

# Modulación del citoesqueleto microtubular por la interacción de melatonina con calmodulina: sus posibles implicaciones fisiológicas

Gloria Benítez-King,<sup>1</sup>Lourdes Huerto-Delgadillo,<sup>1</sup> Fernando Antón-Tay<sup>2</sup>

## Summary

Many body rhythms are coupled to the photoperiod by the rhythmic secretion of the pineal hormone melatonin. Some mental disorders have been related to the disruption of circadian rhythms. The cellular mechanism for rhythmic synchronization by melatonin is not well understood. Recently it has been suggested that microtubule rearrangements by melatonin are mediated by melatonin binding to calmodulin. The anti-calmodulin effect of melatonin may explain the modifications in the neurotransmitter release and axoplasmic transport that follows melatonin administration. Microtubule assembly is a dynamic process which is inhibited "in vivo" and "in vitro" by  $Ca^{2+}$ /Calmodulin ( $Ca^{2+}$ /CaM). CaM antagonists prevent this inhibition by binding to  $Ca^{2+}$  activated CaM, thus blocking a formation of  $Ca^{2+}$ /CaM/tubulin/MAPs complex. Melatonin (MEL) binds to  $Ca^{2+}$ /CaM and it has been shown that it is able *in vivo*, to cause microtubule enlargement and neurite outgrowth, suggesting the existence of a CaM antagonistic mechanism of action. In the present work we studied MEL effects on microtubule polymerization. *In vitro* polymerization of twice cycled microtubule protein (6 mg/ml) was carried out at 30° and monitored after the addition of GTP by measuring the change in turbidity at 350 nm. Under control conditions, tubulin polymerization progressed steadily after a short 2 min lag, and reached equilibrium 18 min later with a polymerization rate of 0.014. In the presence of both 5  $\mu$ M of CaM and 1 mM of  $CaCl_2$ , the calculated polymerization rate was 0.004, the lag period became longer and the polymerization at equilibrium showed 40% inhibition with respect to control values. Complete reversal of  $Ca^{2+}$ /CaM inhibition of microtubule polymerization was observed with  $10^{-9}$  M of MEL or with reported CaM antagonists concentrations  $10^{-5}$  of TFP and 1  $\mu$ g/ml of compound 48/80. Our results support the hypothesis that the cytoskeletal rearrangements induced by MEL are due to its CaM antagonism.

## Resumen

Varios ritmos corporales se acoplan al fotoperiodo a través de la secreción rítmica de la hormona melatonina. Algunos trastornos mentales se han relacionado con modificaciones del ritmo de secreción de la melatonina por la pineal. El mecanismo a nivel celular por medio del cual la melatonina sincroniza los diferentes ritmos corporales no se conoce con exactitud. Recientemente se ha sugerido que la melatonina al actuar como un antagonista de la calmodulina, modula la dinámica de polimerización de los microtúbulos. Esta regulación a su vez explicaría el efecto de la hormona sobre la liberación de neurotransmisores y el transporte axoplásmico en el sistema nervioso central. El ensamble de los microtúbulos es un proceso dinámico que es inhibido por el sistema  $Ca^{2+}$ /Calmodulina tanto *in vivo* como *in vitro*. Los antagonistas de calmodulina previenen esta inhibición por unión a la calmodulina activada por el calcio, bloqueando de esta manera la formación del complejo  $Ca^{2+}$ /Calmodulina/tubulina/MAPs. La melatonina se une a la calmodulina y produce un alargamiento de los microtúbulos y el crecimiento de neuritas *in vivo*, sugiriendo que tiene un efecto antagonista sobre la actividad de la calmodulina. En este trabajo, estudiamos el efecto de la melatonina sobre la polimerización de microtúbulos *in vitro*. El ensayo de polimerización se

<sup>1</sup> Departamento de Neurofarmacología, División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calzada México-Xochimilco 101 Col. San Lorenzo-Huipulco 14370 México D.F.

