

7  
29°

Universidad Nacional Autónoma de  
México.

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de  
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades.

"Purificación y Caracterización de una  
Profilina de *Phaseolus vulgaris*."

## TESIS

Para obtener el grado de Licenciado en Investigación Biomédica  
Básica

presenta

Luis Vidali Rebolledo

Instituto de Biotecnología  
Cuernavaca, Morelos.

TESIS CON  
FALLA DE CEE



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

Los microfilamentos constituyen una parte esencial de la célula vegetal. Se les ha encontrado asociados con una gran variedad de procesos celulares.

La profilina es una pequeña proteína eucariota que se une a los monómeros de actina y aumenta el intercambio de ATP unido a esta. En altas concentraciones disminuye la capacidad de polimerización de la actina. También se ha vinculado a la profilina con fenómenos de transducción de señales ya que tiene afinidad por el segundo mensajero  $PIP_2$ .

En éste trabajo se presenta la purificación de la profilina de diversos tejidos del frijol, se identificó únicamente una isoforma que contiene una composición de aminoácidos muy similar a la profilina del polen de *Betula* y la secuencia de un péptido de digestión de ésta dió una enorme identidad con la profilina de polen. Los anticuerpos generados contra la proteína purificada presentan una alta especificidad y se pudieron utilizar para inmunocuantificarla en diversos tejidos e inmunolocalizarla. La clonación del cDNA está en curso y se espera que en el futuro se pueda tener una idea más amplia del papel que desempeña esta proteína en los sistemas vegetales.

<b>INDICE</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	3
GENERALIDADES DEL CITOESQUELETO	3
MICROFILAMENTOS VEGETALES	6
Componentes proteicos del citoesqueleto de actina	6
Actina	6
Miosina	7
CDPK	8
Localización y función de la actina y las proteínas asociadas.	9
Algas	9
Células diferenciadas	10
Actina	10
Proteínas asociadas a actina	12
Células vegetales dividiendose	13
Actina	13
Proteínas asociadas	15
Células vivas	15
Transducción de señales	16
Relación con la nodulación	18
PROFILINA	22
Distribución	22
Regulación de actina	23
Afinidad por actina	27
Afinidad por polifosfoinosítidos	30
Purificación y afinidad por Poli-L-Prolina	32
Propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y estructurales	34
Localización y concentración celular	38
Función in vivo	39
Genética y regulación	42
<b>OBJETIVOS</b>	47
<b>METODOLOGIA</b>	49
Producción de biomaterial	49
Extracción de la proteína	50
Acoplamiento de Poli-L-Prolina a Sefarosa	51
Cromatografía de afinidad con Poli-L-Prolina	52
Electroforesis SDS-acrilamida	53
Purificación por electroforesis desnaturizante	55
Electroforesis de dos dimensiones	55
Electrotransferencia e inmunoensayo (Western)	56
Producción de anticuerpos	58
Purificación de anticuerpos	58
Análisis de aminoácidos	59
Secuenciación	60
Inmunocuantificación	62
Inmunolocalización	62
Cuantificación de proteína	65

<b>RESULTADOS</b>	66
Purificación de una proteína que se une con alta afinidad a Poli-L-Prolina	66
Caracterización de la proteína de 14 KDa en diferentes tejidos	70
Caracterización de la isoforma	71
Análisis de aminoácidos	75
Secuencia parcial	78
Inmunocuantificación	79
Inmunolocalización	80
<b>DISCUSION</b>	104
Purificación de una proteína con alta afinidad por Poliprolina	104
Caracterización de la isoforma	107
Composición de aminoácidos	108
Secuencia	109
Inmunocuantificación	110
Inmunolocalización	112
Perspectivas	113
<b>CONCLUSIONES</b>	116
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	117
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	138

# INTRODUCCION

## GENERALIDADES DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto constituye la base estructural de la célula eucarionte, participa en la motilidad, transporte y división celular. Las funciones, descubiertas o hipotetizadas, de este organelo aumentan rápidamente. Se ha descrito su participación en: la división celular, la traducción, el posicionamiento del núcleo, la transducción de señales, el crecimiento apical, la diferenciación y en procesos de transformación celular. El citoesqueleto está compuesto por tres sistemas diferentes pero vinculados:

a) Los microtúbulos (MTs) están compuestos de dos isoformas de tubulina. Esta es una proteína globular con un peso aproximado de 50 KDa en todos los sistemas que se ha estudiado. Contiene un GTP unido con alta afinidad, forma estructuras fibrilares cilíndricas con un diámetro de 25 nm y una periodicidad de 13 subunidades. Estas estructuras se encuentran sometidas a una inestabilidad dinámica (Gelfand y Bershadsky, 1991; Frieden, 1985), a modificaciones postraduccionales (Baker, et al. 1986; Gundersen et al., 1987; Kirschner, 1986; Maruta, et al., 1986; Sherwin y Gull, 1989) e interaccionan con una amplia variedad de proteínas

accesorias, conocidas como MAPs (Microtubule Associated Proteins) (Gelfand y Bershadsky, 1991). Los MTs conforman la estructura básica de los unicelulares (cilios y flagelos eucariotes) (Bermudes, et al., 1987; Grain, 1986; Lynn, 1981), así como el huso mitótico (Gelfand, 1991) y juegan un papel importante en el transporte axonal y de vesículas (Gelfand, 1991).

Los MTs se organizan generalmente en "centros organizadores de microtúbulos" o MTOCs (Alberts et al., 1989), que se componen de tubulina gamma (Gelfand, 1991) y otras proteínas, aunque su composición así como su funcionamiento no están todavía bien comprendidos.

b) El segundo grupo de elementos del citoesqueleto son los microfilamentos (MFs), compuestos de actina, otra proteína globular que une fuertemente ATP y  $Mg^{2+}$ . Esta proteína posee un peso aproximado de 42 KDa en todos los sistemas estudiados y forma filamentos con un diámetro aproximado de 7 nm y una periodicidad de 50 nm. Estas estructuras se encuentran en un equilibrio dinámico llamado de "norria" (treadmilling), en donde los monómeros de actina que se disocian en un extremo del filamento (extremo "-") se asocian al otro extremo (extremo "+"). Los MFs interaccionan con una enorme variedad de proteínas asociadas (ABPs) (Actin Binding Proteins), que son las que regulan todos los procesos en los que intervienen estas estructuras. Las más estudiadas de las proteínas asociadas a MFs son las miosinas que son ATPasas activadas por actina. Se clasifican en dos familias, las de tipo I, con una cadena pesada de 100-140 kD, su región conservada es homóloga a la

cadena pesada de la miosina II, y contiene el sitio de unión a actina sensible a ATP. El resto de la molécula tiene funciones variadas en las diferentes moléculas, algunas funciones son: unión a actina no sensible a ATP, unión a membranas y unión a calmodulina. Las miosinas II tienen una subunidad catalítica de 200 kDa, que se divide en una región globular y otra filamentosa. La región globular contiene el sitio de unión a actina que en presencia de ATP se disocia de esta, la región filamentosa se autoasocia formando dímeros que a su vez pueden formar ensamblajes mayores. (Alberts et al., 1989; Kabsch, 1992; Follard y Cooper, 1986).

Los MFs se encuentran tanto en la corteza celular (Bretscher, 1991) como en el núcleo (Nishida et al., 1987); y se les han asignado funciones como la regulación de la traducción (Moon et al., 1983; Singer, 1992; Singer et al., 1989; Yang et al., 1990), el posicionamiento de receptores celulares (Cantley et al., 1991; Drubin et al., 1990; Hartwing et al., 1992; Payraastre et al., 1991; Shariff y Luna, 1992), así como el movimiento y contractibilidad celular (Kabsch, 1992; Noegel y Schleicher, 1989), el transporte intracelular (Domman et al., 1991; Theriot et al., 1992), en fagocitosis, endocitosis y exocitosis (Young et al., 1992) lo que los coloca en una posición crucial dentro de la célula.

c) La tercera clase de estructura son los filamentos intermedios, estos están compuestos por proteínas fibrilares con pesos moleculares que varían entre 40-70 kDa. Se dividen en cuatro tipos: 1) keratinas ácidas, 2) vimentinas y desminas, 3)



neurofilamentos y 4) laminas (Alberts et al., 1989), poseen regiones con alta similitud, así como zonas altamente variables. Conforman filamentos con un espesor de 10 nm y son los componentes principales de la matriz nuclear, las uñas de los vertebrados y el pelo de los mamíferos. Al parecer las proteínas citoplasmáticas evolucionaron a partir de los genes de las laminas (Doring, 1990) y en general se encuentran expresadas en tipos celulares diferenciados.

Existen algunos otros sistemas citoesqueléticos en los organismos inferiores (ciliados y diplomonadales); por ejemplo, los microfilamentos que no contienen actina (Grain, 1986) y las giardinas de *G. lamblia* que no se parecen a ninguna otra proteína antes estudiada (Peattie, 1990).

#### MICROFILAMENTOS VEGETALES

Componentes proteicos del citoesqueleto de actina.

Actina.

Los genes de actina que se han secuenciado en plantas codifican para proteínas con una alta homología con las actinas de otros sistemas. Una sola especie vegetal posee familias de genes de actina más diversas entre sí que las existentes en una sola especie animal y la diversidad existente en una sola planta es comparable con la que existe entre especies animales muy divergentes (Meagher, 1991). Por ello se piensa que las plantas deben tener isoformas

de actina especializadas para funciones específicas y/o la expresión tejido específica (McLean et al., 1990, Perez et al., en prensa). También parece que existen proteínas relacionadas con actina que tienen afinidad por DNasa I y que comparten algunos epítopes con actina (McCurdy y Williamson, 1987; Williamson et al., 1987)

Los productos de algunos de los genes han sido purificados y parcialmente caracterizados (Kato y Tonomura, 1977; Metcalf et al., 1980; Vahey et al., 1982; Turkina, 1987; Ma y Yen, 1989; Villanueva et al., 1990; Liu y Yen, 1992; Andersland et al., 1992). Estos productos pueden ser identificados por inmunoblot, afinidad por DNasa I y análisis fragmentos proteolíticos. No se han reconocido propiedades funcionales que sitúen a la actina vegetal aparte de las animales. Todas las actinas localizadas en plantas forman filamentos de 7 nm que unen fragmentos de miosina en el patrón de punta de flecha, unen anticuerpos antiactina y falotocinas (toxinas producidas por el hongo *Amanita phalloides* que se unen con alta afinidad a actina F) fluorescentes.

Los animales, los mohos (Pollard y Cooper, 1986) y la levadura (Drubin, 1990) tienen proteínas asociadas a actina que regulan la extensión de los filamentos, forman haces, cortan filamentos o les brindan sensibilidad a  $Ca^{2+}$ . Este tipo de proteínas no se han identificado todavía en las plantas.

#### Miosina

No se han clonado genes vegetales de miosina y el estudio

bioquímico de sus productos, así como su inmunolocalización ha sido difícil. Sin embargo, se ha logrado purificar varias miosinas vegetales (Kato y Tonomura, 1977; Ohsuka y Inoue, 1979; Vahey et al., 1982; Turkina, 1987, Ma y Yen, 1989) y dos anticuerpos animales han demostrado cruzar con polipéptidos vegetales en inmunoblots (Parke et al., 1986; Grolig et al., 1988; Tang et al., 1989; Lin et al., 1989). Por el criterio de tamaño, la mayoría de las supuestas miosinas vegetales entran dentro de las de tipo II, aunque algunas tienen pesos moleculares cercanos a las más grandes miosinas de tipo I. La falta de evidencia firme de la existencia de miosinas de tipo I y la presencia de las de tipo II en las células vegetales tiene que ser considerada en el contexto de que las miosinas vegetales se unen y mueven organelos. Esto contrasta con otros sistemas endonde las miosinas I son favorecidas para mover organelos y las de tipo II para soportar tensión. Los haces de actina vegetal son unipolares, pero existe un movimiento bidireccional de organelos en los cables citoplasmicos, lo que sugiere que existen haces de actina muy próximos y con ambas polaridades. La deformación de protoplastos sensible a citocalisina sugiere que la actomiosina vegetal genera tensión así como la fuerza agitadora que genera el flujo citoplásmico. Es claro que queda mucho por investigar en el campo de las miosinas vegetales.

#### CDPK

CDPK es una proteína cinasa de 52 kDa dependiente de calcio pero independiente de calmodulina y fosfolípidos, que fue

purificada de cultivos en suspensión de células de soya (Harmon et al., 1987; Putman-Evans et al., 1990). Esta cinasa es la única proteína asociada a actina, además de miosina, que ha sido caracterizada en plantas. CDPK codistribuye con actina F en las raíces de *Allium* y los tubos polínicos de *Tradescantia*, pero los estudios de afinidad *in vitro* muestran que no se une ni a la actina G ni a la actina F (Putman-Evans et al., 1989). Su unión *in vivo* a la actina es probablemente producida vía una proteína asociada. CDPK es estimulada 100 veces por concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$ , ( $K_{0.5}$  1.5  $\mu M$ ) y puede fosforilar eficientemente las cadenas ligeras de la miosina de molleja (Putman-Evans et al., 1990), lo que sugiere que podría tratarse de un importante regulador del citoesqueleto vegetal.

**Localización y función de la actina y las proteínas asociadas.**

### **Algas**

Las algas characeanas han influido profundamente en las ideas de la función y regulación de la actomiosina de las células vegetales. Las células internodales de estas algas muestran un vigoroso flujo citoplásmico (Kuroda, 1990). Los filamentos de actina forman grandes haces durante la interfase entre el endoplasma en flujo y el citoplasma cortical estacionario, todos los filamentos tienen la polaridad adecuada para mover una miosina endoplasmática en la dirección del flujo del endoplasma (Kersey et

al., 1976). Las miosinas están localizadas en los organelos endoplasmáticos (Grolig et al., 1988) lo que apoya la hipótesis de que los organelos muestran movimientos dependientes del ATP a lo largo de los haces de actina. La regulación de la interacción de la actomiosina podría ser controlada por CDPK, ya que existe un homólogo characeano localizado en el retículo y organelos, así como a lo largo de los haces de actina (Grolig et al., 1988).

### Células diferenciadas

#### Actina

Los microfilamentos individuales se agregan en grandes haces, los que se han observado en una gran variedad de tipos celulares diferenciados en las plantas vasculares. Estos haces se observaron inicialmente por microscopía electrónica, aunque su organización tridimensional fue apreciada mejor por microscopía de epifluorescencia (Parthasarathy, 1985). La orientación del citoesqueleto de actina coincide con la forma de la célula (Parthasarathy, 1985). Así, en las células elongadas que tienen un vigoroso flujo citoplásmico, como el tejido vascular de la raíz o las capas epidérmicas de las hojas o los coleóptilos, el citoesqueleto de actina consiste de grandes haces subcorticales conectados a una red periférica de elementos más finos, ambos con una orientación longitudinal. Las células esféricas como las de los cultivos en suspensión (ver más adelante), el endospermo (Abe et al., 1991) o el tejido de la fruta (Parthasarathy, 1985) contienen

redes tridimensionales de actina pero sin una orientación preferencial.

La función dominante de los grandes haces subcorticales de actina en las células elongadas, es producir el flujo citoplásmico o de organelos. Existe evidencia directa de que los haces que contienen actina F generan un movimiento unidireccional que solo se inhibe con concentraciones de citocalasina que desorganizan a estos haces (Parthasarathy, 1985).

Mientras que la función de la actina subcortical es bastante clara, la función de la red de haces periféricos finos, que se observa en la mayoría de las células, no es muy bien entendida. La actina periférica podría generar el movimiento individual de organelos (Parthasarathy, 1985), pero el abundante flujo citoplásmico organizado no es una característica común en la región cortical de la mayoría de las células. La actina periférica podría participar en la organización espacial de los componentes del citoplasma parietal. La microscopía electrónica ha mostrado asociaciones muy cercanas entre la actina cortical y el retículo endoplásmico (RE), lo que sugiere que la organización de este RE periférico está influenciada por la actina (Lichtscheidt, et al., 1990). Otro proceso con el que se ha vinculado a la actina es en la distribución polar de organelos, especialmente en el movimiento de los estatolitos (Buchen, et al., 1993), y el anclaje de los cloroplastos para maximizar la absorción de luz (Cox, et al., 1987).

Las células vegetales que se expanden por crecimiento apical

son un valioso material para estudiar la organización y función de la actina. Los tubos polínicos preparados por fijación química muestran gruesos y ondulantes haces de actina con una organización axial, prominentes en las regiones subapicales pero también se extienden a lo largo del tubo (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1992). Los métodos alternativos para la preparación del tejido han revelado un ensamblaje más complejo de haces muy finos y filamentos individuales también predominantemente axiales (Lancelle, et al., 1987; Pierson, 1989). La criosustitución ha mostrado haces de actina asociados a microtúbulos corticales, que a su vez están entrecruzados a la membrana plasmática (Lancelle, et al., 1987). Los elementos tubulares del RE y las vacuolas se encuentran ligados a este citoesqueleto cortical.

#### Proteínas asociadas a actina.

Los tubos polínicos son el tipo celular vegetal diferenciado, en el que la localización de la miosina está mejor estudiada. La miosina se encuentra asociada con las superficies exteriores de organelos como los amiloplastos, las mitocondrias, las vesículas precursoras de la pared, el núcleo vegetativo y la célula generativa (Tang, et al., 1989).

CDPK colocaliza con los haces axiales de actina F en los tubos polínicos (Putman-Evans, et al., 1989). A diferencia de la miosina, CDPK no muestra distribuciones puntuales indicativas de una unión a organelos. Así, la colocalización de CDPK y miosina observada en *Chara* no se observa en los tubos polínicos.

