

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

CITOESQUELETO MICROTUBULAR DEL CILIADO PSICRÓFILO
Euplotes focardii: ORGANIZACIÓN, ISOTIPOS Y MODIFICACIONES
POSTRADUCCIONALES DE TUBULINA



X-53-381961-9

Tesis Doctoral que presenta Lucía Arregui García-Rovés
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Directores:

Dra. Susana Serrano Barrero
Profesora Titular de Escuela Universitaria
Facultad de Biología
U.C.M.

Dr. Jose Manuel Andreu Morales
Profesor de Investigación
Centro de Investigaciones Biológicas
C.S.I.C.

MADRID, 1999

23522



BIBLIOTECA

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	
1.	MICROTÚBULOS	
	1.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA	1
	1.2. ESTRUCTURA	1
	1.2.1. Estructura de la tubulina	2
	1.3. DINÁMICA	3
2.	ESTABILIDAD DE LOS MICROTÚBULOS A BAJAS TEMPERATURAS	5
	2.1. DINÁMICA DE LOS MICROTÚBULOS A BAJAS TEMPERATURAS	6
	2.2. ISOTIPOS DE α Y β TUBULINA	7
	2.2.1. Significado funcional	8
	2.3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA	10
	2.3.1. Acetilación	11
	2.3.2. Tirosilación, detirosilación y tubulina no tirosilable	11
	2.3.3. Otras modificaciones postraduccionales de la tubulina	13
3.	LOS CILIADOS COMO MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LOS SISTEMAS MICROTUBULARES	16
	3.1. SISTEMAS MICROTUBULARES EN CILIADOS	17
	3.2. EL CILIADO ANTÁRTICO <i>E. focardii</i>	18
	3.2.1. Morfología general	19
	3.2.2. Ciliación e infraciliación	19
4.	INMUNOCITOQUÍMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA TUBULINA. ANTECEDENTES	20
	4.1. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS HACIA DOMINIOS FUNCIONALES DE LA TUBULINA	21
	4.2. ANTICUERPOS FRENTE A DIFERENTES ISOFORMAS DE TUBULINA	22
	4.3. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA.	23
II.	OBJETIVOS	
1.	OBJETIVOS	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	
1.	MATERIALES	26
	1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	26
	1.1.1. Protozoos ciliados	26
	1.1.2. Tubulina de cerebro bovino	27

1.1.3. Animales de laboratorio	27
1.2. MEDIOS DE CULTIVO	27
1.2.1. Agua de mar artificial	27
1.2.2. Medio de Walne	27
1.2.3. Medio SW/PYE	28
2. MÉTODOS	29
2.1. CONDICIONES DE CULTIVO	29
2.1.1. Cultivos de <i>Euplotes focardii</i>	29
2.1.2. Cultivos de <i>Euplotes vannus</i>	29
2.2. OBSERVACIÓN <i>IN VIVO</i>	30
2.3. MICROSCOPIA ÓPTICA: TÉCNICA DE CARBONATO DE PLATA AMONIACAL	30
2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	30
2.4.1. Microscopía electrónica de barrido	30
2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión	30
2.5. ANTICUERPOS	31
2.5.1. Anticuerpos primarios	31
2.5.2. Anticuerpos secundarios	33
2.5.3. Producción de anticuerpos monoespecíficos	33
2.5.3.1. Selección de secuencias inmunogénicas	33
2.5.3.2. Síntesis química de péptidos	34
2.5.3.3. Acoplamiento de los péptidos sintéticos a proteínas portadoras	34
2.5.3.4. Inmunización de animales	36
2.5.3.5. ELISA	36
2.6. INMUNODETECCIÓN	37
2.6.1. Diluciones empleadas para la inmunodetección con los anticuerpos	37
2.6.2. Inmunoblot	38
2.6.2.1. Electroforesis	38
2.6.2.2. Transferencia	38
2.6.2.3. Western blot	39
2.6.2.4. Eliminación de los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa	40
2.6.3. Inmunofluorescencia indirecta	40
2.6.3.1. Preparación del citoesqueleto	40
2.6.3.2. Incubación con los anticuerpos	41
2.6.3.3. Montaje y observación de las muestras	41
2.7. DESCILIACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS DEL CORTEX CELULAR Y DEL CITOPLASMA DE LA CÉLULA DE <i>E. focardii</i>	41
2.8. EXPERIMENTOS DE ENSAMBLAJE DE LOS MICROTÚBULOS DE LOS MICROTÚBULOS CITOPLASMÁTICOS A DISTINTAS TEMPERATURAS	42
2.9. TRATAMIENTO CON FOSFATASA	42

IV. RESULTADOS

1.	ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO MICROTUBULAR DE <i>E. focardii</i>	44
1.1.	REDES SUPERFICIALES	44
1.1.1.	Lado dorsal	44
1.1.2.	Lado ventral	44
1.2.	CILIACIÓN, INFRACILIACIÓN SOMÁTICA Y SISTEMAS MICROTUBULARES ASOCIADOS	45
1.2.1.	Lado dorsal	45
1.2.2.	Lado ventral: cirros	45
1.3.	CITOESQUELETO ORAL	46
2.	CARACTERIZACIÓN DE LA TUBULINA DEL CILIADO ANTÁRTICO	51
2.1.	REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PÉPTIDOS SINTÉTICOS DE α Y β TUBULINA	51
2.1.1.	Reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las secuencias de la β tubulina	51
2.1.2.	Reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las secuencias de la α tubulina	52
2.2.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LAS ISOFORMAS DE LA β TUBULINA DE <i>E. focardii</i>	55
2.2.1.	Análisis de las regiones más divergentes en la β tubulina	56
2.2.2.	Predicción de las estructuras secundarias de la β tubulina de <i>E. focardii</i>	58
3.	FUNCIONALIDAD SELECTIVA DE LOS ISOTIPOS DE β TUBULINA EN ESTE CILIADO	60
3.1.	PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS	60
3.1.1.	Selección de secuencias inmunogénicas	60
3.2.	ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS	62
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS	63
3.3.1.	Inmunoreconocimiento mediante western blot	63
3.3.2.	Localización celular de las isoformas de β tubulina	65
3.4.	EXPERIMENTOS DE ENSAMBLAJE DE LOS MICROTÚBULOS CITOPLASMÁTICOS A DISTINTAS TEMPERATURAS	67
4.	MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LA TUBULINA DE <i>E. focardii</i>	74
4.1.	CÉLULAS INTERFÁSICAS DE <i>E. focardii</i>	74
4.1.1.	Microtúbulos acetilados	74
4.1.2.	Microtúbulos tirosilados	75
4.1.3.	Microtúbulos glutamilados	75
4.2.	DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS MODIFICADOS POSTRADUCCIONALMENTE DURANTE LA DIVISIÓN DE <i>E. focardii</i>	76
4.3.	COMPARACIÓN DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA DE <i>E. focardii</i> Y DE <i>E. vannus</i> , UNA ESPECIE ATEMPERADA	76

IV.	DISCUSIÓN	
1.	CITOSQUELETO MICROTUBULAR DE <i>E. focardii</i>	84
2.	CARACTERÍSTICAS DE LA TUBULINA DE <i>E. focardii</i>	86
	2.1. LA α y β TUBULINA DE ESTE CILIADO ADAPTADO AL FRÍO CONSERVA EPÍTOPOS DE IMPORTANCIA FUNCIONAL PRESENTES EN OTRAS ESPECIES TEMPERADAS	86
	2.2. VARIACIONES LOCALES DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA TUBULINA DE <i>E. focardii</i> 90	
	2.2.1. Importancia de las sustituciones aminoacídicas de la tubulina de <i>E. focardii</i> en la estructura de la proteína	91
	2.3. FUNCIÓN DE LOS ISOTIPOS DE LA β TUBULINA DE <i>E. focardii</i> EN RELACIÓN CON LA ADAPTACIÓN AL FRÍO	93
	2.4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA DE <i>E. focardii</i>	98
	2.3.1. Poliglutamilación	98
	2.3.2. Acetilación	101
	2.3.3. Tirosilación	102
	2.3.4. Existencia de modificaciones postraduccionales en una especie temperada de <i>Euplotes (E.vannus)</i>	103
	2.3.5. Fosforilación	104
V.	CONCLUSIONES	
1.	CONCLUSIONES	106
VI.	BIBLIOGRAFIA	
1.	BIBLIOGRAFIA	108

Abreviaturas

BSA	albúmina de suero bovino
DMF	dimetil formamida
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis (β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	enzimoinmunoensayo
GTP	guanina trifosfato
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
KLH	hemocianina
MBS	m-maleimido-benzoil N-hidroxisuccinimida ester
PBS	tampón fosfato salino
PIPES	ácido piperacín-1,4-dietanosulfónico
PMSF	fluoruro de metil fenil-sulfonio
PVDF	poli (fluoruro de vinilideno)
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico
TBS	tampón Tris salino

1. MICROTÚBULOS

1.1. IMPORTANCIA BIOLÓGICA

Los microtúbulos son componentes citoesqueléticos presentes en casi todas las células eucariotas. Participan en una gran variedad de funciones, principalmente en las relacionadas con procesos de transporte y movimiento celulares. Forman parte de estructuras como los axonemas ciliares y flagelares que participan en la creación de corrientes implicadas en la movilidad de la célula. Por otro lado, forman el huso mitótico cuyo papel es esencial en la segregación de los cromosomas durante la división nuclear. Los microtúbulos están también implicados en el transporte intracelular de vesículas y orgánulos y en la determinación y el mantenimiento de la forma de la célula.

1.2. ESTRUCTURA

Los microtúbulos son largos cilindros huecos compuestos normalmente por la asociación longitudinal de 13 protofilamentos. El protofilamento se forma a partir del ensamblaje alternativo de subunidades globulares de α y β tubulina (en forma de heterodímero $\alpha\beta$). Los protofilamentos interaccionan entre sí hasta completar la formación del microtúbulo.

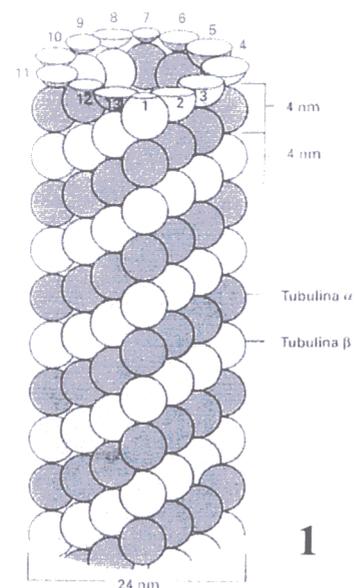


fig. 1- Estructura del microtúbulo (Paniagua *et al.*, 1998).

El microtúbulo presenta una polaridad debida a la disposición asimétrica de sus subunidades. Los dos extremos opuestos crecen y se despolimerizan a velocidades muy diferentes: presentan un extremo (+) o distal de crecimiento rápido, y un extremo (-) o

proximal de crecimiento lento.

Además de las α y β tubulinas, que forman el heterodímero $\alpha\beta$ tubulina, pertenece también a la superfamilia de las tubulinas, la γ tubulina.

La γ tubulina está presente en el material pericentriolar, en centriolos y en el cuerpo basal de cilios y flagelos (Muresan *et al.*, 1993; Fuller *et al.*, 1995; Komarova *et al.*, 1997 y Moudjou *et al.*, 1996 en Ruiz *et al.*, 1998). Forma anillos a los cuales se asocian las subunidades de $\alpha\beta$ tubulina para nuclear los microtúbulos (Zheng *et al.*, 1995; Wiese y Zheng, 1999). Erickson y Stoffer (1996) han propuesto un modelo en el que la γ tubulina forma una espiral que se prolonga tangencialmente en un protofilamento recto que sirve de núcleo de polimerización al que se añaden subunidades de $\alpha\beta$ tubulina durante la formación del microtúbulo.

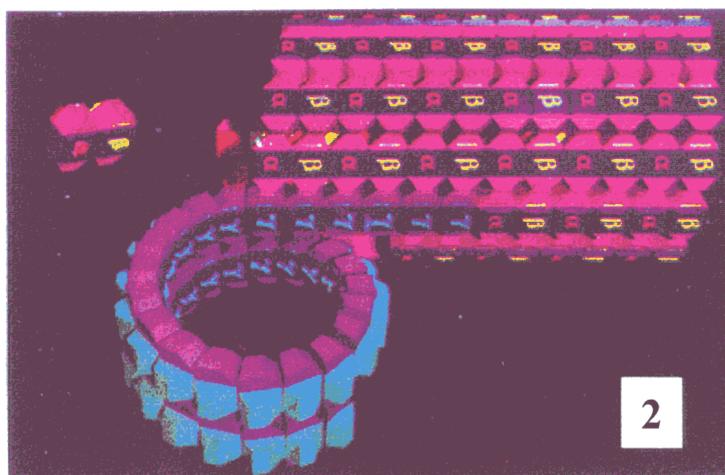


fig. 2- Modelo de nucleación del microtúbulo ensamblado a partir de la espiral de γ tubulina (Erickson y Stoffer, 1996).

1.2.1. Estructura de la tubulina

Las α y β tubulinas son una familia de proteínas de aproximadamente unos 450 residuos cada una, que se encuentran muy conservadas en la evolución. En el modelo de estructura de la tubulina (Nogales *et al.*, 1998) se propone la existencia de un núcleo

formado por dos láminas β , flanqueadas por doce hélices α . Se distinguen tres dominios: un dominio N terminal, constituido por láminas β paralelas que alternan con hélices α , sitio de unión del nucleótido; un dominio intermedio que contiene el sitio de unión del taxol en la subunidad β ; y un dominio carboxi terminal, que contiene dos hélices α que pueden albergar el sitio de unión de MAPs y de proteínas motoras.

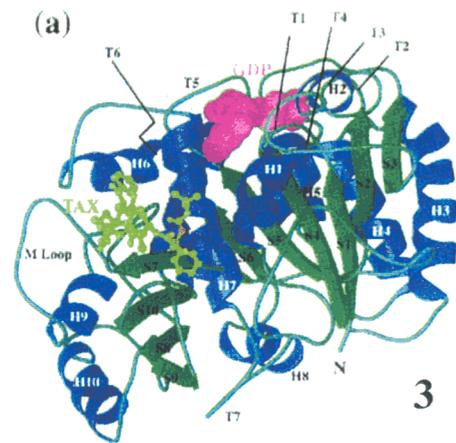


fig. 3- Modelo de estructura tridimensional propuesto por Nogales *et al.* (1998) para la β tubulina.

La γ tubulina tiene una menor expresión que las α y β tubulinas, con las que presenta una homología del 28-35%. En complejos aislados de extractos de *Xenopus* o *Drosophila* que contienen δ tubulina, se observan anillos abiertos de aproximadamente 25 nm de diámetro. Estos anillos nuclean microtúbulos *in vitro*.

1.3. DINÁMICA

El ensamblaje de los microtúbulos depende de varios factores: la presencia de GTP, iones Mg^{++} y EGTA (para quelar los iones de Ca^{++} libres) así como la temperatura ($37^{\circ}C$ en un tampón a pH fisiológico). En estas condiciones, la polimerización implica la hidrólisis de GTP en el heterodímero de tubulina, que se encuentra unido concretamente a la subunidad β . Los microtúbulos así formados se encuentran en equilibrio con la tubulina soluble, que es desplazado hacia la despolimerización cuando baja la temperatura o la concentración de iones Mg^{++} o bien cuando la concentración de dímeros de tubulina alcanza la concentración crítica (que es la concentración mínima de tubulina que queda sin ensamblar y que está en equilibrio con los microtúbulos en estado estacionario).

La polimerización de tubulina en microtúbulos presenta dos fases: una fase de retraso, en la que se forma el fragmento inicial del microtúbulo, y una fase más rápida de elongación. Los microtúbulos polimerizados no son en realidad estructuras estáticas, sino que se encuentran en estado estacionario creciendo y decreciendo estocásticamente. En esta situación, conocida como "inestabilidad dinámica", se consume continuamente energía suministrada por la hidrólisis del GTP de las subunidades que se van adicionando al microtúbulo. Los microtúbulos alternan entre fases de crecimiento lento y de despolimerización rápida (o "catástrofe"). Los microtúbulos en fase de catástrofe pueden volver a la fase de crecimiento en un proceso denominado de "rescate". La frecuencia de alternancia entre estas dos fases es diferente en ambos extremos del microtúbulo, siendo la tasa neta de elongación mayor en el extremo (+).

Los microtúbulos están asociados con proteínas accesorias, como las MAPs (proteínas asociadas a los microtúbulos), que al parecer regulan su ensamblaje e influyen sobre las interacciones de los mismos con otros componentes de la célula. Pertenecen a esta clase de proteínas tanto proteínas motoras (la quinesina o la dineína, por ejemplo), como proteínas estructurales (MAP1A y B, MAP2, tau). La estabilidad de los microtúbulos también puede verse influida por la presencia de iones como el Ca^{++} o el Mg^{++} , que estimulan respectivamente la despolimerización y la polimerización. Por su papel fundamental en la formación del huso mitótico, los microtúbulos son además el blanco de numerosas drogas antimitóticas. Se conocen un elevado número de drogas que inhiben la polimerización y provocan la despolimerización de los microtúbulos, como la colchicina o la vinblastina; otras, como el taxol, inhiben la despolimerización de los microtúbulos.

Uno de los factores determinantes para la estabilidad de los microtúbulos es la temperatura. Los microtúbulos de los mamíferos homeotermos despolimerizan a temperaturas por debajo de los 20°C . Sin embargo, existen organismos psicrófilos que están perfectamente adaptados a las bajas temperaturas y esto implica que la población microtubular debe mantener su estabilidad en estas condiciones de baja temperatura.

2. ESTABILIDAD DE LOS MICROTÚBULOS A BAJAS TEMPERATURAS

La investigación sobre la estabilidad de la tubulina a bajas temperaturas se inició en ciertas poblaciones de microtúbulos citoplásmicos de células de mamífero que son resistentes a la despolimerización a temperaturas cercanas a los 0°C. Brinkley y Cartwright (1975) y Salmon y Begg (1980) mostraron que los microtúbulos del cinetocoro en células en división no despolimerizaban a bajas temperaturas, mientras que sí lo hacen los microtúbulos interfásicos. Jones *et al.* (1980), en un estudio al microscopio electrónico en neuronas de rata, encontraron numerosos microtúbulos intactos después de incubar el tejido durante 1h a 0°C. Webb y Wilson (1980) y Margolis y colaboradores (Job *et al.*, 1981, 1982; Margolis y Rauch, 1981; Pirollet *et al.*, 1983) han realizado comparaciones entre poblaciones de sistemas microtubulares aisladas de cerebro de rata y de oveja, unas lábiles y otras estables al frío. Según estos autores, la estabilidad de estas fracciones de microtúbulos estables en frío, aisladas de mamíferos, se debe a la presencia de determinadas proteínas de bajo peso molecular asociadas a los microtúbulos.

Sin embargo, la mayor parte de nuestro conocimiento sobre la adaptabilidad al frío de los microtúbulos proviene de estudios llevados a cabo sobre las tubulinas de peces de aguas frías, organismos cuya temperatura interna difiere enormemente de la de los mamíferos (entre -2°C y +2°C).

2.1. DINÁMICA DE LOS MICROTÚBULOS A BAJAS TEMPERATURAS

Se han aislado microtúbulos del bacalao atlántico (*Gadus morhua*) y de diversos peces antárticos (principalmente de *Notothenia coriiceps neglecta* y *Notothenia gibberifrons*) (Williams y Correia, 1985; Detrich y Overton, 1986, 1988; Detrich y Parker, 1987, 1993). De los estudios realizados sobre el ensamblaje *in vitro* de la tubulina purificada de estos peces, se pueden extraer las siguientes conclusiones: la capacidad para ensamblar en frío se encuentra en la propia molécula de la tubulina ya que no requiere

proteínas asociadas para ello; la concentración crítica de ensamblaje de las tubulinas de estos peces a 0°C es similar a la de las tubulinas de mamíferos a 37°C, si bien a temperaturas suprafisiológicas (> 0°C) la concentración crítica disminuye para el ensamblaje de las tubulinas de peces antárticos; al igual que los microtúbulos de seres homeotermos, en caliente, los microtúbulos de peces antárticos a bajas temperaturas *in vitro* son estructuras dinámicas, compatibles con fenómenos de flujo de subunidades de tubulina e inestabilidad dinámica (Himes y Detrich, 1989; Detrich *et al.*, 1989).

Las tubulinas de peces antárticos se desdoblaron por electroforesis en las dos bandas, de α y β tubulina, con semejante movilidad que las de mamíferos. Las principales diferencias se centran a nivel de la subunidad α . Utilizando técnicas de isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional se observan bandas que no aparecen en las tubulinas de animales de sangre caliente; destaca la presencia de isoformas de la α tubulina con mayor carácter básico (con mayor proporción de aminoácidos básicos). Detrich *et al.* (1986, 1987) sugieren al menos dos mecanismos moleculares para obtener microtúbulos estables al frío: un mayor carácter básico de la α tubulina y la presencia de interacciones hidrofóbicas.

Por otro lado, los estudios realizados con tubulina purificada de huevos de las mismas especies de peces antárticos han demostrado que la capacidad de ensamblaje de esta tubulina es mayor que la de la tubulina del cerebro (Detrich *et al.*, 1992): de hecho la concentración crítica para la tubulina de los huevos era extremadamente baja, 0,057 mg/ml a 3°C, frente a un 0,87 mg/ml de la tubulina del cerebro. Estos resultados parecen apoyar la "hipótesis de la multitubulina" (Fulton y Simpson, 1976) según la cual, los distintos isotipos de la tubulina difieren en sus propiedades de ensamblaje: se propuso que la tubulina de los huevos se ensamblaba más eficientemente a causa de una disminución en la repulsión entre cargas, debido a que esta tubulina es menos ácida respecto a la del cerebro. Sin embargo, la secuencia de este isotipo de tubulina aún no se conoce.

2.2. ISOTIPOS DE α Y β TUBULINA

Los isotipos múltiples de α y β tubulina codificados por diferentes genes, están ampliamente distribuidos entre los eucariotas (aparecen en muchos animales, plantas, hongos y protistas). Las diferencias entre los productos de expresión se localizan, principalmente, en los últimos 15 aminoácidos del extremo carboxi terminal y, en menor medida, en la región amino terminal, entre las posiciones 25 y 60.

Su estructura, distribución y función han sido revisadas en varias ocasiones (Cowan y Dudley, 1983; Cleveland y Sullivan, 1985; Cleveland, 1987; Sullivan, 1988; Little y Seehaus, 1988; Joshi y Cleveland, 1990; Ludueña, 1993; Gaertig *et al.*, 1993; Raff, 1994; Ludueña, 1998).

Existe una enorme variabilidad entre isotipos. A veces, dos isotipos en el mismo organismo pueden diferir entre ellos sólo en una posición, como es el caso de la α tubulina de los flagelados fotosintéticos *Polytomella* y *Volvox*. En el otro extremo, los dos isotipos β de la ameba *Reticulomyxa* difieren en un 41%. Algunos organismos tienen una única forma de α pero más de una forma de β ; en otros se produce el fenómeno a la inversa. El número de isotipos también es variable, los mamíferos parecen tener seis formas de α y siete de β , mientras que la planta *Arabidopsis* tiene seis de α y nueve de β .

2.2.1. Significado funcional

Se han descrito tres posibles modelos para explicar el significado funcional de la existencia de isotipos distintos de la tubulina (Ludueña, 1998).

El modelo 1 considera que los isotipos no tienen un significado funcional. Podría aplicarse a aquellos isotipos que difieren en sólo una o dos posiciones de manera que, parece difícil que diferencias tan mínimas puedan tener un significado funcional.

Un segundo modelo propone que los isotipos podrían no tener una función específica *per se*, pero su presencia puede incrementar la capacidad de respuesta de los organismos a los cambios ambientales. Según este modelo, la existencia de varios isotipos diferentes supondría una ventaja adaptativa, sin que esto suponga una diferenciación funcional.

La tercera posibilidad sería la de que distintos isotipos podrían realizar funciones diferentes. Es decir, los isotipos difieren en ciertas propiedades que pueden modular su comportamiento y, por lo tanto, su función.

A. Isotipos sin significado funcional (modelo 1)

Todos los isotipos β de mamíferos, incluyendo el BVI muy divergente, forman tanto la red interfásica como el huso mitótico; de forma que no parecen existir diferencias funcionales inherentes a los distintos isotipos.

En el hongo *Aspergillus* los isotipos son expresados diferencialmente en las fases del ciclo celular (crecimiento, esporulación). Sin embargo, en todos los casos las deficiencias en cualquiera de las distintas isoformas, son compensadas con una mayor expresión de las otras.

B. Isotipos que son adaptativos pero que no realizan funciones específicas (modelo 2)

Un ejemplo de este modelo se produce en el vegetal *Arabidopsis*, que tiene seis genes para la α tubulina y nueve para la β . La transcripción de algunos de los genes β es dependiente de la temperatura. A bajas temperaturas, disminuye la transcripción de TUB2, TUB3, TUB6 y TUB8 y la de TUB9 aumenta. TUB9 parece ser más estable al frío. Por lo tanto, en *Arabidopsis* la expresión diferencial es un mecanismo de adaptación a los cambios ambientales (Chu *et al.*, 1993). Joshi *et al.* (1987) también observaron que la presencia de BVI confería cierta estabilidad al frío a los microtúbulos.

El mismo modelo se aplica claramente a los nematodos. En cepas salvajes del nematodo *Haemonchus contortus* existen varios isotipos de β tubulina, mientras que en cepas resistentes al benzimidazol solo hay uno. Esto implica que la presencia de ciertos isotipos ayuda a mediar la resistencia frente a factores ambientales adversos.

En líneas celulares tumorales humanas hay un incremento en la expresión de β III y β IVa cuando las células se hacen resistentes a la estramustina. El incremento de β II es mucho menor. El taxol también altera la expresión de los isotipos β de otras líneas celulares.

En definitiva, la expresión diferencial de los isotipos de tubulina puede contribuir a desarrollar resistencia frente a las drogas antitubulina en células tumorales, de la misma manera que, diferencias en la expresión de isotipos, ayuda a nematodos y vegetales a adaptarse a condiciones ambientales adversas.

C. Isotipos con funciones especializadas (modelo 3)

En células PC-12 de rata se expresan cinco isotipos β (β I- β V) pero se incorporan preferencialmente β I, β II y β IV en sus microtúbulos. De hecho, se ha descrito que β III aparece en estas células en forma globular y no parece estar incorporado en los microtúbulos. Por otra parte, células de la traquea y de retina bovina que expresan β II y β IV, presentan sólo β IV en sus microtúbulos axonemales.

En *Drosophila* se han descrito cuatro genes que codifican para la β tubulina, definiéndose el patrón de expresión de tres de ellos. Uno de los isotipos (β 2) parece expresarse específicamente en células germinales, mientras que los otros dos están implicados en la formación del citoesqueleto en el resto de las células, siendo el β 3 la forma más divergente, y con una función más específica que el β 1.

2.3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA

La heterogeneidad de la tubulina no es sólo debida a la presencia de isotipos sino que también pueden aparecer múltiples formas de tubulina por modificaciones postraduccionales que tienen lugar en el producto primario del gen.

Se han descrito modificaciones post-traduccionales en tubulinas aisladas de peces de aguas frías. En concreto, estudios inmunológicos han detectado un alto grado de acetilación y un predominio de la forma detirosilada en tubulina aislada del cerebro del bacalao atlántico (*Gadus morhua*), lo cual se ha relacionado con la característica estabilidad de sus microtúbulos (Billger *et al.*, 1991). Los microtúbulos de otras tres especies de peces de aguas frías (*Zoarces viviparus*, *Labrus bergylta* y *Oncorhynchus mykiss*) también se han encontrado acetilados y detirosilados (Modig *et al.*, 1994).

2.3.1. Acetilación

La acetilación de la α tubulina se produce específicamente sobre el grupo ϵ amino de la Lys 40. Esta modificación tiene el efecto de neutralizar la carga positiva de este grupo y se ha observado también en las α tubulinas de diversos organismos: vertebrados, insectos, equinodermos, nematodos, plantas y los protistas *Physarum*, *Trypanosoma*, *Chlamydomonas*, *Trichomonas* y otros (Ludueña, 1998). Los microtúbulos que presentan tubulina con la Lys modificada son más estables en presencia de drogas antitubulina (Geyp *et al.*, 1996). La acetilación es particularmente notable en los microtúbulos axonemales, que son generalmente estructuras muy estables, aunque otras poblaciones de microtúbulos también contienen tubulina acetilada (Ludueña, 1998). Se ha caracterizado una α tubulina acetil transferasa y una tubulina deacetilasa. La acetilación parece ocurrir en la tubulina después de que ésta es incorporada en los microtúbulos (Ilscherner y Brandt, 1996). Aparte de incrementar la estabilidad de los microtúbulos, la función precisa de la acetilación no es aún conocida.

2.3.2. Tirosilación, detirosilación y tubulina no tirosilable

La α tubulina es susceptible de entrar en un ciclo de eliminación y de readición del residuo de tirosina en su extremo carboxilo terminal. Este ciclo se produce tanto en los isotipos de α tubulina que presentan una tirosina en esta posición terminal como en los que carecen de ella.

La detirosilación se debe a la acción de una tubulina carboxipeptidasa específica. La enzima actúa tanto sobre la forma polimerizada como sobre el el heterodímero, si bien es dos o tres veces más activa sobre la primera.

La readición del grupo tirosilo es realizada por una tubulina tirosina ligasa que actúa preferentemente sobre la α -tubulina soluble, y requiere ATP.

Esta modificación está presente en la tubulina de varios vertebrados, gambas y tripanosomas (Ludueña, 1998).

La tubulina tirosilada y no tirosilada forma, a menudo, poblaciones de microtúbulos con diferentes funciones en la misma célula. La tubulina tirosilada es común en la red interfásica y en el huso mitótico, mientras que la tubulina no tirosilada aparece en algunos microtúbulos interfásicos (Gundersen *et al.*, 1984) y en elementos citoesqueléticos como cilios, flagelos, centriolos y bandas marginales (Gundersen y Bulinski, 1986; Sherwin *et al.*, 1987). Los microtúbulos detirosilados constituyen *in vivo*, aparentemente, una población más estable.

* Tubulina no tirosilable

Hay una forma de α tubulina modificada postraduccionalmente en la cual se han eliminado los dos últimos residuos (Glu450 y Tyr451). Esta forma de tubulina, denominada tubulina A2, no es sustrato para la tubulina tirosina ligasa por lo que esta población no entraría en ciclo de tirosilación-detirosilación (Barra *et al.*, 1980; Parturle-Lafanechere *et*

al., 1994).

En vertebrados, esta modificación es particularmente frecuente en la tubulina cerebral. Su distribución en neuronas es distinta de aquella de la tubulina detirosilada (Paturle-Lafanecher *et al.* 1994). También se han descrito poblaciones no tirosilables en cilios y flagelos de erizo (Mary *et al.*, 1996). Los microtúbulos que contienen tubulina A2 se piensa que son muy estables.

Por el momento se desconocen los mecanismos enzimáticos implicados en esta modificación postraducciona.

2.3.3. Otras modificaciones postraduccionales de la tubulina

A. Fosforilación

La fosforilación de la β tubulina se observó, por primera vez, en el cerebro de rata (Eipper, 1972) en un isotipo que fué identificado, más tarde, como β III (Ludueña *et al.*, 1988; Diaz-Nido *et al.*, 1990). Eipper localizó el sitio de la fosforilación *in vivo* en la región carboxi terminal, pero puntualizó que la fosforilación *in vitro* era de muy baja actividad específica y que ésta podría tener lugar en varios sitios de la tubulina (Eipper, 1974a,b).

Se ha identificado con precisión la Ser444 como punto preferente de fosforilación, y en menor medida la Tyr437 en el isotipo β III (Diaz-Nido *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1991), aunque aún no está claro cuales son las enzimas que llevan a cabo la fosforilación *in vivo*.

La función de la fosforilación tampoco está clara; parece que la eliminación del fosfato inhibe el ensamblaje de microtúbulos inducido por MAPs, sin embargo, no afecta al ensamblaje de la tubulina pura en glicerol: el fosfato puede, pues, mediar la interacción con las MAPs (Khan y Ludueña, 1996).

Posteriormente se ha descrito la fosforilación en tubulinas de organismos tan diferentes como: el isotipo β VI de la tubulina del eritrocito de pavo (en la Ser441; Rudiger y Weber, 1993), la tubulina de la lombriz del tabaco (Song *et al.*, 1994), la tubulina de la zanahoria (Koontz y Choi, 1993), la α tubulina de linfocitos B humanos activos (Peters *et al.*, 1996), la tubulina de los axonemas del espermatozoide del erizo de mar (Stephens, 1975) o la del protista *Chlamydomonas* (Piperno y Luck, 1976).

B. Poliglutamilación

Esta modificación consiste en la incorporación postraduccional de hasta siete residuos de glutamato en la región carboxi terminal de ambas subunidades de la tubulina, la α y la β (Eddé *et al.*, 1990).

Se ha descrito en la α tubulina neuronal, en la cual es muy común (Eddé *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1991; Rudiger *et al.*, 1995). En mamíferos, las cadenas de poliglutamato son añadidas al grupo γ carboxilo del residuo Glu445 en la α 1 y α 2, del Glu441 en el BI, del Glu435 en el BII, del Glu438 en el BIII y del Glu440 en el BIVa (Eddé *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1991; Rudiger *et al.*, 1992; Redeker *et al.*, 1992; Mary *et al.*, 1994 en Ludueña, 1998).

La poliglutamilación es reversible: de los seis glutamatos normalmente añadidos en la tubulina del cerebro, los tres últimos son rápidamente eliminados, mientras que los tres primeros son más estables. Es probable que exista más de una enzima implicada en la deglutamilación, por lo que el ciclo de glutamilación y deglutamilación podría ser muy complejo (Audebert *et al.*, 1993).

La función de la poliglutamilación no está clara, pero obviamente el resultado es la adición de un número grande de cargas negativas a una región ya fuertemente ácida. Hay evidencias de que la poliglutamilación favorece la unión de kinesina a la tubulina (Larcher *et al.*, 1996). El grado de poliglutamilación influye también sobre la unión de tau tanto a

la α como a β tubulina de ratón (Boucher *et al.*, 1994). Por último, se ha sugerido, que la poliglutamilación juega un papel en la movilidad flagelar; esta hipótesis está apoyada por la observación de que un anticuerpo obtenido frente a la tubulina poliglutamilada puede disminuir la amplitud de la onda flagelar, aunque no afecta a su frecuencia (Gagnon *et al.*, 1996).