<sup>2</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

llevó a cabo con tubulina purificada por dos ciclos de polimerización-despolimerización (6 mg/ml). La mezcla de reacción se incubó a 30° C. La polimerización se inició con la adición de GTP. Los cambios en la absorbancia se registraron a 350 nM cada 2 minutos. En condiciones control, la polimerización de microtúbulos progresó linealmente después de un tiempo de latencia de 2 minutos y alcanzó el equilibrio a los 20 minutos de iniciada la reacción. La velocidad de polimerización calculada en la fase lineal fue de 0.014 O.D./min. En presencia de 5  $\mu$ M de calmodulina y 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , la velocidad de polimerización disminuyó a 0.004 O.D./minuto, el periodo de latencia se alargó a 4 minutos y la polimerización se inhibió un 40% con respecto al control. Se observó que la melatonina  $10^{-9}$  M, previno completamente el efecto inhibitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina sobre la polimerización de los microtúbulos de manera semejante a dos antagonistas de calmodulina ( $10^{-5}$  M de trifluoperazina y 1  $\mu$ g/ml de compuesto 48/80). Estos resultados apoyan que los rearrreglos en el citoesqueleto inducidos por melatonina son mediados por su efecto antagonista sobre calmodulina.

## Introducción

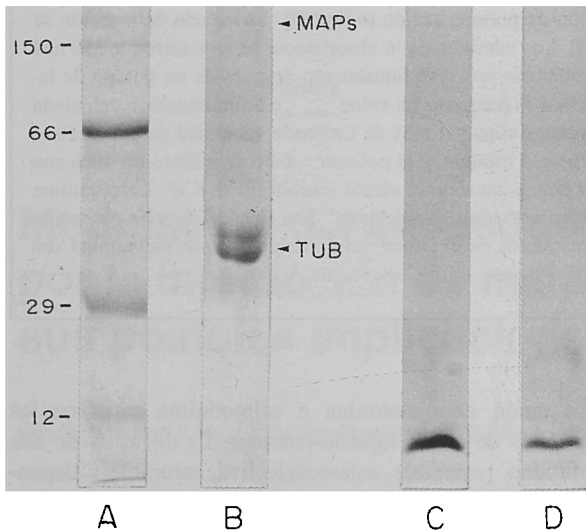
Varios ritmos corporales se acoplan al fotoperiodo a través de la secreción rítmica de la hormona melatonina. Algunos trastornos mentales como la depresión, la esquizofrenia y el trastorno bipolar, se presentan con la ruptura de varios ritmos circadianos entre los que se incluye el ritmo de secreción de la melatonina por la pineal, así como modificaciones en los niveles circulantes de la hormona.<sup>18,19</sup> A nivel del sistema nervioso central se ha demostrado que la melatonina actúa como un neuromodulador, modificando varios sistemas de neurotransmisión. En el mesencéfalo de la rata eleva las concentraciones de serotonina y GABA<sup>1</sup>. En el hipotálamo, inhibe la liberación de dopamina<sup>28</sup> y en varias regiones del cerebro modifica la afinidad y la capacidad de los receptores a benzodiazepinas<sup>20</sup>. Además, la hormona inhibe el flujo axoplásmico, proceso por el cual las enzimas involucradas en la síntesis de neurotransmisores se transportan a la terminal axónica.<sup>8</sup> Los mecanismos celulares a través de los cuales la melatonina sincroniza los ritmos corporales con el fotoperiodo y los que subyacen a su acción como neuromodular no se conocen con exactitud. En los procesos celulares modulados por la melatonina tales como la liberación de neurotransmisores y el transporte axoplásmico, el citoesqueleto microtubular y las enzimas activadas por el sistema  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina, tienen un papel importante.<sup>26</sup> Se tiene evidencia de que la melatonina modifica la red microtubular y la actividad de la calmodulina. En células en cultivo, la hormona antagoniza los efectos de la colchicina (fármaco que despolimeriza la red microtubular),<sup>10</sup> e induce el alargamiento de los microtúbulos y el crecimiento de las neuritas en las células NIE-115.<sup>4</sup> El ensamble de los microtúbulos es un proceso dinámico que depende de la presencia de GTP y de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs). Este proceso es inhibido por  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina.<sup>16,24</sup> Los antagonistas de la calmodulina previenen esta inhibición por unión a la calmodulina activada por  $\text{Ca}^{2+}$ , bloqueando de esta manera la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina/tubulina/MAPs.<sup>13,21</sup>

La unión de melatonina a calmodulina satisface los criterios de unión ligando-receptor. Es decir, es de alta afinidad, reversible, estereoselectiva, saturable y dependiente de calcio.<sup>6,7</sup> En este trabajo exploramos los efectos de la melatonina sobre la polimerización de los microtúbulos *in vitro* en presencia de la calmodulina. Los resultados señalan que los efectos de melatonina sobre los microtúbulos son originados por el efecto antagonista de la hormona sobre calmodulina.