## Células vegetales en división

### Actina

Me concentraré en la organización del sistema de MFs de dos tipos celulares en división que muestran características diferentes de arquitectura: las células, altamente vacuoladas, de cultivos en suspensión y las células meristemáticas de la punta de la raíz.

Durante la interfase, la organización del citoesqueleto de actina es similar al descrito para las células diferenciadas. Se encuentran prominentes haces de filamentos de actina en la región subcortical, éstos dan lugar a elementos más delgados organizados al azar y en algunos casos acomodados en formaciones transversales paralelas a los MTs corticales. Sin embargo esta similitud desaparece cuando estos tipos celulares entran en mitosis. En las células altamente vacuoladas una red de actina persiste a lo largo de la mitosis y es prominente en el fragmosoma que suspende el núcleo y el huso mitótico (Kakimoto y Shibaoka, 1987; Traas et al., 1987; Lloyd y Traas, 1988). Los filamentos radiales de actina del fragmosoma conectan al fragmoplasto que se expande centrífugamente a las paredes celulares adyacentes. Esta observación llevó a pensar a Lloyd y Traas (1988) que esta actina juega un papel estructural esencial en el alineamiento del plano de división de las células vegetales.

En contraste, en el caso de las células meristemáticas, la evidencia indica que el citoesqueleto de actina está completamente desmantelado durante la profase (Clayton y Lloyd, 1985; McCurdy y



Gunning, 1990). En el trigo este dismantelamiento es precedido por una completa reorganización del citoesqueleto cortical de actina en formaciones paralelas, transversales al eje de la célula, de filamentos corticales (McCurdy et al, 1988; McCurdy y Gunning, 1990). Una vez que estas formaciones se desorganizan, normalmente antes de la metafase, las células completan la mitosis sin MFs detectables (McCurdy and Gunning, 1990).

El consenso en la organización de los MFs reaparece durante la citocinesis, en donde la actina está presente en el fragmoplasto (Clayton y Lloyd, 1985; Kakimoto y Shibacka, 1987; Seagull et al., 1987; McCurdy y Gunning, 1990). Aislado los complejos fragmosomales de células de cultivos en suspensión se demostró que los filamentos de actina de las dos mitades de estas estructuras tienen una polaridad neta consistente con el transporte unidireccional de vesículas hacia la placa de división (Kakimoto y Shibacka, 1988). Los MFs se encuentran también asociados con el huso mitótico en algunas células, pero la evidencia apunta a que no participa en generar la fuerza que separa a los cromosomas (Baskin y Cande, 1990). La actina debe más bien participar en la orientación e integridad estructural del huso acromático (Schmit y Lambert, 1990; Traas et al., 1989; Cho y Wick, 1990).

La evidencia arriba comentada sugiere diferentes funciones de la actina durante la mitosis. En las células vacuoladas, por ejemplo, los filamentos de actina participan tanto en la migración premitótica y posicionamiento del núcleo dentro del fragmosoma, así como en mantener la integridad estructural del fragmoplasto. En

contraste, la migración nuclear y la formación del fragmosoma no se observan en las células de la punta de la raíz, así que los filamentos de actina no se requerirían en este caso. Los filamentos de actina en varias células vegetales son sensibles a los fijadores químicos (McCurdy y Gunning, 1990), por lo que el progreso en el conocimiento de su organización durante la mitosis sólo puede ser alcanzado desarrollando técnicas de preparación que permitan visualizar las formaciones del citoesqueleto de actina como realmente sucede *in vivo*, ya sea mediante la microinyección de proteínas marcadas en el caso de células individuales, o con métodos de criofijación rápida en combinación con la microscopía electrónica o la inmunofluorescencia, para los tejidos vegetales.

#### Proteínas asociadas

Sólo la cadena pesada de la miosina (Farke et al., 1986) y CDPK (Putnam-Evans et al., 1989) han sido localizadas en células vegetales durante la división. La inmunofluorescencia de ambas proteínas muestra su acumulación en el fragmoplasto. La polaridad de los filamentos de actina y la presencia de miosina en esta estructura apuntan hacia un sistema de actomiosina para el transporte de vesículas hacia la placa de división, posiblemente regulado por  $Ca^{2+}$  vía CDPK.

#### Células vivas

Los MTs y los MFs se han observado en las células vegetales

vivas y su dinamismo se ha registrado durante la división, el crecimiento y el desarrollo. Al examinar las células vivas de los pelos de los estambres de *Tradescantia*, que fueron inyectadas con faloidina fluorescente, para marcar los MFs, se revelaron nuevos aspectos de la preparación del sitio para la división y la dinámica del citoesqueleto fragmoplástico. Durante la profase los microfilamentos aparecen en todo el cortex celular, quedando los de la región de la banda preprofásica (BPP) alineados transversalmente. Al desintegrarse la envoltura nuclear, estos se desensamblan específicamente, dejando una zona circunferencial en la que los MFs permanecen ausentes a lo largo de la división. Durante la citocinesis los microfilamentos surgen dentro del fragmoplasto, orientados paralelos a los MTs, pero excluidos de la zona en donde los MTs se sobrelapan y en donde las vesículas de la placa celular se agregan. Los MFs del fragmoplasto, de una forma similar a la de los MTs, se encogen de tamaño, se expanden de grueso, y eventualmente se desensamblan cuando la placa celular se ha terminado (Hepler, P.K. et al. 1993).

#### Transducción de señales

En las células eucariotas, las enzimas fosfatidilinositol 4-hidroxi cinasa (PI cinasa) y fosfatidilinositol-4-fosfato 5-hidroxi cinasa (PIP cinasa), son responsables de la formación de los segundos mensajeros fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP) y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). En las células vegetales,

se había considerado que estas cinasas estaban exclusivamente asociadas a la membrana, con la mayoría de la actividad en la porción interior de la membrana celular, pero se pudo demostrar que una porción significativa de la PI cinasa está asociada y reside en la fracción citoesquelética. Estos descubrimientos sugieren que las vías de biosíntesis de polifosfoinosítidos en las células vegetales deben ser reevaluadas para tomar en cuenta el citoesqueleto y que el PIP en si mismo puede jugar un papel único en la modulación de la integridad del citoesqueleto vegetal y la transducción de señales (Xu, F. et al. 1992). En otro trabajo también fueron detectadas las actividades de PI cinasa, PIP cinasa y diacilglicerol (DAG) cinasa en la fracción citoesquelética aislada de los microsomas y la membrana plasmática de células en suspensión de zanahoria. Las actividades de cinasa de lípidos están asociadas con la fracción de filamentos de actina aislada del citoesqueleto. La actividad de las PI y PIP cinasas en la fracción de actina F incrementa significativamente después de que las células son tratadas con una mezcla de enzimas degradadoras de la pared celular, en cambio la actividad de la DAG cinasa asociada a la fracción de actina F no fue afectada por el tratamiento. Los datos indican que al menos una forma de PI, PIP y DAG cinasa se asocia preferencialmente con los filamentos de actina y/o proteínas asociadas a actina, y que las actividades de PI y PIP cinasa asociadas al citoesqueleto pueden cambiar en respuesta al estímulo externo (Tan, E. Boss, W. 1992).

## Relación con la nodulación

Se ha sugerido que durante el crecimiento hacia el interior de los hilos de infección que produce *Rhizobium*, la planta debe de utilizar los procesos normales de crecimiento y división celular. Al iniciarse el hilo de infección, los procesos normales del crecimiento apical de la pared celular en el pelo radicular parecen estar invertidos. Así, una célula que normalmente crece hacia el exterior se convierte en un túnel que sigue al núcleo hacia la base de la célula del pelo radicular. El examen citológico del crecimiento apical de los pelos radiculares no infectados mostró conexiones citoesqueléticas entre el núcleo y la punta del pelo radicular en crecimiento (Lloyd, et al. 1987). Parecería que el inicio del crecimiento hacia el interior del hilo de infección se lleva a cabo por una reestructuración del citoesqueleto, el cual dirige las vesículas citoplasmáticas que contienen los componentes de la pared hacia el extremo en crecimiento de la célula. Sin embargo, no es claro como esta respuesta citológica puede estar asociada a los eventos de señalización de la superficie celular (Brewin, N.J. 1991).

Mientras que el hilo de infección invade a la célula en la capa más externa del cortex, su curso por las subsiguientes capas celulares se encuentra predeterminado en el tejido como una sucesión de células dediferenciadas con núcleos centrales agrandados. Cada célula tiene una sola tira citoplásmica anticlinal (fragmosoma), que se alinea con una tira similar en las células

inmediatas arriba y abajo en las capas celulares del cortex. Estas tiras delimitan el curso del crecimiento del hilo de infección. Se han observado patrones fragmosómicos transcelulares similares en *Tradescantia* en donde los MFs de actina juegan un papel importante en el acomodo del fragmosoma, el aparato transvacuolar que anticipa al plano de división, y en la formación de un sistema supracelular que parece prevalecer sobre las fronteras celulares. Esto se demostró induciendo a las células epidérmicas de la hoja de *Tradescantia* a la división mediante el daño de la hoja. Se formaron nuevos planos de división paralelos a las heridas lineales, y rodeando a los daños puntuales. Los nuevos planos de división se alinearon a través de las células, en lugar de estar las uniones desplazadas como en el tejido normal no dañado. En los primeros 30 min después del daño, la tinción con rodamina-faloidina mostró que un cinturón de finos filamentos corticales se desarrolla paralelo al daño. En la siguiente etapa, existe una migración del núcleo a la pared adyacente al daño, implicando una pronunciada asociación de filamentos de actina con el núcleo. La migración puede ser inhibida por citocalasina D confirmando el papel de la actina en la traumatotaxis. Más tarde, los filamentos de actina fueron vistos alinearse de célula a célula, paralelos al daño, anticipando el futuro plano de división. Por último los filamentos de actina se acumulan en el plano anticlinal, por toda la profundidad celular, contribuyendo de este modo a la formación del fragmosoma. Se ha demostrado que el fragmosoma contiene microtúbulos que unen el núcleo con el cortex y que además contiene filamentos de actina.

Los filamentos de actina están entonces participando en los estadios claves de la migración nuclear y en el alineamiento del plano de división (Goodbody, K.C. Lloyd, C.W. 1990).

Existen algunas similitudes interesantes entre la orientación en la formación de la placa de división del tejido dañado y la orientación y el crecimiento de los hilos de infección en la corteza de la raíz de la leguminosa. a) Durante la infección con *Rhizobium*, las células corticales externas que muestran fragmosomas orientados no entran en citocinesis, aunque se ha llevado a cabo la endoreduplicación nuclear. b) Así como el fragmosoma predetermina la orientación y la posición de la formación de la placa celular en el tejido dañado, también determina la orientación y la posición del desarrollo del hilo de infección durante la infección con *Rhizobium*, se postula que se usa una maquinaria citoesquelética similar en ambos casos. c) Aunque la placa celular crece en dos dimensiones como una estructura laminar, y el hilo de infección lo hace como una estructura cilíndrica que se ramifica ocasionalmente, su composición es muy similar, y ambas crecen por la acumulación de vesículas derivadas del aparato de Golgi. d) Así como la placa celular madura se debe de fusionar perpendicularmente con la pared celular madre para establecer la continuidad de la pared celular nueva y la vieja, y para crear un espacio en la nueva unión intercelular, el hilo de infección al avanzar se debe de fusionar y disolver localmente con la cara proximal de la pared celular madre para liberar el contenido del hilo de infección en el espacio intercelular. De esta forma, el proceso de la formación del hilo de

infección puede ser reiniciado en la superficie de la célula adjunta. Estas analogías hacen tentador sugerir que los hilos de infección crecen de una célula a la siguiente "asaltando" las estructuras citoesqueléticas que son creadas para responder al estímulo que produce el daño. (Brewin, N.J. 1991).



## PROFILINA

La profilina es una proteína que se encuentra ampliamente distribuida en las células eucariotas y se une a los monómeros de actina secuestrándolos reversiblemente en un complejo de alta afinidad que inhibe la polimerización de la actina. Este complejo se disocia *in vitro* en respuesta al tratamiento con los polifosfoinosítidos, PIP y PIP<sub>2</sub> (Haarer y Brown, 1990).

Inicialmente se aisló y cristalizó un complejo del bazo de ternera, que contenía actina y una proteína más pequeña que se llamó profilina (Carlsson, L. et al. 1977). En este trabajo se propuso que la asociación reversible de actina con profilina provee a la célula con un mecanismo para el almacenamiento de actina monomérica y el recambio controlado de microfilamentos, de ahí que su nombre sugiera que la profilina está antes o da lugar a los microfilamentos.

### Distribución

La profilina no estaba restringida al bazo, se encontró en una gran variedad de tejidos y líneas celulares cultivadas (Carlsson, L. et al. 1977). Posteriormente una proteína que inhibía la polimerización de actina fue purificada a homogeneidad de extractos de *Acanthamoeba castellanii*. Su presencia en la ameba tanto como en el hombre sugirieron que la profilina iba a ser tan ubicua como

la actina en las células eucariotas (Reichstein, E. et al 1979). Se descubrió la presencia de profilina en el esperma de *Thyone* (Tilney, L.G. et al. 1983). Los anticuerpos de conejo generados contra la profilina de *Acanthamoeba* reaccionaron con un polipéptido de 11,700 Da de *Physarum* pero con ninguna proteína de *Dyctyostelium* o *Naegleria* (Tseng, P.C.H. et al 1984). También se purificó profilina de los macrófagos alveolares del conejo y se documentaron similitudes estructurales y funcionales con las profilinas aisladas de otras células (DiNubile, M.J. Southwick, F.S. 1985) Más tarde se clonó la región codificante completa y extremos 5' y 3' de la profilina de macrófagos de ratón (Widada, J.S. et al. 1989). En levadura se clonó el gen PFY que codifica para una profilina (Magdolen et al, 1988). Se clonaron y secuenciaron dos genes de profilina en *Physarum polycephalum* (Binette et al. 1990). En plantas, empleando la fracción IgE del suero de un individuo alérgico al polen, se aisló de un banco de expresión de polen de *Betula verrucosa* un cDNA con homología a la profilina (Valenta et al. 1991).

#### Regulación de actina

Se demostró que la asociación con profilina es suficiente para explicar la persistencia del estado monomérico de una parte de la actina en los extractos de bazo, además, la profilina de bazo se recombina con la actina muscular para formar un complejo no polimerizable parecido al aislado de bazo (Carlsson, L. et al.

1977). En el trabajo inicial con la profilina de *Acanthamoeba* se mostró que regulaba la polimerización inhibiendo la nucleación. En sistemas reconstruidos, inhibía la velocidad inicial de polimerización (fase lag) pero no la cantidad final de la actina polimerizada. La inhibición podía ser revertida agregando núcleos de actina F sonicados (Reichstein, E. et al 1979). Se consideró posible que la profilina fuera una de las tantas proteínas que regulan la organización de actina en el citoplasma de *Acanthamoeba*.

Los estudios cinéticos detallados, mostraron que un exceso molar de 7 veces de la profilina de *Acanthamoeba* incrementa 17 veces la velocidad del intercambio del ATP en solución, con el unido a actina G de músculo (Mockrin, S.C. Korn, E.D. 1980). Los estudios bioquímicos posteriores en *Acanthamoeba* demostraron que la profilina inhibe la velocidad de nucleación de la polimerización de actina, la velocidad de elongación del filamento y también reduce la concentración de la actina F en el estado estacionario. El agregar profilina a soluciones de actina F causa su depolimerización y las mismas concentraciones en el estado estacionario son alcanzadas, ya sea que la profilina sea agregada antes de iniciar la polimerización, o una vez completada esta. La profilina también inhibe la actividad de ATPasa de la actina monomérica, siendo el complejo profilactina completamente inactivo (Tobacman, L.S. Korn, E.D. 1982).

Al agregar filamentos preformados (filamentos axosomales del esperma de *Limulus*) a extractos de *Thyone*, los monómeros de actina

rapidamente se ensamblaban en estos filamentos. El ensamblaje sólo se da en una parte del haz, la punta preferida de adición (extremo "+"). Se demostró la presencia de un encapuchador (caper), ya que la actina exógena se ensamblaba en ambos extremos. Cuando la profilina se agregaba a los haces de *Limulus*, la adición de actina al lado no preferido de crecimiento (extremo "-") se veía inhibida. Esto generó el siguiente modelo para explicar como la profilina puede regular la rápida extensión del proceso acrosomal in vivo: El complejo profilactina sólo puede agregarse al extremo "+". Una vez que el monómero se une al filamento, la profilina se libera, y es disponible para unir otro monómero de actina (Tilney, L.G. et al. 1983). En este modelo; un monómero de actina unido a una profilina no puede participar en la nucleación o sumarse al extremo "-" del filamento. Se puede sumar al extremo "+" del filamento. Cuando la profilina está unida al extremo "+" del filamento, los monómeros de actina no se pueden sumar a ese extremo, pero el protómero terminal de actina se disocia a su usual velocidad (Pollard, T.D. Cooper, J.A. 1984).

En mediciones hechas directamente con el microscopio electrónico se ha observado que las altas concentraciones de la profilina de *Acanthamoeba* inhiben la velocidad de elongación de los filamentos de actina muscular en 50 mM KCl, pero el efecto es mínimo en 50 mM KCl con 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Usando el cambio de fluorescencia en actina de *Acanthamoeba* marcada con pirenilo para determinar la polimerización, se confirmaron las observaciones previas de que la profilina de *Acanthamoeba* inhibe la nucleación

con más fuerza que la elongación, bajo condiciones fisiológicas (Tseng, P.C.H. et al 1984).

