de catión unidas a tubulina polimerizada y unidas a tubulina libre (Wyman y Gill, 1990; Lee y Timasheff, 1977). Las representaciones de Wyman para el taxol y para el Flutax (ver figura 3.6A) muestran que los microtúbulos inducidos por Flutax incorporan un ión adicional de Mg^{2+} por tubulina polimerizada más que los inducidos por taxol (2.9 en lugar de 2.1).

La influencia del pH es pequeña en los dos casos (figura 3.6B), siendo algo menos pronunciada en el caso de Flutax que en el de taxol (0.2 en lugar de 0.5 protones adicionales por tubulina polimerizada).

En la figura 3.6C se observa cómo la influencia de la temperatura en el ensamblaje de microtúbulos es algo más pronunciada para Flutax que para taxol. La constante de elongación aparente de los microtúbulos nos da la energía libre de polimerización de los mismos a cada temperatura, a partir de la expresión:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{p, app} \quad (3.1)$$

El aumento de entalpía asociado a la polimerización de los microtúbulos se calculó a partir de la dependencia de la temperatura en el ensamblaje de tubulina inducido por taxoide, a partir de la ecuación de Van't Hoff (Lee y Timasheff, 1977):

$$\ln K_{p, app} = \frac{-\Delta H^{\circ}}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R} \quad (3.2)$$

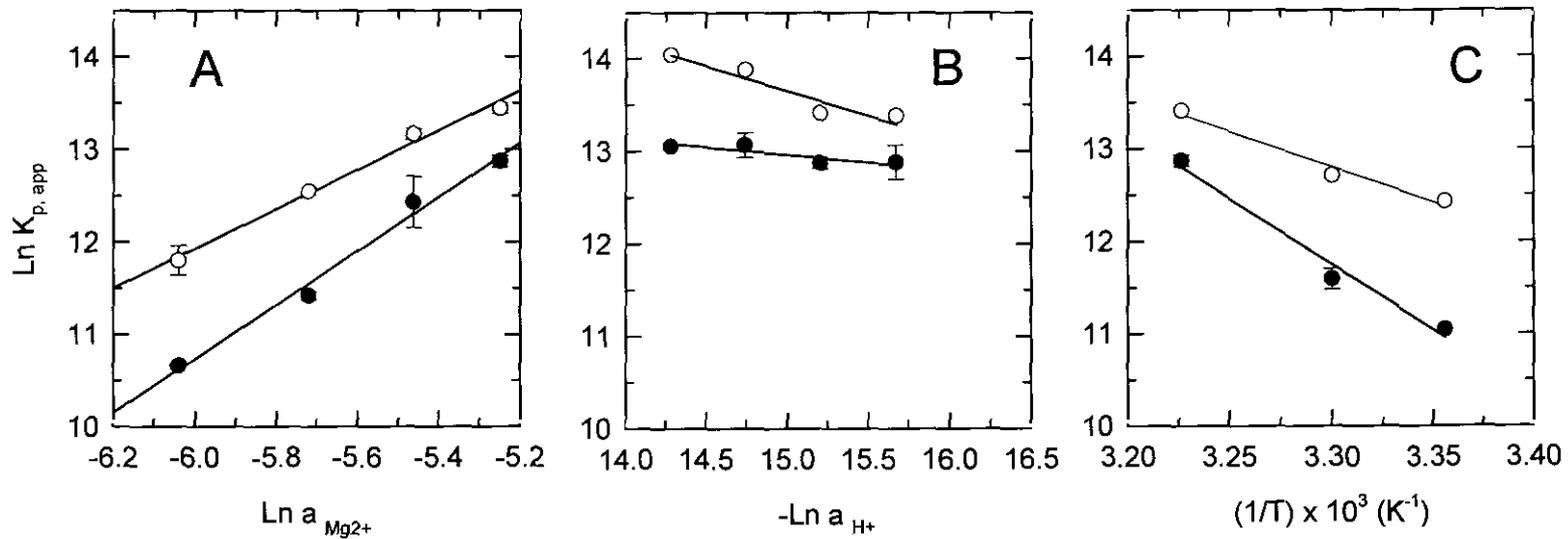


Figura 3.6.- Influencia de las variables de la solución en la polimerización de microtúbulos inducida por Flutax. Panel A.- Representaciones de Wyman (Wyman y Gill, 1990) de polimerización de tubulina inducida por taxoide en función de la concentración de Mg^{2+} libre. La concentración de Mg^{2+} libre se calculó a partir de la concentración total, corrigiéndola por la unión a fosfato, EDTA y nucleotido (Díaz y Andreu, 1993), y se expresa como actividad iónica media. Se representa el logaritmo neperiano de la constante aparente de elongación frente a la actividad de catión. El tampón fue PEDTA, GDP 1 mM. El pH se ajustó a 6.6 tras la adición de $MgCl_2$. ○, taxol; ●, Flutax. Las pendientes son iguales al número de iones adicionales de Mg^{2+} preferentemente unidos al polímero. Los valores obtenidos fueron de 2.1 para el taxol y 2.9 para el Flutax. Panel B: dependencia de la actividad de protones en la polimerización de tubulina inducida por taxoide. El tampón fue PEDTA, $MgCl_2$ 7 mM, GDP 1 mM. ○, taxol; ●, Flutax. Las pendientes son iguales al número de protones adicionales unidos a cada molécula de tubulina en la polimerización. Panel C: representación de Van't Hoff de polimerización de microtúbulos inducida por taxol (○) y Flutax (●). El tampón fue PEDTA, $MgCl_2$ 7 mM, GDP 1 mM, pH 6.6.

En el caso del ensamblaje de GDP tubulina asistido por taxoide, dado que el incremento de capacidad calorífica es nulo en el rango de temperaturas de trabajo (Díaz *et al.*, 1993), el aumento de entalpía puede calcularse a partir de la ecuación (3.3), estimándose en 64 kJ /mol para el taxol (el incremento de entalpía de polimerización inducida por taxol calculado por Díaz *et al.* (1993) fue de 49.1 kJ/mol) y 124 kJ/mol para Flutax.

3.1.1.4.- Visualización de microtúbulos por microscopía de fluorescencia.

Los microtúbulos ensamblados con Flutax y Rotax se han visualizado mediante un microscopio de epifluorescencia que lleva incorporada una cámara CCD. Se observaron tanto microtúbulos aislados (ver figura 3.7) como microtúbulos en distintas formas de organización. Los microtúbulos entrecruzados se observan inmediatamente, tanto si se observan microtúbulos preensamblados como si se dejan ensamblar entre porta y cubre. Formaciones de microtúbulos cruzados similares a ásteres (ver figura 3.7B, inserto) tardan en aparecer (aproximadamente 20 minutos tras iniciar la observación) y son infrecuentes, lo que puede indicar que se organicen alrededor de agregados de proteína desnaturalizada. Los haces densos de microtúbulos aparecen independientemente del tratamiento de la muestra. Cuando la muestra ha sido ensamblada en baño se observan inmediatamente. Cuando se deja ensamblar entre porta y cubre, tardan unos 20 minutos en aparecer.

También se han usado Flutax y Rotax para visualizar microtúbulos de MTP ensamblados previamente a la adición del ligando (figura 3.7, paneles E y G). Formaciones de microtúbulos entrecruzados (figura 3.7, panel E) se observaron en un tiempo inferior a un minuto tras la adición de Flutax. Este resultado demuestra que las MAPs no dificultan la unión de Flutax, y que el sitio de unión del taxol al microtúbulo se encuentra bastante accesible al solvente.

Para comprobar la especificidad de la unión de los taxoides fluorescentes a MTP se diluyeron las muestras de MTP con Flutax del mismo modo que las anteriores (ver Materiales y Métodos, apartado 4.5), salvo que en tampón con docetaxel hasta una concentración final de 80 μ M. La presencia del docetaxel resulta en la rápida desaparición del marcaje de los

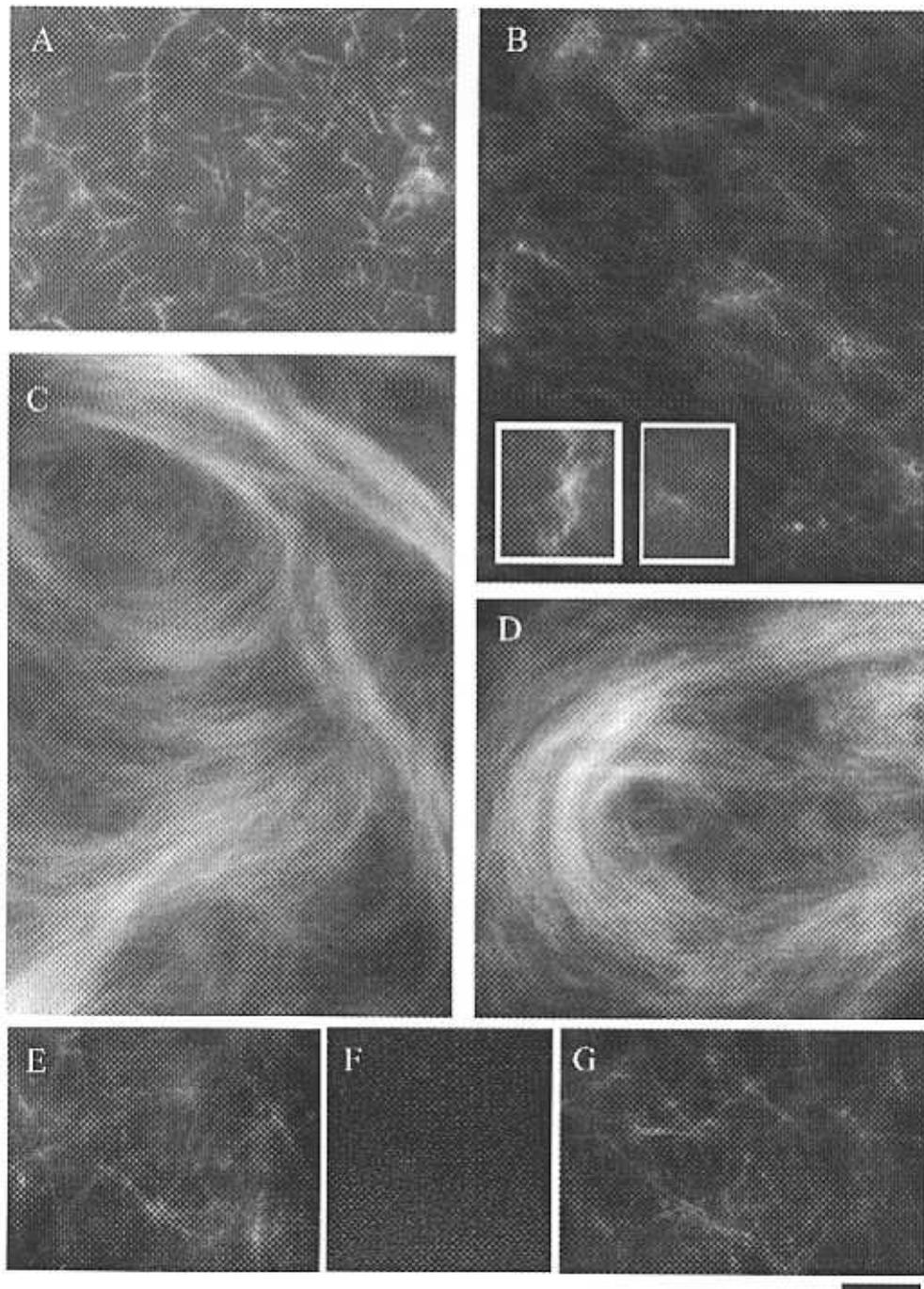


Figura 3.7.- Visualización de microtúbulos con taxoides fluorescentes. A-D, microtúbulos de GDP tubulina inducidos por Flutax, a $20 \mu\text{M}$ de tubulina y $25 \mu\text{M}$ Flutax, en tampón PEMG, GDP 1 mM , pH 6.6. A, microtúbulos aislados. B, microtúbulos entrecruzados. Los insertos muestran formaciones semejantes a ásteres. C y D, haces densos de microtúbulos. E-G, microtúbulos de proteína microtubular preensamblados y visualizados con taxoide fluorescente, a 0.4 mg/mL de MTP y $4 \mu\text{M}$ taxoide, en tampón PIPES 100 mM , GTP 1 mM , MgCl_2 1 mM , EGTA 1 mM , pH 6.9. E, MTP con Flutax. F, MTP con Flutax a dos minutos tras la adición de docetaxel $80 \mu\text{M}$. G, tubulina con Rotax. La barra representa $10 \mu\text{m}$.

microtúbulos (ver figura 3.7 panel F).

3.1.2.- Interacción de microtúbulos con derivados más solubles y fotoestables de Flutax.

3.1.2.1.- Polimerización de microtúbulos inducida por Flutax 2 y Flutax 3.

En las condiciones de ensamblaje de microtúbulos el Flutax sólo es parcialmente soluble (ver Materiales y Métodos, apartado 3.3), lo que dificulta su uso como sonda del sitio de unión del taxol. Para paliar este inconveniente, se evaluaron compuestos de taxol asociado a derivados fluorados de fluoresceína con un pKa para el dianión muy alejado del rango de pH de trabajo (ver Materiales y Métodos, apartado 3.2). En concreto, se usaron los derivados 7-O-[N-(2,7-difluorfluoresceín-4'-carbonil)-L-alanil]taxol (Flutax 2) y el 7-O-[N-(2,7,difluorosulfofluoresceín-4'-carbonil))-L-alanil]taxol (Flutax 3). Ambos son completamente solubles en las condiciones de trabajo (más de 0.2 mM), en el rango de pH de 6.6 a 7.0.

Ambos derivados ensamblan la GDP-tubulina, como se muestra en la figura 3.8, con una cinética más similar a la del taxol que la de Flutax (ver figura 3.2). La representación de tubulina polimerizada y tubulina en el sobrenadante frente a tubulina total (figura 3.8B) muestra que la concentración crítica de polimerización es indistinguible de la de taxol ($1.30 \pm 0.13 \mu\text{M}$).

El Flutax 2 y el Flutax 3 también se han usado para visualizar microtúbulos de proteína microtubular preensamblados mediante microscopía de epifluorescencia. Se observaron tanto microtúbulos aislados como microtúbulos en distintas formas de organización, similares a los mostrados en la figura 3.7. Además, dado que los dos derivados fluorados de la fluoresceína son más fotoestables, los compuestos fluorescentes Flutax 2 y Flutax 3 permiten una exposición más prolongada a la luz que Flutax, por lo que presentan una ventaja adicional en la visualización de microtúbulos.

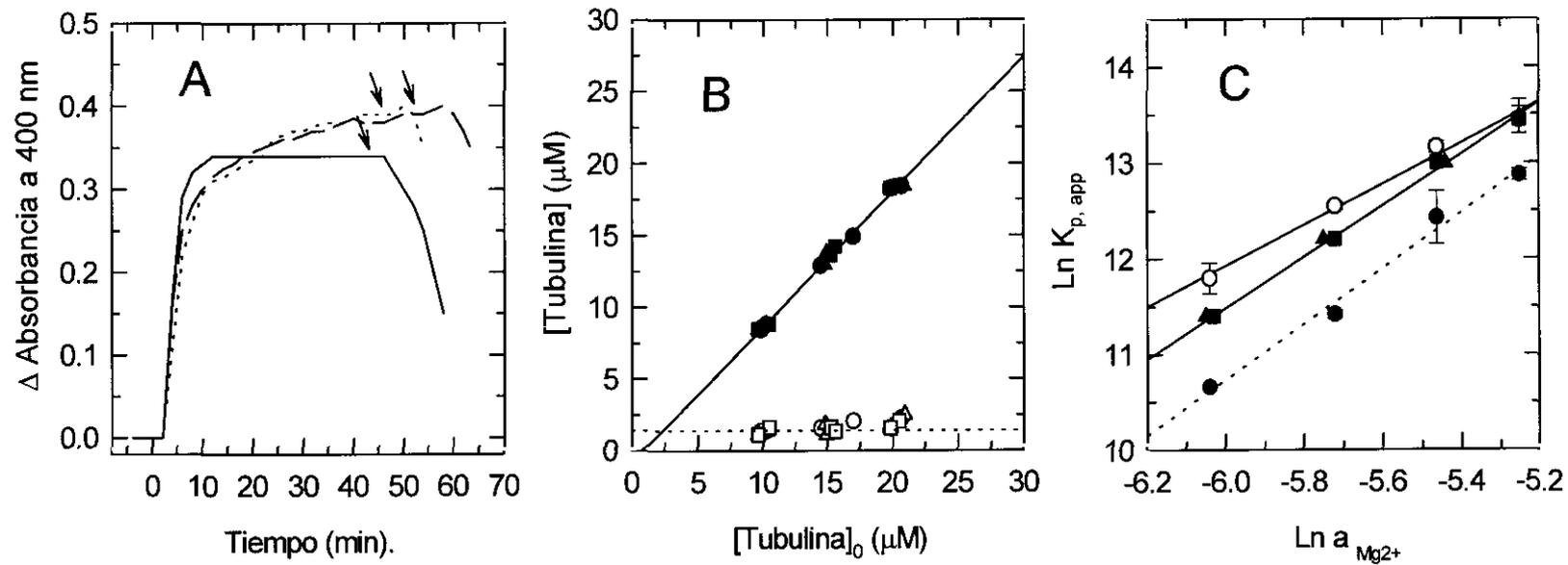


Figura 3.8.- Ensamblaje de microtúbulos inducido por taxoide. Panel A.- Aumento de turbidez debida a polimerización de GDP tubulina a 20 μM en tampón PEDTA, GDP 1 mM, MgCl_2 7 mM, pH 6.6 con un exceso de 1.2 de taxol (línea continua), Flutax 2 (línea de puntos) y Flutax 3 (línea discontinua). Panel B, medida de concentración crítica de polimerización de GDP tubulina en PEDTA, GDP 7 mM, MgCl_2 7 mM, pH 6.6, inducida por taxol (●), Flutax 2 (▲), y Flutax 3 (■). Se representa la concentración de proteína en el sobrenadante (símbolos blancos) y en el sedimento (símbolos negros) frente a la concentración total de tubulina. Panel C.- Representaciones de Wyman (Wyman y Gill, 1990) de polimerización de tubulina inducida por taxoide en función de la actividad de Mg^{2+} libre. Se representa el logaritmo neperiano de la constante de elongación aparente de los microtúbulos frente a la actividad de catión. El tampón fue PEDTA, GDP 1 mM. El pH se ajustó a 6.6 tras la adición de MgCl_2 . ○, taxol; ▲, Flutax 2; ■, Flutax 3. Se representa como comparación la dependencia de la actividad de Mg^{2+} para el Flutax, ya mostrada en la figura 3.6. Las pendientes son iguales al número de iones adicionales de Mg^{2+} preferentemente unidos al polímero. Los valores obtenidos fueron de 2.1 para el taxol, 2.9 para el Flutax, y 2.7 para el Flutax 2 y Flutax 3.

3.1.2.2.- Unión de Flutax 2 y Flutax 3 a microtúbulos.

En la representación de la polimerización de la tubulina a concentración constante con concentraciones crecientes de taxoide (figura 3.9) se observa, de forma similar a la de Flutax, cómo la polimerización aumenta con la concentración de los dos taxoides hasta alcanzar un máximo a concentraciones de taxoide cercanas al doble de la concentración de tubulina. Las medidas de estequiometría de unión de taxoide a GDP tubulina polimerizada (figura 3.9, panel B) dan valores de 1.04 ± 0.08 para el Flutax 2 y de 1.14 ± 0.08 para el Flutax 3, similares a la de taxol (Díaz y Andreu, 1993).

3.1.2.3.- Influencia del pH y la actividad de Mg^{2+} en la polimerización de microtúbulos inducida por Flutax 2 y Flutax 3.

Al igual que ocurre con Flutax, la influencia de la actividad de Mg^{2+} libre es más pronunciada en el ensamblaje de microtúbulos inducidos por Flutax 2 y Flutax 3 que en los inducidos por taxol. Las representaciones de Wyman (Wyman y Gill, 1990, figura 3.8 panel C) de la constante de elongación aparente de polimerización muestra que los microtúbulos inducidos por estos derivados incorporan un ión adicional de Mg^{2+} por tubulina polimerizada más que los inducidos por taxol (2.7 en lugar de 2.1).

Medidas de concentración crítica a pH 6.6 y a pH 6.2 muestran que la influencia del pH es pequeña en ambos casos (equivalente a 0.2 protones adicionales por tubulina polimerizada), similar a la de Flutax (ver figura 3.6).

3.1.3.- Comparación de los taxoides empleados en su unión a microtúbulos.

3.1.3.1.- Unión de taxoides a microtúbulos de MTP.

Para comparar las afinidades relativas de los taxoides empleados por los microtúbulos se eligió un sistema en el que la unión de ligando fuera un proceso prácticamente independiente de la polimerización. Por eso se midió la unión de taxoides a microtúbulos de

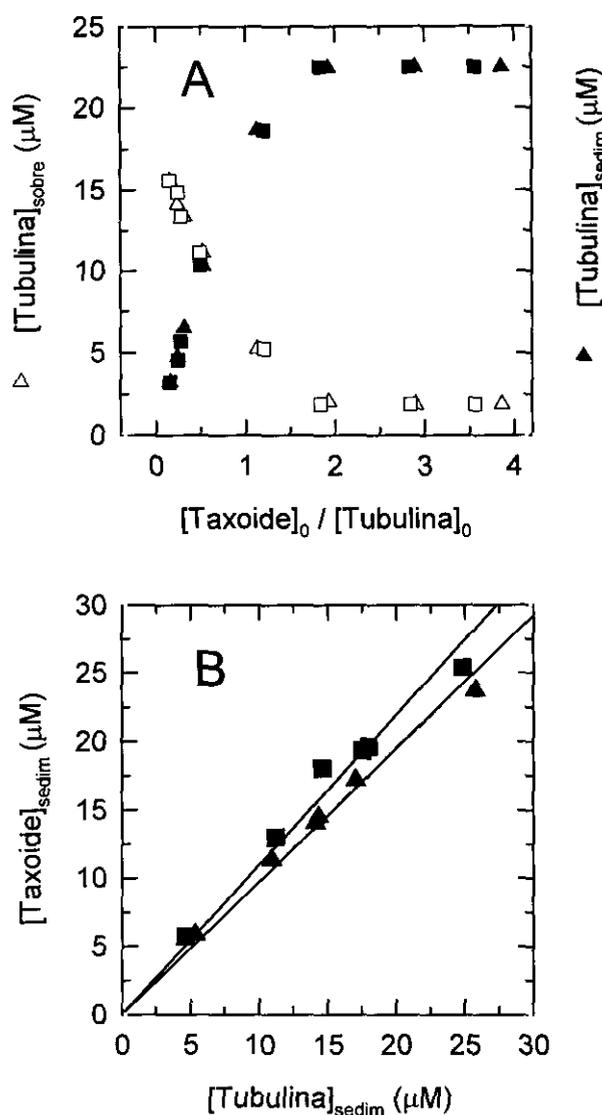


Figura 3.9.- Unión de taxoides fluorescentes a tubulina. Panel A.- Ensamblaje de tubulina en PEDTA, GDP 1 mM, MgCl₂ 7 mM, pH 6.6 a concentración constante de tubulina y relaciones crecientes taxoide/tubulina. Panel A, tubulina 20 μM, taxol. Panel B, tubulina 25 μM. Triángulos, Flutax 2. Cuadrados, Flutax 3. Panel C, tubulina 30 μM, Rotax. Los símbolos negros representan tubulina en el sedimento, y los símbolos blancos tubulina en el sobrenadante. Las concentraciones de tubulina están corregidas por la precipitación inespecífica de proteína. Panel B.- Estequiometría de unión de taxoides fluorescentes a microtúbulos ensamblados en PEDTA, GDP 1 mM, MgCl₂ 7 mM, pH 6.6; Flutax 2 (▲, estequiometría 1.04 ± 0.08) y Flutax 3 (■, estequiometría 1.14 ± 0.08). El experimento se realizó polimerizando concentraciones crecientes de GDP tubulina con un exceso 1:1.2 de taxoide en el tampón indicado a 37° C, separando los microtúbulos por sedimentación y midiendo concentración de proteína y ligando en el sobrenadante y en el sedimento. Las concentraciones libres de ligando variaron de 1.8 μM a 5 μM.

proteína microtubular ensamblados previamente a la adición de ligando; además, estos microtúbulos son fisiológicamente más significativos que los microtúbulos de GDP-tubulina. Para ello se polimerizó MTP a una concentración de 2 o 4 mg/mL en tampón PIPES 100 mM, GTP 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 6.5 con o sin glicerol 3.4 M, y se añadieron cantidades crecientes de taxoides. En la figura 3.10 se observan las representaciones de moles de taxoide unido a 10⁻⁵ g de MTP polimerizada en función del logaritmo de concentración de ligando libre. Se observa que el taxoide unido a microtúbulos aumenta con la concentración de ligando libre hasta aproximadamente 0.8-1:1, se mantiene aproximadamente en esa relación en un cierto rango de concentraciones, para luego volver a subir indefinidamente. Esto sugiere dos tipos de sitios de unión al microtúbulo, uno específico de taxol (como demuestra el hecho de que la unión se desplaza con la adición de docetaxel hasta una concentración de aproximadamente 10 μM), y otros no específicos de más baja afinidad. Se observa también que la unión a sitios de baja afinidad en presencia de glicerol es distinta que en ausencia de este cosolvente. La unión de 2' acetil Flutax se detecta a concentraciones semejantes a las de la unión a sitios de baja afinidad de Flutax.