## Material y métodos

La tubulina se obtuvo del cerebro de borrego y se purificó mediante dos ciclos de polimerización-despolimerización dependientes de la temperatura de acuerdo al método de Shelanski y col.<sup>23</sup> Después de dos ciclos de polimerización-despolimerización al sobrenadante se le adicionó 25 % de glicerol y se almacenó a  $-70^\circ$  C en alícuotas, hasta que se usaron en los ensayos de polimerización *in vitro*. La concentración de proteína en el sobrenadante se estimó con el método de Lowry,<sup>15</sup> empleando albúmina sérica bovina como reactivo patrón.

La calmodulina se purificó a partir del cerebro de borrego por cromatografía hidrofóbica con el método descrito por Gopalakrishna y Anderson.<sup>12</sup> La pureza de la calmodulina y de las proteínas microtubulares se verificó por electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida al 12 y al 10% respectivamente, de acuerdo con el método de Laemmli.<sup>14</sup> La polimerización de los microtúbulos se midió por turbidimetría con el método de Gaskin.<sup>11</sup> La reacción se inició por la adición de 1 mM de GTP a una mezcla de ensayo que contenía 6 mg/ml de tubulina, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 5  $\mu$ M de calmodulina en una solución amortiguadora que contenía MES 0.1 M pH 6.8,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM y EGTA 1 mM). La melatonina ( $10^{-11}$  a  $10^{-6}$  M), o  $10^{-5}$  M de trifluoperazina, o 30  $\mu$ g/ml de compuesto 48/80 se agregaron en una solución que contenía 50 mM tris pH 7.5 y 20% de glicerol, antes de adicionar el GTP. Las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 30° C, y se registró la absorbancia



**Figura 1.** Caracterización de las proteínas microtubulares y de la calmodulina por electroforesis. Las proteínas microtubulares (25 µg) obtenidas por dos ciclos de polimerización-despolimerización y la calmodulina (10 µg) purificada por cromatografía hidrofóbica se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y al 12%, respectivamente. A) Marcadores de peso molecular, B) Proteínas microtubulares, C) Calmodulina comercial, D) Calmodulina.

a 350 nM cada 2 minutos. Las velocidades de polimerización se calcularon en la parte lineal de las cinéticas obtenidas, con el programa Sigma Plot. El grado de for-

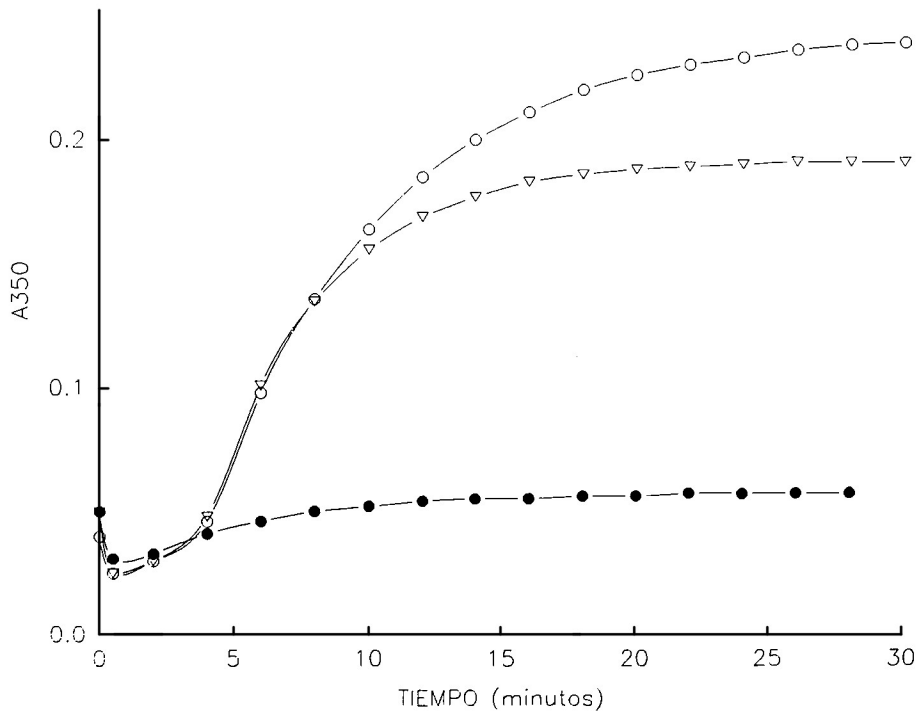
mación de microtúbulos se midió registrando la turbidez alcanzada en el estado estacionario.