La poliglutamilación de la tubulina es independiente de otras modificaciones postraduccionales. La α tubulina puede entrar en el ciclo de tirosilación-detirosilación independientemente de su grado de glutamilación (Eddé *et al.*, 1992). Aproximadamente el 10% de las formas glutamiladas de la clase III de la β tubulina están también fosforiladas (Alexander *et al.*, 1991).

C. Poliglicilación

Es una modificación postraducciona similar a la poliglutamilación. Se trata de la adición de 2-40 residuos de glicina en la región carboxilo terminal de ya sea de la α o la β tubulina, sobre un residuo glutamato (Glu445 en la α y Glu437 en la β), si bien no se excluye la posibilidad de que se produzca también sobre otros residuos ácidos de esta región.

Hasta ahora, solo se ha demostrado en microtúbulos axonemales, tanto de protozoos (en los cilios de *Paramecium*, *Tetrahymena* y *Stylonichya*) como de metazoos (en esperma de humanos y otros mamíferos, pájaros, erizos de mar y caracoles) (Ludueña, 1998). La poliglicinación, sin embargo, no se ha detectado en el flagelado *Euglena* (Bressac *et al.*, 1995; Levilliers *et al.*, 1995; Bré *et al.*, 1996).

La función de la poliglicilación no está clara.

D. Tubulina de membrana

Esta forma de tubulina no ha sido aún secuenciada así que no está claro si representa una distinta isoforma de tubulina, codificada por genes diferentes, o si está modificada postraduccionalmente.

La tubulina de membrana fue descrita por Bhattacharyya y Wolff (1975) en el tiroides bovino y en el cerebro de rata y por Stephens (1981) en los cilios de la vieira *Aequpectern irradians*.

La naturaleza de la tubulina de membrana es aún desconocida: podría constituir un isotipo de tubulina todavía no descubierto, con una región hidrófoba que permitiría su inclusión en la membrana. También podría ser una tubulina modificada postraduccionalmente. Por último, se apunta la posibilidad de una tubulina con propiedades conformacionales inusuales, que permitirían su unión con gran afinidad a la bicapa lipídica (Niggli y Burger, 1987).

3. LOS CILIADOS COMO MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LOS SISTEMAS MICROTUBULARES

Como se desprende del apartado dos, el problema de la adaptación al frío de los microtúbulos se ha afrontado hasta ahora únicamente en el ámbito de los vertebrados. En este aspecto, así como en otros de la investigación de la biología celular y molecular, la utilización de un organismo eucariota unicelular supone evidentes ventajas experimentales, como la elevada tasa de reproducción en condiciones controladas de laboratorio, fácil manipulación con técnicas de biología celular y molecular y, presencia de fenómenos sexuales que determinan recombinación genética y renovación de las líneas celulares (Orias, 1981; Preer, 1986).

En los últimos 15 años la utilización de los protozoos ciliados como modelos experimentales ha aportado importantes avances en el campo de la biología celular y

molecular. Podemos citar tres ejemplos significativos: 1) Al comienzo de los años 80, se llevó a cabo, en el ciliado *Tetrahymena*, la primera caracterización de las extremidades teloméricas del cromosoma eucariota, como secuencia nucleotídica repetida e invertida (Blackburn y Szostak, 1984). Posteriormente, se ha caracterizado en el mismo ciliado un nuevo tipo de DNA polimerasa específica para dicha región (telomerasa), que se ha revelado funcional en todas las células eucariotas (Blackburn, 1991). 2) En 1985, se puso en evidencia en los ciliados *Tetrahymena* (Horowitz y Gorovsky, 1985), *Paramecium* (Caron y Meyer, 1985; Preer *et al.*, 1985) y *Stylonychia* (Helftenbein, 1985), la primera desviación del código genético considerado "universal" en células eucariotas ; otras desviaciones se han descrito sucesivamente en otros protistas. 3) La caracterización del fenómeno de "autosplicing", es decir, la capacidad de eliminación de los intrones y reunión de los exones en una molécula de RNA, descubrimiento efectuado en el ciliado *Tetrahymena* (Cech, 1986).

Los ciliados son además el grupo de protozoos más favorecido para el estudio experimental de la morfogénesis. Son organismos unicelulares muy complejos con una elaborada organización, donde se da tanto la disposición regular de ciertos orgánulos (esencialmente cuerpos basales, homólogos a centriolos), como la existencia de complejos organelares que funcionan como órganos especializados: un aparato oral, para la captura de comida y fagocitosis; un sistema de vacuolas contráctiles (cuyos poros se abren en lugares precisos del cortex) para drenar y excretar líquidos y un citoprocto o ano para la eliminación de los residuos de la digestión. Estos elementos están integrados en un modelo polarizado (polaridad antero-posterior, que se corresponde con la dirección normal con la que nada la célula y polaridad dorsoventral del organismo completo) y asimétrico (asimetría derecha-izquierda expresada tanto a nivel de la célula entera como a nivel de cada cuerpo basal). Durante la reproducción asexual, cada división supone un conjunto de procesos morfogenéticos precisamente coordinados a muy diferentes niveles, desde el ensamblaje de estructuras elementales (microtúbulos, cuerpos basales y otros elementos del citoesqueleto cortical) a la remodelación del modelo superficial.

3.1. SISTEMAS MICROTUBULARES EN CILIADOS

Los ciliados representan dentro de las células eucariotas, el phylum en el cual existe una mayor diversidad y abundancia en sistemas microtubulares. No solo presentan abundantes cilios sobre su superficie, sino también un complejo citoesqueleto tanto cortical como interno, cuyas redes y haces están bien desarrolladas y claramente segregadas en diferentes áreas intracelulares. En *Paramecium*, por ejemplo, se han descrito hasta 13 sistemas microtubulares distintos: uno es cortical y transitorio, otros tres, también transitorios, son intranucleares y, el resto son introcitoplasmáticos y similares a la típica red citoplasmática de células eucariotas superiores.

En los ciliados, a pesar de la diversidad estructural en el citoesqueleto microtubular, la diversidad genética es mucho más reducida que la de los organismos pluricelulares: tanto la α como la β tubulina están codificadas por un número bajo de genes que además, son muy poco divergentes a nivel de secuencia. Un ejemplo es el ciliado *Tetrahymena* sp. que construye su gran variedad de redes microtubulares a partir de sólo un gen α y dos genes β , casi o completamente idénticos en su secuencia (respectivamente, *T. pyriformis* (Barahona *et al.*, 1988); *T. termophila*, Gaertig *et al.*, 1993).

Las modificaciones postraduccionales de la tubulina en ciliados coinciden con las identificadas en organismos pluricelulares: se ha descrito la acetilación (Fleury, 1991; Adoutte *et al.*, 1991; Delgado-Viscogliosi, 1996) y la poliglutamilación (Bré *et al.*, 1994). Además, una modificación postraducciona recientemente caracterizada, la poliglicilación (Redeker *et al.*, 1994), se descubrió inicialmente en axonemas de *Paramecium* y posteriormente en aquellos de una gran variedad de organismos desde protistas a mamíferos (Adoutte *et al.*, 1985, 1991). En cuanto a la tirosilación-detirosilación en protistas, hasta el momento sólo se ha descrito en el grupo de los trypanosomas (Sasse y Gull, 1988).

3.2. EL CILIADO ANTÁRTICO *Euplotes focardii*

La especie utilizada como modelo en este estudio *Euplotes focardii* (Valbonesi y Luporini, 1990), fue aislada de sedimento marino recogido en la Bahía de Terranova (mar de Ross, Antártida). Es un ciliado hipotrico psicrófilo, que vive a una temperatura óptima comprendida entre -1.8 y 2 °C y presenta un límite máximo de temperatura en cultivos de laboratorio de 8-10°C. Este ciliado constituye, por lo tanto, un sistema muy adecuado para tratar de clarificar cuales son las propiedades intrínsecas de la tubulina correlacionadas con la estabilidad al frío de los microtúbulos.

3.2.1. Morfología general

E. focardii está aplastado dorsoventralmente. Su forma y dimensiones varían enormemente en función del tipo de alimentación. Habitualmente la forma celular es elipsoidal aunque las células sobrealimentadas adoptan una forma casi redondeada. Las células vegetativas presentan unas dimensiones medias *in vivo* de 79,8 µ de longitud y 58,6 µ de anchura.

El aparato nuclear está formado por un macronúcleo de gran tamaño con forma de herradura y un micronúcleo, esférico y compacto, localizado cerca del macronúcleo, en la mitad anterior izquierda de la célula.

3.2.2. Ciliación e infraciliación

Euplotes focardii presenta una clara diferenciación con respecto a la distribución de los sistemas ciliares e infraciliares en las superficies ventral y dorsal. La mayor parte de las estructuras locomotoras y de alimentación se sitúan en la superficie ventral de la célula.

El área oral ocupa aproximadamente los dos tercios anteriores de la cara ventral de la célula. En el lado izquierdo se implantan las membranelas adorales compuestas de filas de cilios. Al lado derecho de la cavidad bucal se presenta un complejo paroral muy desarrollado que está formado por filas oblicuas de cinetosomas.

En *E. focardii* la ciliación somática ventral está compuesta por 19 cirros: 10 cirros frontoventrales, 5 transversos, 2 marginales y 2 caudales. Los cirros frontoventrales están localizados en la parte anterior y media de la superficie ventral. Los cirros transversos, más desarrollados que el resto, se sitúan en la mitad posterior del cuerpo y están dispuestos según una configuración característica en forma de coma invertida. Los cirros marginales emergen del lado izquierdo de la célula, el más anterior se localiza, de forma característica en esta especie, inmediatamente por debajo del area oral. Por último, los cirros caudales se sitúan en la parte posterior derecha de la célula.

La ciliación somática dorsal está constituida por 10-11 cinetias longitudinales, 9 o 10 son dorsales y 1 o 2 ventrolaterales. Todas ellas presentan cilios cortos denominados "cerdas", excepto en la zona ecuatorial de la célula donde estos cilios están ausentes. El número de cinetosomas de cada cinetia varía en las células según las dimensiones celulares.

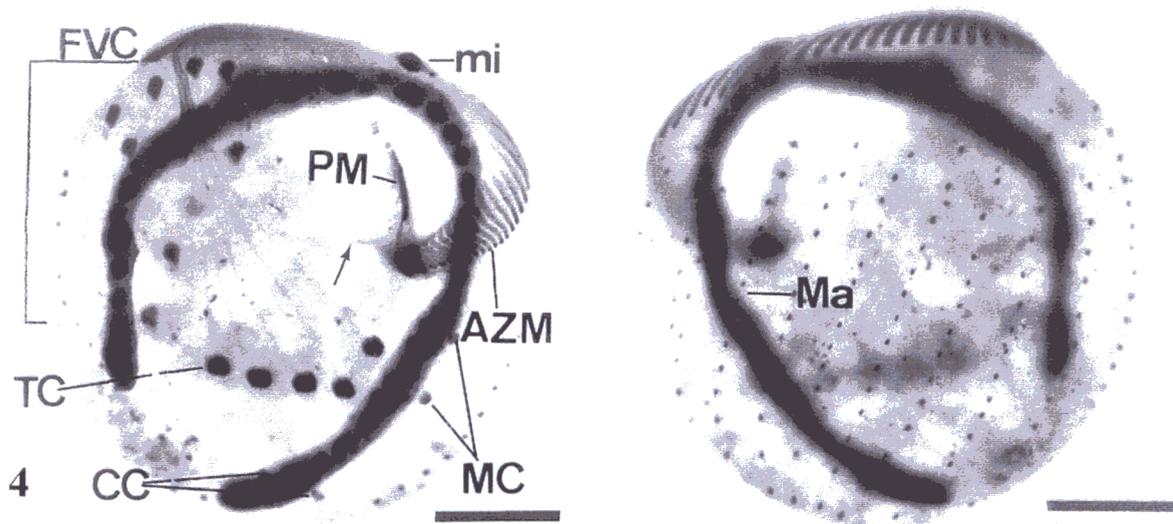


fig. 4- Morfología general del ciliado *Euplotes focardii* (Serrano *et al.*, 1992). Infraciliación ventral (a) y dorsal (b) de un individuo de *E. focardii* impregnado con la plata. mi: micronúcleo; ma: macronúcleo; pm: complejo paroral; FVC: cirros frontoventrales; TC: cirros transversos; MC: cirros marginales; CC: cirros caudales; AZM: zona adoral de membranelas.

4. INMUNOCITOQUIMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA TUBULINA. ANTECEDENTES

Los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales han sido elementos de gran utilidad en la identificación y localización inmunocitoquímica de diversas proteínas y en el estudio de su organización y distribución intracelular mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, western blot e inmunoprecipitación.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales se han utilizado separada o conjuntamente en el estudio de varias características de la tubulina (revisión, Andreu y de Pereda, 1993).

4.1. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A DOMINIOS FUNCIONALES DE LA TUBULINA

Los anticuerpos policlonales y monoclonales se han utilizado para el estudio de la estructura y la distribución de dominios funcionales en los monómeros α y β tubulina.

La interacción entre las subunidades de α y β tubulina en la formación del microtúbulo se han estudiado con anticuerpos policlonales específicos de determinadas secuencias de los monómeros de α y β tubulina: las zonas $\alpha(430-443)$ y $\beta(412-431)$, se encuentran en la zona exterior del protofilamento, y son accesibles a los anticuerpos en microtúbulos estabilizados con paclitaxel, hojas de tubulina inducidas por Zn^{++} , anillos inducidos por Mg^{++} , en microtúbulos de células PtK2 e inducen el ensamblaje anormal de tubulina en estructuras abiertas. Lo mismo sucede con el péptido $\beta(153-165)$. Los anticuerpos no reaccionan con las secuencias $\alpha(214-226)$ y $\beta(241-256)$, en ninguno de los casos anteriores. Sin embargo, se vuelven accesibles a los anticuerpos tras la fijación. La secuencia $\alpha(155-168)$, al contrario que la zona $\beta(153-165)$, se encontraba antigénicamente ocluida, sugiriendo que ambas zonas pueden estar localizadas en los contactos entre

protofilamentos, estando la primera en una zona más interna que la segunda (Arévalo *et al.*, 1990). Otra zona estudiada con anticuerpos policlonales se encuentra en el extremo amino terminal. Este es el caso del péptido $\beta(28-38)$ que no es reconocido por el anticuerpo ni en microtúbulos ensamblados *in vitro* en presencia de MAPs ni en microtúbulos nativos o fijados de células PtK2, pero sí en el heterodímero (Chene *et al.*, 1992).

Los anticuerpos policlonales también se han utilizado para la localización de los posibles sitios en la estructura de la tubulina que interaccionan con diferentes ligandos antimitóticos como la colchicina y la vinblastina. Los anticuerpos no interfieren en la unión de las drogas pero su unión a tubulina es menor cuando la droga está unida por lo que deben de inducir un cambio conformacional en la proteína (Morgan y Spooner, 1983). La localización del sitio de unión intercambiable del GTP en la subunidad de β tubulina se ha estudiado utilizando un anticuerpo específico que compite por el mismo sitio inhibiendo la incorporación del GTP y, por lo tanto, la polimerización de los microtúbulos (Hesse *et al.*, 1985; 1987).

Con anticuerpos policlonales y monoclonales se han definido las secuencias de la tubulina implicadas en la interacción con diferentes MAPs (Cross *et al.*, 1994) o las que intervienen en la interacción de la tubulina con otras proteínas así como en la regulación de su activación (Roychowdhury *et al.*, 1993).

La utilización de anticuerpos monoclonales ha permitido determinar con más detalle sitios funcionales de la tubulina. De esta forma, el estudio de determinadas secuencias del extremo carboxi terminal de α y β tubulina muestra que hay determinadas zonas expuestas como $\alpha(426-450)$ y $\beta(416-430)$, pues son reconocidas tanto en microtúbulos fijados como nativos (Breitling y Little, 1986), lo que se ha confirmado con anticuerpos policlonales específicos de determinadas secuencias de ambas subunidades (de la Viña *et al.*, 1988).

4.2. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A DIFERENTES ISOFORMAS DE TUBULINA

La utilización de anticuerpos también ha permitido detectar distintas isoformas de tubulina en distintos organismos. Así, mediante un anticuerpo policlonal específico de un péptido conservado de la γ tubulina de *Arabidopsis*, se han identificado al menos dos isoformas de esta proteína (Liu *et al.*, 1994). La presencia de diferentes isoformas se ha estudiado de forma más detallada con anticuerpos monoclonales permitiendo, por ejemplo, el análisis de la complejidad antigénica de la tubulina de cerebro codificada por diferentes genes de tubulina (Gozes y Barnstable, 1982).

La posible diferenciación funcional de las distintas isoformas varía en función de los organismos y las poblaciones microtubulares estudiadas. Las diferentes isoformas de β tubulina de mamífero, parecen distribuirse homogéneamente para formar microtúbulos como copolímeros de todos los isotipos expresados (Lewis *et al.*, 1987; Lopata y Cleveland, 1987). Sin embargo, estudios con anticuerpos monoclonales han mostrado que las isoformas de α y β tubulina se distribuyen de forma distinta formando aparatos mitóticos heterogéneos, donde la(s) isoforma(s) de α tubulina están localizadas preferencialmente en el huso y la(s) de β en los microtúbulos astrales (Oka *et al.*, 1990). Así mismo ocurre en el cerebro de vertebrados como es el caso de la isoforma de β tubulina en cerebro bovino (Renthal *et al.*, 1993).

Otras características estructurales de las isoformas de la tubulina se han determinado utilizando anticuerpos monoclonales. Así, se han localizado distintos epítomos de la tubulina a lo largo de los microtúbulos en diferentes organismos y en la misma célula y su expresión diferente a lo largo del desarrollo (Dráber y Dráberová, 1986; Dráber *et al.*, 1988). También se ha determinado que las diferentes características estructurales de las diferentes isoformas de la tubulina se traducen en distintas propiedades funcionales, como por ejemplo, las diferentes propiedades de ensamblaje están en función de los distintos

tipos de los isotipos de β tubulina que estén formando los heterodímeros (Barnejee *et al.*, 1992).

4.3. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE MODIFICACIONES POSTTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA

Con anticuerpos monoclonales se han identificado las zonas concretas de la tubulina donde se producen acetilaciones postraducionales. Utilizando anticuerpos específicos de una isoforma de α tubulina que se encuentra en el axonema del erizo de mar, del esperma de *Drosophila* y humano, se ha localizado que la acetilación *in vivo* se encuentra en el grupo ϵ amino de la Lys40 (Piperno y Fuller, 1985). Adicionalmente, la acetilación se ha detectado en la secuencia $\alpha(25-50)$ de la α tubulina (LeDizet y Piperno, 1987) con el anticuerpo 611B1.

Con anticuerpos policlonales específicos del extremo carboxi terminal de la forma tirosilada y no tirosilada de α -tubulina, se demostró por primera vez, en células fijadas, que hay una distribución separada de ambos tipos de α tubulina, dando lugar a poblaciones de microtúbulos estructuralmente diferentes (Gundersen *et al.*, 1984). Este tipo de modificación postraduccional también se ha identificado con el anticuerpo monoclonal YL1/2. Este se une específicamente a la forma tirosilada de la α tubulina, y su microinyección en diversas líneas celulares de mamífero, ha permitido determinar que la tirosilación no tiene aparentemente ninguna implicación funcional (Wehland *et al.*, 1983; Wehland y Willingham, 1983; Wehland *et al.*, 1984) pues no afecta a la inestabilidad dinámica (Idriss *et al.*, 1991). Sin embargo, se ha observado mediante la utilización conjunta de anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de la tubulina tirosilada y la no tirosilada, que estas dos formas de la tubulina se encuentran distribuidas en diferentes poblaciones de microtúbulos. Así, la tubulina tirosilada está preferencialmente en los microtúbulos más dinámicos y la otra en los más estables, aunque esta modificación postraduccional se produce después de la estabilización de los microtúbulos (Wehland y

Weber, 1987; Kreis, 1987). Por otro lado, con la utilización combinada de anticuerpos policlonales y monoclonales, se ha visto la posible función de la tirosilación. Parece estar implicada en la polimerización de los microtúbulos, como se ha visto en los microtúbulos neuronales en los que la presencia de la α tubulina tirosilada aumenta en el extremo más (Brown *et al.*, 1993). De igual forma, la función de la tirosilación en α tubulina, se ha intentado estudiar con el anticuerpo monoclonal 20C6 que localiza esta forma de la α tubulina en los microtúbulos de células normales de cerebelo de rata con sinaptogénesis completa (Poddar y Sarkar, 1993).

Con el anticuerpo monoclonal GT335 se ha localizado la poliglutamilación en diferentes especies como en el extremo carboxiterminal de la tubulina de diferentes ciliados (Bré *et al.*, 1994) así como en la de cerebro de vertebrados con el anticuerpo monoclonal GT335 (Wolf *et al.*, 1994).

1. OBJETIVOS

Este trabajo se ha planteado como una aproximación a los mecanismos de estabilidad de los sistemas microtubulares en ambientes psicrófilos, utilizando como modelo el protista ciliado *Euplotes focardii*. Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

(1) Determinar la organización del citoesqueleto microtubular en este ciliado antártico. Analizar comparativamente el modelo resultante con el propuesto para otras especies mesófilas del género.

(2) Analizar las secuencias primarias de la α y β tubulina de *E. focardii*: semejanzas y diferencias estructurales con las de otros organismos.

(3) Obtener anticuerpos específicos dirigidos contra péptidos sintéticos correspondientes a regiones variables de los distintos isotipos de β tubulina.

(4) Determinar la relación entre la posible existencia de distintos isotipos de β tubulina y su expresión o funcionalidad diferencial.

(5) Caracterizar las modificaciones postraduccionales en la tubulina de *E. focardii* (en células en interfase y en células en división) y analizar el posible papel de la maquinaria postraduccional en la producción de las poblaciones de microtúbulos adaptados a bajas temperaturas.

1. MATERIALES

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1. Protozoos ciliados

* *Euplotes focardii*

Para el presente estudio se ha utilizado la especie *Euplotes focardii* cedida por los Drs. Valbonesi y Luporini del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Camerino (Italia). Dicha especie fue aislada de muestras recogidas en enero de 1988 en una pequeña cueva al Este de la base antártica italiana localizada en la Bahía de Terra Nova (Mar de Ross, 74°42', 164°) y, junto a ella, fueron identificados otros ciliados pertenecientes a los géneros *Aspidisca*, *Cyclidium*, *Diophrys*, *Epiclintes*, *Paraurostyla*, *Pleuronema*, *Uronema* y *Uronychia* (Valbonesi y Luporini, 1990).

Para la recolección de las muestras se utilizó una draga tipo "Petersen" introducida a una profundidad de 7 m. Los parámetros ambientales medidos en el momento del muestreo fueron los siguientes: salinidad 35‰, temperatura -1,8°C y pH 8,1-8,2. Las muestras fueron almacenadas en obscuridad, a 2-4°C, durante tres meses antes de ser analizadas. Ejemplares del género *Euplotes* posteriormente descritos como *Euplotes focardii* (Valbonesi y Luporini, 1990), fueron aislados y alimentados con el alga *Dunaliella tertiolecta* o con bacterias no identificadas presentes en la muestra original, mantenidas en el medio Luria-Bertani (Bacto Triptona 1%, extracto de levadura 0,5%).

Recibimos dos líneas diferentes de *Euplotes focardii*: la línea utilizada para la descripción original de la especie, depositada oficialmente como TN1 (o CLAP 1624/17), y la línea etiquetada como TN30.

* *Euplotes vannus*

E. vannus es una especie marina adaptada a temperaturas medias, que se ha utilizado para la realización de estudios comparativos con la especie psicrófila. La

población fue aislada en 1990 por la Dra. Perez-Uz, a partir de una muestra tomada de un tanque de cultivo de rotíferos utilizados para la alimentación de peces en el Sea World Aquarium de San Diego (Estados Unidos).

1.1.2. Tubulina de cerebro bovino

La tubulina de cerebro bovino, proporcionada por el grupo del Dr. J.M. Andreu, fue purificada utilizando el procedimiento de Weisenberg modificado (Weisenberg et al., 1968; Lee et al. 1973; Andreu y Timasheff, 1982), tras lo cual se almacenó en nitrógeno líquido.

1.1.3. Animales de laboratorio

Para la producción de anticuerpos se emplearon conejos hembras de Nueva Zelanda de 3-3,5 Kg.

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

1.2.1. Agua de mar artificial

El medio de cultivo utilizado para *E. focardii* fue agua de mar sintética de la marca comercial Instant Ocean (3,33 % en agua destilada), esterilizada en autoclave a 120°C durante 20 min. Una vez estéril, el medio puede almacenarse a 4°C durante uno o dos meses.

A dicho medio se han añadido el alga verde *Dunaliella salina* o la bacteria *Vibrio natriegens* utilizadas como fuente alimenticia por el ciliado.

1.2.2. Medio de Walne

Se trata de un medio enriquecido con trazas de metales y vitaminas que se ha utilizado para los cultivos de mantenimiento del alga verde *Dunaliella salina*.

Está compuesto por una mezcla de dos soluciones:

Solución A

A un volumen de 1.000 ml de agua destilada se añaden:

100 g de NaNO_3

45 g de EDTA (Na)

33,6 g de H_3BO_3

20 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,36 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

1,80 g de EDTA (Fe) o FeCl_3 como sustitutivo.

Solución B

Para un volumen de 100 ml de agua destilada se añaden:

2,1 g de ZnCl_2

2,0 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,9 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

El medio de Walne se obtiene a partir de la mezcla de 1.000 ml de la solución A con 1 ml de la solución B.

Por último, añadimos a este medio 0,1 ml de una solución vitamínica preparada de la siguiente forma: a un volumen de 200 ml de agua destilada se añaden 10 mg de vitamina B_{12} y 200 mg de vitamina B_1 .

1.2.3. Medio SW/PYE-Agar Peptona-Extracto de levadura-agua de mar

El medio SW/PYE se empleó para el mantenimiento de la bacteria *Vibrio natriegens*.

La composición de dicho medio fue la siguiente:

Proteasa peptona (Difco 0118-01-8)	5 g
Extracto de levadura (Difco 0127-01)	2 g
Agar (Difco 0140-019)	15 g
Agua de mar	1 l

La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C durante 15 min.

2. MÉTODOS

2.1. CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Cultivos de *Euplotes focardii*

Obtuvimos clones de la línea TN30 de *Euplotes focardii* (Serrano et al., 1992) mediante el aislamiento directo a la lupa binocular de individuos de las muestras originales con una micropipeta Pasteur. Se escogió esta línea por su mayor capacidad para experimentar un proceso de transformación de células vegetativas normales en células gigantes. Las células fueron aisladas en portaobjetos de tres excavaciones, cada una con 100 µl de agua de mar sintética, adicionando *Dunaliella salina* como alimento. Se estabilizaron cinco clones.

Posteriormente, los distintos clones se cultivaron en volúmenes crecientes de medio de agua de mar artificial a una temperatura constante de 4-5°C y en régimen de obscuridad. Inicialmente se añadieron periódicamente (cada quince días) 2 ml de un cultivo de *Dunaliella salina*, cultivada a su vez en el medio de Walne. Con posterioridad, y con el fin de evitar cualquier tipo de interferencia en los experimentos con la tubulina del alga, se suplementaron los cultivos con la bacteria *Vibrio natriegens* CECT 526 (Colección Española de Cultivos Tipo).

2.1.2. Cultivos de *Euplotes vannus*

Las condiciones de cultivo de esta especie son las mismas que las descritas para *E. focardii*, excepto que su incubación se realiza a temperatura ambiente.

2.2. OBSERVACIÓN *IN VIVO*

El examen de los individuos *in vivo* se realizó utilizando una lupa binocular NIKON modelo SMZ-2T y un microscopio óptico ZEISS III tanto en campo claro como en contraste de fases.

2.3. MICROSCOPIA ÓPTICA: TÉCNICA DE CARBONATO DE PLATA AMONICAL

Las técnicas de impregnación argéntica son imprescindibles para el estudio morfológico de los ciliados. Estas técnicas ponen de manifiesto la infraciliación, tanto oral como somática, otras estructuras citoesqueléticas y el aparato nuclear que son objeto de este estudio.

El método de impregnación utilizado en este trabajo es el del carbonato de plata amoniacal de Fernández-Galiano (1994), que es una modificación del originalmente descrito por el mismo autor (Fernández-Galiano, 1966, 1979).

Las observaciones al microscopio óptico convencional se han llevado a cabo en un microscopio ZEISS III.

2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

2.4.1. Microscopía electrónica de barrido

El procedimiento seguido es el que emplea el punto crítico como método de desecación. Implica la sustitución en las muestras biológicas del agua por alcohol y del alcohol por CO₂ líquido.

Las células de *Euplotes focardii* se procesaron para microscopía electrónica de barrido, utilizando el método descrito por Valbonesi y Luporini (1990) para especies marinas del género *Euplotes*.

2.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

La técnica empleada fue la siguiente:

Las células de *Euplotes* se permeabilizaron en el tampón de extracción descrito para *Tetrahymena* por Wolfe (1985) con ligeras modificaciones (Sacarosa 0,1M, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 0,1 mM, EDTA 1mM y Hepes 10mM, pH 6,8) y que contenía un 0,1% de Triton X-100 y un 0,25% de glutaraldehído. Una vez transparentes, las células se lavaron varias veces en el tampón de extracción con el fin de eliminar el detergente y el fijador. Las células fueron lavadas de nuevo durante 30 min en tampón Pipes 0,05 M con ácido tánico al 2% y glutaraldehído al 1,5%. Tras un lavado en tampón cacodilato, se realizó una postfijación con tetróxido de osmio diluido, también en cacodilato, al 1%. Los ejemplares se lavaron varias veces con tampón y se incluyeron, para facilitar su posterior manejo, en bloques de agar. Los pequeños fragmentos de agar se deshidrataron con soluciones seriadas de alcohol. Una vez finalizada la deshidratación, se realizó la inclusión en bloques de Epon. Estos fueron finalmente cortados en un ultramicrotomo REICHERT Om U3. Las muestras se montaron sobre rejillas de cobre recubiertas con Formvar y se tñieron con soluciones de acetato de uranilo y de acetato de plomo para lograr un buen contraste de las estructuras.

Los cortes fueron observados y fotografiados en un microscopio electrónico JEM 100B.

2.5. ANTICUERPOS

2.5.1. Anticuerpos primarios

*** Anticuerpos primarios comerciales "universales"**

Se utilizaron los anticuerpos de ratón DM1A anti α tubulina (Blose et al., 1984) y anti β tubulina de Sigma. DM1B, anti β tubulina (Blose et al., 1984) de Amersham.

El anticuerpo DM1A reconoce la región α (415-443) de α tubulina y el DM1B la

región β (412-431) de β tubulina (Breitling y Little, 1986; de la Viña et al., 1988).

*** Anticuerpos primarios específicos de secuencia**

Se han empleado anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes posiciones de la secuencia de la tubulina de cerebro porcino:

- frente a los dominios amino terminal de α y β tubulina:

α (1-13) y β (1-13): P2C10 (IgM), P15F6 (IgG1), P4B4 (IgM).

β (1-13): P14B4 [IgG1, (Modig et al., 1999)], P3C11 (IgG2A), P11E12 [IgG1, (Modig et al., 1999)], P9G4 (IgM).

- frente al dominio carboxi terminal de α tubulina:

α (430-443): P12E11 [IgG1, (Chau et al., 1998)], P16G4 (IgG1).

- frente a secuencias intermedias de α y β tubulina:

α (155-168): P12B2 (IgG1), P6B11 [IgG1, (Chau et al., 1998)], P3B7 [IgG1, (Modig et al., 1999)], P6B5 (IgM).

α (214-226): P1F5 [IgG2B, (Modig et al., 1999)], P3D10 (IgM).

β (153-165): P4D6 [IgM, (Modig et al., 1999)], P5C3 [IgG1, (Chau et al., 1998)], P15C7.

β (241-256): P2G8 [IgG1, (Modig et al., 1999)], P2F11 (IgM).

Estos anticuerpos fueron amablemente cedidos por la Dra. I. Barasoain (Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C).

*** Anticuerpos primarios comerciales frente a variaciones postraduccionales**

Los anticuerpos monoclonales 6-11-B1, que reconoce específicamente la α tubulina acetilada en Lys 40 (Piperno y Fuller, 1985); 1A2, frente a la α tubulina tirosilada en el extremo carboxilo (Kreis, 1987); anti fosfotreonina y anti fosfoserina, que reconocen proteínas que contienen treoninas o serinas fosforiladas, respectivamente, fueron de Sigma. El anticuerpo monoclonal YL1/2 (Interchim, Francia) nos fue proporcionado por el Dr.

Antonio Torres (Universidad de Sevilla).

*** Anticuerpos primarios frente a variaciones postraduccionales no comercializados**

El anticuerpo GT335 (Wolff et al., 1992), que reconoce un motivo básico de glutamilación, con independencia del número de unidades glutamiladas presentes en la cadena lateral, fue amablemente cedido por la Dra. A. Wolff (Biochimie Cellulaire, College de France, París).

2.5.2. Anticuerpos secundarios

El anticuerpo de cabra fluoresceinado anti-IgA, IgG e IgM de ratón y el anticuerpo de cabra rodaminado anti-IgG de conejo, fueron de Sigma. El anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa anti-IgG de conejo de BioRad.

2.5.3. Producción de anticuerpos monoespecíficos

2.5.3.1. Selección de secuencias inmunogénicas

Se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias de la β tubulina de *E. foecardii* (Miceli, 1995, comunicación personal); para ello se empleó el programa MaxHom (Sander y Scheneider, 1991). Posteriormente, a las secuencias más divergentes se les aplicó un análisis de predicción de estructura secundaria y de accesibilidad del solvente realizados según el método PHD (Rost y Sander, 1994).

El diccionario de estructura secundaria de proteínas (Kabsch y Sander, 1983) clasifica los elementos de estructura secundaria obtenidos de datos estructurales de cristalografía y resonancia magnética nuclear de proteínas en 8 tipos. El método PHDsec de predicción de estructura secundaria agrupa estos 8 tipos de elementos estructurales en 3 clases según la siguiente convención:

Hélice (α) o H: incluye las hélices α , hélices 3-10 y las hélices π .

Lámina extendida o E: incluye los segmentos extendidos de lámina β , tanto en

disposición paralela como antiparalela.

Bucles o L: incluye residuos en puentes β aislados, giros, vueltas y estructuras desordenadas.