A concentraciones similares las dos profilinas de *Acanthamoeba* prolongan la fase lenta (lag) de la polimerización de actina, e inhiben la elongación débilmente en el extremo "+" y con fuerza en el extremo "-" del filamento (Kaiser, D.A. et al.1986).

Al reexaminar la interacción de la profilina de plaquetas con la actina se obtuvo evidencia de que un simple secuestro de monómeros de actina en un complejo 1:1 con la profilina no puede explicar muchos de los efectos de la profilina sobre el ensamblaje de la actina. Cuando está unida la profilina a la actina se aumenta mil veces la velocidad de disociación del ATP y también incrementa la velocidad de disociación del  $Ca^{2+}$ . La simulación cinética mostró que la profilina cambia entre los monómeros en subsegundos lo que le permite catalizar el intercambio de nucleótido. Los ensayos de polimerización mostraron que la profilina tiene diferentes efectos en la elongación de ambos extremos del filamento; inhibe más la elongación de la actina de plaquetas que la de músculo, siendo insuficiente la formación de un complejo 1:1 para explicar la fuerte inhibición de la polimerización. Se sugiere que los efectos observados *in vitro* son mejor explicados por un envenenamiento catalítico de la nucleación y un encapuchamiento débil. Aunque las plaquetas contienen sólo 1 profilina por 5-10 moléculas de actina, estas complejas reacciones le permitirían a la profilina tener una importante influencia en el ensamblaje de actina (Goldschmidt-Clermont et al. 1991b).

## Afinidad por actina

Estudiando el aumento en el intercambio del ATP unido a la actina al agregar profilina, se demostró que la profilina y la actina forman un complejo 1:1 con una  $K_d = 47 \mu M$  y que la unión de la profilina con la actina es rápida y reversible. El complejo profilactina une 1 mol de ATP/mol, como lo hace la actina G. La profilina no interacciona con ATP o  $Ca^{2+}$  (Mockrin, S.C. Korn, E.D. 1980). Un estudio comparativo posterior determinó la  $K_d$  para la formación del complejo 1:1 entre la profilina de *Acanthamoeba* y la actina de *Acanthamoeba* en el rango de 4-11  $\mu M$ , la  $K_d$  para la reacción entre la profilina de *Acanthamoeba* y la actina de músculo de 60-80  $\mu M$ , sin relación con las concentraciones de KCl y  $MgCl_2$ . La concentración crítica ([C]) para la polimerización de actina y la  $K_d$  para la interacción de actina y profilina son independientes la una de la otra, por lo que un cambio en la [C] de actina altera la cantidad de profilina unida a actina en el estado estacionario. Como consecuencia, la presencia de profilina amplifica el efecto de pequeños cambios en la [C] de actina sobre la concentración de actina F (Tobacman, L.S. Korn, E.D. 1982).

Utilizando los haces de *Limulus* como núcleos se determinó la [C] para el ensamblaje de cada uno de los extremos y la  $K_d$  del complejo profilactina = 10  $\mu M$  (Tilney, L.G. et al 1983). La profilina se puede unir tanto a monómeros de actina con una  $K_d$  de 5  $\mu M$  y al extremo "-" del filamento con una  $K_d$  de 50-100  $\mu M$ . Esto incluye dos diferentes  $K_d$ s, una para la profilina unida al monómero

de actina y otra para la unida a actina en el extremo "+" del filamento. La afinidad por el extremo es 10 veces menor a la del monómero, presumiblemente debido a la diferencia en conformación de las dos formas de actina o a impedimentos estéricos al extremo del filamento (Pollard, T.D. Cooper, J.A.1984).

La profilina aislada del cerebro incrementa la velocidad de intercambio del nucleótido de actina G con ATP, al igual que la profilina de *Acanthamoeba*. El análisis cinético dió Kds para el complejo profilactina de 1.1 y 1.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente a 50 y 200 mM KCl (Nishida, E.1985).

La Kd para la formación del complejo profilactina de los macrófagos del conejo fue  $3 \pm 0.8 \mu\text{M}$ . La afinidad de esta proteína por actina no cambió significativamente en presencia de varias concentraciones de KCl y  $\text{MgCl}_2$ , siendo el complejo estrictamente dependiente en la [C] de actina y en la concentración de profilina. Se analizó la interacción de profilina con actina en presencia de acumentina, una proteína de macrófago que inhibe el intercambio de monómeros de actina en el extremo "-" del filamento. Las bajas concentraciones de esta proteína causaron un decremento substancial en la concentración estimada del complejo profilactina. Si el complejo gelsolina-calcio, que bloquea el intercambio al extremo "+" del filamento, se agrega a las soluciones con profilina y actina en concentraciones subestequiométricas, causa un gran incremento en la concentración estimada del complejo profilactina (DiNubile, M.J. Southwick, F.S. 1985).

En una solución amortiguadora que contiene 50 mM KCl, 1 mM

MgCl<sub>2</sub>, la K<sub>d</sub> para la formación del complejo 1:1 entre la profilina de *Acanthamoeba* y la actina de *Acanthamoeba* es de 5 μM. Cuando la actina es modificada por la adición de un grupo pirenilo en la cisteína 374, la K<sub>d</sub> incrementa a aproximadamente 40 μM pero la [C] (0.16 μM) no cambia. La afinidad mucho más baja de la profilina por la actina modificada explica las anómalas curvas de [C] obtenidas para 5-10% de actina marcada con pirenilo en presencia de profilina y la velocidad de elongación del filamento cuando la polimerización es cuantificada por el incremento en fluorescencia de la actina marcada. Los ensayos de polimerización basados en la dispersión de luz de la actina sin modificaciones en presencia y ausencia de profilina dieron resultados similares para la K<sub>d</sub> (5-10 μM). Estas se determinaron por el incremento de la [C] aparente de la actina F en el estado estacionario con todas las concentraciones de actina hasta 20 μM y por la inhibición de las velocidades iniciales de polimerización de la actina nucleada tanto con actina F como con dímeros entrecruzados covalentemente. En la misma solución amortiguadora, pero con ADP en vez de ATP, la [C] de actina resultó ser más alta (4.9 μM) y la K<sub>d</sub> del complejo profilactina más baja tanto para la actina no modificada (1-2 μM), como para la 100% pirenilada (4.9 μM) (Lal, A.A. Korn, E.D.1985).

El complejo formado entre profilina y actina de bazo de ternera es más fuerte (K<sub>d</sub> < 0.1 μM en 50 mM KCl, y K<sub>d</sub> = 0.4 μM en 50 mM KCl y 1 mM MgCl<sub>2</sub>) que el formado con la actina de músculo (K<sub>d</sub> = 10 μM en 50 mM KCl 1 mM MgCl<sub>2</sub>). El complejo de bazo es también más fuerte que el de profilina y actina de *Acanthamoeba*. Hay



evidencia de un sitio de unión de alta afinidad a cationes divalentes en actina, que parece regular la interacción con la profilina (Larsson, H. and Lindberg, U.1987).

Tres diferentes métodos para determinar la constante de disociación entre la actina y la profilina de plaquetas mostraron que es entre 1 y 5  $\mu\text{M}$ , este valor es similar con la actina de músculo (Goldschmidt- Clermont et al. 1991b).

#### Afinidad por polifosfoinosítidos

El  $\text{PIP}_2$  es el único fosfolípido que en presencia de 80 mM KCl y concentraciones menores de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  disocia a la profilactina con la resultante polimerización de actina. El PIP tiene muy poca actividad y el PI es completamente inactivo. La profilina de plaquetas humanas y de bazo de ternera forma complejos estables con micelas de  $\text{PIP}_2$  (Lassing and Lindberg, 1988a).

También se caracterizó la interacción de la profilina de plaquetas y las dos isoformas de *Acanthamoeba* con los fosfoinosítidos. La profilina de las plaquetas se une a PIP y a  $\text{PIP}_2$  con relativa alta afinidad ( $K_d = 1 \mu\text{M}$  para  $\text{PIP}_2$ , determinado por equilibrio en filtración en gel), pero interacciona débilmente con PI o  $\text{IP}_3$ . Ambas isoformas de *Acanthamoeba* tienen una menor afinidad por  $\text{PIP}_2$  que la de plaquetas, pero la más básica (profilina-II) tiene una mayor afinidad ( $K_d = 10 \mu\text{M}$ ) que la isoforma acídica (profilina-I  $K_d = 100-500 \mu\text{M}$ ). Ninguna de estas profilinas se une a fosfatidilserina ni a fosfatidilcolina. La

diferencia en la afinidad por  $PIP_2$ , es paralela a la habilidad de estas profilinas en inhibir la hidrólisis de  $PIP_2$ , por la fosfolipasa C (PLC) soluble. La interacción de las profilinas con  $PIP_2$  es específica con respecto de los lípidos y de las proteínas. En *Acanthamoeba* las dos isoformas deben tener funciones especializadas en base de sus afinidades idénticas por actina (10  $\mu M$ ) y diferentes afinidades por  $PIP_2$  (Machinsky, L.M. et al.1990).

La profilina aislada de plaquetas se une con alta afinidad a pequeños grupos de moléculas de  $PIP_2$ , tanto en micelas como en bicapas construidas con otros fosfolípidos. La relación molar del complejo de profilina con  $PIP_2$  es de 1:7 en micelas y 1:5 en bicapas. La profilina compete eficientemente con la fosfolipasa C citosólica fosfoinosítido específica (PLC) de plaquetas por la interacción con el sustrato  $PIP_2$ , inhibiendo la hidrólisis de  $PIP_2$ , por esta enzima. Las concentraciones celulares y las características de unión de estas moléculas son consistentes con que la profilina es un regulador negativo de la vía de señales de los fosfoinosítidos, además de su función establecida como inhibidor de la polimerización de actina (Goldschidt-Clermont, et al. 1990).

El factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas pueden estimular la producción del segundo mensajero inositol trifosfato en células sensibles, pero la vía bioquímica para estos eventos ha sido incierta porque las reacciones no han sido reconstruidas *in vitro* con moléculas purificadas. Un tipo de reconstrucción posible requiere no solo el

factor de crecimiento, su receptor con actividad de tirosina cinasa, y la fosfolipasa C-gama 1 soluble, sino también a la profilina. Esta se une al substrato fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) e inhibe su hidrólisis por la fosfolipasa C-gama 1 no fosforilada. La fosforilación de la fosfolipasa C por la tirosina cinasa del receptor anula el efecto inhibitorio de la profilina y resulta en una efectiva activación de la fosfolipasa C-gama 1 (Goldschmidt-Clermont, et al. 1991a).

#### Purificación y afinidad por Poli-L-Prolina

La profilina fue purificada a homogeneidad de extractos de *Acanthamoeba castellanii* con un rendimiento del 30-45%, la proteína de amoeba era parecida pero no idéntica a la profilina aislada por otro método del bazo de ternera y plaquetas humanas, en donde se encontró acomplejada con actina (Reichstein, E. et al 1979).

El análisis del extracto de *Thyone* con PAGE-SDS mostró dos proteínas en una relación molar 1:1, actina y una proteína de 12.5 Kd con un pI de 8.4. Esta proteína se purificó con DEAE. Se concluyó que era profilina por su tamaño, punto isoeléctrico, relación molar con actina, incapacidad para unirse a DEAE y sus efectos en el ensamblaje de actina (Tilney, L.G. et al 1983)

La profilina se puede purificar mediante un procedimiento basado en la cromatografía de afinidad de la enzima prolil-hidroxilasa por su polipeptido inhibidor competitivo que utiliza la cromatografía con poliprolina 30,000 (Tuderman, L. et al.1975). Se

purifican también por afinidad con Poli-L-Prolina otras dos proteínas (PBP-1, PBP-2) de embriones de pollo. PBP-1 compuesta por dos proteínas con un PM de 15 y 42 KDa, siendo PBP-2 el producto de 15·KDa. Se confirmó que la proteína de 42 KDa es actina por su composición de aminoácidos, inmunoquímica y por polimerización, además el complejo PBP-1 inhibe a la DNasa I. La composición de aminoácidos de PBP-2 es similar a la de la profilina humana e inhibe la polimerización. La habilidad de la profilactina para unir poliprolina se debe a la profilina, incluso ésta sola posee mayor afinidad que el complejo, mientras que la actina por sí misma no tiene afinidad alguna (Tanaka & Shibata, 1985). Este protocolo se depuró y se utilizó para aislar la profilina y la profilactina rápidamente y en grandes cantidades, directamente de sobrenadantes de alta velocidad (100000 xg) de extractos crudos, tanto de bazo de ternera como de placenta humana. Las proteínas se pueden eluir activas con 30% DMSO. La profilina y las dos isoformas de profilactina se pueden separar con hidroxilapatita. Los complejos, que tienen una alta actividad específica en el ensayo de inhibición de DNasa I y producen filamentos al agregar  $Mg^{2+}$ , se pueden cristalizar (Lindberg et al. 1988). Se aplicó la poliprolina-Sefarosa también para la purificación de la profilina de *Acanthamoeba*, *Dictyostelium* y plaquetas. Lavando la matriz con 3 M urea y eluyendo la proteína con 6-8 M urea. El rendimiento es del doble de lo reportado en estos sistemas utilizando otros protocolos. La profilina se puede renaturalizar completamente con diálisis, lo que se demuestra por: la misma capacidad de unión a

actina y a poliprolina, la formación de cristales, el espectro idéntico en NMR y la inhibición de la polimerización de la actina. Tanto miosina II como  $\alpha$ -actinina se atrapan en la matriz de poliprolina-Sefarosa, pero esta interacción es debida a interacciones de la actina con la Sefarosa (Kaiser et al. 1989).

La purificación de la profilina de levadura mostró que es similar a otras en peso molecular, afinidad por Poli-L-prolina, en que retarda la velocidad de polimerización e inhibe la hidrólisis de ATP por actina G (Haarer et al, 1990).

La profilina también puede ser purificada del polen de *Vetula verrucosa* utilizando la cromatografía de afinidad con poliprolina (Valenta et al. 1991).

#### Propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y estructurales

La profilina de *Acanthamoeba* inicialmente se caracterizó como una proteína monomérica de 12-14 KDa, más pequeña que la profilina de mamíferos. Tiene una metionina y un pI de 6.4 en condiciones desnaturalizantes, un 28% de alfa hélice un 29% de estructura beta y contiene proporcionalmente más alaninas y menos metioninas, leucinas y lisinas de lo que se había reportado para las profilinas de mamíferos (Reichstein, E. et al. 1979). Una caracterización más detallada de la profilina de *Acanthamoeba* indicó que tiene un peso molecular de 11,700 determinado por sedimentación al equilibrio en ultracentrifugación y un coeficiente de extinción a 280 nm de 14000/M cm. Los anticuerpos de conejo contra la profilina de

*Acanthamoeba* reaccionaron solamente con un polipéptido de 11,700 entre las proteínas de la amoeba separadas por electroforesis. Durante la cromatografía en DEAE de los extractos solubles de *Acanthamoeba* la profilina se separó en dos fracciones, una que no se une y otra fuertemente unida. La profilina purificada de ambas fracciones fue idéntica por todos los criterios probados. La fracción fuertemente unida debió de estarlo indirectamente por actina (Tseng, P.C.H. et al. 1984).

Al secuenciar la profilina de *Acanthamoeba* mostró que contiene 125 residuos, está bloqueada en su extremo amino y tiene una trimetilisina. También se encontró la expresión de dos isoformas, las cuales difieren en 5 posiciones. Estas profilinas tienen un N terminal hidrofóbico y un COOH con residuos básicos. La región más conservada es la amino terminal que entonces se consideró la posible región de unión a actina (Ampe et al. 1985).

La profilina de *Acanthamoeba* purificada de acuerdo a Korn consiste en dos isoformas (profilina I y II) con el mismo peso molecular y reactividad a un anticuerpo monoclonal, pero diferentes puntos isoelectricos, movilidades en cromatografía de carboximetil-agarosa y HPLC de fase reversa. Los puntos isoelectricos de la profilina I y II son 5.5 y > 9.0 respectivamente. (Kaiser, D.A. et al. 1986).

La profilina II de *Acanthamoeba* fue secuenciada a partir de péptidos tripticos y de péptidos de BNPS-skatole. La secuencia es homóloga a la de profilina I, consiste de 125 aminoácidos, tiene bloqueado el amino terminal, contiene una trimetilisina en la

posición 103, pero difiere en al menos 21 posiciones, concentradas principalmente en el centro de la proteína. Contiene dos residuos básicos más que profilina I, lo que le da un pI mayor (Ampe et al, 1988).

La profilina de *Acanthamoeba* fue entrecruzada con actina via una unión cero isopeptídica usando carbodimida. El complejo unido covalentemente fue purificado y tratado con bromuro de cianógeno, cortando a la actina y dejando a la profilina intacta por no tener metioninas. La profilina con un pedazo de actina fue purificada por filtración en gel, electroforésis y electrotransferida a membranas de PCGF. Como el amino terminal de la profilina está bloqueado, la degradación de Edman sólo dio secuencia del fragmento de actina, comenzando con Trp-356. El conjugado fue digerido con tripsina y el péptido entrecruzado identificado por comparación con un patrón triptico de profilina tratada con carbodimida. El análisis de la secuencia de aminoácidos del peptido triptico entrecruzado dió dos aminoácidos cada ciclo. El orden corresponde a la actina comenzando en Trp-356 y la profilina en Ala-94. Por la ausencia de aminoácidos-PTH en ciclos específicos, se concluyó que el Glu-364 de actina está entrecruzado con la Lys-115 de la profilina. Los experimentos con las isoformas I y II de profilina dieron idénticos resultados. La región de entrecruzamiento es homóloga a secuencias en las proteínas encapuchadoras de filamentos, fragmina y gelsolina. (Vandekerckhove, J.S. et al 1989).

