



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

**Estudios de la cooperatividad entre proteínas
motoras y los efectos de estabilizar microtúbulos
con glutaraldehído**

Tesis que presenta
Alma Rosa Oaxaca Camacho

Para obtener el grado de
Maestra en Nanociencias y Materiales

Director de la Tesis:
Dr. Braulio Gutiérrez Medina

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre, 2013.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudios de la cooperatividad entre proteínas motoras y los efectos de estabilizar microtúbulos con glutaraldehído**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Alma Rosa Oaxaca Camacho** y aprobada el **17 de Octubre de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
(Director/Codirectores de la tesis)

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Haret-Codratian Rosu Barbus
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Pinzas ópticas de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 424190 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 005 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de octubre del año 2013, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Haret-Codratan Rosu Barbus	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

sustentó la C.

Alma Rosa Oaxaca Camacho

sobre la Tesis intitulada:

Estudios de la cooperatividad entre proteínas motoras y los efectos de estabilizar microtúbulos con glutaraldehído

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

El Jurado, después de deliberar, determinó

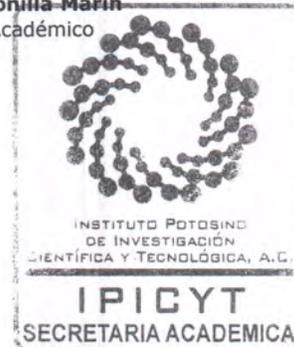
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de octubre de 2013.

Dr. Marcial Bonilla-Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



A mis padres:

Leonardo Oaxaca Bautista y Micaela Camacho Chávez, por su interminable apoyo en todo momento de mi vida, por sus enseñanzas, consejos y por su eterna paciencia y perdón ante mis errores. ¡Los amo mucho!

Y a mi hermano:

Carlos Oaxaca Camacho por soportarme todo este tiempo y a veces darme un incondicional abrazo que me motiva y recuerda que las acciones valen más que mil palabras.

Agradecimientos

Al Dr. Braulio Gutiérrez Medina, por dirigir la elaboración de la presente tesis, por su paciencia y por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de la misma.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello y al Biol. Salvador Ambríz por permitirme trabajar en su laboratorio en Biología Molecular y por todo su apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio Andrés Jiménez, Miguel Guzmán por su ayuda y su amistad brindada.

A mi compañera Noemí Hernández por enseñarme técnicas biológicas y estar conmigo en gran parte de este proyecto.

A mi amiga Nancy Gerling, por su amistad, sabios consejos, por todos los momentos agradables a su lado y por las risas que nunca faltaron.

A mi nuevo amigo Oscar Didier Sánchez quien se sumó a mi vida para hacerme compañía con sus palabras de ánimo y sus consejos.

A mis segundos padres Josefina Camacho y Cosme Chávez, por estar al pendiente de mí, por sus cálidos abrazos que me dan cada que llegó a Zumpango.

A mi amigo Gustavo Modesto por su apoyo, confianza y palabras de ánimo.

A mis familiares Socorro (mi prima), Daniel (mi primo) y Ameyali (mi sobrina), por creer en mí y quererme mucho.

A mis viejos amigas(os) Diana, Carlos, Lili, Carla, Denhy, Irais, Hector, Jorge, Alida y Madai, por escuchar, brindarme palabras de aliento y un te quiero. Aunque estemos lejos la amistad nos une.

A CONACYT por la beca proporcionada.

La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante
Paulo Coelho.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	xi
Resumen	xiv
Abstract	xv
CAPÍTULO I. LOS MICROTUBULOS Y LA PROTEÍNA MOTORA CINESINA	1
I.I. La importancia del citoesqueleto en la célula.....	2
I.II. Los Microtúbulos.....	3
I.II.1. La Tubulina.....	3
I.II.2 Formación de los microtúbulos.....	5
I.II.3 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	6
I.II.4 Los microtúbulos y su función en la célula.....	8
I.III Proteínas motoras.....	8
I.III.1 La Cinesina.....	9
I.III.2 Estructura de la cinesina convencional.....	10
I.III.3 Modelo de procesividad mano sobre mano (hand-over-hand) de la cinesina.....	11
I.III.4 Modelo cinético para la hidrólisis del ATP por la cinesina.....	12
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN CIENTIFICA DE LOS MICROTÚBULOS Y LA CINESINA	14
II.I. Agentes estabilizantes de microtúbulos.....	15
II.I.1. Taxol.....	16

II.I.1.1. Cómo el taxol estabiliza al microtúbulo.....	17
II.I.1.2. Uso del taxol en la investigación.....	19
II.I.2. Estabilidad de los microtúbulos empleando glutaraldehído.....	19
II.I.2.1 El Glutaraldehído.....	19
II.I.2.2. El glutaraldehído forma un cross-linked con los microtúbulos.....	20
II.I.2.3. Uso del glutaraldehído en la investigación.....	21
II.II. Estudios de la cinesina.....	21
II.II.1. Estudios de la cooperatividad de dos o más motores moleculares...	21
II.II.1.1. Varias cinesinas pueden transportar una esfera.....	22
II.II.1.2. Transporte llevado a cabo por dos motores moleculares.....	23
I.III. Objetivos.....	26
I.III.1. Objetivos generales.....	26
I.III.2. Objetivos específicos.....	26
I.IV. Importancia.....	27
CAPÍTULO III. METODLOGÍA EXPERIMENTAL	28
III.I. Expresión de la proteína motora cinesina.....	29
III.I.1. Extracción de la proteína.....	31
III.I.2 Verificación de la presencia de proteínas por electroforesis.....	33
III.I.2.1 Técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida.....	33
III.II. Polimerización de microtúbulos <i>in-vitro</i>	34
III.III. Recubrimiento de las esferas de poliestireno con el anticuerpo penta-histidina.....	35
III.IV. Incubación de esferas recubiertas con anticuerpo con cinesina.....	36
III.V. Ensayos <i>in-vitro</i> empleando pinzas ópticas.....	38
III.V.1. Pinzas ópticas.....	38
III.V.1.1. Ventajas.....	39
III.V.1.2. Elementos básicos que constituyen una pinza óptica.....	40
III.V.2. Calibración de la Pinza óptica.....	41
III.V.3. Preparación de la muestras a analizar para los ensayos <i>in-vitro</i> con la cinesina dimérica y microtúbulos.....	42

III.V.3.1. Modificación de la superficie del cubre objeto.....	42
III.V.3.2. Construcción del canal para poder observar las muestras con el equipo de microscopía óptica-pinzas ópticas.....	43
III.V.3.3. Preparación de la muestra con microtúbulos y cinesinas.....	43
III.V.3.4. Uso de la pinza óptica para realizar el ensayo <i>in-vitro</i>	44
III.V.4. Ensayo <i>in-vitro</i> de la cinesina dimérica.....	44
III.V.3. Ensayo <i>in-vitro</i> con la cinesina dimérica empleando microtúbulos frescos.....	45
III.V.4. Ensayo <i>in-vitro</i> de la cinesina dimérica empleando microtúbulos de varias semanas estabilizados con glutaraldehído.....	46
III.V.5. Observación de la depolimerización de los microtúbulos sobre vidrios recubiertos con poli-L-lisina.....	48
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
IV.I. Verificación de la presencia de la proteína motora cinesina por medio de la técnica de electroforesis.....	50
IV.II. Estabilidad de los microtúbulos.....	52
IV.II.1. Microtúbulos estabilizados con taxol y fijados en vidrios recubiertos con poli –L-lisina.....	52
IV.II.2. Microtúbulos estabilizados con glutaraldehído y fijados sobre una superficie de vidrio recubierta con APTES.....	58
IV.II. Análisis de los datos obtenidos en los ensayos de motilidad: fuerza soportada por la cinesina y tiempo de permanencia sobre el microtúbulo...	64
IV.III. Ensayos <i>in-vitro</i> de motilidad empleando la cinesina.....	67
IV.III.1. Comparación de la fuerza que puede soportar una cinesina vs varias cinesinas al desplazarse sobre microtúbulos frescos estabilizados con glutaraldehído	67
IV.III.2. Comparación del tiempo que permanece una cinesina vs varias cinesinas sobre microtúbulos frescos estabilizados con glutaraldehído.....	76
IV.III.3. Verificación de la funcionalidad de microtúbulos de varias semanas estabilizados con glutaraldehído	80

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	84
V.I. Conclusiones.....	85
V.II. Perspectivas.....	87
REFERENCIAS	88

Lista de figuras

I.1. Imagen de los componentes del citoesqueleto.....	3
I.2. Estructura cristalina de la $\alpha\beta$ tubulina.....	4
I.3. Mecanismo de formación del microtúbulo.....	5
I.4. Nucleación de los microtúbulos sobre la γ -tubulina.....	6
I.5. Esquema del proceso de inestabilidad dinámica.....	7
I.6. Estructura de la cinesina.....	10
I.7. Modelo mano sobre mano.....	12
I.8. Posible ciclo de hidrólisis y cooperatividad de las dos cabezas.....	13
II.1. Estructura química del Taxol.....	16
II.2. Imagen de la estructura cristalina de la α y β tubulina.....	17
II.3. Representación hipotética de como el taxol estabiliza a los microtúbulos.....	18
II.4. Estructura química del glutaraldehído.....	19
II.5. Secuencia de un video del movimiento de la cinesina unida a una esfera sobre un microtúbulo.....	20
II.6. Esquema de dos motores transportando una carga sobre un microtúbulo.....	24
III.1. Sonicador de punta actuando sobre las células.....	32
III.2. Detergente actuando sobre la membrana de las células.....	32
III.3. Esquema del equipo para la técnica de electroforesis de poliacrilamida.....	33
III.4. Bloque de gel de poliacrilamida.....	34
III.5. Esquema que indica el procedimiento de las diluciones seriadas.....	37
III.6. Esquema de como el láser atrapa una esfera en solución.....	39
III.7. Elementos básicos que constituyen una pinza óptica.....	41
III.8. Diseño del canal para realizar los ensayos <i>in-vitro</i> con la cinesina.....	43
III.9. Esquema de cómo el láser atrapa una esfera en solución.....	44

III.10. Esquema de varias cinesinas adheridas al microtúbulo.....	45
III.11. Cámara de humedad para poder conservar los microtúbulos.....	47
IV.1. Geles de poliacrilamida.....	52
IV.2. Depolimerización de un microtúbulo estabilizado con taxol y fijado sobre una superficie de vidrio con poli-L-lisina.....	54
IV.3. Grafica de longitud (μm) del microtúbulo después de la depolimerizada vs el tiempo (s) transcurrido.....	55
IV.4. Imagen de la estructura cristalina de la β -tubulina.....	57
VI.5. Imágenes de la depolimerización de los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído muestras con taxol y sin taxol.....	60
IV.6. Esquema de la reacción del APTES con la superficie del vidrio.....	61
IV.7. Esquema de la reacción del APTES con glutaraldehído.....	62
IV.8. Esquema de la reacción entre el glutaraldehído y la proteína.....	62
IV.9. Trayectoria de la cinesina sobre un microtúbulo.....	65
IV.10. Grafica de la fracción de esferas que se movieron vs a concentración relativa de cinesina.....	69
IV.11. Gráficas de Frecuencia vs Fuerza de la cinesina empleando varias diluciones.....	74
IV.12. Grafica de la fuerzas promedio (μN) soportada por una o más cinesinas vs diluciones de cinesina.....	75
IV.13. Representación de cómo es que la cinesina se distribuye de manera aleatoria sobre una esfera.....	75
IV.14 Esquema de una cinesina unida a una esfera para el cálculo de la distancia máxima a la cual una segunda esfera aún se puede unir al microtúbulo.....	76
IV.15. Gráficas de Frecuencia vs Tiempo de la cinesina empleando varias diluciones.....	76
IV.16. Grafica del tiempo promedio (s) que permanecieron las cinesinas caminando sobre el microtúbulo vs las diluciones.....	80
IV.17. Gráficas de Frecuencia vs Fuerza de la cinesina empleando una	

dilución de 1:280,000.....	82
IV.18. Grafica de la fuerza promedio soportada por más de una cinesina (pN) vs Tiempo (días).....	83

Resumen

En esta tesis se estudio la cooperatividad entre proteínas motoras y los efectos de sobre la funcionalidad de microtúbulos al estabilizarlos con glutaraldehído. La kinesina es un motor molecular biológico de tamaño nanométrico que convierte la energía química de la hidrólisis de ATP en trabajo mecánico. En la célula, la kinesina participa en el transporte intracelular, frecuentemente en grupos, llevando organelos o vesículas hacia el extremo más (+) de filamentos celulares conocidos como microtúbulos. Por otra parte, existen propuestas de aplicaciones nanotecnológicas basadas en conjuntos de kinesinas transportando nanopartículas a lo largo del microtúbulo. Por estas razones, es necesario: 1) Comprender cómo coopera entre sí un conjunto de kinesinas y 2) Estabilizar a los microtúbulos por periodos prolongados. Realizar estos estudios son los objetivos de esta tesis, empleando ensayos de motilidad *in-vitro* en los que kinesinas unidas a una esfera de poliestireno se desplazan sobre microtúbulos fijos sobre una superficie. Utilizando un sistema de pinzas ópticas es posible medir desplazamientos y fuerzas desarrolladas por la kinesina. Respecto al primer objetivo, se realizaron mediciones variando el número de kinesinas por esfera. Encontramos que una sola kinesina desarrolla fuerzas de 4.5 pN y permanece sobre el microtúbulo un promedio de 0.3 s. En cambio, para conjuntos de más de una kinesina la fuerza se incrementa a 5.2 pN y el tiempo de permanencia es de 0.5 s. Estos resultados indican que grupos de dos o más kinesinas cooperan entre sí. Respecto al segundo objetivo, se desarrolló un protocolo de estabilización de microtúbulos utilizando glutaraldehído. Estos microtúbulos resultaron estables aún después de varias semanas, además de que demostraron ser funcionales, lo cual se comprobó mediante ensayos de motilidad con kinesina.

PALABRAS CLAVE: Kinesina, microtúbulos, pinzas ópticas, glutaraldehído y taxol.

Abstract

In this thesis, the cooperativity between a motor protein and the stabilizing effects of the microtubule glutaraldehyde has been studied. Kinesin is a biological molecular motor of the nano scale that has a function of converting chemical energy from ATP hydrolysis into mechanical work. This molecular motor is involved in intracellular transport of cargo such as clusters, organelles or vesicles, leading them to the periphery of the cell through filaments called microtubules. Moreover, there have been proposals of nanotechnological applications for kinesin to carry specific nanoparticles along microtubules. With these reasons in mind, it is necessary to first: 1) Understand how group of kinesin motors cooperate with one another as a group and 2) To stabilize microtubules for prolonged periods of time. In this dissertation, we performed these studies using in vitro motility assays in which kinesin was attached to a polystyrene bead and let to stick and move along a fixed microtubule. It is possible to measure the displacements and forces developed by kinesin using an optical tweezers system. Regarding our first experimental goal, measurements were made by varying the number of kinesins per area. It was found that a single kinesin developed forces of 4.5 pN and remained on the microtubule 0.3 s on average, whereas, for sets including more than a single kinesin the force increased up to 5.2 pN and their time of residence was 0.5 s. These results indicate that groups of more than one kinesin do cooperate between each other within the group. In regards to our second goal, we developed a protocol for microtubule stabilization using glutaraldehyde. Microtubules were observed to be stable after several weeks and that proved to be functional, which was checked by kinesin motility assays.

KEY WORDS. Kinesin, microtubules, optical tweezers, glutaraldehyde, and taxol.

CAPÍTULO I

Los microtúbulos y la proteína motora cinesina

CAPÍTULO I

Los microtúbulos y la proteína motora cinesina.

En este Capítulo se presentan conceptos básicos y una descripción sobre los microtúbulos y la proteína motora cinesina a estudiar en la presente tesis. Además, se mencionará la función que desempeñan dentro de la célula.

I.I. La importancia del citoesqueleto en la célula

La célula es la unidad básica de todos los seres vivos y contiene la maquinaria necesaria para obtener materiales del ambiente y para generar una nueva célula idéntica a sí misma, que contendrá una nueva copia de información hereditaria. Sólo la célula dispone de esta capacidad [1].

Existen dos clases de células: procariotas y eucariotas. Las células procariotas miden 1-10 μ m de diámetro y todos sus componentes se encuentran dentro del citoplasma, mientras que las células eucariotas miden, por lo general, entre 10 y 100 μ m. Una característica única de la célula eucariota es la separación de sus componentes en compartimientos, los cuales son llamados organelos (paquetes de macromoléculas organizadas, rodeados por una membrana).

Uno de los constituyentes más importantes de la célula es el citoesqueleto. La función del citoesqueleto es darle forma y movimiento a la célula además de guiar el movimiento interno de organelos [2] y está formado por filamentos que se conforman de proteínas. El citoesqueleto está compuesto por 3 tipos de filamentos (ver Figura I.1):

- 1) Los filamentos de actina (diámetro \sim 6nm), también conocidos como microfilamentos por su tamaño.

2) Los filamentos intermedios (diámetro ~10nm).

3) Los microtúbulos (diámetro ~24nm) [3].

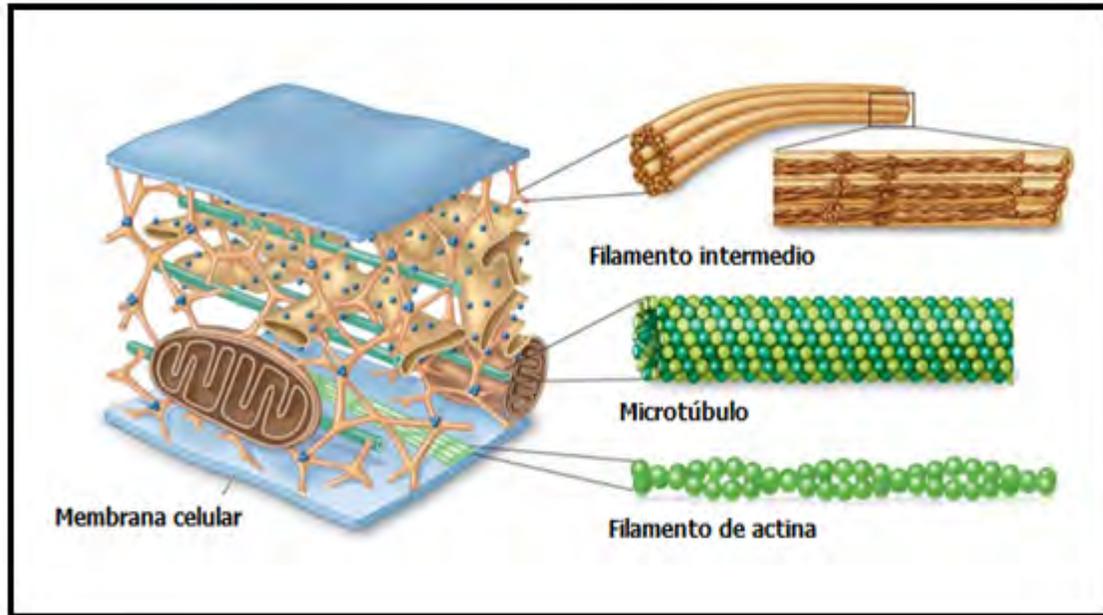


Figura I.1. Imagen de los componentes del citoesqueleto. Dentro de la célula se pueden encontrar: filamentos intermedios, microtúbulos y filamentos de actina [4].

A continuación sólo nos enfocaremos a describir a los microtúbulos que son una parte fundamental del tema desarrollado en esta tesis.

I.II. Los microtúbulos

I.II.1. La Tubulina

Los microtúbulos se componen de un único tipo de proteína globular, denominada tubulina, que es un dímero constituido por dos polipéptidos de 55kDa cada uno. [5] Existen 5 clases de proteínas: α , β , δ , γ , y ϵ tubulina [3], de estas cinco proteínas sólo tres intervienen en la formación del microtúbulo las cuales son α , β y γ tubulina. Cabe señalar que cada monómero de tubulina α o β se encuentra unido a

un nucleótido de guanina (GTP), el cual no se intercambia cuando está unido a la α -tubulina o al sitio N (sitio N es el sitio donde se une el GTP en la α -tubulina), pero sí se intercambia cuando se une a la β -tubulina o al sitio E (sitio E es el sitio donde se une el GTP en la β -tubulina). Las α y β tubulinas comparten 40% amino ácidos en común.

Las estructuras de la α y β tubulina son básicamente idénticas: cada monómero está formado por un núcleo de dos hojas β enrolladas y por una α hélice. La estructura del monómero es muy compacta, pero se puede dividir en tres dominios (ver Figura I.2):

- El dominio amino terminal contiene la región de unión del nucleótido guanina (GTP).

- Un dominio intermedio que contiene el sitio de unión del taxol. (El taxol es un agente que estabiliza a los microtúbulos y también es empleado en terapia contra el cáncer, de este compuesto se hablara más detalladamente en el siguiente capítulo).

- El dominio carboxilo terminal, en el que se unen las proteínas motoras [6].

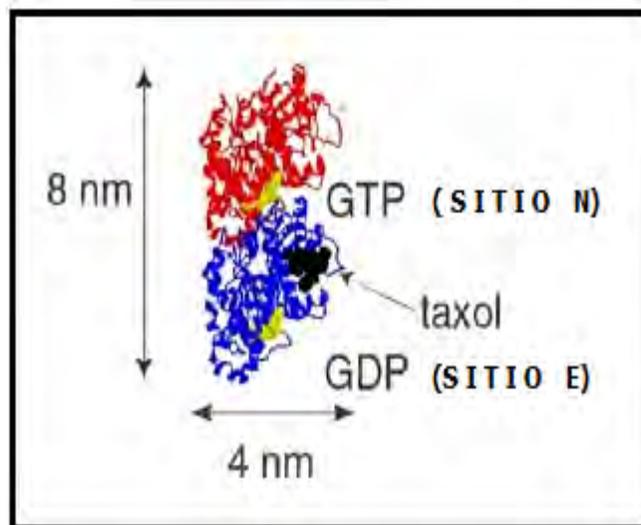


Figura I.2. Estructura cristalina de la $\alpha\beta$ tubulina. De rojo se encuentra el monómero α tubulina y de azul se encuentra el monómero de β tubulina. La parte de color amarillo en la α tubulina es el sitio N y en la β tubulina es el sitio E [7].

I.II.2. Formación de los microtúbulos

Los microtúbulos se forman por medio de la polimerización de los dímeros de α y β tubulina. La polimerización es un proceso polar que refleja la polaridad del dímero de tubulina que a la vez determina la polaridad del microtúbulo [8].

En primer lugar, los dímeros de α y β tubulina se asocian cabeza con cola para formar un protofilamento (unidades globulares alternadas) y a continuación los protofilamentos se asocian lateralmente para formar una lámina que se cerrará para formar un tubo cilíndrico que es el microtúbulo (ver Figura I.3) [3]. En experimentos in vitro se encontró que la polimerización ocurre más rápido de un extremo el cual es nombrado el “extremo más” y al final de este extremo se encuentra la β -tubulina mientras que el extremo que crece más lento es nombrado “extremo menos” y al final de este extremo encontraremos la α -tubulina [8].

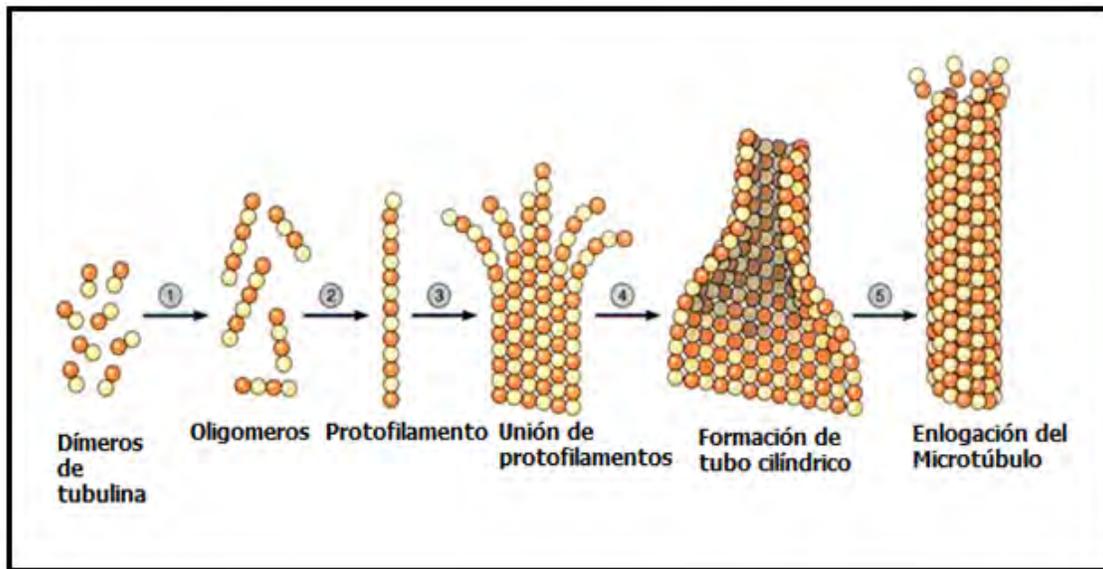


Figura I.3. Mecanismo de formación del microtúbulo. El primer paso es la unión de la α y β tubulina para formar los dímeros. De color amarillo α -tubulina, color anaranjado la β -tubulina [9].

Otro componente importante de la célula eucariota es el centrosoma, en donde podemos encontrar una inusual forma de tubulina, la γ -tubulina. Se piensa que con esta proteína se inicia la nucleación mediante la formación de anillos que actúan como plantillas para el crecimiento de nuevos microtúbulos. Los extremos menos se anclan al centrosoma y los extremos más se dirigen hacia la membrana (ver Figura I.4) [5].