PHDsec, además de asignar un tipo de estructura a cada posición de la secuencia, indica la probabilidad de asignar cada una de las tres clases de estructura (H, E o L). También da información sobre la fiabilidad de la predicción en cada residuo. Define un índice "Rel", normalizado de 1 a 9, que refleja la diferencia de probabilidad entre los dos tipos de estructura más probable para una determinada posición. En conjunto, el método PHDsec tiene una exactitud del 70,8% en la asignación de estructura secundaria a residuos aislados en el caso de las proteínas globulares.

El método PHDacc define tres modelos de accesibilidad del solvente: modelo de 10 estados (asigna a cada residuo un valor de accesibilidad relativa normalizado de 0 a 9), modelo de 2 estados [clasifica los residuos en 2 tipos: oculto (B) y expuesto (E)] y modelo de 3 estados [clasifica los residuos en 3 tipos: oculto (B), intermedio (I) y expuesto (E)].

Se accedió al método PHD mediante correo electrónico a la dirección PredictProtein@EMBL-Heidelberg.de.

2.5.3.2. Síntesis química de péptidos

Para la síntesis de los péptidos nos desplazamos al laboratorio del Dr. D. Andreu del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona. Fueron sintetizados en fase sólida (Merrifield, 1963). Se utilizó un 9050 Plus Pesynthesizer Millipore, un sistema automático de péptidos en fase sólida con química Fmoc y flujo continuo.

2.5.3.3. Acoplamiento de los péptidos sintéticos a proteínas portadoras

A cada uno de los péptidos se le adicionó un aminoácido extra, una cisteína, aminoácido que aporta un grupo sulfhidrilo que sirve para proporcionar un sitio de unión a la proteína transportadora. La eficacia en la incorporación de este aminoácido se midió

mediante el método espectrofotométrico de Ellman (1959), que utiliza como reactivo el ácido 5,5'-ditfobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB): los grupos sulfhidrilos libres reaccionan con él originando el correspondiente 4-nitro-3-carboxitiofenol, que presenta una elevada absorción a 412 nm.

Cuatro de los péptidos sintetizados se conjugaron con KLH (Calbiochem) empleando el ester m-maleimido-benzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) (Pierce). Este reactivo bifuncional enlaza grupos amino con grupos sulfhidrilo (Liu et al., 1979; Green et al., 1982; Arévalo et al., 1990). Por otro lado, dado el bajo valor obtenido en la cuantificación de cisteínas, el péptido correspondiente al tercer isotipo ($\beta 3$) se conjugó con BSA libre de ácidos grasos (Sigma) empleando glutaraldehído (de un grado específico para microscopía electrónica, Merck) que reacciona preferentemente con grupos amino (Kagan y Glick, 1979).

*** Acoplamiento de péptidos a KLH mediante MBS**

Se disolvieron 40 mg de KLH en 1 ml de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,1, se dializó extensivamente frente a 2 l del mismo tampón, con 2 cambios cada 2 h y luego se dejó toda la noche. Posteriormente, se hicieron otros 2 cambios de diálisis y se centrifugó 15 min a 2.500 g a 4-8°C. Se tomó el sobrenadante y se midió la concentración de proteína por el método de Bradford (9-10 mgr/ml; Bradford, 1976), guardándose en alícuotas de 250 μ l a -20°C. A continuación, se añadieron gota a gota 2 mg de MBS disueltos en 0,2 ml de DMF en una solución de 12 mg de KLH en 0,9 ml de tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,2 y se dejó 30 min agitando a temperatura ambiente y en oscuridad. La mezcla de la reacción, KLH-MBS, se pasó a través de la columna de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM pH 6. La columna se protegió de la luz y se eluyó con este tampón a 4°C para eliminar el MBS no unido. Se recogieron fracciones de 1 ml, midiéndose la cantidad de proteína a 280 nm. Luego, se disolvieron 7,5 mg de los péptidos correspondientes a los isotipos $\beta t1-2$ y $\beta t4$ en 1 ml de PBS. La solución se mezcló con 2 ml de KLH-MBS eluidos de la columna y se añadieron inmediatamente 5 μ l de NaOH 5 M por cada ml de KLH-MBS. Se dejó con agitación constante durante 3 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Por último, el

conjugado se dializó frente a PBS durante 48 h con 4 cambios de 1 l y se midió la concentración de proteína por Bradford.

*** Acoplamiento de péptidos a BSA mediante glutaraldehído**

En este caso, se disolvieron 1,2 μ moles del péptido correspondiente al isotipo β t3 y 9 mgr de BSA en 1,2 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 8 (Kagan y Glick, 1974, con modificaciones). Cuando el péptido estuvo bien disuelto se añadieron 0,6 ml de glutaraldehído 0,15 M disuelto en el mismo tampón, gota a gota y con agitación, y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. Luego se dializó la mezcla durante 3 días frente a PBS con 3 cambios de 1 l, y se guardó finalmente a -20°C en alícuotas de 250 μ l.

2.5.3.4. Inmunización de animales

Se inmunizaron conejos de Nueva Zelanda mediante inyección intradérmica en el lomo de 0,5 mg del antígeno en 1 ml de una mezcla a partes iguales de PBS y de adyuvante de Freund completo (Difco). Los animales fueron reinyectados a las 2, 4 y 8 semanas con iguales cantidades de cada antígeno emulsificadas en aceite adyuvante de Freund incompleto (Difco). Se obtuvieron sueros de los animales a intervalos regulares a partir de sangrados en la vena de la oreja y finalmente mediante punción cardíaca (Andreu et al., 1988).

2.5.3.5. ELISA

El título anti-tubulina de los sueros se monitorizó mediante ELISA directo, considerándose arbitrariamente como título el inverso de la dilución del suero, que rindió una señal igual a la mitad de la señal máxima empleada. Para ello se activaron durante 12-15 h a temperatura ambiente placas Costar de 96 pocillos con péptido-BSA (0,1 μ g de péptido/pocillo, 50 μ l) para los sueros de aquellos conejos a los que se inyectó péptido-KLH, y con péptido-KLH para los sueros correspondientes a las inmunizaciones con péptido-BSA. Las placas se lavaron tres veces con PBS y dos veces con agua destilada. Los sitios de unión inespecíficos de las placas se saturaron durante 12-15 h a temperatura ambiente con gelatina (Difco) al 1% (p/v) en PBS. Posteriormente se incubaron, con

excepción de la primera columna que se utilizó como blanco, 50 µl/pocillo de los anticuerpos tal cual o diluidos en PBS con gelatina al 0,05% durante 90 min y a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron de nuevo las placas enteras con 50 µl/pocillo del anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1/1000 en el mismo tampón anterior durante 45 min a temperatura ambiente. De nuevo se lavaron las placas con PBS 5 veces. Como sustrato de la reacción colorimétrica se emplearon 50 µl/pocillo de 0,4 mg/ml 1,2-fenildiamina (OPD) en tampón citrato 62,3 mM, Na₂HPO₄ 25,5 mM, pH 5,2, H₂O₂ 0,04%. Tras 15 min, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 3 N. La densidad óptica se midió a 492 nm en un Titertek Multiskan MC.

Asimismo se ensayó, mediante ELISA, la reactividad cruzada de estos sueros frente a los péptidos sintéticos no unidos a proteína.

2.6. INMUNODETECCIÓN

2.6.1. Diluciones empleadas para la inmunodetección con los anticuerpos

Tabla 1- Anticuerpos monoclonales específicos de secuencia dirigidos contra epítomos funcionales de la tubulina.

Nombre	Epítomo	Secuencia ^a	Dilución (IB) ^b	Dilución (II) ^c
P ₁₄ B ₄	β (1-13)	MREIVHIQAGQSG	1/500	1/5-1/10
P ₄ D ₆	β (153-165)	SKIREEYPDRIMNC	1/1000	1/5-1/10
P ₂ G ₈	β (241-256)	RYPGQLNADLRKLAVN	1/400	1/5-1/10
P ₂ C ₁₀	α (1-13)	MRESISIHVGQAG	1/500	1/5-1/10
P ₁₂ B ₂	α (155-168)	ERLSVDYGGKSKLEC	1/100	1/5-1/10
P ₁ F ₅	α (214-226)	RRNLDIERPT	1/500	1/5-1/10
P ₁₂ E ₁₁	α (430-443)	KDYEEVGVDSVEGE	1/1000	1/5-1/10

^a Secuencia de tubulina de cerebro porcino (Krauh *et al.*, 1981).

^b Diluciones empleadas para la inmunodetección de tubulina sobre membranas de nitrocelulosa.

^c Diluciones empleadas para la inmunodetección de tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 2- Anticuerpos monoclonales dirigidos contra variaciones postraduccionales de la tubulina.

Nombre	Epítipo	Dilución (IB) ^a	Dilución (II) ^b
6-11-B1	α ⁴⁰ K-acetilada	1/15000	1/800
1A2	α Tub tirosilada	1/20000	1/800
YL1/2	α Tub tirosilada	1/20000	1/800
GT335	α Tub glutamilada	1/20000	1/800
Fosfotreonina	treoninas fosforiladas	1/50	-
Fosfoserina	serinas fosforiladas	1/300	-

^a Diluciones empleadas para la inmunodetección de tubulina sobre membranas de nitrocelulosa.

^b Diluciones empleadas para la inmunodetección de tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta.

2.6.2. Inmunoblot

2.6.2.1. Electroforesis

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida (Bio-Rad) con dodecilsulfato sódico de Sigma (SDS-PAGE) utilizando el sistema de Laemmli (Laemmli 1970). Las electroforesis se realizaron en geles de 160x160x1,5 mm o en minigeles de 5x8x0,075 cm. En ambos casos, el gel separador fue habitualmente del 10% de acrilamida en tampón Tris-HCl 0,38 M pH 9 con SDS 0,1% y β -mercapto-etanol 4 μ M (Merck); el gel concentrador fue del 5% de acrilamida en tampón Tris-HCl 0,12 M pH 6,8 con SDS 0,1%. El tampón de electroforesis fue Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, β -mercapto-etanol 4 mM, pH 8,5. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a voltaje constante: 80 V para el gel concentrador y 120 V para el gel separador. Las muestras se prepararon mezclando el tampón de muestra (Laemmli, 1970) e hirviéndolo durante 5 min.

Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul Coomassie R-250 (Serva) al 1% en 45% metanol - 10% ácido acético.

2.6.2.2. Transferencia

La tubulina y los extractos celulares se transfirieron electroforéticamente a

membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm (Bio-Rad) para inmunodetección. Se empleó un sistema de electrotransferencia semi-seco Trans-blot SD de Bio-Rad. Los geles, las membranas de nitrocelulosa y los papeles Whatman 3 MM de cromatografía se equilibraron durante 30 min en tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH 8,5] con una ligera agitación. Entre el ánodo y el cátodo se dispusieron, por el siguiente orden: 5 hojas de papel Whatman 3 MM, la membrana de nitrocelulosa, el gel de acrilamida, y 7 hojas de papel Whatman 3 MM. La transferencia se efectuó a voltaje constante, 15 voltios, durante 1,3 horas con un límite de corriente de unos 2,5 mA/cm². La eficiencia de la transferencia se determinó tiñendo el gel transferido con azul Coomassie R-250 y utilizando estándares-SDS de alto y bajo peso molecular preteñidos (Bio-Rad).

Las membranas de nitrocelulosa se dejaron secar y almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Alternativamente, los geles se transfirieron sobre membranas de PVDF durante 1 h a 240 mA usando el sistema de "Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell" de Biorad.

2.6.2.3. Western blot

Cuando se emplearon anticuerpos monoclonales, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con 1% de gelatina en tampón Tris-HCl salino pH 7,4 (TBS) durante 12-15 h, con agitación constante a temperatura ambiente, para evitar la posterior adsorción inespecífica de los anticuerpos. En su caso, las membranas de PVDF se saturaron en el mismo tampón con 5% de leche deshidratada. Posteriormente, ambos tipos de membranas se lavaron brevemente con tampón TBS- 0,05% Tween 20. Se incubaron durante 1 h con los sueros respectivos a las diluciones adecuadas (Tablas 1 y 2) en tampón TBS. Se lavaron 3 veces durante 5 min con TBS, 0,05% Tween 20 y se incubaron durante 45 min con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Bio-Rad) en una dilución 1/10000. Se lavaron 4 veces durante 5 min con TBS, 0,05% Tween 20 y 2 veces con TBS. Se escurrieron las membranas, se incubaron durante 1 min con los reactivos del sistema de detección quimioluminiscente (ECL) de Amersham, se eliminó el exceso de reactivo y se

envolvieron las membranas en plástico. Dentro de los 30 min siguientes se impresionaron películas X-Omat S (Kodak).

Cuando se emplearon anticuerpos policlonales monoespecíficos, como anticuerpo secundario se empleó anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad) en una dilución 1/5000.

2.6.2.4. Eliminación de los anticuerpos de la membrana de nitrocelulosa

Para eliminar tanto el anticuerpo primario como el secundario se incubaron las membranas de nitrocelulosa en un tampón que contiene 2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 62 mM, pH 6,7 a 50°C, durante 30 min en agitación constante (instrucciones del sistema ECL de Amersham). Después, las membranas se lavaron dos veces con el tampón TBS durante 10 min. Antes de utilizar nuevamente las membranas, se realizó un control de quimioluminiscencia para verificar que no hubiese ninguna señal derivada del anticuerpo precedente, lavándolas a continuación con TBS.

2.6.3. Inmunofluorescencia indirecta

2.6.3.1. Preparación del citoesqueleto

Las células fueron tratadas con saponina o Triton X-100 en el tampón PHEM (Pipes 60 mM, Hepes 25 mM, EGTA 10 mM y MgCl₂ 2 mM, pH 6,9) para la permeabilización de las células. Se ensayaron varias concentraciones de ambos detergentes, obteniendo los resultados óptimos con Triton X-100 al 0,2 % dejándolo actuar durante unos minutos. Una vez transparentes, las células se lavaron varias veces en PHEM con el fin de eliminar el detergente. Posteriormente, la fijación se realizó en paraformaldehído al 2% disuelto en PHEM mediante agitación magnética a 60 °C durante una hora (la solución debe de prepararse el mismo día del ensayo). Por último, se aclararon brevemente en PHEM y se lavaron posteriormente en el tampón PBS, al que se le añadió BSA (3%) y Tween 20 (0,1%) para reducir la unión inespecífica.

Alternativamente, la permeabilización y fijación de las células se realizó con una

solución que contenía conjuntamente un 35% de etanol y un 0,5% de Triton X-100. Las células se depositaron en un portaobjetos embebidas en esta solución y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su evaporación.

2.6.3.2. Incubación con los anticuerpos

En el mismo tampón PBS descrito en el apartado anterior, se incubaron a 4°C en atmósfera saturada de humedad durante 1 h los anticuerpos primarios y durante 45 min los secundarios. Tras cada incubación se lavaron 3 veces en PBS durante 15 min a temperatura ambiente.

2.6.3.3. Montaje y observación de las muestras

Se depositó una pequeña gota de Citifluor Glycerol/PBS solution (London, Nº 100015) en el centro de un portaobjetos especialmente limpio. Posteriormente se transfirieron las células a ésta, una a una, depositándolas lo más separadas posible entre sí y sin provocar burbujas. Colocamos, para finalizar, un cubre ajustando su posición con laca de uñas.

La observación de las muestras se realizó con un fotomicroscopio Axioplan de Zeiss equipado con epiiluminación. Los objetivos utilizados fueron Plan-Neofuar 40x y Plan-Apochromat 63x (de inmersión) de Zeiss con los filtros apropiados para la fluoresceína y la rodamina. Las preparaciones fueron fotografiadas con película Tri-X pan de Kodak de 400 ASA. Para la microscopía confocal se utilizó un microscopio LSM 10 de Zeiss.

2.7. DESCILIACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS DEL CORTEX CELULAR Y DEL CITOPLASMA DE LA CÉLULA DE *E. foecardii*

Los cultivos de *E. foecardii* se concentraron mediante centrifugación a 850 g y se resuspendieron en 5 ml de etanol al 7% (en agua de mar). Para favorecer el proceso de la desciliación celular se agitó vigorosamente la suspensión durante varios segundos. La desciliación se comprobó por observación directa al microscopio de contraste de fases.

Para separar las células desciliadas se centrifugó a 850 g durante 5 min y el sobrenadante (que contiene los cilios) se recuperó por centrifugación a 17.000 g durante 30 min. Los cilios se resuspendieron en el tampón PHEM, al que se le habían añadido inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, o-phenantroline 2 mM, pepstantina A 10 µg/ml) para luego ser analizados en mediate electroforesis o ser alicuotados y congelados a -80°C para su conservación.

Las células desciliadas se resuspendieron en PHEM con inhibidores de proteasas y se sonicaron cuatro veces durante 2 sg a 15 micrones de amplitud (Soniprep 150). Posteriormente, el extracto celular se centrifugó a 14.000 g durante 2 min para separar los microtúbulos del cortex de los del citoplasma.

2.8. EXPERIMENTOS DE ENSAMBLAJE DE LOS MICROTÚBULOS CITOPLASMÁTICOS A DISTINTAS TEMPERATURAS

Células de *E. foecardii* se resuspendieron en el tampón PMI (Pipes-NaOH 0,1 M, MgSO₄ 1mM, EGTA 1mM, pH 6,9 al que se añadieron inhibidores de proteasas [PMSF 2 mM, o-phenantroline 2mM, pepstantina A 10 µg/ml]). Esta muestra fue tratada, como se ha descrito anteriormente, para obtener la fracción de los microtúbulos citoplasmáticos. Se añadió Ca⁺⁺, en una concentración final de 5 mM, para incrementar la despolimerización de estos microtúbulos estables al frío, realizando una incubación en hielo durante 30 min. Posteriormente se centrifugó el extracto a 37.000 g para eliminar todos los microtúbulos no despolimerizados. El sedimento resultante fue analizado en SDS-page. Se incubó el sobrenadante con GTP 1 mM y EGTA 5 mM tanto a 5°C como a 20°C. Por último, se recuperaron los microtúbulos por centrifugación a 37.000 g durante 30 min, y sedimento y sobrenadante fueron analizados mediante eletroforesis y, ulteriormente, western-blot.

2.9. TRATAMIENTO CON FOSFATASA

Muestras de microtúbulos citoplasmáticos se trataron con 200 u/ml de fosfatasa alcalina (Sigma), durante 20 min a 30°C. Para realizar el tratamiento de la fosfatasa a pH

8, se añadió NaOH 30 mM a la muestra que se encontraba en tampón PHEM (pH 6,9). Después de la reacción, las muestras fueron preparadas para ser analizadas mediante electroforesis y, ulteriormente, western-blot.

1. ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO MICROTUBULAR DE *E. focardii*

Euplotes focardii presenta, como es característico de los ciliados, un complejo sistema citoesquelético microtubular, constituido por una serie de redes superficiales y profundas. También se distingue por un complejo patrón cortical de estructuras ciliares, que exhibe una organización diferente en uno y otro lado de la célula, como corresponde al grupo de los hipotricos.

1.1. REDES SUPERFICIALES

1.1.1. Lado dorsal

Aparecen, en esta especie, dos tipos de redes microtubulares superficiales: a) una red longitudinal subcortical, situada por debajo del epiplasma, y constituida por tríadas de microtúbulos irregularmente espaciadas; está interrumpida a nivel de las cinetias dorsales (figs. 5 y 6); b) una red transversal localizada bajo la anterior y formada asimismo por haces microtubulares (fig. 7).

1.1.2. Lado ventral

Muestra el mismo tipo de redes microtubulares longitudinal y transversal que el lado dorsal (fig. 8). La red longitudinal está compuesta, en este caso, por microtúbulos aislados en su mayoría paralelos al eje longitudinal celular (fig. 9); en ocasiones, cerca del aparato oral o en los polos anterior y posterior de la célula los microtúbulos se curvan hacia la derecha o hacia la izquierda. Además, en el área situada entre los cirros caudales y transversos, la orientación de los microtúbulos que forman la red longitudinal es oblicua al eje principal de la célula (fig. 8).

Las crestas ventrales situadas entre los cirros transversos se encuentran reforzadas por tríadas de microtúbulos (fig. 9).

1.2. CILIACIÓN, INFRACILIACIÓN SOMÁTICA Y SISTEMAS MICROTUBULARES ASOCIADOS

1.2.1. Lado dorsal

Las cinetias dorsales están constituidas, como en otras especies de hipotricos, por hileras longitudinales de cilios cortos denominados indistantemente "cerdas dorsales" o "cilios sensoriales". Cada cerda dorsal emerge de una pequeña depresión en la superficie celular y presenta en su base un par de cinetosomas (fig. 10). Del cinetosoma anterior parte un cilio corto cuyo axonema muestra la disposición microtubular típica; entre el axonema y la membrana del cilio se encuentran localizados varios lasiosomas (fig. 11). El cinetosoma posterior no es ciliado (fig. 12). Rodeando la depresión se encuentran unas estructuras vacuolares denominadas ámpulas que contienen frecuentemente estructuras membranosas (fig. 11). Las fibras transversas se encuentran asociadas únicamente al cinetosoma anterior (fig. 12).

1.2.2. Lado ventral: cirros

La ciliación somática, en el lado ventral, está formada por grupos de cilios con forma de pincel, los cirros, implicados en la locomoción celular.

* Cirros transversos

Se sitúan en el polo posterior de la célula, y adquieren un gran desarrollo.

Los elementos citoesqueléticos más desarrollados asociados a la infraciliación ventral de *E.focardii* son las fibras anales (fig. 8). Se trata de haces microtubulares gruesos que parten de un material denso situado en la base de cada cirro transverso y que convergen en el polo anterior de la célula. Los microtúbulos de cada fibra anal están unidos entre sí por medio de finas microfibrillas (fig. 13).

Otros elementos microtubulares se originan en los márgenes izquierdo y derecho de cada cirro, siendo más gruesos los haces del lado izquierdo (fig. 8). Por último, observamos grupos de microtúbulos postciliares asociados a la última fila de cinetosomas de cada cirro

(fig. 14), adquiriendo estos elementos citoesqueléticos un mayor desarrollo en células en división.

*** Cirros frontoventrales**

Cada cirro frontoventral (localizado en la parte anterior y media de la célula) presenta varios haces microtubulares asociados. Estos grupos de microtúbulos forman los denominados haces posterior derecho, anterior derecho y posterior izquierdo, dependiendo de su orientación en la célula. El desarrollo de cada uno de estos haces es diferente según el cirro frontoventral del que se trate (fig. 8).

Como ocurría con los cirros transversos, también se observan microtúbulos postciliares, si bien en este caso asociados a los cinetosomas que se localizan más a la derecha (fig. 15).

*** Cirros marginales y caudales**

Los cirros marginales son dos o tres cirros situados en el margen izquierdo de la célula. Se observan largos haces microtubulares asociados con cada cirro marginal por su lado izquierdo. Estos haces se dirigen hacia la parte anterior izquierda de la célula. Del resto de los lados de cada cirro, emergen grupos de microtúbulos más cortos (fig. 8).

Los cirros caudales, situados en el extremo posterior del ciliado, presentan microtúbulos muy cortos en todo su contorno (fig. 8).

1.3. CITOESQUELETO ORAL

La ciliación oral está constituida por una zona adoral de membranelas (ZAM) que se sitúa en el borde izquierdo de la cavidad oral y por una membrana paroral en el lado derecho.

Bajo la zona adoral de membranelas (ZAM) se extiende una red microtubular muy densa. Esta red está compuesta por microtúbulos aislados que se originan a partir de los

cinetosomas; algunos de ellos conectan las paramembranelas entre sí; otros, se distribuyen oblicuamente por debajo de las mismas (fig. 16).

Las fibras postciliares (que emergen de la fila más posterior de cinetosomas de cada paramembranela) y las transversas (grupo de microtúbulos que parten de las dos filas más anteriores de cada paramembranela, fig. 17) contribuyen al anclaje de las paramembranelas. Los haces microtubulares formados a partir de las fibras transversas constituyen el soporte citoesquelético de las crestas peliculares localizadas entre las paramembranelas (fig. 18). Finalmente, la fibra postoral, que se origina en el extremo posterior de la cavidad bucal, se forma a partir de haces microtubulares que parten de las bases de los cinetosomas de las filas más posteriores de paramembranelas (figs. 19 y 20).

Por lo que respecta al complejo paroral, del lado derecho de esta estructura emergen fibras microtubulares muy cortas. Dada su localización, podrían identificarse, posiblemente, como fibras postciliares (figs. 19 y 21).

fig. 5- Red longitudinal superficial de naturaleza microtubular en el lado dorsal de *E. focardii*. Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo anti β tubulina de Sigma. La barra representa 10 μm .

fig. 6- Detalle de las tríadas de microtúbulos que constituyen la red longitudinal superficial en células permeabilizadas con Triton X-100. TEM. La barra representa 0,25 μm .

fig. 7- Corte oblicuo de una célula permeabilizada con Triton X-100 en la que se observan los haces microtubulares de la red transversal superficial. La barra representa 0,25 μm .

fig. 8- Organización del citoesqueleto microtubular en el lado ventral de una célula de *E. focardii*. Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo anti β tubulina de Sigma. La barra representa 10 μm .

fig. 9- Sección transversal a nivel de la película en el lado ventral de una célula permeabilizada. En esta zona la red longitudinal superficial está formada por microtúbulos individuales y reforzada en las crestas peliculares por tríadas de microtúbulos. La barra representa 1 μm .

fig. 10- Microfotografía electrónica de barrido de la superficie dorsal de *E. focardii*. La flecha señala las cerdas constituyentes de las cinetias dorsales. La barra representa 10 μm .

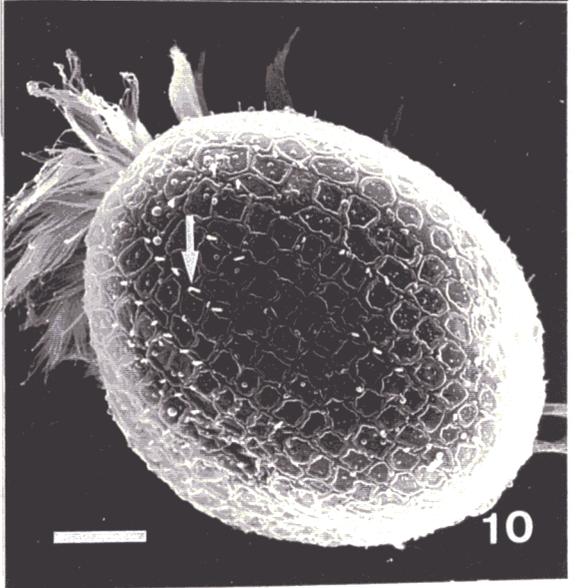
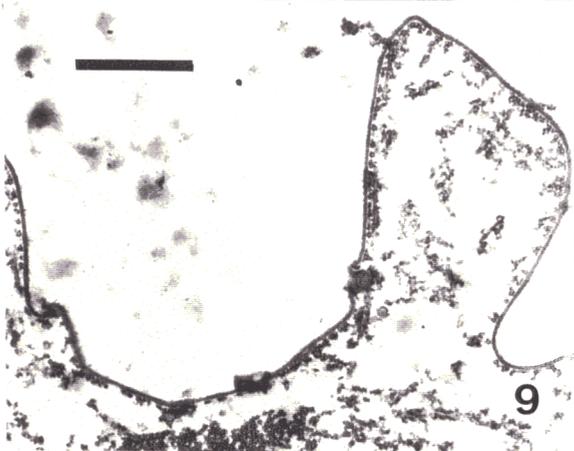
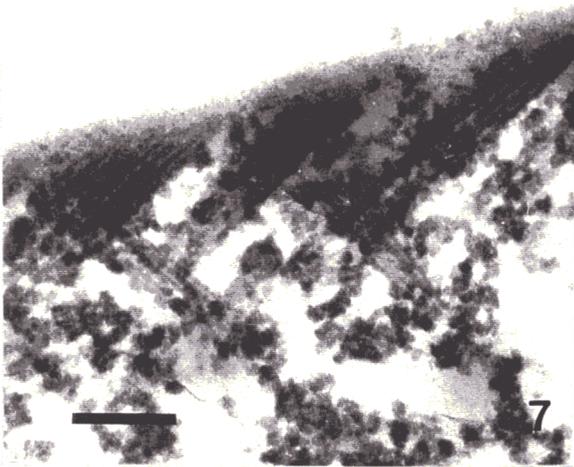
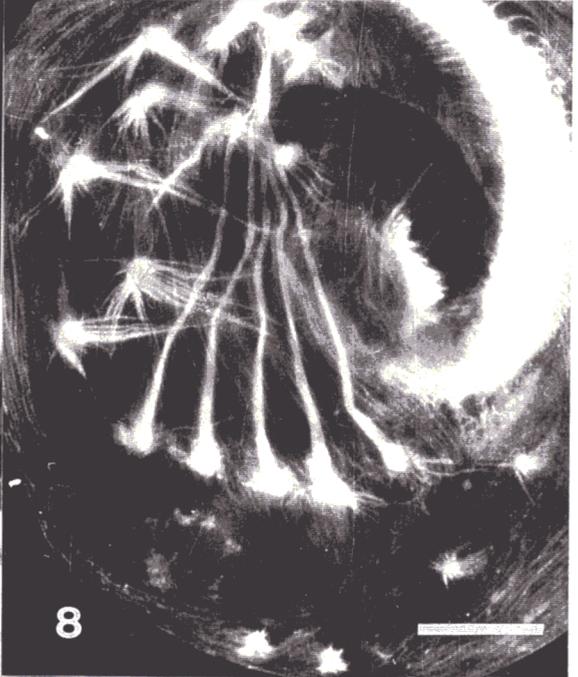
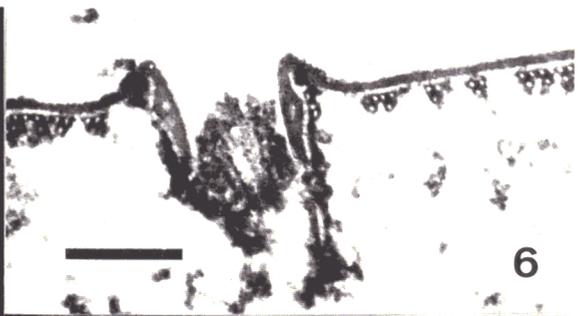
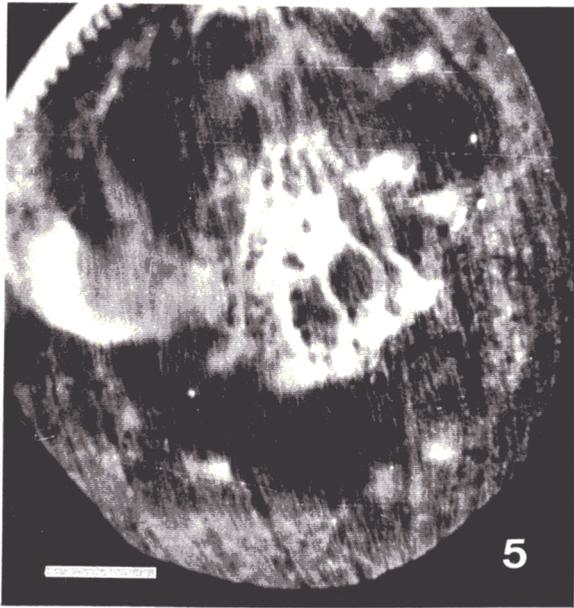


fig. 11- Ultraestructura de las cerdas dorsales en *E. focardii*. Am: ámpulas. L: lasiosomas. La barra representa 0,25 μm .

fig. 12- Cinétida dorsal en una célula permeabilizada. Sólo el cinetosoma anterior está ciliado. T: fibra transversa. La barra representa 0,5 μm .

fig. 13- Sección longitudinal de un cirro transverso. En la parte inferior de cada cinetosoma se aprecia la organización de las fibras anales. La barra representa 0,5 μm .

fig. 14- Microtúbulos postciliares asociados a los cirros transversos. La barra representa 1 μm .

fig. 15- Sección transversal de un cirro frontoventral. Se muestra los microtúbulos postciliares asociados a la fila localizada más a la derecha de cinetosomas. La barra representa 1 μm .

fig. 16- Red microtubular localizada por debajo de la zona adoral de membranelas (ZAM) en la zona oral de *E. focardii*. La barra representa 1 μm .