*Materiales.* Todos los reactivos empleados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo).

## Resultados

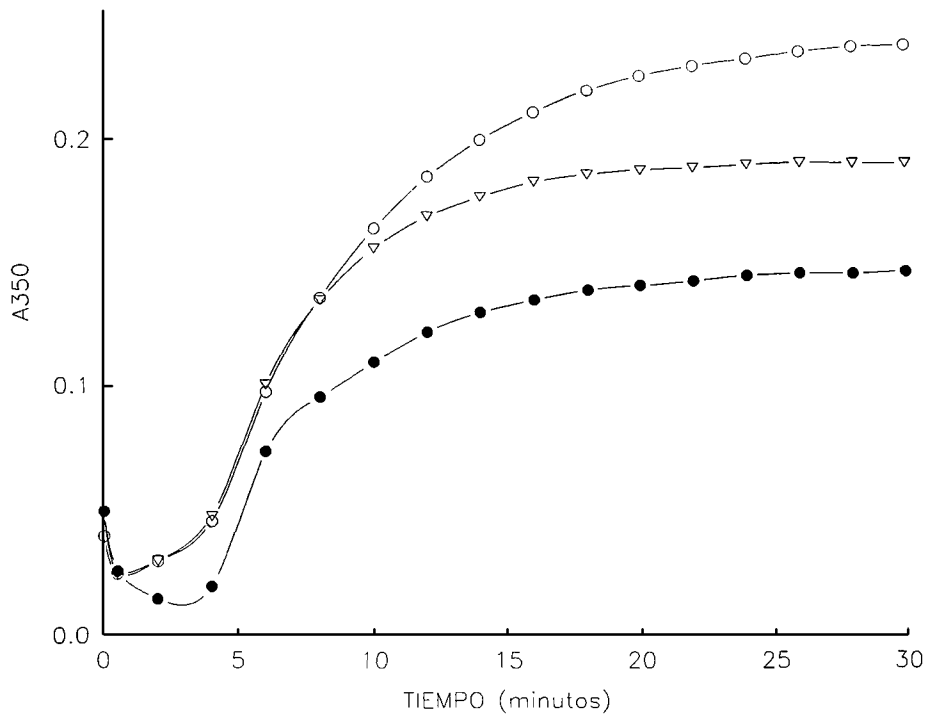
Las proteínas microtubulares corridas en un gel de poliacrilamida al 10%, se separaron en dos bandas principales correspondientes a tubulina alfa y beta y en una banda de 200,000 daltones correspondiente a las MAPs (fig. 1B). La calmodulina obtenida se separó por electroforesis en un gel de acrilamida al 12%. Como se muestra en la figura 1D, se detectó solamente una banda que comigró con la calmodulina comercial (fig. 1C).

En condiciones control (fig. 2), la polimerización de microtúbulos iniciada por la adición de 1 mM de GTP, mostró las tres fases características. Después de dos minutos de latencia (fase de nucleación), la polimerización se incrementó linealmente con una velocidad de 0.014 O.D./min (fase de alargamiento) y alcanzó el equilibrio después de 20 minutos de iniciada la reacción (fase estacionaria). La adición de 1 mM o 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , inhibió la formación de microtúbulos en un 25 y 75%, respectivamente. La presencia de calmodulina