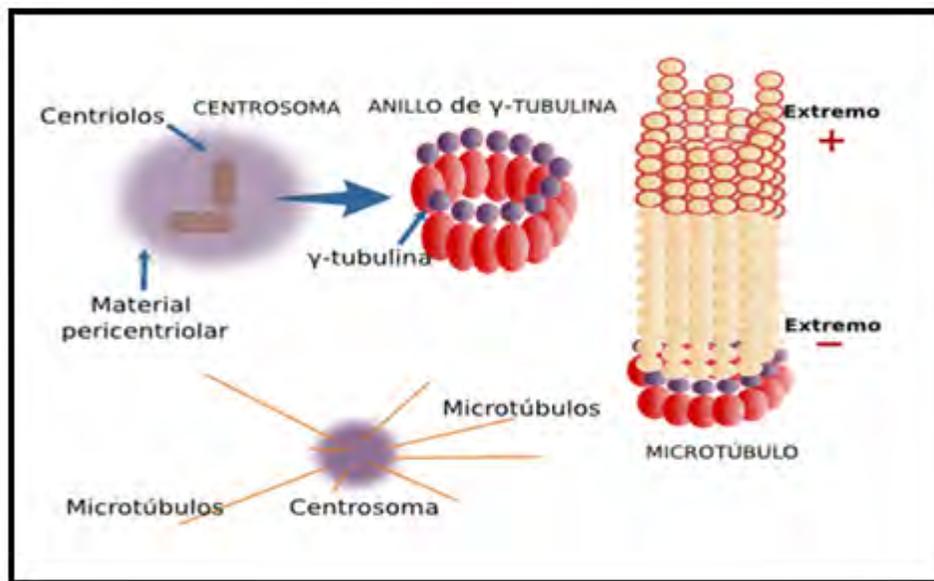


Figura I.4. Nucleación de los microtúbulos sobre la γ -tubulina. Las elipses de color rojo es el centrosoma, los círculos morados son las γ -tubulina y por último los círculos color beige son la α y β tubulina [9].

I.II.3. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos

Los dímeros de tubulina se pueden depolimerizar al igual que polimerizarse, lo que da como consecuencia un ciclo de ensamblaje y desensamblaje rápido de los microtúbulos, al cual se le conoce como inestabilidad dinámica [10,11].

La inestabilidad dinámica se debe a la hidrólisis de GTP unido a la β -tubulina durante o después de la polimerización. El crecimiento de los microtúbulos

continúa mientras exista una concentración elevada de tubulina unida a GTP. En este caso las moléculas nuevas de tubulina unidas a GTP se añaden más rápido de lo que el GTP es hidrolizado, por lo que se mantiene una capa de GTP en el extremo de crecimiento. Sin embargo si el GTP se hidroliza más rápidamente de lo que se añaden las nuevas subunidades, la presencia de tubulina unida a GDP en el extremo del microtúbulo lleva al desensamble y al acortamiento. Este proceso se observa de manera preferencial en los extremos más (ver Figura I.5) [5].

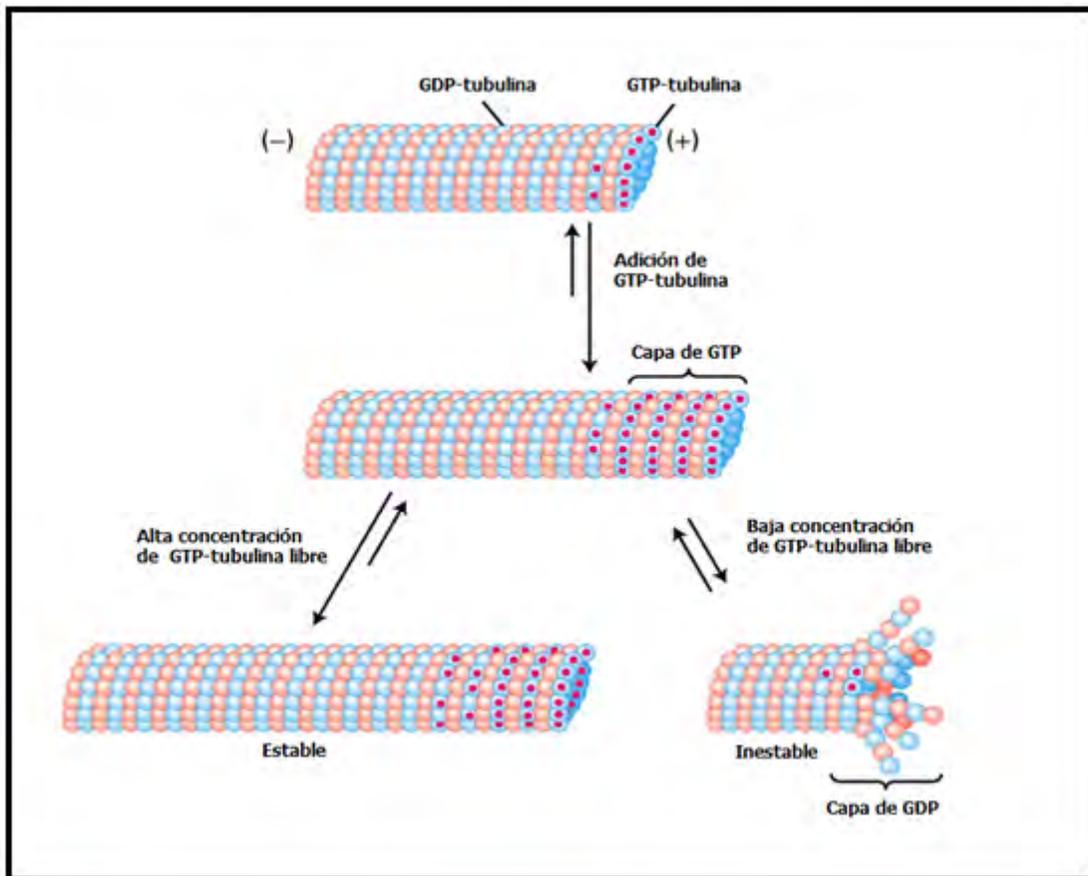


Figura I.5. Esquema del proceso de inestabilidad dinámica. De color rosa se encuentra representada la α -tubulina y de azul la β -tubulina. Los puntos rojos simbolizan al GTP unido a la β -tubulina.

I.II.4. Los microtúbulos y su función en la célula

Los microtúbulos no sólo forman parte del citoesqueleto de la célula sino que también intervienen en diferentes procesos dentro de ella.

Por ejemplo, durante la división celular la función de los microtúbulos es segregar físicamente los cromosomas y orientarlos mediante la formación del huso mitótico. En las células que no se están dividiendo los microtúbulos participan en el movimiento de organelos como las mitocondrias, lisosomas, pigmentos, gotas de lípidos. Son también necesarios para dirigir el tráfico vesicular. Pero esto no significa que los microtúbulos sean los que hacen este proceso, sino que los desplazamientos de los organelos son llevados a cabo por una serie de proteínas llamadas proteínas motoras de las cuales hablaremos a continuación [12].

I.III. Proteínas motoras

El movimiento dirigido es crucial para varios procesos fisiológicos como la contracción muscular, la división celular o el transporte intracelular de organelos a su punto de destino. Para llevar a cabo estas tareas, las células han desarrollado una gran variedad de proteínas motoras moleculares que son capaces de convertir la energía química en energía mecánica y por medio de este mecanismo se pueden mover en el interior de la célula.

Algunos de los miembros de la familia de las cinesinas son moléculas diméricas, con dos dominios de motor catalíticos que están unidas por un tallo en forma de espiral y una característica importante es su capacidad de caminar procesivamente, lo que significa que pueden viajar hasta varios micrómetros sin disociarse de su sustrato [13].

Entre los motores moleculares que están implicados en el transporte intracelular, existen tres grandes superfamilias que han sido identificadas: dioninas, miosinas y cinesinas.

Dioninas: se mueven a lo largo de los microtúbulos del extremo más al extremo menos direccionando la motilidad (movimiento) de los cilios y flagelos.

Miosinas: se mueven a lo largo de los filamentos de actina para conducir la contracción muscular.

Cinesinas: utilizan a los microtúbulos como sustrato para el transporte de organelos y utilizan la energía química del ATP (Adenosín trifosfato) para conducir cambios conformacionales que generan desplazamientos y fuerzas [14]. En este trabajo nos centraremos en el papel de la proteína cinesina.

I.III.1. La Cinesina

La cinesina fue caracterizada por Vale et al. en 1985 [15] como citosólica (es decir se encontró en el citosol de la célula). Las cinesinas son proteínas que constituyen una gran familia de motores moleculares. Hasta ahora, más de 45 familias de cinesinas han sido reportadas en el cerebro de ratón y en el genoma humano. Estas proteínas contienen un dominio en común, este dominio es llamado “dominio del motor” el cual tiene dos características importantes: 1) es el sitio de unión a los microtúbulos y 2) también es el sitio de unión e hidrólisis del ATP.

Esta familia puede ser agrupada en tres tipos, dependiendo de la posición del dominio del motor en la molécula:

- N-cinesinas que tienen el dominio del motor en la región del amino terminal,
- M-cinesinas que tienen el dominio del motor en la parte media

C-cinesinas que tienen el dominio del motor en la región del carboxilo terminal [14].

Este trabajo se enfocará específicamente a la cinesina convencional o cinesina-1, que pertenece a la familia N-cinesinas.

I.III.2. Estructura de la cinesina convencional

La cinesina convencional es una proteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas pesadas idénticas (110 a 140 kDa cada una) ($1 \text{ Dalton} = 1.660\,538\,921 \times 10^{-27} \text{ kg}$) y dos cadenas ligeras idénticas (60- 80 kDa cada una). Las cadenas pesadas tienen tres regiones distintas: un dominio del motor amino-terminal llamado “cabeza”, un dominio en forma de α -helice llamado “tallo” y un pequeño dominio globular carboxilo-terminal llamado “cola” (ver Figura I.6). El dominio globular de la cabeza incluye el sitio de unión e hidrólisis del ATP y el sitio de unión a los microtúbulos. Por otra parte, el dominio globular de la cola se asocia con las cadenas ligeras y se cree que está involucrado en la especificidad del cargo (vesículas u organelos) [16, 17].

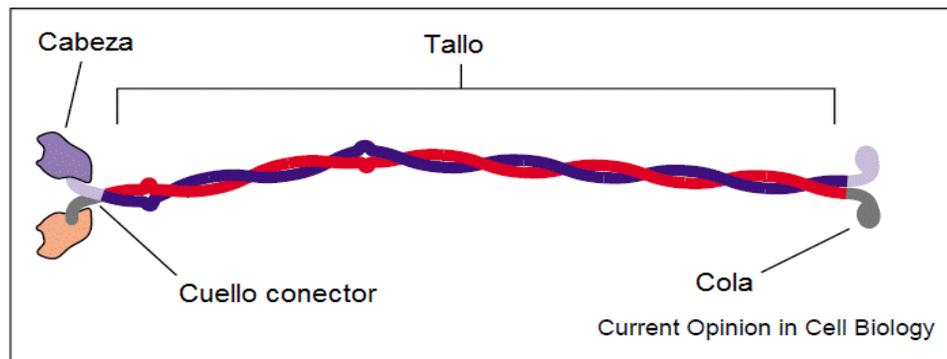


Figura I.6. Estructura de la cinesina. De color morado y rosa se encuentra las cabezas que se unen al microtúbulo, el cuello conector son dos cadenas ligeras de amino ácidos que no están dimerizadas (parte lila y gris que se encuentra después de las cabezas), de color rojo y azul se representan las cadenas que se dimerizan para formar el tallo. Por último, se encuentra la cola, en donde se van a unir los cargos [18].

I.III.3. Modelo de procesividad mano sobre mano (hand-over-hand) de la cinesina

Una inusual e importante propiedad de la cinesina es que es procesiva: esto quiere decir que una sola molécula puede caminar continuamente a lo largo de un microtúbulo de varios micrómetros de largo, ejecutando cientos de pasos de 8 nm (que es el espacio que hay entre α y β tubulina) sin disociarse y soportando fuerzas de varios piconewtons (hasta 7pN). Experimentos bioquímicos muestran que la cinesina hidroliza ~100 moléculas de ATP cada vez que se encuentra con un microtúbulo [19].

Es probable que la procesividad sea resultado de un proceso de adaptación ya que es importante que cada motor permanezca unido al microtúbulo durante tanto tiempo como sea posible para asegurar el transporte de los organelos o vesículas de forma rápida y fiable a través de largas distancias con una pequeña probabilidad de disociarse del microtúbulo durante cada ciclo de hidrólisis de ATP [20].

Por lo tanto, para que la cinesina se desplace de manera procesiva es necesario que permanezca unida al microtúbulo durante todo el recorrido ya que si se desprende ésta se difundirá rápidamente. La estructura de la cinesina sugiere un posible mecanismo llamado mano sobre mano o bien *hand over hand* [19].

Este modelo propone lo siguiente: las cabezas se alternan en la hidrólisis de ATP, donde la liberación de una cabeza depende de la unión de la otra al microtúbulo. En segundo lugar, la molécula cambia entre dos conformaciones diferentes después de cada paso. En tercer lugar, el avance de cada cabeza tiene incrementos de 16 nm, el doble de la distancia recorrida por el tallo durante cada paso (ver Figura I.7) [18].

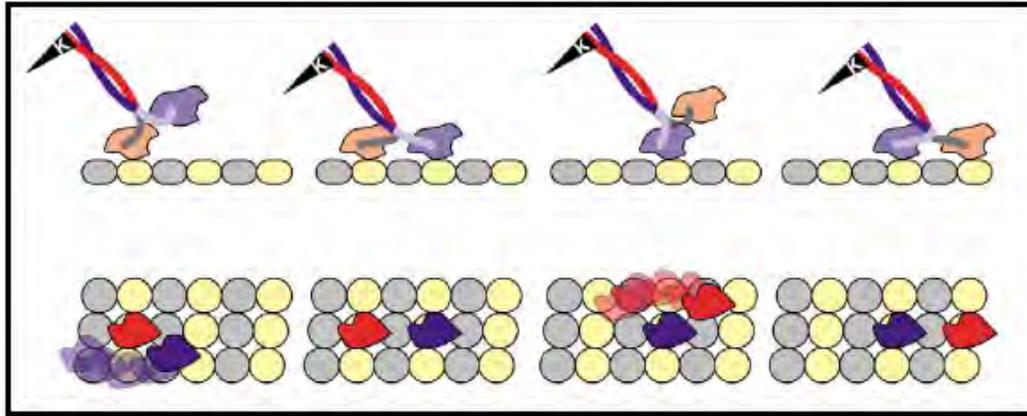


Figura I.7. Modelo mano sobre mano. En la parte superior del esquema es una vista lateral de como se vería la cinesina desplazándose sobre el microtúbulo y en la parte de abajo se observa el trayecto que siguen las cabezas [18].

I.III.4. Modelo cinético del proceso de hidrólisis del ATP por la cinesina

Cuando la cinesina se encuentra en solución (antes de unirse a los microtúbulos) tiene ADP en ambas cabezas, lo cual vamos a representar de la siguiente forma: {K-D, K-D} (del lado izquierdo se representa el estado de la primera cabeza y del lado derecho se representa el estado de la segunda cabeza), debido que la liberación de ADP es muy lenta ($\sim 0.01s^{-1}$). La unión de una cabeza a los microtúbulos {Mt-K-D, K-D} acelera la liberación de ADP de esta cabeza ($50-300s^{-1}$) para dar lugar al estado {Mt-K, K-D}. La unión del ATP a la cabeza unida al microtúbulo lleva al estado {Mt-K-T, K-D}, que generalmente acelera la liberación del segundo ADP ($110-300s^{-1}$). Se sabe que el nucleótido se hidroliza primero para formar el siguiente estado {Mt-K-D-P, K-D}. A continuación, la segunda cabeza se une al microtúbulo para dar el estado {Mt-K-D-P, Mt-K-D} y el ADP es liberado para dar el siguiente estado {Mt-K-D-P, Mt-K}.

Después ocurre la separación de la primera cabeza del microtúbulo para formar {K-D-P, Mt-K} y el fosfato se libera rápidamente para dar {K-D, Mt-K} (ver Figura I.8). Esto completa un ciclo de hidrólisis, durante el cual el tallo de la cinesina se ha movido 8 nm [20].

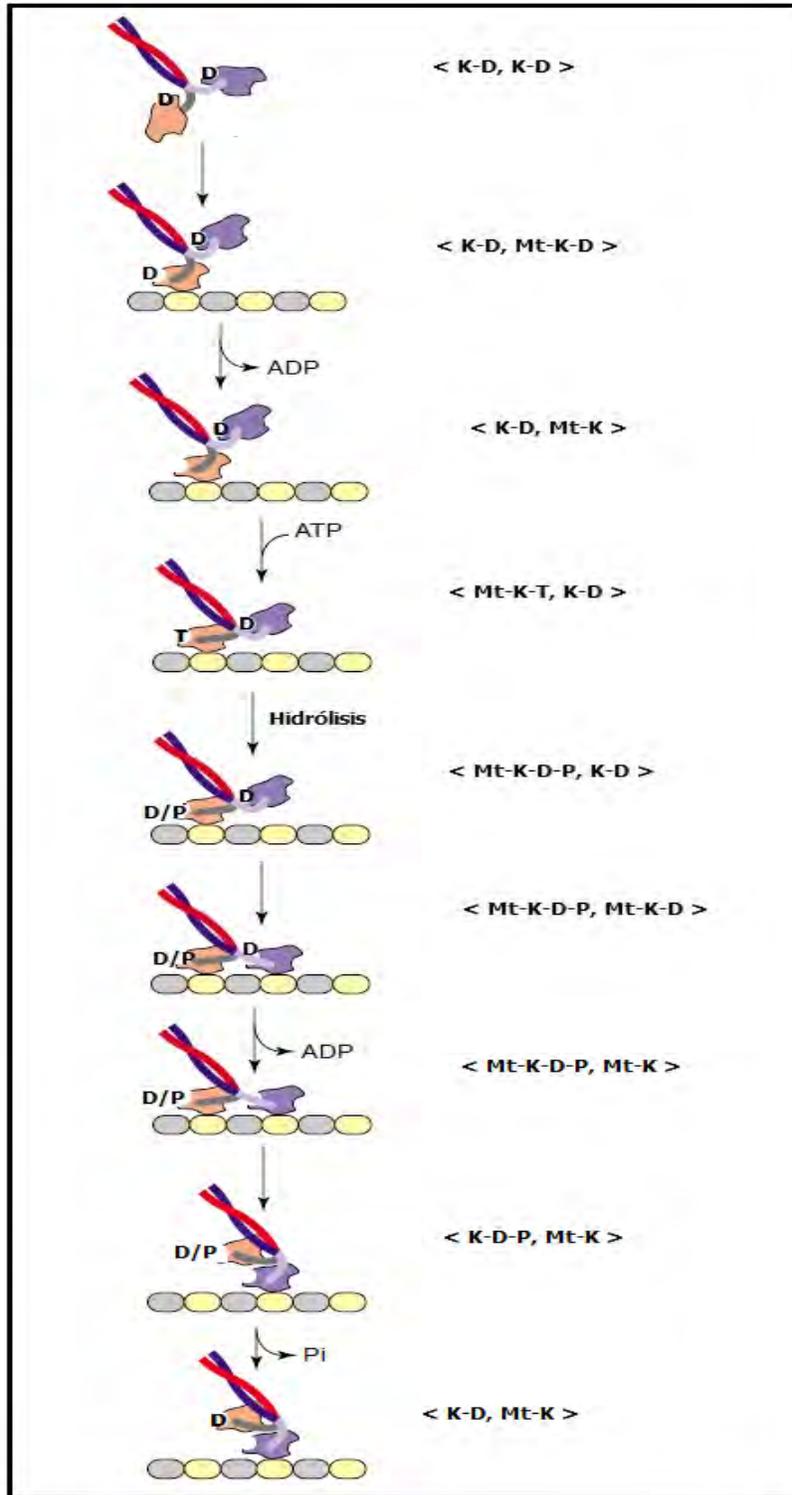


Figura I.8. Posible ciclo de hidrólisis y cooperatividad de las dos cabezas. Dónde: K=cabeza, D=ADP, Mt=microtúbulo, P=fosfato, T=ATP. (Imagen modificada de L. Asbury Charles et al. y William O. Hancock et al. [18 y 20]).

CAPÍTULO II
Antecedentes de la investigación científica de los
microtúbulos y la cinesina.

CAPÍTULO II

Antecedentes de la investigación científica de los microtúbulos y la cinesina

Los microtúbulos son de gran interés debido a su papel como sustrato para el transporte activo de vesículas u organelos a través de la célula. El proceso de transporte es llevado a cabo por proteínas motoras como la cinesina, la cual hidroliza ATP y se desplaza a lo largo de los microtúbulos transportando activamente la carga de un lugar a otro dentro de la célula. Por tal motivo, es importante describir en este capítulo su importancia y algunos experimentos que se han realizado con la cinesina y cómo se ha logrado estabilizar los microtúbulos. Por último se mencionan los objetivos de la presente tesis.

II.I. Agentes estabilizantes de microtúbulos

Debido al papel central de los microtúbulos en la mitosis, los fármacos que afectan al ensamblaje de los microtúbulos no sólo son útiles como herramientas experimentales en biología celular y molecular del centrosoma sino también en el tratamiento del cáncer [5].

Sustancias tales como: colchicina, colcemida, docetaxel, epothilone A, epothilone B, epothilone D, laulimalide, eleutherobin, son algunos ejemplos de fármacos que se unen a la tubulina e inhiben la polimerización del microtúbulo, bloqueando la mitosis [21]. Otro fármaco que también bloquea la división celular es el taxol, el cual estabiliza a los microtúbulos en vez de inhibir su ensamblaje. El taxol se utiliza como agente anticancerígeno y como herramienta experimental en el laboratorio. Recientemente, el glutaraldehído se ha empezado a estudiar como estabilizador de los microtúbulos.

II.1.1. Taxol

El paclitaxel mejor conocido como Taxol (ver Figura II.1) es un diterpeno (es un compuesto que tiene 20 átomos de carbono, es decir, cuatro unidades de isopreno [22]) con un anillo de taxano [23]. El taxol fue aislado en 1971 de la corteza del árbol de tejo [24], también puede obtenerse mediante síntesis parcial a partir de un precursor que se encuentra en las hojas de tejo o bien se puede obtener por medio de síntesis química [25]. Wani et al. lo caracterizaron como un fármaco antitumoral [26] para ciertos tipos de cáncer.

El Taxol ha sido ampliamente utilizado como un fármaco antitumoral y recientemente en las cánulas liberadoras de fármacos para prevenir el bloqueo de las arterias coronarias después de la angioplastia con balón. Además de sus aplicaciones médicas, el Taxol es utilizado con frecuencia en la investigación científica para estudiar la estructura de los microtúbulos así como para estabilizarlos y protegerlos de la depolimerización [24].

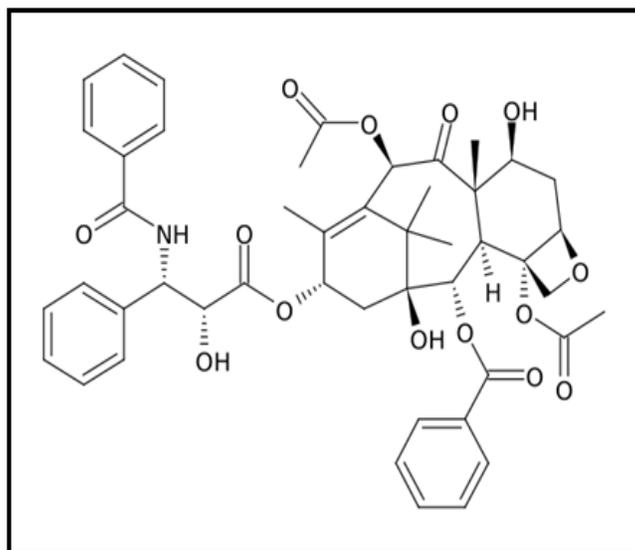


Figura II.1. Estructura química del Taxol [27].

II.1.2. Cómo el taxol estabiliza a los microtúbulos

En el extremo amino terminal de cada monómero de tubulina se encuentra un sitio de unión para el nucleótido de guanina. Cuando la β -tubulina se encuentra con el GTP expone sus sitios de unión con el GTP, el cual se une a estos sitios. El GTP es hidrolizado a GDP durante la formación del microtúbulo. Una molécula de GTP unida a α -tubulina está atrapada de forma permanente en el heterodímero por la unión del monómero de β -tubulina. El taxol se une a un segundo dominio globular de la β -tubulina en un sitio cercano al dominio GTPasa (ver figura II.2.). La unión taxol – tubulina es estequiométrica, es decir, un taxol por dímero de α y β tubulina [28].

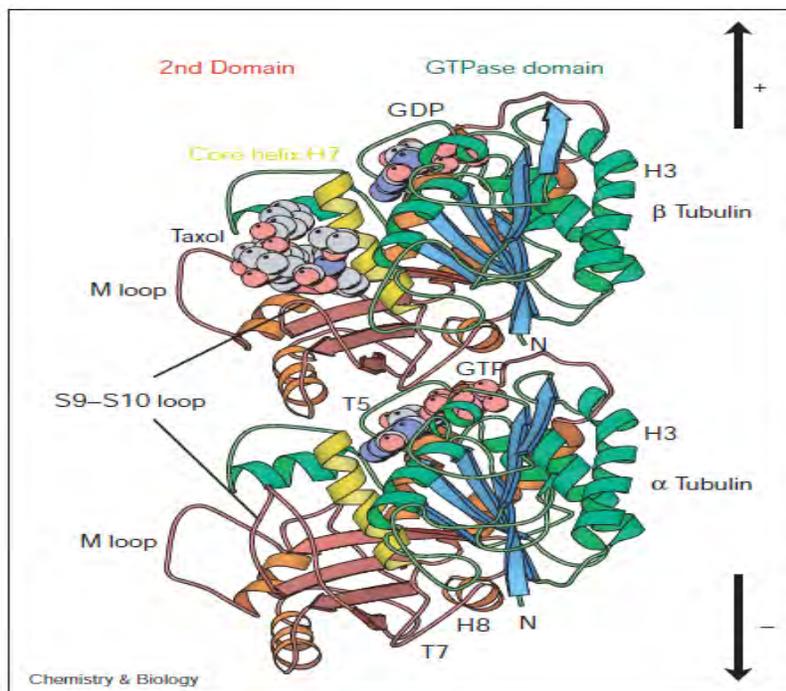


Figura II.2. Imagen de la estructura cristalina de la α y β tubulina. La β tubulina se encuentra en la parte superior y es la que contiene el sitio de unión del taxol. El taxol se encuentra simbolizado como esferas de color gris. La α tubulina se encuentra en la parte inferior del esquema. Las flechas en negro señalan hacia donde serían el extremo más y el extremo menos del microtúbulo [28].

Después de la hidrólisis del GTP los microtúbulos y las hojas conformadas por protofilamentos se vuelven estructuras inestables, debido a que la conformación preferida para los protofilamentos individuales es curva (forma de frijol) y no recta. Los protofilamentos se doblan hacia el exterior y empiezan a depolimerizarse en forma de anillos y bobinas [28]. El mecanismo de estabilización por taxol aún no se conoce por completo, pero se sabe que el taxol interactúa con el amino-terminal de la β -tubulina cambiando la conformación de los dímeros. Arnal y Wade [25] sugieren que cuando el taxol está unido a los dímeros de tubulina no les permite que tengan una conformación en forma de frijol más bien su conformación sería recta lo cual impide que ocurra la depolimerización ver figura II.3.