Los datos experimentales se analizaron según un modelo de dos tipos de sitios de unión, aplicando la ecuación (2.18). Los valores obtenidos se muestran en tabla 1. Este análisis muestra aproximadamente un sitio de unión específico con constantes de equilibrio de disociación del orden de micromolar. El constreñir a 0.8 el número de sitios de unión para todos los ligandos no alteró significativamente el valor de las constantes de asociación (no mostrado). Asimismo, se observan un número indeterminado de sitios de baja afinidad con constantes de asociación de dos a tres órdenes de magnitud menores que las de los sitios de alta afinidad (salvo en el caso del Flutax y el HexaFlutax, en el que sólo las separa un orden de magnitud). La unión a este segundo tipo de sitios no es saturable en el rango de concentraciones en el que trabajamos (ver figura 3.10).

La solubilidad limitada de Rotax impide completar la curva de unión hasta más de 0.4 moles de ligando unido por 10⁻⁵ g de microtúbulos de MTP. Esta unión se desplaza completamente por docetaxel hasta las concentraciones de ligando libre que permite su solubilidad. Los datos disponibles no permiten estimar un número de sitios de unión y una constante de asociación, pero son compatibles con un modelo con 0.8 sitios de unión y una

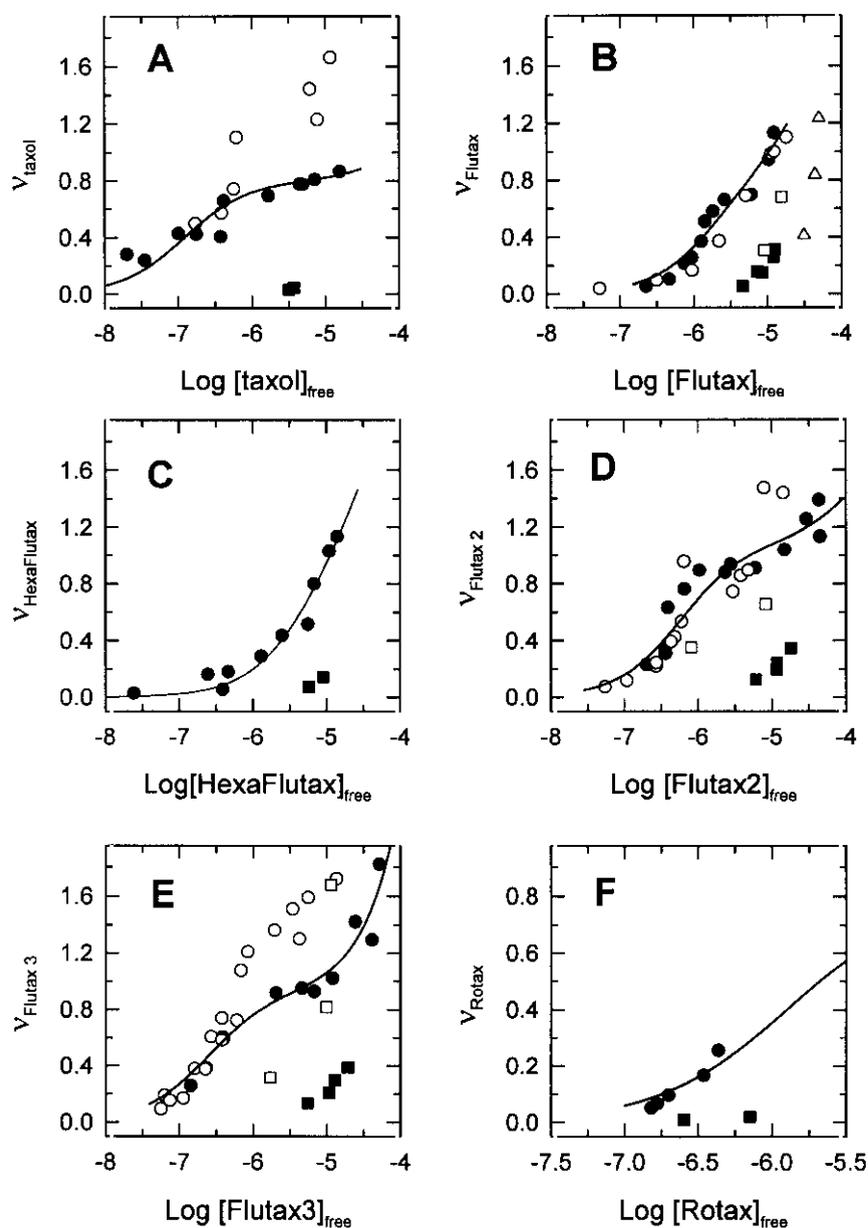


Figura 3.10.- Unión de taxoides a proteína microtubular. ●, MTP a 2 mg/mL en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 6.5. ■, en las mismas condiciones más docetaxel 50 μM. ○, unión a MTP a 4 mg/mL en el mismo tampón sin glicerol. □, unión en el tampón sin glicerol en presencia de docetaxel 50 μM. Las curvas (excepto en panel F) representan el mejor ajuste a la ecuación (2.18) a los datos de unión en tampón con glicerol, según un modelo de dos tipos de sitios de unión. A, taxol. B, Flutax. Δ, 2' acetil Flutax. C, HexaFlutax. D, Flutax 2. E, Flutax 3. F, Rotax, la curva representa una simulación de la unión de ligando a 0.8 sitios de proteína con una constante de asociación de $1.26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

constante de equilibrio de asociación de $0.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (ver figura 3.10, panel E).

	n_1	K_{A1}	(α_1)	$n_2 \times K_{A2}$	(α_2)
Taxol	0.8	$8.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)	$0.003 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)
Flutax	0.9	$0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)	$0.028 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)
HexaFlutax	0.8	$0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)	$0.048 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)
Flutax 2	1.1	$1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)	$0.005 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)
Flutax 3	0.9	$4.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)	$0.020 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)
Rotax	(0.8)	$0.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	(1)	(0)	(0)

Tabla 1.- Valores obtenidos en los mejores ajustes de la ecuación (2.18) a los datos de unión de taxoides a MTP en presencia de glicerol según. n_1 y n_2 son el número de sitios de unión de las dos clases de sitio, α_1 y α_2 son los coeficientes de Hill para los dos tipos de sitio y K_{A1} y K_{A2} son las constantes de disociación para los tipos de sitios 1 y 2. Nuestras condiciones de trabajo sólo nos permiten disponer de uno de los brazos de la isoterma para el segundo tipo de sitio, por lo que no se puede establecer con precisión un valor de n_2 ni de K_{A2} , por lo que sólo se muestra el producto $n_2 \times K_{A2}$, y se constriñe el valor de α_2 a 1. Las curvas se ajustaron al modelo más sencillo, en el que la unión a ambos sitios no es cooperativa. Dejar flotar el índice de cooperatividad para el sitio específico rinde unos índices significativamente mayores que 1 para el Flutax 2 (2.03) y para el Flutax (2.5), siendo el ajuste del modelo a los datos sólo marginalmente mejor (no mostrado). En el caso del Rotax, se constriñeron todos los valores señalados entre paréntesis para hallar el valor de K_A .

Las constantes de asociación obtenidas permiten ordenar estos taxoides por orden de mayor a menor afinidad al sitio de alta afinidad en los microtúbulos, de la forma:

$$\text{Taxol} \succ \text{Flutax 3} \succ \text{Flutax 2} \succ (\text{Rotax}) \sim \text{Flutax} \succ \text{HexaFlutax}$$

En este método de medida de unión de taxoides a MTP se toma la concentración de taxoide fluorescente en el sobrenadante como concentración libre de ligando. Dado que las concentraciones de taxoide se determinan fluorométricamente, una pequeña proporción de fluoróforo inactivo (no unido a taxoide) puede dar lugar a una sobreestimación del ligando libre. Además, la gran afinidad de todos los ligandos por la MTP y las altas concentraciones de proteína usadas hacen que las concentraciones libres de taxoide sean muy pequeñas en relación con las concentraciones totales, por lo que esta sobreestimación en la medida puede

introducir un error en el cálculo de la constante de asociación. En los taxoides fluorescentes derivados de la fluoresceína utilizados en este trabajo se estimó el máximo porcentaje de impurezas fluorescentes en un 0.2% (ver Materiales y Métodos, apartado 3.2). En el caso del Flutax 2 y Flutax 3, se ha calculado que si un 0.2% del fluoróforo fuese inactivo, la constante de asociación para el primer tipo de sitio sería respectivamente de 1.7 y de $4.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (en lugar de 1.6 y $4.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

3.1.3.2.- Competición de taxoides por su sitio de unión a microtúbulos de MTP.

Para medir la afinidad relativa de todos estos taxoides por el sitio de alta afinidad específico de taxol se diseñó un método de competición de dos ligandos por el mismo sitio de unión, un ligando trazador fluorescente (A) a concentración inicial constante, y un ligando competidor (B). Para obtener un desplazamiento efectivo, y evitar la interferencia de la unión a los sitios de baja afinidad, y de la unión de los taxoides a tubulina soluble (ver apartado 2.2 de Resultados), se trabajó a baja fracción de saturación de sitios de unión, a bajas concentraciones de tubulina y trazador y a concentraciones de ligando competidor libre por debajo de $10 \mu\text{M}$. Como taxoides trazadores se eligieron los taxoides que absorben en la región del rojo, porque su baja solubilidad impide obtener unas concentraciones de ligando libre suficientes para desplazar al resto de taxoides (ver Materiales y Métodos, apartado 6.2).

En la figura 3.11 se muestra el desplazamiento de Rotax (taxoide trazador-A) por el taxol y los taxoides fluorescentes que emiten en la región del verde (taxoides competidores-B). Debido a que trabajamos a baja fracción de saturación de sitios, y a que las concentraciones libres de ligando son muy pequeñas, la dispersión de los datos es mucho mayor que en la medida directa de la unión de taxoide a MTP. Sin embargo, se observa cómo el taxol y el Flutax 2 desplazan al Rotax con una efectividad similar, que es mayor que la de Flutax y HexaFlutax. Con éste último, las concentraciones que permiten las condiciones experimentales, no son suficientemente altas para conseguir un desplazamiento de Rotax tan efectivo como en el resto de taxoides, lo que nos indica que su constante de equilibrio de asociación por el sitio de alta afinidad es significativamente menor que la del resto de taxoides fluorescentes.

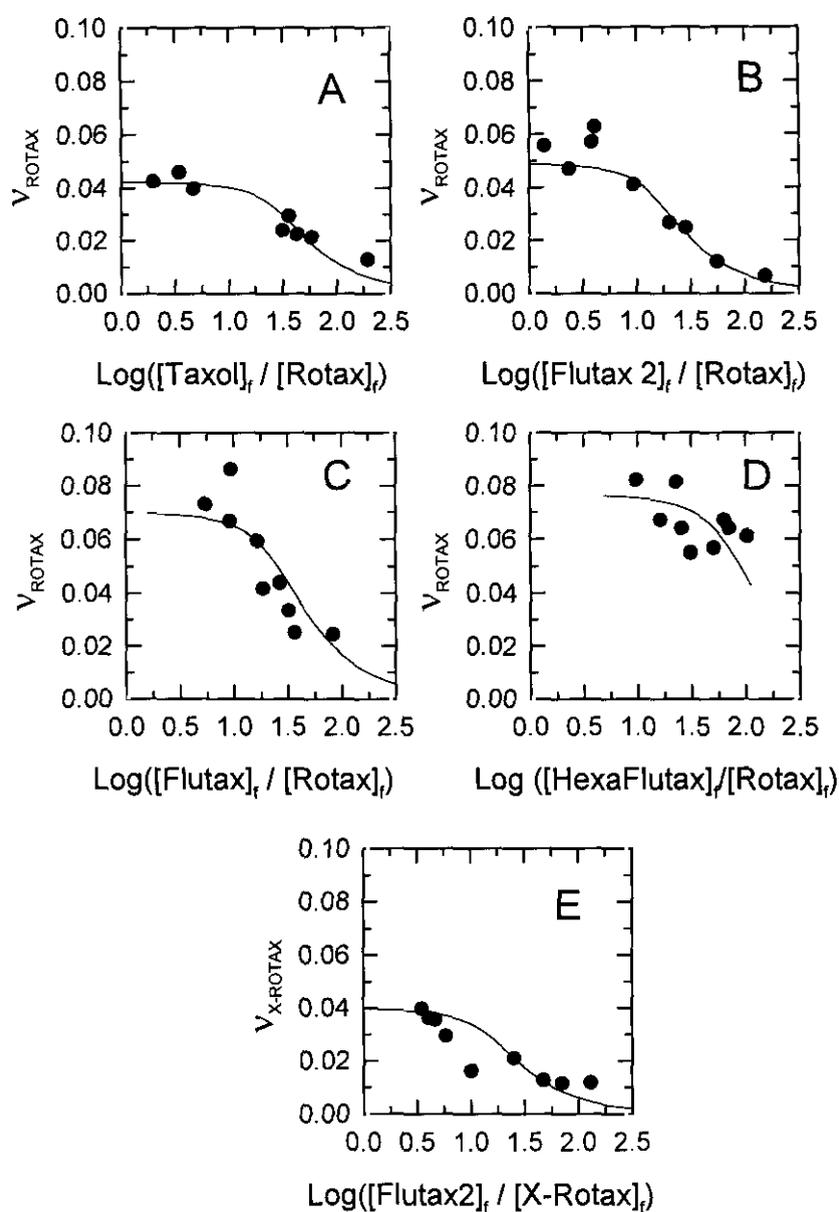


Figura 3.11.- Competición de dos taxoides por el mismo sitio de unión a proteína microtubular en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6.5. Se representan los moles de ligando unidos a cada 10⁻⁵ g de proteína en función de la relación de concentraciones libres de ligando. Se usaron como taxoide trazador el Rotax (paneles A, B, C y D), y el X-Rotax (panel E), y como competidor el taxol (panel A), el Flutax 2 (paneles B y E), el Flutax (panel C) y el Hexaflutax (panel D). Las curvas representan el mejor ajuste a un modelo de competición de dos ligandos por el mismo sitio de unión, utilizando la ecuación (2.31) (ver Materiales y Métodos).

El experimento se analizó según un modelo de competición de dos ligandos por el mismo sitio de unión, ajustando a los datos experimentales la ecuación (2.31). Al principio se dejaron variar los valores de K_A y K_B , y posteriormente se fijó el valor de K_A a $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (el valor más repetido en los ajustes) para poder ordenar todos los taxoides por orden de afinidad. Los resultados de estos ajustes se muestran en la tabla 3. El valor de la constante de asociación de HexaFlutax se muestra sólo de modo orientativo, ya que el desplazamiento de Rotax conseguido no permite una estimación precisa de constante de asociación. En el caso del taxol, la constante de asociación estimada tampoco es del todo fiable, ya que la distribución de los puntos de desplazamiento no es homogénea a lo largo de la curva. Esta falta de precisión se achaca a que el taxol libre se midió por HPLC, método que ofrece menor sensibilidad que la medida por emisión de fluorescencia.

En la figura 3.11, panel E, se muestra el desplazamiento de X-Rotax (taxoide trazador-A) por Flutax 2 (taxoide competidor-B). El Flutax 2 desplaza al X-Rotax de forma similar a la de Rotax. Estos datos se analizaron del mismo modo que los anteriores, construyendo el valor de K_B para Flutax 2 a $4.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (el valor obtenido en el análisis anterior de desplazamiento de Rotax con Flutax 2). La constante de asociación obtenida fue de $2.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para el X-Rotax.

	Flotando K_A y K_B	Construyendo $K_A \approx 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Taxol	($K_B = 2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)	$K_B = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Rotax	$K_A = 2.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	
Flutax	$K_B = 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$K_B = 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Rotax	$K_A = 4.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	
HexaFlutax	($K_B = 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)	$K_B = 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Rotax	$K_A = 3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	
Flutax 2	$K_B = 4.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$K_B = 4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Rotax	$K_A = 3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	

Tabla 2.- Constantes de unión al sitio específico del taxol de diversos taxoides según el mejor ajuste de la ecuación (2.31) a los datos experimentales. Los números entre paréntesis se muestran sólo a título orientativo.

Las constantes de asociación obtenidas nos permiten ordenar la afinidad relativa de los

taxoides de la forma:

$$\text{Flutax 2} \approx \text{Rotax} \approx \text{X-Rotax} \approx \text{Taxol} \geq \text{Flutax} > \text{HexaFlutax}$$

Las limitaciones experimentales de este método hacen que éste no sea capaz de distinguir claramente las constantes de asociación de Flutax 2, Rotax, X-Rotax y taxol, aunque sí distingue al Flutax y al HexaFlutax del resto.

Dado que trabajamos a concentraciones de proteína y de ligando total menores que en el experimento de unión a MTP, este segundo método es menos sensible a la presencia de un pequeño porcentaje de fluoróforo inactivo.

El análisis anterior nos da los valores tanto de la constante de unión del ligando trazador como del competidor, pero precisa de la medida de la concentración del ligando libre. En nuestro diseño de experimento estas concentraciones se determinaron, pero se quisieron analizar los datos de la competición para un caso más general en el que sólo se conozcan las concentraciones de proteína y ligando total. Para ello, se representaron los valores de v_A en función de la cantidad de competidor total (figura 3.12) y se ajustó el sistema de ecuaciones (2.21) a (2.26) para los valores conocidos de $[A]_0$, $[B]_0$ y K_A variando el valor de K_B para buscar la mínima desviación de los datos calculados de v_A con respecto a los datos experimentales. Debido a la fuerte adsorción a las paredes del tubo de Rotax $[A]_0$ no se mantuvo constante en todo el experimento (ver Materiales y Métodos, apartado 6.2), por lo que sólo se tomaron los puntos en que las concentraciones totales de Rotax presentaban menor variación entre sí. Los ajustes se muestran en la figura 3.12, y las constantes de unión determinadas se muestran en la tabla 3.

El experimento de competición también se realizó con el taxoide fluorescente sintetizado por de Guy *et al.* (1996) (β -SulfoRotax) y con un taxoide sintetizado en nuestro laboratorio usando la sulforodamina como fluoróforo y la α -alanina como espaciador (α -SulfoRotax). La unión a MTP detectada para ambos taxoides fue siempre menor de 0.025 moles de taxoide unido a cada 10^5 gramos de MTP, pero esta pequeña cantidad era desplazada por Flutax 2, lo que parece indicar que la unión es específica. Las bajas concentraciones de taxoide en el sobrenadante debidas a la baja solubilidad y fuerte adsorción

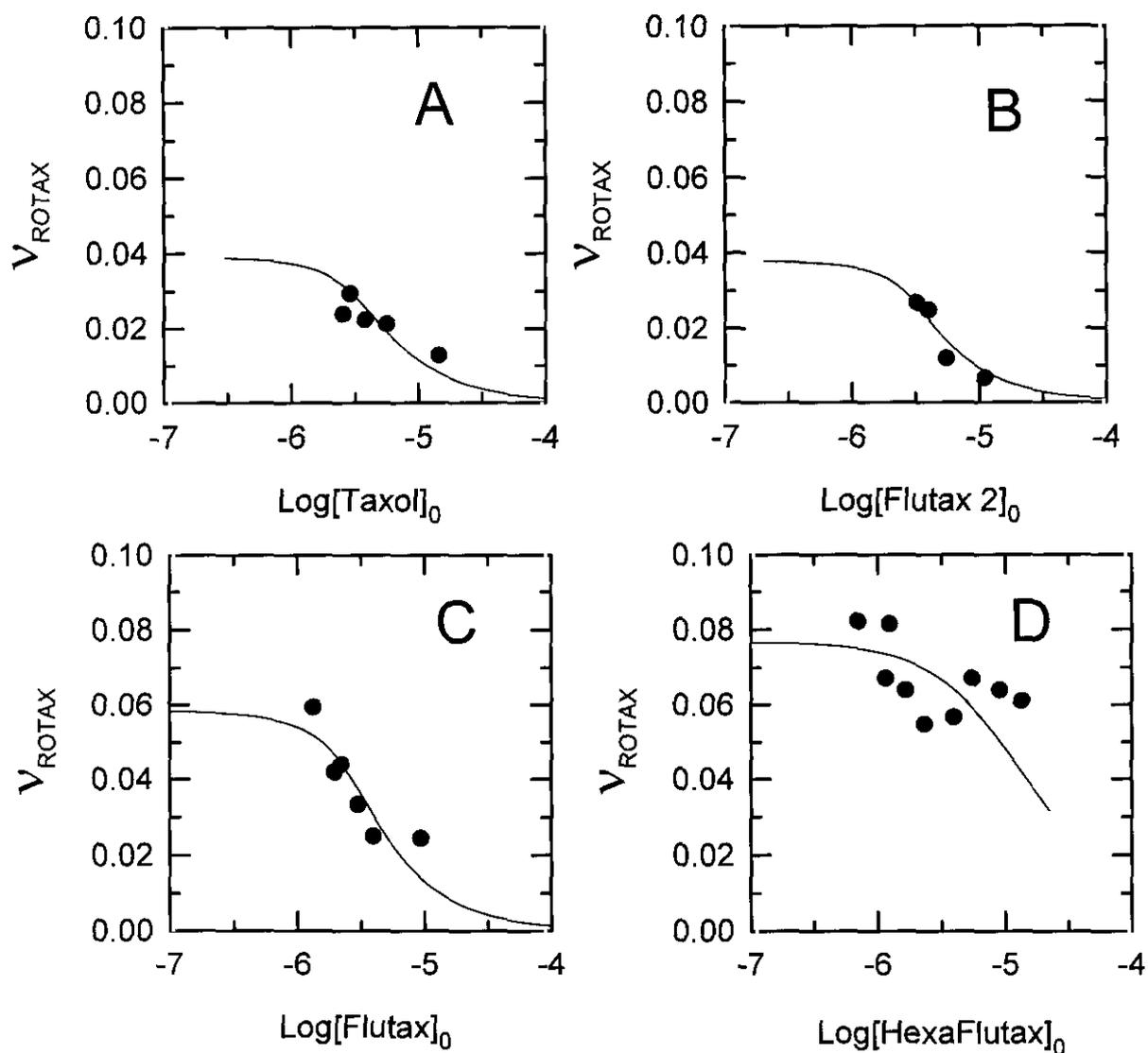


Figura 3.12.- Competición de dos taxoides por el mismo sitio de unión a proteína microtubular en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, MgCl_2 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6.5. Se representan los moles de ligando unidos a cada 10^{-5} g de proteína en función del taxoide competidor total. Se usaron como taxoide trazador el Rotax y como competidor el taxol (panel A), el Flutax 2 (panel B), el Flutax (panel C) y el Hexaflutax (panel D). Las curvas representan el mejor ajuste a una competición de dos ligandos por el mismo sitio de unión según un ajuste múltiple a las ecuaciones (2.19) a (2.24) (ver Materiales y Métodos).

a las paredes de los dos taxoides no permitieron medir adecuadamente la competición en estas condiciones.