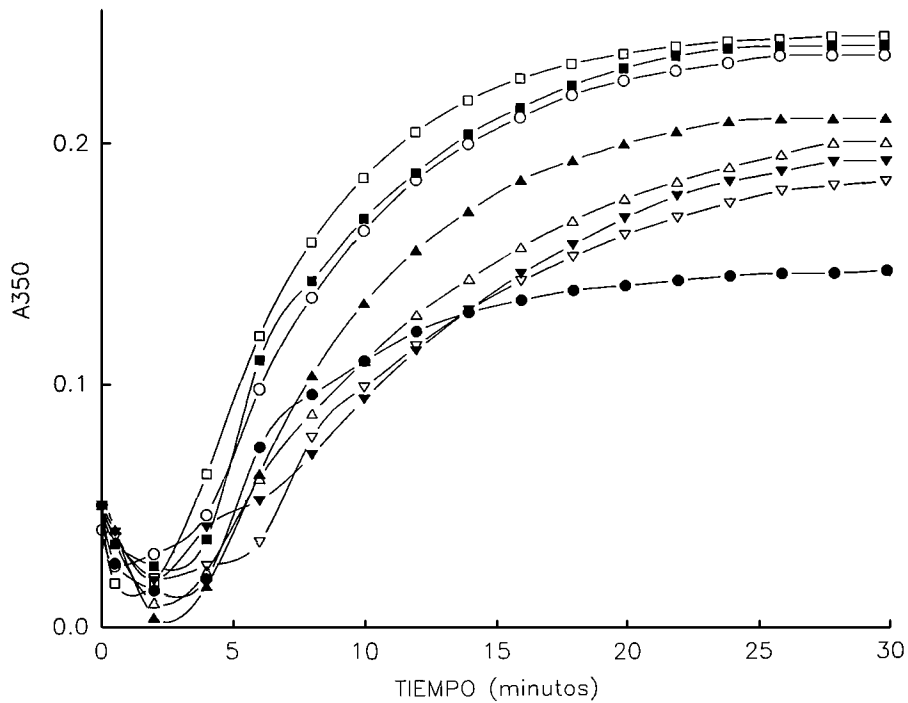


**Figura 2.** Efecto inhibitorio del calcio sobre la polimerización de microtúbulos. La polimerización de tubulina se llevo a cabo en buffer de polimerización (○), durante 30 min a 30° C, o en presencia de 1 mM (▽) o 5 mM (●) de  $\text{CaCl}_2$ .

MODULACION DEL CITOESQUELETO MICROTUBULAR: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS



**Figura 3.** Efecto inhibitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina sobre la polimerización de microtúbulos. La polimerización de tubulina se llevó a cabo en buffer de polimerización (○) durante 30 min. a 30° C, en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  (▽), o en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 5  $\mu\text{M}$  de calmodulina (●).



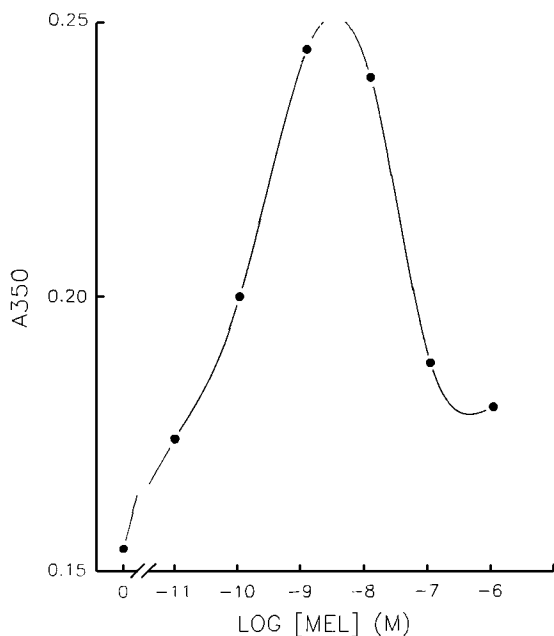
**Figura 4.** Efecto de la melatonina sobre la inhibición de la polimerización de los microtúbulos producida por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. Los ensayos de polimerización se llevaron a cabo en buffer de polimerización (○) durante 30 min. a 30° C, en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  + 5  $\mu\text{M}$  de calmodulina (●), o en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  + 5  $\mu\text{M}$  de calmodulina y melatonina 10<sup>-11</sup> (▽), 10<sup>-10</sup> (▲), 10<sup>-9</sup> (□), 10<sup>-8</sup> (■), 10<sup>-7</sup> (Δ), o 10<sup>-6</sup> M (▼).

acentuó el efecto inhibitorio del calcio sobre la polimerización de los microtúbulos *in vitro*. Con 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 5  $\mu\text{M}$  de calmodulina, la polimerización se inhibió hasta un 40% (fig. 3). La fase de latencia también se modificó en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y calmodulina; ésta se alargó de 2 minutos a 4 minutos y la velocidad de alargamiento disminuyó de 0.014 en el control a 0.006 O.D./min. La inhibición de la polimerización de los microtúbulos producida por  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina se previno con la adición de melatonina. El efecto óptimo se obtuvo con concentraciones fisiológicas de la hormona ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ). A estas concentraciones la cinética de polimerización y el tiempo de latencia fueron semejantes en condiciones control (fig. 4). La melatonina  $10^{-9}$  M en presencia de calmodulina incrementó un 66% la formación de microtúbulos. En contraste, con concentraciones suprafisiológicas de la hormona ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M), se tradujeron en una disminución de la formación de microtúbulos (fig. 5). También  $10^{-9}$  M de melatonina incrementó la velocidad de polimerización de microtúbulos de 0.016 O.D./min a 0.030 O.D./min (fig. 6). Concentraciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  de melatonina mostraron una velocidad de ensamble de 0.016 O.D./min que es igual a la del control. Con concentraciones de  $10^{-5}$  M de trifluoperazina y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de compuesto 48/80, se observó el efecto ya descrito sobre la polimerización de microtúbulos. Es importante hacer notar que las cinéticas de polimerización obtenidas con las concentraciones mencionadas de