La pérdida de la dinámica de los microtúbulos se cree que daña el huso mitótico, provocando así la detención del ciclo celular en la transición metafase a anafase (en la mitosis) y en última instancia la muerte celular por apoptosis [24].

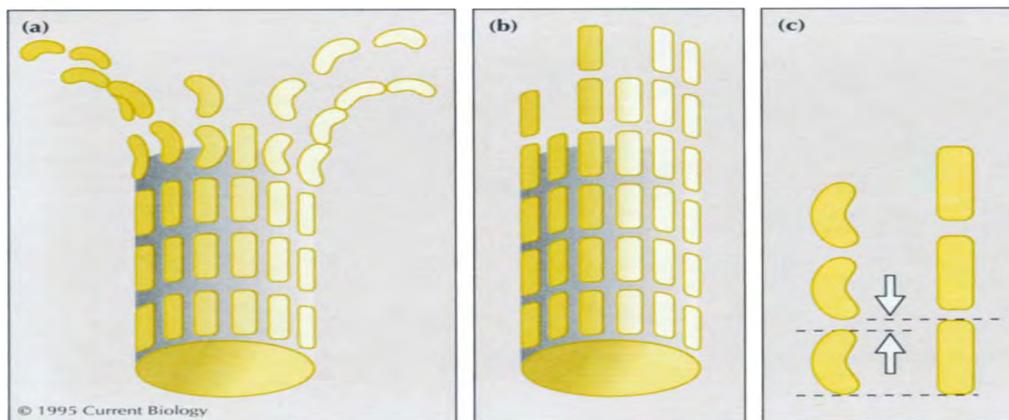


Figura II.3. Representación hipotética de como el taxol estabiliza a los microtúbulos.

El siguiente esquema fue propuesto por Arnal y Wade a) Es la representación de GDP-tubulina como un frijol en vista lateral y esto favorece a los protofilamentos a que empiecen a separarse de los extremos del microtúbulo, b) Es la representación del taxol estabilizando a los microtúbulos, la tubulina tiene una conformación recta de modo que en el extremo los protofilamentos están bloqueados para que inicie la depolimerización, c) Se observa que la conformación de tubulina en los protofilamentos es en forma de frijol cuando está hidrolizado el GTP y en una conformación recta usando el taxol. Las flechas indican que existe una variación en distancia entre los dímeros de tubulina según sea la conformación que adopten [25].

II.I.2. Uso del taxol en la investigación

El taxol es utilizado ampliamente en diversos aspectos de la bioquímica de microtúbulos, tales como la purificación de la tubulina y asociación de proteínas motoras. Es también utilizado en los experimentos que requieren microtúbulos estables; un ejemplo es la medición de la actividad de ATPasa de los motores moleculares, que depende de la presencia de los microtúbulos.

El uso del taxol para estabilizar a los microtúbulos es ampliamente utilizado en casi todas las investigaciones biofísicas relativas a la dirección, incrementos en la velocidad y desplazamiento de los motores moleculares, así como en experimentos sobre el movimiento y la hidrólisis del ATP [25, 29].

II.II. Estabilidad de los microtúbulos empleando glutaraldehído

II.II.1 El Glutaraldehído

El glutaraldehído es un dialdehído de 5 carbonos con una estructura relativamente simple. La fórmula molecular (ver Figura II.4.) muestra que tiene una cadena lineal la cual se une a dos aldehídos por los extremos. Se puede sintetizar químicamente mediante dos pasos: 1) el compuesto acroleína reacciona con etil vinil éter en una reacción Diels-Alder para formar etoxidodihidropirano, 2) este compuesto reacciona con el agua para finalmente dar como resultado el glutaraldehído.

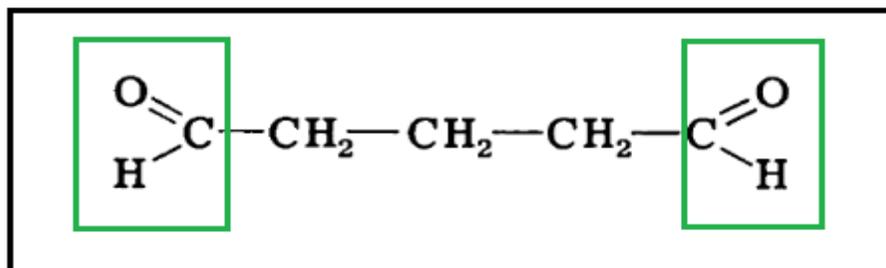


Figura II.4. Estructura química del glutaraldehído. Los cuadros en verde señalan al grupo aldehído [30].

II.II.2. El glutaraldehído forma un cross-link con los microtúbulos

En los últimos años se ha observado que el glutaraldehído funciona como estabilizador de microtúbulos, estos pueden ser estabilizados químicamente por medio de un entrecruzamiento (cross-link) entre las unidades de α y β tubulina por al menos ocho días. Es decir, el glutaraldehído forma un enlace covalente con estas proteínas. Sin embargo, el mecanismo exacto y el sitio de unión del glutaraldehído a estas proteínas aún no se conoce con exactitud. Turner et al. [31] realizaron un ensayo de motilidad donde los microtúbulos se incubaron en soluciones que fueron desde 0.05 - 0.8% de glutaraldehído, para después fijarlos sobre una superficie y colocarles una solución que contenía cinesinas adheridas a una esfera. Por medio de microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC por sus siglas en inglés) observaron que las cinesinas se desplazaban sobre el microtúbulo (ver Figura II.5). Sus resultados comprobaron que el glutaraldehído estabiliza a los microtúbulos por medio de un cross-link, el cual aparentemente no afectó a los sitios de unión entre la cinesina y el microtúbulo ya que se observó transporte incluso cuando tenían una concentración del 1% de glutaraldehído.

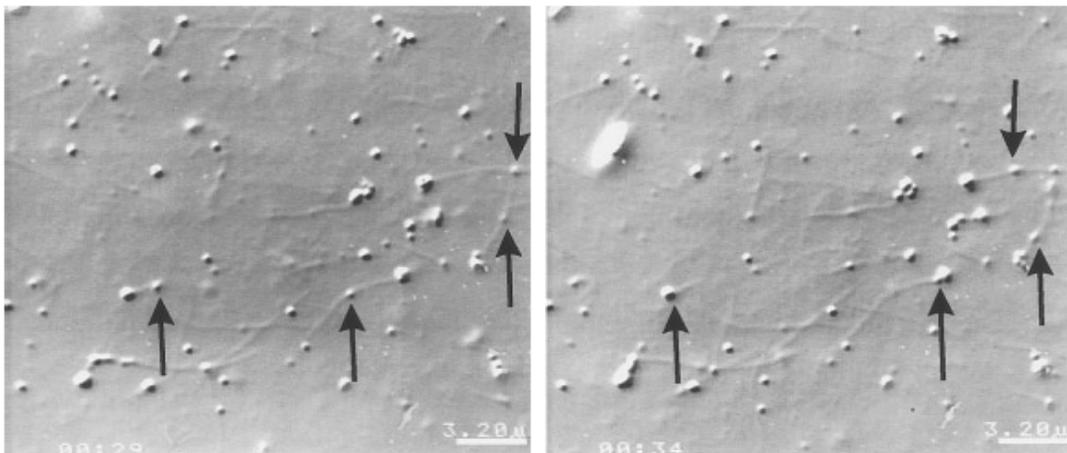


Figura II.5. Secuencia de un video del movimiento de la cinesina unida a una esfera sobre un microtúbulo. Donde se usó 0.05% de glutaraldehído para el cross-link por 1 min. La barra de escala es de 3.2 μm . Las flechas señalan algunas esferas que están siendo desplazadas por la cinesina [31].

II.II.3. Uso del glutaraldehído en la investigación

Estudios realizados en fijación de muestras biológicas por Sabatini et al. (1962, 1963, 1964) y Barnett et al. (1964) demostraron que de todos los aldehídos probados el glutaraldehído fue el más eficaz para la conservación de la estructura celular. La ventaja del glutaraldehído es que tiene dos grupos aldehídos que estabilizan los sistemas intracelulares preservando tanto células eucariotas como procariotas, incluyendo especímenes frágiles tales como invertebrados marinos, embriones, células enfermas, y hongos [30].

II.III. Estudios de la kinesina

Desde el desarrollo de las pinzas ópticas por Arthur Ashkin en 1986 [32], este instrumento ha sido muy útil en la comprensión de la dinámica de las proteínas motoras tanto a escala molecular como celular. En los últimos años, las pinzas ópticas han permitido aplicar fuerzas (cargas) externas controladas para el estudio mecanoquímico de proteínas motoras. Algunos aspectos de la kinesina que se han investigado con esta herramienta son: por ejemplo, el desplazamiento mecánico, la fuerza y velocidad que ejerce al caminar sobre el microtúbulo, la cinética química de la hidrólisis del ATP, la procesividad de una sola kinesina, entre otros.

II.III.1. Estudios de la cooperatividad de dos o más motores moleculares

En los últimos 15 años se ha caracterizado de manera extensiva a la proteína motora kinesina. La mayoría de los experimentos en estos estudios involucran el transporte llevado a cabo por una sola kinesina. Algunas de las propiedades del transporte que se han estudiado son: la velocidad del motor (aproximadamente 500 nm/s) [33], la longitud que recorre sobre el microtúbulo (1 μm) [32], el tamaño

del paso (8 nm) [33], la cantidad de ATP que consume durante todo su recorrido son aproximadamente 100 moléculas [19], la fuerza externa que puede soportar durante su recorrido sobre el microtúbulo (5-7 pN) [35].

Por otra parte, el transporte cooperativo de una carga por varios motores también ha sido estudiado pero en mucho menor grado, a pesar de que la cooperación de varios motores moleculares es bastante común en el transporte celular, como se reveló por estudios de microscopia electrónica [36].

El transporte de una carga llevado a cabo por un conjunto de motores moleculares tiene grandes ventajas, como por ejemplo, el que varios motores pueden soportar fuerzas de mayor magnitud que un solo motor. Esto implica que en un entorno muy viscoso, tal como el citoplasma, grandes cargas se mueven más rápido si se tira por un mayor número de motores [37]. Otra ventaja sería que la cooperación de varios motores hace que puedan recorrer mayores distancias sobre un microtúbulo antes de desprenderse de él.

II.III.1.1. Varias cinesinas pueden transportar una esfera

Beeg et al. [34] estudiaron el transporte de un conjunto de motores unidos a una esfera. Su experimento consistió en fijar microtúbulos a una superficie de vidrio, después hacer fluir esferas que contenían cinesinas. Variaron la concentración de cinesinas por esferas y observaron qué sucedía cuando se desplazaban sobre el microtúbulo, observando las siguientes propiedades: la velocidad y la longitud que recorrieron sobre el microtúbulo. La cantidad de cinesinas fue de 2 hasta 7 cinesinas por esfera.

Estos autores encontraron que a bajas concentraciones de motores unidos a una sola esfera (5 $\mu\text{g/ml}$) la velocidad aumentaba (promedio de 740 nm/s) y la distancia que recorrían también (promedio 1.88 μm). Sin embargo, cuando tenían 7 motores por esfera (concentración 20 $\mu\text{g/ml}$) la velocidad (promedio 534 nm/s) y las longitudes recorridas disminuyeron 1 μm . Para estas observaciones ellos dan

una explicación de lo que podría estar sucediendo. La disminución de la velocidad y la longitud que recorren las cinesinas a grandes concentraciones se puede deber a un impedimento estérico entre las cinesinas. Esto quiere decir, si en las esferas los motores están muy juntos entre sí, puede ser que más de una cinesina esté unida al microtúbulo. Cuando un motor está desplazándose paso a paso y enfrente de él hay otro motor lo más probable es que éste motor este ocupando el siguiente sitio de unión y por lo tanto el motor que esta atrás de ésta tiene que esperar a que se desocupe este sitio de unión [34].

II.III.1.1. Transporte llevado a cabo por dos motores moleculares

Vershinin et al. [38] han realizado investigaciones de cómo es llevado a cabo el transporte por dos motores moleculares cinesinas sobre un microtúbulo. Uno de los experimentos que realizaron fue fijar microtúbulos sobre una superficie de vidrio, después fluyeron cinesinas unidas a una esfera y por medio de microscopia óptica observar la distancia que las cinesinas recorrieron sobre el microtúbulo. Para este experimento las esferas sólo contenían 2 cinesinas. Por otro lado, aunque la mayoría de sus esferas en los experimentos contenían dos motores, existía la posibilidad de tener esferas con más de dos motores, aunque en mínima cantidad. El resultado que obtuvieron fue que los dos motores unidos a una esfera recorrieron más de 8 μm sobre el microtúbulo, esta distancia es mayor comparada con la de una sola cinesina (1 μm) [34]. Por otra parte, Vershinin et al. también realizaron un estudio teórico el cual confirmó que los dos motores moleculares unidos a un cargo puede recorrer mayores distancias que cuando se tiene un solo motor molecular unido a un cargo. Aunque sus estudios teóricos predijeron una distancia menor a 8 μm , esto se puede deber a que en la teoría las cinesinas se encuentran agrupadas, mientras que en los experimentos las cinesinas se unen aleatoriamente a la superficie de la esfera. Michael Vershinin et al. propusieron un posible modelo para explicar la coordinación entre dos motores moleculares cinesinas (ver Figura II.6). Los dos motores se unen a microtúbulo y comienzan a

desplazarse sobre él. Cuando uno de los motores se separa del microtúbulo el otro aún sigue unido al microtúbulo y puede seguir desplazándose sobre él. Después de un tiempo el motor que se desprendió de microtúbulo se vuelve a unir al microtúbulo, entonces los dos motores pueden seguir su recorrido juntos. Este evento puede ocurrir más de una vez, hasta que por fin ambos motores se desprenden del microtúbulo [38,39].

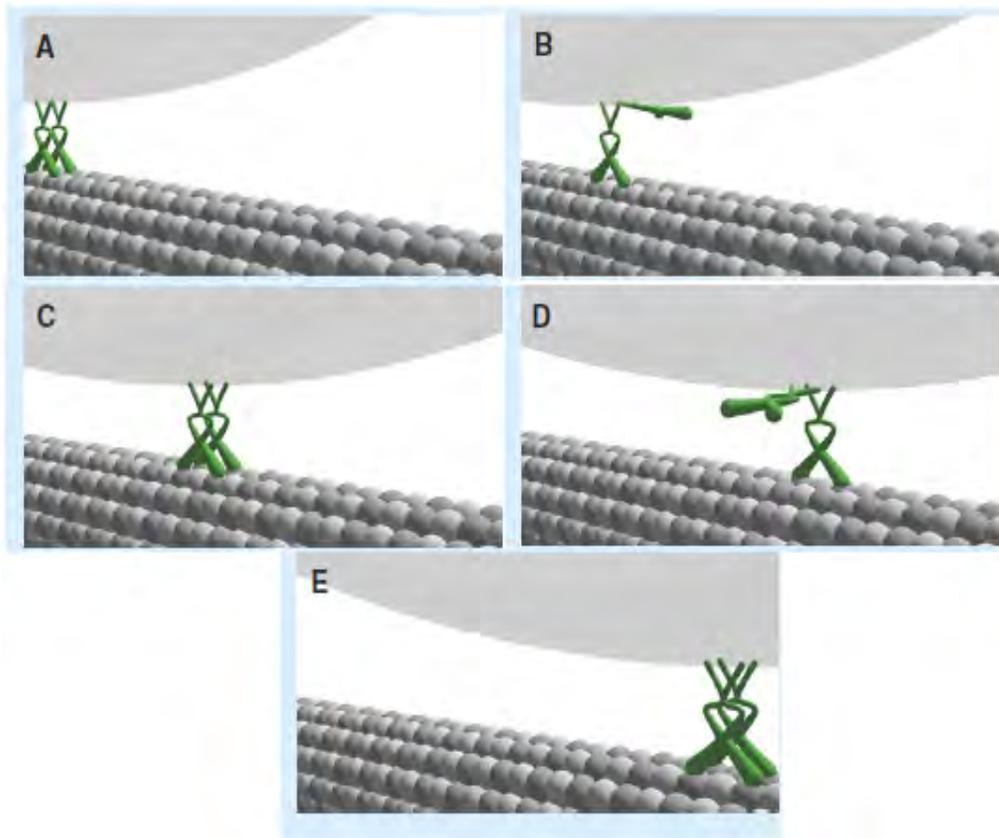


Figura II.6. Esquema de dos motores transportando una carga sobre un microtúbulo. A) Dos motores unidos a un microtúbulo. B) Uno de los motores se desprende del microtúbulo mientras que el otro sigue unido al microtúbulo y puede seguir desplazándose sobre él. C) El motor que se desprendió anteriormente se vuelve a unir al microtúbulo. D) Uno de los dos motores se vuelve a desprender del microtúbulo. E) De nuevo ambos motores están sobre el microtúbulo transportando el cargo a lo largo del microtúbulo [38].

Por otra parte Jamison et al. [40] estudiaron la fuerza que pueden soportar exactamente dos cinesinas unidas a una esfera para llevar a cabo el transporte sobre un microtúbulo antes de desprenderse. El procedimiento que ellos emplearon para tener exactamente dos cinesinas unidas a una esfera fue el siguiente (no es detallado): A una esfera que estaba recubierta con estreptavidina se le adhirió un fragmento de ADN que contenía dos biotinas separadas por una distancia de 50 nm entre ellas. Después por medio de un anclaje con la proteína “leucine zipper” las cinesinas se unen al ADN. El experimento *in-vitro* lo llevaron a cabo de la siguiente manera: los microtúbulos se fijan a una superficie de vidrio, después se hizo fluir una solución que contenía a las cinesinas adheridas a la esfera y con ayuda de la pinza óptica atraparon una esfera para colocarla sobre un microtúbulo y medir la fuerza que soportaba al irse desplazando sobre el microtúbulo antes de desprenderse. Los resultados que ellos obtuvieron fueron que las cinesinas soportaron fuerzas hasta de 17 pN, este valor es mayor al que se obtiene con una sola cinesina (7.3 pN). Jamison et al. realizaron un análisis estadístico con todos sus datos que obtuvieron de las fuerzas que soportaron las cinesinas y realizaron una gráfica de frecuencia vs fuerza que soportaron las cinesinas. La fuerza promedio que obtuvieron fueron de 5.9 ± 2.6 pN para dos cinesinas, comparado con el valor promedio para una sola cinesina de 6.0 ± 2.0 pN, lo cual resulto una sorpresa, pues estos dos valores son muy similares. Ellos atribuyen esta similitud a que la dinámica de una cinesina es influenciada por la otra cinesina [40].

I.V. Objetivos

I.V.1. Objetivos generales

- 1) Evaluar la magnitud de la fuerza que soportan una o más cinesinas y el tiempo que permanecen avanzando sobre un microtúbulo antes de desprenderse de él.
- 2) Evaluar el uso del glutaraldehído en la estabilidad a largo plazo de los microtúbulos y su efecto en la funcionalidad de los mismos.

I.V.2. Objetivos específicos.

- 1) Expresar la proteína motora cinesina y verificar que es funcional.
- 2) Realizar varios ensayos de motilidad con diferentes concentraciones de cinesinas unidas a un solo cargo.
- 3) Medir la diferencia que existe entre la fuerza que ejerce una sola cinesina y la que ejercen varias cinesinas.
- 4) Estabilizar microtúbulos con glutaraldehído por diferentes periodos (varias semanas).
- 5) Evaluar la capacidad de la cinesina de caminar sobre los microtúbulos estabilizados por varias semanas (~7 semanas) con glutaraldehído.

I.IV. Importancia

Los microtúbulos y las proteínas motoras como la cinesina representan dos componentes importantes para el transporte intracelular.

El conocer más acerca de la cooperatividad entre múltiples motores moleculares cinesinas para transportar un cargo es de gran interés biológico. Por otro lado, el interés de estos componentes de transporte intracelular en la nanotecnología involucra utilizar motores moleculares en aplicaciones diversas. Los conjuntos de cinesinas pueden llevar a cabo un transporte activo de nanomateriales o bien material biológico (que va desde nanómetros hasta unas cuantas micras de diámetro) en dispositivos nanotecnológicos. Ejemplos de ello serían en los sistemas de microfluído y macrofluído, y últimamente se ha diseñado un nuevo sistema llamado “nanolego” el cual consiste en el ensamblaje de nuevas estructuras por medio de proteínas motoras [41, 42, 43, 44].

Los microtúbulos tienen inestabilidad dinámica la cual se ha observado en experimentos *in-vitro*. La durabilidad de los microtúbulos dentro del citoplasma es de tan sólo 15 min. Sin embargo, en condiciones *in-vitro* los microtúbulos son estables tan sólo unas horas, esto empleando un agente que los estabiliza (taxol) [45]. Este problema es particularmente agudo cuando se trata de realizar ensayos de motilidad con la cinesina o bien en aplicaciones que utilicen las propiedades de transporte de cinesinas sobre microtúbulos. Por lo tanto, se necesita encontrar agentes que ayuden a estabilizar a los microtúbulos por varias semanas o inclusive meses. Los microtúbulos estables pueden servir como una plantilla para el montaje o el crecimiento de nanomateriales, para producir nanocables inorgánicos, matrices para nanopartículas y también pueden servir para transportar ADN dentro de un dispositivo nanométrico [43, 44, 46].

CAPÍTULO III

Metodología experimental

CAPÍTULO III

Metodología experimental

En este Capítulo se describen los protocolos utilizados en esta tesis, lo cuales se pueden agrupar en: la expresión de la cinesina, preparaciones previas a los ensayos de motilidad y los ensayos *in-vitro* que se realizaron con la cinesina empleando las pinzas ópticas.

III.I. Expresión de la proteína motora cinesina

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotes y eucariotes transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento [1].

Para poder realizar los ensayos *in-vitro* es necesario expresar la proteína cinesina. La siguiente metodología se realizó para obtener tanto la cinesina dimérica como la cinesina monomérica. Cabe señalar que en esta tesis no se empleó la cinesina monomérica.

Los plásmidos (moléculas de ADN circular que contienen la información génica de las proteínas de interés) de las cinesinas dimérica y monomérica fueron un regalo del grupo del Dr. Steven Block en la Universidad de Stanford California.

Para obtener la proteína, el primer paso es introducir el plásmido correspondiente en la bacteria *E.coli*. Después, esta bacteria se hace crecer en un medio líquido que le proporciona los nutrientes necesarios. Una vez que se obtiene una cantidad suficiente de células se les induce a que produzcan la proteína de interés y

finalmente se extrae la proteína de las células rompiendo la pared y membrana celulares.

Estos pasos se explican con mayor detalle a continuación.

Transformación. Esta parte involucró la transformación de la bacteria, es decir introducir el plásmido dentro de células de *E.coli*, para que las células elaboren nuestra proteína. Únicamente se empleó este protocolo para la transformación de la cinesina monomérica. Para el caso de la cinesina dimérica ya se contaba con células transformadas. En esta sección trabajamos con dos plásmidos correspondientes a la cinesina monomérica: BB2 y HH1.

Se empleó el protocolo de choque térmico para la transformación de la célula.

- 1) El tubo de BL21 (DE3) competente *E. Coli* se dejó en hielo por 10 min.
- 2) Se adicionaron 4 μ L del plásmido correspondiente y se mezcló con mucho cuidado.
- 3) La mezcla se colocó en hielo por 30 min.
- 4) Después de este tiempo se mantuvo a 42°C por 10 s e inmediatamente se cambió a un medio con hielo por 5 min.
- 5) Añadiendo 950 μ L de SOC (25°C, medio donde creció la *E. Coli*, el cual le proporciona los nutrientes necesarios) al medio, se dejó a 37°C por una hora.
- 6) Se tomó 100 μ L del cultivo y con unas cuantas gotas se plaqueó (distribuir las células en un medio sólido rico en nutrientes) el plato de selección.
- 7) Del medio de cultivo anterior se tomaron 100 μ L adicionándolos a 900 μ L de SOC (dilución 1:10), para plaquear nuevos platos de selección.
- 8) De la solución anterior se tomaron 100 μ L adicionándolos a 900 μ L de SOC (dilución 1:100) y se plaquearon nuevos platos de selección.
- 9) Por último, todos los platos de selección se dejaron a 37°C por 12 horas.

Como ya se mencionó anteriormente para la cinesina dimérica ya se tenían las células transformadas. Por lo tanto para el paso de expresión sólo se tomó una pequeña cantidad de células guardadas a -80°C y después se agregaron a 20 ml de LB/ampicilina y se continuó con el proceso que a continuación se describirá.

Expresión. Después de las 12 horas transcurridas se hicieron 5 muestras de células transformadas, cada una con 5ml de LB, 5 μL ampicilina y una pequeña cantidad de las colonias que crecieron en los platos de selección (cada muestra es de diferente colonia). Se dejaron a 37°C toda la noche.

De las muestras anteriores se tomaron 200 μL de células y se agregaron a 20 mL de LB/ampicilina, se dejó a 37°C hasta alcanzar una $\text{OD}=0.5$ (OD =densidad óptica). Después se indujo la expresión de proteína con IPTG 1mM (IPTG=isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), se dejó a 27°C por 5 horas, bajo agitación constante.

Después de las 5 horas, se tomó una alícuota de 1mL, se centrifugó y se guardó el pellet a -20°C para verificar posteriormente la expresión correcta de la proteína por medio de electroforesis.

Los 19 mL restantes se centrifugaron, se guardaron los pellets a -80°C .

III.I.1. Extracción de la proteína

La extracción de la proteína de interés se realiza después de que las células concluyen la etapa de expresión. Las membranas plasmáticas de las células pueden romperse de modo que liberan su contenido y dejan a la proteína de interés en solución.

A los pellets de células guardados a -20°C se les agregó un buffer de lisis (consistente en: Fosfato de sodio dibasico, NaCl, MgCl, DTT, ATP, Imidazol solo para las muestras con histidina) (Fosfato de sodio dibasico, NaCl, MgCl, DTT,

ATP, EDTA solo para las muestras con biotina) más un coctel inhibidor de proteasas y PMSF.

Después, a cada muestra se le dieron 5 pulsos de 20s de duración cada uno con un sonicador de punta, es decir se emplean ondas de alta frecuencia que sirve para fragmentar la pared celular (ver Figura III.1)



Figura III.1. Sonicador de punta actuando sobre las células. Sirve para fragmentar la pared celular [47].