Los estudios continuaron también con las isoformas de profilina en mamíferos, en donde la profilactina preparada del bazo

de ternera puede fraccionarse con hidroxilapatita en dos picos. Uno con gama actina, el otro con beta actina, existiendo una equimolaridad de ambas proteínas. Las isoformas de profilina (I intacta, II sin el glutámico y la tirosina carboxiterminales) se distribuyen diferente en los dos picos (PI-A gama y PI+PII-A beta). PI tiene pI de 9.08 y PII son dos isoformas de 9.12 y 9.18 (Segura & Lindberg, 1984).

La interacción entre la profilina y la actina depende críticamente de el estado del carboxilo terminal de la actina, también en el caso de la profilina el C-terminus es de gran importancia para el comportamiento fisicoquímico de la proteína (Larsson, H. and Lindberg, U.1987).

La profilina de bazo de ternera es un sustrato *in vitro* de la proteína cinasa C (PKC) purificada de la placenta humana, con una  $K_m$  aparente de 4  $\mu M$ . El  $PIP_2$  es un activador efectivo de la fosforilación de profilina por PKC y causa un incremento máximo de 13 veces en la  $V_{max}$  con un efecto de la mitad del máximo en 40  $\mu g/ml$ . La acción del  $PIP_2$  no fue igualada por fosfatidilserina, ácido fosfatídico o fosfoinositol, mientras que el fosfatidilinositol monofosfato fue levemente estimulante. En contraste, la fosforilación PKC dependiente de la histona tipo III-s, la proteína básica mielina o la lipocortina-I no fueron afectadas por  $PIP_2$ . Se sugiere que el  $PIP_2$  modifica la naturaleza de las interacciones profilina-PKC (Hansson, 1988).

El análisis de los cristales de profilina mostró una extensa red intermolecular, más que un discreto "complejo



monomérico", compuesta por cintas de actina mantenidas en su sitio por columnas de moléculas de profilina, acuñadas entre subunidades de actina vecinas y corriendo perpendiculares a las cintas. La comparación de los datos obtenidos con microscopía electrónica, difracción de rayos X, espectroscopía, y bioquímica de la molécula de actina sugieren que una simple transformación relaciona a las cintas observadas en los cristales con la actina F. Los cristales muestran propiedades polimórficas particulares, que refuerzan la visión de que los giros y compresiones locales, reversibles, nucleótido dependientes y cooperativos dentro del filamento de actina son importantes para la generación y transducción de fuerza en el complejo actomiosina (Schutt, C.E. et al. 1989).

La profilina recombinante de polen expresada en *E. coli* tiene una alta afinidad por poli-L-prolina. Los IgE de los individuos alérgicos se unen tanto a la proteína natural y recombinante así como a la humana. La profilina humana y la de polen inducen producción de histamina en individuos alérgicos a profilina pero no en alérgicos a otros alérgenos de plantas. La similitud estructural de estas proteínas podría ser la responsable de mantener los títulos de IgE en el tipo I de alergia (Valenta et al. 1991).

#### Localización y concentración celular

La inmunotinción fluorescente mostró a la profilina distribuida uniformemente en el citoplasma de *Acanthamoeba*. Con inmunoensayos

se calculó que el 2% de la proteína de la amoeba es profilina y que la concentración de profilina es de 100  $\mu\text{mol/litro}$  de células (Tseng, et al. 1984).

La inmunolocalización ultraestructural de la profilina en leucocitos humanos y plaquetas demostró que en ambos tipos celulares una fracción significativa de la profilina se encuentra asociada a regiones de la membrana celular que no tienen filamentos de actina y otras estructuras discernibles (Hartwing, et al. 1989).

### Función in vivo

Se ha documentado el surgimiento reversible de complejos de alta afinidad de profilactina en extractos de plaquetas al activarse. Se utilizó poliprolina-Sefarosa para extraer la profilina, y se determinó la proporción de ésta unida a actina con la suficiente afinidad para soportar la dilución. Se demostró que las plaquetas en descanso no contienen complejos de alta afinidad, pero la estimulación con trombina los genera en segundos, y desaparecen 5 min después de la activación. La disociación de los complejos se correlaciona temporalmente con la acumulación de actina en el citoesqueleto insoluble al detergente triton X-100 (Lind et al., 1987).

La interacción específica receptor/ligando, que genera las señales transmembranales, induce la inmediata polimerización de actina y la formación de ensamblajes de microfilamentos cerca de la membrana plasmática. El complejo profilactina parece proveer a la

actina para la formación de estos microfilamentos. Una parte de la naturaleza regulatoria de este mecanismo es que el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato se puede unir a la profilina, disociando el complejo profilactina y liberando a la actina para su polimerización. Esto sugiere que el ciclo del fosfatidilinositol (PI), que juega un importante papel en la regulación celular, también debe controlar a la motilidad basada en microfilamentos. La neomicina, una droga que tiene una alta afinidad por los fosfoinosítidos e interfiere in vivo con el ciclo del PI, inhibe la polimerización de actina en plaquetas inducidas tanto con trombina como con ADP. Cuando el ADP es usado como agonista (pero no en el caso de la trombina) la inducción de la polimerización de actina puede bloquearse con aspirina. La introducción de  $Ca^{2+}$  en las plaquetas con el ionóforo A23187 o la estimulación de la proteína cinasa C (PKC) por el forbol-éster TPA no induce la polimerización de actina; tampoco la adición combinada de estos dos agentes. El ácido retinoico que inhibe a la PKC tampoco tiene efecto sobre la polimerización de actina inducida por trombina (Lassing, I. Lindberg, U. 1988).

Después de la activación de las plaquetas, la asociación de profilina con la membrana incrementa reversiblemente. Siendo esta la más importante evidencia hasta la fecha de la interacción entre profilina y los fosfolípidos in vivo (Hartwing, J.H. et al. 1989).

La estimulación quimiotáctica de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) está asociada con un incremento de dos veces en el contenido de actina F. En los leucocitos PMN sin

estímulo la profilactina celular está a su máxima concentración. Después del estímulo se disocia el complejo, liberándose los monómeros de actina en 10 seg, llegando la concentración de profilactina a un mínimo en 40 s y se mantiene constante mientras la célula se encuentre expuesta al quimioattractor (más de 30 min). Si se suspende el estímulo el complejo se reasocia en 20 seg. El análisis cuantitativo de estas reacciones, mostró que que la actina liberada y reunida por la profilina puede únicamente explicar un pequeño porcentaje del cambio total en la actina F. Se determinó una relación molar de la actina con la profilina de 1 a 5.2. Aunque la profilina libera a la actina en el momento apropiado para estimular su ensamblaje durante la exposición al quimioattractor, la concentración de profilina en los leucocitos PMN es insuficiente para explicar el alto contenido de actina que permanece sin polimerizar. Además la cantidad de la actina liberada por la profilina es muy pequeña para explicar los enormes cambios en el estado de polimerización de la actina durante la estimulación con el quimioattractor (Southwick and Young. 1990).

La microinyección, en células normales de riñón (NRK), de la profilina mamífera expresada en *E. coli* o la purificada de cerebro bovino, produjo la disminución dosis-dependiente de la actina F, así como una dramática reducción de la actina y la  $\alpha$ -actinina en las fibras de estrés. También se produjo una fuerte inhibición en la extensión de los lamelipodia. La microinyección no causó perturbación de los contactos focales al sustrato, la depolimerización de los filamentos en la banda circunferencial no

lamelipodial, o en los anillos contráctiles de división, incluso la citocinesis se mantuvo normal. En contraste con la profilina pura, la microinyección de complejos de profilactina de alta afinidad indujeron un incremento en la actina F celular y reforzaron la actividad de "fruncido" (ruffling). Esto sugiere que el complejo se debe disociar en la célula y que debe de haber varios estados de profilina que difieren en su habilidad para unir o liberar actina. De tal forma que la profilina y la profilactina funcionarían como reguladores de un pequeño grupo de filamentos de actina en la célula (Cao, et al. 1992).

#### Genética y regulación

Existe una sólo copia del gen PFY que codifica para la profilina en levadura, y que se pensó era requerido para la germinación de la espora y la viabilidad celular. El gen mapea en el cromosoma XV y está ligado al marcador ADE2. El transcrito primario contiene un intrón. El gen se transcribe constitutivamente y codifica para un polipéptido de 126 aminoácidos. El peso molecular deducido es de 13,340 KDa, que coincide con el peso del producto de una traducción *in vitro* del transcrito del cDNA correspondiente (Magdolen et al, 1988). Las cepas con disrupciones o deleciones del gen sobreviven, aunque crecen lentamente, son sensibles a la temperatura, pierden la forma elipsoidal típica, crecen mucho más grandes de lo normal, son multinucleadas, tienen delocalizada la deposición de quitina y presentan una distribución

alterada de actina (Haarer et al, 1990).

La proteína CAP es parte del complejo adenilato ciclasa de *S. cerevisiae*. Su N-terminal es necesario para la respuesta celular a RAS. La pérdida del C-terminal está asociada a defectos nutricionales y morfológicos. Las mutantes en *cap* geman al azar y tienen defectos en la distribución de actina. Los defectos nutricionales y morfológicos asociados a la pérdida del C-terminal son suprimidos por la sobreexpresión de *PFY*, el gen que codifica para profilina. El fenotipo de las mutantes en *PFY* se asemeja al de las que no poseen el C-terminal de CAP. El estudio de las mutantes de profilina de levadura y las proteínas de *Acanthamoeba* sugiere que la supresión de las mutantes en *cap* es independiente o adicional a la habilidad de unir actina. Esta habilidad podría ser la unión a fosfoinosítidos. La profilina podría proveer un vínculo entre las señales de crecimiento y el remodelado del citoesqueleto (Vojtek, A. et al. 1991).

La sobreproducción de actina es letal para las células de levadura. En cambio la sobreexpresión de el gen de profilina *PFY*, no conduce a ningún fenotipo. La sobreproducción de la profilina puede compensar parte de los efectos dañinos de la sobreproducción de actina en proporción a la concentración de profilina expresada. Esto demuestra que la profilina y la actina interaccionan *in vivo*. Los estudios de inmunofluorescencia sugieren que la supresión actúa reduciendo el ensamblaje de actina. Se observó también que la sobreproducción masiva de profilina no puede restaurar completamente el fenotipo silvestre (p. ej. la apariencia silvestre

del sistema de MFs). Esto indica que el secuestro de monómeros no es el único mecanismo mediante el cual se controla el balance de la polimerización de actina en levadura (Magdolen, et al. 1993).

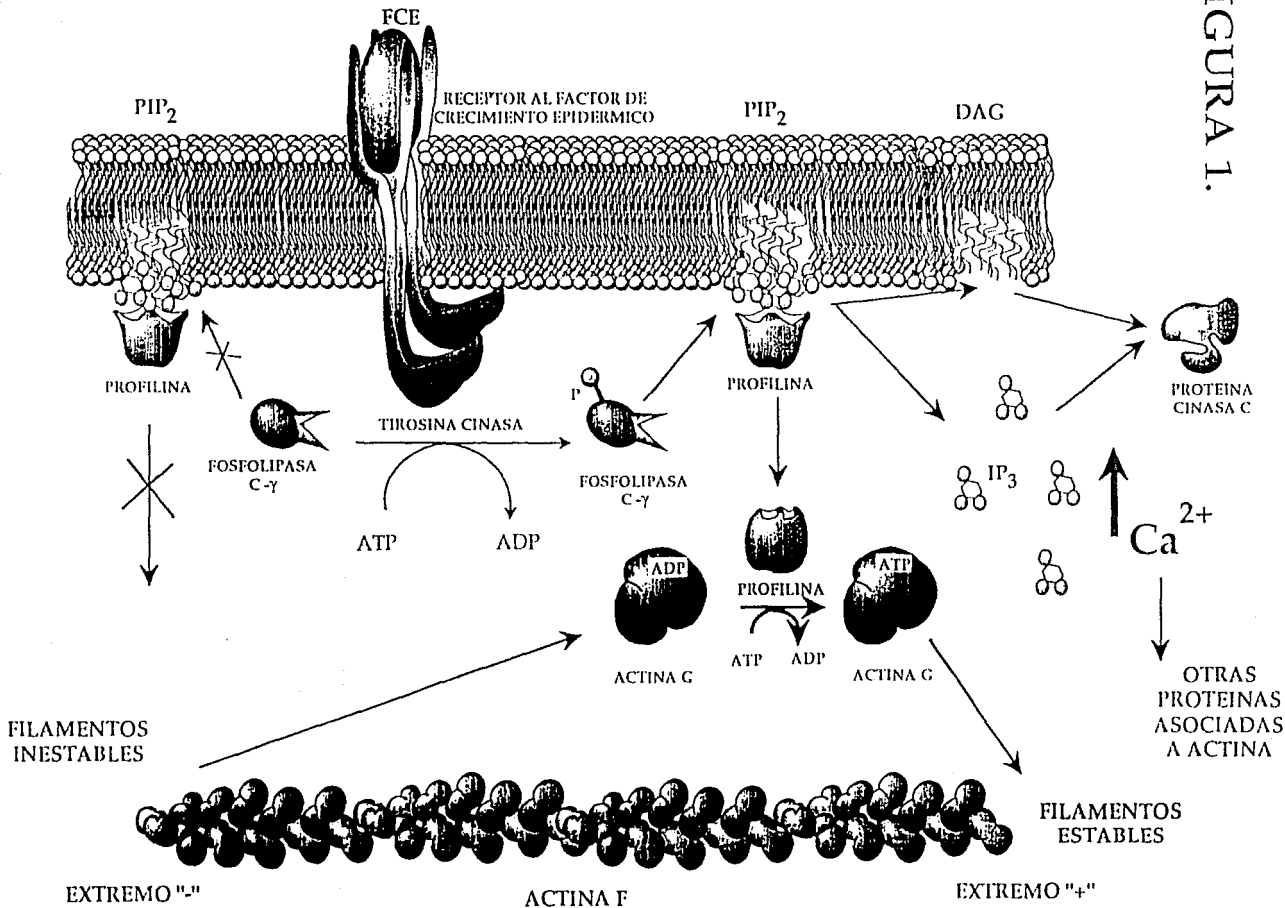
La secuencia del cDNA de la profilina de los macrófagos del ratón tiene un 95% de homología con la humana y un 92% con la bovina. A nivel de nucleótidos es un 94.4% homóloga con la humana siendo el 65% de esta diferencia es debida al tercer codón (Wicada, J.S. et al. 1989).

Los dos genes de profilina en *Physarum polycephalum* contienen dos intrones y los exones codifican para 125 amino ácidos ambos son 66% idénticos entre si, 54% con *Acanthamoeba*, 46% con levadura, 22% con ratón, 21% con ternera y 21% con humano. La profilina A se encuentra en amoebas, cistos y esporas maduras, la profilina P en plasmodios esferulando, no coexisten las dos isoformas. Esta es una importante evidencia de la regulación de profilina durante el desarrollo de *Physarum* (Binette et al. 1990).

*Chickadee* es uno de los genes de un pequeño grupo de mutantes que atrofia el transporte de citoplasma de las células nodriza de *Drosophila*. Se clonó el gen *chickadee* y se encontró que es 40% homólogo a la profilina de levadura y *Acanthamoeba*. Las células nodriza que no poseen la profilina específica de ovario no pueden sintetizar las redes citoplasmáticas de actina correctamente. Los núcleos de las células nodriza se desplazan bloquean el flujo del citoplasma. Lo anterior sugiere que la síntesis de nuevas redes citoplasmáticas de actina es responsable de mantener la posición nuclear en las células nodriza (Cooley et al. 1992).

# MODELO DE ACCION DE LA PROFILINA

FIGURA 1.





**Figura 1.** Modelo de acción de la profilina. En las células animales el receptor del factor de crecimiento epidérmico se dimeriza al recibir al factor. El dímero tiene en la cara citoplásmica de la célula actividad de tirosina cinasa; entre las varias proteínas que fosforila se encuentra la fosfolipasa C. Una fracción de la profilina se encuentra unida a la membrana interaccionando con grupos de  $PIP_2$ , inhibiendo la actividad de la fosfolipasa sobre estos e incapaz de interaccionar con la actina. Cuando la fosfolipasa se fosforila aumenta su afinidad por los fosfolípidos y la profilina se disocia de la membrana quedando libre de interaccionar con la actina. Los fosfolípidos son cortados por la fosfolipasa en los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ). La profilina incrementa la velocidad del intercambio del ATP de la actina generándose más actina ATP que puede polimerizar y formar filamentos estables.

## OBJETIVOS

El citoesqueleto de actina parece ser un organelo fundamental para la célula vegetal. Se ha demostrado su participación en procesos como la división nuclear y celular, el flujo citoplásmico, el transporte de organelos, el crecimiento celular, la respuesta al daño y recientemente en el anclaje de algunas enzimas que participan en la transducción de señales.

Las principales lagunas en el conocimiento de este complejo sistema se deben a que no se han identificado suficientes proteínas asociadas a actina. Precisamente son éstas las que regulan el dinamismo de los MFs en otros sistemas, y es de esperar que las plantas no sean la excepción. Del sistema de MFs vegetal se han identificado y caracterizado, como ya se vió, únicamente miosina y CDPK, siendo la caracterización de la miosina todavía deficiente.