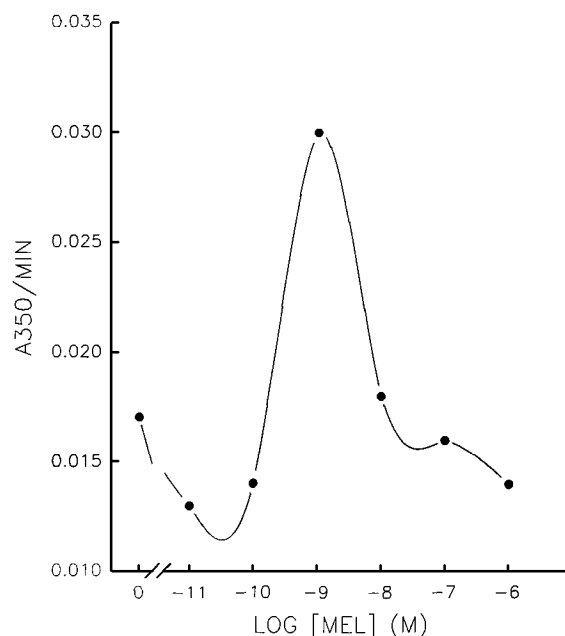
trifluoperazina y el compuesto 48/80 son semejantes a las obtenidas con melatonina  $10^{-9}$  M (fig. 7).

## Discusión

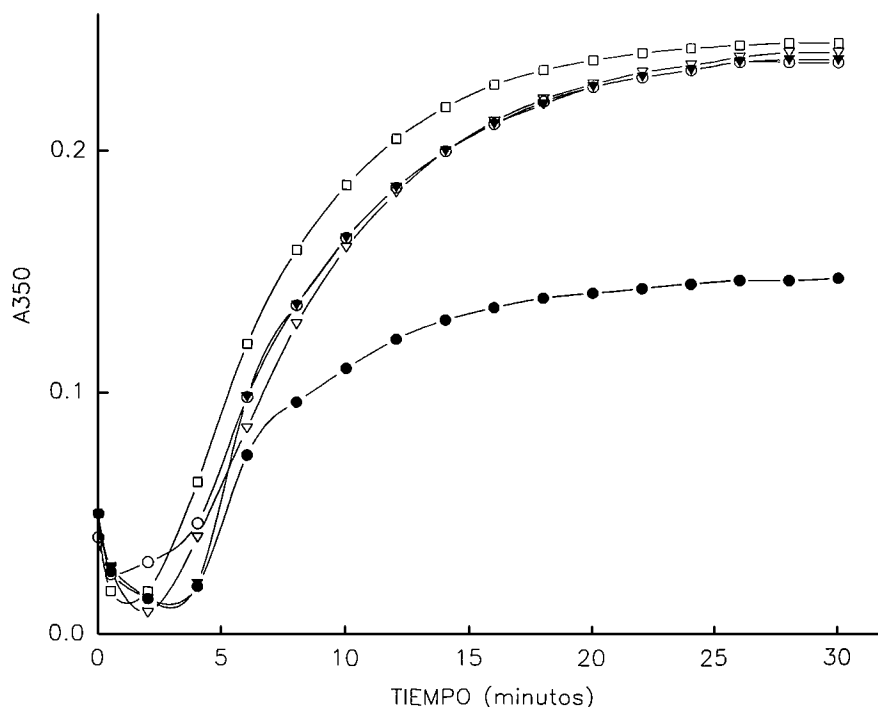
Los resultados obtenidos mostraron que los antagonistas de la calmodulina, la trifluoperazina y el compuesto 48/80, previnieron el efecto inhibitorio del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina sobre la polimerización de microtúbulos *in vitro* de manera semejante a lo reportado en la literatura.<sup>21</sup> Estos compuestos, al unirse a la región hidrofóbica de la calmodulina activada por calcio, impiden la formación de los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina/MAPs y  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina/tubulina favoreciendo la formación de los microtúbulos.<sup>13,17</sup> La trifluoperazina además de antagonizar a la calmodulina, se une a la tubulina produciendo una inhibición de la polimerización de los microtúbulos.<sup>3</sup> La melatonina  $10^{-9}$  M (concentración fisiológica) produjo el mismo efecto que los antagonistas clásicos. Además, datos previos indican que la hormona se une a la calmodulina con alta afinidad.<sup>2,7</sup> Sin embargo, con concentraciones farmacológicas ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) de la hormona, se observó una inhibición en la velocidad de polimerización y la formación de los microtúbulos. Este fenómeno se debe posiblemente a que la melatonina se une a la tubulina de manera inespecífica e independiente de calcio.<sup>7</sup> Un mecanismo semejante podría expli-