Después se le agregó Tween triton 100x. Es un detergente suave para terminar de disolver la pared celular, que no se pudo romper por completo con el sonicador de punta. (ver Figura III.2).

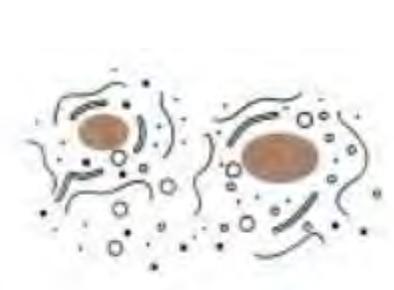


Figura III.2. Detergente actuando sobre la membrana de las células. Sirve para generar orificios a la pared celular [47].

Inmediatamente después, se centrifugaron las muestras por 30 min, a 15000 rpm, 4°C. El sobrenadante (donde encontramos la proteína de interés) se almacenó con 50% glicerol a -20°C. Antes de almacenarlo, se tomó una alícuota de 1 mL para saber si la proteína estaba presente en nuestras muestras por medio de la técnica de electroforesis.

III.1.2 Verificación de la presencia de proteínas por electroforesis

Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución que contiene moléculas proteicas, éstas migran en una dirección del ánodo y con una velocidad que refleja su tamaño y su carga neta. Esto constituye la base de la técnica denominada electroforesis.

III.1.2.1 Técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida

Nosotros empleamos la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). En esta técnica las cadenas polipeptídicas forman un complejo con moléculas cargadas negativamente de dodecil sulfato sódico (SDS) y migran por lo tanto como complejos proteínas-SDS cargados negativamente a través de un gel poroso de poliacrilamida. El aparato utilizado para esta técnica se muestra en la figura III.3. Generalmente se agrega un agente reductor (mercaptoetanol) para romper cualquier unión $-S-S-$ (enlaces sulfuro – sulfuro) en las proteínas o entre éstas. Las proteínas migran a una velocidad que refleja su peso molecular (ver Figura III.4) [46].

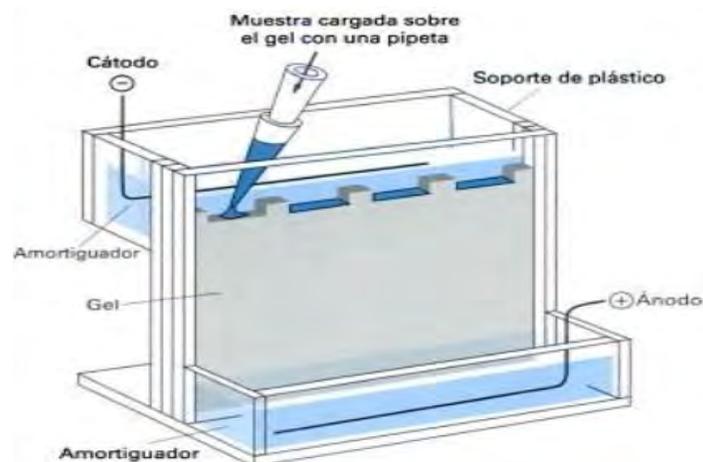


Figura III.3. Esquema del equipo para la técnica de electroforesis de poliacrilamida.

En el esquema se muestra como una muestra está siendo colocada en cada canal del gel de poliacrilamida [47].

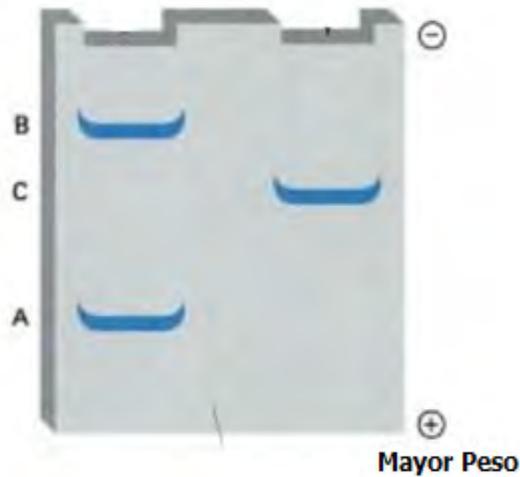


Figura III.4. Bloque de gel de poliacrilamida. Se observa la migración de las proteínas [47].

III.II. Polimerización de microtúbulos *in-vitro*

Como se sabe, las unidades de α y β tubulina son indispensables para la polimerización de los microtúbulos. Nosotros tenemos la tubulina resuspendida en un buffer general de tubulina en alícuotas de 5 μ l guardadas a -80°C . (el stock de tubulina es marca cytoskeleton, número de catálogo TL238)

A continuación se explica el protocolo que se siguió:

- 1) La alícuota de α y β tubulina se sacó de -80°C , para dejarla reposar en hielo por 30 min, esto con la finalidad de que el cambio en temperaturas no sea abrupto.
- 2) En un vial se agregó 15.2 μ l PEM/GTP (15.4 μ l PEM 80 y 2.0 μ l 10 mM GTP) y 2.2 μ l de DMSO, se agitó por medio de un vortex para tener una solución homogénea. Transcurridos los 30 min se tomó 4.8 μ l de tubulina para agregarlos a la solución anterior.

- 3) La solución anterior se incubó por 30 min a 37°C.
- 4) Al finalizar los 30 min se le agregó 2 µl de buffer estabilizador (PEM 80, 10 mM GTP, NaN₃, 10 mM Taxol y DMSO).

Los microtúbulos se almacenan a temperatura ambiente y son estables durante un mes.

III.III. Recubrimiento de las esferas de poliestireno con el anticuerpo penta-histidina

Las esferas de poliestireno (que se utilizan en los ensayos de motilidad que se describirá posteriormente) se recubren con penta-histidina que es un anticuerpo que reconoce a la etiqueta de histidinas presente en la cinesina. La razón de usar el penta-histidina es que este anticuerpo a su vez esta conjugado con un compuesto llamado biotina, el cual es muy afin a la estreptavidina y estos dos compuestos se pueden unir (la estreptavidina y la biotina) y a su vez cuando este anticuerpo se encuentra con la cinesina que tiene la etiqueta de 6 histidinas la puede reconocer. Por lo tanto, con este proceso se puede adherir la cinesina a la esfera.

A continuación se explica el protocolo que se siguió:

- 1) Se realizó una dilución de esferas 1:100 en 100 µl. Agregamos 10 µl de esferas del stock provisto por el fabricante (diámetro 540nm de la marca Spherotech Inc. Recubiertas con estreptavidina) a 70 µl de PEMBSA (PEM 80 y BSA), se sonicaron por 15 min, con la finalidad de tener las esferas bien dispersas en la solución. Después se agregan 20 µl del anticuerpo penta-histidina (marca Qiagen).
- 2) Esta dilución se dejó rotando a temperatura ambiente por 1 hora.
- 3) Transcurrida la hora se realizaron 5 lavados, cada lavado consistió en:

- Centrifugar la muestra a 9000 rpm por 1 min.
- Quitar sobrenadante y quedarnos con el pellet.
- La cantidad que se le retiró de sobrenadante es la misma cantidad que se le adicionará de PEMBSA.
- Emplear el vortex para deshacer el pellet.
- Cambiar toda la muestra a un nuevo vial y repetir el procedimiento.

Al finalizar los lavados, el vial de las esferas se almacenó en un rotor a 4°C.

III.IV. Incubación de esferas recubiertas con anticuerpo con cinesina

Como ya se mencionó anteriormente, el anticuerpo unido a la esfera hace posible que la cinesina se pueda adherir a la esfera.

A continuación se explica el procedimiento que se siguió para adherir las cinesinas a la esfera.

Se preparó 1ml de buffer de ensayo (BSA 40 mg/ml, PEM 80, acetato de potasio 3 M, ATP 100 mM, Taxol 10 mM, DTT 0.5 M)

Se realizó una dilución de esferas 2:300 en 300 µl volumen final (2 µl esferas y 298 µl buffer de ensayo), la cual se sonicó por 15 min en presencia de hielo.

Se realizaron diluciones seriadas de la proteína con el buffer de ensayo para variar el número de cinesinas por esfera (ver Figura III.5).

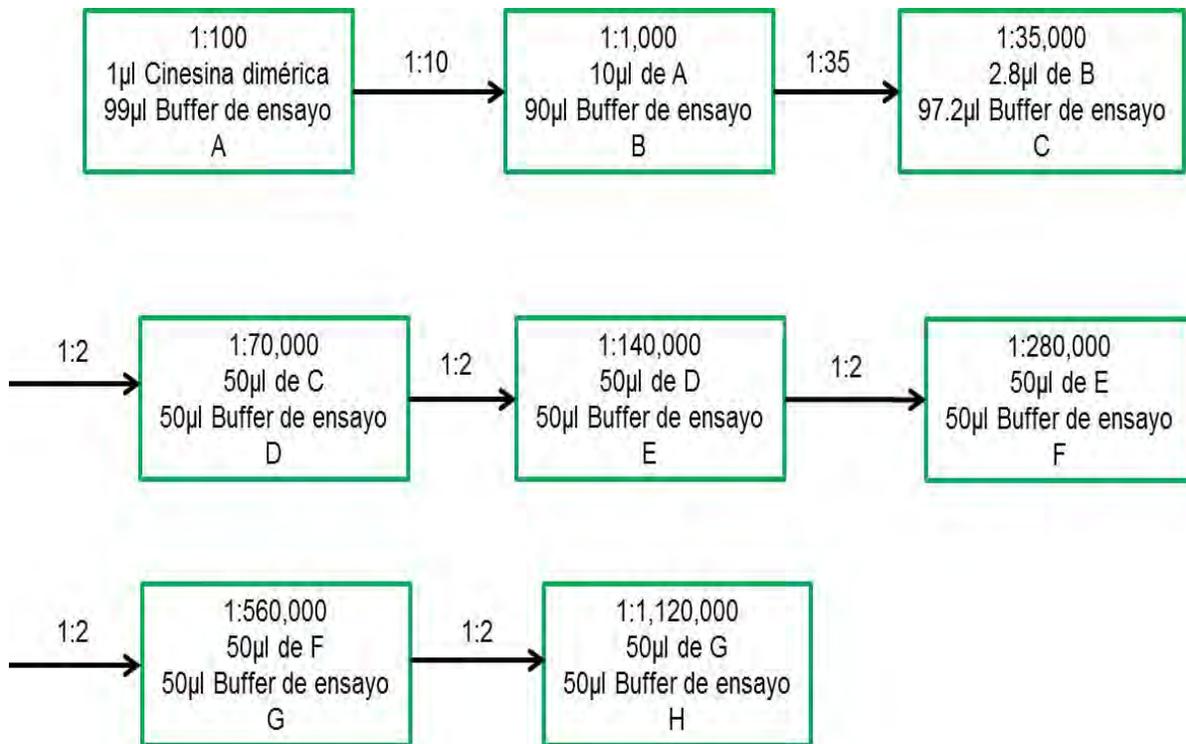


Figura III.5. Esquema que indica el procedimiento de las diluciones seriadas. En la parte superior del rectángulo se encuentra la dilución final de cada muestra, después se indica la cantidad que se agregó de cada solución y finalmente la letra que le corresponde a cada muestra. En la parte superior de las flechas se indican las diluciones que se iban realizando.

Después de obtener las diluciones seriadas y las esferas bien sonicadas, se realizó una dilución final 1:2 esferas-cinesinas (ver Tabla III.1).

Muestra	Volumen	Muestra	Volumen	Dilución final de cinesinas
1		2		
C	40µL	Esferas	40µL	1:70,000
D	40µL	Esferas	40µL	1:140,000
E	40µL	Esferas	40µL	1:280,000
F	40µL	Esferas	40µL	1:560,000
G	40µL	Esferas	40µL	1:1,120,000
H	40µL	Esferas	40µL	1:2,240,000

Tabla III.1. Diluciones de cinesina y esferas.

Las muestras obtenidas se dejan incubando por 12hrs a 4°C en un rotor, para después ser utilizadas inmediatamente en los ensayos de motilidad.

III.V. Ensayos *in-vitro* empleando pinzas ópticas

Las pinzas ópticas fueron nuestra principal herramienta para la realización de la presente tesis. En primer lugar, nos sirvió para comprobar que la proteína motora kinesina se expresó correctamente. En segundo lugar, se empleó para medir la fuerza que ejerce una kinesina vs varias kinesinas y el tiempo que permanece una kinesina vs varias kinesinas sobre el microtúbulo. En tercer lugar, es útil para poder observar si los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído aún son funcionales, es decir si la kinesina sigue desplazándose sobre los microtúbulos sin problema. A continuación hablaremos sobre la pinza óptica.

III.V.1. Pinzas ópticas

Una pinza óptica consiste en un láser enfocado (por medio de la lente objetivo de un microscopio óptico) que atrapa en 3 dimensiones a una partícula (de un material dieléctrico) cuyo tamaño puede ser desde unas cuantas micras hasta decenas de nanómetros.

La partícula queda atrapada porque experimenta una fuerza restitutiva que apunta en la dirección donde la intensidad de la luz es mayor, similar a la fuerza que experimenta una masa unida a un resorte. Por lo tanto, podemos emplear la ley de Hook ($F=-kx$, donde F es la fuerza, k es la constante del resorte y x es el desplazamiento). Al igual que en un resorte la fuerza que ejerce la luz sobre una esfera es proporcional al desplazamiento de la esfera (x ; y ; z) respecto a su posición de equilibrio (x_0 ; y_0 ; z_0). Para nuestro sistema de pinzas ópticas la ley de Hook solo se cumple si están presentes las siguientes tres condiciones: 1) Tener

un haz gaussiano, 2) Que el objeto que atrapemos sea una esfera, 3) Que los desplazamientos (x) sean pequeños de 0 a 150 nm (ver Figura III.6.) [32].

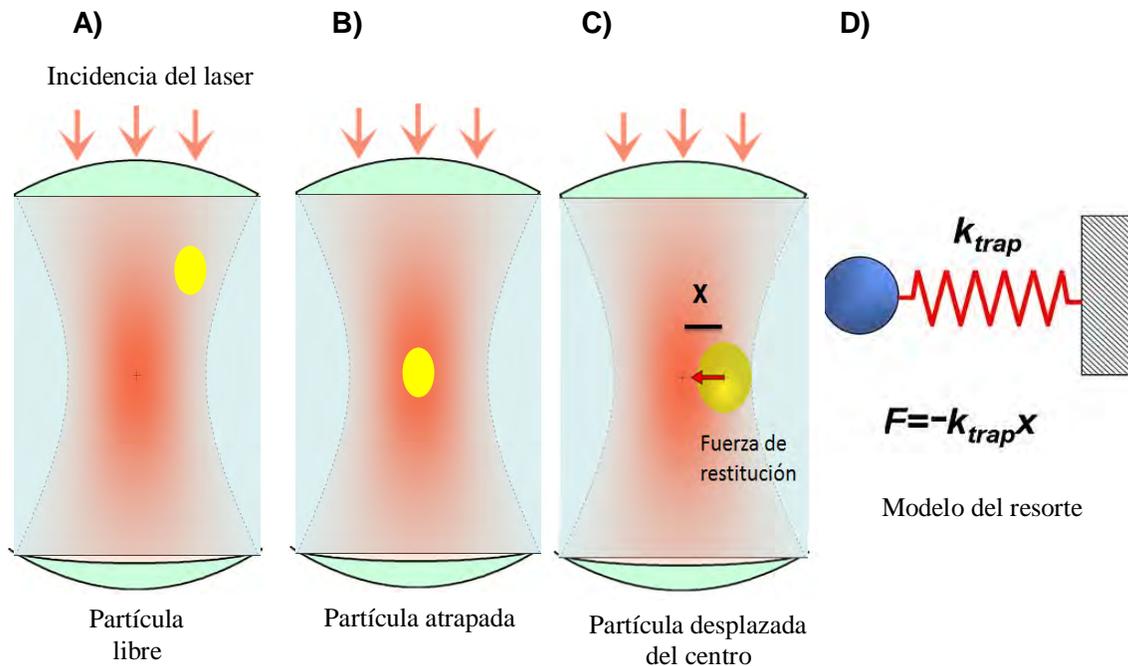


Figura III.6. Esquema de como el láser atrapa una esfera en solución. A) Representa la esfera libre en solución. B) Representa la esfera atrapada en el centro del láser. C) Representa un desplazamiento de la esfera hacia la derecha y que esta a su vez está sintiendo la fuerza de restitución del láser a la posición de equilibrio. D) Modelo del resorte.

III.V.1.1. Ventajas

Las pinzas ópticas permiten medir desplazamientos de nanómetros y manipular objetos micrométricos y nanométricos, ejerciendo en ellos fuerzas del orden de hasta decenas de pN.

En el mundo macroscópico estas fuerzas son despreciables, no así para una macromolécula, organelo o célula. Estas fuerzas son suficientes para detener el avance de un espermatozoide, el transporte de vesículas dentro de una célula o para

estirar macromoléculas como el ADN (Ácido desoxirribonucleico) o el ARN (Ácido ribonucleico).

La pinza óptica es una herramienta versátil, utilizada en el estudio de las partículas coloidales, polímeros, interacciones moleculares, proteínas motoras, células vivas [48]. Se ha logrado estirar la membrana celular de una planta [49] y hasta manipulado cromosomas.

Las pinzas ópticas también pueden ser utilizadas in vitro. Empleándolas como transductores de fuerza se ha logrado medir la fuerza producida por algunos motores moleculares, como la kinesina que transporta vesículas a lo largo del citoesqueleto [33].

III.V.1.2. Elementos básicos que constituyen una pinza óptica

La pinza óptica cuenta con los siguientes elementos básicos: Se necesita de un láser y un sistema de lentes capaces de enfocar el láser en una región lo más pequeña posible (del orden de 500 nm de diámetro). Estos tamaños tan pequeños de la mancha del láser pueden obtenerse con un objetivo de microscopio de gran apertura numérica (NA=1.3 en nuestro experimento).

El condensador es el otro elemento del microscopio invertido que cumple la función de coleccionar toda la luz del láser que atraviesa la muestra para después enviarla a un sistema de detección de la posición de la esfera (x; y; z) que en este caso es un fotodetector de posición (FDP). Por último, tenemos una cámara CCD que nos ayuda a capturar las imágenes de microscopía de campo claro o convencional (ver Figura III.7.) [32].

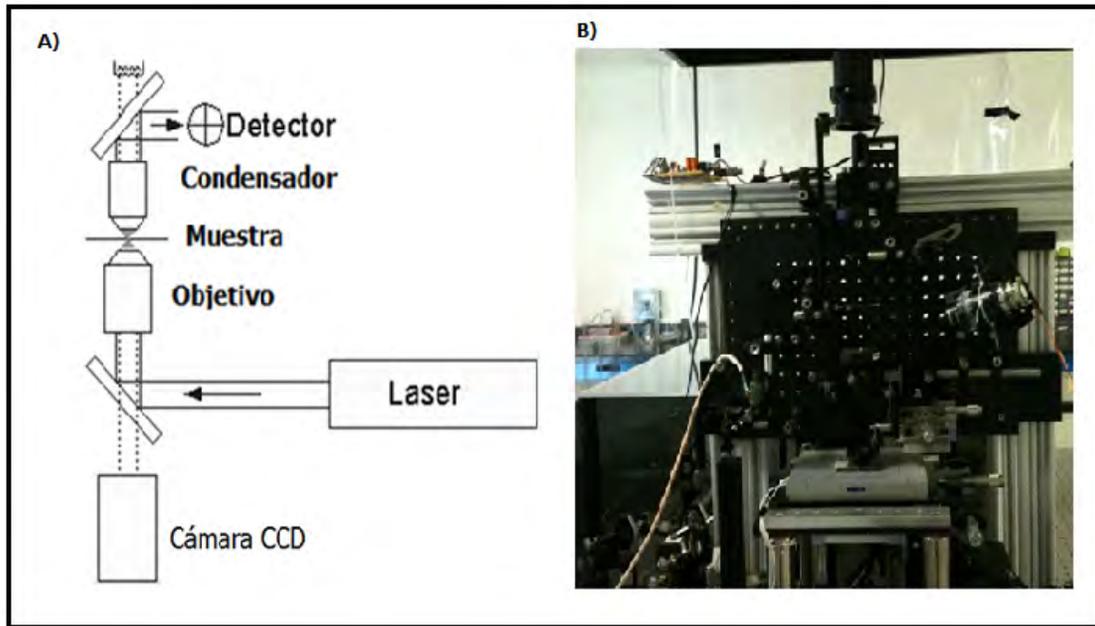


Figura III.7. Elementos básicos que constituyen una pinza óptica. A) Representan los componentes básicos de una pinza óptica, B) Es la fotografía del equipo de pinzas ópticas ubicado en el IPICYT (Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica).

III.V.1.4. Calibración de la Pinza óptica

La pinza óptica nos reporta desplazamientos y fuerzas, pero los datos que este equipo nos proporciona originalmente se encuentran en unidades de volts. Para poder obtener datos de distancia en nanómetros empleamos un procedimiento de calibración ya estandarizado para nuestro microscopio. La calibración nos proporciona dos constantes que nos sirven para convertir la señal original de desplazamiento de volts a nanómetros y también para determinar la constante efectiva del resorte (k).

Para mayor detalle acerca del procedimiento de la calibración ver la tesis de maestría “Construcción y caracterización de una pinza óptica para el estudio de moléculas individuales” [32].

III.V.3. Preparación de la muestras a analizar para los ensayos *in-vitro* con la cinesina dimérica y microtúbulos

Para realizar los ensayos *in-vitro* con la cinesina y los microtúbulos, el primer paso es fijarlos microtúbulos a una superficie. Después, se añaden las esferas de poliestireno decoradas con cinesinas y con la ayuda de las pinzas ópticas son posicionadas sobre un microtúbulo para que comiencen a desplazarse. A continuación se describen los pasos de manera detallada.

III.V.3.1. Modificación de la superficie del cubre objeto

Para limpiar la superficie del vidrio del cubre-objeto y porta-objeto con los cuales será preparada la muestra se realizó lo siguiente:

Se colocaron los cubre-objetos (Corning, no. 2940-224) en un soporte cerámico, para poder introducirse a un equipo Plasma Cleaner, el cual trabajó a una presión de 1 Torr con radio frecuencia. Los cubre-objetos y porta objetos se dejaron por 5 minutos, después de este tiempo se apaga el equipo para dejarlo que se ventile la cámara donde se encuentran los cubre objetos.

Para funcionalizar los cubre objetos limpios, se pasaron los mismos a un soporte de teflón para sumergirlos en una solución de etanol- APTES ((3-aminopropil)triétoxissilano Sigma Aldrich) (1:50), por una hora.

Transcurrida la hora se secan a 110°C.

Una vez secos se guardaron en una caja para evitar que se llenen de polvo.

III.V.3.2. Construcción del canal para poder observar las muestras con el equipo de microscopía óptica-pinzas ópticas

Este canal se construye con un porta objetos y un cubre objetos de la siguiente manera.

-Al cubre objetos se lo coloca dos trozos de cinta doble cara para formar un canal justo en medio

-El cubre objetos que previamente ha sido modificado en su superficie se adhiere a la cinta doble cara para cubrir el canal que se formó (ver Figura III.8).

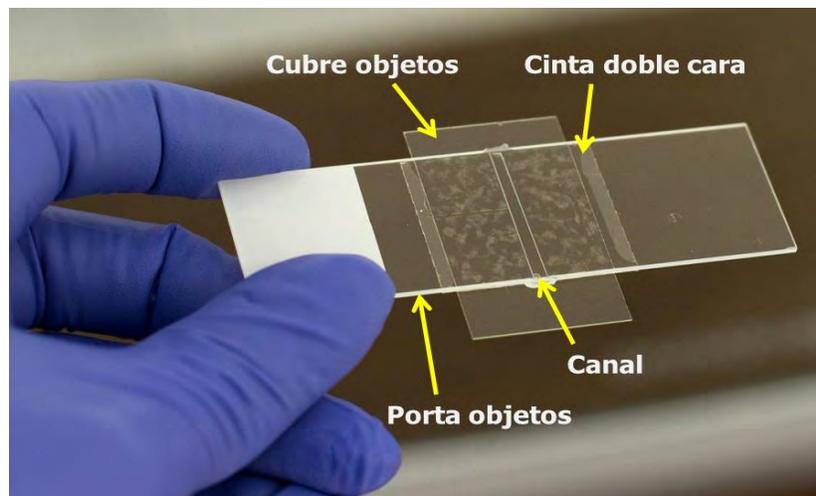


Figura III.8. Diseño del canal para realizar los ensayos *in-vitro* con la cinesina.

III.V.3.3. Preparación de la muestra con microtúbulos y cinesinas

Una vez que se tuvo el canal se fluyeron 10 μ l de glutaraldehído al 8% v/v (Sigma Aldrich), esperando 30 min.

Después se lava con 200 μ l de PENTAX (PEM 80 y taxol 10 mM) y se fluyen 30 μ l de microtúbulos (diluidos en PENTAX 1:100) esperamos 10 min, para volver a lavar 100 μ l PENTAX y fluir 70 μ l de buffer de ensayo. Esperamos 5 min y por último lavamos con 30 μ l de buffer de ensayo para después fluir 20 μ l de esferas-cinesina.

Una vez que se terminó de fluir todo lo necesario, se procedió a sellar el canal con valap (el valap es una mezcla de vaselina, parafina y lanolina en partes iguales).

III.V.3.4. Uso de la pinza óptica para realizar el ensayo *in-vitro*

III.V.3.4.1. Ensayo *in-vitro* con la cinesina dimérica

La finalidad de este ensayo-*in-vitro* es verificar que nuestra proteína motora cinesina es funcional.

Una vez sellada, la muestra se coloca en la platina del microscopio de la pinza óptica.

Lo primero que se realizó es la visualización de los microtúbulos ya que sin ellos no podemos trabajar. Una vez que se ha verificado la presencia de microtúbulos, después atrapamos una esfera-cinesina (ver Figura III.9), y con ayuda del láser la colocamos lo más cercano posible a la superficie del microtúbulo y esperamos a que comience a caminar la cinesina para poder guardar las mediciones de desplazamientos (ver Figura III.10).