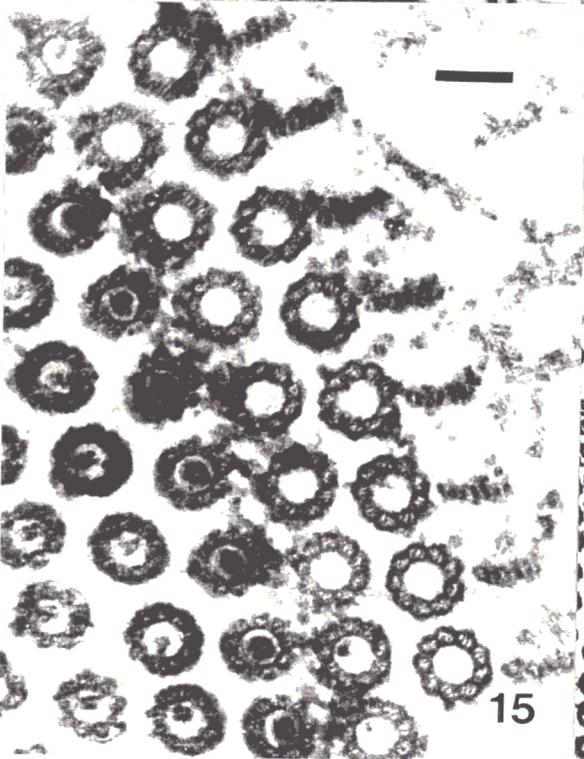
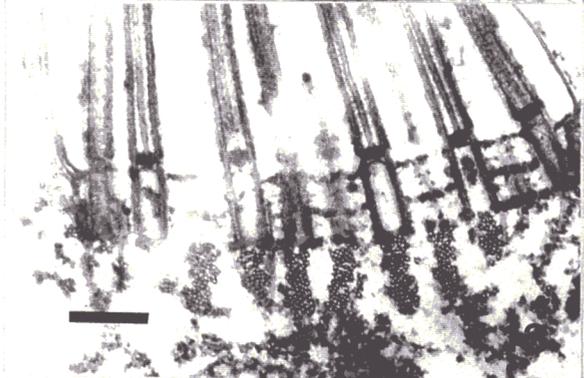
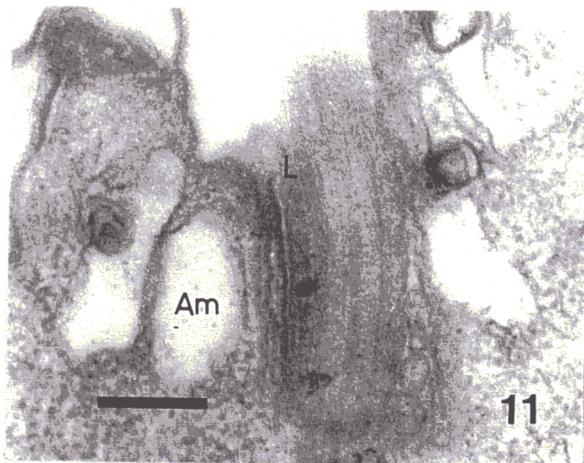


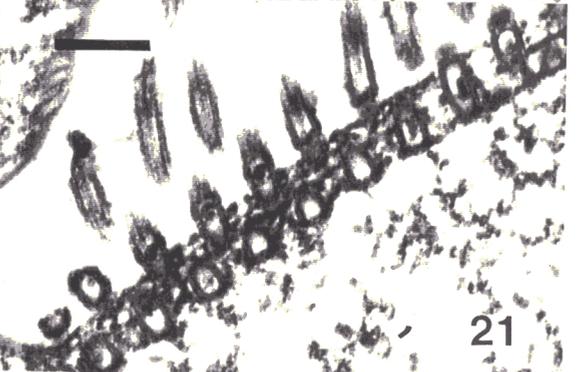
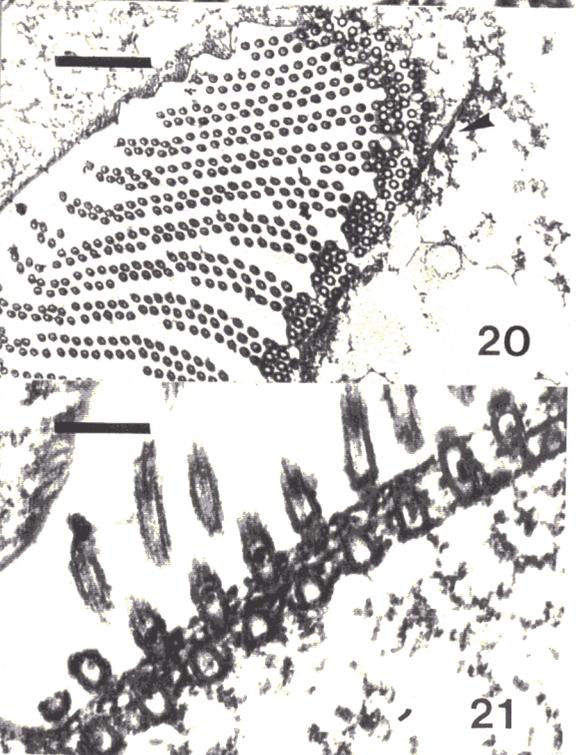
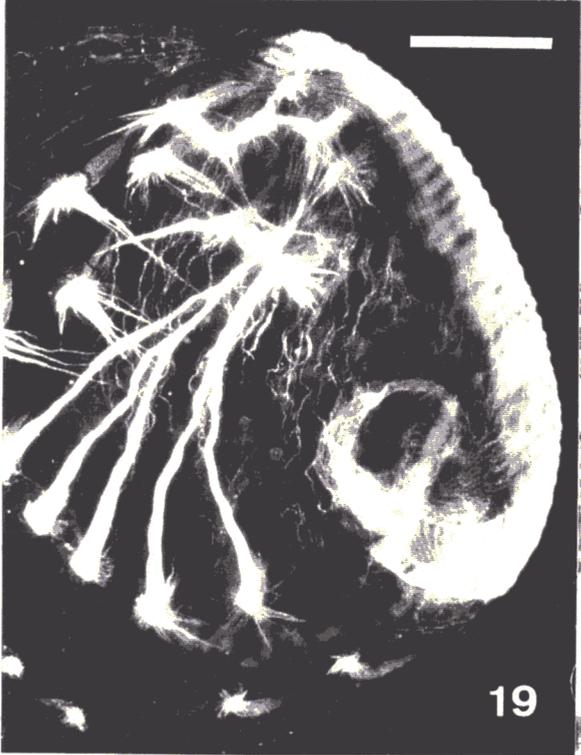
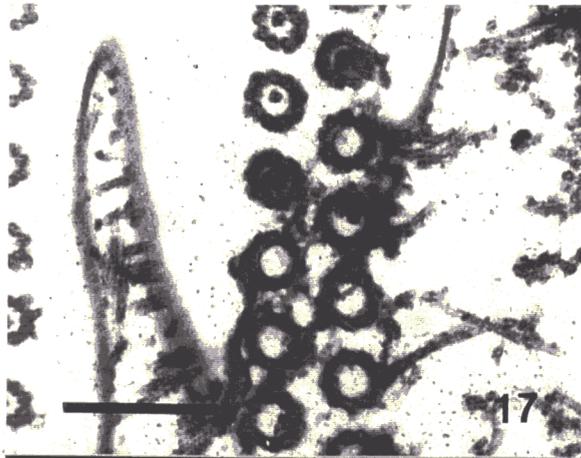
fig. 17- Detalle de las fibras postciliares asociadas a los cinetosomas de las paramembranelas. La barra representa 0,5 μm .

fig. 18- Detalle de las crestas orales situadas entre las paramembranelas, reforzadas por fibras transversas. La barra representa 0,5 μm .

fig. 19- Fibra postoral (fp). Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo anti β tubulina de Sigma. La barra representa 1 μm .

fig. 20- Detalle al TEM de la fibra postoral (\blacktriangleright). La barra representa 2 μm .

fig. 21- Sección transversal del complejo paroral. La barra representa 0,5 μm .



como control (fig. 23). Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia indirecta mostraron el patrón microtubular típico de esta especie (fig. 24) y descrito de manera detallada en estudios anteriores (Valbonesi y Luporini, 1990; Serrano et al., 1992; Arregui et al., 1994).

2.1.2. Reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las secuencias de la α tubulina

Respecto de los anticuerpos anti α tubulina, desglosaremos los resultados en función de la secuencia contra la que van dirigidos:

α (1-13): De los anticuerpos ensayados contra esta secuencia sólo el anticuerpo monoclonal P2C10 reconoció la tubulina de *E. focardii*, además de otras proteínas presentes en los extractos celulares de este ciliado (fig. 25(a)); sin embargo, los experimentos de inmunofluorescencia indirecta no proporcionaron una tinción específica de los sistemas microtubulares de esta especie (fig. 26(a)).

α (155-168): Mientras que los anticuerpos P6B11 y P3B7 reaccionaron positivamente con los microtúbulos del ciliado una vez fijado, mostrando una imagen similar a la obtenida con los anticuerpos anti β tubulina; los anticuerpos P12B2 y P6B5 presentaron una débil reacción con la proteína en ambos tipos de ensayo (figs. 25(b) y 26(b)).

α (214-226): Los resultados del inmunoblot evidenciaron el reconocimiento de la α tubulina de *E. focardii* (fig. 25(c)), además de reactividad con otras proteínas del extracto. Mientras que con el anticuerpo P1F5 obtuvimos resultados negativos en los experimentos de inmunofluorescencia indirecta, el anticuerpo P3D10 mostró una tinción específica de los cilios de cirros y membranelas en la cara ventral del ciliado (fig. 26(c)).

α (430-443): De los dos anticuerpos ensayados contra esta secuencia sólo el etiquetado como P12E11 decoró las redes microtubulares de *E. focardii* y reconoció la tubulina del ciliado en los inmunoblot realizados (figs. 25(d) y 26(d)).

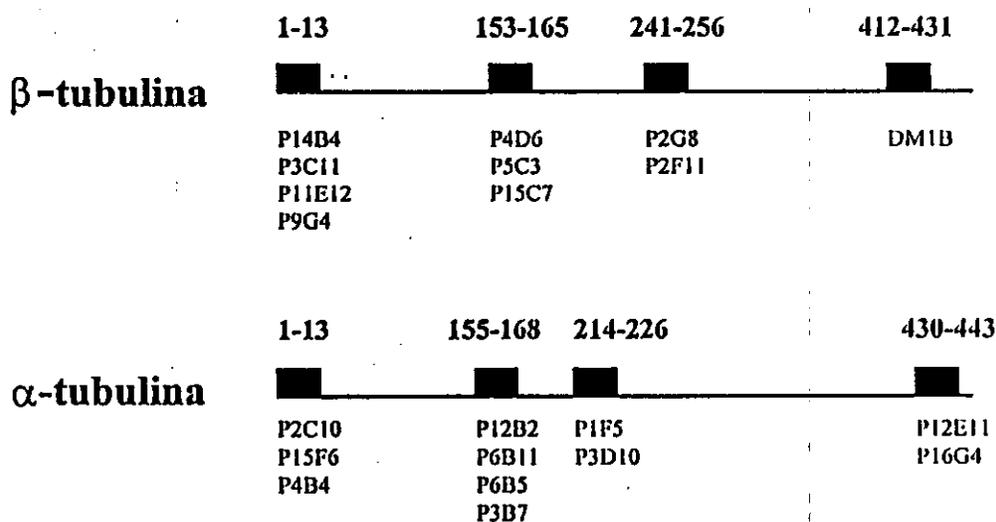
2. CARACTERIZACIÓN DE LA TUBULINA DEL CILIADO ANTÁRTICO

2.1. REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PÉPTIDOS SINTÉTICOS DE α Y β TUBULINA

Los anticuerpos frente a oligopéptidos sintéticos de α y β tubulina porcina utilizados en este estudio se corresponden con regiones de la proteína evolutivamente conservadas y con un posible papel funcional en la formación de los microtúbulos (véase "Discusión").

Para especificar la localización del epítipo reconocido por estos anticuerpos, representamos en un diagrama (fig. 22) las posiciones de estos péptidos dentro de la secuencia de cada subunidad.

fig. 22- Diagrama representativo especificando los epítipos reconocidos por los anticuerpos antisequencia.



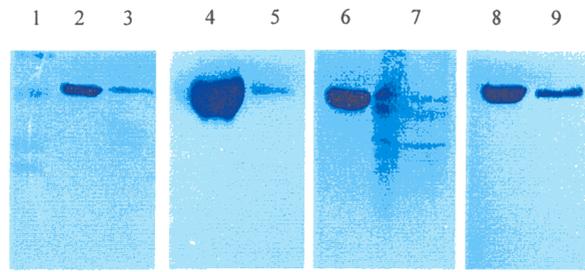
La reactividad de los anticuerpos antisequencia frente a la tubulina del ciliado antártico fue ensayada tanto en células completas (inmunofluorescencia indirecta) como frente a extractos celulares (westernblot).

2.1.1. Reactividad de los anticuerpos dirigidos contra las secuencias de la β tubulina

Los anticuerpos ensayados reaccionaron específicamente con la banda de β tubulina obtenida de un extracto de *E. focardii*, así como con la de la tubulina bovina utilizada

fig. 23- Western blot realizado con anticuerpos dirigidos contra secuencias de la β tubulina porcina. Inmunoreconocimiento de la tubulina cerebral bovina [purificada, (2, 4, 6, 8)] y de la tubulina de *E. focardii* [en muestras de extractos completos del ciliado, (3, 5, 7, 9)]. A, anticuerpo P14B4 dirigido contra la secuencia β (1-13); B, anticuerpo P4D6 dirigido contra la secuencia β (153-165); C, anticuerpo P2G8 dirigido contra la secuencia β (241-256); D, anticuerpo DM1B dirigido contra la secuencia β (412-431). (1) patrón de pesos moleculares.

fig. 24- Inmunofluorescencia indirecta realizada con anticuerpos dirigidos contra secuencias de la β tubulina porcina. Elementos microtubulares teñidos por estos anticuerpos en el lado ventral de células permeabilizadas y fijadas de *E. focardii*. La barra representa 20 μ m. A, célula incubada con el anticuerpo P14B4 específico frente a β (1-13) en la que se observan los cirros ventrales con haces microtubulares asociados a cada uno de ellos y las estructuras orales: zona adoral de membranelas, membrana paroral y fibra postoral; B, célula incubada con el anticuerpo P4D6 específico frente a β (153-165), en ella se distinguen claramente los cilios que forman parte de los cirros y de las membranelas orales y algunos de los microtúbulos longitudinales de la red superficial; C, célula incubada con el anticuerpo P2G8 específico frente a β (241-256); D, célula incubada con el anticuerpo DM1B de Amersham específico frente a β (412-431). Las fotografías obtenidas empleando estos dos últimos anticuerpos muestran unas imágenes muy similares a las descritas con los anticuerpos mencionados previamente.



23

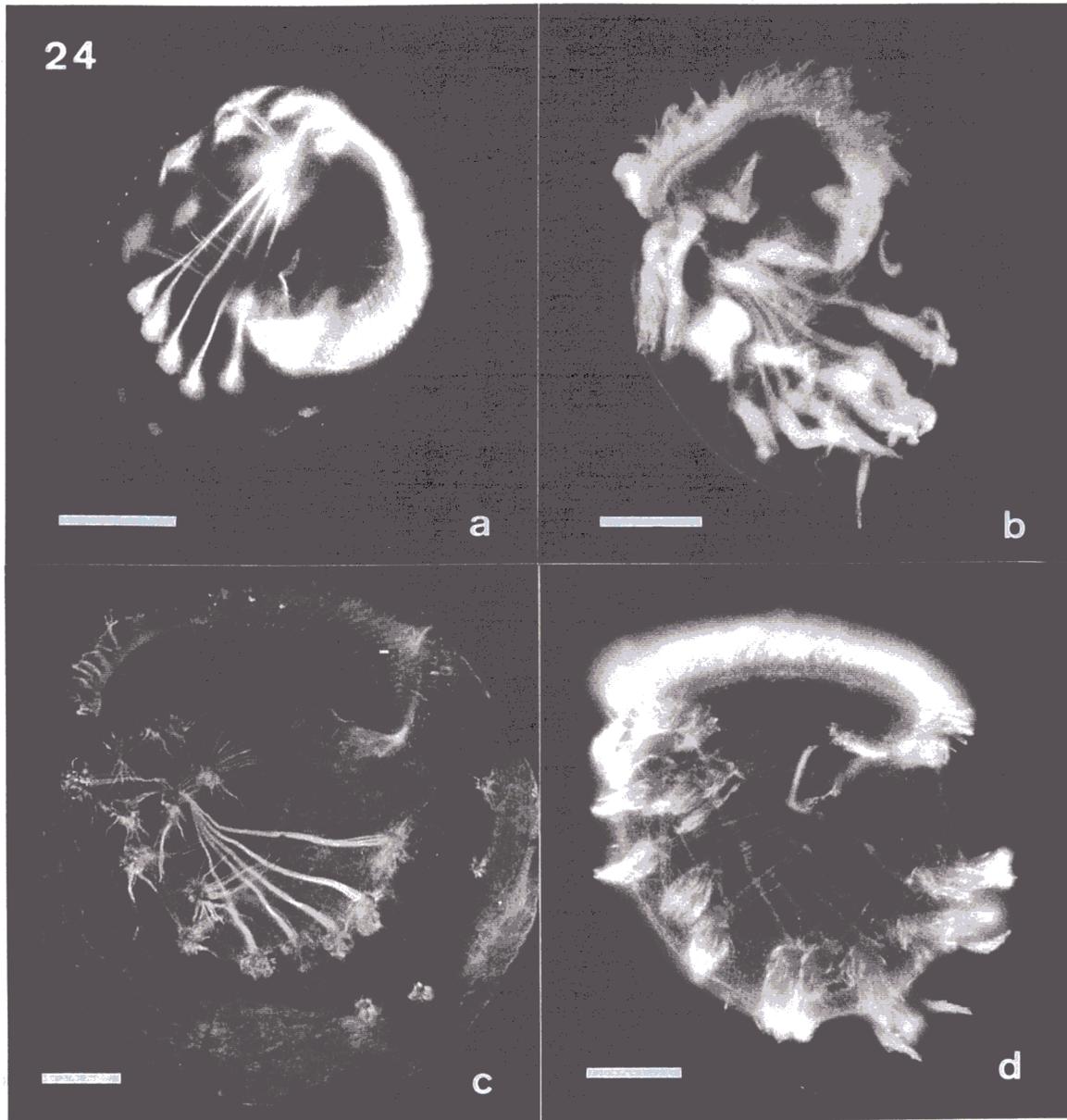
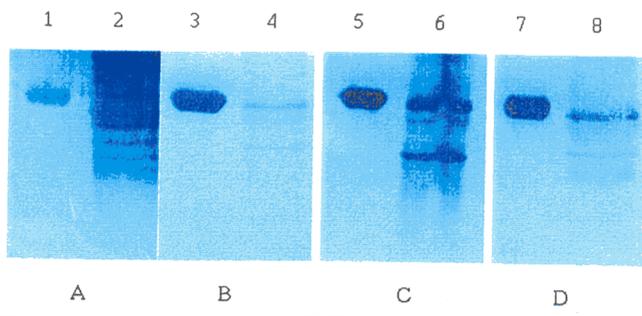
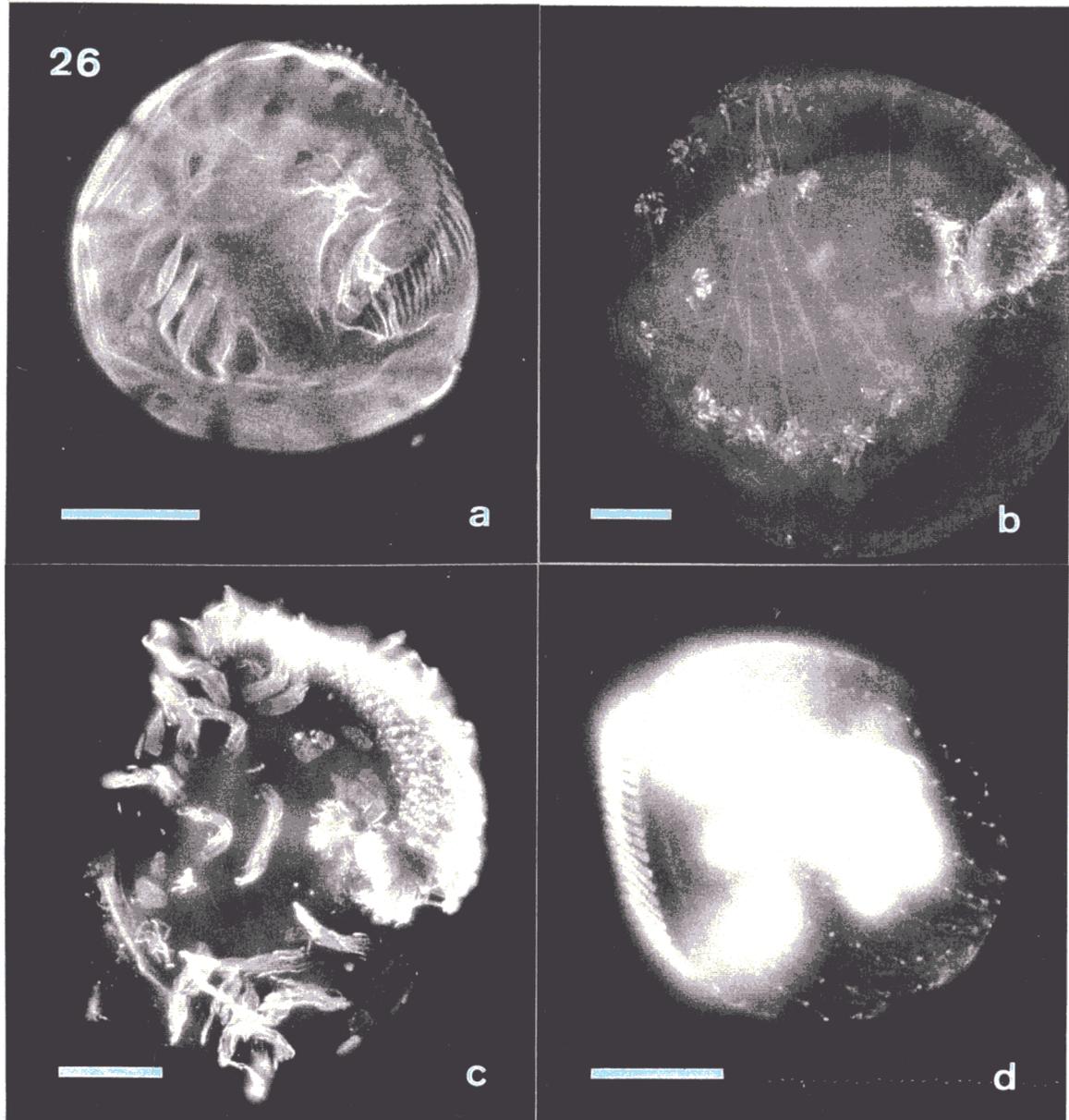


fig. 25- Western blot realizado con anticuerpos dirigidos contra secuencias de la α tubulina porcina. Inmunoreconocimiento de la tubulina cerebral bovina [purificada, (1, 3, 5, 7)] y de la tubulina de *E. focardii* [en muestras de extractos completos del ciliado, (2, 4, 6, 8)]. A, anticuerpo P2C10 dirigido contra la secuencia α (1-13); B, anticuerpo P6B11 dirigido contra la secuencia α (155-168); C, anticuerpo P1F5 dirigido contra la secuencia α (214-226); D, anticuerpo P12E11 dirigido contra la secuencia α (430-443).

fig. 26- Inmunofluorescencia indirecta realizada con anticuerpos dirigidos contra secuencias de la α tubulina porcina. La barra representa 20 μ m. A, tinción inespecífica de la célula incubada con el anticuerpo P2C10 dirigido contra α (1-13); B, débil reactividad de los sistemas microtúbulares de *E. focardii* con el anticuerpo P6B11 dirigido contra la secuencia α (155-168); C, cilios de cirros y membranelas en células incubadas con el anticuerpo P3D10 dirigido contra α (214-226); D, elementos microtubulares teñidos por el anticuerpo P12E11 dirigido contra α (430-443) en el lado dorsal de una célula permeabilizada y fijada de *E. focardii*: filas de cilios y cinetosomas.



25



2.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LAS ISOFORMAS DE LA β TUBULINA DE *E. focardii*

A partir de las secuencias génicas de las cuatro isoformas de la β tubulina obtenidas por el equipo de la Dra. Miceli en la Universidad de Camerino (Italia), nos propusimos localizar las regiones más divergentes de las mismas mediante su alineamiento.

Este análisis puso de relieve que se trata de polipéptidos mayoritariamente conservados, en los que las sustituciones de aminoácidos se encuentran restringidas, en la práctica, a los siguientes dominios: 51-65, 164-192, 312-335, 375-393 y extremo carboxiterminal.

Como se muestra en la tabla 3, las dos isoformas Bt1 y Bt2 de *E. focardii* son muy parecidas entre sí (con un 97,3% de identidad en la secuencia aminoacídica), mientras que si comparamos estas secuencias aminoacídicas con las de las formas Bt3 y Bt4 este porcentaje disminuye notablemente. El grado de identidad entre Bt1 y Bt4 se reduce al 83,4%, lo que indica que la β tubulina en este organismo es marcadamente heterogénea. De hecho, si se comparan estas cuatro secuencias con las de organismos del mismo género no adaptados al frío, como *Euplotes crassus* y *E. octocarinatus*, los valores de identidad se sitúan, respectivamente, entre el 94,4% y el 84,1% y entre el 93,7% y el 83,0%.

Tabla 3- Valores porcentuales de identidad de la secuencia proteica de las cuatro isoformas de β -tubulina (Bt1, Bt2, Bt3 y Bt4) comparadas entre ellas y con las de las β tubulina de *E. crassus* (Harper y Jahn, 1989) y *E. octocarinatus* (Liang et al., 1994).

Porcentaje de similitud

	1	2	3	4	5	6	
<i>E. focardii</i> Bt1: 1	.	97.3	85.6	83.4	94.4	93.7	1
<i>E. focardii</i> Bt2: 2		.	87.2	84.5	94.6	94.3	2
<i>E. focardii</i> Bt3: 3			.	84.5	86.1	85.1	3
<i>E. focardii</i> Bt4: 4				.	84.1	83.0	4
<i>E. crassus</i> : 5					.	95.9	5
<i>E. octocarinatus</i> : 6						.	6
	1	2	3	4	5	6	

2.2.1. Análisis de las regiones más divergentes en la β tubulina

El análisis minucioso de tres de las cinco regiones con mayor incidencia de sustituciones (posiciones 164-192, 312-335, 375-393)) no permitió obtener una pauta significativa de distribución de las mismas.

Las sustituciones específicas de *E. focardii* que se localizan en la región aminoterminal de la proteína entre las posiciones 52 y 63 de la secuencia aparecen agrupadas. En la figura 27 se especifican las sustituciones presentes en esta región. En las secuencias génicas de β t1, β t2 y β t3, dichas sustituciones podrían derivarse de un proceso de inserción y deleción de un nucleótido que provocaría un cambio en el marco de lectura de la secuencia génica: se inserta una C en la posición 169 y se elimina una T en la posición 180, lo que da lugar a un cambio de la secuencia proteica del aminoácido 57 al 60; en particular, en la posición 57, en la que en el resto de las especies aparece un aminoácido no cargado, se aprecia una sustitución por un aminoácido básico.

En cuanto a la isoforma β t4 se observan asimismo sustituciones en el tramo inmediatamente anterior de la secuencia, entre los aminoácidos 52 y 56 inclusive. En este caso, además de la posición 57 también la posición 56 presenta un aminoácido básico en sustitución de uno habitualmente no cargado.

fig. 27- Secuencia génica de la β tubulina de *E. focardii* del aminoácido 52 al 63. Comparación con las secuencias de otros ciliados no adaptados al frío. Se resaltan en negrita las sustituciones aminoacídicas específicas de la especie antártica.

	54	Ala	Thr	Gly	Gly	Arg	Tyr	Val	Pro	Arg	Ala	6
<i>P. tetraurelia</i>												
<i>T. thermophila</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. lemnae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. octocarinatus</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. crassus</i>		GCA	ACT	GGT	GGT	AGA	TAT	GTT	CCA	AGA	GCT	
<i>E. focardii</i> β t1		Ala	Thr	Gly	Arg	Lys	Ile	Cys	Pro	Arg	Ala	
β t2		GCA	ACT	GGA	CGG	AAG	ATA	TGT	CCA	AGA	GCT	
β t3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β t4	52	Ile	Glu	Thr	Leu	Lys	-	-	-	-	-	

Otra característica de la β tubulina de *E. focardii* es la presencia de varias sustituciones en el dominio carboxiterminal de la proteína. Esta región está en general integrada, según se desprende de la comparación de la secuencia de muy diversos organismos, por un tramo muy conservado seguido de un tramo muy variable que parte en general del aminoácido 438 (fig. 28).

En el primero de ambos tramos (generalmente muy conservado), en dos de los genes de la β tubulina de *E. focardii* se aprecian diversas sustituciones aminoacídicas. En el gen β t3 hemos identificado 4 sustituciones (Cys 425, Cys 427, His 428 y Tyr 430) y una inserción (Gly 433) que, en comparación con la secuencias de otros organismos, se revelan únicas en esta especie. En el gen β t4 se ha identificado una sola sustitución específica de *E. focardii* (Cys 424) y una inserción (Glu 434).

Por último, mencionaremos la sustitución de residuos Glu por residuos Asp en la región variable del dominio carboxiterminal. Especial atención merece el glutámico de la posición 439 que, en los cuatro genes, está sustituido por un aspártico. Este es el sitio más común de la poliglutamilación de la β tubulina de todos los organismos, incluidos los protozoos (Bré et al., 1994). Además, en dos de las isoformas de la β tubulina (β t3 y β t4) aparecen, en la estructura primaria, sitios potenciales de fosforilación: una serina en posición 443 en la isoforma β t3 y una treonina en las posiciones 443 y 445 en la isoforma β t4.

fig. 28- Secuencia de la región carboxiterminal de la β tubulina de *E. focardii*, alineada con las secuencias de *E. crassus* (Harper y Jahn, 1989), *Stylonychia lemnae* (Witte et al., 1995), *Paramecium tetraurelia* (Dupuis, 1992), *Tetrahymena pyriformis* (Barahona et al., 1988), *Notothenia coriiceps neglecta* (Detrich y Parker, 1993) y los isotipos II y III de vertebrado (Sullivan y Cleveland, 1986). En negrita se indican las sustituciones específicas de *E. focardii* y subrayados aparecen los sitios potenciales de fosforilación.

	421		
<i>E. focardii</i> β t1	EYQQYQDATA	EE..EGEFDD	EEEMDV..
β t2	EYQQYQDATA	EE..EGEFDD	EEEMDV..
β t3	EYQQ QC HTY	EE G .EGEFDD	EDSEL...
β t4	EYQ CY QDATA	EDE EE EQYDQ	EDTDT...
<i>E. crassus</i>	EYQQYQDATA	EE..EGEYVE	DEDEMDGM
<i>E. octocarinatus</i>	EYQQYQDATA	EE..EGEMDE	EEGAME..
<i>S. lemnae</i>	EYQQYQDATA	ED..EEEMDE	EQME...
<i>T. pyriformis</i>	EYQQYQDATA	EE..EGEFEE	EEGEN...
<i>P. tetraurelia</i>	EYQQYQDATA	EE..EGEFEE	E.GEQ...
Isotipo II (ratón)	EYQQYQDATA	EEEEGEFEEEE	GEDEA...
<i>N. coriiceps</i>	EYQQYQDATA	EEEEGEFEEEG	EEDGA...
Isotipo III (pollo)	EYQQYQDATA	EEEGEMYEDD	EEEEQGAK

En este dominio, el método PHDsec predice una mayor potencialidad de formación de una α hélice en el extremo C-terminal en el caso del gen $\beta t4$ que en el del $\beta t3$ y, a su vez, en éste que en el de los $\beta t1-2$.

3. FUNCIONALIDAD SELECTIVA DE LOS ISOTIPOS DE B TUBULINA EN ESTE CILIADO

3.1. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS

3.1.1. Selección de secuencias inmunogénicas

Para la obtención de anticuerpos policlonales específicos frente a las distintas isoformas, analizamos los datos obtenidos en el estudio, mediante el método PHacc, de la accesibilidad al solvente de las regiones más divergentes mencionadas en el apartado 2.2.1.

El análisis de los resultados de accesibilidad nos indicó que la región del extremo carboxiterminal constituía el epítipo óptimo para ser usado como inmunógeno, dado el claro predominio del carácter expuesto de los residuos y sus altos valores de accesibilidad al solvente, con grados de confianza de las predicciones para cada residuo muy elevados (fig. 30).

fig. 30- Predicciones de accesibilidad al solvente de los péptidos carboxiterminales de la B tubulina de *E. focardii*. (AA) secuencia de aminoácidos. (P_3) predicción de accesibilidad al solvente: oculto (b), expuesto (e).

St1-2

```

AA      EYQQYQDATAEEEEGEFDDDEEEMDV
ACCESIBILIDAD
3ª:    P_3 acc ebeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee
10ª:   PHD acc 7077677777777777777777779

```

St3

```

AA      YQQCQCHTYEEGEGEFDDDESEL
ACCESIBILIDAD
3ª:    P_3 acc beeeeeeeeeeeeeeeeeee
10ª:   PHD acc 077577776777777777777779

```

St4

```

AA      EYQCYQDATAEDEEEEEQYDQEDTD
ACCESIBILIDAD
3ª:    P_3 acc ebeeeeeeebeeeeeeeeeeeeeee
10ª:   PHD acc 707767776077777777777779

```

De acuerdo con estos criterios se procedió a la síntesis química de cinco péptidos distintos:

Bt1-2	CEEEGEFDDEEEMDV
Bt3	CHTYEEGEGEFDDSESEL
Bt4	CEDEEEEQYDQEDTDT
Bt1-2*	CGEFDDEEEMDV
Bt4*	CQYDQEDTDT

La denominación de los péptidos se realizó a partir de la isoforma correspondiente de la β tubulina.

En el caso de los isotipos Bt1 y Bt2, la secuencia elegida era plenamente coincidente, por lo que no se pudo discriminar entre uno y otro. Se eligieron las dos secuencias más cortas para optimizar la especificidad de los sueros frente a los isotipos 1-2 y 4, lo que tiene como inconveniente que estos epítomos podrían no provocar una respuesta inmunológica suficiente.

A cada uno de los péptidos se le adicionó un aminoácido más, una cisteína, aminoácido que aporta un grupo sulfhidrilo que proporciona un sitio de unión a la proteína transportadora (en el caso del péptido Bt3, esta cisteína no puede considerarse adicional, puesto que se halla presente en la propia secuencia aminoacídica codificada por este gen). Para medir la eficacia en la incorporación de este aminoácido, se recurrió a un método espectrofotométrico, el método Ellman (1959). Los resultados obtenidos fueron de un 49%, un 59%, un 23%, un 79% y un 95% de eficacia, respectivamente, para los isotipos Bt1-2, Bt1-2*, Bt3, Bt4 y Bt4*. Como proteínas transportadoras utilizamos KLH (hemocianina) y BSA (albúmina de suero bovino), habitualmente empleadas en este tipo de experimentos. La KLH se utilizó con Bt1-2, Bt1-2*, Bt4 y Bt4*, usando MBS (m-maleimido-benzoil N-hidroxisuccinimida éster) como agente de unión al péptido a través de las cisteínas. En el caso del péptido Bt3, nos pareció mas adecuado usar glutaraldehído y BSA, dado el bajo valor obtenido en la cuantificación de cisteínas (23%).

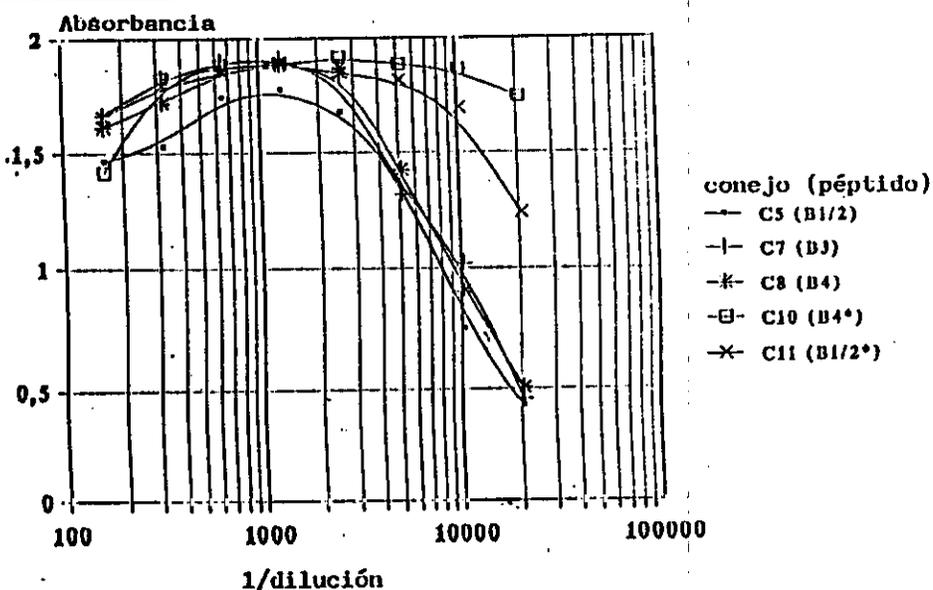
fig. 31- Complejos péptido-proteína transportadora usados como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos de los isotipos de la β tubulina de *E. foecardii*.