Taxoide competidor	[Taxoide trazador] _{exp}	K _B
Taxol	0.12 μM	3.0 x 10 ⁶ M ⁻¹
Flutax	0.15 μM	3.3 x 10 ⁶ M ⁻¹
HexaFlutax	0.19 μM	0.3 x 10 ⁶ M ⁻¹
Flutax 2	0.12 μM	4.0 x 10 ⁶ M ⁻¹

Tabla 3-. Valores de K_B para el ajuste en función de las concentraciones totales de ligando y proteína. Se representa la media de los valores de taxoide trazador total en los puntos en que se realiza el ajuste determinada experimentalmente.

3.1.3.3.- Cambios en la estructura de los microtúbulos inducidos por taxoide.

El Flutax, el Rotax, el Flutax 2 y el Flutax 3 inducen un aumento en el número de protofilamentos de microtúbulos de GDP tubulina con respecto a los microtúbulos ensamblados en presencia de taxol (ver figura 3.13). Los microtúbulos de taxol observados mostraron mayoritariamente un patrón de 2 franjas - vacío - 2 franjas, indicativo de 13 protofilamentos (figura 3.13), mientras que los microtúbulos inducidos por taxoides fluorescentes presentan mayoritariamente patrones de franjas 3 - vacío - 3, y 3 - vacío - 4, representativos de microtúbulos de 15 y 16 protofilamentos respectivamente (Chrétien y Wade, 1991).

Cuando los taxoides fluorescentes se añaden sobre microtúbulos de MTP sus efectos en el cambio de protofilamentos no son tan notables como en el caso de los GDP microtúbulos. Mientras que los patrones de franjas observados para MTP en ausencia de taxoide fueron mayoritariamente de 2-nada-2 (13 protofilamentos), en presencia de ligandos fluorescentes se cuantificaron tanto microtúbulos de 13 como de 14 y, en menor cantidad, de 15 protofilamentos. En las muestras observadas no se detectan diferencias significativas entre los microtúbulos a los que el taxoide se añadió antes del ensamblaje y aquellos a los que se les añadió una vez polimerizados (ver figura 3.14). Sin embargo, es necesario un mayor número de observaciones para poder establecer con precisión tales diferencias.

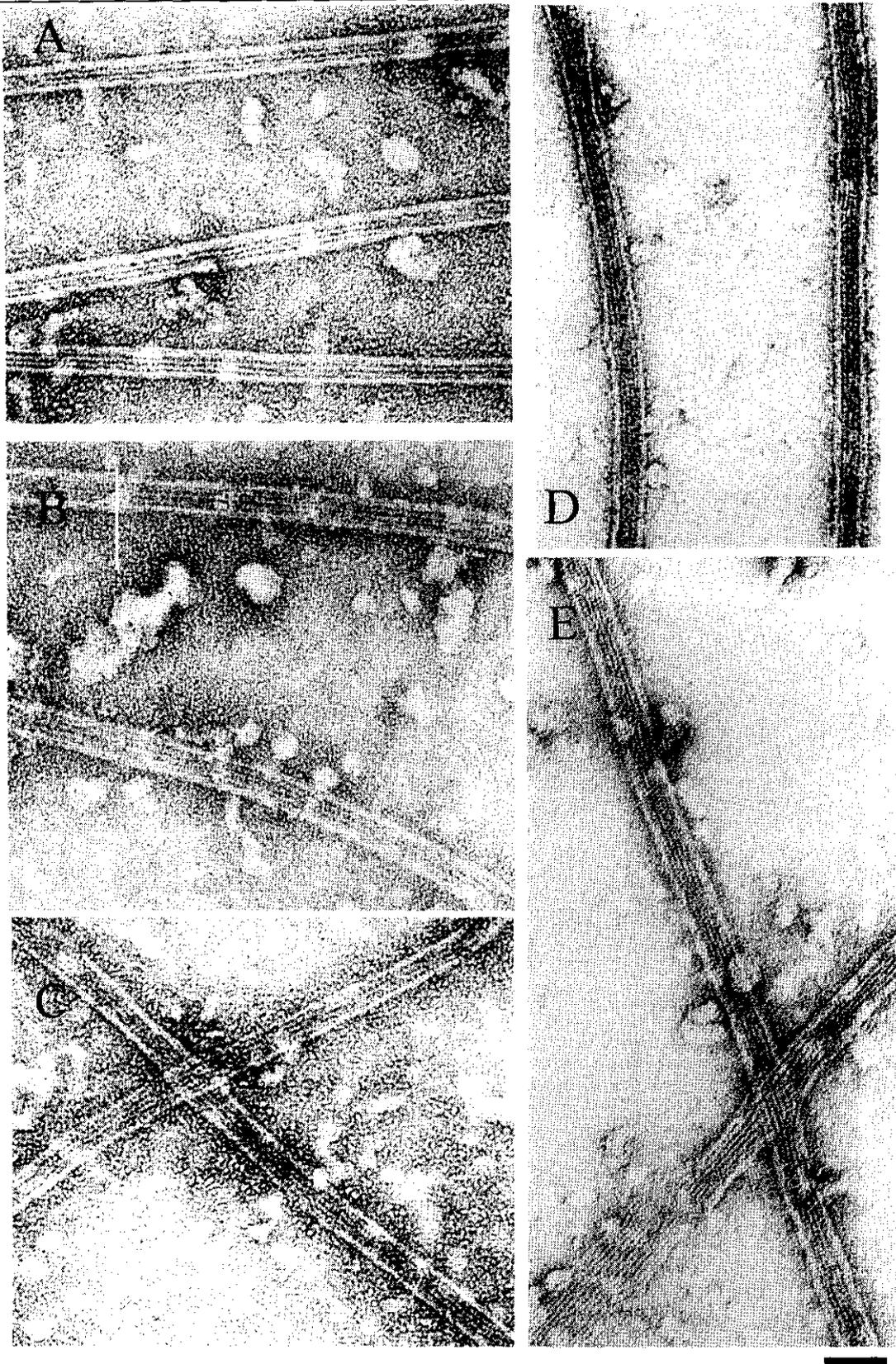


Figura 3.13.- Fotografías de microscopía electrónica de microtúbulos de GDP tubulina inducidos por taxol (panel A), Flutax (panel B), Rotax (panel C), Flutax 2 (panel D) y Flutax 3 (panel E). La barra representa 50 nm.

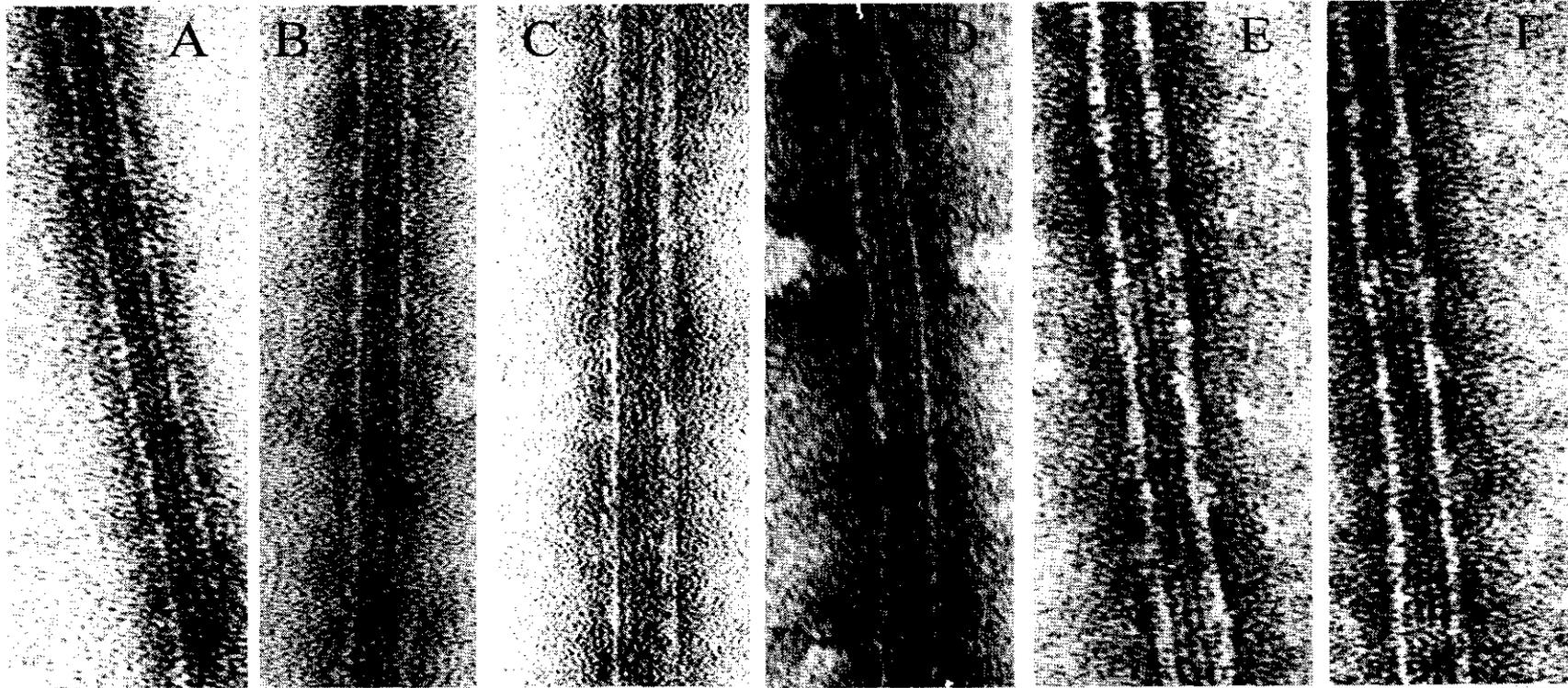


Figura 3.14.- Microtúbulos de MTP en tampón PIPES 100 mM, GTP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6.5. A y B, microtúbulos sin taxoide añadido. C, y D, microtúbulos con Flutax y Flutax 3 respectivamente añadidos antes de la polimerización. E y F, microtúbulos con Flutax 2 añadido después de la polimerización.

3.2.- UNION DE TAXOIDES FLUORESCENTES A TUBULINA: DIFERENCIAS CON SU UNION A MICROTUBULOS.

3.2.1.- Espectros de absorción de taxoides fluorescentes con tubulina y microtúbulos.

Aunque todos los análogos fluorescentes del taxol se sintetizaron con la molécula fluorescente en la posición 7 del taxol, que no es esencial para su función, y que probablemente está lejos de su sitio de unión (Kingston, 1994), todos los derivados de la fluoresceína han resultado ser sensibles al microentorno en el que se encuentran. En presencia de tubulina o microtúbulos en la disolución, sufren cambios apreciables en su espectro de absorción (ver figuras 3.15 y 3.17).

2.1.1.- Cambios en el espectro de absorción de Flutax.

En el Flutax, en nuestras condiciones de trabajo, el cromóforo fluoresceína se encuentra en equilibrio entre sus formas de ionización monoaniónica y dianiónica, cada una de las cuales presenta un espectro de absorción diferente. Esta transición se puede seguir mediante la relación entre diferentes valores de absorción a distintos pH (ver Materiales y Métodos, apartado 2.5). En el caso de Flutax en tampón fosfato, se determinó el pKa aparente a partir de las relaciones entre los valores de absorción a 493 nm y 464 nm en función del pH (ver figura 3.16). El pKa resultante de este análisis fue de 6.54 ± 0.03 . Dado que el pKa para el equilibrio monoanión/dianión para la fluoresceína es de 6.3 (Diehl, 1989; Klonis *et al.*, 1998), los resultados muestran que la unión covalente del taxol a la molécula de fluoresceína no cambia significativamente las propiedades de ionización de la misma.

En presencia de tubulina y de microtúbulos, la forma del espectro de absorción de Flutax experimenta cambios a diferentes valores de pH (ver figura 3.15). En presencia de microtúbulos, presenta un desplazamiento de 4 nm hacia longitudes de onda mayores en la posición de su máximo de absorción, y a pH 6.6, un aumento en su coeficiente de extinción molar. Sin embargo, en presencia de tubulina no polimerizada, el cambio que se produce en su espectro de absorción es más notable y completamente distinto. La posición de su máximo

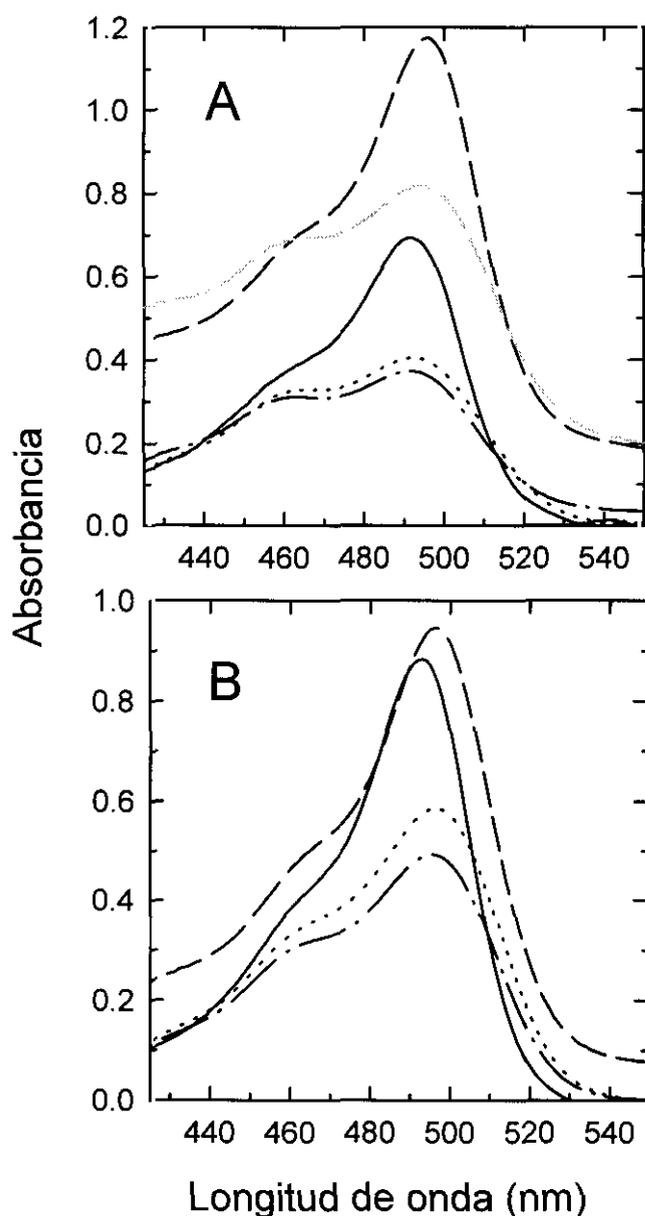


Figura 3.15.- Espectros de absorción de Flutax en tampón PEDTA, GDP 1 mM, pH 6.6 (panel A) o 7.0 (panel B). Línea continua, Flutax 2 μM (el espectro se representa multiplicado por 10). Los espectros de Flutax en este tampón a 4 $^{\circ}$ C y a 37 $^{\circ}$ C resultaron superponibles. Línea de puntos, Flutax 20 μM en presencia de tubulina 25 μM . Línea alterna con puntos, Flutax 20 μM en presencia de tubulina 25 μM y MgCl_2 7 mM, a 4 $^{\circ}$ C. Línea discontinua, lo mismo, tras 1h de incubación a 37 $^{\circ}$ C (Flutax en microtúbulos). Línea discontinua gris, lo mismo, tras la adición de docetaxel 30 μM . Todos los espectros se adquirieron en un espectrofotómetro Varian Cary 3E.

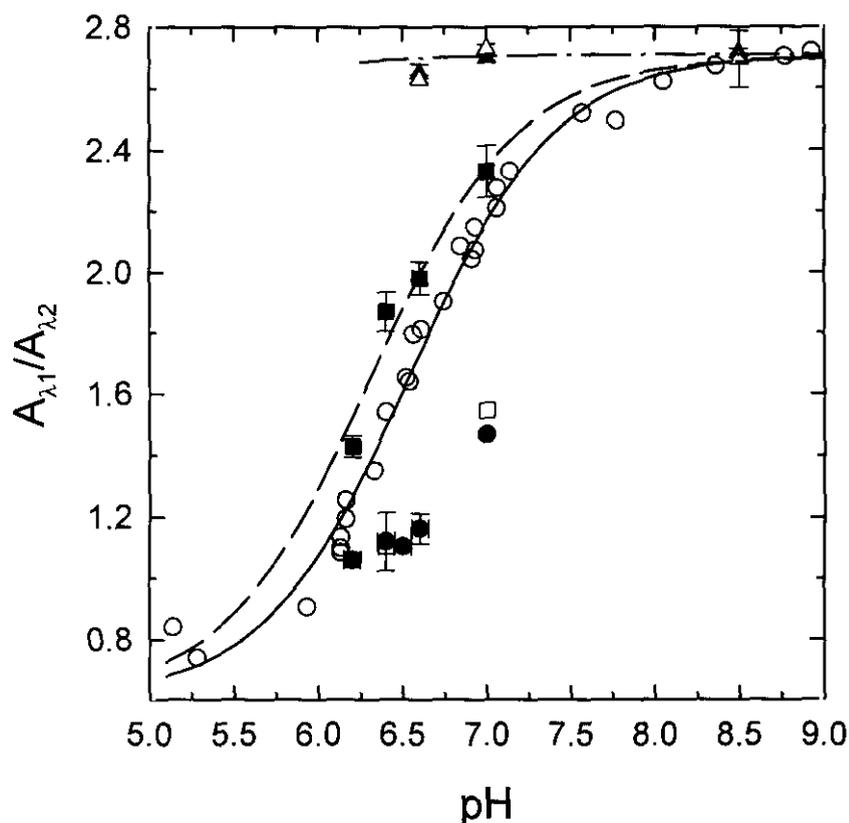


Figura 3.16.- Curvas de titulación espectrofotométrica de Flutax en tampón PEDTA GDP 1 mM en función del pH, en solución (○, Flutax 2 μ M en el tampón indicado a 20° C, la relación entre valores es indistinguible en presencia o ausencia de $MgCl_2$), en presencia de microtúbulos (■, Flutax 20 μ M en el mismo tampón más $MgCl_2$ 7 mM y tubulina 25 μ M, espectro medido tras 1 hora de incubación a 37° C), en presencia de tubulina y $MgCl_2$ (□, mismas condiciones que anterior, medido a 4° C), y de tubulina (●, en tampón PEDTA GDP 1 mM con tubulina 25 μ M). Dado que el Flutax unido a la tubulina sufre un cambio en su espectro muy diferente al que experimenta cuando se une a microtúbulos, se representan las relaciones entre valores de absorción a 493 nm y 464 nm de Flutax unido a microtúbulos corregidas por la absorción del Flutax unido a la tubulina no ensamblada que queda en solución. Las barras de error representan la desviación estándar entre el valor experimental y el corregido. La constante ácida de ionización calculada para el Flutax en disolución ajustando la ecuación (2.9) a los datos (línea continua) fue de 6.54 ± 0.03 . El ajuste a los datos de Flutax unido a microtúbulos de la ecuación (2.9) (línea discontinua) se realizó construyendo los valores de M y N a los valores obtenidos para Flutax en solución, y dio un valor de pKa de 6.3 ± 0.1 unidades de pK. Los triángulos blancos representan la relación entre valores de absorción a 494 nm y 464 nm para Flutax 2, y los triángulos negros, la relación entre A_{500}/A_{470} para Flutax 3.

de absorción apenas varía (2 nm a pH 7.0) pero sufre una disminución acusada de su coeficiente de extinción (aproximadamente del 40%).

Si atribuimos los cambios en el espectro de absorción del Flutax unido a microtúbulos únicamente a cambios en el estado de ionización de la molécula, podemos representar las relaciones entre valores de absorción a 493 y 464 nm, de forma análoga a la del ligando en solución (ver figura 3.16), para estimar un pKa aparente del taxoide unido a los microtúbulos. Si asumimos que la relación ($\epsilon_{493} / \epsilon_{464}$) para el monoanión y para el dianión no cambia con respecto al valor que tiene en solución, el cambio se traduce en una ligera disminución del pKa aparente (0.2 unidades de pK) respecto de su valor en solución. Esto puede interpretarse como la presencia de un microentorno catiónico en el sitio de unión del ligando en la tubulina. Por otro lado, la posición del máximo de absorción de Flutax se desplaza hacia longitudes de onda mayores cuando se une a los microtúbulos, lo que indica que el cromóforo fluoresceína sufre otros fenómenos tras su unión al microtúbulo (fundamentalmente puentes de hidrógeno, ver Klonis *et al.*, 1998). Por tanto, la relación entre valores de absorción se ve afectada por otros factores distintos al cambio en el estado de ionización, por lo que el cálculo del cambio en la constante ácida de ionización es por el momento una aproximación.

El cambio de la forma del espectro de absorción y la disminución del coeficiente de extinción de Flutax unido a tubulina soluble son mucho más acusados que en tubulina polimerizada, por lo que pueden utilizarse como herramienta para detectar el estado de polimerización de la proteína en la solución. Ambos cambios son similares a los observados cuando aumenta la concentración de taxoide por encima de 2 μM a pH menores que 7.0 (ver figura 2.4 de Materiales y Métodos), por lo que es posible que coexistan varios efectos adicionales a los que pueda haber en microtúbulos, como fenómenos de agregación o apilamiento de Flutax.

	^a $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{MAX}}$	^b $\epsilon_{\text{max, app}} \pm 3000^*$	^c $A_{\lambda_1}/A_{\lambda_2}$
Flutax, tampón A, pH 6.6, 2 μM	492 nm	35000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	18
microtúbulos GDP, pH 6.6	496 nm	46000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	22
tubulina, pH 6.6	492 nm	21000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	12
Flutax, tampón A, pH 7.0, 2 μM	493 nm	50000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	21
microtúbulos GDP, pH 7.0	497 nm	55000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	22
tubulina, pH 7.0	495 nm	28000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	16
Flutax, tampón B, pH 6.5, 1.5 μM	497 nm		20
microtúbulos MTP, 15 μM	498 nm		27
Flutax 2, tampón A, pH 6.6	494 nm	73000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	27
microtúbulos GDP, pH 6.6	497 nm	58000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	34
tubulina, pH 6.6	502 nm	50000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	28
Flutax 2, tampón B, pH 6.5, 15 μM	497 nm		29
microtúbulos MTP, 15 μM	497 nm		33
Flutax 3, tampón A, pH 6.6	500 nm	76000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	27
microtúbulos GDP, pH 6.6	504 nm	61000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	29
tubulina, pH 6.6	508 nm	54000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	26
Flutax 3, tampón B, pH 6.5	504 nm		28
microtúbulos MTP	505 nm		32

Tabla 4.- Coeficientes de extinción y la relación entre valores de absorción de taxoides fluorescentes a una concentración de 20 μM (excepto donde se indica). Tampón A, PEMG, GDP 1 mM, pH 6.6. Tampón B, PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl_2 , 1 mM pH 6.5. a, posición del máximo de absorción. b, coeficiente de extinción molar aparente (ver Materiales y Métodos, apartado 3.4) en el máximo, en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. En el caso de taxoide unido a microtúbulos, la desviación estándar es de ± 5000 . c, relación entre valores de absorción ($\lambda_1 = 493$ nm para Flutax, 494 nm para Flutax 2 y 500 nm para Flutax 3. $\lambda_2 = 464$ nm para Flutax y Flutax 2, y 470 nm para Flutax 3).