Para profundizar en el estudio de la regulación de los MFs vegetales es indispensable caracterizar un mayor número de proteínas asociadas a actina vegetal. Entre las proteínas de mayor importancia podría citar a la profilina, a la  $\alpha$ -actinina y a la gelsolina. Las tres proteínas unen actina, la primera en su estado monomérico, la segunda en su estado filamentosos y la última en ambos estados dependiendo de las concentraciones de calcio.

En vista de la existencia de un protocolo de alta afinidad para purificar la profilina vegetal y por ser una proteína

abundante en otros sistemas se seleccionó para caracterizarla detalladamente.

La elección del frijol como modelo de estudio se debe básicamente al interés específico de profundizar en la participación del citoesqueleto en el proceso de simbiosis con el *Rhizobium*. Como se comentó anteriormente, existe evidencia indirecta de que el citoesqueleto y particularmente el sistema de microfilamentos debe estar participando en la formación del hilo de infección, y es de esperar que también participe en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis. La profilina probablemente regula la organización de la actina, funcionando como vínculo entre las señales del exterior y el sistema de MFs. Este tipo de hipótesis se podrían contrastar una vez que se cuente con herramientas tales como, la proteína puura, los anticuerpos específicos y la clona correspondientes.

Los objetivos del presente trabajo son: 1) la purificación de la profilina de *P. vulgaris* mediante la cromatografía de alta afinidad por poli-L-prolina, 2) la producción de anticuerpos policlonales específicos, 3) la inmunocuantificación de la proteína 4) y su inmunolocalización.

## METODOLOGIA

### Producción de biomaterial

Todo el material que se utilizó fue de *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Jamapa.

Los hipocotilos y radículas se obtuvieron en botes germinadores (4 l); las semillas (0.5 l), se esterilizan superficialmente con hipoclorito de sodio comercial (cloralex) diluido al 5% (0.5 l) durante 10 min (mayores concentraciones de cloro o mayores tiempos de incubación reducen considerablemente la viabilidad de las semillas), se enjuagan con abundante agua tridestilada, se escurren con una gasa en la boca del bote ajustada con un liga y acomodando el bote en ángulo para que terminen de escurrir. En esta posición se incuba el bote en la obscuridad a 30°C, las semillas se riegan cada 12 h y se escurren de manera que siempre se mantengan húmedas, al quinto día las raíces e hipocotilos alcanzan un tamaño promedio de 4 cm. Se cosechan, separando a mano el hipocotilo de los cotiledones y guardando los hipocotilos a -70 °C hasta su uso, de un bote germinador se obtienen aprox 100g de hipocotilos y radículas.

Los nódulos y las hojas se obtienen de plantas adultas. Las semillas se esterilizan en hipoclorito al 10% durante 20 min (este tratamiento produce lesiones en muchas de las semillas), aquellas

que no se dañan se enjuagan con abundante agua tridestilada estéril y se germinan a 30 °C en charolas de aluminio estériles con papel secante húmedo en el fondo y tapas de papel aluminio. Al tercer día los germinados se siembran en un agujero de 2 cm de profundidad en macetas de vermiculita, inoculándose con *Rizobium tropici* (CIAT 899), crecido en medio líquido (FY) toda la noche, aplicándose 1 ml de este medio por germinado. Se colocan cinco plantas por maceta y se crecen con medio hidropónico sin nitrógeno. Un mes después de la inoculación, se cosechan los nódulos y las hojas. Se cosecharon un total de 300 plantas, con un rendimiento aproximado de 100g de nódulos y varios kilos de hojas. Este material se conservó a -70 °C grados hasta su uso.

#### Extracción de la proteína

El tejido congelado con N<sub>2</sub> líquido se pulveriza en un molino de café y la proteína se extrae del polvo, en agitación constante durante 1 hr con una solución amortiguadora estabilizadora de microfiliamentos (SEM). Esta solución consta de: 10 mM HEPES (N-[hidroxietilpiperazina-n'-(2-ácido etanesulfónico)]), 10 mM Acetato de Mg, 2 mM EGTA (etilen-glicol-bis(B-aminoetil eter)), 1% PTE (polihidroxietileno-10-tridecil eter), 1 mM PMSF (floururo fenilmetilsulfónico) , 1 mM DTT (ditiotreitol), ajustado a pH 7.4 con KOH, y se centrifuga a 30 000 g durante 1hr a 4°C. El sobrenadante se filtra con "miracloth" (magitel). Los extractos pequeños se obtienen homogenizando en un mortero a 4°C, 1 g ó menos de tejido

con 2 vol. (2 ml o menos) de una solución de Tris-HCl (Tris-(hidroximetil) aminometano) 20 mM, pH 8. El homogenizado se centrifuga en una microcentrífuga a 10 000 g durante 30 min. El sobrenadante representa la fracción soluble.

#### Acoplamiento de Poli-L-Prolina a Sefarosa

El procedimiento de acoplamiento se realizó de acuerdo a Rozycki M. et al. (1991). 150 mg de Poli-L-Prolina (SIGMA), PM aprox. 10000, se resuspenden en 35 ml de solución amortiguadora de acoplamiento (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, pH 8) y se agita a 4 °C durante 24 hr para solubilizarla, la solución se centrifuga a 20000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se incuba con 5 g de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNEr) (SIGMA). Esta matriz se resuspendió previamente en 50 ml de HCl 1 mM, pH 3, y se lavó con 1 l de esta solución en un sistema de filtración (Millipore) con capacidad de 250 ml y sin filtro. Se drenó todo el líquido sin secar la matriz (vol final 15ml). Este procedimiento no debe de tardar más de 10 min. La suspensión se incuba durante toda la noche en un tubo de 50 ml con tapa de rosca a 4°C con agitación continua en un agitador horizontal. La eficiencia del acoplamiento se calcula por lecturas espectrofotométricas a 230 nm de la solución antes y después del acoplamiento. La Sefarosa se lava con 1 l de una solución de Tris-HCl 100 mM, pH 8, en el sistema de filtración y se incuba con 2 vol. de esta solución durante cuatro horas a 4°C con agitación continua en el agitador horizontal, a fin

de saturar los posibles sitios reactivos sobrantes. La matriz se centrifuga (500 g durante 5 min) y el sobrenadante se decanta. Se equilibra con una solución L (20 mM Tris-HCl, pH 8,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM).

#### Cromatografía de afinidad con Poli-L-Prolina

Para la cromatografía en columna se empacan 3 ml de la matriz de afinidad en una columna construida con una jeringa de 20 ml a la que se le pone un tapón de nylon para evitar el escape de la Sefarosa. Se equilibra con 10 vol de solución amortiguadora de cromatografía (100 mM KCl, 100 mM glicina, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM DTT), a un flujo de 20 ml/h generado por una bomba peristáltica.

El extracto de 100 g de hipocotilos, hojas o nódulos, se carga a un flujo de 15 ml/h lo que en algunos casos toma mas de 12 hrs. La columna se lava con 20 vol. de solución de cromatografía y se eluye con 25 vol. de la misma solución conteniendo 30% DMSO (dimetil sulfoxido) sin DTT. El eluyente se colecta en fracciones de 10 ml y la proteína presente se precipita con DOC (geoxicolato de sodio) 0.1 %, TCA (ácido tricloroacético) 15% toda la noche, se centrifuga a 30 000 g durante 30 min y se resuspende en 0.5 ml de acetona helada (-20 grados) por fracción y se centrifuga a 10000 rpm en una microcentrífuga. Esta operación se repite una vez más para lavar todo el TCA restante. Las pastillas se resuspenden en solución amortiguadora de Laemmli (Laemmli, U.K. 1970) (5% SDS

(dodecilsulfato de sodio), 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.125 M Tris pH 6.8), se hierven durante 10 min y se cargan alícuotas de cada fracción en un gel de SDS-acrilamida 15%, para analizar el grado de pureza.

Para la cromatografía en suspensión, 15 ml de matriz equilibrada se incuban con el sobrenadante del extracto de 100 g de tejido, con agitación horizontal durante 2 hrs. La matriz se separa del extracto en un sistema de filtración y se lava con 1 l de solución L. La matriz se drena y se resuspende en 10 ml de solución L con SDS al 2%, se incuba con agitación horizontal durante 1 hr a temperatura ambiente y se empaca en una columna fabricada con una jeringa. La columna se eluye por gravedad con la misma solución de SDS y se colectan fracciones de 10 ml. Las proteínas se precipitan con TCA al 15% y se dejan a temperatura ambiente toda la noche. El precipitado se centrifuga a 30 000 g durante 0.5 hr y la pastilla se resuspende en 0.5 ml de acetona helada y se centrifuga durante 10 min a 10 000 g en una microfuga, se repite esta operación y las pastillas se solubilizan en solución amortiguadora de Laemmli, hirviendo durante 10 min.

#### Electroforesis SDS-acrilamida:

Se utilizó el sistema discontinuo de electroforesis desnaturalizante con SDS y reductor desarrollado por Laemmli, adaptado al tamaño 7x8 cm. La solución del gel separador consta 14.6% acrilamida, 0.4% bis-acrilamida (15% T, 2.7% C), 375 mM Tris-



HCl pH 8.8, SDS 0.1%, APS (persulfato de amonio) 0.05%, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina) 0.05%. Se degasifica antes de agregar el TEMED y una vez agregado éste, se vierte con la ayuda de una pipeta en un molde plano de vidrio y alumina con separadores de 1.5 o 0.75 mm, sellado con agarosa (0.6% en agua) en la base, se dejan 3 cm para vertir el gel concentrador y se agregan 300 µl de isopropanol. El gel concentrador consta de 3.9% acrilamida, 0.1% bis-acrilamida (4% T, 2.7% C), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 0.1%, APS 0.05%, TEMED 0.05%. No es necesario degasificar esta solución que se agrega encima del gel separador una vez que éste ha polimerizado y se ha enjuagado con agua, se coloca un peine para hacer los pozos ya sea de 10 ó 15 dientes o uno preparativo. La solución amortiguadora en los electrodos es la misma en ambos y consta de 192 mM glicina, 24 mM Tris-HCl, pH 8.6, 0.1% SDS. Esta solución se agrega antes de cargar las muestras.

Las muestras se hierven en solución amortiguadora de Laemmli durante 5 min, se centrifugan 5 min a 10 000 g y se cargan en los pozos. Se conectan los electrodos a una fuente de poder a 160 volts, voltaje constante, durante aprox. 1 hr a temp ambiente, hasta que el colorante alcanza la base del gel. Los geles se separan del vidrio y se enjuagan con agua tridestilada. Para teñir la proteína se utiliza azul de coomasie R-250 al 0.125% en una solución de 50% metanol, 10% ácido acético, 40% agua, los geles se destiñen en la misma solución sin azul de coomasie.

## Purificación por electroforesis desnaturizante

La proteína precipitada y solubilizada se carga en un minigel preparativo de SDS-poliacrilamida 15%, 0.75 mm de espesor, 7 cm de largo por 8 cm de ancho, se cargan aprox 50 ug de proteína, se tinte por 15 min y se destinte por 20 min, la banda mayoritaria, con un peso aproximado de 14 KDa comparado con un estandar de lisozima, se corta del gel con la ayuda de un bisturí.

## Electroforesis de dos dimensiones

Para realizar la electroforesis de dos dimensiones se utiliza el sistema desarrollado por O'Farrell, en donde se separa primero por punto isoeléctrico (pI) en condiciones desnaturizantes y posteriormente por tamaño molecular con el sistema de Laemmli (O'Farrell, P.H. 1975). Este sistema también se adaptó al formato pequeño (Hofer).

Los geles para realizar el isoelectroenfoque (IEF) se hacen en tubos de vidrio con capacidad para 200  $\mu$ l y 7 cm de largo. Los tubos se lavan con mezcla crómica durante 1 hr y se enjuagan bien con agua tridestilada, se incuban unos minutos con KOH 100 mM y se enjuagan de nuevo con agua, se les agrega etanol absoluto y se dejan secar. La solución del gel consta de 3.12% acrilamida, 0.18% bisacrilamida (3.3% T, 5.6% C) 9 M urea, 0.36% anfolinas de pH 3-10, 0.64% anfolinas de pH 5-7, 2% Nonidet P40, 0.02% persulfato de amonio y 0.1% TEMED. La solución amortiguadora del cátodo consta de

20 mM NaOH y la del ánodo de 0.085% ácido fosfórico (Hoefler scientific instruments, 1989).

Las muestras se resuspenden o diluyen en un solución amortiguadora de lisis o solución K que consta de 2% anfolinas de pH 5-7, 2% Nonidet P40, 1% DTT, 9.5 M urea. Se cargan en la parte catódica del gel, se cubren con agua y se electroenfocan durante 2 hr a 1000 volts a voltaje constante. El gel se extruye del tubo con la ayuda de una jeringa con agua y se equilibra en solución amortiguadora de Laemmli durante 45 min; en este paso los geles se pueden congelar a  $-70^{\circ}$ . Los geles se descongelan a temperatura ambiente y se colocan en la superficie de un gel preparativo con SDS como los descritos anteriormente. La electroforesis se realiza de la misma forma.

#### Electrotransferencia e inmunoensayo (Western)

La electrotransferencia se realizó de acuerdo con el protocolo desarrollado por Towbin (Towbin, H.T. et al. 1979), pero las proteínas se adsorbieron a una membrana PVDF (Immobilon-P Millipore).

Después de realizar la electroforesis el gel se equilibra durante 15 min en una solución amortiguadora de transferencia 192 mM glicina, 25 mM Tris, pH 8.6, 20% metanol. La membrana de PVDF se incuba 30 seg en 100% metanol, 1 min en agua y 1 min en solución de transferencia. Se coloca el gel sobre un dos papeles filtro Whatman #1 humedecidos con solución de transferencia, y sobre el gel la

membrana de PVDF cuidando que no se atrapen burbujas, hasta arriba se colocan otros dos papeles filtro humedecidos y estos se colocan entre dos esponjas dentro de un cartucho que va sumergido en solución de transferencia en una cámara con electrodos paralelos a los lados. La transferencia se realiza durante 2 hr a 400 mA, corriente constante, a 4°C.

La membrana se tñe con Fonceau 0.2% ácido acético 1% y se localizan los marcadores de peso molecular los cuales se pueden marcar con un bolígrafo. Se enjuaga bien con agua tridestilada y se incuba con una solución amortiguadora TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween 40 0.05%) 1% albúmina bovina (BSA) durante 1 h a 42°C con agitación constante. Esta solución se puede reutilizar varias veces si se guarda con 0.01% de azida de sodio. Inmediatamente se incuba durante 1 h con una dilución del suero de 1:10000. Se lava 3 veces durante 5 min con la solución TBST y se agrega el segundo anticuerpo (producido en cabra contra IgG de conejo, Boehringer-Mannhaim) que lleva acoplada la fosfatasa alcalina, a una dilución de 1:4000 en TBST, se incuba 30 min y se lava 3 veces por 5 min con TBST. Para revelar se prepara 10 ml de una solución de 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 66µl de NBT y 33 µl de BCIP (PROMEGA). La membrana se incuba en esta solución de 5 a 15 min y las bandas reactivas aparecen como un precipitado violeta.

## Producción de anticuerpos

Se inmunizó a conejos Nueva Zelanda, con 5 meses de nacidos. La banda conteniendo la proteína purificada por electroforesis se pica en pequeños fragmentos 1mm x 1mm, se agrega agua hasta 1 ml y se emulsifica con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, utilizando dos jeringas interconectadas para la operación. Se toma una muestra de sangre, 5ml, de la vena marginal de la oreja con ayuda de una jeringa (suero preinmune) y la emulsión se inyecta subcutáneamente en 2 puntos (0.5 ml) sobre el lomo del animal y se refuerza cada 21 días con emulsiones preparadas con el adyuvante incompleto. Se toman muestras de 10 ml de sangre 15 días después de cada inmunización. Se separan los coágulos de las paredes del tubo con ayuda de una paleta de madera y la sangre se deja coagular de 4 a 6 h a temperatura ambiente. Una vez que el suero se separa, se decanta y se centrifuga a 10 000 g durante 15 min a 4 °C, los sobrenadantes se alicuotan en tubos eppendorf de 1.5 ml y se congelan a -70 grados hasta su uso.

## Purificación de anticuerpos

Para la purificación de los anticuerpos se utiliza un método rápido de inmunoafinidad (-); el antígeno se separa de los contaminantes con el mismo método de geles preparativos desnaturalizantes de acrilamida, pero la banda se electrotransfiere (ver Western blot) y se tñe con una solución ácida de Ponceau, la

banda de interés se corta y se bloquea de la misma forma que para un Western blot, se incuba con una dilución 1:100 del suero en TBST (TBS con Tween 20 al 0.05%) durante 1hr y se lava extensivamente con TBST. Los anticuerpos se eluyen incubando la banda 10 min con 2 ml de una solución de 100 mM glicina pH 2.5, los 2 ml se recuperan y se neutralizan con 0.05 ml de Tris 2 M, pH 8. A esta solución se agrega 5% BSA y se congela a -70 °C hasta su uso.

#### Análisis de aminoácidos

La proteína eluida de la columna de poliprolina y solubilizada en una solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{CO}_3$  100 mM, pH 7.8, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol, se cromatografía en una columna de 1x25 cm de Sefadex G-100 equilibrada con la misma solución. Las fracciones con la proteína de 14 KDa se dializan contra la misma solución pero sin  $\beta$ -Mercaptoetanol y se concentran por evaporación en una centrifuga Savant con vacío. La proteína seca se hidroliza con HCl 6N. La separación de los amino ácidos se realizó con un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) equipado con una columna de DEAE, esto fue realizado por duplicado en la Unidad de Análisis y Síntesis del Instituto de Investigaciones Biomédicas. No se realizó el análisis para detectar triptofano, prolina ni cisteína; la composición del resto de los aminoácidos sí fue determinada. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g}$  de aminoácido y se convierten a  $\mu\text{molar}$ .