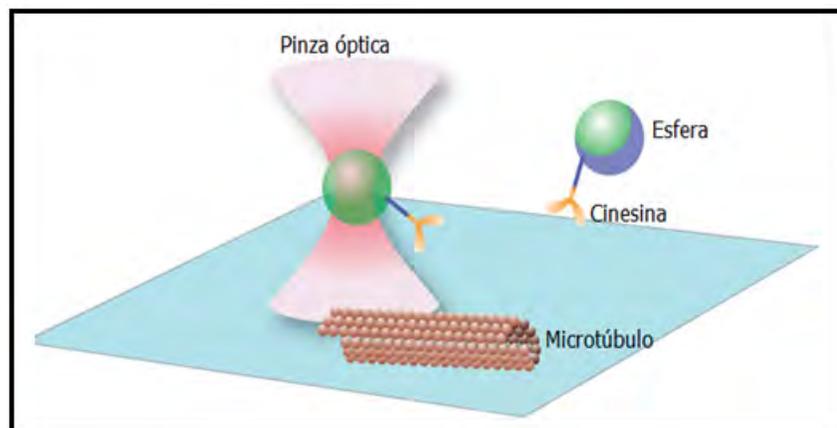


Figura III.9. Esquema de cómo el láser atrapa una esfera en solución. En el dibujo se puede observar como con la ayuda del láser la esfera es atrapada. Después se coloca la esfera lo más cercana al microtúbulo para que la cinesina interactúe con él.

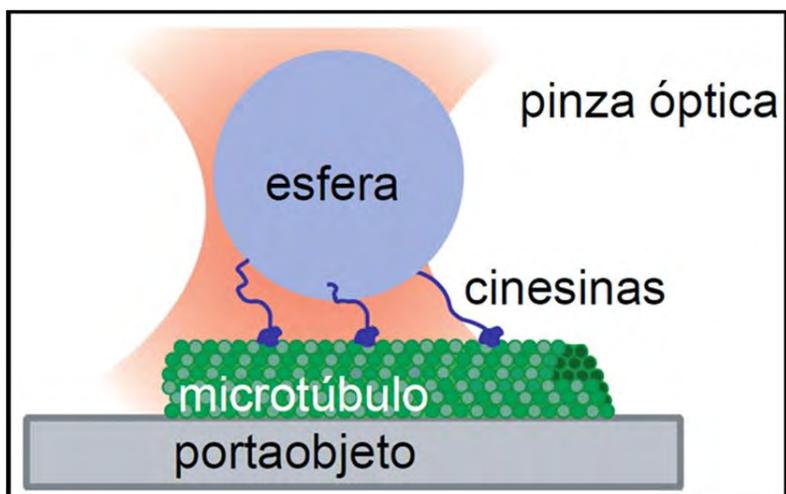


Figura III.10. Esquema de varias cinesinas adheridas al microtúbulo. Se muestra como las cinesinas comienzan a desplazarse sobre el microtúbulo.

III.V.3. Ensayo *in-vitro* con la cinesina dimérica empleando microtúbulos frescos

La finalidad de este ensayo *in-vitro* es obtener datos de la fuerza máxima que soporta una cinesina vs la fuerza máxima que soportan varias cinesinas actuando sobre la misma esfera. Otro punto interesante de este ensayo es medir el tiempo que dura una cinesina vs varias cinesinas desplazándose sobre el microtúbulo antes de que se desprendan de éste.

Se realizaron varias diluciones de cinesinas como ya se mencionó anteriormente, de cada dilución se tomaron 15 esferas y se anotó si se desplazaban o si no se desplazaban sobre el microtúbulo. Y después con estos datos obtener la probabilidad de cuántas cinesinas tenemos por esfera.

El procedimiento de cómo se emplea la pinza óptica es el mismo que en la sección anterior.

III.V.4. Ensayo *in-vitro* de la cinesina dimérica empleando microtúbulos de varias semanas estabilizados con glutaraldehído

En primer lugar, tenemos que preparar las muestras que contengan microtúbulos fijos sobre la superficie de un canal. Se van a preparar dos muestras diferentes: una muestra va a contener taxol y la otra no lo va a contener. Sin embargo, algo que es común a ambas preparaciones es que los microtúbulos están fijado a la superficie del cubre objetos por medio del glutaraldehído. Las soluciones que se van a fluir a cada muestra están en la tabla III.2. Primero fluimos 20 μ l de glutaraldehído esperamos 30 minutos lavamos con 100 μ l de PENTAX o PEM80 según sea el caso inmediatamente fluimos 15 μ l de microtúbulos esperamos 10 minutos y después lavamos con 30 μ l PENTAX o PEM80 según sea el caso e inmediatamente se fluyen 30 μ l de buffer de ensayo y finalmente la muestra se coloca en la cámara de humedad.

Muestra con taxol	Muestra sin taxol
Glutaraldehído (8% v/v)	Glutaraldehído (8% v/v)
PENTAX (Pem80, taxol 10 mM)	PEM80
Microtúbulos 1:100 en PENTAX	Microtúbulos 1:100 en PEM80
PENTAX	PEM80
Buffer de ensayo <u>con taxol</u>	Buffer de ensayo <u>sin taxol</u>

Tabla III.2. Preparación de muestras con microtúbulos.

Se prepararon dos muestras para cada condición descrita en la tabla III.2 cada tercer día durante dos meses y medio. Las muestras se almacenaron en una cámara de humedad para que no se secan (ver Figura III.11).



Figura III.11. Cámara de humedad para poder conservar los microtúbulos. La muestra está colocada sobre un soporte dentro de una caja petri la cual contiene agua milli Q (agua ultrapura).

Transcurridas varias semanas después de la preparación de las muestras, el día del ensayo se lavó la muestra con 2ml de PEM80 y se fluyeron las esferas con cinesinas.

Lo primero que se realizó fue tomar una imagen de los microtúbulos estabilizados con glutaraldeído para verificar que aún no se habían depolimerizado.

Al igual que en la sección anterior, se empleó la pinza óptica para atrapar una esfera y posicionarla en un microtúbulo y esperar a que comenzara a desplazarse sobre él para guardar los datos de desplazamiento como función del tiempo.

III.V.5. Observación de la depolimerización de los microtúbulos sobre vidrios recubiertos con poli-L-lisina

El motivo de observar cómo se depolimerizan los microtúbulos (que fueron estabilizados empleando únicamente taxol) conforme avanza el tiempo es para tener un dato de referencia y poder compararlo con los datos que obtendremos cuando los microtúbulos estén estabilizados con glutaraldehído.

Los vidrios se limpian como ya se explicó en la sección anterior, utilizando un plasma cleaner. Inmediatamente después de ser sacados de la cámara del plasma cleaner, son colocados en una solución de poli-L-lisina por 15 min (300 ml de etanol y 6 μ l de poli-L-lisina) y después se secan con la ayuda de unos mecheros de alcohol que son colocados alrededor del recipiente que contiene los vidrios.

Cuando los vidrios ya se encuentran secos se procede a formar un canal como ya se explicó en la sección anterior. Una vez formado el canal se fluyen 15 μ l de microtúbulos (dilución 1:100, 1 μ l de microtúbulos y 99 de PEMTAX), se dejan por 15 minutos en una cámara de humedad, después de este tiempo se fluyen 30 μ l de PEMTAX y finalmente se sella el canal.

La muestra sellada se coloca en la platina del microscopio de campo claro que tiene la pinza óptica. En la muestra se busca un área donde podamos observar por completo un microtúbulo y cada 20 min se toma una imagen, hasta que el microtúbulo se haya depolimerizado.

CAPÍTULO IV
Resultados y discusión.

CAPÍTULO IV

Resultados y discusión

Este Capítulo está enfocado en presentar los resultados obtenidos y la discusión para los tres experimentos principales que son: 1) Medir el tiempo de depolimerización de los microtúbulos empleando como estabilizante el taxol, 2) Medir la fuerza que puede soportar una kinesina vs la fuerza que pueden soportar varias kinesinas y medir el tiempo que permanece una kinesina sobre el microtúbulo vs el tiempo que permanecen varias kinesinas sobre el microtúbulo. 3) Medir el tiempo de depolimerización de los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído después de varias semanas y verificar que aún son funcionales para que la kinesina se desplace sobre ellos.

IV.I. Verificación de la presencia de la proteína motora kinesina por medio de la técnica de electroforesis

Como se mencionó en el Capítulo 3, la expresión de la kinesina es necesaria para poder realizar los ensayos *in-vitro*, es decir la kinesina tiene que ser funcional y caminar a lo largo de los microtúbulos.

Para poder comprobar que la kinesina se expresó correctamente, empleamos la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, el cual es un método utilizado para caracterizar proteínas, que permite separar moléculas cargadas. Cuando las proteínas se someten a la acción de un campo eléctrico migran de acuerdo a su peso.

La figura IV.1 muestra los geles de poliacrilamida obtenidos por la técnica de electroforesis. Se puede observar la expresión de las kinesinas monomérica y dimerica. En la columna BB2 No Inducido de la figura IV.1A), podemos observar

que no tenemos bandas tan resaltadas en el peso molecular esperado de 39.2 kDa ($1\text{Da}=1.6\times 10^{-27}\text{kg}$) (para ubicar el peso molecular se utiliza un marcador que contiene proteínas de peso previamente conocido), esto es conforme a lo esperado ya que la proteína de nuestro interés aún no se encuentra presente en la célula. En las columnas de BB2 Inducido y HH1 Inducido aparece una banda ~39.2 kDa que nos indica que nuestra cinesina monomérica está presente, este resultado nos indica que la célula produjo nuestra proteína de interés. También es posible visualizar esta banda ~39.2 kDa en la columna de extracto total, indicando que nuestra proteína de interés está presente en solución después del paso de centrifugación.

En la figura IV.1B) la columna de No inducido no se observa ninguna banda remarcada a ~46kDa (peso de una de las cadenas de la cinesina dimérica) este resultado es correcto ya que nuestra proteína de interés aun no la produce la célula. En la columna de Inducido aparece una banda que se encuentra recorrida entre 40 y 45 kDa, esto posiblemente se deba a que la cámara de electroforesis no estaba funcionando de manera adecuada, por tal motivo nosotros atribuimos esta banda a la presencia de la cinesina dimérica ya que se ha reportado que su peso debe de estar ~46kDa. En la columna de extracto total se puede observar la aparición de una banda en ~46kDa, que nos indica que la cinesina dimérica está presente en solución. Esto es bueno ya que de este stock estaremos tomando las alícuotas para realizar los ensayos *in-vitro* en la pinza óptica.

El peso molecular para ambas cinesinas está establecido en la literatura [50].

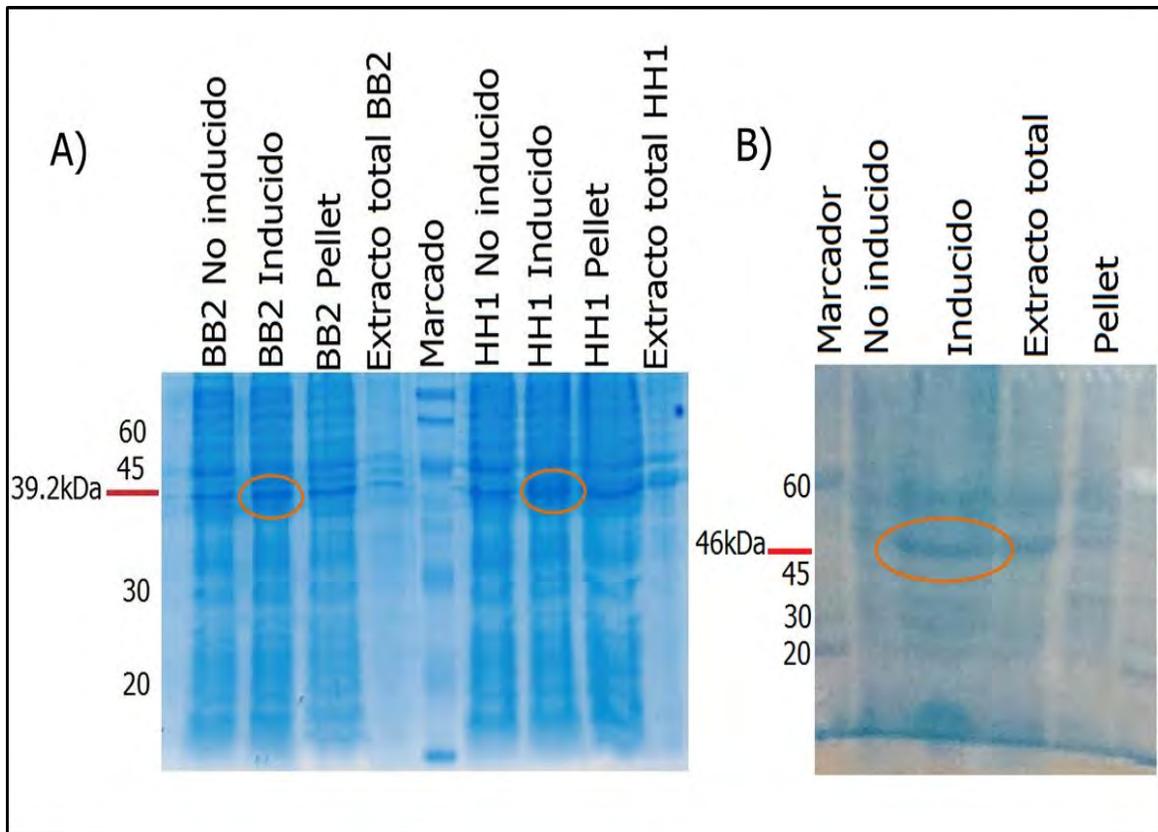


Figura IV.1. Geles de poliacrilamida. A) cinesina monomérica y B) cinesina dimérica. El peso molecular de cada cinesina se encuentra señalado con una línea roja en su respectivo gel, la elipse anaranjada indica la banda de inducción de la proteína cinesina.

Como ya se mencionó en el capítulo 3, sólo se trabajó con la cinesina dimérica.

IV.II. Estabilidad de los microtúbulos

IV.II.1. Microtúbulos estabilizados con taxol y fijados en vidrios recubiertos con poli-L-lisina

Este experimento se realizó con la finalidad de medir el tiempo que tardan en depolimerizarse los microtúbulos estabilizados con taxol y fijados a una superficie de vidrio por medio de poli-L-lisina.

Las imágenes se tomaron con el microscopio de campo claro adaptado a la pinza óptica. A las imágenes obtenidas se les realizó un procesamiento digital con el programa ImageJ en donde se ajustó el contraste de las imágenes de los microtúbulos para aumentar la visibilidad.

La figura IV.2 muestra imágenes de un microtúbulo a medida de que se depolimeriza. Este microtúbulo fue fijado con poli-L-lisina sobre la superficie de un cubre objeto. Las flechas amarillas denotan el inicio y el final del microtúbulo que se estará observando al transcurrir del tiempo. Estas flechas nos servirán de referencia para poder observar la disminución en la longitud del microtúbulo. En A) el microtúbulo a $t=0$ min se encuentra en su longitud inicial, en B) han transcurrido un $t=42$ min y la depolimerización parece ser muy lenta ya que visualmente no se alcanza a ver un cambio en la longitud. En C) a un $t=71$ min se comienza a ver la depolimerización del lado derecho del microtúbulo (la parte depolimerizada se encuentra señalado con una línea verde), en D) a un $t=104$ min la depolimerización es más notoria ya que en ambos lados del microtúbulo se observa el acortamiento así como en una parte cercana al extremo derecho del microtúbulo, en E) a un $t=122$ min la depolimerización está causando que el microtúbulo se fragmente en varias posiciones, en F) a un $t=179$ min se puede observar otra fragmentación del microtúbulo justo del lado izquierdo. A un $t=190$ min (G) el microtúbulo casi se ha depolimerizado por completo (con una línea roja se denota la fracción de microtúbulo que aún se puede visualizar). Finalmente en H) a un $t=215$ min el microtúbulo se fragmenta en varias secciones y la depolimerización del microtúbulo está llegando a su punto final. Estos resultados son los que nosotros esperábamos observar al transcurrir el tiempo ya que investigaciones sobre el tiempo de depolimerización del microtúbulo indican que solo son estables con taxol por unas cuantas horas.

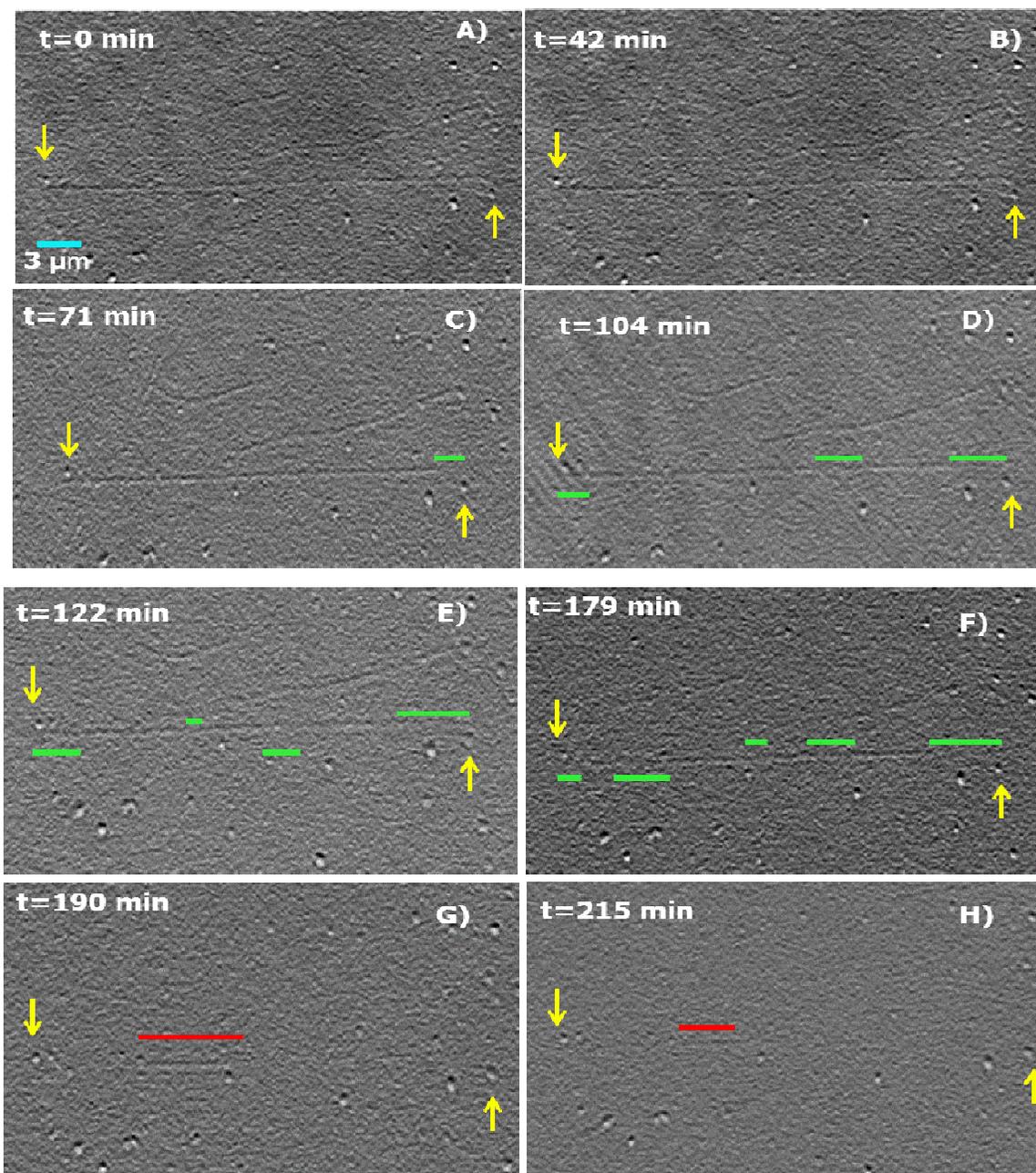


Figura IV.2. Depolimerización de un microtúbulo estabilizado con taxol y fijado sobre una superficie de vidrio con poli-L-lisina. En las imágenes se puede observar como al transcurrir el tiempo el microtúbulo se comenzó a depolimerizar. Las flechas amarillas en cada imagen denotan el inicio y el final del microtúbulo lo cual sirve de referencia para ver cómo avanza la depolimerización al transcurrir el tiempo. Las líneas verdes indican en lugar y donde ocurrió la depolimerización. Finalmente las líneas rojas indican lo que quedo del microtúbulo después de 190 y 215 min. Para todas las imágenes la escala es de 3 μm .

Por medio del programa ImageJ se realizó la medición de la longitud del microtúbulo conforme iba transcurriendo el tiempo. Se realizó una gráfica de la longitud del microtúbulos vs el tiempo transcurrido, en la cual se puede observar cómo la longitud del microtúbulo cae drásticamente después de 179 minutos transcurridos, ya que de tener una longitud de 14.6 μm a $t=179$ minutos cuando $t=190$ minutos su longitud es de 5.2 μm (ver Figura IV.3). La longitud inicial del microtúbulo fue de 28.3 μm y después de 215 minutos fue de 3.1 μm .

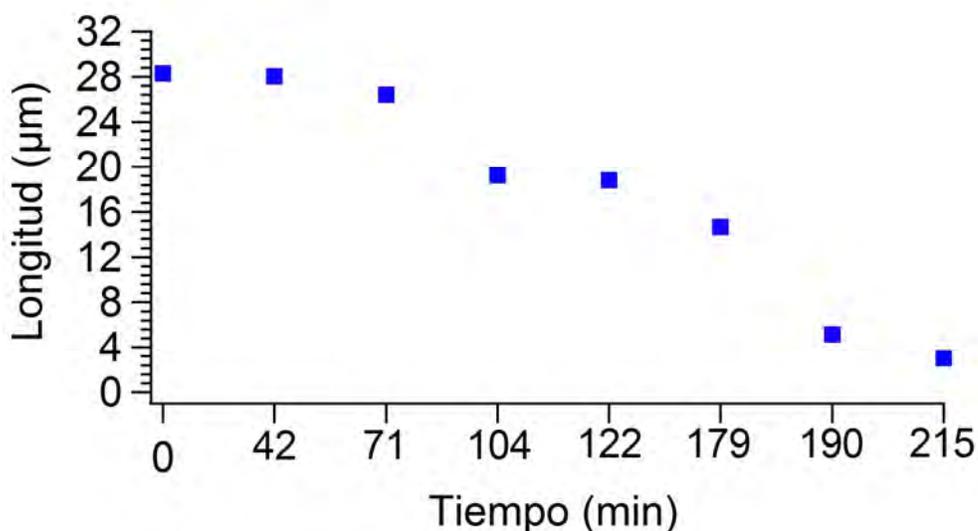


Figura IV.3. Gráfica de longitud (μm) del microtúbulo después de la depolimerizada vs el tiempo (s) transcurrido. La longitud inicial del microtúbulo fue de 28.3 μm y la longitud final fue de 3.1 μm .

Según los resultados obtenidos por las imágenes tomadas en el microscopio adaptado a la pinza óptica el tiempo aproximado de depolimerización de microtúbulos con longitudes típicas ($\sim 10\text{-}30$ μm) empleando como estabilizante al taxol es de 3 horas con 35 min.

Para poder entender las observaciones de la depolimerización de los microtúbulos estabilizados con taxol consideremos lo siguiente. La función de la poli-L-lisina depositada sobre el vidrio cobre objeto de nuestras muestras es que facilita que

los policationes se absorban fuertemente a la superficie sólida del vidrio, dejando sitios catiónicos libres que pueden interactuar con los sitios aniónicos de la superficie de los microtúbulos. Estas interacciones son simplemente electrostáticas [51]. Esta interacción que se genera entre la poli-L-lisina y el microtúbulo no afecta a su dinámica, simplemente nos ayuda a que el microtúbulo esté fijo en la superficie del vidrio.

El uso de Taxol como un agente estabilizante ha ayudado considerablemente a resolver el problema de la depolimerización de los microtúbulos. Sin embargo, aun empleando taxol la solución al problema de la depolimerización se encuentra limitada a unas pocas horas, como se observó en la figura IV.2. Nuestros resultados concuerdan con lo ya antes reportado por algunos autores [26].

¿Cómo se explica la forma en que taxol anula la inestabilidad debido a la presencia del GDP en lugar de GTP en β -tubulina? O en otras palabras ¿Cómo estabiliza el taxol a los microtúbulos? Nogales et al. [52] discuten la posibilidad de que el taxol induce cambios en el loop M de la estructura de un protofilamento, este cambio podría compensar un movimiento en la hélice H3 del protofilamento vecino y H3 podría sentir la pérdida de un γ -fosfato después de la hidrólisis del GTP (ver Figura IV.4) [52]. Y con este cambio conformacional que se da el dímero de tubulina permanecerá recto en lugar de cambiar su conformación a una forma curva. Recordemos que en el Capítulo 2 sección II.1.2 comentamos que después de la hidrólisis del GTP los microtúbulos y las hojas conformadas por protofilamentos se vuelven estructuras inestables, debido a que la conformación preferida para los protofilamentos individuales es curva (forma de frijol) y no recta. Los protofilamentos se doblan hacia el exterior y empiezan a depolimerizarse en forma de anillos y bobinas. Pero el hecho es que aún no se tiene un mecanismo bien definido de como el taxol estabiliza a los microtúbulos.

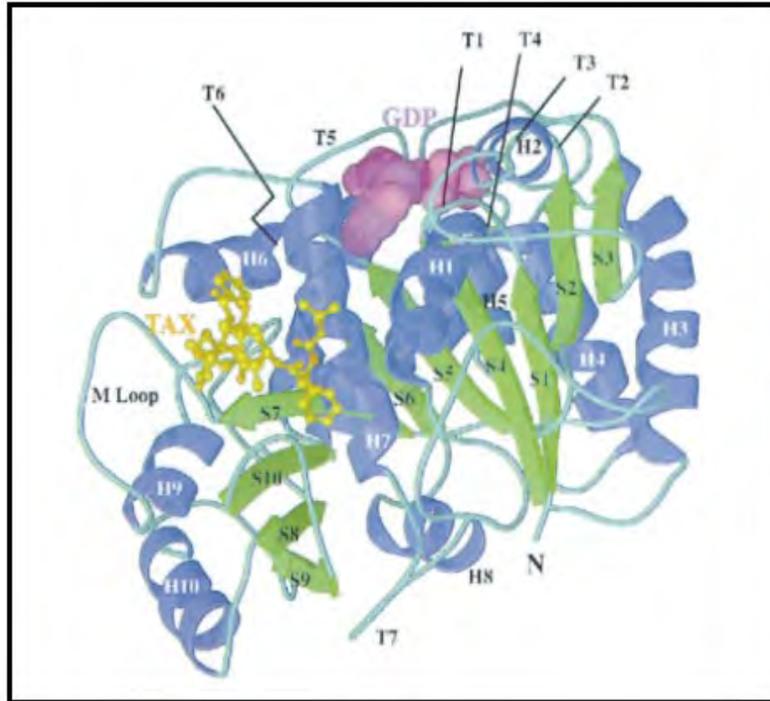


Figura IV.4. Imagen de la estructura cristalina de la β -tubulina. De color amarillo se encuentra el taxol y muy cercano a este sitio de unión del taxol se encuentra el M Loop. De color morado está el GDP [52].