<u>Péptido inmunogénico</u>	<u>Proteína transportadora</u>	<u>Conejos</u>	
Bt1-2:	CEEEGEFDDEEEMDV	KLH (MBS)	C4,C5
Bt3:	CHTYEEGEGEFDDDESEL	BSA (GA)	C6,C7
Bt4:	CEDEEEEQYDQEDTDT	KLH (MBS)	C8,C9
Bt4*:	CQYDQEDTDT	KLH (MBS)	C10
Bt1-2*:	CGEFDDEEEMDV	KLH (MBS)	C11

3.2. ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

La obtención de anticuerpos en el suero de los conejos fue analizada mediante ELISA. En los ensayos que mostramos, el antígeno utilizado para activar las placas fue tan sólo el péptido, con el fin de detectar exclusivamente los anticuerpos antipéptido y no aquellos otros dirigidos contra la proteína transportadora. Se observaron respuestas positivas para las cinco secuencias peptídicas. La figura 28 muestra las curvas obtenidas para los diferentes sueros cuando éstos fueron incubados, a las diluciones indicadas, en placas activadas con 0,1 μ g de péptido en cada pocillo.

fig. 32- ELISA contra péptidos sintéticos de sueros antipéptidos.



Según se observa, los sueros presentaron un título antipéptido significativo.

Posteriormente, se ensayó asimismo mediante ELISA la reactividad cruzada de estos sueros frente a los otros péptidos. En la figura 33 se representan las curvas de resultados de este experimento. En este punto, y dados los resultados obtenidos con el suero C10, desechamos este suero para experimentos posteriores.

La especificidad también se probó mediante ensayos de inhibición en experimentos de inmunofluorescencia, tal y como ya se ha mencionado en la sección "Materiales y métodos". En uno de los experimentos, el anticuerpo utilizado se incubó con un exceso de concentración del péptido, mientras que en otro se utilizó el suero preinmune. La fluorescencia disminuyó marcadamente en ambos casos (fig. 34).

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS

Los sueros obtenidos se denominaron anti β t1-t2, anti β t3 y anti β t4. Analizamos si la β tubulina de *E. focardii*, entre otras proteínas celulares, era reconocida específicamente por los mismos. Para ello, realizamos electroforesis en geles de poli-acríamida de extractos completos del ciliado seguidos de western blots con cada uno de los antisueros.

Asimismo, empleamos células de *E. focardii* previamente permeabilizadas y fijadas en experimentos de inmunofluorescencia indirecta para la localización de los diferentes isotipos en los sistemas microtubulares del ciliado.

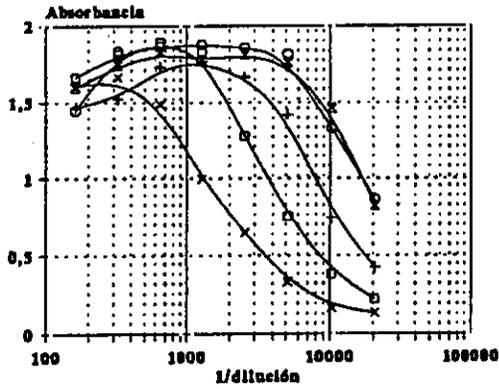
3.3.1. Inmunoreconocimiento mediante western blot

* Anti β t1-2 (C4/C5 y C11)

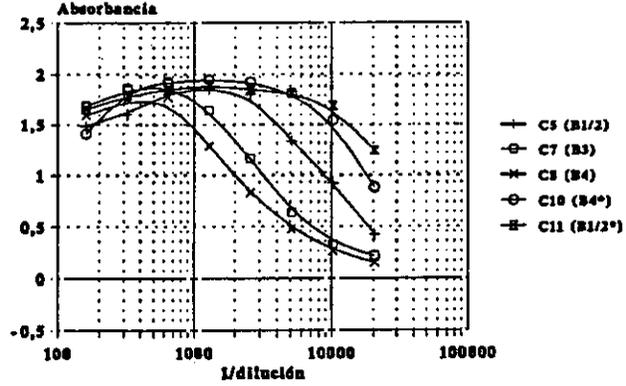
Los sueros de los conejos C4/C5 y C11 producidos frente al isotipo β t1-2 reaccionaron casi exclusivamente con una banda cuyo peso molecular coincide con la tubulina de *E. focardii* (fig. 35). Sólo a diluciones muy bajas de los sueros, se detectaron algunas bandas más débiles, que podrían corresponder a fragmentos

fig. 33- Reactividad de los sueros antipéptidos con los distintos péptidos sintéticos.

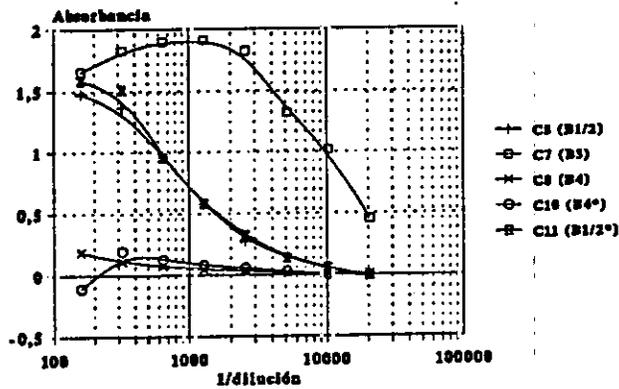
Reactividad de los sueros con el péptido Bt1



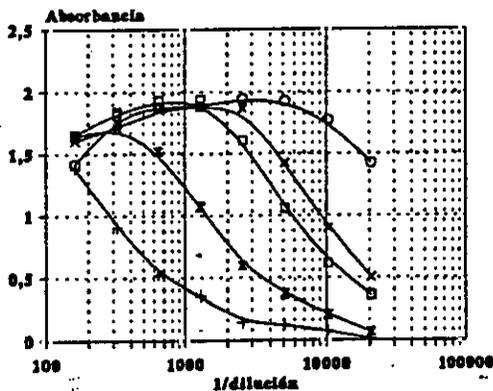
Reactividad de los sueros con el péptido Bt1-2*



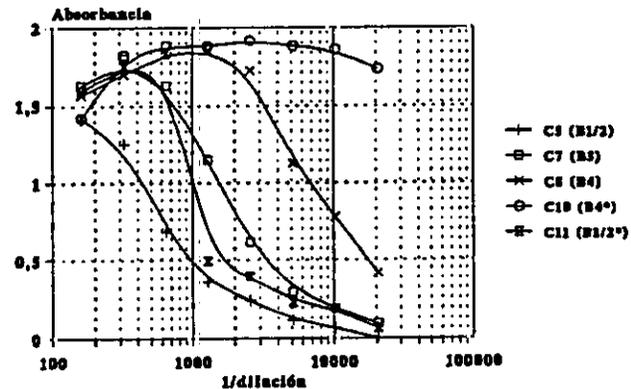
Reactividad de los sueros con el péptido Bt3



Reactividad de los sueros con el péptido Bt4



Reactividad de los sueros con el péptido Bt4*



proteolíticos de la propia tubulina o bien a otras proteínas que comparten el mismo epítipo.

* Anti Bt3 (C6/C7)

Las curvas del ELISA indican claramente que los sueros C6/C7 reaccionan específicamente con la secuencia elegida. No obstante, cuando los experimentos de westernblot fueron realizados en las mismas condiciones que para el isotipo anterior (fig. 35) la especificidad obtenida con este anticuerpo resultó menos concluyente. Teniendo en cuenta el distinto método seguido para la obtención de los sueros contra el isotipo Bt3 (véase el apartado 3.1.1.), se probó un procedimiento diferente para la realización del blot (variando el protocolo de transferencia de proteínas, de modo que se sustituyeron las membranas de nitrocelulosa por las de PVDF, y empleando además un sistema de electrotransferencia diferente, véase "Material y métodos"). Con ello se consiguió reconocer la banda de la tubulina (fig. 37).

* Anti Bt4 (C8)

Los análisis de inmunoblot con los extractos celulares de *E. foecardii* indican el reconocimiento por el antisuero Bt4 de la isoforma correspondiente de β tubulina, si bien esta banda se sitúa ligeramente por debajo de la correspondiente a las isoformas 1-2 (fig. 35).

Por otra parte, se observó que los sueros C4/C5 y C6/C7 (generados frente a los isotipos Bt1-2 y Bt3, respectivamente) no reconocen ni la tubulina purificada de cerebro bovino (fig. 35) ni los extractos celulares de otro ciliado, *Paramecium* sp. (Miceli, comunicación personal), mientras que el anticuerpo frente a Bt4 se une fuertemente a ambos.

3.3.2. Localización celular de las isoformas de β tubulina

* Anti Bt1-2

Las microfotografías muestran que los anticuerpos específicos de las secuencias correspondientes a los isotipos Bt1-2 decoran tanto las redes microtubulares superficiales

presentes en este ciliado como los microtúbulos axonemales de los cilios, los cinetosomas que sirven de base a los cirros, las fibras denominadas anales que parten de la base de los cirros transversos, así como las fibras que sirven de anclaje para el resto de los cirros, la ZAM y la membrana paroral (fig. 36). Todas estas estructuras son reconocidas también por el anticuerpo DM1B, tal y como se muestra en la figura 36(f). Las imágenes superpuestas de la figura 36(g) muestran la localización comparada de ambos anticuerpos (en amarillo aparecen las estructuras reconocidas tanto por uno como por otro). Por otra parte, los mencionados anticuerpos específicos reconocen la banda correspondiente a la β tubulina en todas las fracciones celulares de *E. focardii*, aunque más débilmente en la fracción del cortex (fig. 37).

* Anti Bt3

El anticuerpo anti Bt3 reconoce específicamente los microtúbulos de los cuerpos basales (fig. 38). Este reconocimiento se hace especialmente evidente (en rojo en la imagen superpuesta de la figura 38(e)) en aquellas células que fueron fijadas con etanol (véase "Material y métodos"). El resto de las estructuras (puestas de manifiesto por el marcaje verde de la fluoresceína en la figura 38(c) no muestran reactividad alguna con dicho anticuerpo. Este suero reconoce básicamente la fracción celular de cortex (fig. 37), lo cual sugiere que este isotipo de β tubulina tiene una localización celular específica en los cuerpos basales.

* Anti Bt4

La inmunofluorescencia indirecta con este suero muestra un resultado muy similar al obtenido con el anti Bt1-2, aunque los cilios que componen cirros y membranelas se tiñen con mayor intensidad (fig. 39). Se observa también una débil reactividad de los cuerpos basales. Además, este anticuerpo parece teñir redes intracitoplasmáticas (visibles en rojo en la imagen superpuesta de la figura 39(e)).

El anti Bt4 reconoce todas las fracciones celulares, aunque la fracción axonemal de un modo más intenso (fig. 37).

3.4. EXPERIMENTOS DE ENSAMBLAJE DE LOS MICROTÚBULOS CITOPLASMÁTICOS A DISTINTAS TEMPERATURAS

Para determinar si el ensamblaje de un isotipo específico depende en alguna medida de la temperatura, realizamos ciclos de despolimerización-repolimerización de los microtúbulos citoplasmáticos (menos estables que el resto) de *E. focardii* tanto a 20°C como a 5°C.

Como puede observarse en la figura 40, con el suero anti β t1-2 la reacción es especialmente evidente en el caso de la muestra obtenida con una temperatura de polimerización de 5°C. Frente al suero anti β t4, los microtúbulos citoplasmáticos mostraron una fuerte reacción cuando se llevó a cabo la repolimerización a 20°C, mientras que no se detectó ninguna señal en la fracción polimerizada a 5°C (fig. 40). El suero anti β t3, en cambio, no reconoció ninguna de las muestras ensayadas en este experimento. Sin embargo, sí se obtuvo una reacción positiva cuando este último suero se ensayó sobre la membrana que contenía el sedimento resultante de la centrifugación de los extractos celulares tratados con Ca^{++} (véase "Material y métodos"), donde es de esperar que se encuentren presentes los microtúbulos más estables, no despolimerizados ni siquiera en presencia de Ca^{++} , incluidos los correspondientes a las bases ciliares.

* Detección de microtúbulos fosforilados

Por último, verificamos la reactividad de un anticuerpo anti P treonina. Este anticuerpo comercial reaccionó con mayor intensidad, al contrario que el anticuerpo anti β t4, con los microtúbulos citoplasmáticos polimerizados a 5°C (fig. 40).

La falta de reconocimiento por parte del suero anti β t4 de los microtúbulos polimerizados a 5°C podría deberse a una modificación postraduccional de la secuencia correspondiente. Además, como ya se ha mencionado, en dicha secuencia existen dos posibles sitios de fosforilación (Tre). De hecho, la fracción citoplasmática fue reconocida por el anticuerpo anti β t4 de forma más intensa en la muestra sometida al tratamiento de defosforilación, mientras que el control realizado sin fosfatasas mostró una reacción más débil (fig. 41).

fig. 34- Imágenes de inmunofluorescencia indirecta en ensayos de inhibición realizados para probar la especificidad de los sueros dirigidos frente a los isotipos de la β tubulina de *E. focardii*. La barra representa 20 μ m. (A, C, E) los anticuerpos anti β t1-2 (A), anti β t3 (C) y anti β t4 (E) se incubaron con un exceso de concentración de péptido β t1-2, β t3 y β t4, respectivamente. (B, D, F) sueros preinmunes de los conejos C5 [inmunizado con el péptido β t1-2, (B)], C7 [inmunizado con el péptido β t3, (D)] y C8 [inmunizado con el péptido β t4, (F)].

34



a



b



c



d



e



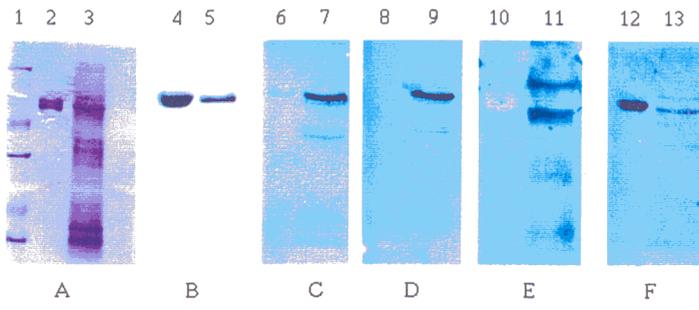
f

fig. 47- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo 61151 en células permeabilizadas y fijadas de la especie atemperada *Euplotes vannus*. La barra representa 20 μm . A, lado dorsal; B, lado ventral.

fig. 48- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo GT335 en células permeabilizadas y fijadas de *E. vannus*. La barra representa 20 μm . A, lado dorsal; B, lado ventral.

fig. 35- Western blot realizado con los sueros obtenidos frente a los isotipos de la β tubulina de *E. focardii*. A, gel teñido con azul de Coomassie: (1) patrón de pesos moleculares, (2) tubulina cerebral bovina purificada, (3) extracto de cultivo de *E. focardii*. Inmunoreconocimiento de la tubulina cerebral bovina [purificada, (4, 6, 8, 10, 12)] y de la tubulina de *E. focardii* [en muestras de extractos completos de cultivos del ciliado, (5, 7, 9, 11, 13)] con: B, DM1B, anticuerpo empleado como control; C, suero C5 producido frente al isotipo β t1-2; D, suero C11 también producido frente al isotipo β t1-2; E, suero C7 producido frente al isotipo β t3; F, suero C8 producido frente al isotipo β t4.

fig. 36 (A-D)- Sistemas microtubulares de *E. focardii* teñidos con los anticuerpos específicos de las secuencias correspondientes a los isotipos β t1-2. Inmunofluorescencia indirecta, microscopio de inmunofluorescencia convencional. La barra representa 20 μ m.



35

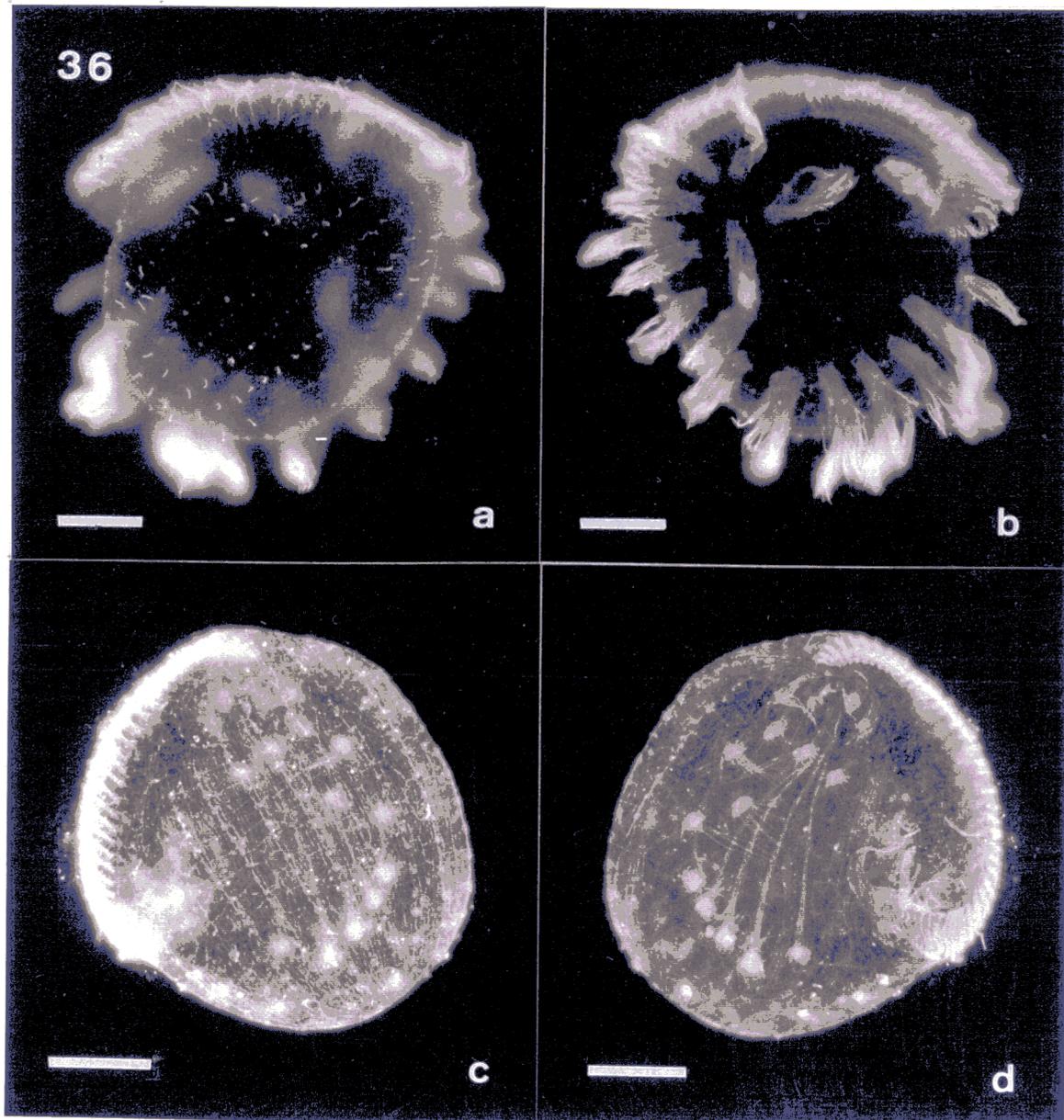


fig. 36 (E-G)- Inmunofluorescencia indirecta realizada con los anticuerpos específicos de las secuencias correspondientes a los isotipos β t1-2. Microscopía confocal (fotografías de P. Ballarini). La barra representa 20 μ m. (E) el anticuerpo antiisotipo ha sido revelado con un anticuerpo secundario conjugado con Texas red; (F) el anticuerpo monoclonal DM1B, empleado como control, ha sido revelado con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína; (G) imagen obtenida de la superposición de las dos precedentes.

fig. 37- Reactividad en western blot con los sueros obtenidos contra los isotipos de la β tubulina de *E. focardii* frente a tres fracciones celulares de *E. focardii*: axo (fracción axonemal, cilios), cortex (fracción cortical) y cyto (fracción citoplasmática). Se señala la banda de la β tubulina reconocida por los anticuerpos (fotografía de S. Pucciarelli).

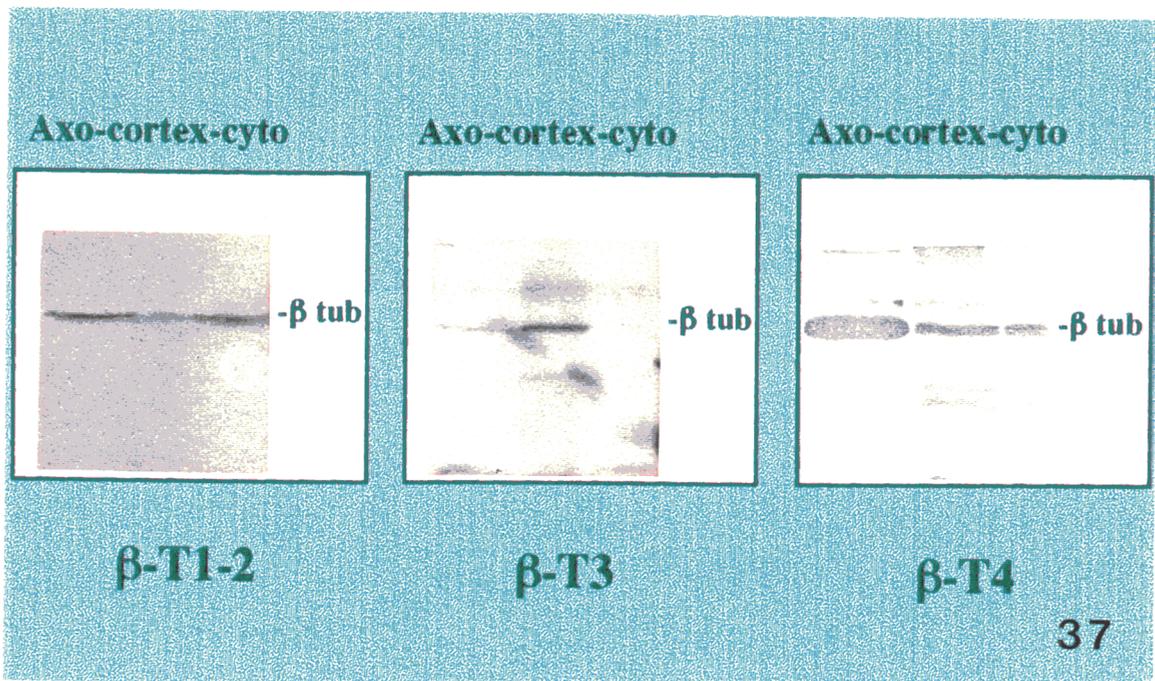
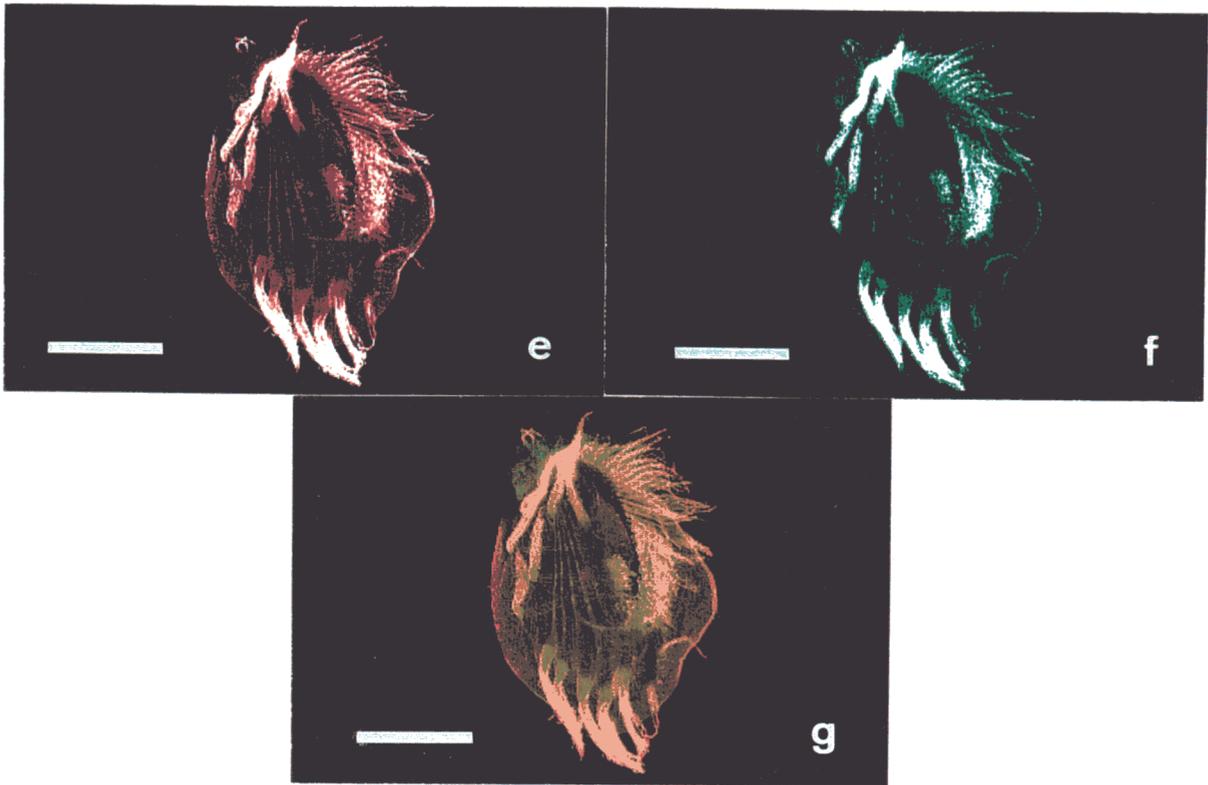
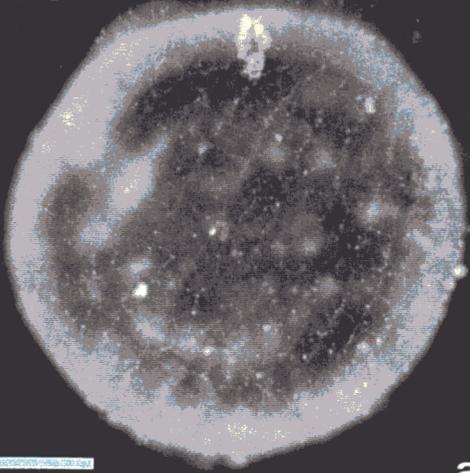


fig. 38- Resultados de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo específico del isotipo Bt3. La barra representa 20 μm . A,B, imágenes obtenidas de células de *E. focardii* fijadas con paraformaldehído con un microscopio de inmunofluorescencia convencional; C-E, imágenes obtenidas de células fijadas con etanol con un microscopio confocal (fotografías de P. Ballarini): (C) el anticuerpo antiisotipo ha sido revelado con un anticuerpo secundario conjugado con Texas red; (D) el anticuerpo monoclonal DM1B ha sido revelado con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína; (E) imagen obtenida de la superposición de las dos precedentes.

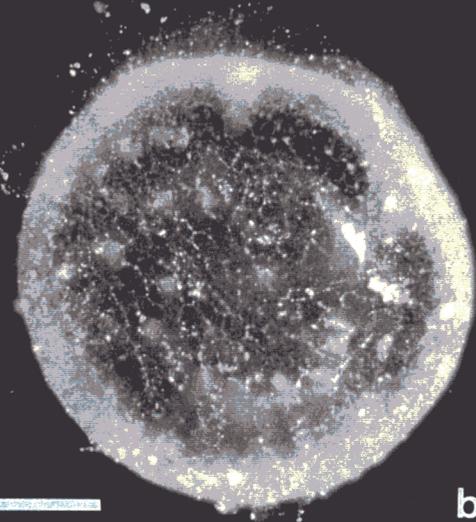
38



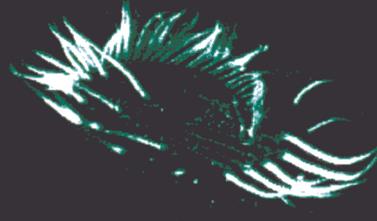
a



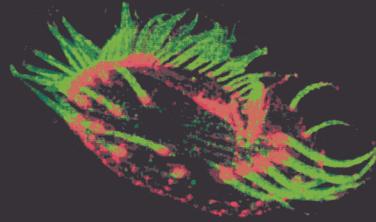
c



b



d

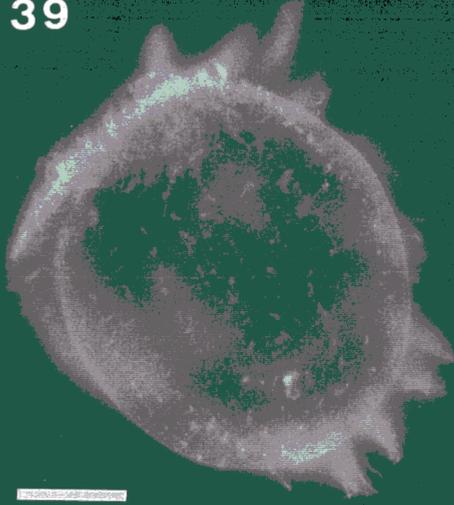


e

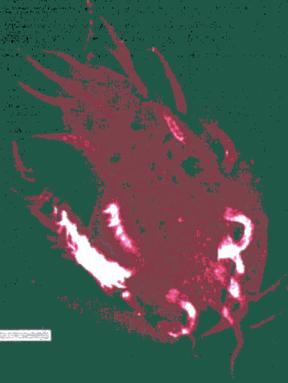
fig. 39 (A,B)- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo específico del isotipo Bt4. Microscopio de inmunofluorescencia convencional. La barra representa 20 μm .

fig. 39 (C-E)- Imágenes obtenidas con un microscopio confocal y según el mismo procedimiento descrito en las dos figuras anteriores. La barra representa 40 μm .

39



a



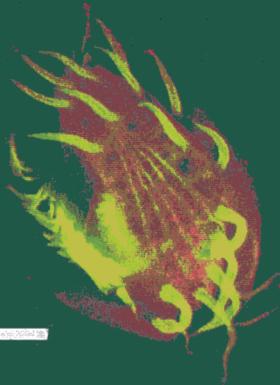
c



b



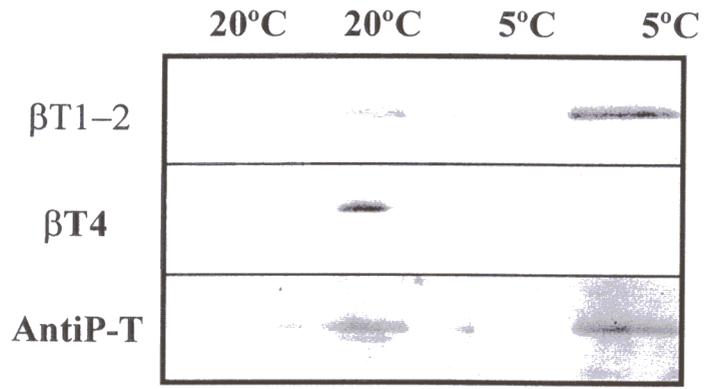
d



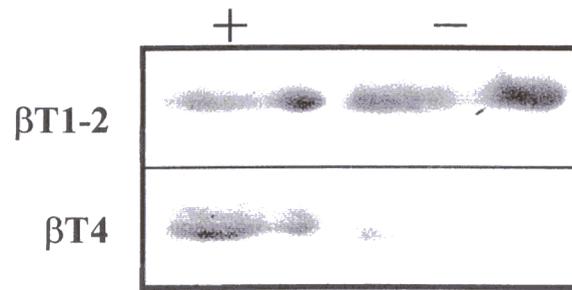
e

fig. 40- Western blot realizado con anticuerpos específicos de las secuencias correspondientes a los isotipos β t1-2 y β t4, así como con un anticuerpo dirigido contra las treoninas fosforiladas. Inmunoreconocimiento de los microtúbulos citoplasmáticos de *E. focardii* inducidos a repolimerizarse a unas temperaturas de 20°C y 5°C.

fig. 41- Western blot realizado con los anticuerpos específicos de las secuencias correspondientes a los isotipos β t1-2 y β t4. Inmunoreconocimiento de los microtúbulos citoplasmáticos de *E. focardii*: (+) muestra sometida a un tratamiento de defosforilación; (-) muestra control a la que no se le ha añadido fosfatasa.



40



41

4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN LA TUBULINA DE *E. focardii*

Además de la posible fosforilación a que se hace referencia en el anterior apartado, se puso de manifiesto la presencia de modificaciones postraduccionales en la tubulina de *E. focardii* mediante anticuerpos específicos frente a tubulina acetilada, tirosilada y poliglutamilada.

Nuestros resultados muestran la existencia de tubulina acetilada y glutamilada en las células de *E. focardii*, mientras que no se observó ninguna reactividad en los extractos de *E. focardii* usando los anticuerpos frente a tubulina tirosilada (1A2 y YL1/2) (fig. 42). El anticuerpo dirigido contra la tubulina acetilada reconoce una única banda que migra de forma similar a la α tubulina de la muestra de tubulina cerebral bovina utilizada como control (fig. 42(b)). En relación con el anticuerpo GT335, cuando se analizaron los extractos de *E. focardii* por inmunoblotting se reconoció una banda gruesa y difusa, siendo imposible distinguir si la reactividad corresponde a la α o a la β tubulina de *Euplotes*, debido a la comigración de ambas bandas (fig. 42(c)).

4.1. CÉLULAS INTERFÁSICAS DE *E. focardii*

4.1.1. Microtúbulos acetilados

La acetilación se detectó preferentemente en los microtúbulos axonemales, de manera que los orgánulos compuestos de cilios, como son los cirros locomotores, la zona adoral de membranelas, el complejo paroral o los cilios de las cinetias dorsales, resultan fuertemente teñidos en las preparaciones de inmunofluorescencia realizadas con el anticuerpo (fig. 43). Las fotografías muestran también la decoración diferencial a lo largo de la estructura axonemal y, en particular, la fuerte tinción de la región distal del axonema ciliar.

También están acetilados los haces microtubulares que parten de la base de cada uno de los cirros, los microtúbulos asociados al sistema de la vacuola contráctil (fig.