## Secuenciación

La proteína purificada por afinidad se electrotransfiere con una solución amortiguadora de CHES (ácido ciclohexilamino-ethanosulfónico) 10 mM, pH 10, a una membrana de PVDF (Immobilon Millipore), se tiñe con 0.2% Ponceau en 1% ácido acético. Aprox. 14 µg de proteína se recortan (3x3 mm) con tijera y se lavan con abundante agua tridestilada, el cuadrado de membrana se analiza en un secuenciador automático.

Para la secuencia interna se requiere de una digestión de la proteína. La proteína eluida de la columna de afinidad (aprox 100 µg) se solubiliza en solución de Laemmli y se separa de los contaminantes en un gel preparativo de poliacrilamida-SDS. La banda mayoritaria con un peso aprox de 14 KDa se recorta (3 mm x 7 cm) después de haberla identificado tiñendo 15 min el gel y destiñéndolo durante 20 min. La banda se incuba con varios cambios de agua tridestilada, se corta en fragmentos (3 mm x 1cm) que se colocan en un tubo eppendorf con 300 µl de una solución amortiguadora de 100 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ , pH 7.8, 1% SDS, se agregan 5 µg de la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* disuelta en la misma solución y se incuba a 37 °C toda la noche. El tubo se centrifuga a 10 000 g 10 min a temperatura ambiente y la solución azul (el gel pierde el colorante) se hierve en con un 1/3 del volumen de solución de Laemmli 4X y se carga en un gel preparativo de 22% de acrilamida y de 1.5 mm de espesor. Las proteínas se corren a 160 v voltaje constante y se tiñe en las mismas condiciones que se

indican arriba. Los péptidos seleccionados se recortan, se lavan con abundante agua tridestilada y se incuban de nuevo a 37 °C con  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ -SDS toda la noche. El péptido se dializa con una membrana de diálisis con un corte de 3 000 contra solución de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ , pero sin SDS y se secuencía mediante la degradación de Edman en un secuenciador automático. El equipo utilizado fue marca Millipore, equipado con un cromatografo líquido (HPLC) y una computadora para el análisis de los residuos liberados y derivatizados. De uno de los péptidos se consiguió secuenciar 30 aminoácidos.

#### **Inmunocuantificación**

Se inmunocuantificó la proteína en las raíces e hipocotilos recién germinados. Las semillas se germinan en charolas como arriba se indicó y al tercer día se cosechan de la siguiente forma: con la navaja de un bisturí se cortan segmentos de puntas de radícula, radícula, región abundante en pelos radiculares, región de donde nacen las raíces secundarias (corona), hipocotilo, hojas embrionarias y cotiledones. Inmediatamente después de cortarlos se sumergen en nitrógeno líquido y se guardan a -70 °C hasta su uso. Se cosechan aprox. 100 mg o más de cada parte. Las secciones se descongelan y se homogenizan con 100 o 200  $\mu\text{l}$  de una solución amortiguadora de Tris-HCl, pH 8, con la ayuda de un homogenizador con un émbolo de teflón para tubos eppendorf. El homogenizado se centrifuga a 10000 g 30 min y se cuantifica la proteína del sobrenadante. Se solubilizan cantidades iguales de proteína con



solución de Laemlli y se cargan tres diluciones (10, 5, 2.5 µg) por cada sección en geles de 15 pozos y 1.5 mm de espesor, de manera que quedaron cuatro muestras problema y 3 carriles con una cantidad conocida (2, 10 y 20 ng) de profilina por gel.

Los geles se electrotransfieren y la proteína inmunoreactiva se cuantifica digitalizándola con un scanner XRS acoplado a un analizador de imágenes (Millipore). El programa del analizador que se utilizó fue el Visage en la sección de análisis individual de bandas. Los parámetros de lectura se colocan en default y los resultados (expresados como la integral de la densidad óptica (IDO) de cada banda) se correlacionaron con los estándares para obtener ng de profilina por µg de proteína total. Para ajustar estos datos a los errores experimentales y de transferencia, se corre un gel simultáneo con 20 µg de cada sección, se electrotransfiere y se tiñe con azul de Coomassie, este gel se analiza en las mismas condiciones que los anteriores y el total de la IDO de cada carril se promedia y se ajusta con este valor la proteína cargada en cada carril. Los resultados que mantienen una proporción lineal de las diluciones con un coeficiente de correlación de 0.98 o más se toman como significativos y se analizan.

#### Inmunolocalización

El tejido seccionado igual que para la inmunocuantificación se fija en viales de 10 ml, durante 1 hr a 4 °C con formaldehído al 4% en solución estabilizadora de microfilamentos sin detergente (PTE)

ni DTT (esta solución se prepara fresca antes de fijar con paraformaldehído, que se agita a 60 °C en el volumen necesario de agua mas dos o tres gotas de NaOH 2 N, una vez disuelto se le agrega SAM 10X y se enfría a 4 °C). Una vez fijado el tejido se desecha la solución fijadora con una pipeta Pasteur y se agregan 5 ml de etanol al 50%, inmediatamente se desecha esta solución y se agrega fresca incubando 30 min, esto se repite dos veces más. Se desecha la solución al 50% y se agrega al 70%, se hacen tres cambios de 30 min. El tejido puede permanecer en esta solución toda la noche. Se cambia la solución al 70% por una al 95% y se incuba 30 min, esto se repite 2 veces más y se pasa a 100% 30 min. Se desecha el etanol y se substituye por xileno al 100%, se desecha inmediatamente y se agrega nuevo, se incuba 20 min y se repite la operación dos veces más. Al último cambio de xileno se le agrega un volumen igual de Paraplast que se fundió un día antes en un horno a 60 °C, se agita y se deja a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente se funde la mezcla a 60 °C, se desecha y se agregan 5 ml de Paraplast fundido, se incuba 1 h a 60 °C, se desecha y se repite esta operación dos veces más. Las secciones se incluyen en moldes de plástico calentados a 60 °C. Para orientar las secciones se utilizan pinzas calentadas con un mechero de alcohol, se orientan las secciones y se dejan endurecer los bloques a temperatura ambiente, se guardan en una caja seca hasta su uso.

Se cortan secciones de 8  $\mu\text{m}$  con la ayuda de un microtomo marca Leica. Las secciones (aprox 6) se expanden en agua a 42 °C y se recuperan con portabjetos. Se dejan secar a 42 °C y se incuban en

un horno a 42 °C toda la noche para que se adhieran firmemente al portaobjetos. Al día siguiente las secciones se desparafinan incubándolas en vasos de Coplin con xilol durante 10 min y se rehidratan pasandolas por alcohol al 100% tres veces, al 95% tres minutos y a solución amortiguadora TBST. Se bloquean con albúmina bovina al 5% en TBST de 6-12 hr, se seca la laminilla con papel absorbente solamente a los lados de los cortes, dejándolos húmedos. Se agregan 100 µl del correspondiente anticuerpo purificado o suero preinmune diluido en 5% BSA en TBST 1:400. Se incuba durante 1 hr en una cámara húmeda y se lava con TBST 3 veces por 5 min. Se seca de la misma forma que antes y se incuba durante 1 hr con 100 µl del segundo anticuerpo (de cabra contra IgG de conejo) diluido 1:500 en TBST 5% BSA que lleva acoplada la fosfatasa alcalina, aquí se incluye un control que no se incubó con el primer anticuerpo. Se lava igual que antes y mientras tanto se prepara 1 ml de una solución de 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.6 µl NBT, 3.3 µl BCIP. Se seca el portaobjetos dejando húmedos los cortes y se agregan 100 µl de esta solución. Se incuba 10 min y se sumerge en una solución de 50 mM EDTA pH 8. Las preparaciones se lavan con agua tridestilada, se dejan secar y se montan con bálsamo de Canadá para microscopía, cubriéndolas con un cubreobjetos del #1. Las muestras se analizaron con objetivos de 6.3, 16, 40 y 63 X en un microscopio fotónico ZEISS, en campo claro, en campo oscuro y contraste de fases. Se fotografiaron con una película Kodakcolor gold ASA 100.

## Cuantificación de proteína

Para cuantificar la proteína se utilizó el protocolo de unión a pigmento desarrollado por Bradford (Bradford, M.B. 1976).

Para preparar el reactivo de Bradford se disuelven 20 mg de Azul de Coomassie G-250 en 10 ml de etanol al 95%, se agregan 20 ml de ácido fosfórico al 85% y se diluye a 200ml con agua tridestilada, se filtra y se guarda a 4 °C, esta solución es estable por meses.

Se agregan 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford a 800  $\mu$ l de una solución que contenga la proteína (normalmente agua). Se incuba de 5-30 min y se lee la absorbancia contra un blanco, que se prepara agregando 200  $\mu$ l de reactivo a la misma solución sin proteína, a 595 nm en un espectrofotómetro. Se hace una curva estándar con diluciones de albúmina de 1-20  $\mu$ g/ml contra el que se comparan los resultados.

## RESULTADOS

### Purificación de una proteína que se une con alta afinidad a Poli-L-Prolina

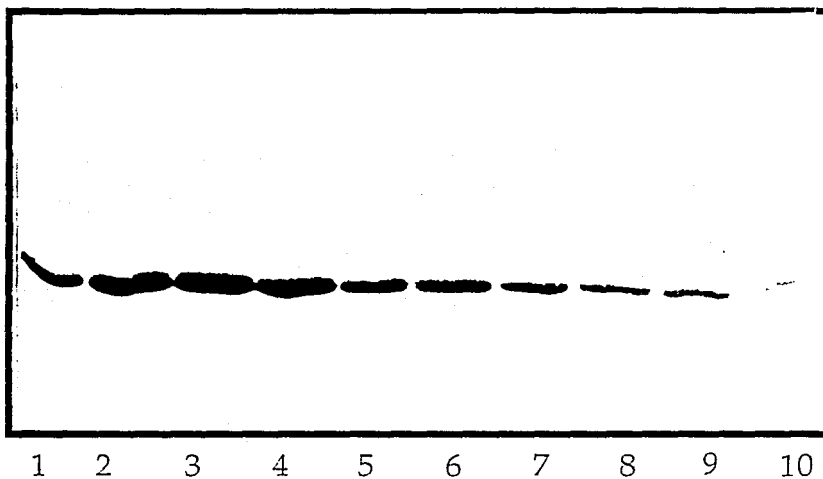
Al eluir con DMSO al 30% una columna de Sefarosa-Poli-L-Prolina en la que se cromatografió el sobrenadante de un extracto crudo de raíz e hipocotilo del frijol, se obtiene un componente mayoritario con un PM estimado en un gel de poliacrilamida-SDS de aproximadamente 14 KDa que, por densitometría, equivale a más del 90% de la fracción (fig. 2). Partiendo de aprox. 100 g de tejido que equivalen a aprox. 1 g de proteína, se obtienen aprox. 300 µg de la proteína de 14 KDa (Tabla I).

Una vez que se obtuvo el anticuerpo y se montó la técnica de inmunocuantificación se pudieron calcular, la capacidad de la columna y el rendimiento.

La inmunocuantificación del péptido de 14 KDa después de incubarse en suspensión con diferentes cantidades de Sefarosa-Poliprolina, mostró que en las condiciones más de trabajo un 80% de la proteína inmunorreactiva inicial es secuestrada por la matriz (Fig. 3A, Tabla I.).

La elución con DMSO al 30% o con urea 8 M liberan únicamente una fracción de la proteína de 14 KDa inicialmente unida, mientras

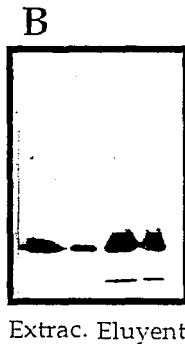
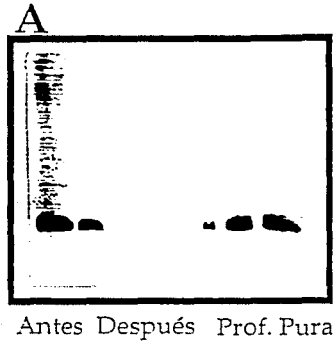
## Elución de la columna de Poli-L-Prolina



**Figura 2.** La proteína eluída de una columna de Poli-L-Prolina con DMSO al 30% se precipitó con TCA y una tercera parte de cada fracción de 10 ml se cargó en un gel de poliacrilamida del 15%. La proteína se tiñó con azul de coomasie. Los números corresponden al número de la fracción, el peso de la proteína es de 14 kDa.

## Tabla I. Tabla de purificación

FRACCION	PROTEINA mg	PROFILINA $\mu$ g	% DE PROF INICIAL	CONC. ESPECIFICA $\mu$ g/mg
EXTRACTO CRUDO	950	1330	100	1.4
LAVADO	948	276	20	0.3
UNIDO	—	1054	80	—
ELUYENTE	0.330	300	23	909



**Figura 3.** Western blots incubados con una dilución 1:10000 del suero de conejo anti profilina. Los geles son de poliacrilamida-SDS al 15% **A.** Los primeros dos carriles contienen 10 y 5  $\mu$ g respectivamente de proteína total de un extracto crudo de raíz y los siguientes dos tienen la misma cantidad de proteína del mismo extracto pero después de incubarse con una matriz con poliprolina; los últimos tres tienen 2,5,20 ng de profilina purificada. **B.** Los primeros dos carriles tienen 10 y 5  $\mu$ g de extracto crudo de raíz los siguientes dos tienen una pequeña fracción de la proteína eluida de la columna con 2% SDS.



que la elución con 2% SDS y 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol desprende una mayor cantidad de la proteína unida en un volumen mucho menor. La elución con DMSO o con urea toma mucho tiempo y diluye enormemente la muestra, quedando la proteína a concentraciones de 1  $\mu$ g/ml. Para resolver este problema y en vista de que el SDS despega a la proteína de la matriz, la elución se realizó con SDS al 2% durante menos de 1 h quedando la proteína a una concentración de 5-10  $\mu$ g/ml.

El factor de purificación se determinó a partir de la concentración relativa de la proteína antes y después de la cromatografía de afinidad. La concentración relativa inicial calculada por inmunocuantificación es de 0.001 mg/mg de proteína, la concentración relativa después es de 0.9 mg/mg lo que da un factor de purificación de 900 veces en un sólo paso (Tabla I).

El rendimiento se calculó cargando una alícuota del eluyente de SDS en un gel de poliacrilamida junto con una muestra del extracto crudo e inmunocuantificando las bandas (Fig. 3B). El rendimiento calculado corresponde a un 23 % de la proteína inmunoreactiva inicial, y un 28.4% de lo que se une a la matriz. Aparece también una prominente banda inmunorreactiva de degradación que contiene cerca del 5% de la proteína inicial (Fig. 3B. Eluyente).

#### Caracterización de la proteína de 14 KDa en diferentes tejidos

Un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína

purificada de raíz detecta también en inmunoblots una proteína de 14 KDa de los extractos crudos de hoja (Fig. 4B) y nódulo (Fig. 4C).

A partir de estos extractos (Fig. 5A) se puede purificar también por cromatografía de afinidad por poli-L-prolina, el polipéptido de 14 KDa (Fig 5B). La proteína purificada de los otros dos tejidos presenta reactividad contra el anticuerpo generado contra la proteína de raíz (Fig. 4C).

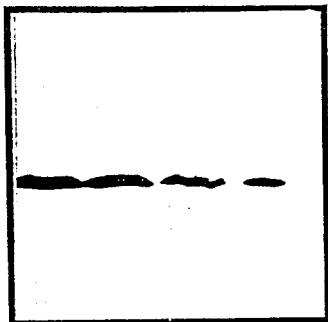
#### Caracterización de la isoforma

La proteína purificada por afinidad tiene un peso molecular estimado por electroforesis en poliacrilamida con SDS de 14.4 KDa. Esto fue determinado generando una curva estándar del logaritmo del peso de marcadores de peso molecular comerciales contra la movilidad electroforética ( $R_f$ ) (la distancia recorrida por la proteína entre la recorrida por el colorante). La curva resultó recta con una coeficiente de correlación de 0.98 en el rango de 14-66 KDa.

La proteína purificada es una sola isoforma con un punto isoeléctrico (pI) de 5.3 (Fig. 6A). Esto se determinó midiendo el gradiente de pH generado durante el isoelectroenfoque el cual fue lineal con un coeficiente de correlación mayor a 0.98 en el rango de pH de 5-7.