Uno de los objetivos de esta tesis es obtener una mayor estabilidad de los microtúbulos que la que se obtiene con taxol (preservando una estructura funcional para que la cinesina pueda moverse a través de ellos). Para cumplir este objetivo fijamos a una superficie los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído y con taxol. Se espera que con estos dos compuestos estabilizadores de microtúbulos el tiempo de depolimerización sea menor comparado con el obtenido con el uso del taxol.

IV.II.2. Microtúbulos estabilizados con glutaraldehído y fijados sobre una superficie de vidrio recubierta con APTES

Recordemos que en este experimento tendremos dos tipos de muestras 1) microtúbulos estabilizados con glutaraldehído y con taxol (Mt-GA-T) y 2) microtúbulos estabilizados con glutaraldehído sin taxol (Mt-GA).

La figura IV.5 muestra el proceso de depolimerización de muestras que tenían varias semanas de preparadas. A la izquierda tenemos Mt-GA-T y a la derecha Mt-GA. Las imágenes que se presentan en la figura IV.5 fueron tomadas con un microscopio de campo claro adaptado a la pinza óptica. A las imágenes sólo se les realizó un tratamiento digital (ajuste de contraste) empleando el programa de ImageJ.

La figura IV.5A) y la figura IV.5B) son las imágenes tomadas el mismo día que se depositaron los microtúbulos sobre el cubre objetos, en A podemos observar que hay una gran cantidad de microtúbulos comparado con B, mientras que en ambas se perciben microtúbulos de longitudes grandes y pequeñas. La variación en la cantidad de microtúbulos en ambas muestras se puede deber al momento de modificar la superficie del vidrio el APTES no se adhirió completamente a la superficie del vidrio, lo que impide que varios microtúbulos se fijen a la superficie del vidrio.

La figura IV.5C) y la figura IV.5D) son las imágenes de microtúbulos obtenidas después de 20 días de haber sido depositados. En ambas imágenes se aprecia la reducción de concentración de microtúbulos comparado con A y B. En C, la longitud de los microtúbulos que aún están presentes no se ven tan acortados como en D. En la imagen D es un poco más complicado distinguir a los microtúbulos aunque se le haya realizado un tratamiento digital para mejorar su

visualización. El resultado de la imagen de D es el esperado ya que como sabemos esa muestra no contiene taxol y que el taxol no esté presente en los microtúbulos probablemente está haciendo que se depolimericen más rápido comparado con los microtúbulos que contienen taxol.

La figura IV.5E) y la figura IV.5F) son imágenes de microtúbulos tomadas a los 38 días. Se observa cómo los microtúbulos han acortado su longitud a menos de la mitad. En cuanto a la cantidad de microtúbulos en las muestras hay una diferencia entre E y F. En E podemos observar solo 5 microtúbulos bien definidos mientras que en F sólo se ven 2 microtúbulos, lo que indica que el proceso de depolimerización ya está por completarse en ambas muestras. Estas observaciones en las muestras son lo que esperábamos. Esperábamos que con taxol y glutaraldehído los microtúbulos duraran más tiempo y en este caso observamos mayor cantidad de microtúbulos en la muestra con taxol.

La figura IV.5G) y la figura IV.5H) son imágenes a los 51 días, en ambas muestras ya no se encontraron microtúbulos.

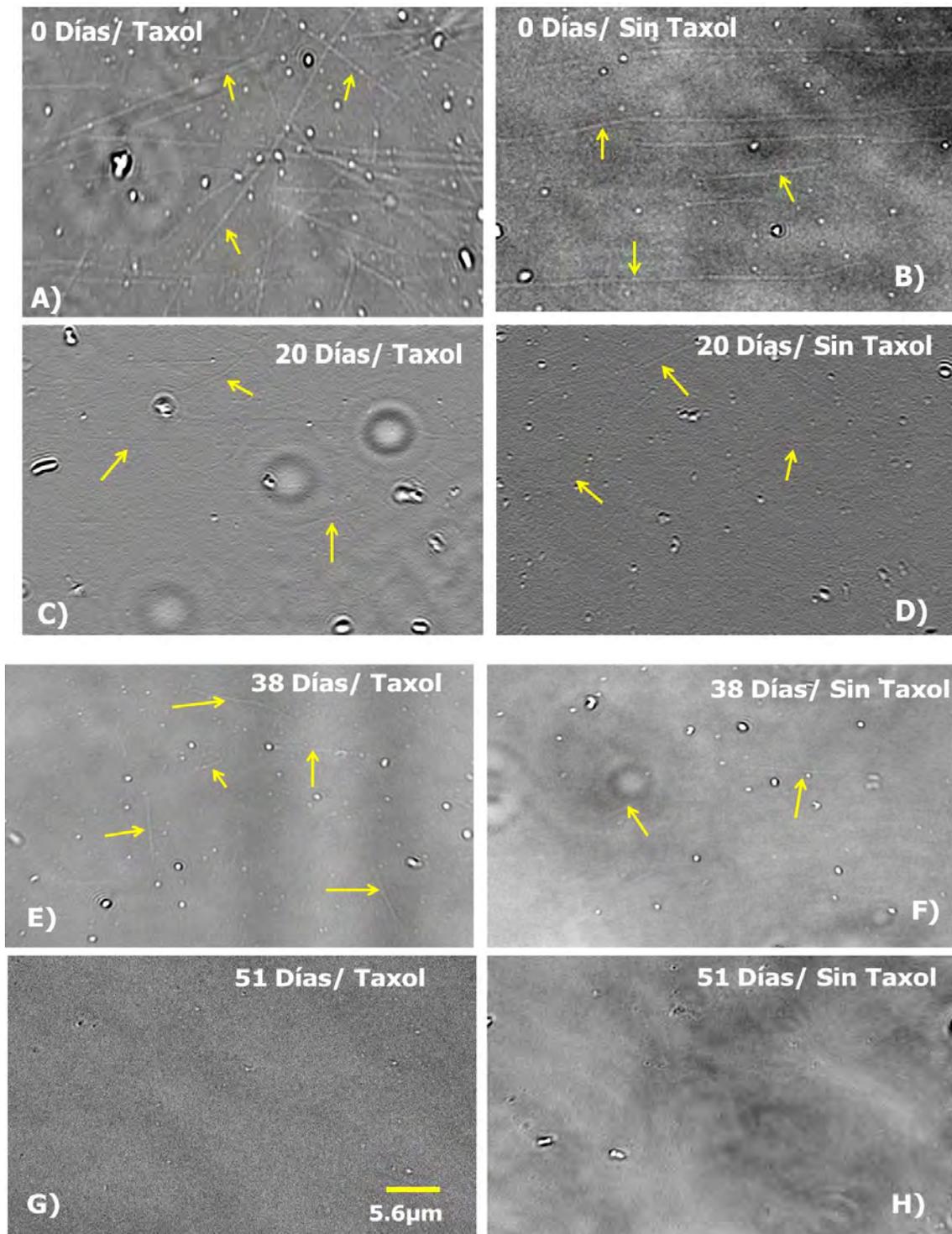


Figura IV.5. Imágenes de la depolimerización de los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído muestras con taxol y sin taxol. Proceso de depolimerización controlado por glutaraldehído- taxol imágenes A, C, E, G y usando solo glutaraldehído imágenes B, D, F, H. Las flechas amarillas se encuentran señalando a los microtúbulos de cada muestra. Para todas las imágenes la escala es de 5.6 μm .

Para comenzar a discutir el cómo actúa el glutaraldehído, primero se hablará de cómo se adhieren los microtúbulos a la superficie del vidrio.

En primer lugar, al colocar 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) lo que ocurre con la superficie del vidrio es un proceso de silanización, el cual se explica a continuación. Como se sabe, el vidrio está constituido por un 70% de SiO_2 el resto del porcentaje es de CaO , Na_2O , K_2O y Al_2O_3 , [53]. El principal compuesto que reacciona con el APTES es el SiO_2 de ahí el nombre de silanización. El APTES tiene grupos etóxido unidos al silicio los cuales se protonan al estar en contacto con la solución de etanol, al protonarse los oxígenos de este grupo, los OH^- del vidrio pueden reaccionar con el silicio del APTES y así formar un enlace covalente entre el vidrio y el APTES (ver Figura IV.6).

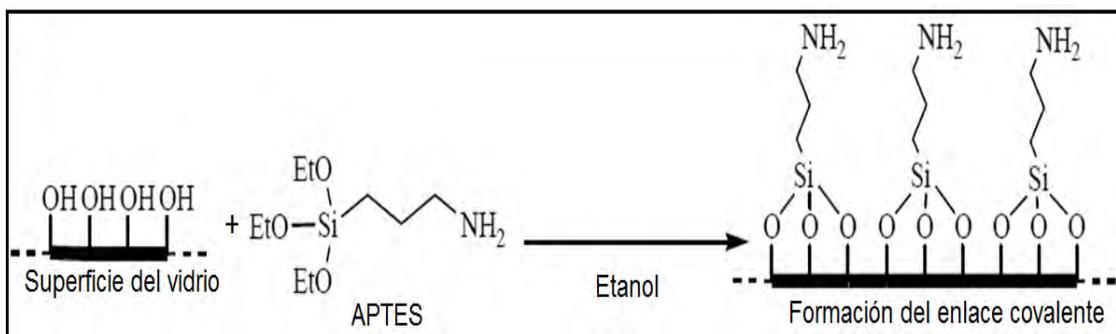


Figura IV.6. Esquema de la reacción del APTES con la superficie del vidrio.

Después de la unión del APTES con el vidrio, se hace reaccionar el grupo amino del APTES con un grupo aldehído del glutaraldehído. Los pares libres del nitrógeno reaccionan con el carbonilo del glutaraldehído y forman un doble enlace entre el carbono del glutaraldehído y el nitrógeno de la proteína a fijar sobre la superficie del vidrio (ver Figura IV.7). Después de este paso se pueden fluir microtúbulos y éstos quedarán fijados y estabilizados por el glutaraldehído a la superficie del vidrio. A continuación se presenta una posible explicación de cómo el glutaraldehído estabiliza a los microtúbulos.

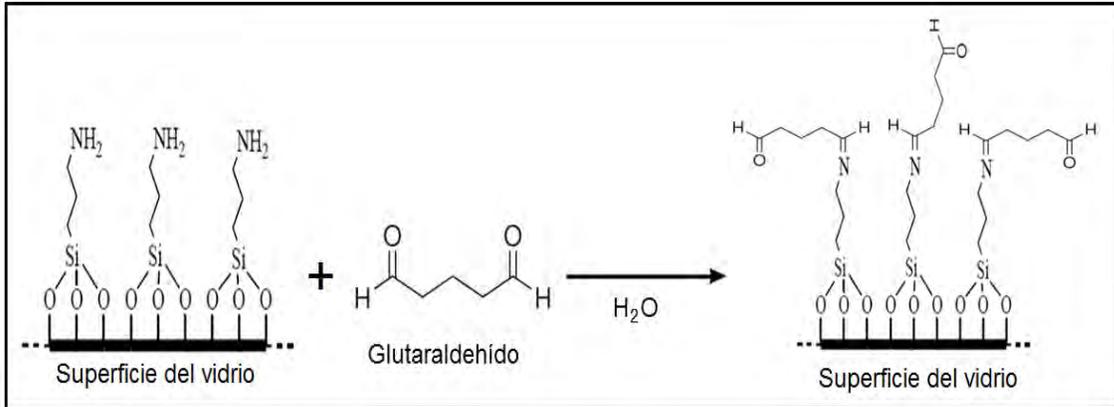


Figura IV.7. Esquema de la reacción del APTES con glutaraldehído.

El glutaraldehído se empleó por primera vez en 1963 por Sabatini, Bensch y Barnett para fijar proteínas y poder observarlas a través de microscopía electrónica, demostrando que la unión glutaraldehído-proteína es muy estable ya que se forma un enlace covalente entre ellos [54]. El mecanismo de unión del glutaraldehído con las proteínas es vía un grupo amino y un grupo carbonilo (ver Figura IV.8). Como se sabe los microtúbulos están constituidos por proteínas de tubulina, es por esta razón que el glutaraldehído puede formar enlaces covalentes con el microtúbulo.

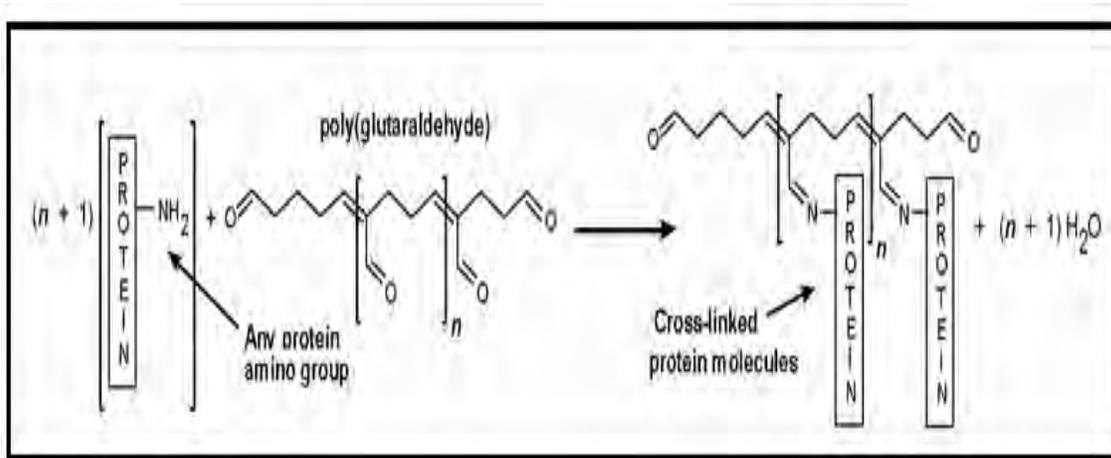


Figura IV.8. Esquema de la reacción entre el glutaraldehído y la proteína [55].

Una posible explicación del porqué el glutaraldehído estabiliza a los microtúbulos es que cuando el glutaraldehído se encuentra en solución acuosa forma polímeros de tamaño variable. Por lo tanto, para tener polímeros de cadenas cortas es necesario que el porcentaje de glutaraldehído sea bajo (<50%). Al tener varias cadenas de polímeros en solución acuosa puede surgir el proceso de reticulación (es una reacción química mediante la cual los polímeros se unen en cadenas tridimensionales componiendo una especie de red). Esto ocasionaría que cuando se haya formado la red algunos grupos carbonilo reaccionen con grupos amino de la proteína (en este caso la tubulina) y como es una red la que tenemos formada suponemos que ésta puede fijar unos cuantos protofilamentos del microtúbulo a la superficie del vidrio logrando así que se estabilice. Nosotros suponemos que fija algunos protofilamentos del microtúbulo ya que el tamaño del glutaraldehído es muy pequeño, tan solo de 0.75 nm y el número más común de glutaraldehídos en la red es de 8, por lo tanto el tamaño aproximado de la red sería de 6 nm y un microtúbulo tiene un diámetro de 24 nm, por tal motivo esta red no alcanza a cubrir todo el microtúbulo. Como se había mencionado antes la interacción carbono doble enlace nitrógeno es la formación de un enlace covalente el cual es muy estable. Esta interacción ha sido reportada por Turner et al. [29,53].

Tal vez el enlace covalente que se forma entre el glutaraldehído y las proteínas es el que ayude a estabilizar a los microtúbulos junto con la ayuda del taxol, el cual es un compuesto que ya se sabe que puede estabilizarlos por al menos unas cuantas horas.

Ya que se verificó visualmente que los microtúbulos están presentes después de 38 días, debemos de realizar otro tipo de pruebas para verificar que sigan siendo funcionales. Para ello, se realizaron las pruebas de motilidad de la cinesina con estos microtúbulos.

Para comparar las pruebas de motilidad utilizando microtúbulos estables por varias semanas, lo primero que se realizó fue un ensayo *in-vitro* con la cinesina donde los microtúbulos eran frescos. Estos ensayos además son importantes en sí

mismos para aprender acerca de la cooperatividad entre motores moleculares, como ya se explicó en el capítulo 2. Los dos parámetros que se midieron en estos ensayos de motilidad fueron la fuerza que la cinesina puede soportar y el tiempo en que permanece caminando sobre los microtúbulos.

IV.II. Análisis de los datos obtenidos en los ensayos de motilidad: fuerza soportada por la cinesina y tiempo de permanencia sobre el microtúbulo.

Las cinesinas se unen a una esfera de poliestireno de 540 nm de diámetro (descrito en el capítulo 3). La esfera se atrapó ópticamente y fue colocada directamente sobre el microtúbulo que se inmovilizó en la superficie del cubreobjetos, previamente identificado utilizando el microscopio (ver Figura VI.9A y Figura VI.9B). Cuando se une la cinesina al microtúbulo en presencia de ATP avanza unidireccionalmente hacia el extremo “mas” del microtúbulo. En nuestro experimento se utilizó la trampa óptica (fija) para medir los desplazamientos de la cinesina sobre el microtúbulo así como para ejercer una fuerza de retardo en las cinesinas que aumenta a medida de que la esfera se aleja del centro del láser. Se consideraron microtúbulos alineados a lo largo de la dirección x, de modo tal que la fuerza de retardo se determina a través de la ley de Hooke ($F_x = -k_x \cdot x$, recordando que la constante k_x ha sido determinada previamente a través de un método de calibración). La figura VI.9C representa ejemplos de los registros obtenidos cuando la cinesina se desplaza sobre el microtúbulo.

Los datos que obtuvimos por medio de la calibración de la pinza óptica son los siguientes: para la constante del resorte $k_x=0.065$ pN/nm, para la constante de conversión volts-nanómetros: $X=68.644$ nm/V. La constante k_x se empleó para obtener la fuerza máxima que soportaron una ó varias cinesinas, mientras que la constante X fue utilizada para conocer los desplazamientos de una ó de varias cinesinas sobre el microtúbulo.

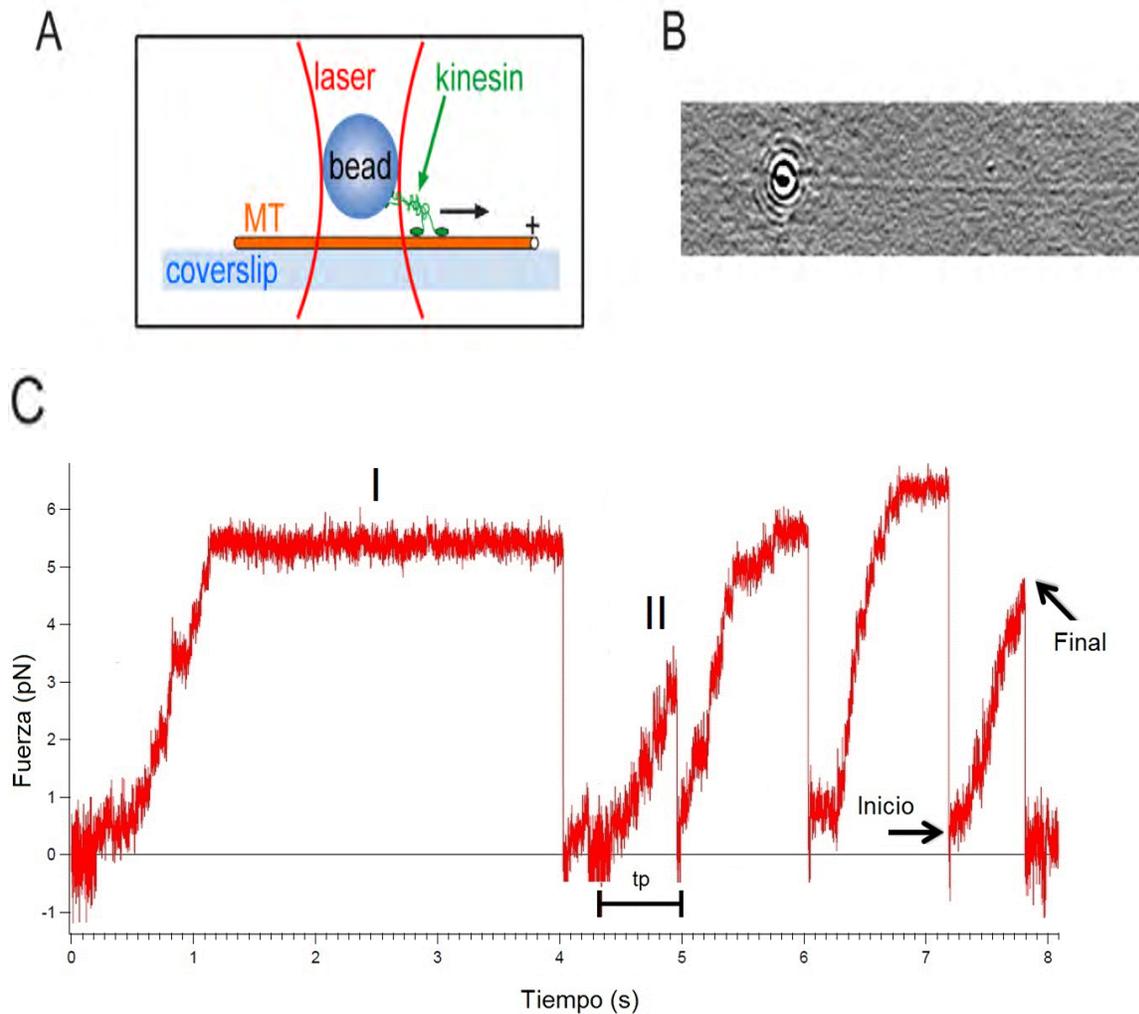


Figura IV.9. Trayectoria de la cinesina sobre un microtúbulo. A) Representación esquemática del ensayo con esferas-cinesinas, no es a escala [56]. B) Esfera con cinesina atrapada por el láser y colocada directamente sobre un microtúbulo, visualizado mediante procesamiento digital de imágenes. C) Registros representativos para la caminata de una cinesina donde se observan fuerzas aproximadas a 6 pN y tiempos de permanencia sobre el microtúbulo (t_p) hasta 4 s, las flechas marcan el inicio en que la cinesina comienza a caminar y el final donde la cinesina se desprendió del microtúbulo. C.I. indica un tipo de trayectoria donde a una fuerza aproximada de 6 pN se presenta una meseta lo que indica que la cinesina se detuvo por un tiempo antes de desprenderse del microtúbulo y C.II. Es otro tipo de trayectoria donde la cinesina llega a un punto máximo de fuerza en este caso aproximadamente 4 pN y se desprende inmediatamente. La [ATP] = 100 mM, dilución empleada 1:280,000.

Los experimentos de motilidad producen datos como los que se muestran en la figura IV.9C, en donde se grafica Fuerza (pN) vs Tiempo (s). Las gráficas se realizaron con el programa Igor.

Los parámetros que nos interesan conocer son la fuerza máxima y el tiempo que duró la cinesina desplazándose sobre el microtúbulo. Como se observa en la figura IV.9C, existen dos tipos de eventos que ocurren cuando la cinesina se encuentra desplazándose sobre el microtúbulo. El primer evento (evento I) que se observa es cuando la cinesina llega a una fuerza máxima y en lugar de desprenderse inmediatamente del microtúbulo permanece sobre él por un cierto tiempo (ver figura IV.9C.I). El segundo evento (evento II) que se observa es cuando la cinesina llega a una fuerza máxima y se desprende inmediatamente del microtúbulo (ver figura IV.9C.II). Para la obtención de los datos de la fuerza máxima se consideraron los dos eventos y simplemente se observó cuál era el valor máximo de la fuerza. Estos datos fueron recopilados en una hoja de Excel. Para la obtención de los datos del tiempo que permaneció la cinesina desplazándose sobre el microtúbulo (t_p) sólo se consideraron los eventos del tipo dos (ver figura IV.9C.II). Para obtener el valor de t_p simplemente se observa en qué momento la cinesina comienza a desplazarse sobre el microtúbulo (ver flecha de inicio en la figura IV.9C) y el momento en que se desprende del microtúbulo (ver flecha de final en la figura IV.9C), los únicos eventos que se consideraron fueron los del tipo II. Este intervalo de tiempo es el que se toma para t_p . Estos datos fueron recopilados en una hoja de Excel.

Para los datos de fuerza que soporta la cinesina y el tiempo que permanece la cinesina desplazándose sobre el microtúbulo se realizaron histogramas de frecuencia.

IV.III. Ensayos *in-vitro* de motilidad empleando la cinesina

IV.III.1. Comparación de la fuerza que puede soportar una cinesina vs varias cinesinas al desplazarse sobre microtúbulos frescos estabilizados con glutaraldehído

Este experimento se realizó con la finalidad poder observar el movimiento de la cinesina en microtúbulos frescos y cómo es que la fuerza que soporta una cinesina unida a una esfera de poliestireno se ve afectada cuando tenemos más de 2 cinesinas unidas a la misma esfera.

Para tener una aproximación de cuántas cinesinas tenemos en cada una de las diluciones, se realizaron ensayos donde se atrapaba una esfera con ayuda del láser y se posicionaba sobre el microtúbulo, esperando a que caminara la cinesina. Se contabilizó entonces el número de veces que ocurrió este evento a diferentes diluciones. El total de esferas atrapadas por dilución fue de 15.

Mark J. Schnitzer et al. [31] reportaron que cuando el 50% de las esferas que contienen cinesinas unidas, se desplazan sobre el microtúbulo la probabilidad de tener una cinesina unida a una esfera es del 86%. Ellos mencionan que en los experimentos *in-vitro* con cinesinas unidas a una esfera de poliestireno pueden ocurrir dos eventos: 1) La esfera se une al microtúbulo y se mueve, con una probabilidad de $P(f)$ donde f es la concentración relativa de cinesinas, o 2) La esfera no se unió al microtúbulo con la probabilidad de $1-P(f)$. Entonces si una sola cinesina es capaz de hacer que se desplacen las esferas se cumple que: $P(f)=1-\exp(-\lambda f)$, esta ecuación corresponde a la probabilidad de Poisson, donde λ es un parámetro de ajuste. Encontraron que cuando la $P(f)\leq 0.5$, la probabilidad de que una esfera tenga dos o más motores es de <0.14 . Otro dato interesante que ellos reportan es que la probabilidad de que dos cinesinas estén unidas al microtúbulo simultáneamente es <0.02 [33].