43(c)), una red de microtúbulos localizados bajo las membranelas (fig. 43(a)), y algunos microtúbulos corticales, sobre todo aquellos que constituyen la red transversal (fig. 43(b)). Esta red está localizada bajo la red longitudinal, también constituida por microtúbulos, de los cuales sólo una parte están acetilados (fig. 43(d)).

4.1.2. Microtúbulos tirosilados

Usando el anticuerpo 1A2, no fue posible obtener en el inmunoblot una reacción positiva con los extractos de *E. focardii*; sin embargo, dicho anticuerpo sí reaccionó con la tubulina cerebral bovina incubada simultáneamente (fig. 42(a)). A pesar de esta falta de reacción con la tubulina del ciliado en extractos celulares, algunas estructuras microtubulares se tiñeron con este anticuerpo. Con el fin de asegurar una correcta interpretación de los resultados, y teniendo en cuenta que Olins et al. (1989) describieron la presencia de tubulina tirosilada en la especie mesófila *Euplotes eurystomus*, comprobamos la reactividad de los extractos de *E. focardii* con otro anticuerpo anti tubulina tirosilada, YL 1/2. No se observó ningún reconocimiento en los blots ni en las preparaciones de inmunofluorescencia realizadas, lo que sugiere que los microtúbulos de *E. focardii* no contienen tubulina tirosilada.

4.1.3. Microtúbulos glutamilados

Los datos obtenidos a partir de los experimentos de inmunofluorescencia realizados indican que la glutamilación está también presente en los microtúbulos axonemales de *E. focardii* (fig. 44(a,b)). Estos muestran una tinción homogénea, en contraste con la descripción que se ha hecho de la distribución de la tubulina glutamilada a lo largo de la estructura axonemal de *Paramecium* (Bré et al., 1994). Los cuerpos basales, los sistemas microtubulares asociados a ellos y la red microtubular longitudinal superficial también fueron teñidos (fig. 44(a,b)). En relación con esta última, hay una subpoblación de microtúbulos dentro de esta red cortical que se detecta exclusivamente con este anticuerpo (fig. 44(c)), y que no resulta teñida ni con los anticuerpos anti- α tubulina (fig. 44(d)) ni con el anticuerpo 611B1 (fig. 43(d)).

4.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS MODIFICADOS POSTRADUCCIONALMENTE DURANTE LA DIVISIÓN DE *E. focardii*

En un estudio previo (Serrano et al., 1992), puede encontrarse una descripción detallada de la división celular de esta especie antártica. Como hecho común a ambas modificaciones postraduccionales, la acetilación y la poliglutamilación, observamos que las estructuras microtubulares acetiladas y glutamiladas descritas para la célula interfásica de *E. focardii* permanecen visibles durante todo el proceso de bipartición.

Además, la tubulina glutamilada se observó durante la formación de determinados elementos microtubulares a lo largo del proceso de división: primordio oral (fig. 45(a)), primordios cirrales (fig. 45(b)), cinetosomas de las cinetias dorsales en formación (fig. 45(c)) y algunos haces que constituyen el huso de división (fig. 45(d)). De igual modo, la red longitudinal de microtúbulos de ambas superficies del ciliado (dorsal y ventral) permaneció visible durante todo el ciclo celular, como se muestra en la figura 45(e-h).

En cuanto a la tubulina acetilada, presentó una pauta de distribución muy similar a la descrita para la tubulina glutamilada, con la excepción de la red longitudinal superficial, que se tiñó muy débilmente (fig. 46(a,b)), y de aquellos microtúbulos localizados bajo las membranelas en los que la presencia de tubulina acetilada fue especialmente evidente (fig. 46(c)).

4.3. COMPARACIÓN DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA DE *E. focardii* Y DE *E. vannus*, UNA ESPECIE ATEMPERADA

Se realizaron con la especie *Euplotes vannus* los mismos experimentos de inmunofluorescencia llevados a cabo con la especie antártica, usando anticuerpos dirigidos contra las variaciones postraduccionales de la tubulina. Los datos obtenidos a partir de estos experimentos nos permitieron identificar la acetilación y la glutamilación

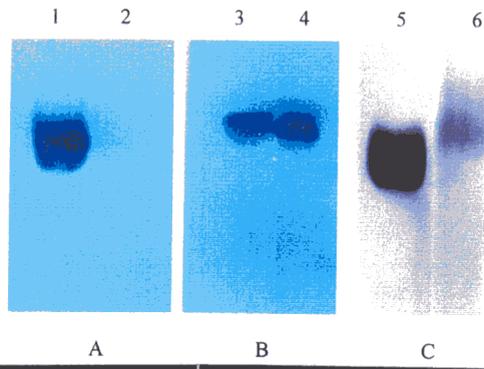
como las variaciones postraduccionales de la tubulina de este ciliado. El anticuerpo anti tubulina tirosilada dió, de nuevo, una reacción negativa.

Ambas especies mostraron prácticamente el mismo patrón morfológico microtubular por lo que respecta a las modificaciones postraduccionales. No obstante, en relación con la acetilación destacaremos dos diferencias: el hecho de que las cerdas dorsales de *E. focardii* parezcan estar teñidas con 611B1 a lo largo de un tramo de mayor longitud que en el caso de *E. vannus*, el cual muestra una punta más teñida que el resto del axonema (fig. 47(a)). Por otra parte, los cinetosomas dorsales son visibles con este anticuerpo en el espécimen antártico, mientras que no pueden detectarse en la especie atemperada (fig. 47(a)).

En relación con la glutamilación, la principal diferencia entre ambas especies radica a nivel cortical: *E. focardii* parece tener un mayor número de microtúbulos glutamilados que *E. vannus* en la red longitudinal. En esta última especie, aunque la red longitudinal también aparece glutamilada, nunca ha sido detectada de una forma tan nítida como en la especie antártica (fig. 48).

fig. 42- Western blot realizado con anticuerpos dirigidos contra modificaciones postraduccionales de la tubulina. Inmunoreconocimiento de la tubulina cerebral bovina [purificada, (1, 3, 5)] y de la tubulina de *E. focardii* [en muestras de extractos completos del ciliado, (2, 4, 6)]. A, anticuerpo 1A2 dirigido contra tubulina tirosilada; B, anticuerpo 611B1 dirigido contra tubulina acetilada; C, anticuerpo GT335 dirigido contra tubulina glutamilada.

fig. 43- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo 611B1 dirigido contra tubulina acetilada. La barra representa 20 μm . A, elementos microtubulares teñidos por este anticuerpo en el lado ventral de una célula permeabilizada y fijada de *E. focardii*; nótese la decoración diferencial a lo largo de la estructura axonemal. La flecha señala la red microtubular localizada bajo las membranelas orales; B, cinetias dorsales y red microtubular superficial transversal; C, microtúbulos asociados al sistema de la vacuola contráctil; D, subpoblación de microtúbulos acetilados de la red microtubular superficial longitudinal.



42

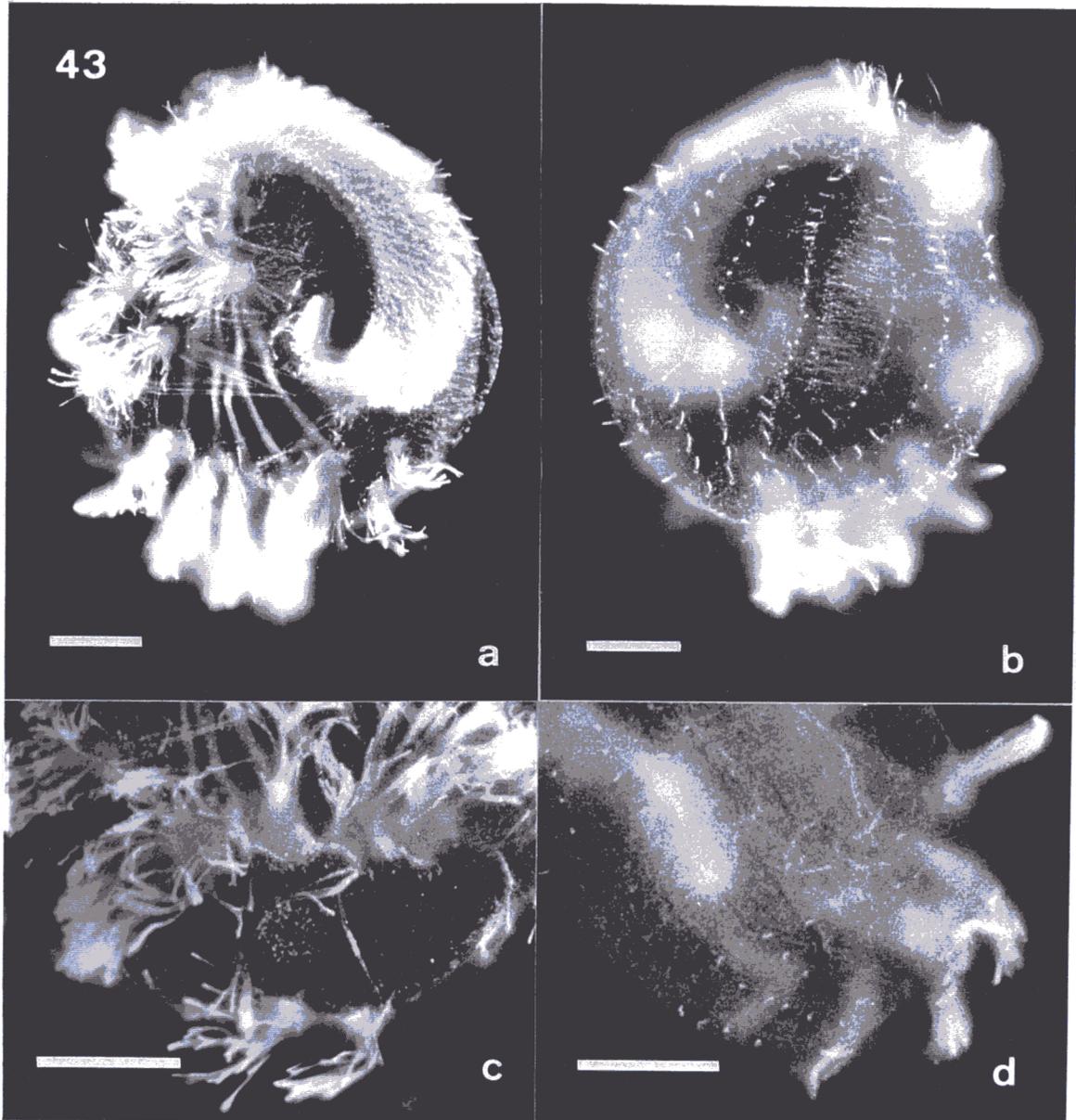
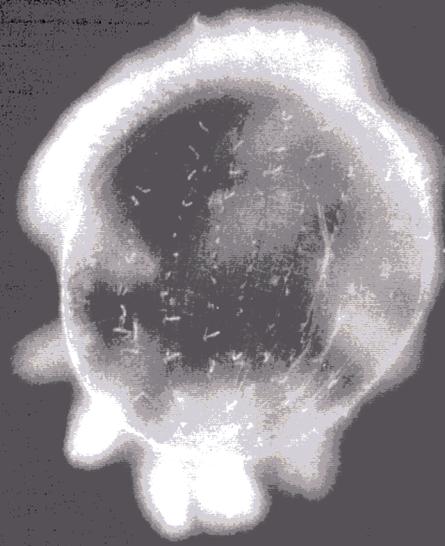


fig. 44- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo GT335 dirigido contra tubulina glutamilada. La barra representa 20 μm . A, elementos microtubulares teñidos por este anticuerpo en el lado ventral de una célula permeabilizada y fijada de *E. foecardii*. Nótese la tinción homogénea a lo largo de la estructura axonemal; B, elementos microtubulares en el lado dorsal del mismo individuo; C,D detalle de la red microtubular superficial longitudinal teñida con GT335 (C) y con el anticuerpo anti α tubulina, DM1A (D).

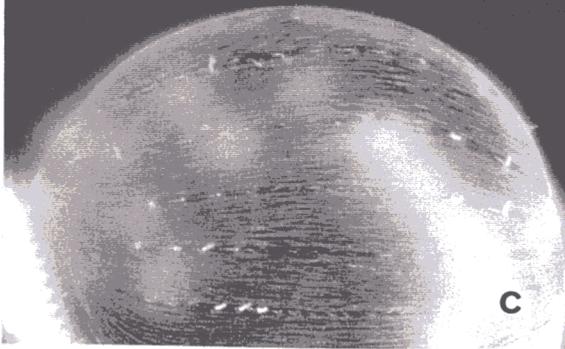
44



a



b



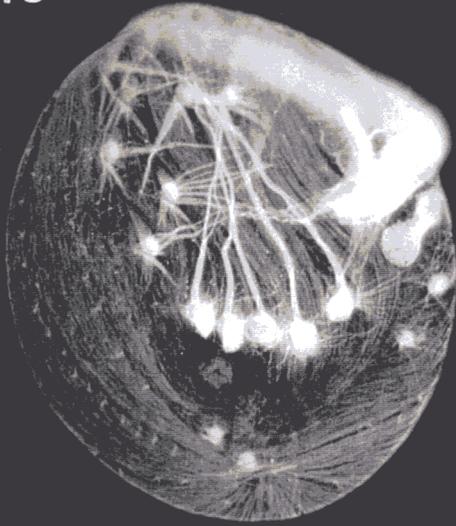
c



d

fig. 45 (A-D)- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo GT335. Distribución ventral de los elementos microtubulares glutamilados durante el proceso de división de *E. focardii*. La barra representa 20 μm . A, la flecha señala el primordio oral; B, primordios cirrales; C, célula en una fase más tardía del proceso de división donde además de los primordios cirrales se pueden observar los cinetosomas de las cinetias dorsales en formación; D, migración de la infraciliación ventral hacia su posición final en las células hijas. Se observan haces microtubulares probablemente implicados en esta migración.

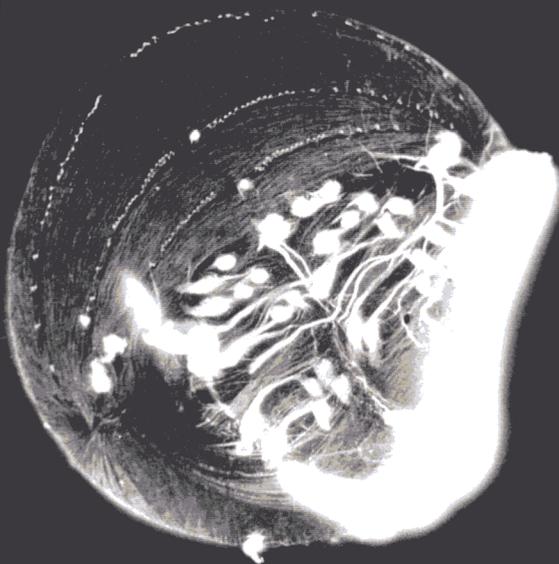
45



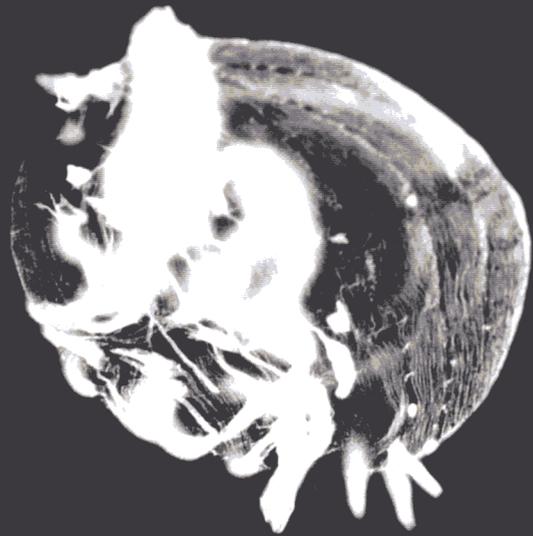
a



b



c



d

fig. 45 (E-H)- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo GT335. Distribución dorsal de los elementos microtubulares glutamilados durante el proceso de división de *E. focardii*. La barra representa 20 μ m. La red microtubular cortical longitudinal permanece visible durante todo el proceso de división.

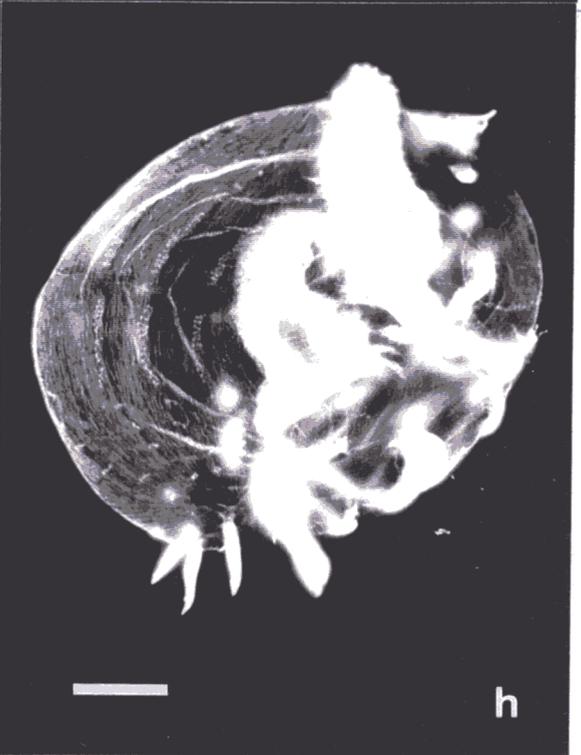
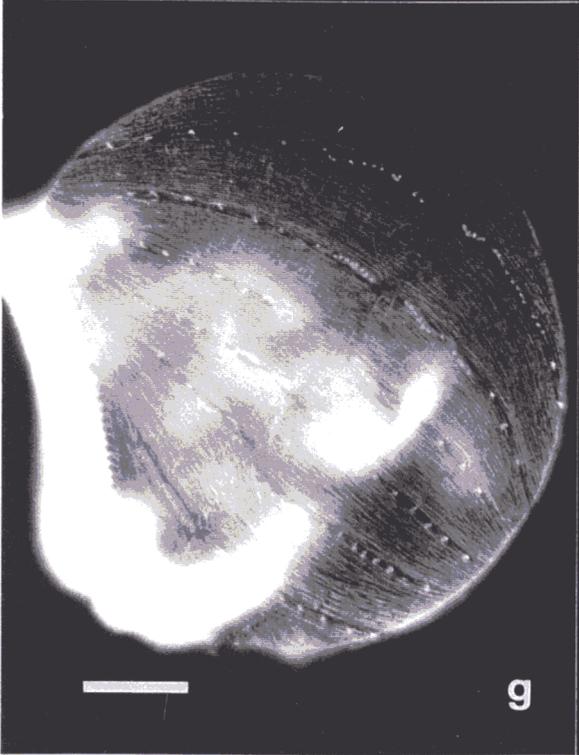
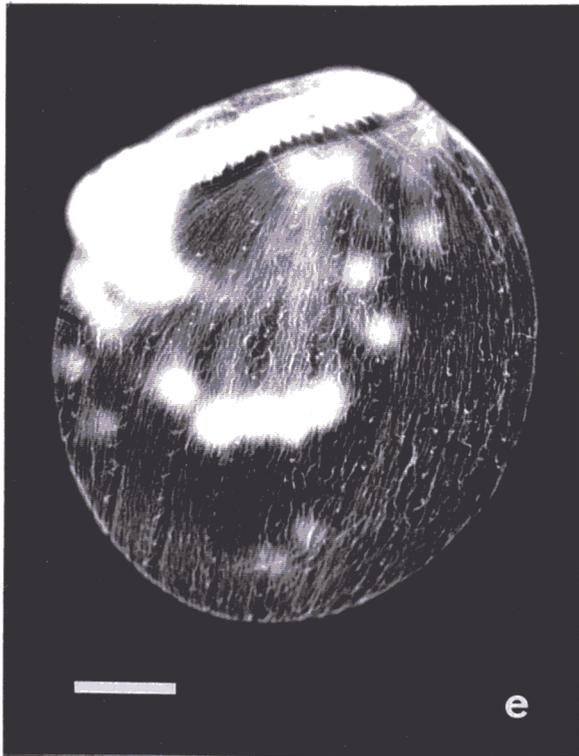
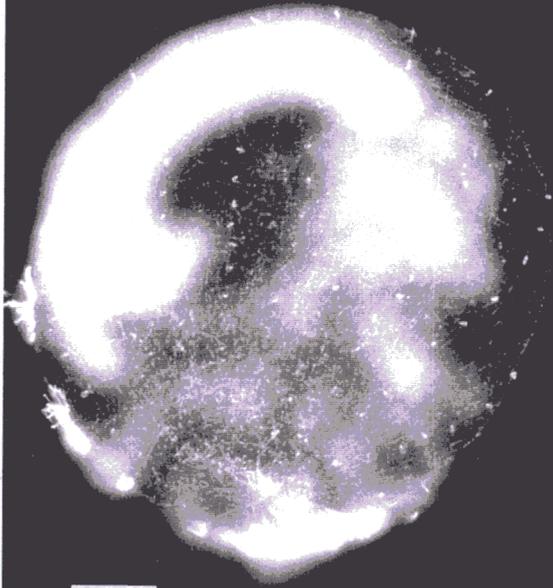
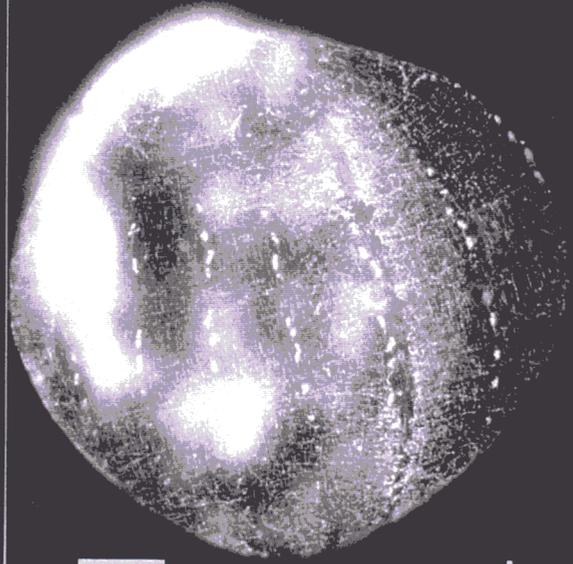


fig. 46- Inmunofluorescencia indirecta realizada con el anticuerpo 611B1. La barra representa 20 μm . A,B, distribución dorsal de los elementos microtubulares acetilados durante el proceso de división de este ciliado; C,D, lado ventral de las mismas células. Nótese la densa red microtubular localizada bajo las membranelas orales.

46



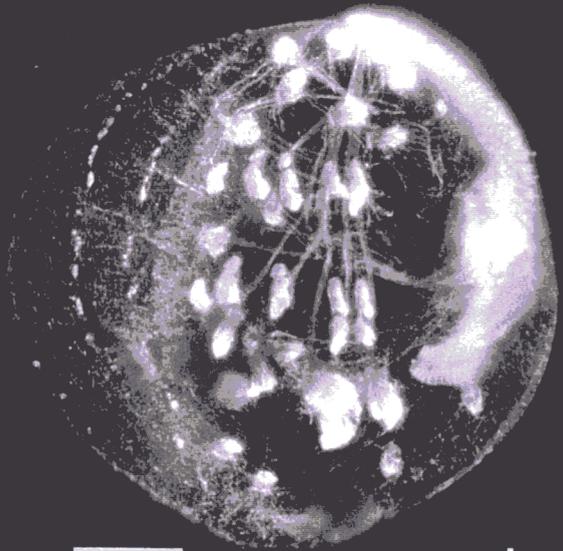
a



b

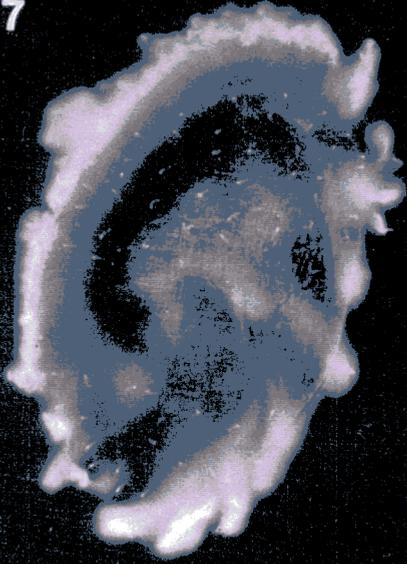


c



d

47



a

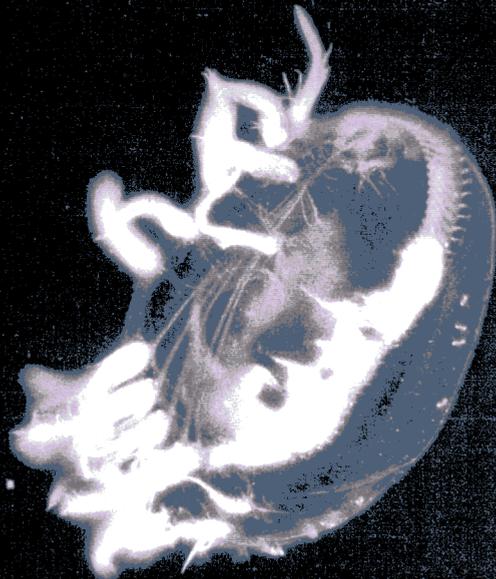


b

48



a



b

1. CITOESQUELETO MICROTUBULAR DE *Euplotes focardii*

Para el estudio del citoesqueleto microtubular de *E. focardii*, partimos de una serie de experiencias previas realizadas con las muestras originales en las que habíamos estudiado la estructura general del citoesqueleto en células teñidas con plata, así como el patrón morfogenético durante el proceso de bipartición (Serrano *et al.*, 1992).

Para determinar cuáles de los elementos corticales descritos con anterioridad eran de naturaleza microtubular, se aplicaron técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de inmunofluorescencia. Los resultados demuestran que, en *E. focardii*, los microtúbulos constituyen los elementos citoesqueléticos principales de la célula. En líneas generales, el patrón microtubular de *E. focardii* es similar al descrito para otras especies mesófilas del mismo género (Grim 1967, 1982; Tuffrau *et al.* 1968; Ruffolo 1967a, b; Jerka-Dziadosz *et al.* 1987; Delgado *et al.* 1988; Fleury 1991a, b), es decir, presenta una clara diferenciación dorso-ventral con una disposición característica de ciliados hipotricos. No obstante, hemos observado algunas particularidades en la especie que a continuación se detallan:

a) En el complejo que constituye cada cerda en las cinetias dorsales de *E. focardii*, el cilio que emerge presenta el típico patrón microtubular y varios lasiosomas asociados a su parte lateral, tal y como ocurre en *E. eurystomus* (Ruffolo 1976a, b), si bien en este caso la membrana ciliar no se encuentra replegada del modo que se ha descrito en la referida especie. Además, en *E. focardii* tan sólo se observan fibras transversas asociadas al cinetosoma anterior no ciliado de cada pareja, mientras que en otras especies del género se describen también microtúbulos postciliares. Por otro lado, se han identificado estructuras membranosas contenidas en las ámpulas o vacuolas ciliares de *E. focardii* que no se habían observado con anterioridad.

b) La red microtubular superficial es semejante a la de otros euplótidos. Todos los autores coinciden en la función de esta red, consistente en el mantenimiento de la forma celular, pero su origen parece ser distinto en los diferentes grupos de ciliados. En

algunos de estos organismos, este sistema superficial se origina en los microtúbulos postciliares (heterotricos) o transversos (colpódidos) asociados a la infraciliación somática. No obstante, Fleury (1991) sugiere que en *Euplotes* estos microtúbulos superficiales podrían generarse lateralmente a partir de otros microtúbulos superficiales. De acuerdo con esta hipótesis, sustentada también por los resultados de Jerka-Dziadosz (1988) en *E. octocarinatus*, en *E. focardii* los microtúbulos de la red superficial podrían originarse a partir de los microtúbulos adicionales que refuerzan las crestas peliculares observadas entre los cirros ventrales.

c) La infraciliación somática ventral de *E. focardii* coincide con la observada por Fleury (1991a) en *E. aediculatus*. Las diferencias en la localización de las fibras postciliares en los cirros fronto-ventrales y los cirros transversos, atribuidas a la rotación que sufren estos últimos durante el proceso de bipartición, es coherente con lo observado en *E. aediculatus*. Sin embargo, la organización de las fibras anales de *E. focardii* no puede calificarse de nematodesmal. Los microtúbulos se hallan unidos entre sí por finas conexiones, pero su disposición no se corresponde con el modelo hexagonal típico de los nemadesmos.

d) Dado que la bibliografía sobre el citoesqueleto oral del género *Euplotes* es muy escasa, no disponemos de suficientes términos de comparación para evaluar nuestras observaciones. Con todo, la red microtubular que se dispone por debajo de la ZAM es más compleja en este ciliado antártico que la descrita en *E. patella* (Tuffrau, 1968). Las crestas localizadas entre paramembranelas están reforzadas por fibras transversas asociadas a las dos filas de cinetosomas situadas más hacia la izquierda, que además parecen estar más desarrolladas que en otras especies del género. En el lado derecho de la cavidad oral, las fibras postciliares son los principales elementos asociados al complejo paroral. Finalmente, hemos identificado la fibra postoral, que muestra una conexión con las paramembranelas más posteriores.

Todo ello nos permite conjeturar que las diferencias a nivel de organización citoesquelética que se aprecian en *E. focardii*, y muy especialmente el desarrollo más

complejo del area oral, podrían estar relacionadas con la adaptación a dos factores limitantes: las bajas temperaturas características del ambiente antártico y las condiciones nutricionales específicas del mismo. En los cultivos clonales mantenidos en nuestro laboratorio se ha observado un elevado polimorfismo en función de la disponibilidad de nutrientes (Arregui *et al.*, 1991; Valbonesi *et al.*, 1995). En cultivos con un deficiente aporte de nutrientes, entre el 20 y el 30% de la población celular está constituida por individuos gigantes, mientras que el resto mantiene unas dimensiones medias. Estas modificaciones exigen la formación de nuevas estructuras integradas por microtúbulos citoesqueléticos "adicionales" a los ya descritos. Estos individuos gigantes son además formas macrostomas cuya condición es reversible, poseen unas dimensiones que casi triplican las dimensiones normales de su especie y son caníbales, es decir, pueden ingerir otras células de menores dimensiones de su misma especie. Así pues, la forma macrostoma de *E. focardii* representa una notable ventaja adaptativa para la supervivencia de la especie, incapaz de enquistarse durante el invierno antártico. Es su capacidad de adaptación a los cambios del entorno nutricional la que les permite asegurar su supervivencia y proliferación aun en las condiciones de nutrición más extremas.