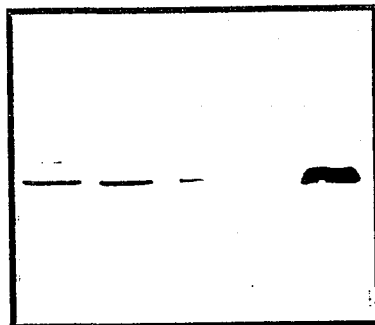
También se generaron anticuerpos policlonales (ver metodología) que reconocen específicamente una sola banda de 14.4

A



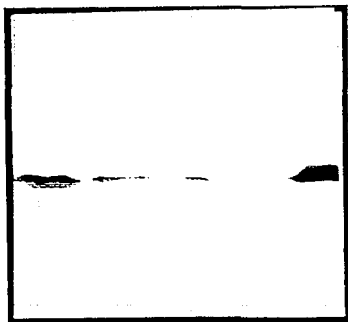
Raiz      Prof.  
            Pura

B



Hoja      Prof.  
            Pura

C



Nódulo      Prof.  
              Pura

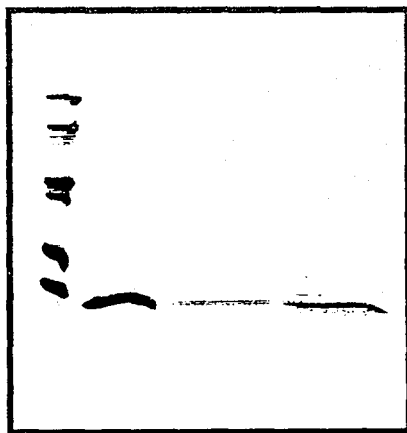
**Figura 4.** Western blots incubados con una dilución de 1:10000 del suero de conejo anti profilina. Los geles son de poliacrilamida-SDS al 15%. A. Diluciones de un extracto crudo de raíz 10, 5 y 2  $\mu$ g de proteína total. El cuarto carril tiene aprox. 10 ng de la profilina pura de raíz. B. Las misma diluciones que en A. pero con extracto de hoja. C. Lo mismo que en A. pero con nódulo.

A



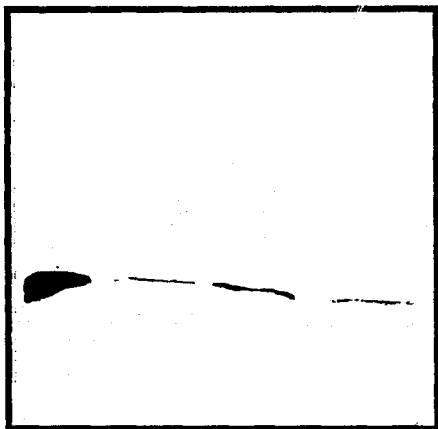
Raiz Hoja Nódulo

B

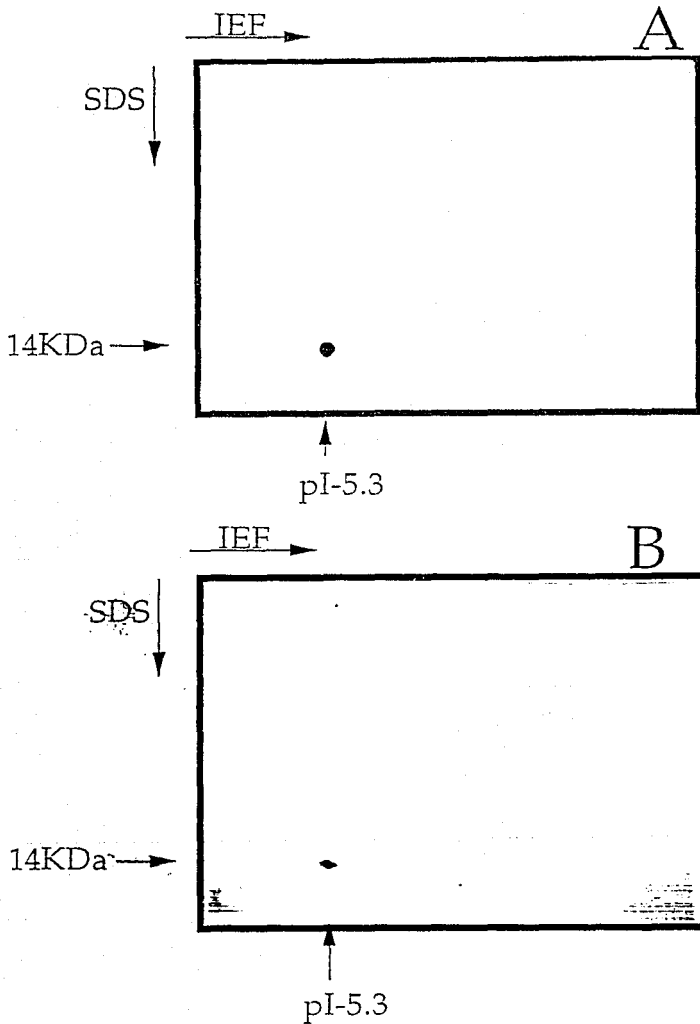


Marc. Raiz Hoja Nódulo

C

Raiz Hoja Nódulo Extrac.  
Crudo  
Raíz

**Figura 5.** Purificación de profilina de diferentes tejidos. Los gels son de poliacrilamida-SDS al 15%. A. 20  $\mu$ g de extracto crudo de raíz, hoja y nódulo. Teñido con azul de coomasie. B. El primer carril tiene los marcadores de peso molecular, el más ligero corresponde a lisozima (14.4 KDa). Los siguientes carriles tienen alícuotas de la profilina purificada de raíz, hoja y nódulo. Teñido con azul de coomasie. C. Western blot de lo mismo que en B. pero con 10 veces menos proteína.



**Figura 6.** A. La proteína purificada por filtración en gel fue concentrada y una alícuota cargada en un gel de dos dimensiones con un gradiente de pH de 5-7 y un gel de 15% acrilamida en la segunda dimensión. El gel fue teñido con azul de coomasie. B. 20  $\mu$ g de un extracto crudo de nódulo se cargaron en un gel igual que en A. el gel fue electrotransferido e inmunodetectado con el anticuerpo purificado antiprofilina.

KDa, en análisis de tipo Western de raíces, hypocotilos, nódulos y hojas del frijol hasta diluciones del suero de 1:10000 (Fig. 5). Los anticuerpos reconocen un sólo punto en un gel de 60s dimensiones cargado con un extracto crudo de nódulo. Esta isoforma tiene exactamente el mismo punto isoeléctrico (pI 5.3) que la isoforma de raíz (Fig. 6B.).

#### Análisis de aminoácidos

A la proteína eluida de la matriz de afinidad, y posteriormente cromatografiada en una columna de Sefadex G100 o sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se le realizó un análisis de aminoácidos. La única diferencia importante entre ambos métodos es que la cantidad de glutámico-glutamina disminuye mucho en la proteína preparada por electroforesis.

Esta proteína muestra una composición de aminoácidos similar a la de las profilinas, especialmente la del polen de *Betula verrucosa*, a la profilina de *Saccharomyces cerevisiae*, a una de las isoformas de *Physarum polycephalum* y a la de *Drosophila melanogaster*, mostrando menos similitud con otras profilinas, sobre todo las de *Acanthamoeba castellanii* (Tabla II).

En la tabla III se pueden observar las comparaciones de la suma del cuadrado de la diferencia del porcentaje molar de cada aminoácido de las diferentes profilinas reportadas hasta la fecha, incluyendo una viral (Blasco et al., 1991), y el análisis obtenido de la del frijol. En este caso se utilizó la composición de

Aminoácido	Phaseolus +/-	Phaseolus Fln.	Detula	Jaccharomyce	Physarum P.	Drosophila	Homo.	Physarum A.	Mus.	Acantha. I,2	Acantha. I,1	Acantha II
Alanina	6,70 +/- 0,2	6,7	6,6	10,2	10,7	7,7	7,6	9,1	8,5	16,5	16,5	14,2
Arginina	3,49 +/- 0,3	3,4	1,6	4,2	0,8	3,4	3,8	0,8	3,8	2,5	3,3	2,5
Glicina	15,63 +/- 2,5	15,6	15,6	11,9	15,7	10,3	1,3	15,7	12,3	13,2	12,4	14,2
Histidina	2,65 +/- 0,3	2,6	3,3	2,5	0	1,7	1,5	2,5	1,5	0,8	0,8	0,8
Isoleucina	7,3 +/- 0,2	7,3	9	8,5	10,7	6	3,0	7,4	3,8	5,8	7,4	5,8
Leucina	9,4 +/- 0,7	9,4	7,4	7,6	8,3	8,5	9,2	7,4	9,2	7,4	5	7,5
Lisina	5,36 +/- 1,1	5,3	5,7	4,2	7,4	5,1	7,6	9,1	6,9	5	5,8	5
Metionina	4,33 +/- 0,5	4,3	3,3	0,8	0,8	0,9	3,1	0	3,8	0	0	0
Fenilalanina	2,62 +/- 0,4	2,6	3,3	1,7	1,7	1,7	3,1	1,7	3,8	4,1	3,3	4,2
Serina	4,91 +/- 0,4	4,9	7,4	5,1	5	9,4	7,6	6,6	8,5	4,1	5,8	5
Treonina	8,09 +/- 0,7	8	4,9	5,9	6,6	6,8	8,4	5	9,2	9,9	9,9	9,2
Tirosina	7,56 +/- 1,0	7,5	3,3	5,1	5,8	5,1	3,8	5	3,1	4,1	4,1	4,2
Valina	4,97 +/- 0,1	4,9	7,4	9,3	5,8	10,3	9,9	10,7	10	9,9	9,1	10
Asx	8,40 +/- 1,6	8,4	7,4	10,2	9,9	9,4	11,5	10,7	9,2	10,7	10,7	10,8
Glx	8,52 +/- 4,8	13,3	13,9	12,7	10,7	13,7	6,1	8,3	6,1	5,8	5,8	6,7





glutámico/glutamina del primer análisis realizado ya que el resultado del segundo análisis resultó muy bajo. El resto de los resultados se promediaron y en general dieron desviaciones menores a la unidad. Esta comparación (Weltman, J.K. y Dowben, R.M. 1973) permite distinguir a la misma proteína (valores menores de 50), proteínas relacionadas (entre 50 y 100) o no relacionadas (más de 100).

### Secuencia parcial

La proteína electrotransferida a una membrana de PVDF y sometida a la degradación de Edman en un secuenciador automático no dió ninguna señal, lo que sugirió que se encontraba bloqueada.

La proteína se eluyó de un gel preparativo de acrilamida-SDS y se incubó por 12 h en presencia de la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*. Los fragmentos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de 22% poli-acrilamida con SDS y en presencia de agente reductor. Se generaron 2 fragmentos mayoritarios de 10 y 6 KDa, quedando una parte de la proteína sin digerir. El fragmento de 6 KDa se eluyó del gel toda la noche. El péptido se concentró a 20  $\mu$ l en una microcentrífuga (Savant) conectada a una bomba de vacío y se adsorbió a una membrana de PVDF que se sometió a secuenciación. Se secuenciaron 20 aminoácidos, los que presentaron una extensa identidad (80%) con un fragmento de la secuencia predecida del cDNA de la profilina del polen de *Eucalia*. En la figura 7 se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida

## ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LA SECUENCIA PARCIAL DE PROFILINA

<i>Phaseolus</i>	-EITGIMNDFNEPGLAPTGLYIGGFKYKVIQ-	IDENTIDAD (SIMILITUD)
<i>Betula</i>	47-EITGIMKDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYKVIQ-77	-80.6 (3.2)
<i>Sacar.</i>	41-EIGEIVQGFNDNPAGLQSNGLHIQGGKFMILLR-71	-38.7 (16.1)
<i>Phys. P.</i>	41-EGQAIAALEFKTPANVVFASGITINGIKYMGIK-71	-35.5 (9.7)
<i>Phys. A.</i>	40-EGAKIVNGFKDSASVLSGGIFVDGQKYLTK-70	-29.0 (29.0)
<i>Mus</i>	44-PAEVGVLVGKDRSFFVNGLTLGGQKCSVIR-74	-29.0 (16.1)
<i>Homo</i>	45-PAEVGVLVGKDRSFFYVNGLTLGGQKCSVIR-75	-29.0 (12.9)
<i>Acan. II</i>	41-NGAALANAFKDATAIRSNGFELAGTRYVVTIR-71	-22.6 (25.8)
<i>Droso.</i>	41-ELSKLISGFDQQDGLTSNGVTLAQQRVIYLS-71	-19.4 (32.03)
<i>Acan. I1</i>	41-QGTTLAGAFNNADAIRASGFDLAGVHYVTLR-71	-19.4 (22.6)
<i>Acan. I2</i>	41-QGQTLAGAFNNADPIRAGGFDLAGVHYVTLR-71	-16.1 (16.1)

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos

obtenida de la profilina de *Phaseolus* con otras profilinas secuenciadas. La identidad se refiere a los aminoácidos idénticos que ocupan la misma posición, la similaridad a los aminoácidos que presentan un cambio conservativo.

con otras profilinas, también se especifica el fragmento que tiene homología y el porcentaje de identidad.

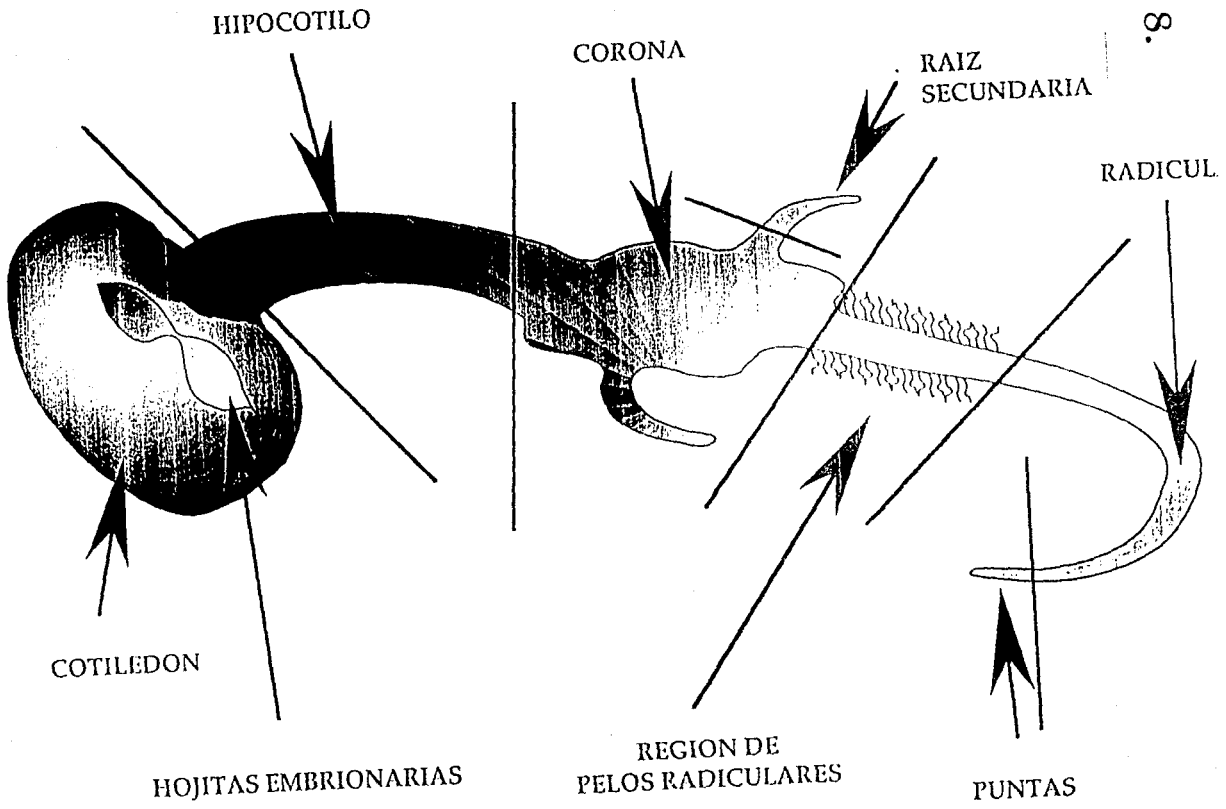
### Immunocuantificación

La inmunocuantificación se realizó con plantas recién germinadas. Se separó en varias zonas: Cotiledón, hojas embrionarias, hipocotilo, corona, raíces secundarias, región de pelos radiculares, radícula, puntas y nódulos (Fig. 8). La cuantificación se realizó en inmublots (Western blots) contra un estándar conocido y los problemas en tres diluciones por cada uno, existiendo linealidad con coeficientes de correlación siempre mayores de 0.96, en un rango de proteína inmunoreactiva de 2 a 50 ng (Fig. 9).

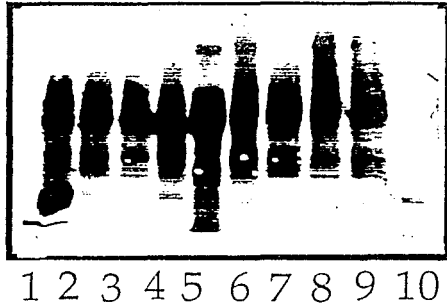
Los resultados resumidos en la figura 10 muestran que existe una distribución diferencial del polipéptido en las diferentes regiones de la raíz recién germinada, siendo mayor la concentración específica en la corona de donde se generan las raíces secundarias, y disminuyendo gradualmente hacia los extremos. Los nódulos mostraron una concentración intermedia, semejante a la de los hipocotilos. El promedio de la concentración de la profilina en las plántulas recién germinadas del frijol es de 1.4 mg/g de proteína total.

# SECCIONAMIENTO DEL GERMINADO DEL FRIJOL

FIGURA 8.