**Figura 5.** Efecto de la melatonina sobre la formación de microtúbulos. La formación de microtúbulos se cuantificó como se describió en métodos en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  + 5  $\mu\text{M}$  de calmodulina y varias concentraciones de melatonina.



**Figura 6.** Efecto de la melatonina sobre la velocidad de polimerización de microtúbulos. La velocidad de polimerización de la tubulina se determinó como se describió en métodos en presencia de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  + 5  $\mu\text{M}$  de calmodulina y varias concentraciones de melatonina.



**Figura 7.** Efecto de la trifluoperazina y el compuesto 48/80 sobre la inhibición de la polimerización de los microtúbulos producida por Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina. Los ensayos de polimerización se llevaron a cabo en buffer de polimerización (○), en presencia de 1 mM de CaCl<sub>2</sub> + 5 μM de calmodulina (●), o en presencia de 1 mM de CaCl<sub>2</sub> + 5 μM de calmodulina y melatonina 10<sup>-9</sup> M (□) o trifluoperazina 10<sup>-5</sup> M (▼), o 1 μg/ml del compuesto 48/80 (▽).

car los efectos en campana producidos por la administración de la melatonina *in vivo*.<sup>1,4</sup>

Los datos presentados aquí, indican que la melatonina actúa como un antagonista de calmodulina a concentraciones fisiológicas (10<sup>-9</sup>). Sin embargo, a dosis farmacológicas los efectos de la hormona son el resultado de la suma de la unión específica de la melatonina a la calmodulina y de la unión inespecífica de la melatonina a la tubulina. Estos resultados además explican los efectos de la melatonina sobre la formación de neuritas y el alargamiento de los microtúbulos en las células de neuroblastoma NIE-115<sup>4</sup> y confirman el efecto antagonista de la hormona sobre la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina.<sup>5</sup>

En el interior de las células existen mecanismos que regulan la presencia y la actividad de la calmodulina. Entre los primeros se encuentran los fenómenos de compartimentalización de la calmodulina y su unión a neuromodulina y a las ubicuitinas.<sup>9,25,27</sup> Entre los segundos, se han descrito la formación de gradientes intracelulares de calcio, y la concentración de las enzimas blanco de la calmodulina y sus sustratos.<sup>22,25</sup> Estos mecanismos, junto con la accesibilidad de la melatonina al interior de las células, daría lugar en cada fenotipo celular a una respuesta específica de la hormona.

El citoesqueleto en las neuronas tiene un papel importante en el transporte axoplásmico y en la liberación de neurotransmisores.<sup>26</sup> Es posible que los efectos de la melatonina sobre estos procesos celulares,<sup>8,28</sup> se originen por la modulación de la polimerización de los microtúbulos mediada por la interacción de la hormona con la calmodulina.

Finalmente, los datos refuerzan la hipótesis,<sup>4</sup> de que la melatonina podría sincronizar los diferentes ritmos corporales, a través de un rearrreglo cíclico del citoesqueleto. Por lo tanto, los cambios descritos tanto en el ciclo de secreción de la melatonina como en sus niveles circulantes pudieran jugar un papel en la fisiopatología de los trastornos mentales asociados con la ruptura de los ritmos circadianos.