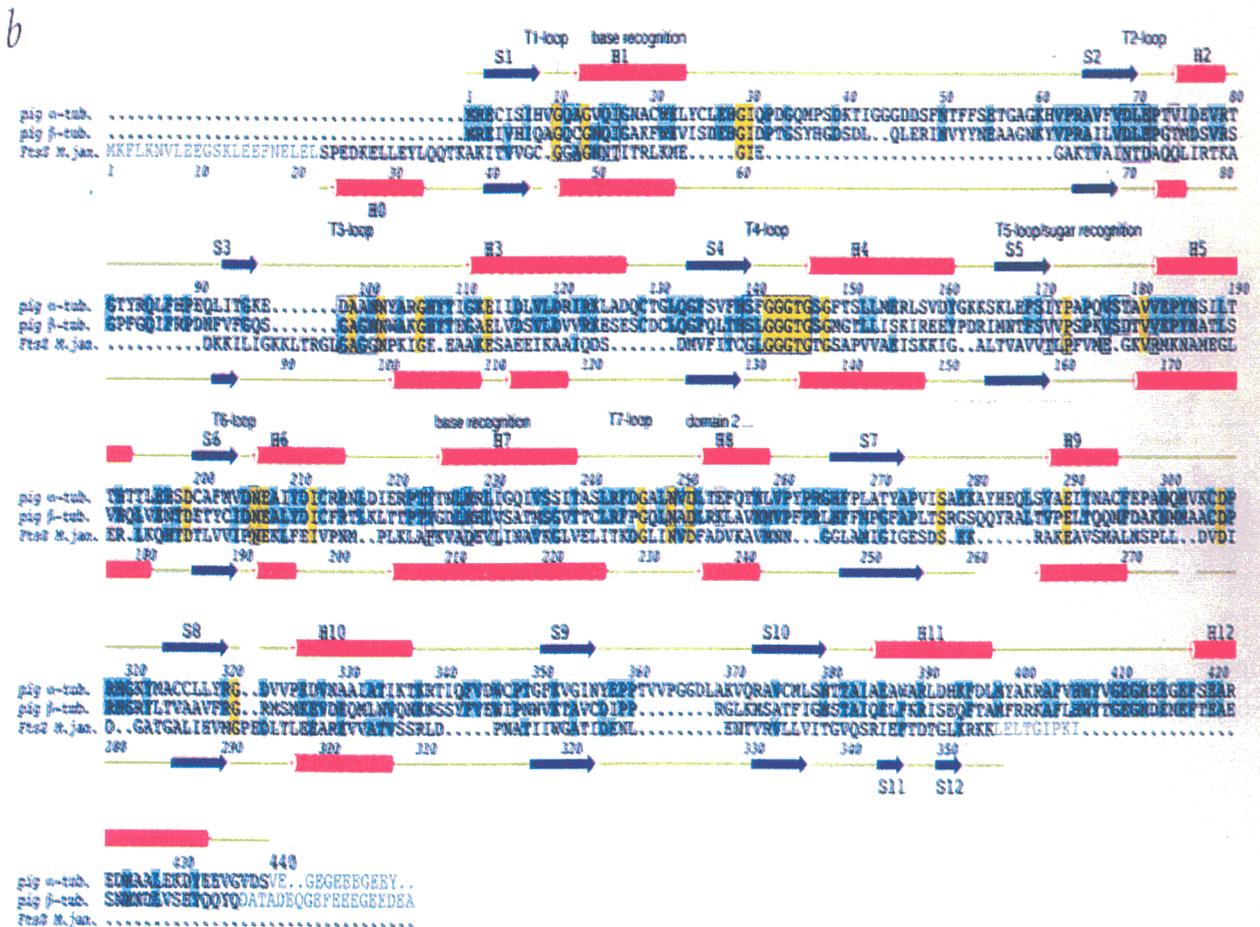
2. CARACTERÍSTICAS DE LA TUBULINA DE *Euplotes focardii*

2.1. LA α Y β TUBULINA DE ESTE CILIADO ADAPTADO AL FRÍO CONSERVA EPÍTOPOS DE IMPORTANCIA FUNCIONAL PRESENTES EN OTRAS ESPECIES TEMPERADAS

Para comprobar la presencia de determinadas secuencias en la α y β tubulina de *E. focardii*, utilizamos un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra péptidos de la secuencia de la tubulina cerebral porcina. El criterio utilizado para producir los anticuerpos fue su posible antigenicidad como zonas hidrofílicas de la superficie de la proteína. Localizamos estas regiones en el modelo estructural tridimensional de la tubulina porcina recientemente propuesto por Nogales *et al.* (1998) a partir de experimentos de cristalografía electrónica. Para una mayor claridad terminológica,

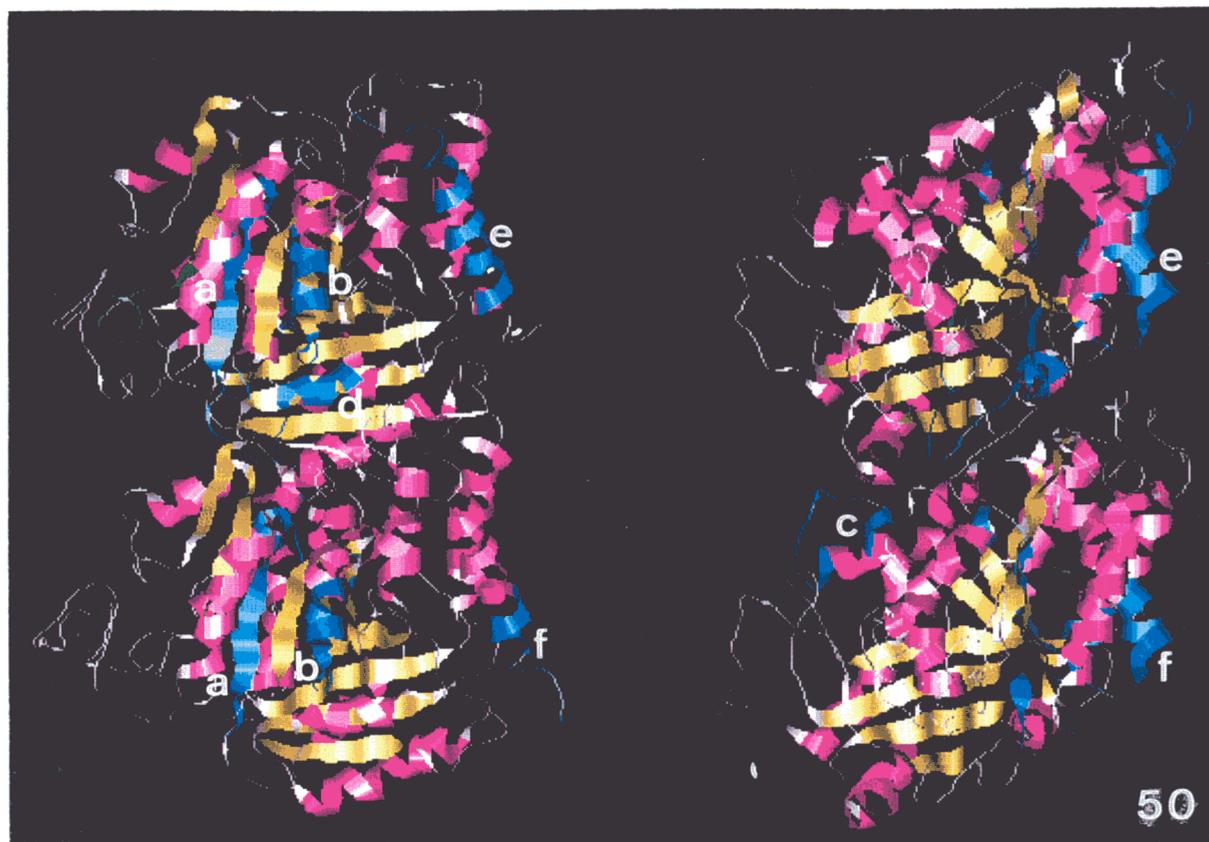
reproducimos a continuación (fig. 49) la nomenclatura básica utilizada por dichos autores para la enumeración de los diferentes elementos de la estructura secundaria de la tubulina porcina.

fig. 49- Elementos de estructura secundaria localizados sobre las secuencias de la α y β tubulina porcina (Nogales *et al.*, 1998).



En la figura 50, se reproduce el modelo tridimensional, en el que aparecen marcadas en azul las regiones con las que reaccionan los anticuerpos empleados en este estudio.

fig. 50- Modelo tridimensional de la tubulina. Las hélices α aparecen coloreadas en rosa y en amarillo las láminas β . En azul están marcadas las regiones con las que reaccionan los anticuerpos antisequencia empleados en este trabajo.



A continuación, analizamos la importancia funcional de estos epítopos en relación con los resultados obtenidos.

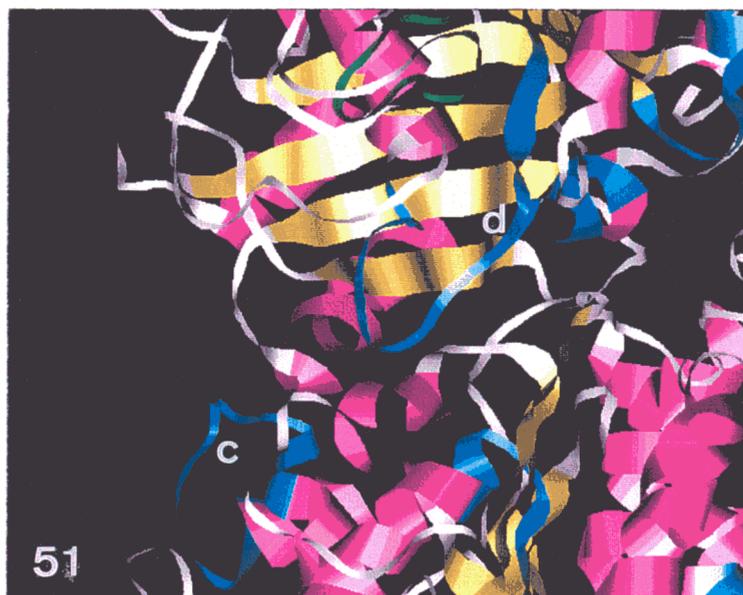
- (a) Posiciones 1-13 de la α y β tubulina: esta región forma parte de los elementos de la estructura secundaria definidos como S1 y bucle T1 en la figura 49. Estos están en contacto directo con el GTP: concretamente, con los fosfatos (residuos Gly10, Glu11) y con la base guanina (Cys 12).

- (b) Posiciones 155-168 de la α tubulina y 153-165 de la β tubulina: forman parte de los elementos de la estructura secundaria definidos como H4 y S5 en la figura 49. Se trata de zonas de interacción lateral entre dímeros.

- (c) Posiciones 214-226 de la α tubulina: se trata de un bucle que existe entre las hélices H6 y H7, tal como están definidas en la figura 49. Como puede observarse en la figura 51, constituye una zona de interacción longitudinal entre monómeros.

- (d) Posiciones 241-256 de la β tubulina: forman parte del bucle T7 y el comienzo de la hélice H8 definidos en la figura 49. Esta zona está en contacto con el nucleótido y es además una región directamente implicada en el contacto longitudinal entre monómeros (fig. 51).

fig. 51- Ampliación, en el modelo tridimensional propuesto para la tubulina, de la región de contacto longitudinal entre monómeros. Coloreadas en azul y señaladas por una flecha están las posiciones β (241-256) y α (214-226).



- (e) Posiciones 412-431 de la β tubulina: forman la hélice H12 de la figura 49. Esta hélice se encuentra tanto en la superficie de la molécula como en la superficie externa de los microtúbulos, e interviene en la unión con las MAPs y con las proteínas motoras.

- (f) Posiciones 430-443 de la α tubulina: forman parte del extremo de la hélice H12 de la figura 49 y también incluyen los últimos residuos de la región carboxi terminal de la molécula. Estos residuos corresponden a una región hipervariable de la secuencia en la que se localizan la mayor parte de las diferencias entre isotipos y entre especies.

El reconocimiento de la α y de la β tubulina de *E. focardii* por parte de estos anticuerpos demostró que estas secuencias también están conservadas en dicho organismo.

La comparación de las secuencias frente a las cuales se habían sintetizado los anticuerpos con las secuencias proteicas predichas a partir de la secuencia génica de la tubulina del ciliado (Miceli *et al.*, 1994; Pucciarelli *et al.*, 1997) permitió comprobar que sólo hay ligeras diferencias entre ambas, que en todo caso no alteran la función de estas zonas en la formación de los microtúbulos.

2.2. VARIACIONES LOCALES DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA TUBULINA DE *E. focardii*

Detrich *et al.* (1989) y Williams *et al.* (1985) propusieron la hipótesis según la cual la estabilidad al frío de los microtúbulos de los organismos adaptados a las bajas temperaturas era debida, principalmente, a las propiedades intrínsecas de la tubulina, en virtud de su secuencia primaria y/o de la presencia de modificaciones postraduccionales particulares.

La secuencia primaria de la α tubulina de *E. focardii* está muy conservada (Miceli, comunicación personal) con respecto a la de las especies congénicas no adaptadas al frío, y no presenta unas características propias, al contrario de la descrita por Detrich para los peces antárticos. En estos últimos organismos se ha observado que la α tubulina presenta un mayor porcentaje de aminoácidos básicos que en el caso de la tubulina de los organismos de ambientes templados, lo que se traduce en un menor número de cargas negativas que parece favorecer la dinámica de polimerización al frío.

En cambio, el análisis de las secuencias completas de la β tubulina de *E. focardii* demuestra que, en este organismo, la secuencia primaria de esta proteína es, en algunos casos, muy divergente respecto de otras formas de β tubulina de especies afines. Si consideramos que la tubulina es una proteína muy conservada debido a sus complejas

funciones, la acumulación de mutaciones no letales en la β tubulina de *E. focardii* podría estar determinada por la presión selectiva de un habitat extremo como es el antártico.

2.2.1. Importancia de las sustituciones aminoacídicas de la tubulina de *E. focardii* en la estructura de la proteína

Como se ha expuesto en "Resultados", algunas de las sustituciones aminoacídicas específicas de la β tubulina de *E. focardii* se concentran en las posiciones 52 a 63 de la secuencia. De acuerdo con los resultados obtenidos por Nogales *et al.* (1998), esta región forma parte del bucle entre la hélice H1 y la S2 (figs. 49 y 52).

fig. 52- Localización (coloreado en verde) de las posiciones β (52-63) en el modelo tridimensional propuesto para la tubulina.



Según estos autores, estas posiciones se localizan en la superficie interna del microtúbulo (fig. 50) y se corresponden con una región donde habitualmente se encuentran deleciones e inserciones. Por tanto, no puede considerarse que la presencia en esta zona de mutaciones en la tubulina de *E. focardii* pueda tener consecuencias importantes en la dinámica de los microtúbulos adaptados al frío de este ciliado.

Otra característica de la β tubulina de *E. focardii* es la presencia de sustituciones en el dominio carboxi terminal de la proteína. Esta región es particularmente importante en la interacción de los microtúbulos con determinadas proteínas (MAPs o proteínas motoras) a través de las cuales interaccionan, a su vez, con otros componentes celulares.

La estructura tridimensional predicha por Nogales *et al.* (1998) para el dominio carboxi terminal es de dos hélices H11 y H12 separadas por un bucle. Estos elementos intervienen en la interacción longitudinal entre monómeros. Los últimos residuos carboxi terminales han sido eliminados del modelo por tratarse de una región hipervariable de la secuencia donde se localizan la mayor parte de las diferencias entre isotipos y entre especies, como de hecho ocurre en el caso de los diferentes isotipos de la β tubulina de *E. focardii*.

La predicción de la estructura secundaria de este dominio hipervariable efectuada por el método PHD (Rost y Sander, 1993; Rost y Sander, 1994) ha demostrado que las variaciones aminoacídicas presentes en los genes β t3 y β t4 pueden cambiar la conformación del dominio carboxi terminal. Un cambio estructural en esta región puede reducir la flexibilidad del conjunto del dominio, lo que podría determinar un tipo de interacción distinta con las MAPs, indispensable para la regulación de la dinámica de los microtúbulos adaptados al frío.

Por último, en la secuencia primaria de dos de las isoformas de la β tubulina de *E. focardii* resulta evidente la presencia de posibles sitios de fosforilación (una modificación no muy frecuente en la tubulina) constituidos por una serina en posición 442 de la β t3 y dos treoninas en las posiciones 443 y 445 en la β t4. Estas sustituciones dan lugar a la formación de una secuencia consenso para la fosforilación por enzimas de la familia de la caseína-quinasa (Kennelly y Krebs, 1991), como se ha demostrado en el caso de uno de los isotipos de la β tubulina de pollo (Diaz-Nido *et al.*, 1990; Rudiger y Weber, 1993).

2.3. FUNCIÓN DE LOS ISOTIPOS DE LA β TUBULINA DE *E. focardii* EN RELACIÓN CON LA ADAPTACIÓN AL FRÍO

En los ciliados en general, aparece un número reducido de genes de tubulina que codifican proteínas idénticas o muy semejantes entre sí. Además, en este grupo la presencia de diferentes isotipos parece tener su origen en procesos de duplicación génica, con lo cual los diversos isotipos son más similares dentro de una misma especie que entre especies. Por el contrario, en vertebrados los diferentes genes de α y β tubulina pueden distribuirse en clases isotípicas comunes de acuerdo con sus funciones o especificidades en los tejidos.

La evolución de las secuencias de la tubulina en ciliados parece estar guiada por una tendencia a la uniformización. Esta característica, que aparece también en amebas como *Naegleria* (Lai *et al.*, 1988), podría reflejar la necesidad de una cierta uniformización del pool de tubulina para poder formar estructuras microtubulares tan estables y extendidas como son los axonemas de los cilios y de los flagelos. Se trata de una hipótesis propuesta inicialmente por Little (1985) y Silflow (1991) y discutida más recientemente por Gaertig *et al.* (1993) y Lai *et al.* (1994).

Por tanto, el ciliado *E. focardii* constituye una excepción, en la medida en que, lejos de mostrar esa misma tendencia a la uniformización, presenta cuatro isotipos diferentes de β tubulina. Para abordar esta cuestión de la diversidad de la β tubulina en *E. focardii*, utilizamos métodos inmunocitoquímicos.

Cuando se desea obtener anticuerpos frente a determinadas regiones de una proteína, por regla general se recurre a una de estas dos estrategias: o bien se obtienen anticuerpos monoclonales frente a la proteína para posteriormente mapear sus epítomos, o bien se procede a la inmunización con péptidos químicamente sintetizados correspondientes a las secuencias de la proteína. Esta segunda opción es la que elegimos en nuestro caso. A tal fin, la selección de los péptidos adecuados reviste una importancia crucial.

Para la producción de los anticuerpos antiisotipos de la β tubulina de *E. focardii* se realizó previamente un análisis de accesibilidad de los residuos al solvente que permitió seleccionar los péptidos más adecuados al efecto. También tuvimos en cuenta el hecho de que la región carboxiterminal es la región más divergente (que en el caso de este ciliado contiene además algunas sustituciones aminoacídicas únicas) y está considerada como una de las regiones de la tubulina más inmunogénicas.

De este modo se seleccionaron y se sintetizaron químicamente cinco péptidos correspondientes a tres isoformas distintas de la proteína.

Los sueros obtenidos reaccionaron específicamente con las regiones de la proteína homóloga a los péptidos sintetizados y reconocieron también específicamente la tubulina y los microtúbulos celulares de *E. focardii*.

Por las características de secuencia del péptido elegido, se esperaba que el suero anti β 3 fuese muy específico de esta especie, ya que incluía algunas de las sustituciones únicas descritas en este ciliado, mientras que cabía esperar que los sueros anti β 1-2 y anti β 4 reaccionaran con una mayor variedad de β tubulina de otros grupos.

La reactividad del suero C8 (anti β 4) con la tubulina purificada de cerebro bovino y con los extractos celulares de *Paramecium* sugiere la existencia de una región homóloga conservada en la tubulina de estos organismos. En cambio, el suero C5 (anti β 1) no reaccionó con ninguna de estas dos muestras, en contra de lo que cabría esperar por la similitud entre la región contra la que se dirige y la del isotipo β 4. Una forma de explicar este comportamiento tal vez sea que, en *E. focardii*, el isotipo β 1 no se encuentre modificado postraduccionalmente a nivel de estos quince últimos aminoácidos, de modo que la secuencia es reconocida sin ningún problema por el anticuerpo. Si, como sucede en el caso de la tubulina bovina y de la de *Paramecium*, este dominio presenta alguna modificación postraducciona (la poliglutamilación ha sido descrita en ambos casos), es posible que la antigenicidad del epítipo varíe de tal forma que el anticuerpo no sea ya capaz de reconocerlo. Sin embargo, la discusión de este

fenómeno excede de los objetivos perseguidos por la presente tesis.

De los resultados obtenidos en los experimentos de inmunoreconocimiento llevados a cabo con los anticuerpos específicos de los tres isotipos de la β tubulina de *E. focardii*, se desprende claramente que los tres se expresan y que forman parte de los sistemas microtubulares de este organismo.

Los análisis de inmunoblot e inmunofluorescencia evidencian que existe al menos un isotipo de la β tubulina de *E. focardii* que tiene una localización y posiblemente una función específicas. En efecto, al realizar un inmunoblot el anticuerpo dirigido contra el isotipo β 3 reconoce claramente la tubulina de los microtúbulos presentes en la fracción cortical, que seguramente corresponden a los cuerpos basales (según se deduce de los resultados obtenidos con la técnica de inmunofluorescencia indirecta).

Este resultado resulta particularmente interesante sobre todo si se tiene en cuenta el hecho de que estas estructuras funcionan, en protozoos, como centros organizadores de microtúbulos (MTOC). Parece lógico que este isotipo participe de algún modo en la formación de los MTOC y que, por tanto, pueda estar implicado en la nucleación de los microtúbulos. Esta hipótesis es coherente con el hecho de que tratamientos para la despolimerización de los microtúbulos como la sonicación o la adición de Ca^{2+} no parecen afectar al isotipo β 3. De hecho, como ya se ha comentado en la sección "Resultados", este isotipo únicamente se ha detectado en el sedimento obtenido de la centrifugación de los microtúbulos despolimerizados, lo que demuestra que forma parte de estructuras muy estables, como se supone que son los cuerpos basales y en general los MTOC.

Otros dos hechos apoyan esta hipótesis:

a) Se ha observado decoración con anti β 3 en células en división de *E. focardii* en otros dos compartimentos celulares: el micronúcleo y el macronúcleo. En ambos

casos, esta localización coincide con la distribución de otros MTOC ya conocidos que intervienen en el desarrollo del huso mitótico micronuclear y de los microtúbulos implicados en la división macronuclear.

b) Los resultados obtenidos en los experimentos realizados (con el fin de esclarecer este aspecto del isotipo $\beta 3$ en el marco de una línea de investigación actualmente desarrollada en colaboración con el laboratorio de la Dra. Miceli) encaminados a analizar la expresión del gen $\beta 3$ después de la desciliación celular, un proceso reversible y que estimula la nucleación de microtúbulos para la reconstrucción de los cilios. Los northern blot de m-RNA extraídos de las células de *E. focardii* antes de la desciliación, a las 4 y a las 25 horas después de la misma pusieron de manifiesto una expresión diferencial de los genes de la β tubulina: la expresión del $\beta 3$ es máxima a las 4 horas después de la desciliación, cuando se supone que se estimula la nucleación de los microtúbulos en los MTOC. La expresión del gen $\beta 1-2$ aumenta gradualmente tras la desciliación de las células en las fases previas a la división celular.

Por otro lado, para obtener la decoración con el suero anti $\beta 3$ fue necesario modificar ligeramente el protocolo inmunocitoquímico empleado con los sueros frente a los isotipos $\beta 1-2$ y $\beta 4$. Es posible que la necesidad de estos ajustes respondiera al hecho de que la producción de los anticuerpos fue diferente respecto de las proteínas transportadoras utilizadas para inmunizar al animal. Sin embargo, es más probable que se deba a la dificultad de obtener una buena decoración inherente a los MTOC. Así parece desprenderse de los ajustes que han debido introducir en los protocolos estándar otros autores para obtener la tinción de estas mismas estructuras con anticuerpos anti γ tubulina en una especie del género *Euplotes* como es *Euplotes octocarinatus* (Liang *et al.*, 1996).

De hecho, la distribución del isotipo $\beta 3$ detectada por el anticuerpo antisequencia es muy similar a la de la γ tubulina descrita en *E. octocarinatus* por dichos autores, donde se ha observado en los tres mismos compartimentos: el micronúcleo, el macronúcleo y los cuerpos basales. Incluso el tipo de decoración

obtenida es muy parecida: en el caso del micronúcleo, estos autores hacen hincapié en que la δ tubulina no presenta una mayor concentración en los polos del huso, lo que se relaciona con la ausencia de un polo ultraestructuralmente diferenciado similar al descrito en otros organismos. En ambas especies se obtienen también, en ausencia de microtúbulos detectables en el nucleoplasma, acumulaciones puntuales de tubulina en el macronúcleo: si bien el macronúcleo de *Euplotes* se divide amitóticamente, su división implica necesariamente la participación de microtúbulos que se nuclean dentro de la envoltura nuclear.

Aunque a título de mera hipótesis, estos resultados nos permiten considerar verosímil que este isotipo esté implicado en la interacción con el MTOC: más concretamente, podría ser responsable de la interacción de la γ tubulina en el extremo menos del microtúbulo, a partir del cual se inicia la nucleación de los microtúbulos. Erickson y Stoffer (1996) han sugerido la presencia en este extremo de una β tubulina que interacciona en el protofilamento lateralmente con la γ tubulina y verticalmente con la α tubulina. En *E. focardii*, esta tubulina podría estar representada por la isoforma β 3.

El resto de las estructuras microtubulares de *E. focardii* son copolímeros de los isotipos β 1-2 y β 4, según los datos que hemos obtenido: el isotipo β 1-2 está presente en todos los microtúbulos de las distintas fracciones celulares de *E. focardii*, es decir, los axonemales, citoplasmáticos y corticales. La forma β 4 está presente, principalmente, en los microtúbulos axonemales (la banda correspondiente a la fracción axo es muy patente en los experimentos de western blot, y cirros y membranelas resultan fuertemente teñidos en las imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia).

Por otro lado, los experimentos de despolimerización-repolimerización realizados mediante la incubación de los extractos celulares a 20°C y 5°C con GTP demostraron que los microtúbulos de este organismo no sólo son capaces de polimerizar a 5°C, sino que la polimerización resulta favorecida a esta temperatura, al menos en lo que respecta al isotipo β 1-2, tal y como demuestra la fuerte reacción de la muestra (sedimento) obtenida incubando la fracción de los microtúbulos citoplásmicos a 5°C. Esto puede

tener dos explicaciones: o bien la β tubulina de *E. focardii* es tan divergente con respecto a la de otros organismos no antárticos que las sustituciones aminoacídicas dan lugar a una estructura tridimensional diferente que es la que facilita la polimerización a 5°C, o bien es la presencia de determinadas proteínas asociadas a los microtúbulos la que induce o favorece la polimerización a 5°C.

El resultado obtenido con el suero anti β t4 no fué el esperado en una especie antártica: en este caso, parece que la polimerización de este isotipo se ve favorecida por temperaturas más altas, ya que el anticuerpo presenta una reacción más fuerte en el caso de la muestra obtenida de la polimerización a 20°C. A la vista de estos resultados, proponemos que al menos una parte de los microtúbulos citoplasmáticos de *E. focardii* contienen el isotipo β t4 modificado postraduccionalmente, que por esta razón no puede ser reconocido por el anticuerpo antiseuencia obtenido al efecto. De hecho, el tratamiento de los microtúbulos citoplasmáticos de *E. focardii* con fosfatasa alcalina incrementa la reacción de la muestra con este anticuerpo. Dado que el suero anti β t4 reconoce específicamente el dominio carboxi terminal de este isotipo, suponemos que la fosforilación es, al menos, una de las referidas modificaciones postraduccionales, e implica a los residuos treonina 443 o treonina 445 de este isotipo.

2.4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA TUBULINA DE *E. focardii*

2.4.1. Poliglutamilación

En organismos antárticos, se ha comprobado (Detrich *et al.*, 1993) la existencia de poliglutamilación en el dominio carboxi terminal de uno de los isotipos de β tubulina neuronal del pez *Notothenia coarctata neglecta*. La modificación postraduccional causa un aumento de la carga negativa de esta región. Este dominio modula la polimerización de la tubulina *in vitro* y participa en la unión con diferentes proteínas, aparentemente gracias a esta carga negativa.

Más en general, la poliglutamilación fue inicialmente descrita en la α tubulina

(Eddé *et al.*, 1990) y posteriormente en diversos isotipos de β tubulina de vertebrado (Eddé *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1991; Rudiger *et al.*, 1995). También se ha detectado en la α y la β tubulina de ciliados como *Paramecium* y *E. aediculatus* (Bré *et al.*, 1994), una especie congénérica de *E. focardii* que se encuentra en hábitats temperados.

Nuestros experimentos con GT335, anticuerpo que reconoce la tubulina poliglutamilada, muestran la presencia de esta modificación en la tubulina del ciliado antártico. Sin embargo, dado que la α y la β tubulina de *E. focardii* comigran en el gel de poliacrilamida, al igual que ocurre en otras especies de *Euplotes* (Delgado y Fleury, 1993), la incubación con el anticuerpo reveló una única banda de un peso molecular aproximado de 50000 **. No nos fue posible determinar qué subunidad(es) estaba(n) implicada(s) en la reacción. Sin embargo, cuando analizamos las secuencias del dominio carboxi terminal de la tubulina de *E. focardii* observamos que en los cuatro genes de la β tubulina el Glu 438, la posición más común de poliglutamilación de la β tubulina en todos los organismos, incluidos los protozoos (Bré *et al.*, 1994), había sido sustituido por un aspártico. Por el contrario, la posición de poliglutamilación de la α tubulina estaba conservada, lo que nos da pie para pensar que, en nuestra especie, la poliglutamilación tiene lugar en la subunidad α .

Esta conclusión ha resultado recientemente confirmada con una técnica diseñada para poder separar las dos subunidades de la tubulina de *E. focardii*, modificando la metodología clásica de la electroforesis (Laemli, 1970). En concreto se preparó un gel de poliacrilamida con un tampón con un pH más ácido que el normalmente utilizado según Laemli. Asimismo, para conseguir una mayor separación entre ambas subunidades se incubó el extracto citoesquelético con iodoacetamida, un agente alquilante que reacciona con los residuos laterales de la proteína. Este análisis reveló una α tubulina con una movilidad electroforética mayor que la de la β . Al utilizar el anticuerpo GT335 en geles SDS en estas condiciones particulares, reconoció la α tubulina de *E. focardii*, pero no la β tubulina. Posteriormente, estos mismos autores describieron una distribución de la poliglutamilación limitada a una sola fracción de la α tubulina

(constituida por dos de las siete isoformas encontradas) (Pucciarelli *et al.*, 1997).

El anticuerpo GT335 también ha sido utilizado con éxito en un estudio que tenía por objeto localizar, mediante inmunofluorescencia, los microtúbulos que contienen tubulina poliglutamilada en ciliados (Bre *et al.*, 1994). Por ello, empleamos este anticuerpo para analizar si la poliglutamilación está distribuida uniformemente o, por el contrario, es característica de alguno de los numerosos sistemas microtubulares presentes en este microorganismo.

Como puede comprobarse, nuestra propuesta de distribución celular de los microtúbulos poliglutamilados en *E. focardii* difiere de la formulada en el trabajo de Pucciarelli *et al.* (1997), en particular por lo que respecta a la observación de la red microtubular superficial omitida por los mencionados autores. Con todo, esta diferencia parece tener su origen principalmente en las distintas condiciones de fijación y permeabilización en las que se elaboraron las preparaciones. En función de dichas condiciones, pueden verse alterados los puntos de unión de los anticuerpos, la accesibilidad de los mismos o incluso las propias estructuras celulares. Cualquiera de estas anomalías podría explicar la falta de reactividad, consignada por dichos autores, de la red microtubular superficial de este ciliado. Por lo demás, esta estructura ha sido observada tanto en esta especie (Arregui *et al.*, 1994) como en otras especies del mismo género (Fleury, 1991) con idénticos anticuerpos anti α y β tubulina a los utilizados por dichos autores.

Nuestros resultados no sólo confirman la presencia abundante de microtúbulos poliglutamilados en esta red, sino que además ponen de manifiesto su estabilidad durante todo el ciclo celular de *E. focardii*. Este hecho ha sido también observado en otro hipotrico estudiado con GT335, *Paraurostyla weissei*, en el cual la glutamilación de estos microtúbulos ha sido interpretada como un "marcaje bioquímico asociado a los mecanismos de transmisión de estructuras" (Bre *et al.*, 1994).

Se ha probado, asimismo, que la red de microtúbulos citoplasmáticos de *E.*

focardii no resulta teñida con el anticuerpo GT335, al contrario de lo que ocurre en el caso del ciliado *Paramecium* (Bre *et al.*, 1994). Así pues, podemos considerar, en definitiva, que es poco probable que la poliglutamilación juegue papel alguno en la adaptación al frío de los microtúbulos, ya que en ese caso tal propiedad debería estar presente en todas las poblaciones microtubulares de esta especie antártica. De hecho, recientemente se ha sugerido que esta modificación postraducciona puede jugar un papel importante, semejante al de la poliglicilación, en la movilidad de los flagelos, favoreciendo la interacción de la región carboxi terminal de la α tubulina y las MAPs (Gagnon *et al.*, 1996).

2.4.2. Acetilación

Como la α tubulina de *E. focardii* presentaba una estructura primaria muy conservada respecto de otras especies del mismo género no adaptadas al frío, consideramos que sería interesante analizar otras modificaciones postraduccionales (acetilación y tirosilación) descritas en esta subunidad, que podría intervenir en la constitución de los microtúbulos estables al frío gracias, precisamente, a la presencia de dichas variaciones postraduccionales.

Efectivamente, la acetilación es una modificación postraducciona presente en la tubulina de *E. focardii*; es más, muchos de los microtúbulos que en *E. focardii* están glutamilados aparecen también acetilados, como sucede con los microtúbulos axonemales, los microtúbulos originados a partir de los cuerpos basales o los asociados con el sistema de la vacuola contráctil.

No obstante, en *E. focardii* existen estructuras microtubulares que están exclusivamente acetiladas: en particular, las pertenecientes a la red superficial transversal y una población de microtúbulos localizados bajo las membranelas orales de este ciliado.

Esta modificación postraducciona se ha relacionado frecuentemente con las poblaciones de microtúbulos consideradas estables, con un "turn over" bajo y con

microtúbulos estables al frío (véase la revisión de Wallin y Stromberg, 1995). Sin embargo, la evidencia experimental indica que esta modificación no puede ser la causa de la estabilidad, pues es posterior a la estabilización (Bulinski y Gundersen, 1991). Experimentos de polimerización *in vitro* de la tubulina de peces adaptados al frío han mostrado que los microtúbulos de estos organismos mantienen la capacidad de polimerización a 4°C independientemente de la cantidad de tubulina acetilada que contengan (Wallin y Stromberg, 1995). En el caso de otro ciliado, *Tetrahymena*, se ha demostrado recientemente que, en ausencia de acetilación, todas las poblaciones de microtúbulos, incluso aquellas estables al frío, permanecen inalteradas (Gaertig *et al.*, 1995).

En cuanto a la morfogénesis, nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros protistas como *Paramecium* (Bré *et al.*, 1994) y *Trichomonas* (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 1996), de acuerdo con los cuales la acetilación y la glutamilación se producen poco después del ensamblaje de los microtúbulos.

2.4.3. Tirosilación

La ausencia de reacción de los extractos citoesqueléticos de *E. focardii* cuando se usaron los anticuerpos específicos indica que la α tubulina de *E. focardii* no está tirosilada.

La presencia de tubulina tirosilada parece servir de indicador de los microtúbulos de reciente ensamblaje (Sherwin *et al.*, 1987). Sin embargo, tampoco hemos podido detectar ninguna reacción cuando usamos los anticuerpos durante el proceso de división de este ciliado, lo que sugiere que todos los microtúbulos de *E. focardii* están constituidos por α tubulina detirosilada.

La secuencia completa de la α tubulina de este ciliado antártico ha sido obtenida muy recientemente (Miceli, comunicación personal), habiéndose confirmado la ausencia de tirosina carboxi terminal. Lo cierto es que la detirosilación de la α tubulina parece ser un fenómeno general en ciliados, si bien con algunas excepciones, como por

ejemplo en *Tetrahymena*. Sin embargo, aunque este aminoácido está presente en este último género los estudios bioquímicos no han revelado ninguna actividad de la tirosina ligasa (Preston *et al.*, 1979; Raybin y Flavin, 1977). La tirosilación de la α tubulina se ha descrito también, mediante experimentos de inmunofluorescencia, en una especie de *Euplotes* (Olins *et al.*, 1989), *Euplotes eurystomas*. Por el contrario, estudios de secuenciación en otras especies del género (*Euplotes octocarinatus*, Liang *et al.*, 1994) han demostrado que carecen de este aminoácido terminal.

Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo vienen a sustentar las conclusiones ya alcanzadas por Dupuis y Williams (1996) como un hecho general para los ciliados: el ciclo Tyr/Gly no tiene un significado fisiológico universal para las propiedades dinámicas de los microtúbulos (incluidos aquellos estables al frío), o al menos no participa en la morfogénesis de las estructuras microtubulares altamente elaboradas que caracterizan a los ciliados**.

2.4.4. Existencia de modificaciones postraduccionales en una especie temperada de *Euplotes* (*E. vannus*)

Los resultados obtenidos de la comparación de las variaciones postraduccionales presentes en la α tubulina de *E. focardii* con las de la especie temperada *E. vannus*, igualmente analizadas mediante experimentos de inmunofluorescencia, indican la presencia de acetilación y poliglutamilación con una distribución similar de las poblaciones microtubulares modificadas, así como la ausencia de tubulina tirosilada en ambas especies.

Estos datos parecen indicar que la acetilación y la poliglutamilación no están relacionadas con mecanismos de adaptación al frío de los microtúbulos, estando seguramente más bien implicadas en el mantenimiento de la estabilidad de estructuras microtubulares relacionadas en ambas especies (temperada y antártica) con funciones de importancia vital como son la determinación de la forma celular, la alimentación, la locomoción o la regulación osmótica.