3.2.1.2.- Cambios en el espectro de absorción de Flutax 2 y Flutax 3.

En nuestras condiciones de trabajo, tanto Flutax 2 como Flutax 3 se encuentran fundamentalmente en forma dianiónica (ver Materiales y Métodos, apartado 3.3; figura 3.16 de Resultados). Sin embargo, la forma de su espectro de absorción también experimenta cambios en presencia de tubulina o microtúbulos. Cuando están unidos a microtúbulos de GDP tubulina a una concentración de 20 μM taxoide y 25 μM tubulina ambos sufren un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores en la posición de su máximo de absorción, así como una disminución en su coeficiente de extinción (figura 3.17). Estos cambios han sido importantes a la hora de interpretar los cambios observados en el espectro de absorción de Flutax tras su unión a microtúbulos.

En presencia de tubulina no polimerizada, el cambio en la posición de su máximo de absorción es mucho más acusado (8 nm), y la disminución en su coeficiente de extinción es también mucho mayor (aproximadamente de un 30% en los dos casos).

3.2.1.3.- Cambios en el espectro de Flutax, Flutax 2 y Flutax 3 en presencia de glicerol.

Estos taxoides también son sensibles a la presencia de glicerol en la solución. En tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, GTP 1 mM, EGTA 1 mM, MgCl_2 1 mM, pH 6.5 presentan un desplazamiento hacia el rojo en su máximo de absorción similar al que presentan cuando están unidos a microtúbulos de GDP tubulina, como se muestra en la tabla 4 y en la figura 3.18. Cuando se unen a microtúbulos de MTP ensamblados en el mismo tampón previamente a la adición de taxoide, la forma del espectro varía muy poco, lo cual puede sugerir que el tampón con glicerol imita de algún modo del microentorno de los taxoides en su sitio de unión al microtúbulo.

En la tabla 4 se comparan los coeficientes de extinción aparentes y las relaciones entre valores de absorción de los tres taxoides fluorescentes en distintos tampones cuando se encuentran libres en solución o unidos a tubulina soluble o a microtúbulos.

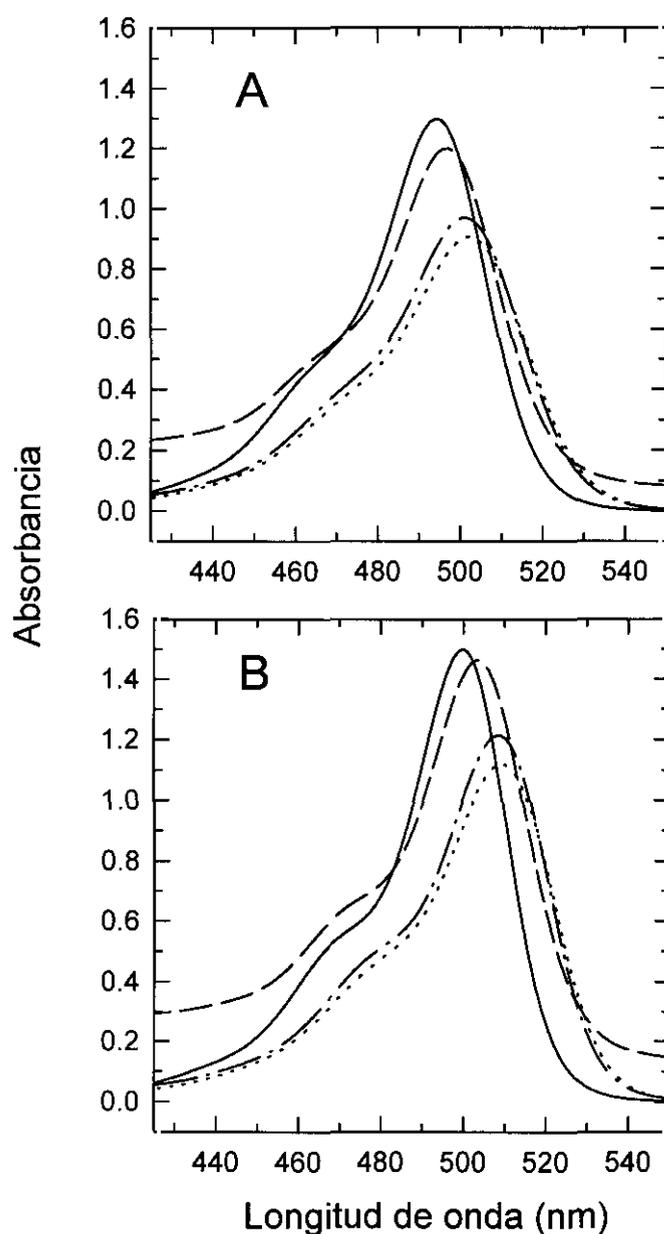


Figura 3.17.- Espectros de absorción de Flutax 2 (panel A) y Flutax 3 (panel B) en tampón PEDTA GDP 1 mM, pH 6.6. Línea continua, taxoide 20 μ M en solución. Línea de puntos, taxoide 20 μ M en presencia de tubulina 25 μ M en el mismo tampón. Línea alterna con puntos, taxoide 20 μ M en presencia de tubulina 25 μ M y MgCl₂ 7 mM, a 4° C. Línea discontinua, lo mismo, tras una hora de incubación a 37° C (taxoide en microtúbulos). Todos los espectros se adquirieron en un espectrofotómetro Varian Cary 3E termostatzado.

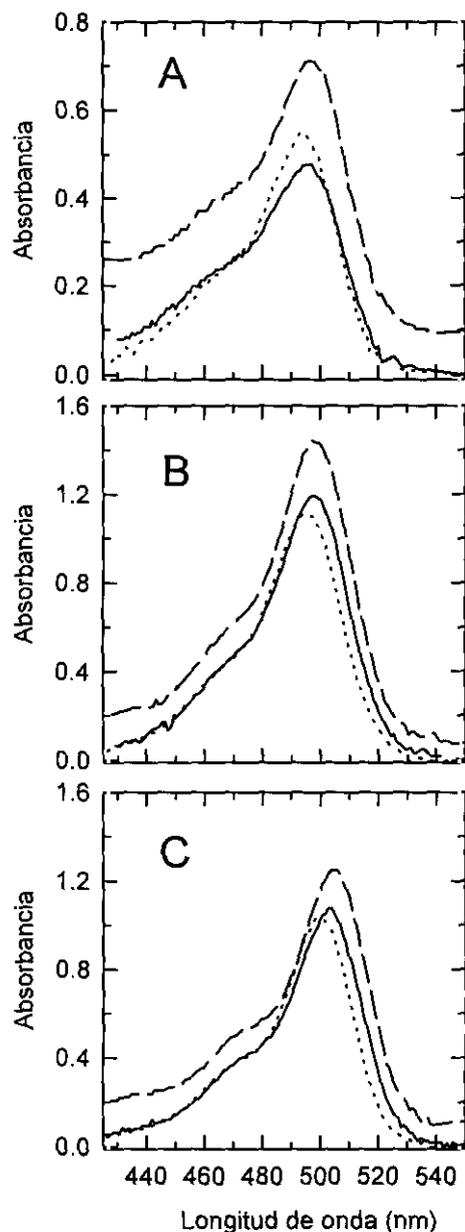


Figura 3.18.- Espectros de absorción de taxoides fluorescentes en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 (línea de puntos), en tampón PIPES 100 mM, glicerol 3.4 M, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1mM, GTP 1 mM, pH 6.5 (línea continua), y en el mismo tampón en presencia de MTP polimerizada durante 1 hora a 37°C, medidos a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Hitachi U2000. Panel A, Flutax. Los espectros de Flutax sin tubulina se adquirieron a 1.1 μ M, y se presentan multiplicados por 10. El espectro en presencia de microtúbulos se adquirió a 11 μ M. Panel B, Flutax 2 a 14 μ M. Panel C, Flutax 3 a 12 μ M.

3.2.2.- Interacción de taxoides fluorescentes con tubulina.

3.2.2.1.- Velocidad de sedimentación de tubulina con taxoides fluorescentes.

El hecho de que la forma del espectro de absorción de los taxoides fluorescentes cambie en presencia de tubulina no polimerizada en la solución indica algún tipo de interacción entre estos ligandos y la proteína.

Para medir esta interacción, se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación de tubulina en presencia de estos taxoides en tampón PEDTA, GDP 20 μM , pH 7.0 en ausencia de Mg^{2+} , y por tanto en condiciones en que la tubulina no ensambla en microtúbulos.

El Flutax cosedimenta en su mayor parte con la tubulina en experimentos de velocidad de sedimentación a 60000 rpm en tampón PEDTA pH 7.0, como muestra la figura 3.19 (paneles A y B). Para comprobar que la unión no era debida a la parte fluorescente del ligando se realizó un experimento similar con tubulina y alaninfluoresceína. Asimismo, se realizó un control con ovoalbúmina y Flutax, para comprobar si el Flutax se uniría a cualquier otra proteína (figura 3.20, paneles C a F). En ambos casos el resultado fue negativo, lo que demuestra la especificidad de Flutax por la tubulina.

El Rotax también se une a la tubulina en experimentos de velocidad de sedimentación, como se muestra en la figura 3.20 (paneles A y B), aunque su baja solubilidad impide un análisis cuantitativo de esta unión.

El análisis más detallado de la figura 3.19 (paneles A y B) muestra que del Flutax inicial (22 μM) la mayor parte cosedimenta con 20 μM de tubulina, que sedimenta totalmente, mientras que queda en el sobrenante una concentración de ligando libre de 2 μM . La figura 3.20 (panel C) muestra la contribución de la absorción de la fluoresceína a 295 nm: se observa la aparición de una línea base de ~ 0.1 A que es debida a la absorción a esa longitud de onda de la fluoresceína alanina no sedimentada.

Se midieron los coeficientes de sedimentación (s_{20}) tanto a 295 nm (longitud de onda a la que aproximadamente el 80% de la absorción es debida a la proteína) como a 495 nm (en que toda la absorción es debida al Flutax), y se comparó con el de la tubulina sin ligando en el mismo tampón al que se le añadió la cantidad equivalente de DMSO (estado de referencia).

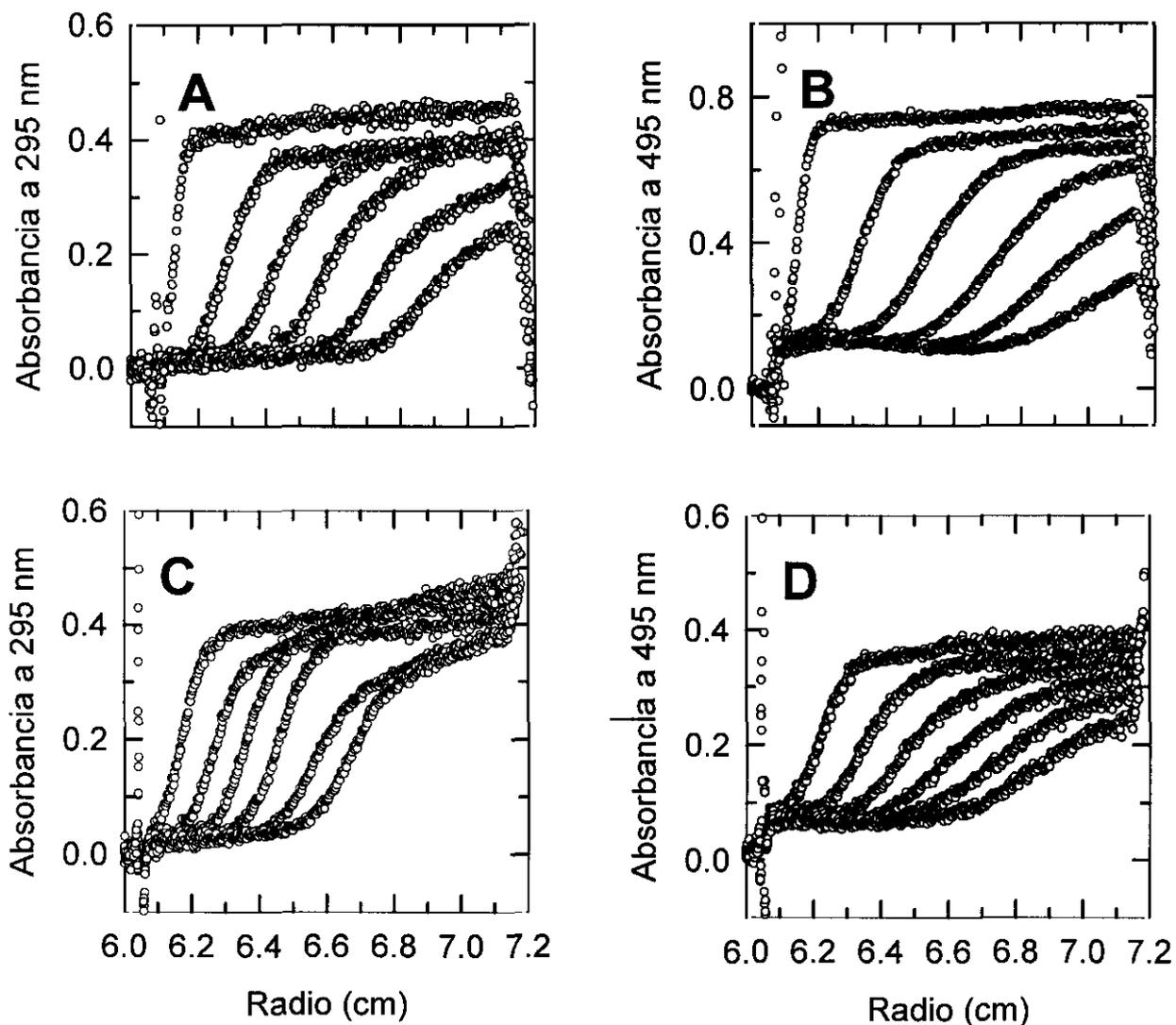


Figura 3.19.- Perfiles de velocidad de sedimentación de tubulina y taxoides fluorescentes, en tampón PEDTA, GDP 20 μM , pH 7.0. Paneles A y B, tubulina 20 μM en presencia de Flutax 25 μM a 295 nm y a 495 nm, respectivamente. Paneles C y D, tubulina 20 μM en presencia de 2' acetilFlutax 25 μM . Todos los perfiles se adquirieron a 20° C y 60000 rpm, a intervalos de tiempo de 5 minutos.

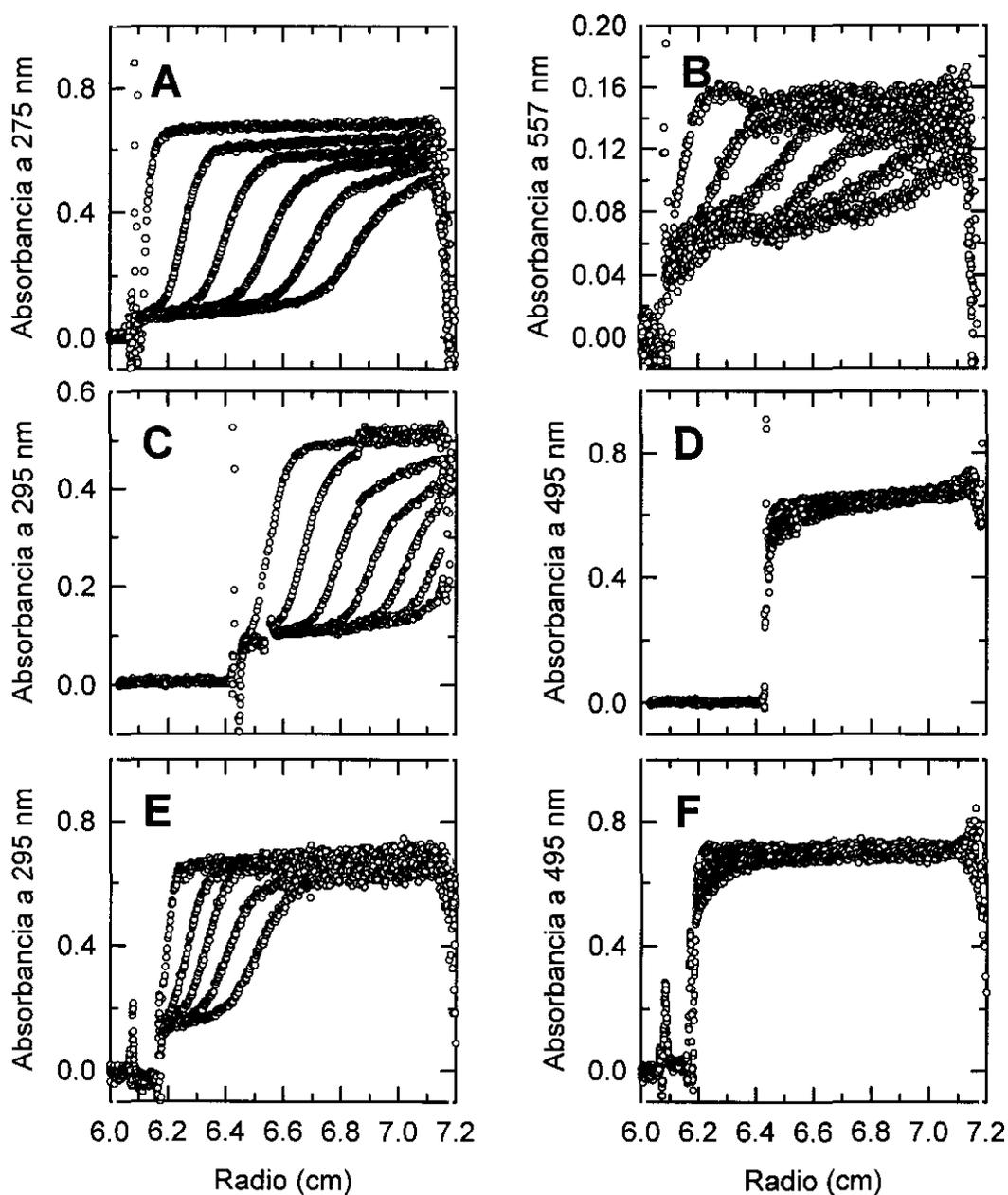


Figura 3.20.- Perfiles de velocidad de sedimentación de tubulina y taxoides fluorescentes, en tampón PEDTA, GDP 20 μM , pH 7.0. Paneles A y B, tubulina 6 μM con Rotax a concentración final 2 μM , medido a 275 y 557 nm. Paneles C y D, tubulina 20 μM en presencia de fluoresceín alanina 25 μM , a 295 y 495 nm, respectivamente. Paneles E y F, Flutax 25 μM en presencia de ovo-albúmina medidos a 295 y 495 nm respectivamente. Todos los perfiles se adquirieron a 20° C y 60000 rpm, a intervalos de tiempo de 5 minutos.

Para medir el coeficiente de sedimentación se emplearon tanto el método de representar la posición radial del frente en función del tiempo (al que nos referiremos a partir de ahora como método 1), que determina el coeficiente de sedimentación de la especie mayoritaria en la celda, como el método del segundo momento de perfiles de sedimentación (método 2), que nos da una información más completa de todas las especies en solución). En los experimentos realizados, se observa que el coeficiente de sedimentación determinado por el segundo método siempre es mayor que el determinado por el método del logaritmo de r frente a t , lo que indica heterogeneidad en el material que está sedimentando (ver tabla 5).

El coeficiente de sedimentación de la tubulina a una concentración de 20 μM sin ligando medido por el método 1 es de 5.5 ± 0.2 S, que corresponde con el valor de coeficiente de sedimentación de tubulina corregido a dilución infinita (s_{20}^0) de 5.8 S determinado por Frigon y Timasheff (1975). Sin embargo, cuando se mide por el método 2, da un valor de 6.2 ± 0.4 S. Esta diferencia entre los dos métodos indica que parte del material está sedimentando con mayor velocidad que el dímero de tubulina. La causa de esta diferencia puede ser una agregación parcial de la proteína debida a la desnaturalización, ya que la GDP tubulina en ausencia de Mg^{2+} presenta una velocidad de desnaturalización mayor que la de la proteína equilibrada con catión (Menéndez *et al.*, 1998). Esta disparidad entre los dos métodos no se observa cuando se disminuye la concentración de la tubulina a 6 μM , lo que parece indicar que la agregación es menor.

Cuando se añade Flutax a la tubulina se observa que a 295 nm el coeficiente de sedimentación medido por el método 1 no varía con respecto al estado de referencia (5.3 S). Sin embargo, cuando se mide por el método 2, sí que se observa un aumento en presencia de Flutax (de 6.2 ± 0.4 S en ausencia de ligando a 7.3 ± 0.5 S). Esta diferencia en los valores obtenidos por los dos métodos indica que aumenta la asimetría del pico. Este aumento se puede achacar a un aumento en la agregación de la tubulina, pero también se puede deber a un artefacto óptico causado por la absorción a 295 nm del Flutax que está sedimentando (ver más adelante). Este cambio en el coeficiente de sedimentación promedio no se observa con el taxol ni con el docetaxel, como se muestra en la tabla 5.

A 495 nm, se observa que el coeficiente de sedimentación de Flutax en presencia de tubulina es mayor que el de la proteína, tanto si se mide por el método 1 (7.6 ± 0.4 S) como

por el método 2 (8.3 ± 0.1 S).

Por otro lado, también se midió el coeficiente de sedimentación de tubulina equimolecular con Flutax $6 \mu\text{M}$. En estas condiciones se observa que no existe esa discrepancia entre coeficientes de sedimentación calculados por diferentes métodos, ni en el estado de referencia ni en presencia de Flutax. Además, el coeficiente de sedimentación medido a 495 nm no aumenta en presencia de taxoide.

En la representación de la distribución de coeficientes de sedimentación (figura 3.21) se observa que el máximo del $g(s^*)$ de la tubulina en presencia de Flutax (línea continua) coincide con el de la proteína sin ligando (línea de puntos). Sin embargo, cuando se mide a 495 nm , este máximo está desplazado al menos dos unidades de S con respecto al pico de la tubulina (línea discontinua). Todo esto parece indicar que el Flutax se une preferentemente a especies de tubulina mayores que el monómero. Estos cambios en la distribución de los coeficientes de sedimentación no se detectan cuando la proteína y el ligando están a una concentración de $6 \mu\text{M}$.

La presencia de docetaxel $50 \mu\text{M}$ no desplaza la unión de Flutax a la tubulina. Sin embargo, el aumento en el coeficiente de sedimentación de la tubulina medido por el segundo momento en presencia de Flutax $25 \mu\text{M}$ y de docetaxel $50 \mu\text{M}$ no es tan apreciable (6.8 S en lugar de 7.6 S). En la representación de $g(s^*)$ frente a s^* no se observa que el docetaxel tenga influencia en la distribución de los coeficientes de sedimentación (figura 3.20, líneas grises).

El 2' acetil Flutax se comporta de manera similar al Flutax. Su coeficiente de sedimentación en presencia de tubulina medido a 495 nm es algo mayor que el de la tubulina, y en la distribución de coeficientes de sedimentación se observa que el máximo se encuentra algo desplazado con respecto al del estado de referencia (figura 3.20, panel C). El docetaxel no tiene ningún efecto ni en los coeficientes de sedimentación ni en la distribución de los mismos. Tanto el Flutax 2 como el Flutax 3 (figura 3.21, paneles D y E) se comportan de la misma forma.