#### Agradecimientos

*Este trabajo se realizó con el apoyo parcial de CONACYT donativo No D111-904693 y del CIMBYC.*

## Referencias

1. ANTON-TAY F, CHOU C, ANTON S, WURTMAN RJ: Brain serotonin concentrations: Elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science*, 162:277-278, 1968.
2. ANTON-TAY F, HUERTO-DELGADILLO L, ORTEGA-CORONA B, BENITEZ-KING G: Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. En: Toitou Y, Reiter RJ (eds). *Proceedings of Melatonin and the Pineal Gland from Basic Science to Clinical Application*. Elsevier, Amsterdam (En prensa).
3. APPU RAO AG, CANN JR: A comparative study of the interaction of chlorpromazine, trifluoperazine, and promethazine with mouse brain tubulin. *Molec Pharmac*, 19:295-300, 1981.
4. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res*, 9:209-220, 1990.
5. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res*, 557:289-292, 1991.
6. BENITEZ-KING G, CHAVEZ JL, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Caracterización de la unión melatonina-calmodulina. *Anales*, Instituto Mexicano de Psiquiatría, 3:13-18, 1992.
7. BENITEZ-KING G, CHAVEZ JL, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Characterization of melatonin binding to calmodulin. Melatonin and the pineal gland from basic science to clinical application. Satellite Symposium of the IX International Congress of Endocrinology. *Abst*, 15, 1992.
8. CARDINALI DP, FREIRE F: Melatonin effects on brain: Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and production of crystalloid and tubular formation in the hypothalamus. *Mol Cell Endocr*, 2:317-320, 1975.
9. ESTEP RP, ALEXANDER KH, STORM DR: Regulation of free calmodulin levels in neurons by neuromodulin: Relationship to neuronal growth and regeneration. *Current Topics in Cellular Regulation*, 31:161-179, 1990.
10. FITZGERALD TJ, VEAL A: Melatonin antagonizes colchicine-induced mitotic arrest. *Experientia*, 32:372-373, 1976.
11. GASKIN F, CANTOR CR, SHELANSKI ML: Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J Molec Biol*, 89:737-742, 1974.
12. GOPALAKRISHNA R, ANDERSON WB: Ca<sup>2+</sup>-induced hydrophobic site on calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenylsepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Comm*, 104:830-836, 1982.
13. KUMAGAI H, NISHIDA E, KOTAI S, SAKAI H: On the mechanism of calmodulin-induced inhibition of microtubule assembly in vitro. *J Biochem*, 99:521-525, 1986.
14. LAEMMLI UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
15. LOWRY OH, ROSENBOUGH HJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
16. MARCUM JM, DEDMAN JR, BRINKLEY BR, MEANS AR: Control of microtubule assembly-dissassembly by calcium dependent regulator protein. *Proc Natl Acad Sci EUA*, 75:3771-3775, 1978.
17. MATTSON MP: Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res Rev*, 13:179-212, 1988.
18. MENDELEWICZ J, LINKOWSKI P, BRANCHEY L: Abnormal 24 hr pattern of melatonin secretion in depression. *Lancet*, 11:1362, 1979.
19. MILES A, PHILBRICK RS: Melatonin and psychiatry. *Biol Psych*, 23:405-425, 1988.
20. NILES LP, PICKERING DS, ARCISZEWSKI MA: Effects of chronic melatonin administration on GABA and diazepam binding in rat brain. *J Neural Transm*, 70:117-125, 1987.
21. PERRINO BA, CHOU IN: Calmodulin modulation of adverse effects of Ca<sup>2+</sup> on microtubules and tubulin polymerization in vitro. *Toxic in vitro*, 3:227-234, 1989.
22. RASMUSSEN H: The complexities of intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling. *Biol Chem Hope-Seyler*, 371:191-206, 1990.
23. SHELANSKI ML, GASKIN F, CANTOR CR: Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci EUA*, 70:765-768, 1973.
24. SOLOMON F: Binding sites for calcium on tubulin. *Biochemistry*, 16:358-360, 1977.
25. STOCLET JC, GERARD D, KILHOFFER MC, LUGNIER C, MILLER R, SCHAEFFER P: Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Progr Neurobiol*, 29:321-364, 1987.
26. VALE RD, BANKER G, HALL ZW: The neuronal cytoskeleton. En: Hall ZW (ed). *An Introduction to Molecular Neurobiology*. Sinauer Associates, Inc, publishers, Sunderland, Massachusetts, 1992.
27. ZIEGENHAGEN R, GEHRKE P, JENNISSEN HP: Covalent conjugation of mammalian calmodulin with ubiquitin. *FEBS*, 237:103-107, 1988.
28. ZISAPEL N, LAUDON M: Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: Regulation of calcium entry. *Brain Res*, 272:378-381, 1983.