Esto nos lleva a concluir que el citoesqueleto microtubular de *E. focardii* se ha adaptado a las condiciones ambientales extremas en las que debe de sobrevivir a través de otros mecanismos: una vez excluidas las diferencias estructurales en la cadena β (véase el apartado 2.1 de esta Sección), dos posibles alternativas son la presencia de otras modificaciones postraduccionales inusuales y/o desconocidas, o la presencia de MAPS que aún no han sido estudiadas en esta especie.

2.4.5. Fosforilación

Recientemente se ha descrito (Pucciarelli *et al.*, 1997) una modificación postraducciona l inusual en la subunidad β de *E. focardii*: la fosforilación. Para demostrar su existencia, estos autores ensayaron anticuerpos antifosfo serina y antifosfotreonina sobre extractos celulares completos de *E. focardii*, evidenciando mediante western blot la banda que anteriormente había sido reconocida por un anticuerpo anti β tubulina.

La fosforilación es una modificación postraducciona l que ya ha sido descrita en otros casos en determinadas células: en particular, es típica de pequeñas poblaciones de microtúbulos estables al frío del cerebro de vertebrados (Diaz-Nido *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1991) y de la banda marginal del eritrocito de pollo (Rudiger y Weber, 1991). Además, se ha sugerido la posibilidad de fosforilación en la β tubulina del pez *Notothenia cooriceps neglecta*, único organismo antártico, además del *E. focardii*, del que se conoce la secuencia de la β tubulina.

Todas estas consideraciones, así como el hecho de que la fosforilación esté ampliamente distribuida en la β tubulina de *E. focardii*, sugirieron a Pucciarelli *et al.* (1997) que esta modificación postraducciona l podía tener un cierto papel en la adaptación al frío de los microtúbulos.

Estos autores avanzaron la hipótesis de que las isoformas de β tubulina que reconocían los anticuerpos antifosfo serina y antifosfotreonina fueran producto de los genes $\beta t3$ y $\beta t4$, ya que en ambos casos existían posiciones potenciales de fosforilación

en la secuencia primaria de la región carboxi terminal. Sin embargo, tampoco pudieron excluir la posibilidad de que los productos de los genes $\beta t1$ y $\beta t2$ estuviesen fosforilados en una posición no localizada en la región carboxi terminal, como sucede por ejemplo en una pequeña fracción de la tubulina de los cilios de *Tetrahymena* (Hirano-Ohinishi y Watanabe, 1989), en la cual la β tubulina de este organismo no presenta ninguna posición particular de fosforilación en la región carboxi terminal (Gaertig *et al.*, 1993).

Nuestros resultados nos permiten plantear la posibilidad de dos subpoblaciones de la tubulina producto del gen $\beta t4$:

- Una población de microtúbulos axonemales, no fosforilados, como lo demuestra la fuerte reacción de los anticuerpos específicos de secuencia obtenidos por nosotros con la fracción axo en western blot y de cirros y membranelas en experimentos de inmunofluorescencia. En esta subpoblación la polimerización tiene lugar tanto a 20°C como a 5°C.

- Una población de microtúbulos citoplasmáticos constituida por microtúbulos fosforilados estables al frío, lo que explicaría la ausencia de la banda correspondiente a la fracción citoplasmática a 5°C utilizando nuestros anticuerpos antisequencia y su detección empleando anticuerpos antifosfotreonina. A 20°C estos microtúbulos sí serían detectados por el mismo anticuerpo pues a dicha temperatura puede tener lugar la acción de las fosfatasas.

La fosforilación podría determinar un cambio conformacional en la región carboxi terminal de la β tubulina que contribuiría a la estabilidad al frío ya que esta región es esencial para la regulación de la dinámica de la polimerización (Mandelkow y Mandelkow, 1994).

CONCLUSIONES

1. Los sistemas citoesqueléticos microtubulares del ciliado antártico *E. focardii* presentan una organización semejante a la de especies mesófilas, si bien existe una mayor complejidad estructural, especialmente en el área oral.
2. Los epítomos de α y β tubulina de importancia funcional para la formación de los microtúbulos, así como para la interacción con otras proteínas se conservan en especies adaptadas al frío.
3. La secuencia primaria de la β tubulina de *E. focardii* es muy divergente con respecto a otros organismos del mismo género no adaptados al frío. Las sustituciones específicas de la β tubulina de *E. focardii* se localizan en la región amino terminal de la proteína entre las posiciones 52 y 63 de la secuencia y en el dominio carboxi terminal.
4. *E. focardii* constituye una excepción a la tendencia general en ciliados de uniformización del pool de la tubulina ya que presenta cuatro isotipos diferentes de β tubulina.
5. Los cuatro isotipos de la β tubulina de *E. focardii* se expresan y forman parte de los sistemas microtubulares de este organismo. Los microtúbulos de este organismo están formados principalmente por los isotipos $\beta t1-2$ y $\beta t4$.
6. El isotipo $\beta t3$ parece tener una localización y una función específicas, relacionada con los centros organizadores de microtúbulos, y probablemente con la gamma tubulina.
7. La α tubulina de este ciliado es heterogénea debido a la presencia de diferentes modificaciones postraduccionales: acetilación, detirosilación y poliglutamilación.

8. La β tubulina de *E. focardii* presenta una modificación postraduccionaI inusual en esta subunidad: la fosforilación. Esta modificación está presente en el isotipo β t4 aunque no podemos excluir la posibilidad de que los otros isotipos estén fosforilados.

9. *E. focardii* se ha mostrado como un modelo biológico eficaz en la comprensión de los mecanismos de adaptación al frío de los sistemas microtubulares.

- Adoutte, A., Claisse, M., Maunoury, R., Beisson, J. (1985): Tubulin evolution: ciliate-specific epitopes are conserved in the ciliary tubulin of metazoa. *J. Mol. Evol.* 22: 220-229.
- Adoutte, A., Delgado, P., Fleury, A., Levilliers, N., Lainé, M.C., Marty, M.C., Boisvieux-Ulrich, E. y Sandoz, E. (1991): Microtubule diversity in ciliated cells: evidence for its generation by post-translational modification in the axonemes of *Paramecium* and quail oviduct cells. *Biol. Cell* 71: 227-245.
- Alexander, J.E., Hunt, D.F., Lee, M.K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S.C., Macdonald, T.L., Sundberg, R.J., Rebhun, L.J. y Frankfurter, A. (1991): Characterization of posttranslational modifications in neurospecific class III B-tubulin by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88: 4685-4689.
- Amos, L.A., y Amos, W.B. (1991): "Molecules of the Cytoskeleton." Macmillan Education Ltd. London.
- Andreu, D., de la Viña, S. y Andreu, J.M. (1988): Chemical synthesis of five tubulin antigenic sequences. *Int. J. Peptide Protein Res.* 31: 555-566.
- Andreu, J.M. y Timasheff, S.N. (1982): Interaction of tubulin with single sing analogues of colchicine. *Biochemistry* 21: 534-543.
- Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., Lee, J.C. y Timasheff, S.N. (1984): Interaction of tubulin with colchicine analogues: an equilibrium study. *Biochemistry* 23: 1742-1752.
- Andreu, J.M. y de Pereda, J.M. (1993): Site-directed antibodies to tubulin. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 26: 1-6.
- Arevalo, M. A., Nieto, J. M., Andreu, D. y Andreu, J.M. (1990): Tubulin assembly probed with antibodies to synthetic peptides. *J. Mol. Biol.* 214:105-120.
- Arregui, L., Serrano, S. y Guinea, A. (1994): Microtubular elements of the marine antarctic ciliate *Euplotes focardii* (Ciliophora, hypotrichia). *Arch. Protistenkd.* 144: 357-364.
- Barahona, I., Soares, H., Cyrne, L., Penque, D., Denoulet, P. y Rodrigues-Pousada, C. (1988): Sequence of one α - and two β -tubulin genes of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Mol. Biol.* 202: 365-382.
- Banerjee, A., Roach, M.C., Trcka, P. y Ludueña, R.F. (1992): Preparation of a monoclonal antibody specific for the class IV isotype of β -tubulin. *J. Biol. Chem.* 267: 5625-5630.
- Blackburn, E.H. y Szostak, J.W. (1984): The molecular structure of centromeres and

- telomeres. Annu. Rev. Biochem. 53: 163-194.
- Blackburn, E.H. (1991): Structure and function of telomeres. Nature 350: 569-573.
- Bray, D. (1992). "Cell Movements." Garland, New York and London.
- Bershadsky, A.D., y Vasiliev, J.M. (1988): "Cytoskeleton." Plenum, New York.
- Billger, M., Stromberg, E. y Wallin, M. (1991): Microtubule-associated protein-dependent colchicine stability of acetylated cold-labile brain microtubules from the Atlantic cod, *Gadus morhua*. J. Cell Biol. 113: 331-338.
- Blose, S.H., Meltzer, D.I. y Feramisco, J.R. (1984): 10-nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal and polyclonal antibodies against tubulin. J. Cell Biol. 98: 847-858.
- Bré, M.H., de Néchaud, B., Wolff, A. y Fleury, A. (1994): Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. Cell Motil. Cytoskeleton 27: 337-349.
- Breitling, F. y Little, M (1986): Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL 1/34, DM1A and DM1B. J. Mol. Biol. 189: 367-370.
- Brinkley, B.R. y Cartwright, J., Jr.. (1975): Cold-labile and cold-stable microtubules in the mitotic spindle of mammalian cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 253: 428-439.
- Brown, A., Li, Y., Slaughter, T. y Black, M.M. (1993): Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. J. Cell Sci. 104: 339-352.
- Bughio, N.I., Faubert, G.M. y Prichard, R. (1993): Characterization and biological activities of anti-*Brugia pahangi* tubulin monoclonal antibodies. Int. J. Parasitol. 23: 913-924.
- Bulinsky, J., C. y Gundersen, G. G. (1991): Stabilization and posttranslational modifications of microtubules during cellular morphogenesis. Bioassays 13: 285-293.
- Burns, R.G. (1991): α , β y γ tubulins: sequence comparisons and structural constraints. Cell Motil. Cytoskel. 20: 181-189.
- Caron, F, and Meyer, E. (1985): Does *Paramecium primaurelia* use different genetic code in its macromolecules?. Nature 314: 185-188.
- Cassimeris, L. (1993): Regulation of microtubule dynamic instability. Cell Motil.

- Cytoskeleton 26: 275-281.
- Cech, T.R. (1986): The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* 44: 207-210.
- Chene, P., Mazarguil, H. y Wright, M. (1992): Microtubule assembly protects the region 28-38 of the β -tubulin subunit. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 22: 25-37.
- Cleveland, D.W. y Sullivan, K.F. (1985): Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 331-365.
- Cleveland, D.W. (1987): The multitubulin hypothesis revisited: What have we learned?. *J. Cell Biol.* 104: 381-384.
- Cohen, J., Adoutte, A., Grandchamp, S., Houdebine, L.M., y Beisson, J. (1982): Immunocytochemical study of microtubular structures throughout the cell cycle of *Paramecium*. *Biol. Cell* 44: 35-44.
- Cohen, J. y Beisson, J. (1988): The cytoskeleton. En Gortz, H.D. (ed.): "*Paramecium*". Heidelberg: Springer Verlag, pp. 363-392.
- Correia, J.J. y Williams, R.C., Jr. (1983): Mechanisms of assembly and disassembly of microtubules. *Ann. Rev. Biophys. Bioengng.* 12: 211-235.
- Cowan, N.J. y Dudley, L. (1983). Tubulin isotypes and the multigene tubulin families. *Int. Rev. Cytol.* 85: 147-173.
- Cross, D., Farias, G., Dominguez, J., Avila, J. y Maccioni, R.B. (1994): Carboxyl terminal sequences of β -tubulin involved in the interaction of HMW-MAPs. Studies using site-specific antibodies. *Mol. Cell. Biochem.* 132: 81-90.
- 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. *Biochemistry* 27: 5352-5356.
- Delgado, P., Calvo, P. y Torres, A. (1988): Euploetes cytoskeleton: tubulin and microtubular systems in interphase. *J. Protozool.* 35: 393-399.
- Delgado P. y Fleury, A. (1993): Comparison of the electrophoretic behavior of tubulin from distantly related ciliates. *Europ. J. Protistol.* 29: 176-181.
- Delgado-Viscogliosi, P., Brugerolle, G. y Viscogliosi, E. (1996): Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 33: 288-297.
- Detrich, H.W., III y Overton, S.A. (1986): Heterogeneity and structure of brain tubulins

- from cold-adapted Antarctic fishes: Comparison to brain tubulins from a temperate fish and mammal. *J. Biol. Chem.* 262: 10922-10930.
- Detrich, H.W., III y Parker, S.K. (1987): Cold stable microtubules from Antarctic fishes contain unique α tubulins. *J. Biol. Chem.* 262: 8360-8366.
- Detrich, H.W., III y Overton, S.A. (1988): Antarctic fish tubulins: Heterogeneity, structure, aminoacid compositions and charge. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 593-600.
- Detrich, H.W., III, Johnson, K.A. y Marchese-Ragona, S.P. (1989): Polymerization of Antarctic fish tubulins at low temperatures: energetic aspects. *Biochemistry* 28: 10085-10093.
- Detrich, H.W., III, Fitzgerald, T.J. Dinsmore, J.H. y Marchese-Ragona, S.P. (1992): Brain and egg tubulins from Antarctic fishes are functionally and structurally distinct. *J. Biol. Chem.* 267: 18766-18775.
- Detrich, H.W. y Parker, S. (1993): Divergent neural β -tubulin from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps neglecta*: Potential sequence contributions to cold adaptation of microtubule assembly. *Cell. Motil. Cytoskel.* 24: 156-166.
- Diaz-Nido, J., Serrano, L., Lopez-Otin, C., Vandekerckhove, J. y Avila, J. (1990): Phosphorylation of a neuronal specific B-tubulin isotype. *J. Biol. Chem.* 265: 13949-13954.
- Dráber, P. y Dráberová, E. (1986): Heterogeneity of microtubules recognized by monoclonal antibodies to α -tubulin. *European J. Cell Biol.* 41: 82-88.
- Dráber, P., Lagunowich, L.A., Dráberová, E., Viklicky, V. y Damjanov, I. (1988): Heterogeneity of tubulin epitopes in mouse fetas tissues. *Histochem.* 89: 485-492.
- Dupuis, P. (1992): The β -tubulin genes of *Paramecium* are interrupted by two 27 bp introns. *EMBO J.* 11: 3713-3719.
- Dupuis-Williams, P., Klotz, C., Mazarguil, H. y Beisson, J. (1996): The tubulin gene family of *Paramecium*: Characterization and expression of the aPT1 and aPT2 genes which code for α -tubulins with unusual C-terminal amino acids, GLY and ALA. *Biol Cell* 87:83-93.
- Dustin, P. (1984): "Microtubules". Springer-Verlag, Berlín y New York.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F. y Denoulet, P. (1990): Posttranslational glutamylation of α -tubulin. *Science* 247: 83-85.

- Erickson, H.P. y Stoffler, D. (1996): 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.
- Fernández-Galiano, D. (1966): Algunas modificaciones y nuevas precisiones sobre el método de impregnación en masa de los ciliados por el carbonato de plata. *Bol. R. Soc. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)* 64: 95-98.
- Fernández-Galiano, D. (1976): Silver impregnation of ciliated protozoa; procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 95: 375-378.
- Fernández-Galiano, D. (1994): The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa from sewage (and other) waters. *Wat. Res.* 28: 495-496.
- Fleury, A. (1991a): Dynamics of the cytoskeleton during morphogenesis in the ciliate *Euplotes*. I. Basal bodies related microtubular system. *Europ. J. Protistol.* 27: 99-114.
- Fleury, A. (1991b): Dynamics of the cytoskeleton during morphogenesis in the ciliate *Euplotes*. II. Cortex and continuous microtubular systems. *Europ. J. Protis.* 27: 220-237.
- Fulton, C., Kane, R.E. y Stephens, R.E. (1971): Serological similarity of flagellar and mitotic microtubules. *J. Cell. Biol.* 50: 762-773.
- Fulton, C. y Simpson, P.A. (1976): Selective synthesis and utilization of tubulin. The multitubulin hypothesis. *Cell Motility*. New York: Cold Spring Harbor.
- Gaertig, J., Thatcher, T.H., McGrath, K.E., Callahan, R.C. y Gorowsky, M.A. (1993): Perspectives on tubulin isotype function and evolution based on the observation that *Tetrahymena thermophila* microtubules contain a single alpha- and beta-tubulin. *Cell Motil. Cytoskel.* 25: 243-253.
- Gaertig, J., Cruz, M.A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D.G. y Gorowsky, M.A. (1995): Acetylation of Lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* 129: 1301-1310.
- Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Eddé, B., Desbruyères, E., Paturle-Lafanechère, L., Multigner, L., Job, D. y Cibert, C. (1996): The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J. Cell Sci.* 109: 1545-1553.
- Gozes, I. y Barnstable, C.J. (1982). Monoclonal antibodies that recognize discrete forms of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2579-2583.

- Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. y Lerner, R. (1982): Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* 28: 477-487.
- Grim, J.N. (1967): Ultrastructure of pellicular and ciliary structures of *Euplotes eurystomus*. *J. Protozool.* 14: 625-634.
- Grim, J.N. (1982): Subpellicular microtubules of *Euplotes eurystomus*: their geometry relative to cell form, surface contours and ciliary organelles. *J. Cell Sci.* 56: 471-484.
- Gundersen, G.G., Kalnoski, M.H. y Bulinski, J.C. (1984): Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated α tubulin are distributed differently *in vivo*. *Cell* 38: 779-789.
- Harper, D.S. y Jahn, C.L. (1989): Inconstancy of the genetic code among ciliated protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3052-3056.
- Hastie, S.B. (1991): Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol. Ther.* 512: 377-401.
- Helftenbein, E. (1985): Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for α -tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a termination codon. *Nucleic Acids Res.* 13: 415-432.
- Herzog, W. y Weber, K. (1977): *In vitro* assembly of pure tubulin into microtubules in the absence of microtubule-associated proteins and glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 1860-1864.
- Hesse, J., Maruta, H. y Isenberg, G. (1985): Monoclonal antibodies localize the exchangeable GTP-binding site in β - and not α -tubulins. *FEBS Lett.* 179: 91-95.
- Hesse, J., Thierauf, M. y Ponstingl, H. (1987): Tubulin sequence region β :155-174 is involved in binding exchangeable guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 262: 15472-15475.
- Himes, R.H. y Detrich, H.W., III (1989): Dynamics of antarctic fish microtubules at low temperatures. *Biochemistry* 28: 5089-5095.
- Hirano-Ohinishi, J. y Watanabe Y. (1989): Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of ciliary B-tubulin in *Tetrahymena*. *J. Biochem.* 105: 858-860.
- Horowitz, S. y Gorovsky, M.A. (1985): An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2452-2455.
- Horwitz, S.B. (1992): Mechanism of action of taxol. *Trends. Pharm. Sci.* 13: 134-136.

- Idriss, H., Stammers, D.K., Ross, C.K. y Burns, R.G. (1991): The dynamic instability of microtubules is not modulated by α -tubulin tyrosinylation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 20: 30-37.
- Jerka-Dziadosz, M (1987): Signal-induced reorganization of the microtubular cytoskeleton in the ciliated protozoan *Euplotes octocarinatus*. *J. Cell Sci.* 87: 555-564.
- Job, D., Fischer, E.H. y Margolis, R.L. (1981): Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4679-4682.
- Job, D. y Margolis, R.L. (1982): Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21: 509-515.
- Jones, D.H., Grey, E. y Barron, J. (1980): Cold-stable microtubules in brain studied in fractions and slices. *J. Neurocytol.* 9: 493-504.
- Joshi, H.C. y Cleveland, D.W. (1990): Diversity among tubulin subunits: Toward what functional end?. *Cell Motil. Cytoskel.* 16: 159-163.
- Joshi, H.C. (1994). Microtubule organizing centers and δ -tubulin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 55-62.
- Kagan, A., y Glick, S.N. (1979). En *Methods of Hormone Radioimmunoassay* (pp. 327-339). New York: Academic Press.
- Kenelly, P.J. y Krebs, E.G. (1991): Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266: 15555-15558.
- Kingston, D.G. (1994): Taxol: The chemistry and structure-activity relationships of a novel anticancer agent. *Trends Biotech.* 12: 117-125.
- Kirschner, M. y Mitchinson, T. (1986): Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell (Cambridge, Mass.)* 45: 329-342.
- Kowalski, R.J. y Williams, R. C., Jr. (1993): Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J. Biol. Chem.* 268: 9847-9855.
- Krauh, E., Little, M, Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W. y Ponstingl, H. (1981): Complete amino acid sequence of β -tubulin from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (7): 4156-4160.

- Kreis, T.E. (1987): Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J.* 6: 2697-2606.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680-685.
- Lai, E.Y., Remillard, S.P., Fulton, C. (1988): The α -tubulin gene family expressed during cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *J. Cell Biol.* 106: 2035-2046.
- Lai, E.Y., Remillard, S.P., Fulton, C. (1994): A β -tubulin gene of *Naegleria* encodes a carboxy-terminal tyrosine. *J. Mol. Biol.* 235: 377-388.
- Lajoie-Mazenc, I., Tollon, Y., Detraves, C., Julian, M., Moisand, A., Gueth-Hallonet, C., Debec, A., Salles-Passador, I., Puget, A., Mazarguil, H., Raynaud-Messina, B. y Wright, M. (1994): Recruitment of antigenic gamma-tubulin during mitosis in animal cells: presence of gamma-tubulin in the mitotic spindle. *J. Cell. Sci.* 107: 2825-2837.
- Lee, J.C., Frigon, R.P. y Timasheff, S.N. (1973): The chemical characterization of calf brain microtubule protein subunits. *J. Biol. Chem.* 248: 7253-7262.
- Lee, J.C. y Timasheff, S.N. (1975): The reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin. *Biochemistry.* 14: 5183-5187.
- LeDizet, M. y Piperno, G. (1987): Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* α -tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5720-5724.
- Lewis, S.A., Gu, W. y Cowan, N.J. (1987): Free intermingling of mammalian β -tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell.* 49: 539-548.
- Liang, A., Schmidt, H.J. y Heckmann, K. (1994): The α - and β -tubulin genes of *Euplotes octocarinatus*. *J. Euk. Microbiol.* 41(2): 163-169.
- Little, M. (1985): An evaluation of tubulin as a molecular clock. *Biosystems* 18: 241-247.
- Little, M. y Sheehaus, T. (1988): Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 90B, 655-670.
- Liu, F.T., Zinnecker, M., Hamaoka, T. y Katz, D.H. (1979): New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates. *Biochemistry*, 18(4): 690-697.
- Liu, B., Joshi, H.C., Wilson, T.J., Silflow, C.D., Palevitz, B.A. y Snustad, D.P. (1994). Gamma-tubulin in *Arabidopsis*: gene sequence, immunoblot and

- immunofluorescence studies. *Plant Cell*. 6: 303-314.
- Lopata, M.A. y Cleveland, D.W. (1987). *In vivo* microtubules are copolymers of available β -tubulin isotypes: localization of each six vertebrate β -tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigens. *J. Cell. Biol.* 105: 1707-1720.
- Ludueña, R.F. (1993): Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol. Biol. Cell* 4: 445-457.
- Ludueña, R.F. (1998): Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* 178: 207-275.
- Mandelkow, E. M., Herrmann, M. y Ruhl, U. (1985): Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies. *J. Mol. Biol.* 185: 311-327.
- Mandelkow, E.M. y Mandelkow, E. (1992): Microtubule oscillations. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 22: 235-244.
- Mandelkow, E. y Mandelkow, E.M. (1994): Microtubule structure. *Curr. Opin. Struct Biol.* 4: 171-179.
- Margolis, R.L. y Rauch, C.T. (1981): Characterization of rat brain crude extract microtubule assembly: correlation of cold stability with the phosphorylation state of microtubule associated 64 K protein. *Biochemistry* 20: 4451-4458.
- Merrifield, R.B. (1963): Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156.
- Miceli, C., Ballarini, P., Di Giuseppe, G, Valbonesi, A. y Luporini, P. (1994): Identification of the tubulin gene family and sequence determination of one β -tubulin gene in a cold-poikilotherm protozoan, the antarctic ciliate *Euplotes focardii* : *J. Euk. Microbiol.* 41 (4): 420-427.
- Mitchison, T., y Kirschner, M. W. (1984): Dynamic instability of microtubule growth. *Nature (London)* 312: 237-242.
- Modig, C., Stromberg, E. y Wallin, M. (1994): Different stability of posttranslationally modified brain microtubules isolated from cold-temperate fish. *Mol. Cell. Biochem.* 130: 137-147.
- Morgan, J.L. y Spooner, B.S. (1983): Immunological detection of microtubule poison-induced conformational changes in tubulin. *J. Biol. Chem.* 258: 13127-13133.
- Morgan, J.L., Holladay, C.R. y Spooner, B.S. (1987): Species-dependent immunological differences between vertebrate brain tubulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:

1414-1417.

- Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K.H. (1998): Structure of the α - β tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203.
- Oakley, B.R. (1992): δ -tubulin: the microtubule organizer?. *Trends Cell Biol.* 2: 1-5.
- Olins, D.E., Olins, A.L., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M., Wheland, J. y Weber, K. (1989): Differential distribution of α -tubulin isotypes in *Euplotes eurystomus* determined by confocal immunofluorescence microscopy.
- Oka, M.T., Arai, T. y Hamaguchi, Y. (1990): Heterogeneity of microtubules in dividing sea urchin eggs revealed by immunofluorescence microscopy: spindle microtubules are composed of tubulin isotypes different from those of astral microtubules. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 16: 239-250.
- Oka, M.T., Arai, T. y Hamaguchi, Y. (1994): Different reactivity with the monoclonal antitubulin antibodies between native and fixed mitotic microtubules in sea urchin eggs. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 29: 241-249.
- Orias, E. (1981): Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in *Tetrahymena thermophila*: a review and a model. *Dev. Genet.* 2: 185-202.
- Piperno, G. y Fuller, M.T. (1985): Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of α -tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J. Cell Biol.* 101: 2085-2094.
- Pirollet, F., Job, D., Fisher, E.H. y Margolis, R.L. (1983): Purification and characterization of sheep brain cold-stable microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1560-1564.
- Poddar, R. y Sarkar, P.K. (1993): Delayed detyrosination of α -tubulin form parallel fibre axons and its correlation with impaired synaptogenesis in hypothyroid rat cerebellum. *Brain. Res.* 614: 223-240.
- Preer, J.R., Preer, L.B., Rudman, B.M. y Burnett, A.J. (1985): A deviation from the universal code: the gene for surface protein 51A in *Paramecium*. *Nature* 314: 188-190.
- Preer J.R. (1986): Surface antigens of *Paramecium*. In "The molecular biology of ciliated protozoa" (J.G. Gall, ed.), pp. 301-336. Academic Press, Inc., Orlando Fla.
- Preston, S.F., Deanin, G.G., Hanson, R.K. y Gordon, M.W. (1979): The phylogenetic distribution of tubulin: tyrosine ligase. *J. Mol. Evol.* 13: 233-244.

- Pucciarelli, S., Ballarini, P. y Miceli, C. (1997): Cold adapted microtubules: Characterization of tubulin posttranslational modifications in the antarctic ciliate *Euplotes focardii*. *Cell Motil. Cytoskel.* 38: 329-340.
- Raff, E.C. (1994): The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function. En "Microtubules" (J.S. Hyams and C.W. Lloyd, eds.), pp. 85-109. Wiley-Liss, New York.
- Raybin, D. y Flavin, M. (1977): Enzyme which specifically adds tyrosine to the α chain of tubulin. *Biochemistry* 16: 2189-2194.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A. y Bré, M.H. (1994): Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 266: 1688-1690.
- Renthal, R., Schneider, B.G., Miller, M.M. y Ludueña, R.F. (1993): β IV is the major β -tubulin isotype in bovine cilia. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 25: 19-29.
- Rost, B. y Sander, C. (1993): Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232: 584-599.
- Rost, B., y Sander, C. (1994a): Combining evolutionary information and neuronal networks to predict protein secondary structure. *Proteins* 19(1): 55-72.
- Rost, B., y Sander, C. (1994b): Conservation and prediction of solvent accessibility in protein families. *Proteins. Struc. Func. Gen.* 20: 216-226.
- Rowinsky, E.K. y Donehower (1991): The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmacol. Ther.* 52: 35-84.
- Roychowdhury, S., Wang, N. y Rasenick, M.M. (1993): G protein binding and G protein activation by nucleotide transfer involve distinct domains on tubulin: regulation of signal transduction by cytoskeletal elements. *Biochemistry* 32: 4955-4961.
- Ruffolo, J.J., Jr. (1976a). Fine structure of the dorsal bristle complex and pellicle of *Euplotes*. *J. Morphol.* 148: 469-488.
- Ruffolo, J.J., Jr. (1976b): Cortical morphogenesis during the cell division cycle in *Euplotes*: an integrated study using light optical, scanning electron and transmission electron microscopy. *J. Morphol.* 148: 489-528.
- Rudiger, M. y Weber, K. (1993): Characterization of the posttranslational modifications in tubulin from the marginal band of avian erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 218: 107-116.

- Rudiger, M., Plessman, U., Rudiger, A.H. y Weber, K. (1992): Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. *FEBS Lett.* 308: 101-105.
- Salmon, E.D. y Begg, D.A. (1980): Functional implication of cold stable microtubules in kinetochore fibers of insect spermatocytes during anaphase. *J. Cell Biol.* 85: 853-865.
- Sander, C. y Schneider, R. (1991): Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* 9: 56-68.
- Sasse, R. y Gull, K. (1988): Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 90: 577-589.
- Schliwa, M. y Van Blerkom, J. (1981): Structural interaction of cytoskeletal components. *J. Cell Biol.* 90: 222-235.
- Silflow, C.D. (1991): Why do tubulin genes family lack diversity in flagellate/ciliate protists?. *Protoplasma* 164: 9-11.
- Serrano., L., Wandosell, F. y Avila, J. (1986a). Location of the regions by five commercial antibodies on the tubulin molecule. *Anal. Biochem.* 159: 253-259.
- Serrano, S., Sola, A., Guinea, A., Arregui, L. y Fernández-Galiano, D. (1992): Cytoskeleton of *Euplotes focardii*: Morphology and morphogenesis. *Can. J. Zool.* 70: 2088-2094.
- Stephens, R. (1975): Structural chemistry of the axoneme: Evidence for chemically and functionally unique tubulin dimers in outer fibers. En "Molecules and Cell Movement" (S. Inoué y R.E. Stephens, eds.), pp. 181-206. Raven Press, New York.
- Sullivan, K.F. y Cleveland, D.W. (1986): Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate β -tubulin polypeptide classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4327-4331.
- Sullivan, K.F. (1988): Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 687-716.
- Theodorakis, N.G. y Cleveland, D.W. (1992): Physical evidence for cotranslational regulation of β -tubulin mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 791-799.
- Tilney, L.G., Brian, J., Bush, D.J., Fujiwara, K., Mooseker, M.S., Murphy, D.B., y Snyder, D.H. (1973): Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.*, 59: 267-275.

- Timasheff, S.N. y Grisham, L.M. (1980): *In vitro* assembly of cytoplasmic microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 565-592.
- Toso, R.J., Jordan, M.A., Farrel, K.W., Matsumoto, B. y Wilson, L. (1993): Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability *in vitro* by vinblastine. *Biochemistry* 32: 1285-1293.
- Tuffrau, M., Pyne, C.K. y De Haller, G. (1968): Organization de l'infrciliature chez quelques ciliés hypotriches. *Protistologica* 4: 289-301.
- Valbonesi, A. y Luporini, P. (1990): A new marine species of *Euplotes* (Ciliophora, Hypotrichida) from Antarctica. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.* 56: 57-61.
- Valbonesi, A., Apone, F. y Luporini, P. (1995): Intraclonal polimorphism in the Antarctic ciliate *Euplotes focardii*. *Eur.J.Protistol.* 31: 469A.
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A. y Erickson, H.P. (1988): Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell. Biol.* 107: 1437-1448.
- Wallin, M. y Stromberg, E. (1995): Cold-stable and cold adapted microtubules. En Jeon, K.W., Jarvik, J. (eds.): *International Review of Cytology: A survey in Cell Biology.* Academic Press, vol. 157, pp. 1-31.
- Webb, B.C. y Wilson, L. (1980): Cold-stable microtubules from brain. *Biochemistry* 19: 1993-2001.
- Wehland, J., Willingham, M.C. y Sandoval, I.V. (1983): A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of α -tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization *in vitro*, and microtubule polymerization and organization *in vivo*. *J. Cell Biol.* 97: 1467-1475.
- Wheland, J. y Willingham, M.C. (1983): A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of α -tubulin. II. Effects on cell movement, organization of microtubules, and intermediate filaments, and arrangement of Golgi elements. *J. Cell Biol.* 97: 1476-1490.
- Wheland, J., Shroder, H.C. y Weber, K. (1984): Amino acid sequence requirements in the epitope recognized by the α -tubulin-specific rat monoclonal antibody YL1/2. *EMBO J.* 3: 1295-13000.
- Wheland, J. y Weber, K. (1987): Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of α -tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell Sci.* 88:185-203.

- 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. (1972): Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science*. 177: 1104-1105.
- Wiese, C. y Zheng, Y. (1999): δ -tubulin complexes and their interaction with microtubule-organizing centers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 250-259.
- Williams, R.C., Jr., Correia, J.J. y De Vries, A.L. (1985): Formation of microtubules at low temperatures by tubulin from Antarctic fish. *Biochemistry* 24: 2790-2798.
- Wilson, L. y Jordan, M.A. (1994): Pharmacological probes of microtubule function. En *Microtubules*. Wiley-Liss, Inc. pp. 59-83.
- Witte, H., Kneer, M. y Ammermann, D. (1995): Transcription of the highly amplified tubulin gene family of *Stylonychia lemnae*. *Europ. J. Protistol.* 31: 268-274.
- Wolf, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F. y Denoulet, P. (1992): Distribution of glutamylated α and β tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* 59: 425-432.
- Wolf, A., Houdayer, M., Chillet, D., de Néchaud, B. y Denoulet, P. (1994): Structure of the polyglutamyl chain of tubulin: occurrence of α and gamma linkages between glutamyl units revealed by monoreactive polyclonal antibodies. *Biol. Cell.* 81: 11-16.
- Wolfe, J. (1985): Cytoskeletal reorganization and plasma membrane fusion in conjugating *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.* 73: 69-85.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. y Mitchison, T. (1995): A δ -tubulin ring complex purified from the unfertilized egg of *Xenopus laevis* can nucleate microtubule activity *in vitro*. *Nature* 378: 578-583.