	Método	^a s ₂₀ , a 295	^b s ₂₀ , ligando	^c s ₂₀ , a 295, DT	^d s ₂₀ , ligando, DT
Tubulina	1	5.5 ± 0.2		5.5* ± 0.1	
	2	6.2 ± 0.4		6.2* ± 0.2	
Tubulina 6 μM	1	5.5			
	2	5.7			
Tubulina, taxol	1	5.3			
	2	6.6			
Tub, Flu-ala	1	4.9			
	2	5.8			
Tub, Flutax	1	5.6 ± 0.3	7.6 ± 0.4	5.1	6.9
	2	7.3 ± 0.5	8.3 ± 0.1	6.6	8
Tub, Flutax 6 μM	1	5.5	5.8		
	2	5.7	6.3		
Tub, 2' ac.Flutax	1	5.7	6.7	5.6	6.4
	2	7.1	8.8	7.3	8.4
Tub. 6 μM, Rotax	1	5.3			
	2	5.5			
Tub, Flutax 2	1	5.6 ± 0.1	7.0 ± 0.1	5.8	6.9
	2	7.0 ± 0.4	8.2 ± 0.3	6.8	7.8
Tub, Flutax 3	1	5.5	6.7		
	2	7.8	8.1		

Tabla 5.- Coeficientes de sedimentación de tubulina 20 μM y de los ligandos correspondientes a 25 μM (excepto donde se indica, 6 μM) medidos por el método de la posición del frente en función del tiempo (método 1) y por el método del segundo momento de la distribución de concentración (método 2). a, coeficiente de sedimentación medido a 295 nm. (excepto en las muestras a 6 μM de tubulina, medido a 275 nm). b, coeficiente de sedimentación medido a las longitudes de onda de cada ligando (ver Materiales y Métodos, apartado 6.1). c, coeficientes de sedimentación de la tubulina en presencia de docetaxel 50 μM (excepto (*), 25 μM). d, coeficientes de sedimentación del ligando en presencia de docetaxel 50 μM.

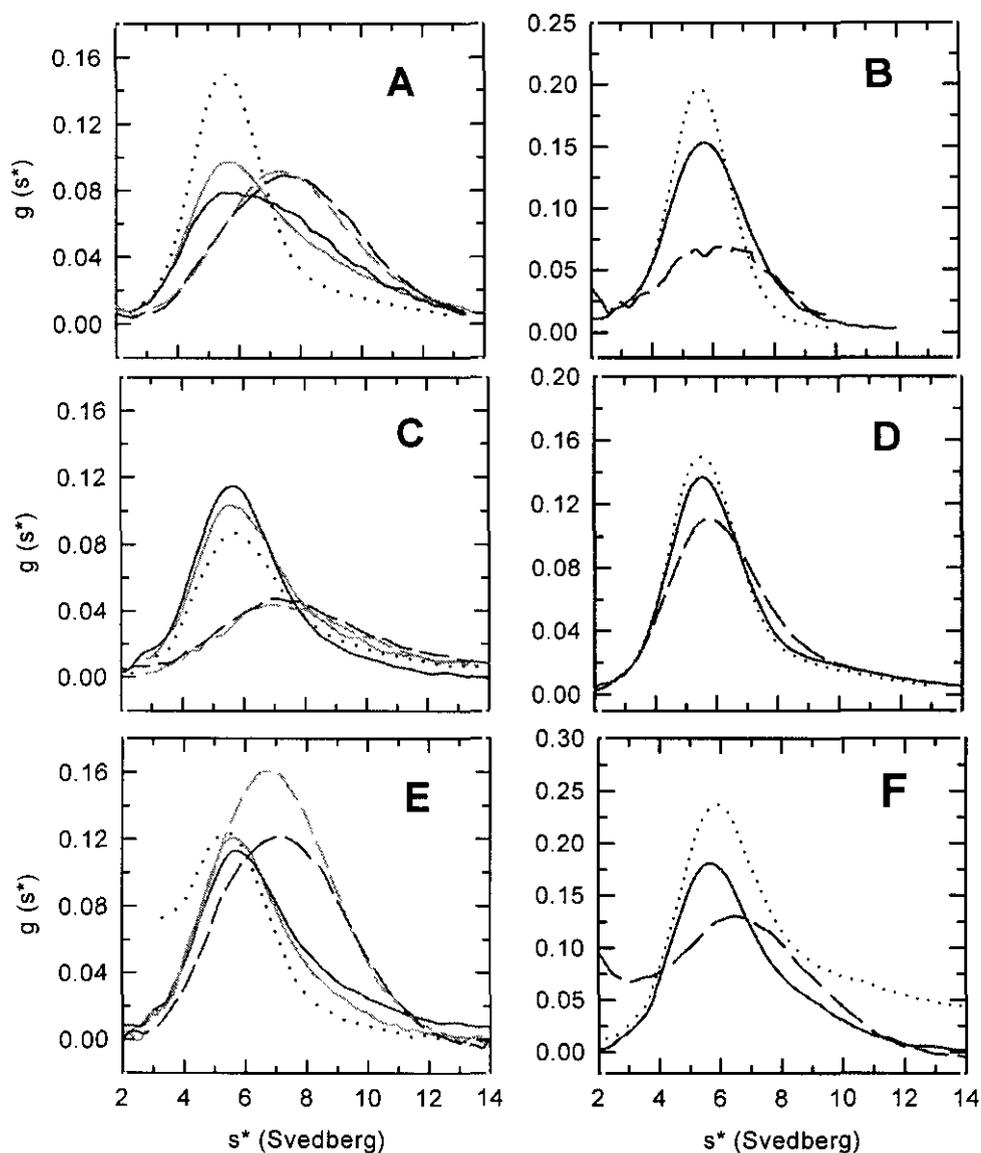


Figura 3.21.- Representaciones de $g(s^*)$ frente a s^* de experimentos de velocidad de sedimentación de tubulina con taxoides, en tampón PEDTA, GDP 20 μM , pH 7.0. Se tomaron cuatro perfiles consecutivos de sedimentación, del minuto 20 al minuto 35. Líneas de puntos, tubulina 20 μM a 295 nm (excepto panel B, tubulina 6 μM a 275 nm). Líneas continuas negras, tubulina 20 μM más taxoide 25 μM a 295 nm (excepto panel B, ambos a 6 μM , medidos a 275 nm). Líneas continuas grises, lo mismo con de docetaxel 50 μM . Líneas discontinuas negras, tubulina 20 μM más taxoide 25 μM (excepto panel B, ambos a 6 μM) a la longitud de onda del ligando fluorescente. Líneas continuas grises, lo mismo con docetaxel 50 μM . Panel A, tubulina con Flutax. Panel B, tubulina con Flutax 6 μM . Panel C, tubulina con 2' acetil Flutax. Panel D, tubulina con taxol (línea discontinua) o con docetaxel (línea continua) a 295 nm. Panel E, tubulina con Flutax 2. Panel F, tubulina con Flutax 3.

En la tabla 5 se muestran los coeficientes de sedimentación de la tubulina y de los ligandos por los dos métodos mencionados. De la observación de esta tabla y de las distribuciones de coeficientes de sedimentación (figura 3.21) podemos obtener las siguientes conclusiones:

- Los taxoides fluorescentes (activos o no) se unen a la tubulina no polimerizada. Esta unión no se desplaza por docetaxel, y no es debida a la parte fluorescente aislada del taxol.

- Los coeficientes de sedimentación de los taxoides fluorescentes (activos o no) en presencia de tubulina en la región del visible son mayores que a 295 nm por los dos métodos de cálculo empleados. Además, la distribución de los coeficientes de sedimentación muestra que el pico de $g(s^*)$ está alrededor de 7.5 S. Esto sugiere que los taxoides fluorescentes se unen de forma heterogénea a la tubulina, preferentemente a especies moleculares mayores que el dímero. Sin embargo, es difícil decir si el coeficiente de sedimentación medido en la región del visible es realmente el coeficiente de sedimentación de la especie molecular a la que se une el taxoide: si la unión de taxoide a tubulina es heterogénea (el taxoide se une a las especies de tubulina que sedimentan más rápido), y produce un cambio en su coeficiente de extinción (como hemos visto en el apartado 2.1 de Resultados), la disminución en el coeficiente de extinción de taxoide unido a especies de tubulina mayores al dímero puede provocar una deformación del frente de sedimentación en la región del visible que puede introducir un error en la estimación del coeficiente de sedimentación. Sin embargo, si la unión de taxoide fuese homogénea al dímero de tubulina no se detectaría ningún cambio en los coeficientes de sedimentación a las dos longitudes de onda. Cuando la tubulina está a una concentración menor (6 μM) no se observa esta disparidad en los coeficientes de sedimentación, lo que indica que el Flutax también se une al dímero de tubulina.

- Los taxoides fluorescentes aumentan el coeficiente de sedimentación medido a 295 nm. A esta longitud de onda, la absorción es debida tanto a la tubulina (aproximadamente un 80%) como al taxoide (aproximadamente un 20%). Por tanto, es difícil distinguir si este aumento en el coeficiente de sedimentación es debido a que los taxoides inducen una pequeña agregación en la tubulina, o simplemente a que los taxoides unidos a las especies de tubulina que sedimentan más rápido producen un aumento de absorción en posiciones radiales algo más avanzadas que el frente principal de la tubulina. Para comprobar esta segunda posibilidad

se estimó a partir de los perfiles de sedimentación a 495 nm y del espectro de absorción del Flutax la máxima contribución que tendría este taxoide a la absorción a 295 nm, y este valor se restó de los perfiles de velocidad a esta última longitud de onda. El coeficiente de sedimentación del espectro diferencia calculado por el segundo momento presentó un valor de 6.5 S.

- Por tanto, aunque de los resultados obtenidos no podemos afirmar que los taxoides aumenten la agregación de la tubulina, sí podemos apuntar que se unen a especies no definidas mayores que el dímero.

3.2.2.2.- Unión de taxoides a tubulina y microtúbulos de GDP tubulina

Se midió la unión de taxoides fluorescentes a tubulina en las mismas condiciones de los experimentos de velocidad de sedimentación. Para ello se diseñó un experimento de sedimentación en centrífuga preparativa que simulase las condiciones de la centrífuga analítica (ver Materiales y Métodos, apartado 5.2). En la figura 3.22 se muestran las isotermas de unión de taxoides a GDP tubulina en tampón PEDTA, GDP 20 μM , pH 7.0. En ellas se observa que los derivados fluorescentes se unen a la tubulina no ensamblada mucho más que el taxol, y que esta unión no se desplaza por docetaxel. Además, la unión de Flutax a la GDP tubulina es indistinguible de la de su derivado inactivo 2' acetil Flutax. El hecho de que esta unión no sea saturable en las condiciones de trabajo dificulta su análisis cuantitativo, pero puede describirse como una unión a sitios múltiples. Se sometieron a un ajuste según la ecuación (2.17) de la misma forma que en experimentos de unión a microtúbulos de MTP, salvo que para un sólo tipo de sitios (a los que llamamos n_2). Los resultados de este ajuste se muestran en la tabla 6.

En la isoterma de unión de taxoides a microtúbulos de GDP tubulina (figura 3.22) se observa que hasta una concentración de ligando libre de hasta 10 μM se comportan de manera similar al taxol, uniéndose una molécula de taxoide por molécula de proteína polimerizada, si bien la concentración libre de ligando a partir de la que se observa polimerización es menor para el taxol que para el resto de taxoides (taxol \angle Flutax 3 \sim Flutax 2 \angle Flutax). En esta región, la unión se desplaza por docetaxel. A partir de 10 μM de Flutax 2 y Flutax 3 libre, comienza la unión a sitios de baja afinidad.

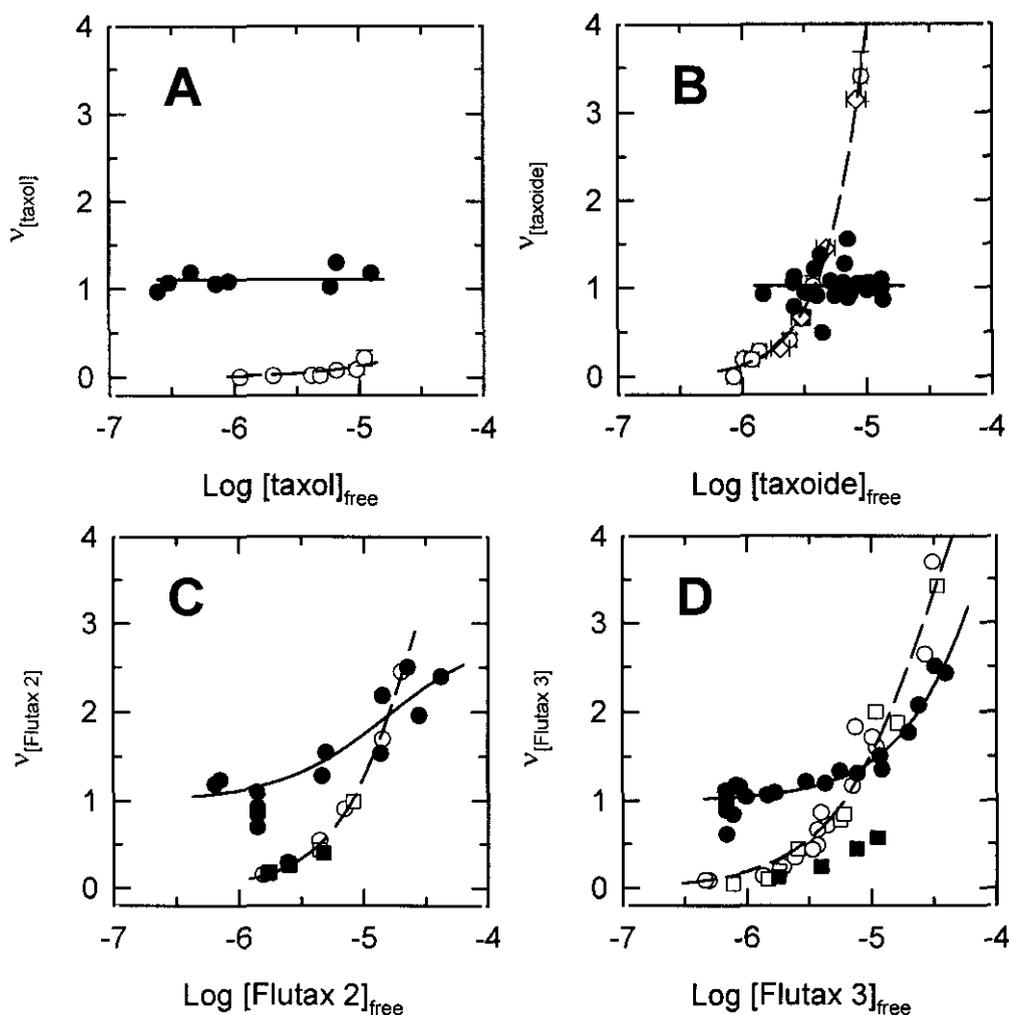


Figura 3.22- Unión de taxoides a GDP tubulina a 20° C (símbolos blancos) y a microtúbulos de GDP tubulina a 37° C (símbolos negros). Círculos, unión del taxoide indicado. Cuadrados, unión de taxoide en presencia de docetaxel 50 μM . Panel A, taxol. Panel B, Flutax y 2' acetil Flutax (rombos). Panel C, Flutax 2. Panel D, Flutax 3. Las líneas continuas representan el mejor ajuste a la unión a los microtúbulos según la ecuación (2.16), excepto en los paneles A y B, donde representan la media aritmética de los valores de v_{taxoide} . Las líneas discontinuas representan el mejor ajuste a la unión a tubulina. La unión a GDP tubulina se determinó en proteína equilibrada en tampón PEDTA, GDP 20 μM , pH 7.0, y se midió por sedimentación a 85000 rpm (280000 g) durante una hora a 20° C en un rotor TL100. La unión a microtúbulos se determinó sobre proteína en el mismo tampón más MgCl_2 7 mM, dejando polimerizar la tubulina 2 horas a 37° C y separando los microtúbulos de la proteína soluble por sedimentación a 50000 rpm (100000 g) en un rotor TL100 durante 10 minutos a 37° C.

Para estimar la unión a sitios de baja afinidad (n_2) de Flutax 2 y de Flutax 3, se realizó un ajuste de la ecuación (2.17) a los datos experimentales. Cuando se produce la polimerización de la GDP tubulina, el sitio de alta afinidad en los microtúbulos que se forman está completamente ocupado ($n_1=1$), por lo que se restó de todos los valores 1.0 (correspondiente a la unión a este sitio) y se ajustaron los valores correspondientes a la unión al sitio de baja afinidad a la ecuación (2.17). A la curva resultante del ajuste se le sumó 1.0, de modo que la curva representa $n_1 + n_2$. Los valores de n_1 , $n_2 \times K_{A2}$ y α_2 se muestran en la tabla 6:

	n_1	$n_2 K_{A2} (x10^6 M^{-1})$	α_2
Taxol, tubulina	(0)	0.015	(1)
Flutax, 2' acetil Flutax, tubulina	(0)	0.088	1.6
Flutax 2, tubulina	(0)	0.21	1.3
Flutax 2, microtúbulos	(1)	0.12	(1)
Flutax 3, tubulina	(0)	0.19	(1)
Flutax 3, microtúbulos	(1)	0.005	(1)

Tabla 6.- Valores del ajuste de la ecuación (2.16) a los datos de unión de taxoide a microtúbulos de GDP y a GDP-tubulina. En el caso de Flutax y Futax 2 unidos a tubulina no polimerizada, constreñir los coeficientes de Hill a 1.0 resultaba en un número de sitios de unión n_2 anormalmente alto.

De nuevo la unión de taxoide a tubulina no se satura en nuestras condiciones de trabajo, por lo que sólo podemos estimar el producto $n_2 K_{A2}$. En estos valores se observa un aumento con respecto a los valores de unión a los sitios de baja afinidad de microtúbulos de MTP, tanto para tubulina no polimerizada como para microtúbulos de GDP. Sin embargo, tanto el hecho de que para Flutax no se haya detectado unión a microtúbulos de GDP hasta las concentraciones libres ensayadas, como que los valores de $n_2 K_{A2}$ para Flutax 2 y Flutax 3 disminuyan con el ensamblaje, sugieren que la polimerización reduce la unión de taxoides a sitios de baja afinidad.

4.-Discusión

4.1.- TAXOIDES FLUORESCENTES COMO SONDAS DEL SITIO DE UNIÓN DE TAXOL.

El taxol es una de las drogas antimitóticas más estudiadas en la actualidad, tanto desde el punto de vista clínico (D'Andrea y Seidman, 1997) como en la caracterización de efectos en líneas celulares (Tores y Horwitz, 1998) y aproximaciones por métodos bioquímicos y biofísicos (Derry *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1998). A pesar de este estudio exhaustivo el mecanismo molecular por el cual el taxol induce y estabiliza la polimerización de la tubulina en microtúbulos permanece desconocido.

Una de las limitaciones que presenta la molécula de taxol para el estudio de su interacción con la tubulina es que presenta su máximo de absorción en el mismo rango espectral de las proteínas, por lo que resulta imposible seguir espectrofotométricamente a la tubulina y al taxol por separado cuando están interaccionando entre sí.

En este sentido, unos taxoides marcados fluorescentemente, que por lo tanto absorban en un rango espectral distinto al de la tubulina, pueden ser una valiosa herramienta para el estudio de la unión del taxol a la molécula de tubulina.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de actuar como sondas del sitio de unión del taxol de una serie de derivados fluorescentes obtenidos mediante adición covalente de una molécula fluorescente a la posición 7 de esta droga.

4.1.1.- Polimerización de microtúbulos inducida por taxoides fluorescentes.

El Flutax, el Flutax 2, el Flutax 3 y el Rotax inducen la polimerización de la tubulina en su forma inactiva (GDP tubulina). Todos ellos se unen con una estequiometría de 1:1 competitivamente con el taxol a su sitio de unión. Las propiedades termodinámicas del ensamblaje de GDP tubulina con taxoide fluorescente son similares a las del ensamblaje inducido por taxol. La interacción preferencial de los microtúbulos inducidos por taxoide fluorescente con protones es similar, y a su vez diferente a la de los microtúbulos polimerizados a partir de GTP tubulina en tampones más favorables al ensamblaje (Díaz *et al.*, 1993). Sin embargo, los microtúbulos ensamblados con taxoides fluoresceïnados

incorporan un catión de Mg^{2+} adicional por molécula de tubulina en el proceso de ensamblaje con respecto a los inducidos por taxol.

La acetilación del grupo 2' hidroxilo del taxol en el Flutax hace que, del mismo modo que sucede con el taxol, el derivado obtenido sea inactivo. Aunque la fluoresceína se ha enlazado a la posición 7 del taxol, que se encuentra lejos de la parte de la molécula que se une a la tubulina, un espaciador más largo entre el taxol y la fluoresceína reduce significativamente la afinidad de la droga resultante (HexaFlutax) por el sitio de unión específico del taxol y hace que sea incapaz de inducir la polimerización de la GDP tubulina, aunque es capaz de unirse a microtúbulos de MTP ensamblados previamente a la adición de taxoide.

En la literatura se han descrito otras series de derivados fluorescentes del taxol. Sengupta *et al.* (1995; 1997) sintetizaron taxoides fluorescentes mediante la introducción de grupos dimetil amino en los anillos de benzoilo en posiciones 2, 3' y N unido a 3'. Además, unieron grupos dimetil amino benzoil a las posiciones 7 y 10. Estos análogos presentan máximos de absorción a longitudes de onda entre 270 y 340 nm, es decir, más cerca del espectro de la proteína que los taxoides fluorescentes descritos en este trabajo. Curiosamente, el análogo sustituido en 7 es el menos efectivo en inducir ensamblaje de tubulina. El ensayo de polimerización de tubulina asistido por taxoide es menos riguroso que el utilizado en este trabajo: se muestra sólo el porcentaje de tubulina que queda sin polimerizar tras 15 minutos de ensamblaje de GTP tubulina en presencia de taxoide.

Han *et al.*, (1996) sintetizaron un análogo fluorescente del taxol mediante la introducción de un grupo amino en el grupo benzoilo en posición 2 del taxol, lo que hace que la molécula presente un máximo de absorción a 320 nm. Para comparar su actividad en ensamblar microtúbulos *in vitro* con la del taxol se mide el aumento de turbidez debido al ensamblaje de GTP tubulina, detectándose que la máxima inducción de ensamblaje ocurre a una relación de 3 moléculas de taxoide fluorescente por molécula de tubulina, lo que indica que los taxoides son menos activos que el taxol en la inducción del ensamblaje de la tubulina, pero ofrece ninguna medida de la constante de elongación de los microtúbulos ni de la estequiometría aproximada de unión de drogas al microtúbulo .

Guy *et al.*, (1996) siguieron una estrategia similar a la descrita por Souto *et al.* (1995),

y sintetizaron una serie de taxoides mediante la unión de moléculas fluorescentes a una β -alanina en posición 7 del taxol. La actividad de los compuestos resultantes se midió por el aumento que producían en el ensamblaje de proteína microtubular. En el trabajo no se menciona si son capaces de ensamblar tubulina en condiciones en las que no ensamble por sí misma. En el presente trabajo se evalúa la capacidad de el β -sulforotax, que es el taxoide fluorescente de mayor actividad de la serie, en ensamblar la GDP-tubulina, siendo el resultado negativo. Su baja solubilidad ha impedido medir adecuadamente su unión a proteína microtubular.

Por último, Rao *et al.* (1998) han sintetizado dos derivados fluorescentes del taxol, uniendo isotiocianato de fluoresceína y sulforodamina a la posición 7 del taxol mediante un espaciador de ácido 6(N-tercbutoxicarbonil) aminocaproico. En su trabajo se realizan estudios de citotoxicidad de los taxoides obtenidos, pero no se analiza la capacidad de los mismos de ensamblar microtúbulos *in vitro*.

4.1.2.- Microscopía electrónica de microtúbulos inducidos por taxoide.