Nosotros encontramos que para una dilución 1:560,000 el 50% de las esferitas con cinesina se desplazaron sobre el microtúbulo, lo que sugiere que en ese punto la probabilidad de tener más de una cinesina por esfera es muy baja. Ahora bien cuando tenemos diluciones menores (es decir, la concentración de cinesinas es mayor) se espera que más de una cinesina esté unida a una esfera, mientras que para diluciones mayores la probabilidad de encontrar dos o más cinesinas por esfera disminuye.

La figura IV.10. muestra nuestros datos de la fracción de esferas que se movieron vs la concentración de cinesina (línea naranja con asterisco verde). Se realizó un ajuste de los datos a la ecuación de probabilidad de Poisson (línea azul): $1 - \exp(-\lambda f)$. El ajuste fue bueno, lo cual concuerda con lo ya reportado en la literatura [33]. Esto nos da confianza de que nuestros ensayos y nuestro método de análisis son adecuados.

Por otra parte, es posible hacer una estimación del número de cinesinas por esfera a una dilución dada. Para ello, consideremos la condición de dilución de la cinesina en la cual el 50 % de esferas mostraron motilidad sobre el microtúbulo. En esta condición, es válida la siguiente relación $1 - \exp(-\lambda f) = 0.5$. Si se despeja λf , podremos obtener el promedio de cinesinas por esfera (esta es una propiedad de la estadística de Poisson). Entonces, para nuestra dilución de 1:560,000 (50%) tenemos el promedio de 0.7 motores por esfera, para una dilución de 1:280,000 el promedio es de 1.4 motores por esfera, para 1:140,000 el promedio es de 2.8 motores por esfera y por último para 1:70,000 el promedio es de 5.6 motores por esfera. Para las diluciones mayores a 1:560,000, es decir, 1:1,120,000 y 1:2,240,000, la probabilidad de tener más de un motor por esfera disminuye.

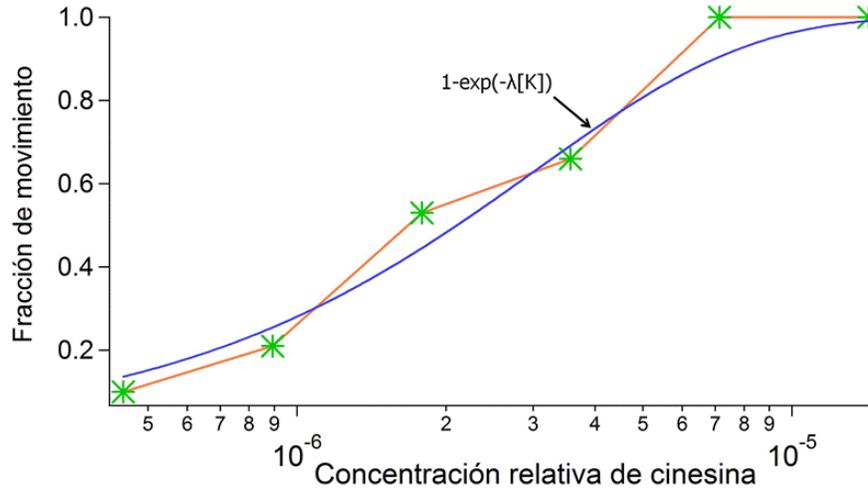


Figura IV.10. Grafica de la fracción de esferas que se movieron vs la concentración relativa de cinesina. La línea naranja con asteriscos en verde representa los valores experimentales y la línea azul representa el ajuste a la probabilidad de Poisson. Para cada concentración de cinesinas se tomaron 15 esferas.

En la figura IV.11. se muestran las gráficas de frecuencia vs la fuerza que soportan una o más cinesinas según sea el caso de la dilución. Se puede observar que los promedios de las fuerzas no tienen un cambio significativo al tener, en promedio, 1 ó más de una cinesina unida a una esfera, excepto en el resultado correspondiente a la dilución de 1:70,000. Sin embargo, si observamos la dispersión de los datos en A) (correspondiente a un promedio de 5.6 cinesinas por esfera) las fuerzas que soportó la cinesina llegaron hasta 13 pN, comparando con el valor de E) (correspondiente a un promedio de 0.35 cinesinas por esfera) donde muy pocos eventos ocurrieron en fuerzas de 8 y 9 pN o mayores. Estos últimos datos (E) concuerdan con lo ya antes reportado por otros autores [57], donde ellos comentan que la fuerza máxima que puede sostener una sola cinesina se encuentra entre 4 y 7 pN. Estos valores que encontramos confirmaron nuestras expectativas.

En la figura IV.12 se graficaron los valores promedio de las fuerzas que pueden soportar una o varias cinesinas desplazándose sobre el microtúbulo vs el valor de las diluciones (obtenidos de los datos de la figura IV.11). Se observa que a una

mayor concentración de cinesinas el valor de la fuerza no aumenta mucho respecto a bajas concentraciones de cinesina, excepto en el caso de la dilución de 1:70,000.

En resumen, para ambas figuras (figura IV.11 y figura IV.12) tenemos dos observaciones principales:

- 1) La aparición de eventos mayores a 7 pN al ir aumentando la concentración de cinesinas.
- 2) No hay una variación significativa de los promedios de los valores de las fuerzas.

Para explicar ambos resultados, nosotros tomamos en consideración lo siguiente:

En primer lugar, los datos se dividieron en dos regiones: Región A donde los eventos observados corresponden a una sola cinesina (diluciones 1:560,000 y 1:1,120,000), Región B donde los eventos observados corresponden a una o más cinesinas (diluciones 1:280,000, 1:140,000 y 1:70,000).

En segundo lugar, a mayor concentración de cinesinas la probabilidad de tener dos o más cinesinas unidas al mismo tiempo al microtúbulo aumenta.

En tercer lugar, el proceso por el cual las cinesinas se unen a una esfera es aleatorio, es decir, nosotros no controlamos las distancias y espaciamientos entre cada cinesina que hay en la superficie de la esfera (ver figura IV.13).

De acuerdo a las consideraciones para la región A, nosotros no esperábamos cambio en el valor de los promedios de las fuerzas, ya que en esta región sólo tenemos una sola cinesina. Es decir, los valores de las fuerzas deben de estar en el rango entre 4 y 7 pN, como ya se ha reportado anteriormente para una sola cinesina. Por lo tanto, para esta región lo que observamos en nuestros experimentos es lo que esperábamos.

Ahora, para la región B, nosotros esperábamos que aumentara el valor de la fuerza conforme aumenta la concentración de cinesinas. Esto se esperaba ya que al aumentar la concentración de la cinesina la probabilidad de encontrar dos o más

cinesinas unidas al mismo tiempo a un microtúbulo aumenta. Esto ocasionará un aumento en el número de eventos mayores a 7 pN y por lo tanto un aumento en la fuerza de los promedios. Sin embargo, aun con un aumento en la concentración de cinesinas la probabilidad de tener dos o más cinesinas unidas al mismo tiempo al microtúbulo es baja. Para entender esto, consideremos el siguiente ejemplo. En la dilución de 1:70,000 esperamos que haya un promedio de ~6 cinesinas por esfera. Entonces, la pregunta es: ¿Cuál es la probabilidad en este caso de que dos o más cinesinas se unan simultáneamente al mismo microtúbulo?

Para contestar la pregunta anterior, consideremos lo siguiente:

El radio de la esfera de 540 nm.

El tamaño de la longitud de la cinesina de ~10 nm.

El diámetro del microtúbulo de 25 nm.

En promedio el número de cinesinas por esfera es de 6 (dilución 1:70,000).

Como nosotros queremos saber la probabilidad de tener dos cinesinas unidas al mismo tiempo al microtúbulo. Lo primero que necesitamos es calcular la distancia entre dos objetos, esto con la finalidad de saber que tan lejos o tan cerca deben de estar una cinesina de la otra, para que ambas puedan interactuar con el microtúbulo. Considerando que las cinesinas van a estar distribuidas homogéneamente sobre un área dada, entonces nosotros tenemos $A = \text{área total}$ dividida entre el número de cinesinas, por lo tanto tendremos la siguiente expresión para el área por cinesina:

$$\frac{A}{N}$$

De la expresión anterior podemos obtener la distancia entre dos cinesinas, ya que la expresión del área es lado por lado, es decir, $A=L^2$. Por lo tanto despejando L tenemos que $L = \sqrt{A/N}$, donde L es la distancia, A es el área total y N es el número de cinesinas y con esta fórmula podemos calcular la distancia entre dos cinesinas. Por ejemplo para la dilución de 1:70,000 tenemos en promedio ~6 por esferas, el valor de $L = \sqrt{4\pi r^2/6} = 390 \text{ nm}$ ($4\pi r^2$, es la expresión para calcular el área de una esfera, donde r= el radio de la esfera). Por lo tanto, para seis cinesinas la distancia

entre ellas es de 390 nm. Este valor se retomara más adelante para el cálculo de la probabilidad.

Ahora bien, el segundo paso es calcular la distancia máxima donde la cinesina unida a la esfera aun pueda interactuar con el microtúbulo, este valor depende del radio de curvatura de la esfera. En la figura IV.14 se esquematiza una esfera con una cinesina (esferita pequeña de color rojo) adherida al microtúbulo (línea azul). Los cálculos que se van a realizar son para encontrar la distancia máxima (d).

En la figura IV.14 tenemos una cinesina adherida al microtúbulo, ésta va a ser nuestro punto de referencia, después delimitamos una altura máxima a la cual debe de estar la cinesina para que pueda interactuar con el microtúbulo, esta distancia la denominamos l .

Con estos dos puntos de referencia trazamos un triángulo rectángulo (de color rojo) y por medio del teorema de Pitágoras tenemos la siguiente expresión para d :

$$d = \sqrt{l^2 + (2a)^2}$$

Ahora necesitamos encontrar el valor de a , y para esto ocupamos la relación entre los ángulos. Entonces $\Theta = \Theta'$.

$$\text{Seno } \Theta = l / 2a$$

$$\text{Seno } \Theta' = a/R$$

$l / 2a = a/R$, despejamos a :

$$a = \sqrt{l * R / 2}$$

Ya que encontramos “ a ”, podemos sustituir esta nueva expresión en la fórmula de d :

$$d = \sqrt{l^2 + (2 * \sqrt{l * R / 2})^2}$$

$$d = \sqrt{l^2 + (2 * l * R)}$$

Nosotros conocemos el valor de $l = 10$ nm (el tamaño de la cinesina) y el valor de $R = 270$ nm (el radio de la esfera). Por lo tanto, el valor de $d = 74$ nm, este valor es la distancia máxima a la cual la segunda cinesina unida a la esfera aún puede interactuar con el microtúbulo.

Hasta este momento nosotros conocemos dos valores muy importantes: 1) El valor de la distancia entre dos cinesinas (390 nm) y 2) El valor de la distancia máxima a la cual la segunda cinesina se puede unir al microtúbulo (74 nm).

Para obtener la probabilidad (P) de que dos cinesinas estén al mismo tiempo unidas al microtúbulo dividiremos la distancia máxima entre la distancia entre dos cinesinas.

$P = (75/390) * 100 = 19\%$ de probabilidad de que dos cinesinas se unan al microtúbulo al mismo tiempo para una dilución de 1:70,000.

Como vemos en el ejemplo anterior, a pesar de que haya más de una cinesina en la esfera la probabilidad de que dos o más cinesinas se unan simultáneamente al mismo microtúbulo es relativamente baja para las diluciones consideradas en este estudio.

Por lo tanto, la mayoría de los eventos que se presentaron en la región B se deben a una sola cinesina, aunque tengamos más cinesinas en la esfera. Esto explica las dos observaciones principales mencionadas anteriormente: por una parte, explica los pocos eventos que se observaron a fuerzas mayores de 7 pN que se deben a más de dos cinesinas interactuando al mismo tiempo sobre el microtúbulo ya que la probabilidad de que ocurrieran estos eventos es baja pero esto no significa que no estén ocurriendo. Por otra parte, los promedios de las fuerzas no variaron significativamente, lo cual se debe a que la mayoría de los eventos fueron debido a una sola cinesina.

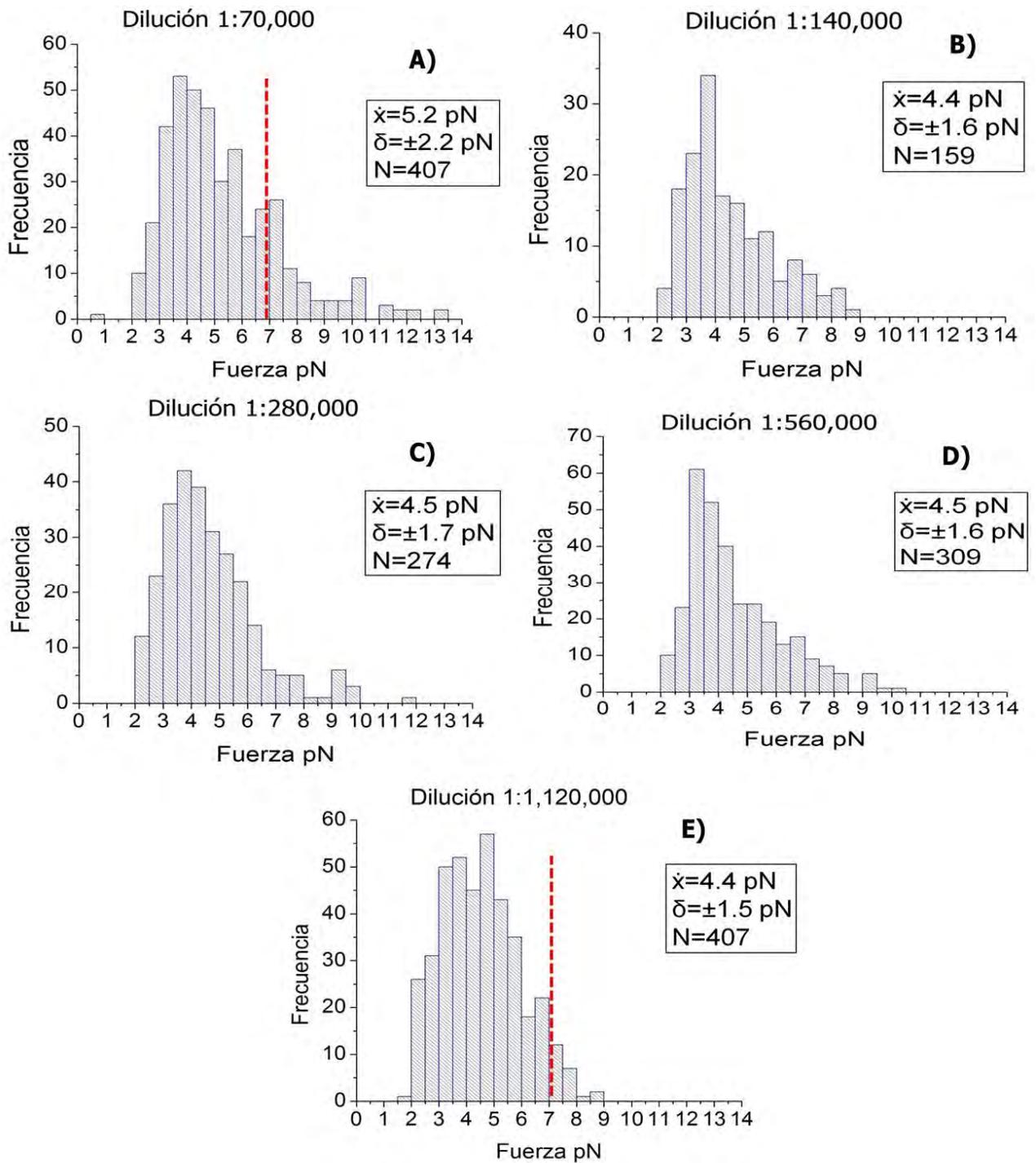


Figura IV.11. Gráficas de Frecuencia vs Fuerza de la kinesina empleando varias diluciones. Donde \bar{x} es el promedio de todas las fuerzas medidas, δ (\pm) es la desviación estándar y N es el número total de datos. La línea roja denota el límite de fuerza que pudo soportar una sola kinesina antes desprenderse.

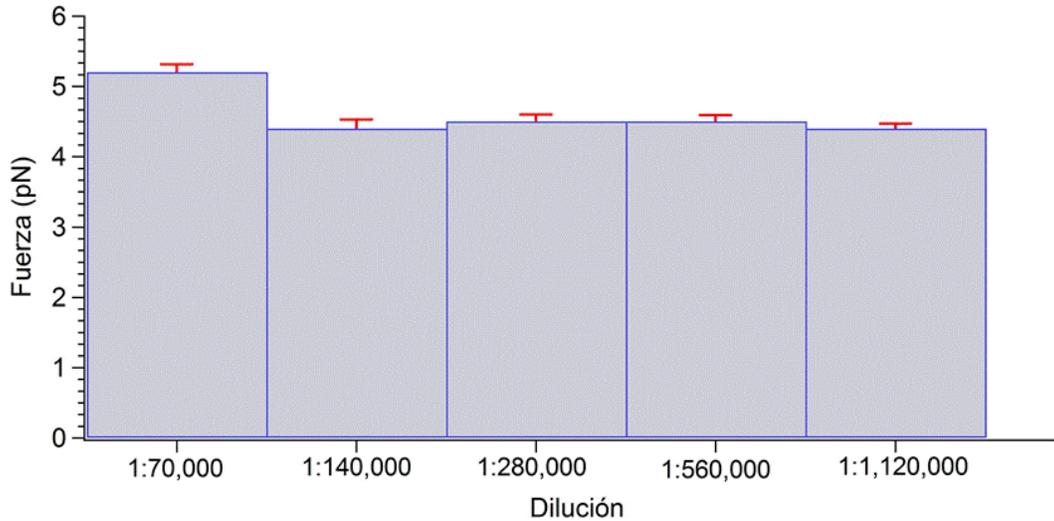


Figura IV.12. Grafica de la fuerzas promedio (pN) soportada por una o más cinesinas vs diluciones de cinesina. Las barras rojas pertenecen al cálculo del error estándar.

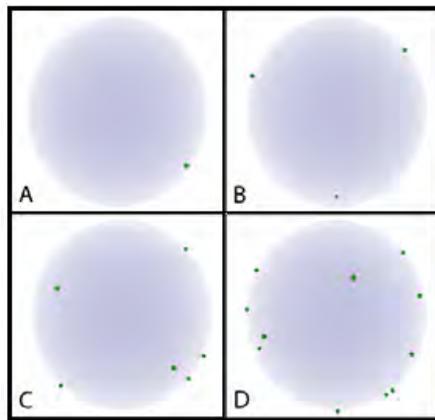


Figura IV.13. Representación de cómo es que la cinesina se distribuye de manera aleatoria sobre una esfera. Los círculos de color verde representan a la cinesina, y los círculos de color lila representan a la esfera. A) Es el ejemplo de cuando solo tenemos una cinesina por esfera. B) Se tienen tres cinesinas adheridas a la superficie de la esfera, como se observa ninguna de las tres cinesinas están muy cercanas entre si. C) Se tienen más de dos cinesinas adheridas a la superficie de la esfera pero como se observa la mayoría de ellas están alejadas entre si. D) como aumento la cantidad de cinesinas adheridas a la esfera se puede observar que pueden existir dos cinesinas juntas entre si y a la vez también existir cinesinas alejadas una de la otra.

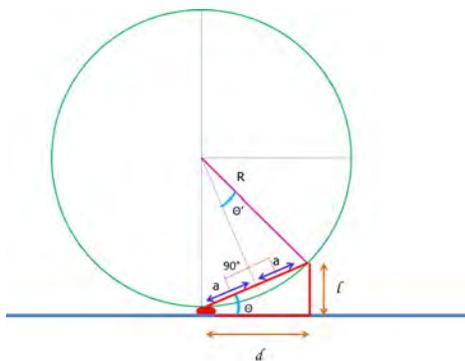


Figura IV.14 Esquema de una cinesina unida a una esfera para el cálculo de la distancia máxima a la cual una segunda esfera aún se puede unir al microtúbulo. Donde d es la distancia máxima, l es el tamaño aproximado de la cinesina, R es el radio de la esfera.

IV.III.2. Comparación del tiempo que permanece una cinesina vs varias cinesinas sobre microtúbulos frescos estabilizados con glutaraldehído

Este experimento se realizó para ver el tiempo que duran una o varias cinesinas desplazándose sobre el microtúbulo antes de desprenderse de él. Recordemos que los eventos analizados son del tipo II y corresponden a los de la figura IV.9C.II.

En la figura IV.15 se observa que cuando tenemos un mayor número de cinesinas unidos a una esfera (dilución 1:70,000, promedio de 5.6 motores por esfera) duran más tiempo sobre el microtúbulo (con un tiempo promedio de 0.5 segundos) que cuando se tiene una sola cinesina por esfera (dilución 1:560,000 y 1:1,120,000) en donde el tiempo de permanencia promedio es de 0.3 segundos. Como se puede observar en la figura IV.15A) aparecen eventos hasta de 2 segundos y conforme vamos disminuyendo la concentración de cinesinas, el número de estos eventos también va disminuyendo como se puede observar en figura IV.15D) y figura IV.15E), donde la mayoría de eventos ocurrieron por debajo de 1 segundo.

La figura IV.16 es una gráfica de los tiempos promedio vs la magnitud de las diluciones. Se observa que a concentraciones altas de cinesina (>1:560,000) el tiempo promedio es 0.5 s y a bajas concentraciones (< 1:560,000) es de 0.3 s. Por lo tanto el tiempo de permanencia fue aumentando conforme aumentábamos la concentración de cinesinas.

En resumen, para ambas figuras tenemos dos principales observaciones:

- 1) La aparición de eventos de hasta 2 segundos de duración a alta concentración de cinesinas (dilución de 1:70,000) estos eventos se observaron muy raramente a concentraciones bajas (dilución de 1:1,120,000).
- 2) Tenemos una variación en los promedios de los tiempos de permanencia conforme se aumenta la concentración de cinesinas.

Para entender estos resultados nosotros consideramos lo siguiente, de manera análoga a lo ya presentado para el caso de la fuerza sostenida por una o varias cinesinas:

En primer lugar, los datos se dividieron en dos regiones: Región A donde los eventos observados corresponden a una sola cinesina (diluciones 1:560,000 y 1:1,120,000), Región B donde los eventos observados corresponden a una o más cinesinas (diluciones 1:280,000, 1:140,000 y 1:70,000).

En segundo lugar, estamos seguros que estos eventos de las diluciones de 1:560,000 y 1:1,120,000 corresponde a una cinesina por esfera, por lo tanto estos datos van a ser nuestra referencia contra la cual vamos a realizar comparaciones. En particular, para estas dos diluciones prácticamente nunca observamos eventos con tiempos de permanencia mayores a 1 segundo. Por lo tanto, para nuestros experimentos de la región B todos los eventos con una duración mayor a 1 segundo serán atribuidos a la presencia de dos o más cinesinas unidas a un mismo microtúbulo.

En tercer lugar, en nuestros experimentos observamos que a mayor concentración de cinesinas aumentan los eventos de duración mayor a 1 segundo.

En cuarto lugar, a mayor concentración de cinesinas la probabilidad de tener dos o más cinesinas unidas al mismo tiempo al microtúbulo aumenta pero no constituye la mayoría de los eventos (como ya se explicó en el análisis anterior para las fuerzas).

Tomando todos estos puntos anteriores en consideración podemos proporcionar la siguiente explicación de nuestras observaciones. Para la región A, nosotros no esperábamos cambio en los promedios de los tiempo de permanencia ya que tanto en la dilución 1:560,000 como en la dilución 1:1,120,000 los eventos observados ocurren debido a una sola cinesina. Por lo tanto, para esta región nuestros resultados comprueban lo que esperábamos, ya que ambas diluciones presentaron un tiempo promedio de 0.3 (figura IV.16) y la mayoría de eventos de tiempo de permanencia estuvo debajo de 1 segundo (figura IV.15D y figura IV.15E).

Para la región B, nosotros esperábamos que los promedios de tiempos de permanencia sobre el microtúbulo aumentaran. Como ya presentamos en nuestro análisis de las fuerzas, si bien es cierto que altas concentraciones de cinesina aumenta la probabilidad de que dos o más cinesinas interactúen simultáneamente con el mismo microtúbulo, la mayoría de los eventos aún en este caso se deben a una cinesina. Sin embargo, a diferencia del caso de la fuerza, en el caso del tiempo de permanencia estos pocos eventos si tienen una influencia marcada sobre los promedios.

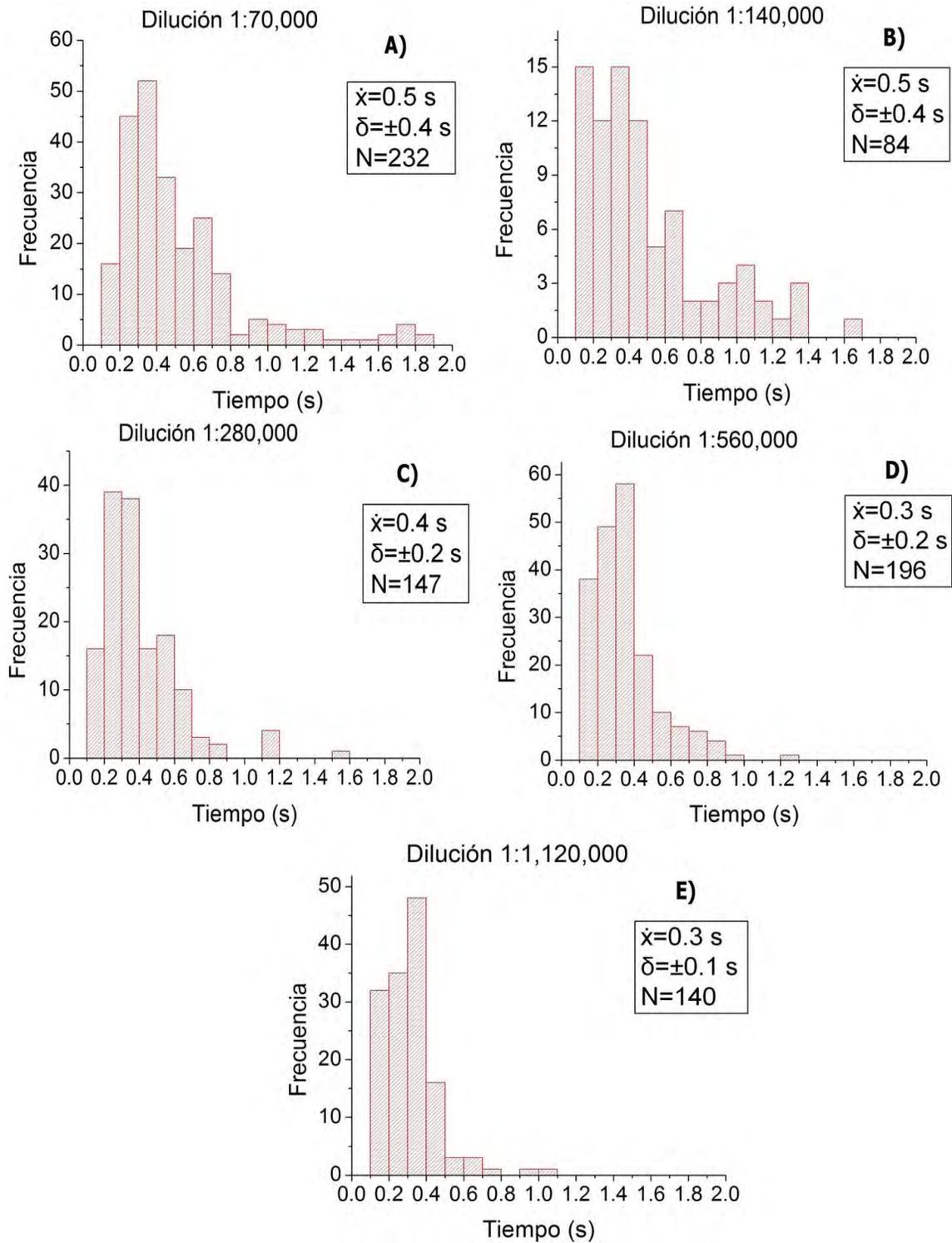


Figura IV.15. Gráficas de Frecuencia vs Tiempo de la cinesina empleando varias diluciones. Donde \bar{x} es el promedio de todas las fuerzas medidas, $\delta (\pm)$ es la desviación estándar y N es el número total de datos.