Se comprobó por microscopía electrónica si la introducción de un sustituyente del tamaño de la fluoresceína o de la rodamina en la posición 7 del taxol puede afectar a la estructura del polímero formado. Para ello se observaron microtúbulos de GDP tubulina ensamblados con taxoides fluorescentes, y se compararon con los ensamblados con taxol.

Sorprendentemente, los microtúbulos ensamblados con taxoides fluorescentes presentan al menos dos protofilamentos más que los inducidos por taxol. La mayoría de los microtúbulos de taxol eran de 12 o 13 protofilamentos, mientras que los inducidos por taxoides fluorescentes presentaban 15 o 16 protofilamentos. Los microtúbulos de estas dimensiones no son frecuentes en la naturaleza, aunque son característicos de los axonemas de algunas especies de insectos (Lanzavecchia *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1997). El cambio en el número de protofilamentos del microtúbulo inducido por taxoide ya ha sido detectado entre el taxol y el derivado más soluble docetaxel (Andreu *et al.*, 1994; Díaz *et al.*, 1998), aunque en el caso de los taxoides fluorescentes la adición de al menos 2 protofilamentos implica una mayor distorsión de la red microtubular, y el cambio en el número de comienzos de hélice S

de 3 a 4 (Wade y Chrétien, 1993).

El cambio en el número de protofilamentos inducido por taxol está ligado a la unión de la cadena lateral del mismo (Andreu *et al.*, 1994). En el caso de los taxoides fluorescentes, el fluoróforo está sobre la posición 7 del taxol, supuestamente lejos de su sitio de unión (ver apartado 7.1 de la Introducción), pero aparentemente interacciona lo suficiente con la pared microtubular para inducir un cambio notable en el número de protofilamentos. Sería interesante comprobar si la presencia de un espaciador entre el taxol y la molécula fluorescente influye en el cambio en el número de protofilamentos, ya que nos daría mayor información sobre el sitio de unión en el taxol a la tubulina. El HexaFlutax no induce la polimerización de GDP tubulina, pero se une específicamente a microtúbulos de MTP, por lo que puede usarse en un medio más favorable a la polimerización (con GTP, glicerol), y comprobar si también afecta al número de protofilamentos. Otra opción sería sintetizar un derivado de HexaFlutax con Flutax 2 o Flutax 3 como cromóforos, y ver si éstos tienen una mayor actividad.

4.1.3.- Tinción de microtúbulos *in vitro* con taxoides fluorescentes.

Una de las aplicaciones más inmediatas que pueden tener unas sondas fluorescentes del sitio de unión del taxol es su capacidad para teñir fluorescentemente de modo específico microtúbulos obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* sin necesidad de emplear marcadores que puedan interferir con el sistema. Para evaluar la utilidad de los derivados de taxol descritos en este trabajo en este sentido, se visualizaron microtúbulos ensamblados *in vitro* en un microscopio de epifluorescencia.

Se han observado microtúbulos de GDP tubulina ensamblados con Flutax y Rotax, encontrándose en ambos casos que a lo largo del tiempo los microtúbulos se organizan espontáneamente en haces densos, que pueden estar relacionados con los haces de microtúbulos celulares descritos en la literatura (Roberts *et al.*, 1989). Este nivel de organización tiene lugar sin la intervención de proteínas motoras requeridas para la formación de ásteres (Heald *et al.*, 1996; Nédelec *et al.*, 1997). También se han observado con ambos taxoides disposiciones radiales semejantes a los ásteres de microtúbulos inducidos por el taxol

en las células (Roberts *et al.* 1989), aunque con las condiciones ensayadas no podemos distinguir si estas formaciones se han originado por simple adhesión de microtúbulos a núcleos de agregación de tubulina.

Los taxoides fluorescentes también se han usado para teñir fluorescentemente microtúbulos de proteína microtubular ensamblados previamente a la adición de taxoide, lo que demuestra que las MAPs no impiden la unión de taxoides fluorescentes al microtúbulo preformado. Esta unión es específica al sitio de unión del taxol, ya que se desplaza completamente por el análogo de taxol docetaxel. Además, se ha demostrado que Flutax tiñe homogéneamente microtúbulos de proteína microtubular en un tiempo inferior a un minuto.

4.1.3.1.- Aplicaciones y perspectivas de la visualización de microtúbulos con taxoides fluorescentes.

El hecho de que los taxoides fluorescentes se unan a microtúbulos de proteína microtubular es un buen indicador de que se pueden unir a microtúbulos celulares. En este laboratorio se han visualizado específicamente con Flutax microtúbulos en células permeabilizadas PtK2 (células de epitelio de riñón de rata canguro *Potorus tridactylus*). Además, Flutax es capaz de teñir centrosomas más intensamente que los anticuerpos contra α - y β -tubulina, lo que indica que los centrosomas pueden ser un blanco adicional de la acción del taxol. También se han obtenido imágenes de red microtubular teñidas específicamente con Flutax mediante incubación de líneas celulares PtK2, células monocíticas de leucemia humano U937 y células de neuroblastoma de ratón con concentraciones subinhibitorias de Flutax, seguida de eliminación del exceso de medio de cultivo (ver figura 4.1). La tinción obtenida en estas imágenes es debida principalmente a la entrada de Flutax residual por ruptura de la membrana plasmática durante el montaje. Sin embargo, se han observado tanto microtúbulos citoplasmáticos como de huso mitótico en células vivas, mediante incubación de células monocíticas de leucemia humano con Flutax 15 nm durante 16 horas (Evangelio *et al.*, 1998). El Flutax 2 también se ha usado para visualizar microtúbulos en células vivas (Miguel Abal e Isabel Barasoáin, comunicación personal), por lo que ambos derivados pueden ser una poderosa herramienta para estudiar el efecto de distintas drogas sobre la evolución del

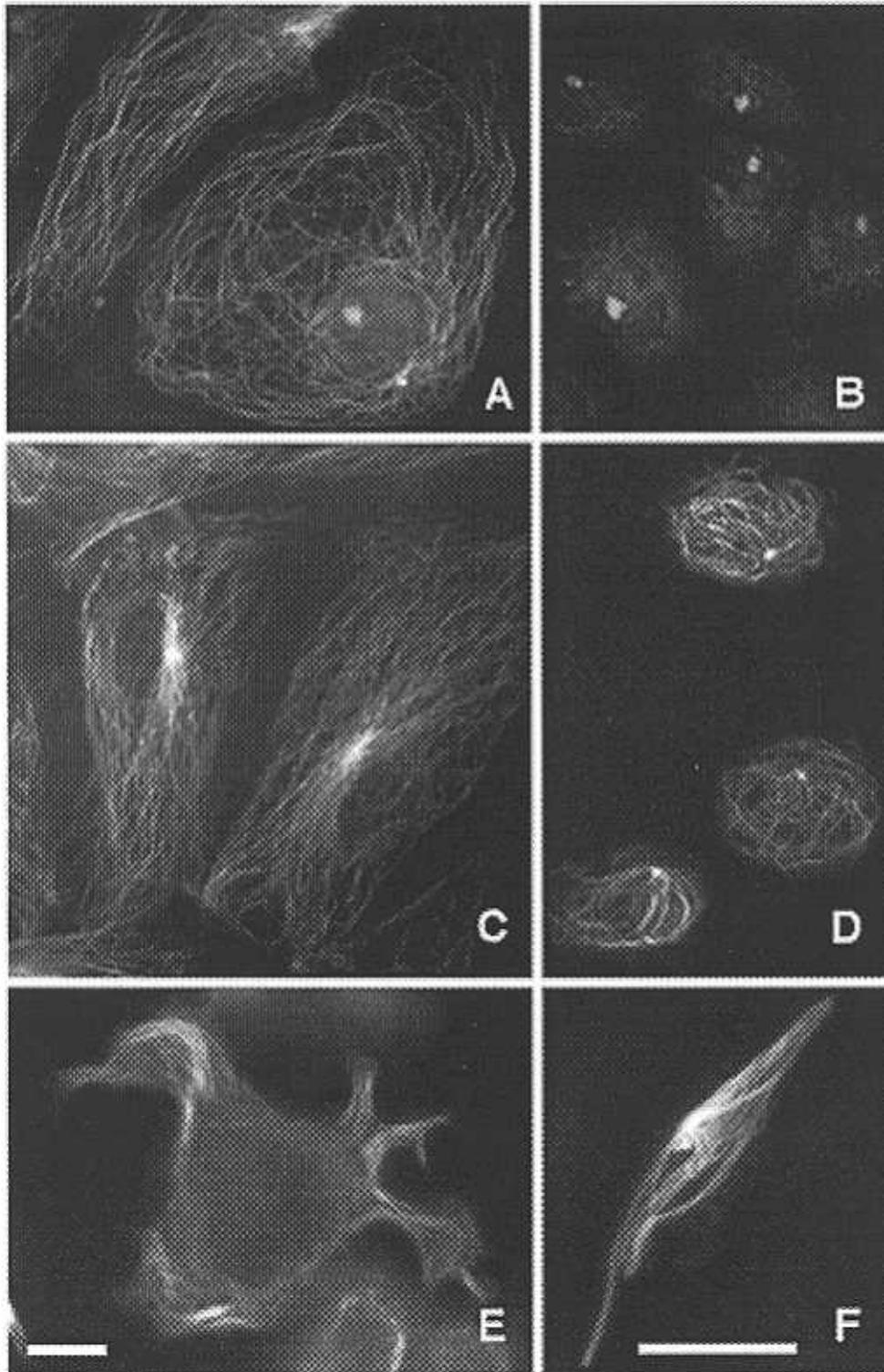


Figura 4.1.- Visualización específica de microtúbulos celulares con Flutax. A: células PtK2 permeabilizadas incubadas con Flutax 1 μM durante una hora. B, lo mismo que A, tras la adición de docetaxel. C, células PtK2 incubadas con Flutax 0.5 μM durante 20 horas y montadas directamente. D, células U937 incubadas con Flutax 37 nm durante 16 horas. E, células de neuroblastoma de ratón incubadas con Flutax 1 μM durante 2 horas. F, epimatigotes de *Trypanosoma cruzi* incubadas durante 3 horas con Flutax 1 μM . Las barras en E (para A-E) y F corresponden a 10 μm .

citoesqueleto en líneas celulares creciendo. Actualmente se están usando tanto el Flutax otros derivados fluorescentes para localizar nuevas dianas del taxol en la célula.

4.1.4.- Unión de taxoides fluorescentes a microtúbulos.

4.1.4.1- Sitios de unión de taxoides a microtúbulos.

Las observaciones de microscopía de fluorescencia prueban que los taxoides fluorescentes se unen específicamente a los microtúbulos de MTP, lo que los convierte en unas potenciales sondas del sitio de unión del taxol a los microtúbulos preformados. Para completar la caracterización biofísica de los taxoides es interesante comprobar si la unión de los taxoides fluorescentes se comporta de manera similar a la del taxol, y estimar las constantes de equilibrio de asociación de cada uno de ellos a su sitio de unión.

Se ha medido la afinidad relativa de los taxoides fluorescentes por el sitio de unión específico del taxol mediante dos métodos distintos. En el primero, se ha medido directamente la unión del taxol y de sus análogos fluorescentes a microtúbulos de MTP, y se ha expresado en función del taxoide libre. En el segundo se ha medido el desplazamiento de un taxoide de su sitio específico por el resto, y se ha expresado el resultado tanto en función del taxoide libre como en función del taxoide total añadido.

La constante de equilibrio de asociación de taxol a microtúbulos de proteína microtubular está en el orden de 10^6 M^{-1} , (constante de disociación del orden de micromolar) independientemente del método usado para estimarla. Esta constante está de acuerdo con la calculada por Parness y Horwitz (1981) para microtúbulos de MTP, aunque es significativamente menor que la que detectaron Caplow *et al.* (1994) para microtúbulos de GMPCPP tubulina y GTP tubulina. Esta diferencia en los valores publicados puede ser debida a la presencia de MAPs: cuando mide la cinética de asociación/disociación del Flutax para la MTP se obtienen valores distintos de K_A que para microtúbulos de glicerol (J. F. Díaz, comunicación personal).

En la observación de las curvas de unión de taxoide a MTP en función de concentración de ligando libre se observa la presencia de dos sitios de unión de taxoide a los

microtúbulos. Uno de ellos presenta una estequiometría de aproximadamente una molécula de taxol por molécula de tubulina, y es el sitio específico descrito para el taxol en los microtúbulos. La otra clase de sitios es no específica (no desplazable por docetaxel), y aparentemente no saturable en nuestras condiciones de medida, por lo que resulta difícil una caracterización más precisa. Las constantes de equilibrio de asociación por ambos tipos de sitio están separadas al menos dos órdenes de magnitud para la mayor parte de los taxoides. En el taxol también se observa unión al sitio de baja afinidad a concentraciones libres de taxol por encima de 10 μM (antes en ausencia de glicerol), aunque mucho menor que para los taxoides fluorescentes.

Este método de medida de constantes de asociación nos ha permitido distinguir dos tipos de sitio de unión (describir el sistema), determinar las constantes de asociación del sitio específico y al menos acotar el orden de magnitud del segundo tipo de sitio. La desventaja que tiene este método es que se precisa separar los microtúbulos de la tubulina soluble, y determinar las concentraciones de proteína y de ligando en las dos fracciones (aunque ambas medidas pueden hacerse sobre la misma muestra).

Una vez caracterizado el sistema, se quiso diseñar un método más general que nos permitiera medir las constantes de asociación por el sitio de alta afinidad en función de concentraciones de proteína y de ligando total añadido. Para ello se desplazó el Rotax de su sitio de unión por el resto de los taxoides. La principal limitación que presenta este método aplicado a estos ligandos es que se debe trabajar a concentraciones muy bajas de proteína y de ligando y a baja fracción de saturación de sitios para evitar la interferencia de la unión al segundo tipo de sitios, por lo que la dispersión de los datos es mayor que en el caso anterior. Se obtienen valores de constantes de asociación del mismo orden de magnitud que las obtenidas por el método directo, pero no se observan diferencias entre las de taxol, Flutax 2 y Rotax.

Estas medidas de unión de derivados fluorescentes del taxol a microtúbulos ayudan a describir mejor el sistema que las medidas de afinidades relativas de otros taxoides existentes en la literatura. Sengupta *et al.* (1996; 1997) realizaron un ensayo de competición en el que se ordena la afinidad de los taxoides fluorescentes por el porcentaje de taxol unido a microtúbulos que desplazan. No se hace estequiometría de unión de ninguno de ellos, por

lo que ofrecen solo una visión parcial de lo que ocurre en el sistema. En cambio, Han *et al.* (1996) detectan al menos dos tipos de sitios de unión del 2-AB-PT a los microtúbulos, uno con estequiometría 0.8 ± 0.1 desplazable por docetaxel y otro de menor constante de unión con estequiometría de 1.3 ± 0.1 .

4.1.4.2.- Cambios espectroscópicos asociados a la unión de taxoides a microtúbulos.

Todos los derivados se han sintetizado con la molécula fluorescente en la posición 7 del taxol, que supuestamente se encuentra lejos del sitio de unión de la molécula a la tubulina. Sin embargo, tanto el Flutax como sus derivados más solubles Flutax 2 y Flutax 3 han resultado ser sondas sensibles al microentorno en el que se encuentran.

Los espectros de absorción de los tres taxoides experimentan un desplazamiento acusado hacia longitudes de onda mayores en la posición de su máximo de absorción tras su unión al microtúbulo. Además, el Flutax sufre un desplazamiento de -0.2 unidades de pH en su pKa aparente de ionización de la forma monoaniónica a la dianiónica cuando se une al microtúbulo. Esto indica un microentorno catiónico en las proximidades de la fluoresceína, que puede ser debido a la presencia de residuos básicos a la tubulina o a la presencia de un catión. Dado que los microtúbulos ensamblados con taxoides fluorescentes incorporan un ión adicional de Mg^{2+} por molécula de proteína polimerizada, este catión puede estar unido a la molécula de fluoresceína. El Flutax, a su vez, experimenta un aumento en su coeficiente de extinción debido a un aumento en la proporción del dianión, mientras que Flutax 2 y Flutax 3 experimentan una disminución en su coeficiente de extinción. Curiosamente, la presencia de glicerol 3.4 M en el tampón induce en los tres taxoides cambios en la posición del máximo de absorción y en la relación entre valores de absorción en el máximo y en el hombro muy similares a los inducidos por la unión a los microtúbulos.

En la literatura ya se han descrito desplazamientos batocrómicos del dianión de la fluoresceína cuando se une a proteínas. Mummert y Voss (1995) detectaron cambios en la posición del máximo de absorción del dianión de la fluoresceína a pH 8.0 cuando se conjugaba covalentemente con distintas proteínas. Klonis *et al.* (1998) detectaron desplazamientos hacia longitudes de onda mayores del máximo de absorción del espectro de

la fluoresceína cuando ésta se unía a anticuerpos mono y policlonales, siendo este desplazamiento más pronunciado cuanto mayor era la afinidad del anticuerpo por la fluoresceína.

Por otra parte, Klonis *et al.* (1998) también estudiaron los cambios en la posición del máximo de absorción del espectro del dianión de la fluoresceína cuando ésta se encontraba en mezclas de agua con distintos solventes. Estos cambios se correlacionaban con los valores α y β de Kamlet y Taft (1976) que dan una escala de capacidad de distintos solventes de actuar como donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, respectivamente. Los valores de λ_{MAX} se desplazaban hacia el rojo y los coeficientes de extinción molar disminuían al aumentar el valor β de los solventes. Estos autores sugirieron que la formación de puentes de hidrógeno podría jugar un papel importante en estos cambios: la fluoresceína actúa como aceptor de puentes de hidrógeno en presencia de donadores de puentes de hidrógeno como el agua. Cuando la fluoresceína se disuelve en mezclas de distintos cosolventes con agua, los solventes actúan provocando una disminución en el número y/o en la fuerza de los puentes de hidrógeno que forma la fluoresceína, produciendo un desplazamiento hacia el rojo con respecto al H₂O. El desplazamiento hacia el rojo del espectro cuando la fluoresceína se une a anticuerpos estaría provocado por una disminución en la formación de puentes de hidrógeno en la zona de la molécula que se une a la proteína.

Por lo tanto, los cambios que sufren los espectros de las moléculas fluorescentes tras su unión al microtúbulo pueden indicar un cambio en el número o la intensidad de los puentes de hidrógeno que forma la fluoresceína, aunque no podemos descartar otros efectos. El estudio de los cambios espectroscópicos de Flutax, Flutax 2 y Flutax 3 libres y unidos a microtúbulos en distintos solventes, en comparación con los posibles cambios que pudieran detectarse en taxoides con un espaciador mayor entre el taxol y el fluoróforo puede aportar más información para explicar estos cambios.

4.1.4.3.- Aplicaciones y perspectivas.

4.1.4.3.1.-Taxoides fluorescentes como herramientas para localizar el sitio de unión del taxol.

Durante el transcurso de esta tesis doctoral se ha propuesto un modelo de estructura tridimensional de tubulina (Nogales *et al.* 1997) a partir de hojas de Zn estabilizadas con taxol. En este modelo, la molécula de taxol se une a la β -tubulina en la cara interna de la pared del microtúbulo (ver apartado 7.2 de la Introducción). Sin embargo, diversas evidencias experimentales contradicen aparentemente esta situación del taxol. Experimentos de intercambio de taxol unido a los microtúbulos por un exceso de su análogo docetaxel, y viceversa, muestran que la vida media de intercambio entre los dos ligandos y el cambio en el número de protofilamentos inducido por la unión de taxol tienen lugar en un minuto (Díaz *et al.*, 1998), lo que indica que el sitio del taxol se encuentra bastante accesible al solvente.

En la visualización de microtúbulos de proteína microtubular con Flutax, se observa la tinción de los microtúbulos preformados antes de un minuto después de la adición del taxol. La explicación más simple de este resultado es que el sitio de unión del taxol se encuentra en la pared exterior del microtúbulo. Si el sitio estuviese en la parte interior, las moléculas de taxol tendrían que i) pasar a través de los extremos del microtúbulo y difundir desde los extremos hacia el centro hasta unirse a los sitios vacíos disponibles, o bien ii) acceder al interior gracias a crecimientos y decrecimientos del microtúbulo debidos a la inestabilidad dinámica, o iii) a través de poros o aperturas en la pared microtubular.

Para examinar la primera posibilidad, se estimó el tiempo mínimo requerido para marcar la pared interna de los microtúbulos por moléculas de Flutax difundiendo desde los extremos hacia el interior del mismo. Para ello se asumió que la unión rápida e irreversible de Flutax a la pared está limitada únicamente por la difusión del ligando, y se aplicó la ley de Fick, que relaciona el transporte neto de masa a través la unidad de superficie con la concentración de soluto y con la distancia recorrida x . (Cantor y Schimmel, 1986, pags. 570-579). Igualando el número de moléculas unidas a un corte del microtúbulo de espesor dx al número de moléculas que difunden en el tubo durante un intervalo de tiempo dt , y asumiendo un gradiente lineal de concentración de Flutax libre, se llega a una expresión que relaciona el tiempo requerido para que el frente de unión de Flutax se desplace desde el extremo del tubo a una posición x . Aplicando esta expresión, se obtiene que las moléculas de Flutax en nuestras condiciones de visualización de microtúbulos de MTP tardarían al menos

cuatro minutos en teñir un microtúbulo de 10 μm de longitud (Evangelio *et al.*, 1998). Otros cálculos de difusión de taxol a lo largo del microtúbulo por un grupo diferente al nuestro (Odde, 1998) también arguyen contra la posibilidad de que el taxol alcance su sitio de unión por difusión desde los extremos del microtúbulo. La posibilidad de que el Flutax acceda a la cara interna gracias a una rápida despolimerización y posterior ensamblaje con taxol debido a la inestabilidad dinámica de los microtúbulos es también poco probable, ya que las MAPs suprimen la inestabilidad dinámica (Horio y Hotani, 1986).

La explicación más sencilla que compatibiliza la unión rápida de Flutax a los microtúbulos con el modelo de estructura tridimensional de tubulina es que el taxol accede al lumen del microtúbulo a través de poros en la pared microtubular, como los que se han detectado en la estructura a baja resolución de los microtúbulos (Lanzavecchia *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1997, 1998; ver figura 1.3). Otra posibilidad es que el taxol acceda al lumen del microtúbulo a través de aperturas transitorias en su pared (Díaz *et al.*, 1998) En este caso, el interior del microtúbulo podría ser un compartimento funcionalmente importante, interviniendo junto con la cara externa de la pared en la regulación de su dinámica.

Actualmente se están usando los taxoides fluorescentes para medir la velocidad de unión de Flutax al microtúbulo mediante fluorescencia con resolución temporal. Dado que el Flutax sufre un cambio en su pKa aparente cuando se une al microtúbulo, su espectro de absorción experimenta un aumento significativo del coeficiente de extinción, debido a la mayor proporción del dianión cuando el ligando se une al microtúbulo. Este aumento del coeficiente de extinción se traduce en un aumento de la intensidad de fluorescencia, que se está usando para medir la velocidad de unión de Flutax microtúbulos preformados. A partir de esta velocidad, se puede estimar si los poros presentes en la pared microtubular son suficientemente grandes para permitir la entrada de Flutax en el lumen del microtúbulo en el tiempo calculado para la unión del taxoide a su sitio.

4.1.4.3.2.- Uso de taxoides fluorescentes para medir constantes de unión de ligandos al sitio de unión del taxol.

Recientemente se han descrito nuevos ligandos del sitio de unión del taxol (epotilonas

A y B, discodermolida, ver apartado 7.3 de la Introducción). Se ha descrito que las epotilonas inhiben la unión de taxol a los microtúbulos, por lo que sería interesante describir la unión de estos nuevos ligandos al sitio de unión de taxol.