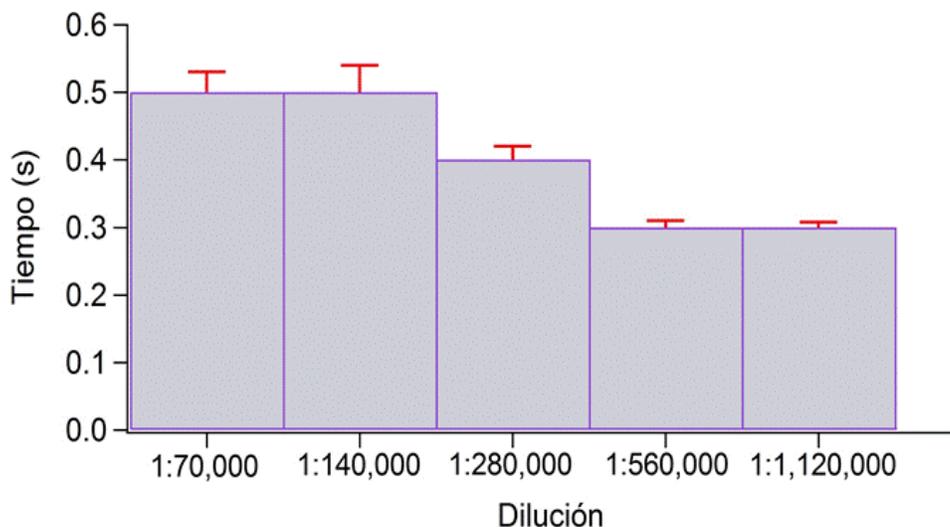


Figura IV.16. Grafica del tiempo promedio (s) que permanecieron las cinesinas caminando sobre el microtúbulo vs las diluciones. Las barras rojas pertenecen al cálculo del error estándar.

IV.III.3. Verificación de la funcionalidad de microtúbulos de varias semanas estabilizados con glutaraldehído

Como ya se vio en la sección **IV.IV.2** de este capítulo, los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído aún se pueden observar por medio de microscopía óptica de campo claro. Sin embargo, aunque los microtúbulos se puedan visualizar no es posible saber si han ocurrido cambios en sus estructuras de modo tal que les afecten la funcionalidad. Por lo tanto, para comprobar que siguen siendo funcionales se realizó este experimento de motilidad con la cinesina donde colocamos una dilución de 1:280,000 (correspondiente a la situación de un promedio de 1.4 motores por esfera).

Un problema que tuvimos con nuestras muestras que contenían microtúbulos de varias semanas de haber sido estabilizados con glutaraldehído es que se observó la presencia de bacterias, las cuales fueron difíciles de eliminar. Para eliminarlas, se lavó con 2 ml de PEM80 y se usó vacío para succionarlas, aunque algunas de

ellas permanecieron al final de ese proceso. A pesar de este problema, se pudieron tomar datos de cinesinas desplazándose sobre un microtúbulo los cuales fueron suficientes para realizar una estadística de la frecuencia vs la fuerza soportada por más de una cinesina.

En la figura IV.17 se observan las gráficas de la fuerza (pN) soportada por más de una cinesina vs el tiempo de estabilización (días). Se consideraron tres muestras: la primera con microtúbulos con un tiempo de estabilización de 20 días y con taxol, la segunda con microtúbulos con un tiempo de estabilización de 38 días con taxol y la última muestra de microtúbulos con un tiempo de estabilización de 38 días sin taxol. La figura IV. 18 muestra una gráfica de la fuerza (pN) promedio soportada por varias cinesinas vs el tiempo (días). La fuerza promedio para los tres casos (3.4, 3.6 y 3.4 pN, respectivamente) fue menor a lo que obtuvimos con microtúbulos frescos empleando la misma dilución (1:280,000, 0 días con taxol) de cinesinas (4.5 pN). Sin embargo, aunque los promedios sean ligeramente diferentes, cabe notar que en todos los casos los eventos se encuentran entre 2 y 7 pN. Es decir, los valores de la fuerza promedio para nuestras muestras con microtúbulos estabilizados por varias semanas son similares a los obtenidos con microtúbulos frescos tomando en cuenta la desviación estándar de las distribuciones. Con estos valores de fuerzas obtenidos logramos comprobar que los microtúbulos aún siguen siendo funcionales para que la cinesina se desplace sobre ellos.

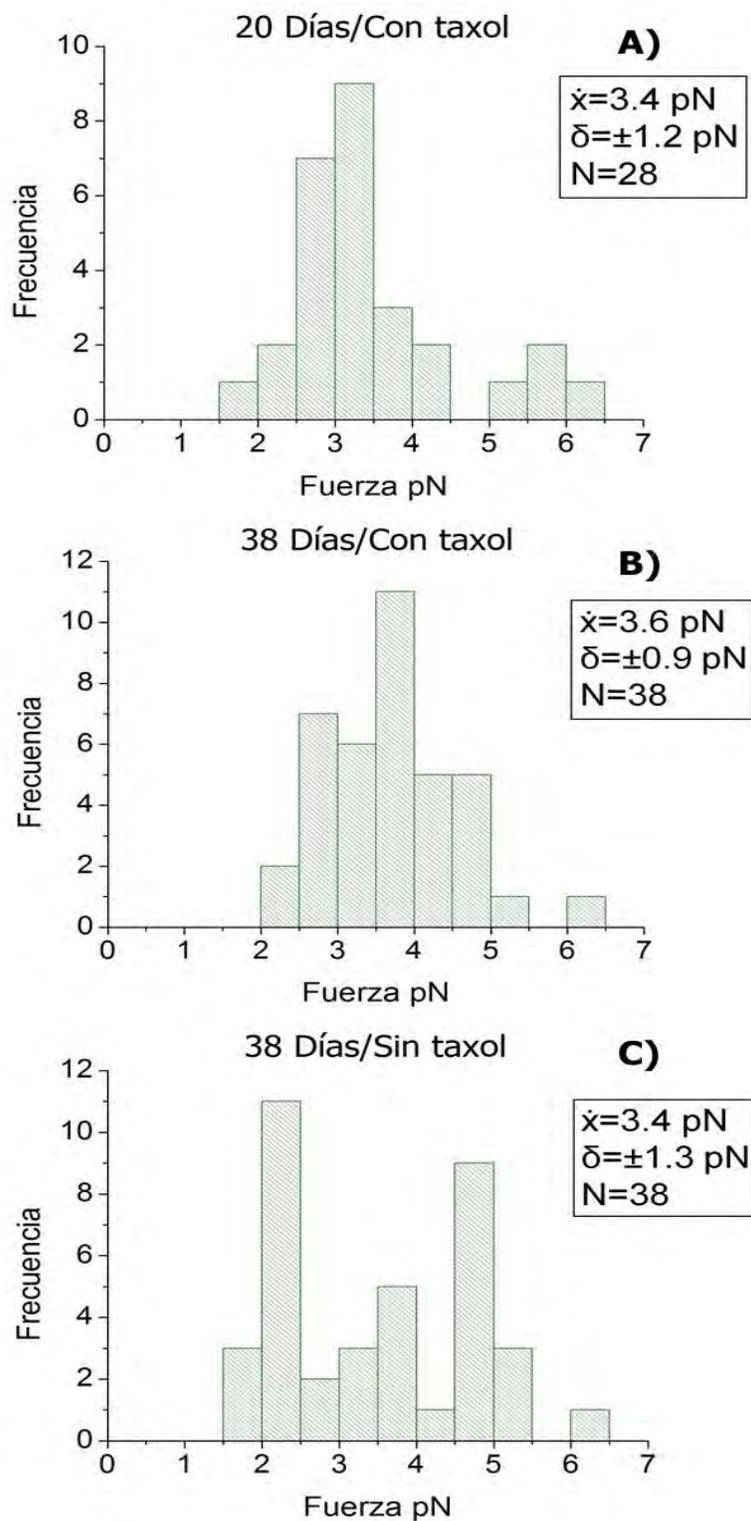


Figura IV.17. Gráficas de Frecuencia vs Fuerza de la cinesina empleando una dilución de 1:280,000. Donde \bar{x} es el promedio de todas las fuerzas medidas, $\delta (\pm)$ es la desviación estándar y N es el número total de datos.

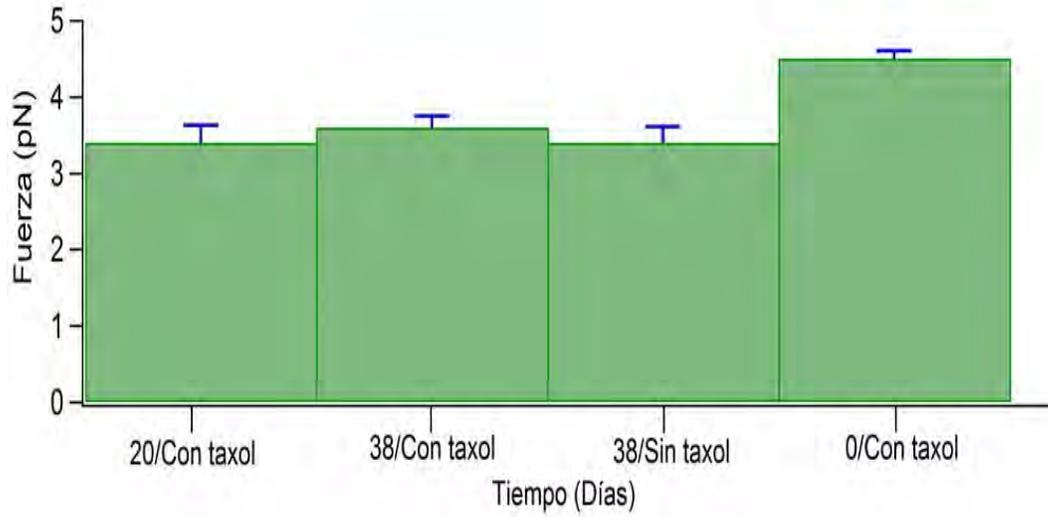


Figura IV.18. Grafica de la fuerza promedio soportada por más de una cinesina (pN) vs Tiempo (días). Las barras en color azul pertenecen al cálculo del error estándar.

CAPÍTULO V

Conclusiones y Perspectivas

CAPÍTULO V

Conclusiones y perspectivas

V.I. Conclusiones

Se logró expresar la proteína motora cinesina, en sus formas dimérica y monomérica.

Se comprobó por medio de un ensayo de motilidad *in-vitro*, utilizando la técnica de pinzas óptica, que la cinesina dimérica es funcional.

Los valores de la fuerza promedio que soporta una cinesina vs los valores de la fuerza promedio que pueden soportar más de dos cinesinas en nuestros experimentos fueron de 4.5 pN y 5.2 pN, respectivamente.

Logramos observar valores de fuerzas mayores a 7 pN en diluciones correspondientes a un promedio de 6 cinesinas por esfera. Estos eventos se atribuyen a más de dos cinesinas unidas a un mismo microtúbulo. Este resultado confirma que grupos de más de una cinesina cooperan para desarrollar fuerzas mayores a 7 pN (la fuerza máxima que desarrolla una sola cinesina).

Logramos observar valores de tiempo de permanencia del motor molecular avanzando sobre el microtúbulo mayores a 1 segundo en diluciones correspondientes a un promedio de 6 cinesinas por esfera. Estos eventos se atribuyen a más de dos cinesinas unidas a un mismo microtúbulo. Este resultado confirma que grupos de dos o más cinesinas cooperan para desarrollar tiempos de permanencia mayores a 1 segundo (que es el tiempo de permanencia correspondiente a una sola cinesina y que nosotros establecimos como referencia).

El experimento realizado con microtúbulos estabilizados con taxol fijados sobre una superficie recubierta con poli-L-lisina estableció que el tiempo de depolimerización es de 3 horas 35 minutos, consistente con reportes previos en la literatura.

Por medio de microscopia óptica de campo claro logramos visualizar microtúbulos estabilizados con glutaraldehído con taxol y sin taxol en las muestras que tenían 38 días de haber sido preparadas. Esta observación confirma que nuestro método de estabilización de microtúbulos preserva microtúbulos polimerizados varias semanas después de su preparación.

Los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído con taxol y sin taxol demostraron ser funcionales 38 días después de su preparación. La funcionalidad de los microtúbulos se comprobó mediante un experimento de motilidad con la cinesina. En estos experimentos de motilidad obtuvimos datos de la fuerza que pueden soportar más de dos cinesinas, las cuales estuvieron entre 3.4 y 3.6 pN. Estos valores de fuerza son ligeramente menores a los observados con microtúbulos frescos bajo idénticas condiciones, aunque la dispersión de los datos en ambos casos es relativamente grande, lo que hace que los datos de fuerza con microtúbulos estabilizados con glutaraldehído sean estadísticamente similares a los datos obtenidos para microtúbulos frescos.

Los objetivos planteados al inicio de este trabajo se cumplieron ya que: a) comprobamos que grupos de más de una cinesina cooperan entre sí para desarrollar mayores fuerzas y para permanecen avanzando sobre el microtúbulo por tiempos mayores. b) Se logró desarrollar un método de estabilización para microtúbulos utilizando glutaraldehído. Los microtúbulos se observaron estables después de varias semanas y siguen siendo funcionales. Esto último se comprobó mediante nuestros experimentos de motilidad con cinesina.

V.II. Perspectivas

- 1) Revisar nuestro protocolo de estabilización de microtúbulos para incrementar tiempos de estabilización, y evitando el problema de contaminación que se presentó en este trabajo.
- 2) Realizar ensayos de motilidad *in-vitro* con microtúbulos de varias semanas, a diluciones tales que una sola kinesina participe en el transporte y comparar con el caso de microtúbulos frescos.
- 3) Investigar si nuestro método de estabilización de microtúbulos es capaz de preservar la integridad de los microtúbulos aún en condiciones de deshidratación. Para ello, proponemos dejar un microtúbulo estabilizado con glutaraldehído por varias semanas pero ahora dejando que se seque la muestra para después de un tiempo hidratarla de nuevo con el buffer de ensayo. En caso de que los microtúbulos continúen sobre la superficie del cubre objeto se realizaría un ensayo *in vitro* para comprobar su funcionalidad.
- 4) Por medio de microscopia de fuerza atómica observar la estructura de los microtúbulos estabilizados con glutaraldehído después de varias semanas. Esto confirmaría que la estructura del microtúbulo no tiene daños.
- 5) Realizar un estudio de cooperatividad en un ensayo de motilidad con kinesinas monoméricas. Este estudio resultaría de gran utilidad ya que resulta más fácil de modelar teóricamente en comparación al caso de la kinesina dimérica.

REFERENCIAS

- [1] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Biología molecular de la célula*, Quinta Edición, Editorial Omega, Barcelona 2008, p. 1-2.
- [2] Rodney Boyer, *Conceptos de bioquímica*, Editorial International Thomson, México Diciembre 2002, p. 17, 21-22.
- [3] Jonathon Howard, *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*, Editorial Sinauer Associates Incorporated, 2001, p. 120.
- [4] Boyce Rensberger, *Life Itself: Exploring the Realm of the Living Cell*, Editorial Oxford University Press, USA 1996, p. 48.
- [5] Cooper Geoffrey, *La célula*, Segunda edición, Editorial Marban, 2010, p. 25.
- [6] Eva Nogales, Sharon G. Wolf, Kenneth H. Downing, Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography, *Nature*, Vol. 39, January 1998, 199-203.
- [7] Jennifer L. Ross and D. Kuchnir Fygenson, Mobility of taxol in microtubule bundles, *Biophysical Journal*, Vol. 84, June 2003.
- [8] Joe Howard and Anthony A. Hyman, Dynamics and mechanics of the microtubule plus end, *Nature*, Vol. 422, 17 April 2003, 753-758.
- [9] Freeman, W.H., Bracegirdle, B, *Atlas de histología*. Paraninfo, Segunda edición, Madrid 1981.
- [10] T. Mitchison y M.W. Kirschner, Dynamic instability of microtubule growth, *Nature* 312, 1984, 237-242.
- [11] T. Horio y H. Hotani, Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark field microscopy, *Nature* 321, 1986, 605-607.
- [12] Arshad Desai, Timothy J. Mitchison, Microtubule polymerization dynamics, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1997, 83–117.
- [13] Melanie Brunnbauer, Felix Mueller-Planitz, Süleyman Kösem, Thi Hieu Ho, Renate Dombi, J Christof M Gebhardt, Matthias Rief, Zeynep Okten, Regulation of a heerodimeric kinesin-2 through an unprocessive motor domain that is turned processive by its parther, *P Natl Acad Sci Usa*, Vol. 107 (23), 2010, 10460-10465.
- [14] Nobutaka Hirokawa, Yasuko Noda, Yosuke Tanaka and Shinsuke Niwa, Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport, *Nature reviews*, Vol. 10, October 2009, 682-696.

- [15] Dae-Hyun Seog, Dae-Ho Lee, Sang-Kyoung Lee, Molecular Motor Proteins of the Kinesin Superfamily Proteins (KIFs): Structure, Cargo and Disease, *Journal Korean Med Sci*, Vol.19, 2004, 1-7.
- [16] K. Frank, A. Isabelle, H. Wade Richard, A model of the microtubule–kinesin complex based on electron cryomicroscopy and X-ray crystallography, *Current Biology*, 8, No 4, 1998, 191-198.
- [17] L. Moyer Michele, P. Gilbert Susan and A. Johnson Kenneth, Purification and Characterization of Two Monomeric Kinesin Constructs, *Biochemistry*, Vol.35, 1996, 6321-6329.
- [18] L. Asbury Charles, Kinesin: world's tiniest biped, *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17:89–97.
- [19] William O. Hancock and Jonathon Howard, Processivity of the Motor Protein Kinesin Requires Two Heads, *The Journal of Cell Biology*, Volume 140, Number 6, March 1998, 1395–1405.
- [20] William O. Hancock and Jonathon Howard, Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains, *PNAS*, Vol. 96, no. 23, November 1999, 13147–13152.
- [21] Antonio Tito Fojo, *The Role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*, Ed Humana Press, 2008, p.307-309.
- [22] L.G. Wade, Jr., *Química orgánica*, 2da edición, editorial Pearson Prentice hall, México 1993, p.1234.
- [23] Daniel M. Bollag, Patricia A. McQueney, Jian Zhu, Otto Hensens, Lawrence Koupal, Jerrold Liesch, Michael Goetz, Elias Lazarides, and Catherine M. Woods, Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action, *Cancer research*, 55,1 Junio 1995, 2325-2333.
- [24] Margit Foss, Buck W. L. Wilcox, G. Bradley Alsop, Dahong Zhang, Taxol Crystals Can Masquerade as Stabilized Microtubules, *Plos one*, Issue 1, January 2008, e1476.
- [25] Isabelle Arnal and Richard H. Wade, How does taxol stabilize microtubules?, *Current Biology*, Vol 5 No 8, 1995, 900-908.

- [26] Peter B., Schiff and Susan Band Horwitz, Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, *Cell Biology*, Vol. 77, No. 3, March 1980, 1561-1565.
- [27] George A Orr, Pascal Verdiel-Pinard, Hayley McDaid, Susan Band Horwitz, Mechanisms of taxol resistance related to microtubules, *Oncogene*, Vol. 22, 2003, 7280-7295.
- [28] Linda A. Amos and Jan Löwe, How Taxol stabilises microtubule structure, *Chemistry & Biology*, Vol 6 No 3, 1999, R65–R69.
- [29] Hyman AA, Chretien D, Arnal I, Wade RH: Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl (α)-methylene-diphosphonate. *J Cell Biol*, 1995, 128:117-125.
- [30] M. A. Hayat, Fixation for electron microscopy, Editorial Academic Press, New York 1981, 66- 67.
- [31] David Turner, Chunyen Chang, Kan Fang, Peter Cuomo, and Douglas Murphy, Kinesin Movement on Glutaraldehyde-Fixed Microtubules, *Analytical biochemistry*, Vol. 242, 1996, 20–25.
- [32] Carmen Noemí Hernández Candia, Construcción y caracterización de una pinza óptica para el estudio de moléculas individuales, Tesis de maestría, México D.F. 2011.
- [33] Karel Svoboda and Steven M. Block, Force and Velocity Measured for Single Kinesin Molecules, *Cell*, Vol. 77, June 1994, 773-794.
- [34] Janina Beeg, Stefan Klumpp, Rumiana Dimova, Ruben Serral Gracia, Eberhard Unger and Reinhard Lipowsky, Transport of Beads by Several Kinesin Motors, *Biophysical Journal*, Volume 94, January 2008, 5 32–541.
- [35] Visscher K, Schnitzer MJ, Block SM, Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp, *Nature* Vol. 400, 1999, 184-189.
- [36] Ashkin, A., K. Schütze, J. M. Dziejczak, U. Euteneuer, and M. Schliwa, Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap, *Nature*, Vol. 348, 1990, 346–348.
- [37] Hill, D. B., M. J. Plaza, K. Bonin, and G. Holzwarth, Fast vesicle transport in PC12 neurites: velocities and forces. *Eur. Biophys. J.* Vol. 33, 2004, 623–632.

- [38] Michael Vershinin, Brian C. Carter, David S. Razafsky, Stephen J. King, and Steven P. Gross, Multiple-motor based transport and its regulation by Tau, PNAS, Vol. 104, no. 1, January 2 2007, 87–92.
- [39] Steven P. Gross, Michael Vershinin, and George T. Shubeita, Cargo Transport: Two Motors Review Are Sometimes Better Than One, Current Biology 17, June 2007, R478–R486.
- [40] D. Kenneth Jamison, Jonathan W. Driver, Arthur R. Rogers, Pamela E. Constantinou, and Michael R. Diehl, Two Kinesins Transport Cargo Primarily via the Action of One Motor: Implications for Intracellular Transport, Biophysical Journal, Volume 99, November 2010, 2967–2977.
- [41] G. L. van den Heuvel Martin and Dekker Cees, Motor Proteins at Work for Nanotechnology, review SCIENCE, 317, 2007, 333-336.
- [42] Kengo Usui, Tei Maki, Fuyu Ito, Atsushi Suenaga, Satoru Kidoaki, Masayoshi Itoh, Makoto Taiji, Takehisa Matsuda, Yoshihide Hayashizaki, and Harukazu Suzuki, Nanoscale elongating control of the self-assembled protein filament with the cysteine-introduced building blocks, protein science, Vol. 18, 2009, 960—969.
- [43] Martin G. L. van den Heuvel and Cees Dekker, Motor Proteins at Work for Nanotechnology, Science, Vol. 317, 2007, p. 333-336.
- [44] Ashutosh Agarwala, Henry Hessb, Biomolecular motors at the intersection of nanotechnology and polymer science, Progress in Polymer Science, Vol. 35, 2010, 252–277.
- [45] Andrew K. Boal, Hernesto Tellez, Susan B. Rivera, Nicholas E. Miller, George D. Bachand, and Bruce C. Bunker, The Stability and Functionality of Chemically Crosslinked Microtubules, nano micro small, Vol. 2, No. 6, 2006, 793 – 803.
- [46] Christian Brunner, Karl-Heinz Ernst, Henry Hess and Viola Vogel, Lifetime of biomolecules in polymer-based hybrid nanodevices, Nanotechnology, Vol. 15, 2004, S540–S548.
- [47] Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Introducción a la biología celular, Segunda Edición, Editorial Medica panamericana, México julio 2008, p. 163, 164 y 167.

- [48] Alexandre Lewalle, King's College, The Smallest Tweezers in the World, *The Physics Teacher*, Vol. 46, November 2008, 467-472.
- [49] A. Ashkin and J M Dziedzic, Internal cell manipulation using infrared laser traps, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 86, 1989, 7914-7918.
- [50] I. Yuichi, Y. Toyoshima Yoko, H. Iwane Atsuko, M. Sayuri, H. Hideo and Y. Toshio, Movements of truncated kinesin fragments with a short or an artificial flexible neck, *Biophysics Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, July 1997, 7275–7280.
- [51] Daniel Mazia, Gerald Schatten and Winfield Sale, Adhesion of cell to surfaces coated with polylisine; Applications to Electron Microscopy, *Journal of cell biology*, Vol. 66, 1975, 198-200.
- [52] Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. & Downing, K.H., High resolution model of the microtubule. *Cell*, Vol. 96, 1999, 79-88.
- [53] William D. Callister Jr., *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*, Segunda Edición, Editorial Limusa , 2009, 461.
- [54] D. Hopwood, Some aspects of fixation with glutaraldehyde, *J. Anat.*, Vol. 101, No.1, 1967, 83-92 83.
- [55] John A. Kiernan, Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do, *Microscopy Today*, Vol. 00-1, 2000, 8-12.
- [56] Carmen Noemí Hernández Candia, Sara Tafoya Martínez, Braulio Gutiérrez-Medina, A Minimal Optical Trapping and Imaging Microscopy System, *Plos one*, Volume 8, Issue 2, e57383, February 2013 1-10
- [57] Block S, Kinesin: what gives?, *Cell* Vol. 93, 1998, 5–8.