En este trabajo se han medido las constantes de equilibrio de asociación de la mayor parte de los taxoides fluorescentes a la tubulina. Por otro lado, hemos visto cómo el coeficiente de extinción aparente de Flutax aumenta cuando se une al microtúbulo. Además, se ha descrito que la anisotropía de fluorescencia de Flutax aumenta en un orden de magnitud cuando se une a los microtúbulos (Evangelio *et al.*, 1998). Estos cambios permiten medir espectrofotométricamente el porcentaje de taxoide unido y taxoide libre, sin necesidad de separar el material polimerizado y la proteína y taxoide libres por sedimentación. Por lo tanto, los taxoides fluorescentes pueden usarse para medir las afinidades relativas de otros ligandos que se unan al sitio de unión de taxol mediante un experimento sencillo de competición, en el que un ligando del sitio de unión del taxol no fluorescente (ligando competidor) desplazase de su sitio a un taxoide fluorescente a concentración total constante (ligando trazador). La medida de aumento de intensidad o de anisotropía de fluorescencia del taxoide fluorescente nos daría la concentración de trazador desplazado. El análisis de la competición podría realizarse como se ha descrito en el apartado 6.3.3 de Materiales y Métodos en función de la concentración total de ligando añadido, lo que nos daría con bastante aproximación la constante de equilibrio de asociación del ligando no fluorescente al sitio de unión de taxol.

4.2.-DIFERENCIAS ENTRE LA UNIÓN DE TAXOIDES FLUORESCENTES A TUBULINA Y A MICROTÚBULOS.

4.2.1.- Cambios espectroscópicos de los taxoides fluorescentes.

El cambio que se detecta en el espectro de absorción de los taxoides fluorescentes cuando se unen a la tubulina es distinto al que ocurre cuando se unen a los microtúbulos. El desplazamiento hacia el rojo de la posición de sus máximos de absorción y la disminución de sus coeficientes de extinción aparentes son mayores. Estos cambios detectan un tipo de fenómenos distintos a los que ocurren cuando los taxoides fluorescentes se unen al

microtúbulo, al tiempo que nos sirven de indicador del estado de polimerización de la proteína presente en la solución.

Los cambios en el espectro de absorción de derivados de taxol tras su unión a microtúbulos y a tubulina no polimerizada ya han sido descritos para los taxoides fluorescentes mencionados anteriormente. (Guy *et al.*, 1996; Sengupta *et al.*, 1996,1997). En los dos tipos de derivados se detectan cambios en el espectro de absorción o emisión de los taxoides cuando se unen a los microtúbulos, indicativos de un entorno apolar cerca de las posiciones 2, N y 3' y que las posiciones 7 y 10 están en un entorno menos hidrofóbico (Sengupta *et al.*, 1997). También se describen cambios en espectro de fluorescencia de los ligandos en presencia de tubulina en condiciones de no ensamblaje (Sengupta *et al.*, 1995, 1997) o a tubulina-colchicina (Han *et al.*, 1996). Los cambios detectados en taxoides fluorescentes sustituidos en 2 y 3' son los que en presencia de microtúbulos. Sin embargo, los taxoides fluorescentes con sustituyentes en posiciones 7 y 10 (Sengupta *et al.*, 1997) presentan cambios en su espectro de fluorescencia cuando se unen a microtúbulos distintos a los que se detectan cuando se unen a tubulina soluble, lo que indica que las sustituciones en estas posiciones son más indicadas para caracterizar cambios en el microentorno del sitio de unión del taxol a la proteína.

Ninguno de los dos grupos ha medido la unión de taxoides fluorescentes a la tubulina no polimerizada. El hecho de que la unión a tubulina no se desplace por taxol se achaca a que las afinidades de los taxoides por microtúbulos y por proteína no polimerizada están muy separadas y a que los sitios de unión no están saturados. Sengupta *et al.* (1997) cuestionan si el sitio de unión es el mismo para tubulina no polimerizada que para la tubulina ensamblada.

Se ha propuesto que la incorporación al microtúbulo del dímero de tubulina provoca un cambio conformacional en el sitio de unión del taxol que aumenta la afinidad de la tubulina por la droga (Díaz *et al.*, 1993). Es difícil saber si los diferentes cambios observados en los diferentes taxoides fluorescentes unidos a tubulina o a microtúbulos corresponden a un cambio conformacional del sitio de unión tras el ensamblaje o a la unión del taxoide a un sitio inespecífico diferente.

4.2.2.- Unión de taxoides fluorescentes a tubulina.

Para caracterizar la unión de los taxoides fluorescentes por la tubulina se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación, que mostraron que todos los taxoides fluorescentes probados, activos o no, se unen de forma heterogénea a la tubulina soluble, preferentemente a formas de tubulina no determinadas mayores que el dímero. Las evidencias experimentales de que la unión de 2' acetil Flutax (que tiene modificado el grupo 2' hidroxilo del taxol, implicado en la unión con la tubulina (Jiménez-Barbero *et al.*, 1998)) y de que la presencia de docetaxel no afecta a esta unión, indican que esta unión es inespecífica.

Para medir la afinidad de los taxoides por la tubulina no polimerizada se realizaron experimentos de unión de ligando a tubulina en las mismas condiciones en que se hizo la velocidad de sedimentación. En los taxoides analizados se observa una unión a un número indeterminado de sitios en el dímero de tubulina con constantes de asociación mayores que para el sitio de baja afinidad (sitio inespecífico) de los microtúbulos, lo que indica que bien el ensamblaje en microtúbulos, o bien la presencia de MAPs dificultan la unión de los taxoides a la proteína.

Para distinguir entre estos efectos se midió la unión de taxoides a microtúbulos de GDP tubulina. En las curvas de unión se observa que el taxol y el Flutax se unen a un sólo sitio hasta las concentraciones libres ensayadas, mientras que Flutax 2 y Flutax 3 muestran una unión no específica. El ajuste a un modelo de unión a múltiples sitios con la misma constante de asociación calculada para la tubulina soluble muestra una disminución en el producto nK_A . Estas dos evidencias demuestran que el ensamblaje en microtúbulos, aun en ausencia de MAPs, dificulta la unión de taxoides a los sitios de baja afinidad. Esta disminución de la unión de taxoide a sitios de baja afinidad asociada a la polimerización puede deberse a la oclusión de los sitios por los contactos laterales entre subunidades de tubulina, o bien a una modificación en la afinidad de los taxoides fluorescentes por la tubulina polimerizada.

Por otro lado, dado que la tubulina sufre una pequeña agregación por desnaturalización en ausencia de Mg^{2+} , y que la velocidad de sedimentación muestra que los taxoides fluorescentes se unen preferiblemente a especies mayores que la tubulina, parecen indicar que los taxoides fluorescentes se unen preferiblemente a tubulina parcialmente desnaturalizada. Además, un experimento preliminar (no mostrado) de polimerización de GDP tubulina sometida a las mismas condiciones que las del experimento de unión de taxoide a tubulina no

polimerizada indica que la unión del taxoide fluorescente induce una desnaturalización en la tubulina. Todo esto parece indicar que la protección que el ensamblaje ejerce sobre de la unión de taxoides fluorescentes a GDP tubulina es debida simplemente a la estabilización de la proteína, más que a una disminución en el número de sitios por oclusión debida a contactos entre subunidades de proteína.

Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son las siguientes:

- El Flutax, Flutax 2, Flutax 3 y Rotax son capaces de inducir la polimerización de la tubulina en su forma inactiva (“GDP-tubulina”) con una efectividad comparable a la del taxol. Flutax, Flutax 2 y Flutax 3 incorporan un ión adicional de magnesio en el ensamblaje.

- Los microtúbulos de GDP tubulina inducidos por taxoides fluorescentes presentan al menos dos protofilamentos más que los inducidos por taxol. Cuando se une el taxoide fluorescente a microtúbulos de MTP ensamblados previamente a la adición de taxoide, no se acusa un cambio significativo en el número de protofilamentos.

- La introducción de un espaciador más largo entre el taxol y la molécula fluorescente anula la capacidad de ensamblar GDP tubulina de Flutax.

- Los taxoides fluorescentes evaluados son útiles para visualizar microtúbulos ensamblados *in vitro* por microscopía de fluorescencia. El Flutax se une específicamente a microtúbulos preformados en un tiempo inferior a un minuto, lo que indica que el sitio de unión de taxol en el microtúbulo se encuentra fácilmente accesible al solvente.

- Todos los taxoides evaluados presentan dos tipos de sitios de unión en microtúbulos. Uno específico del taxol de alta afinidad, y un número indeterminado de sitios inespecíficos de más baja afinidad. Las constantes de equilibrio de asociación de taxoide fluorescente a cada uno de los tipos de sitio están separadas por órdenes de magnitud para la mayoría de los taxoides.

- El Flutax, Flutax 2 y Flutax 3 sufren cambios notables en su espectro de absorción cuando se unen a los microtúbulos, indicativos de un microentorno catiónico en el sitio de unión del taxol, y de una alteración en el número o la intensidad de los puentes de hidrógeno que forma la fluoresceína. Estos cambios son útiles para medir la unión de Flutax a microtúbulos. Los cambios observados en los espectros de los taxoides fluorescentes cuando se unen a tubulina no polimerizada son significativamente distintos, y pueden usarse como indicadores del estado de polimerización de la tubulina presente en una disolución.

- Los derivados fluorescentes evaluados se unen inespecíficamente a la tubulina en su forma no ensamblada. Esta unión se produce de forma heterogénea, a especies de tubulina mayores del dímero. Las constantes de equilibrio de asociación calculadas para la tubulina no polimerizada son algo mayores que las constantes de unión a los sitios no específicos de los microtúbulos. La polimerización de la GDP tubulina dificulta la unión de taxoide fluorescente, bien por oclusión de número de sitios, bien por estabilización de la proteína.

Bibliografía

-
- Aisner, J. y Cortes-Funes, H. (1997): "Paclitaxel in head and neck and other cancers: future prospects." *Semin. Oncol.*, 24: S2-113-S2-115.
 - Albert, A. y Serjeant, E. P. (1984): "The determination of ionization constants." Chapman y Hall, editores.
 - Amos, L. A. y Amos, W. B. (1991): "Molecules of the cytoskeleton." MacMillan Molecular Biology.
 - Amos, L.A. y Baker, T. S. (1979): "The three-dimensional structure of tubulin protofilaments". *Nature*, 279: 607-612.
 - Amos, L. A. y Hirose, K. (1997): "The structure of microtubule-motor complexes". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 4-11.
 - Andreu, J. M., Gorbunoff, M. J., Lee, J. C. y Timasheff, S. N. (1984): "Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analoges: an equilibrium study." *Biochemistry*, 23: 1742-1752.
 - Andreu, J. M. y Timasheff, S. N. (1986): "The measurement of cooperative protein self-assembly by turbidity and other techniques." *Methods Enzymol.*, 130: 47-59.
 - Andreu, J. M., Bordas, J., Díaz, J. F., García de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F. J., Nogales, E., Pantos, E., y Towns-Andrews, E. (1992): "Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol- and MAP-induced microtubules". *J. Mol. Biol.*, 226: 169-184.
 - Andreu, J. M., Díaz, J. F., Gil, R., De Pereda, J. M., García Lacoba, M., Peyrot, V., Briand, C., Towns-Andrews, E. y Bordas, J. (1994): "Solution structure of taxotere-induced microtubules to 3 nm resolution. The change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side chain." *J. Biol. Chem.* 269: 31785-31792.
 - Angelastro, J. M. y Purich, D. L. (1990): "Irreversible GTP hydrolysis attends tubulin self-assembly". *Eur. J. Biochem.*, 191: 507-511.
 - Arnal, I. y Wade, R. H. (1995): "How does taxol stabilize microtubules?" *Curr. Biol.*, 5: 900-908.
 - Baker, T. S., y Amos, L. A. (1978): "Structure of the tubulin dimer in zinc-induced sheets". *J. Mol. Biol.*, 123: 89-106.
 - Barbier, P., Peyrot, V., Leynadier, D. y Andreu, J. M. (1998): "The active GTP- and GDP-liganded states of tubulin are distinguished by the binding of chiral isomers of ethyl 5-amino-2-methyl-1,2-dihydro-3-phenylpyrido[3,4-b]pyrazin-7-yl carbamate".

Biochemistry, 37: 758-768.

- Bass, P. W. (1997): "Microtubules and axonal growth". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 29-36.
- Belmont, L. D. y Mitchison, T. J. (1996): "Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." *Cell*, 84: 623-631.
- Best, D., Warr, P. J. y Gull, K. (1981): "Influence of the composition of commercial sodium dodecyl sulfate preparations on the separation of alpha- and beta-tubulin during polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal. Biochem.* 114:281-284.
- Bloom, G. S. y Goldstein, L. S. B. (1998): "Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway." *J. Cell Biol.*, 140: 1277-1280.
- Bradford, M.M. (1976): "A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Bramhill, D. (1997): "Bacterial cell division". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 395-424.
- Burton, P. R., Hinkley, R. E., y Pierson, G. B. (1975): "Tanic acid stained microtubules with 12, 13 & 15 protofilaments." *J. Cell Biol.*, 65: 227-233.
- Cantor, C. R., y Schimmel, P. R. (1980a). "Biophysical Chemistry". Editor W. H. Freeman, New York.
- Caplow, M. (1992): "Microtubule dynamics." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 58-65.
- Caplow, M.; Ruhlen, R L. y Shanks, J. (1994a): "The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice." *J. Cell Biol.*, 127: 779-788.
- Caplow, M. y Shanks, J. (1996): "Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules". *Mol. Biol. Cell*, 7: 663-675.
- Caplow, M.; Shanks, J. y Ruhlen, R L. (1994a): "How taxol modulates microtubule disassembly." *J. Biol. Chem.*, 269: 23399-23402.
- Carrier, M. F. (1991): "Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3: 12-17.
- Cassimeris, L. (1993): "Regulation of microtubule dynamic instability". *Cell Motil. Cytoskeleton*, 26: 275-281.
- Chalfie, M. y Thomson, (1982): "Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *Caenorhabditis elegans*." *J. Cell Biol.*, 93: 15-23.

-
- Chau, M. F., Radeke, M. J., Barasoain, I., de Inés, C., Hohlstaedt, L. y Feinstein, S. C. (1999): "The microtubule associated Protein tau cross-links to two distinct sites on each α and β tubulin monomer via separate domains." *Biochemistry*, en prensa
 - Chrétien, D., Fuller, S. D. y Karsenti, E. (1995): "Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates". *J. Cell. Biol.*, 129: 1311-1328.
 - Chrétien, D., Flyvbjerg, H. y Fuller, S. D. (1998): "Limited flexibility of the interprotofilament bonds in microtubules assembled from pure tubulin." *Eur. Biophys. J.*, 27: 490-500.
 - Chrétien, D. y Wade, R. H. (1991): "New data on the microtubule surface lattice." *Biol. Cell*, 71: 161-174.
 - Coffey, R. L. y Purich, D. L. (1995): "Non-cooperative binding of the MAP-2 microtubule-binding region to microtubules." *J. Biol. Chem.*, 270: 1035-1040.
 - Correia, J. J., Baty, L. T. y Williams, R. C. (1987): " Mg^{2+} dependence of guanine nucleotide binding to tubulin". *J. Biol. Chem.*, 262: 17278-17284.
 - Cortese, F., Bhattacharyya, B. y Wolf, J. (1977): "Podophylotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin." *J. Biol. Chem.*, 252: 1134-1140.
 - Cowden, C. J., y Paterson, I. P. (1997): "Cancer drugs better than taxol?" *Nature*, 387: 238-239.
 - Curmy, P. A., Andersen, S. S., Lachkar, S., Gavet, D., Karsenti, E. y Knossow, M. (1997): "The stathmin-tubulin interaction *in vitro*." *J. Biol. Chem.*, 272: 25029-25036.
 - D'Andrea, G. M. y Seidman, A. D. (1997): "Docetaxel and paclitaxel in breast cancer therapy: present status and future prospects." *Semin. Oncol.*, 4: S13-27-S13-44.
 - Davis, A., Sage, C. R., Dougherty, C. A., y Farrell, K. W. (1994): "Microtubule dynamics modulated by guanosine triphosphate hydrolysis activity of β -tubulin." *Science*, 264: 839-842.
 - Denis, J. N., Correa, A. y Greene, A. E. (1990): "An improved synthesis of the side chains of taxol and of RP56976." *J. Org. Chem.*, 55: 1957-1959.
 - Derry, W. B., Wilson, L. y Jordan, M. A. (1995): "Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics." *Biochemistry*, 34: 2203-2211.
 - Derry, W. B., Wilson, L., Khan, I. A., Ludueña, R. F. y Jordan, M. A. (1997): "Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated

- and purified beta-tubulin isotypes.” *Biochemistry*, 36: 3554-3562.
- Desai, A. y Mitchison, T. J. (1997): “Microtubule polymerization dynamics”. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 83-117.
 - Díaz, J. F. y Andreu, J. M. (1993): “Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: Reversibility, ligand stoichiometry and competition.” *Biochemistry*, 32: 2747-2755.
 - Díaz, J. F., Andreu, J. M., Diakun, G., Towns-Adrews, E., y Bordas, J. (1996): “Structural intermediates in the assembly of taxoid-induced microtubules and GDP- tubulin double rings: time-resolved X-ray scattering.” *Biophys. J.*, 70: 2408-2420.
 - Díaz, J. F., Menéndez, M. y Andreu, J. M. (1993): “Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin.” *Biochemistry*, 32: 10067-10077.
 - Díaz, J. F., Pantos, E., Bordas, J., y Andreu, J. M. (1994): “Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules”. *J. Mol. Biol.*, 238: 215-225.
 - Díaz, J. F., Valpuesta, J. M., Chacón, P. y Andreu, J. M. (1998): “Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easily accessible site: internal microtubule dynamics?” *J. Biol. Chem.*, 273: 33803-33810.
 - Diehl, H.(1989): “Studies on fluoresein VI. Absorbance of the various prototropic forms of yellow fluoresein in aqueous solution.” *Talanta*, 36: 413-415.
 - Diehl, H. y Horchak-Morris, N. (1987): “Studies on fluoresein-V. The absorbance of fluoresein in the ultraviolet, as a function of pH.” *Talanta*, 34:739-741
 - Diehl, H. y Markuszewski, R. (1989): “Studies on fluoresein VII. The fluorescence of fluoresein as a function of pH. *Talanta*, 36: 416-418.
 - Downing, K. H. y Nogales, E. (1998a): “Tubulin and microtubule structure”. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10: 16-22.
 - Downing, K. H., y Nogales, E. (1998b): “New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin.” *Eur Biophys. J.*, 27: 431-436.
 - Drechsel, D. N. y Kirschner, M. W. (1994): “The minimum GTP cap required to stabilize microtubules.” *Curr. Biol.*, 4:1053-1061.
 - Drewes, G., Ebnet, A., y Mandelkow, E. M. (1998): “MAPs, MARKs and microtubule dynamics.” *TIBS*, 23: 307-311.

-
- Egelman, E. H. (1998): "Tubulin family: kinship of key proteins across phylogenetic domains". *Curr. Biol.*, 8: R288-R290.
 - Eichenlaub-Ritter, U. y Tucker, J. B. (1983): "Microtubules with more than 13 protofilaments in the dividing nuclei of ciliates." *Nature*, 307: 60-62.
 - Evangelio, J. A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A. A., Lillo, M. P., Acuña, A. U., Amat-Guerri, F. y Andreu, J. M. (1998): "Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton". *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 39: 73-90.
 - Erickson, H. P. (1998): "Atomic structures of tubulin and FtsZ." *Trends Cell Biol.*, 8: 133-137
 - Erickson, H. P. y Stoffler, D. (1998): "Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to α/β and γ tubulin." *J. Cell Biol.*, 135: 5-8.
 - Fan, J., Griffiths, A. D., Lockhart, A., Cross, R. A. y Amos, L. A. (1996): "Microtubule minus ends can be labeled with a phage display antibody specific to α -tubulin." *J. Mol. Biol.*, 259: 325-330.
 - Faguy, D. M. y Doolittle, W. F. (1998): "Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division". *Curr. Biol.*, 8: R338-R341.
 - Frigon, R. P. y Timasheff, S. N. (1975): "Magnesium-induced self-association of calf brain tubulin: I. Stoichiometry." *Biochemistry*, 14: 4559-4566.
 - Gee, M. A. y Vallee, R. B. (1998): "The role of the dynein stalk in cytoplasmic and flagellar motility." *Eur. Biophys. J.*, 27: 466-473.
 - Goldberg, R. J. (1953): "Sedimentation in the ultracentrifuge". *J. Phys. Chem.* 57, 194-202.
 - Gore, M. E., Levy, M., Rustin, G., Perren, T., Calvert, A. H., Earl, H. Y Thompson, J. M. (1995): "Paclitaxel(taxol) in relapsed and refractory ovarian cancer: UK and Eire experience." *Br. J. Cancer*, 72: 1016-1019.
 - Gutske, N., Trinczeck, B., Biernat, E. M., Mandelkow, E. M., y Mandelkow, E. (1994): "Domains of τ protein and interactions with microtubules". *Biochemistry*, 33: 9511-9522.
 - Guy, R. K., Scott, Z. A., Sloboda, R. D., y Nicolaou, K. C. (1996): "Fluorescent taxoids". *Chem. Biol.*, 3: 1021-1031.
 - ter Harr, E., Kowalski, R. J., Hamel, E., Lin, C. M., Longley, R. E., Gunasekera, S. P., Rosenkranz, H. S., y Day, B. W. (1996): "Discodermolide, a cytotoxic marine agent

- that stabilizes microtubules more potently than taxol." *Biochemistry*, 35: 243-250.
- Han, Y., Chaudhary, A. G., Chordia, M. D., Sackett, D. L., Pérez-Ramírez, B., Kingston, D. G. I., y Bane, S. (1996): "Interaction of a fluorescent derivative of paclitaxel (taxol) with microtubules and tubulin-colchicine." *Biochemistry*, 35: 14173-14183.
 - Hancock, W. O. y Howard, J. (1998): "Processivity of the motor protein kinesin requires two heads". *J. Cell Biol.*, 140: 1395-1405.
 - Hastie, S. B. (1991): "Interactions of colchicine with tubulin". *Pharmac. Ther.*, 51:377-401.
 - Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., Karsenti, E. (1996): "Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts". *Nature*, 382: 420-425.
 - Hill, T. L. y Carlier, M. F. (1983): "Steady-state theory of the interference of GTP hydrolysis in the mechanism of microtubule assembly." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4404-4408.
 - Hirokawa, N. (1994): "Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 74-81.
 - Hirokawa, N., Noda, Y. y Okada, Y. (1998): "Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 60-73.
 - Hirose, K., Amos, W. B., Lockhart, A., Cross, R. A. y Amos, L. A. (1997): "Three-dimensional cryoelectron microscopy of 16-protofilament microtubules: structure, polarity, and interactions with motor proteins." *J. Struct. Biol.*, 118: 140-148.
 - Hirose, K., Cross, R. A. y Amos, L. A. (1998): "Nucleotide-dependent structural changes in dimeric NCD molecules complexed to microtubules." *J. Mol. Biol.*, 278: 389-400.
 - Horio, T. y Hotani, (1986): "Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy." *Nature*, 321: 605-607.
 - Hortobagyi, G. N., Holmes, F. A., Theriault, R. L. y Buzdar, A. U. (1994): "Use of taxol (paclitaxel) in breast cancer." *Oncology*, 51: 29-32.
 - Horwitz, S. B. (1992): "Mechanism of action of taxol." *Trends Pharm. Sci.*, 13: 134-136.
 - Horwitz, S. B. (1994): "How to make taxol from scratch." *Nature*, 367: "593-594.
 - Hyams, J. S. y Lloyd, C. W., eds. (1994). "Microtubules." Editorial Wiley-Liss.
 - Hyman, A. A., Chrétien, D., Arnal, I. y Wade, R. H. (1995): "Structural changes

- accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(α,β)-methylene-diphosphonate." *J. Cell Biol.*, 128: 117-125.
- Hyman, A. A., Salser, D. N., Drechsel, N., Unwin, N. y Mitchison, T. J. (1992): Role of the GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP." *Mol. Biol. Cell*, 3: 1155-1167.
 - Hyman, A. A. y Karsenti, E. (1996): "Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly". *Cell*, 84: 401-410.
 - Inoué, S. (1997): "The role of microtubule assembly dynamics in mitotic force generation and functional organization of living cells." *J. Struct. Biol.*, 118: 87-93.
 - Inoué, S. y Salmon, E. D. (1995): "Force generation by microtubule assembly/dissassembly in mitosis and related movements." *Mol. Biol. Cell*, 6: 1619.-1640.
 - Itoh, T. J., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T. y Hotani, H. (1997): "Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in microtubule dynamics." *Biochemistry*, 36: 12574-12582.
 - Jánosi, I. M., Chrétien, D. y Flyvbjerg, H. (1998): "Modeling elastic properties of microtubule tips and walls." *Eur. Biophys. J.*, 27: 501-513.
 - Jiménez, M. A., Evangelio, J. A., Aranda, C., López-Brauet, A., Andreu, D., Rico, M., Lagos, R., Andreu, J. M., y Monasterio, O. (1999): "Helicity of α (404-451) and β (394-445) tubulin C-terminal peptides". *Protein Science*, en prensa.
 - Jiménez-Barbero, J., Souto, A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J. A., Acuña, U. Andreu, J. M. y Amat-Guerri, F. (1998): "Effect of 2'-OH acetylation on the bioactivity and conformation of 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]taxol. A NMR-fluorescence microscopy study." *Bioorg. Med. Chem.*, 6: 1857-1863.
 - Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D. y Wilson, L. (1993): "Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 9552-9556.
 - Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H. y Wilson, L. (1996): "Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death." *Cancer Res.* 56: 816-825.
 - Jordan, M. A. y Wilson, L. (1998): "Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 123-130.
 - Joshi, H. C. (1994): "Microtubule organizing centers and γ -tubulin." *Curr. Opin. Cell Biol.*,

- 6: 55-62.
- Joshi, H. C. (1998). "Microtubule dynamics in living cells." *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10: 35-44.
 - Jourdain, L, Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D. y Carlier, M. F. (1997): "Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules". *Biochemistry*, 36: 10817-10821.
 - Kamlet, M. J. y Taft, R. W. (1976): "The solvatochromic comparison method. I. The β -Scale of solvent hydrogen-Bond acceptor (HBA) basicities." *J. Am. Chem. Soc.*, 98: 377-383.
 - Karsenti, E., Boleti, H. y Vernos, I. (1996): "The role of microtubule dependent motors in centrosome movements and spindle pole organization during mitosis". *Sem. Cell. Developmental Biol.* 7: 367-378.
 - Kikkawa, M., Ishikawa, T., Wakabayashi, T. y Hirokawa, N. (1995): "Three-dimensional structure of the kinesin head-microtubule complex." *Nature*, 376: 274-279.
 - Kingston, D. G. (1991): "The chemistry of taxol." *Pharmacol. Ther.*, 52: 1-34.
 - Kingston, D. G. (1994): "Taxol: the chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent." *Trends Biotech.* 12: 117-125.
 - Kirschner, M. W. y Mitchison, T. (1986): "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." *Cell*, 45: 329-342.
 - Klonis, N., Clayton, A. H., Voss, E. W. y Sawyer, W. H. (1998): "Spectral properties of fluorescein in a solvent-water mixtures: applications as a probe of hydrogen bonding environments in biological systems." *Photochem. Photobiol.*, 67: 500-510.
 - Kowalski, R. J., Giannakakou, P., y Hamel, E. (1997): "Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (taxol®)". *J. Biol. Chem.*, 272: 2534-2541.
 - Kozielski, F., Arnal, I. y Wade, R. H. (1998): "A model of the microtubule-kinesin complex based on electron cryomicroscopy and X-ray crystallography". *Curr. Biol.*, 8: 191-198.
 - Kozielski, F., Sack, S., Marx, A., Thormälen, M., Schönbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. (1997): "The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility." *Cell*, 91: 985-994.
 - Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., y Vale, R. D. (1996). "Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin." *Nature*, 380:

550-554.

- Laemmli, U. K. (1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 225: 680-685.
- Lanzavecchia, S., Bellon, P. L., Dallai, R. y Afzelius, B. A. (1994): "Three-dimensional reconstructions of accessory tubules observed in the sperm axonemes of two insect species." *J. Struct. Biol.*, 113: 225-237.
- Larcher, J. C., Boucher, D., Lazereg, S., Gros, F. y Denoulet, P. (1996): "Interaction of kinesin motor domains with α - and β -tubulin subunits at a tau-independent binding site." *J. Biol. Chem.*, 271: 22117-22124.
- Larsson, H., Wallin, M. y Edstrom, A. (1976): "Induction of a sheet polymer of tubulin by Zn^{2+} ." *Expt. Cell Res.*, 100: 104-110.
- Lee, G. (1993): "Non-motor microtubule-associated proteins." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5: 88-94.
- Lee, J. C. y Timasheff, S. N. (1977): "In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables." *Biochemistry*, 16: 1754-1764.
- Li, Y. y Benezra, R. (1996): "Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2." *Science*, 274: 246-249.
- Lippincott-Schwartz, J. (1998): "Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 52-59.
- Löwe, J. y Amos, L. A. (1998): "Crystal structure of the bacterial cell division protein FtsZ." *Nature*, 391: 203-206.
- Ludueña, R. F. (1998): "Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications." *Int. Rev. Cytol.*, 178: 207-275.
- Lutkenhaus, J. y Addinall, S. J. (1997): "Bacterial cell division and the Z ring". *Ann Rev. Biochem.*, 66: 93-116.
- Mandelkow, E. y Johnson, K. A., (1998): "The structural and mechanochemical cycle of kinesin." *TIBS*, 23: 429-433.
- Mandelkow, E. y Mandelkow, E. M. (1995): "Microtubules and microtubule-associated proteins." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 72-81.
- Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. (1992): "Microtubule oscillations". *Cell Motil. Cytoskeleton*, 22: 235-244.

-
- Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. (1998): "Tau in Alzheimer's disease." *Trends Cell Biol.*, 8: 425-427.
 - Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. y Milligan, R. A. (1991): "Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study." *J. Cell Biol.*, 114: 977-991.
 - Markman, M. (1997): "Current status and future directions of platinum/paclitaxel-based chemotherapy of ovarian cancer." *Semin. Oncol.* (suppl 11): s11-24-s11-27.
 - Marx, A., Thormählen, M., Müller, J., Sack, S., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. (1998). "Conformations of kinesin: solution vs. crystal structures and interactions with microtubules." *Eur. Biophys. J.*, 27: 455-465.
 - Marya, P. K., Syed, Z., Fraylich, P. E., y Eagles, P. A. M. (1994): "Kinesin and tau bind to distinct sites on microtubules." *J. Cell Sci.*, 107: 339-344.
 - Matus, A. (1991): "Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis". *J. Cell Sci.*, 15:61-67.
 - McEwen, B. F., Ceska, T. A., Crepeau, R. H. y Edelstein, S. J. (1983): "Structural changes in tubulin sheets upon removal of microtubule-associated proteins." *J. Mol. Biol.*, 166: 119-140.
 - McNally, F. J. (1996): "Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 23-29.
 - McRae, T. H. (1997): "Tubulin post-translational modifications, enzymes and their mechanisms of action." *Eur. J. Biochem.*, 244: 265-278.
 - Medrano, F. J., Andreu, J. M., Gorbunoff, M. y Timasheff, S. N. (1991): "Roles of ring C oxygens in the binding of colchicine to tubulin." *Biochemistry*, 30: 3770-3777.
 - Melki, R., Carlier, M. F. y Pantaloni, D. (1990): "Direct evidence for GTP and GDP-Pi intermediates in microtubule assembly." *Biochemistry*, 29: 8921-8932.
 - Melki, R., Carlier, M. F., Pantaloni, D. y Timasheff, S. N. (1989): "Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies." *Biochemistry*, 28: 9143-9152.
 - Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J. F. y Andreu, J. M. (1998): "Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site." *J. Biol. Chem.*, 273: 167-176.

-
- Mickey, B. y Howard, J. (1995): "Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents". *J. Cell Biol.*, 130: 909-917.
 - Milisav, I. (1998): "Dynein and dynein-related genes". *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 39: 261-272.
 - Minton, A. P. (1984): "What binding experiments can and cannot tell us about the interaction between hormones and membranes." En "Peptide hormones, biomembranes and cell growth.", editores Liana Bolis, Roberto Verna y Luigi Frati. Plenum Publishing Corporation.
 - Minton, A. P. (1990): "Quantitative characterization of reversible molecular associations via analytical centrifugation." *Anal. Biochem.*, 190: 1-6.
 - Mitchison, T. J. (1993): "Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules." *Science*, 261: 1044-1047.
 - Mitchison, T. J., Evans, L., Schulze, E. y Kirschner, M. (1986): "Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle." *Cell*, 45: 515-527.
 - Mitchison, T. y Kirschner, K. (1984a): "Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes". *Nature*, 312: 232-237.
 - Mitchison, T. y Kirschner, K. (1984b): "Dynamic instability of microtubule growth". *Nature*, 312: 237-242.
 - Monasterio, O., Andreu, J. M. y Lagos, R. (1995): "Tubulin structure and function". *Comments Mol. Cellular Biophys.*, 8: 273-306.
 - Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts, B., Agard, D. A. (1995): "Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome". *Nature*, 378: 637-640.
 - Mukherjee, A. y Lutkenhaus, J. (1998): "Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis." *EMBO J.* 17:462-469.
 - Mummert, M. E. y Voss, E. W. (1995): "Effects of secondary forces on the primary antibody-ligand interaction." *Mol. Immunol.*, 32: 1225-1233.
 - Muramatsu, N. y Minton, A. P. (1988): "An automated method for rapid determination of diffusion coefficients via measurements of boundary spreading". *Anal. Biochem.*, 168: 345-351.
 - Nédélec, F. J., Surrey, T., Maggs, A. C., y Leibler, S. (1997). "Self-organization of microtubules and motors." *Nature*, 389: 305-308.

-
- Nicolaou, K. C., Yang, Z., Liu, J. J., Ueno, H., Nanterment, P. G., Guy, R. K., Claiborne, C. F., Renaud, J., Couladouros, E. A., Paulvannan y Sorensen, E. J. (1994): "Total synthesis of taxol." *Nature*, 367: 630-634.
 - Noble, M., Lewis, S. A., y Cowan, N. J. (1989): "The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and *tau*". *J. Cell Biol.*, 109: 3367-3376.
 - Nogales, E., Wolf, S. G., y Downing, K. H. (1997): "Visualizing the secondary structure of tubulin: three dimensional map." *J. Struct. Biol.*, 118: 119-127.
 - Nogales, E., Wolf, S. G., y Downing, K. H. (1998): "Structure of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography." *Nature*, 391:199-203.
 - Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Ludueña, R. F. y Downing, K. H.(1995): "Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site". *Nature*, 375: 424-427.
 - Oakley, B. R. (1992): " γ -tubulin: the microtubule organizer?" *Trends Cell Biol.*, 2: 1-5.
 - Odde, D. (1998): "Diffusion inside microtubules". *Eur. Biophys. J.*, 27: 514-520.
 - Ookata, K., Hisanaga, S., Sugita, M., Okuyama, A., Murofushi, H., Kitazawa, H., Chari, S., Bulinski, J. C., y Kishimoto, T. (1997): "MAP4 is the *in vivo* substrate for CDC2 kinase in HeLa cells: identification of a M-Phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4." *Biochemistry*, 36: 15873-15883.
 - Oosawa, F. y Asakura, S. (1975): "Thermodynamics of the polymerization of tubulin". London: Academic Press.
 - Parekh, H. y Simpkins, H. (1997): "The transport and binding of taxol." *Gen. Pharmacol.*, 29: 167-172.
 - Parness y Horwitz, (1981): "Taxol binds to polymerized tubulin *in vitro*." *J. Cell Biol.*, 91: 479-487.
 - Paschal, B. M., Obar, R. A., y Vallee, R. B. (1989): "Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C-terminus of tubulin". *Nature*, 342: 569-572.
 - de Pereda, J. M., Leynadier, D., Evangelio, J. A., Chacón, P. y Andreu, J. M. (1996): "Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites and homology to FtsZ." *Biochemistry*, 35: 14203-14215.
 - de Pereda, J. M., Wallin, M., Billger, M. y Andreu, J. M. (1995): "Comparative study of the colchicine binding site and the assembly of fish and mammalian microtubule

- proteins." *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 30: 153-163.
- Press, W. H., Flannery, B. P., Tenkolsky, S. A. y Vetterling, W. T. (1989): "Numerical recipes in Pascal." Cambridge University Press.
 - Ralston, G. (1993). "Introduction to Analytical Ultracentrifugation". Beckman Instruments Inc. C.A.
 - Rao, S., Chu, J.J., Liu, R. S., y Lai, Y.K. (1999): "Synthesis and evaluation of [¹⁴C]-labelled and fluorescent-tagged paclitaxel derivatives as new biological probes." *Bioorg. Med. Chem.*, 6: 2193-2204.
 - Rao, S., Krauss, N. E., Heerding, J.M., Orr, G. A. y Horwitz, S. B. (1994): "3'-(p-Azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 31 aminoacids of β -tubulin." *J. Biol. Chem.*, 269: 3132-3134.
 - Rao, S., Orr, G. A., Chaudhary, A. G., Kingston, D. G. I. y Horwitz, S. B. (1995): "Characterization of the taxol binding site on the microtubule: 2-(m-Azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (aminoacids 217-231) of β -tubulin." *J. Biol. Chem.*, 270: 20235-20238.
 - Rieder, C. L., Cole, R. W., Khokjakov, A. y Sluder, G. (1995): "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores." *J. Cell Biol.*, 130: 941-948.
 - Rieder, C. L. y Salmon, E. D. (1998): "The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis." *Trends Cell Biol.*, 8: 310-318.
 - Roberts, J. R., Rowinsky, E. K., Donehower, R. C., Robertson, J. y Allison, D. C. (1989): "Demonstration of the cell cycle positions of taxol-induced "asters" and "bundles" by sequential measurements of tubulin immunofluorescence, DNA content, and autoradiographic labeling of taxol-sensitive and -resistant cells." *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 1659-1665.
 - Romberg, L., Pierce, D. W., y Vale, R. D. (1998): "Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility." *J. Cell Biol.*, 140: 1407-1416.
 - Rowinsky, E. K. (1994): "Update on the antitumour activity of paclitaxel in clinical trials." *Ann. Pharmacother.*, 28: 18-22.
 - Rowinsky, E. K. y Donehower, R. C. (1991): "The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics". *Pharmacol. Ther.*, 52:35-84.
 - Rowinsky, E. K., Donehower, R. C., y Tucker, R. W. (1988): "Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol". *Cancer Res.*, 48: 4093-4100.

-
- Rudner, A. D. y Murray, A. W. (1996): "The spindle assembly checkpoint." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 773-780.
 - Sablin, E. P., Kull, F. J., Cooke, R., Vale, R. D. y Fletterick, R. J. (1996): "Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd." *Nature*, 380: 555-559.
 - Schachman, H. K. (1959): "Ultracentrifugation in Biochemistry". New York, Academic Press, 1959.
 - Sengupta, S., Boge, T. C., Georg, G. I., y Himes, R. H. (1995): "Interaction of a fluorescent paclitaxel analogue with tubulin". *Biochemistry*, 34: 11889-11894.
 - Sengupta, S., Boge, T. C., Liu, Y., Hepperle, M., Georg, G. I., y Himes, R. H. (1997): "Probing the environment of tubulin-bound paclitaxel using fluorescent paclitaxel analogues." *Biochemistry*, 36: 5179-5184.
 - Serrano, L., de la Torre, J., Maccioni, R. B., y Avila, J. (1984): "Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: localization of the site for MAP2 interaction." *Biochemistry*, 23: 4675-4681.
 - Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A. y Nishida, E. (1994): "Microtubule severing by elongation factor 1 alpha." *Science*, 266: 282-285.
 - Shiina, N., Gotoh, Y. y Nishida, E. (1995): "A novel homo-oligomeric protein responsible for an MPF-dependent microtubule-severing activity." *EMBO J.*, 11: 4723-4731.
 - Shiina, N., Gotoh, Y. y Nishida, E. (1995): "Microtubule severing en M phase". *Trends Cell Biol.* 5: 283-286.
 - Simon, J. R., Parsons, S. F., y Salmon, E. D. (1992): "Buffer conditions and non-tubulin factors critically affect the microtubule dynamic instability of sea urchin egg tubulin." *Cell Motil. Cytoskeleton* 21: 1-14.
 - Song, D., Hsu, L.-F., y Ay, J. L.-S. (1996): "Binding of taxol to plastic and glass containers and protien under in vitro conditions." *J. Pharm. Sci.* 85: 29-31.
 - Song, Y. H. y Mandelkow, E. (1995): "The anatomy of flagellar microtubules: polarity, seam, junctions and lattice." *J. Cell Biol.*, 128: 81-94.
 - Sosa, H. y Chrétien, D. (1998): "Relationship between Moiré patterns, tubulin shape, and microtubule polarity." *Cell Motil. Cytoskeleton*, 40: 38-43.
 - Sosa, H., Hoenger, A. y Milligan, R. A. (1997): "Three different approaches for calculating the three dimensional structure of microtubules decorated with kinesin and motor domains." *J. Struct. Biol.*, 118: 149-158.

-
- Sosa, H. y Milligan, R. A. (1996): "Three dimensional structure of ncd-decorated microtubules obtained by a back projection method." *J. Mol. Biol.*, 260: 743-755.
 - Souto, A. A., Acuña, A. U., Andreu, J. M., Barasoain, I., Abal, M., y Amat-Guerri, F. (1995): "New fluorescent water-soluble taxol derivatives." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34: 2710-2712.
 - Spencer, C. M. y Faulds, D. (1994): "Paclitaxel: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer." *Drugs*, 48: 794-847.
 - Spiegelman, B. M., Penningroth, S. M. y Kirschner, M. W. (1977): "Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese Hamster ovary cells." *Cell*, 12:587-600.
 - Stafford, W. F., III (1992): "Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile". *Anal. Biochem.*, 203: 295-301.
 - Stafford, W. F., III (1994): "Boundary Analysis in Sedimentation Velocity Experiments." *Methods Enzymol.*, 240: 478-501.
 - Steinberg, I. Z. y Schachman, H. K. (1966): "Ultracentrifugation studies with absorption optics. V. Analysis of interacting systems involving macromolecules and small molecules." *Biochemistry*, 5: 3728-3747.
 - Straight, A. F. (1997): "Cell cycle: checkpoint proteins and kinetochores." *Curr. Biol.*, 7: R613- R616.
 - Taft, R. W., y Kamlet, M. J. (1976): "The solvatochromic comparison method. II. The α -Scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities." *J. Am. Chem. Soc.*, 98: 2886-2894.
 - Torres, K. y Horwitz, S. B. (1998): "Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent." *Cancer Res.*, 58: 3620-3626.
 - Toso, R. J., Jordan, M. A., Farrell, K. W., Mastumoto, B. y Wilson, L. (1993): "Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine" *Biochemistry*, 32: 1285-1293
 - Tran, P. T., Walker, R. A. y Salmon, E. D. (1997): "A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends". *J. Cell Biol.*, 138: 105-117.
 - Vale, R. D., Coppin, C. M., Malik, F., Kull, F. J. y Milligan, R. A. (1994): "Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanical properties, and kinesin-driven transport

- of microtubules." *J. Biol. Chem.*, 269: 23769-23775.
- Vale, R. D. y Fletterick, R. J. (1997): "The design plan of kinesin motors". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 745-777.
 - Vallee, R. B. y Gee, M. A., (1998): "Make room for dynein." *Trends Cell Biol.*, 8: 490-494.
 - Van Holde, K. E. (1985). "Physical Biochemistry". Capítulo 3: "Chemical Equilibrium". Editorial Prentice-Hall, Inc.
 - Verde, F, Berrez, J.M., Antony, C. y Karsenti, E. (1991): "Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein." *J. Cell Biol.*, 112: 1177-1187.
 - Venier, P., Maggs, A. C., Carlier, M. F., y Pantaloni, D. (1994): "Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations." *J. Biol. Chem.*, 269: 13353-13360.
 - de la Viña, S., Andreu, D., Medrano, F. J., Nieto, J. M. y Andreu, J. M. (1988): "Tubulin structure probed with antibodies to synthetic peptides. Mapping of three major types of limited proteolysis fragments." *Biochemistry*, 27: 5352-5365.
 - Wade, R. H. y Chrétien, D. (1993): "Cryoelectron microscopy of microtubules". *J. Struct. Biol.*, 110: 1-27.
 - Wade, R. H., Chrétien, D. y Job, D. (1990): "Characterization of microtubule protofilament number: how does the surface lattice accommodate?" *J. Mol. Biol.*, 212: 775-786.
 - Wade, R. H. y Hyman, A. A. (1997): "Microtubule structure and dynamics". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 12-17.
 - Wade, R. H., Meurer-Grob, P., Metz, F. y Arnal, I. (1998): "Organization and structure of microtubules and microtubule-motor protein complexes." *Eur. Biophys. J.*, 27: 446-454.
 - Walczac, C. E., Vernos, I., Mitchison, T. J., Karsenti, E. y Heald, R. (1998): "A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity." *Curr. Biol.*, 8:903-913.
 - Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P. y Salmon, E. D. (1988): "Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies." *J. Cell. Biol.*, 107: 1437-1448.
 - Walker, R. A. y Sheetz, M. P. (1993): "Cytoplasmic microtubule-associated motors". *Ann.*

- Rev. Biochem.*, 62: 429-451.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., y McPhail, A. T. (1971): "Plant antitumour agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumour agent from *Taxus brevifolia*". *J. Amer. Chem. Soc.*, 93: 2325-2327.
 - Waters, J. C. y Salmon, E. D. (1997): "Pathways of spindle assembly." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 37-43.
 - Weisenberg, R. C., Borisy, G. G. y Taylor, E. (1968): "The colchicine binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules". *Biochemistry*, 7: 4466-4479.
 - Weisenberg, R. C., Deery, W. J. y Dickinson, P. J. (1976): "Tubulin-nucleotide interactions during polymerization of tubulin". *Biochemistry*, 15: 4248-4254.
 - Wells, W. A. E., (1996): "The spindle-assembly checkpoint: aiming for a perfect mitosis, every time." *Trends Cell Biol.*, 6: 228-234.
 - Wilson, L y Jordan, M. A. (1994). "Pharmacological probes of microtubule function". En "Microtubules". Hyams, J. S. y Lloyd, C. W. (eds.). New York: Wiley-Liss, pp. 59-84.
 - Wyman, J., y Gill, S. J. (1990): "Binding and linkage. Functional chemistry of biological macromolecules." University Science Books, Mill Valley, California.
 - Wolf, S. G., Mosser, G., y Downing, K. H. (1993): "Tubulin conformation in zinc-induced sheets and microtubules." *J. Struct. Biol.*, 111: 190-199.
 - Wolf, S. G., Nogales, E., Kikkawa, M., Gratzinger, D., Hirokawa, N. y Downing, K. H. (1996): "Interpreting a medium resolution model of tubulin: comparison of zinc-sheets and microtubule structure". *J. Mol. Biol.*, 262: 485-501.
 - Yang, J. T. , Saxton, W. M., Stewart, R. J., Raff, E. C. y Goldstein, L. S. B. (1990): "Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility *in vitro*". *Science*, 249: 42-47.
 - Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. y Mitchison, T. (1995): "A γ -tubulin ring complex purified from the unfertilized egg of *Xenopus laevis* can nucleate microtubule activity *in vitro*." *Nature*, 378: 578-583.