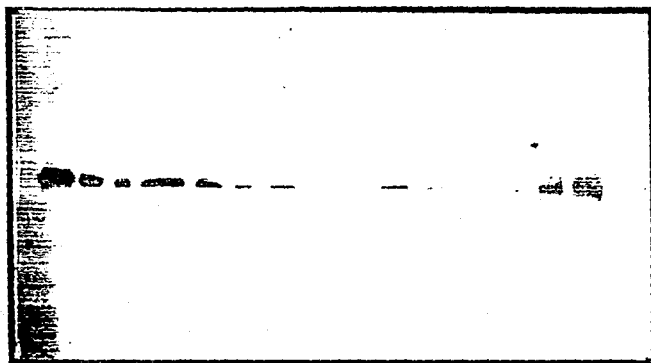


A



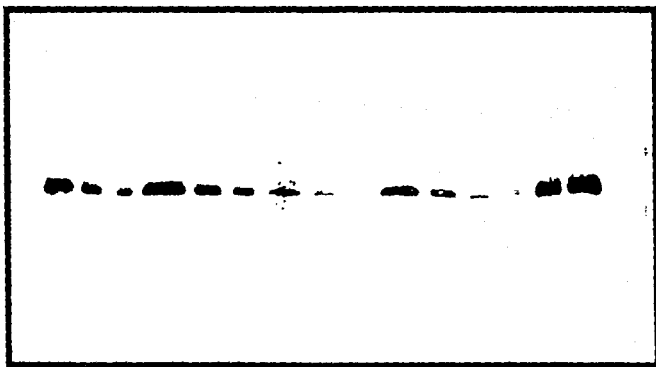
**Figura 9.** A. Patrón de proteínas totales de los extractos utilizados para la inmunocuantificación. 20  $\mu$ g de proteína se separaron en un gel de 15% poliacrilamida y se transfirieron a una membrana PVDF que se tiñó con azul de coomasie. 1. Nódulo. 2. Región de pelos radiculares. 3. Raíces secundarias. 4. Hojas embrionarias. 5. Cotiledón. 6. Hipocotilo. 7. Corona. 8. Puntas. 9. Radícula. 10. 1  $\mu$ g de profilina pura. B. y C. Lo mismo que en A. pero se cargaron diluciones de 10, 5 y 2.5  $\mu$ g con un estandar. La profilina se inmunodetectó con una dilución 1:10000 del suero de conejo.

B



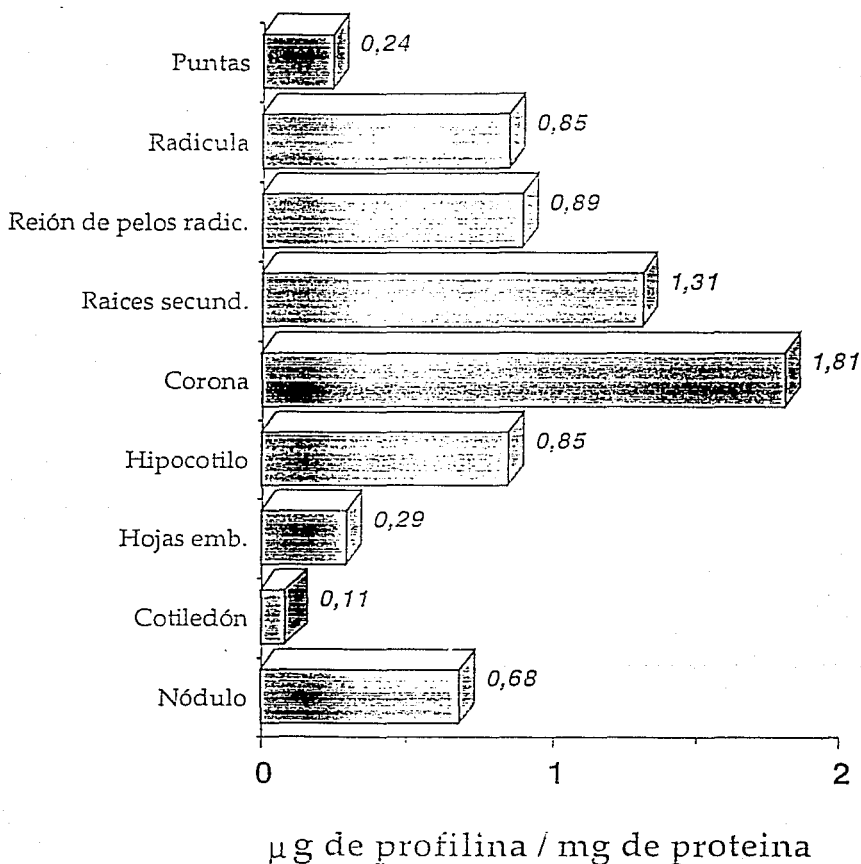
Reg. Raices Hojas Cotiled. Est. 2,10,20 ng  
pelos secund. embrio.  
radic.

C



Hipocot. Corona Puntas Radic. Est. 2,10,20 ng

## Concentración específica de la profilina



**Figura 10.** Concentración de profilina en relación a la proteína total. Los geles de la figura 9 se cuantificaron con un digitalizador acoplado a una computadora y los resultados, expresados como la integral de la densidad óptica (IDO), se convirtieron a  $\mu\text{g}$  utilizando las curvas estándar de cada Western.

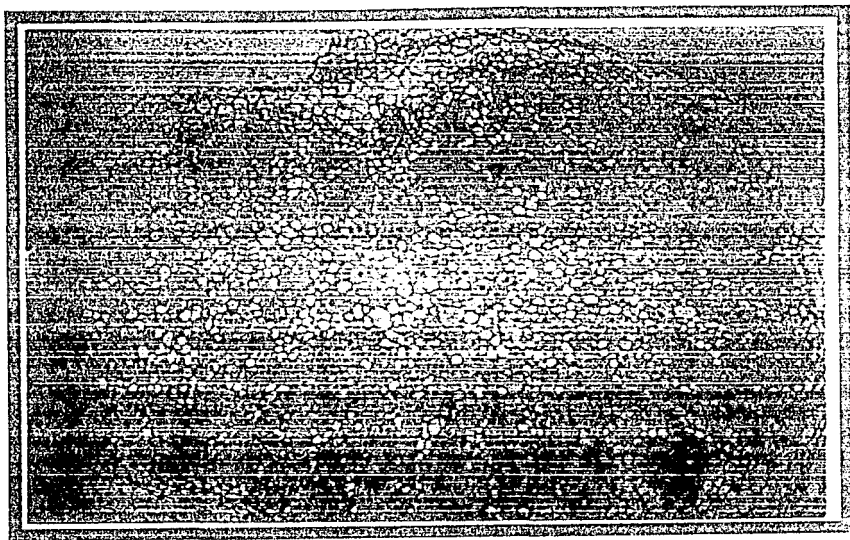
## Inmunolocalización

La inmunolocalización de la proteína confirmó su amplia distribución, en general todo el citoplasma de las células de los nódulos (Fig. 11.A) y raíces (Fig. 12.A, 13.A, 14.A) se tiñe con el anticuerpo purificado. Se encuentra una mayor señal en la endodermis de los nódulos y en los haces vasculares de los mismos (Fig. 11.C,E,G). En el resto de los tejidos la tinción es homogénea (Figs. 12, 13 y 14) salvo en los haces de xilema de la corona (Fig. 12.C,E,G), en donde no existe señal pero no se podría afirmar una distribución preferencial. Los cortes tratados con suero preinmune o sin primer anticuerpo no dieron ninguna señal (Figs. 11.B,D,F,H,J) los cortes de raíz no reaccionaron con un anticuerpo anti leghemoglobina purificado (Figs. 12.B,D,F,H,J, 14.D) que en los nódulos reconoce únicamente las células infectadas (Fig. 11.K,L,M,N,Ñ,O).

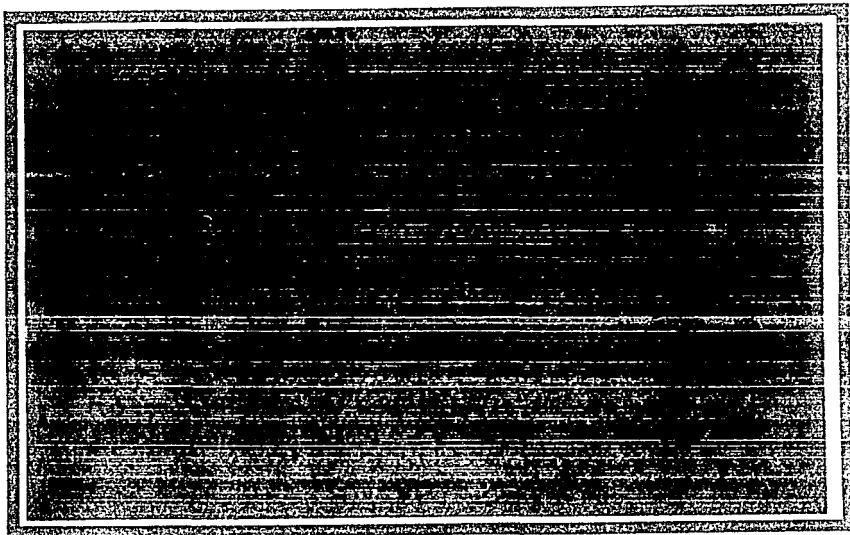


Figura 11.

A



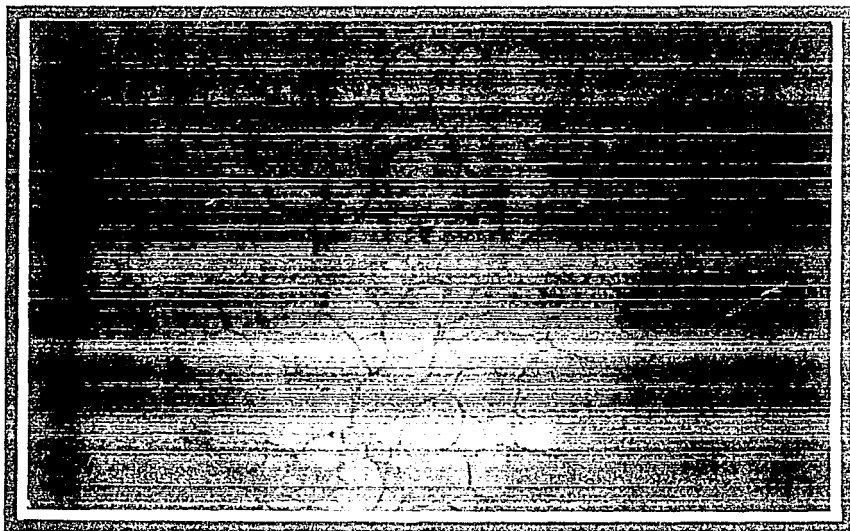
B



C



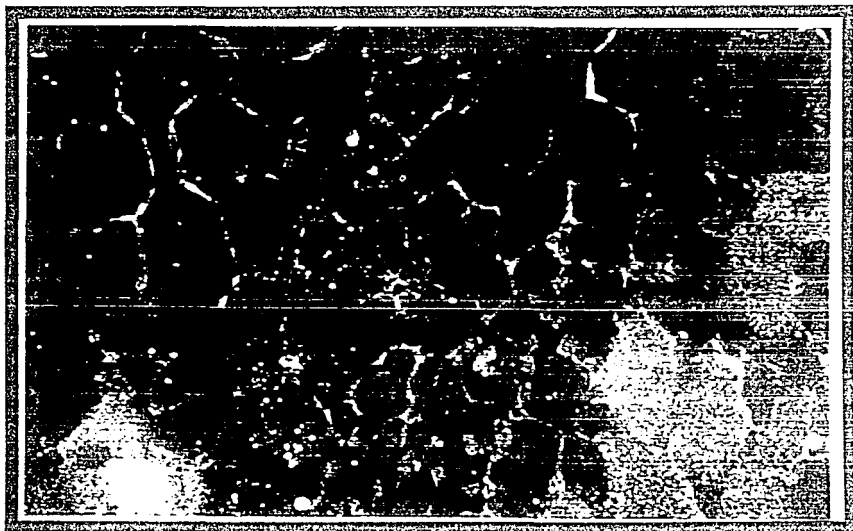
D



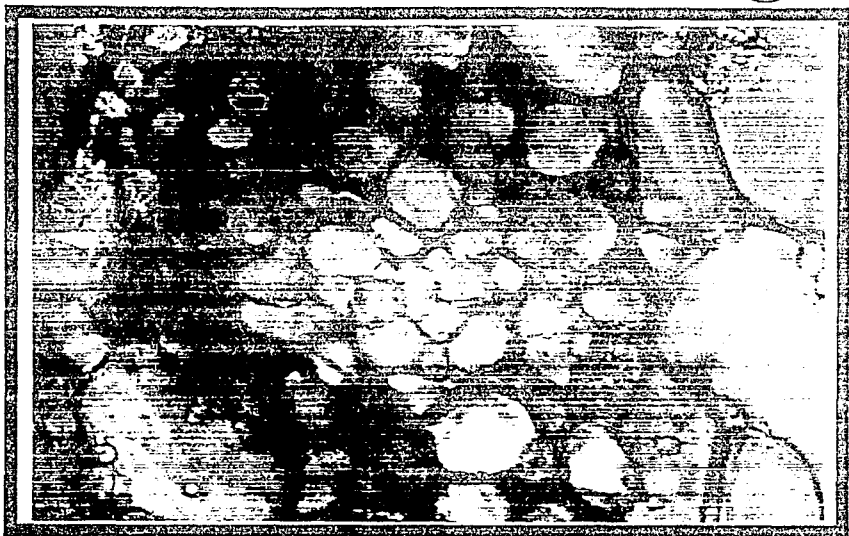
E



F



G

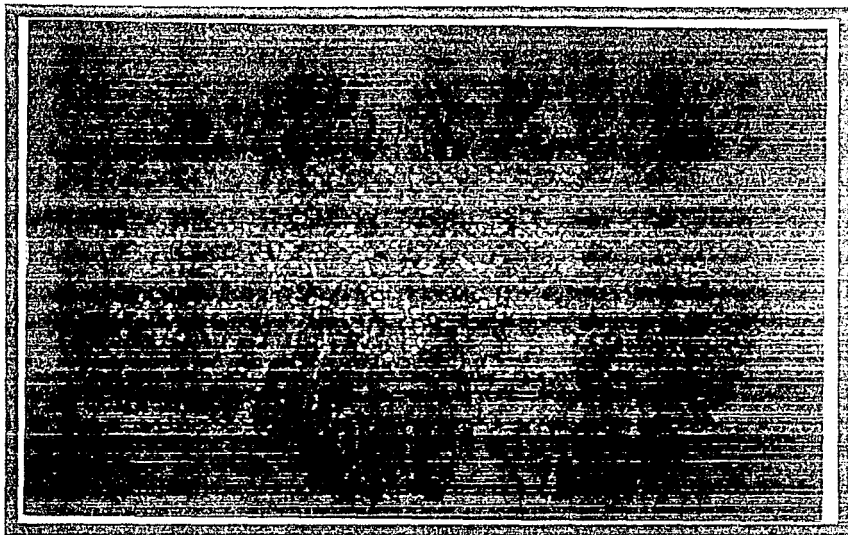


H





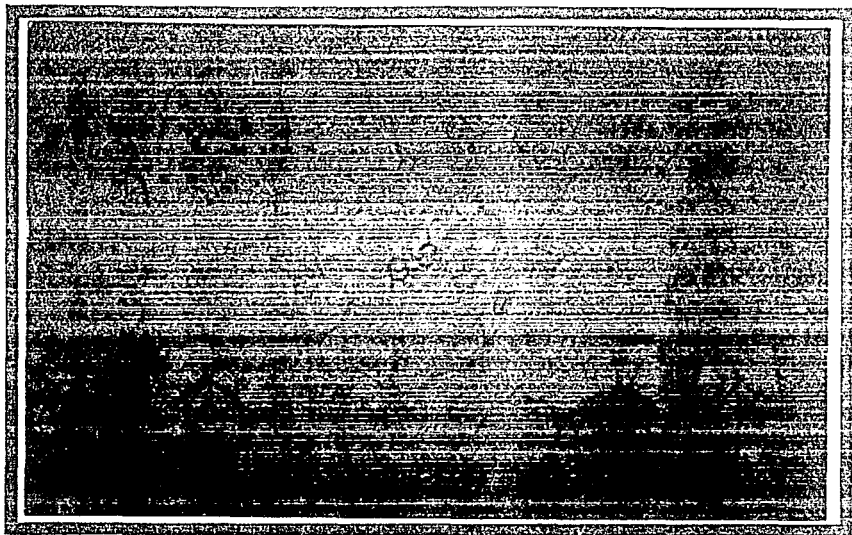
K



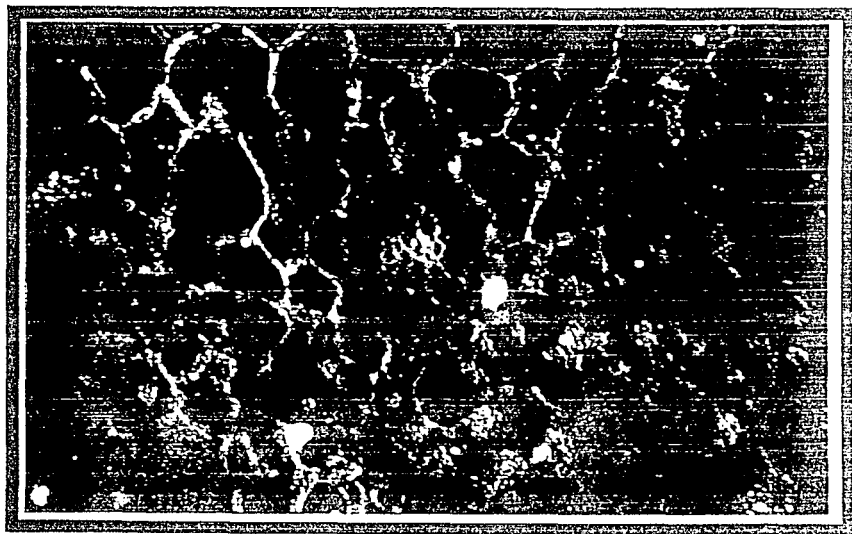
L



M



N



N



O





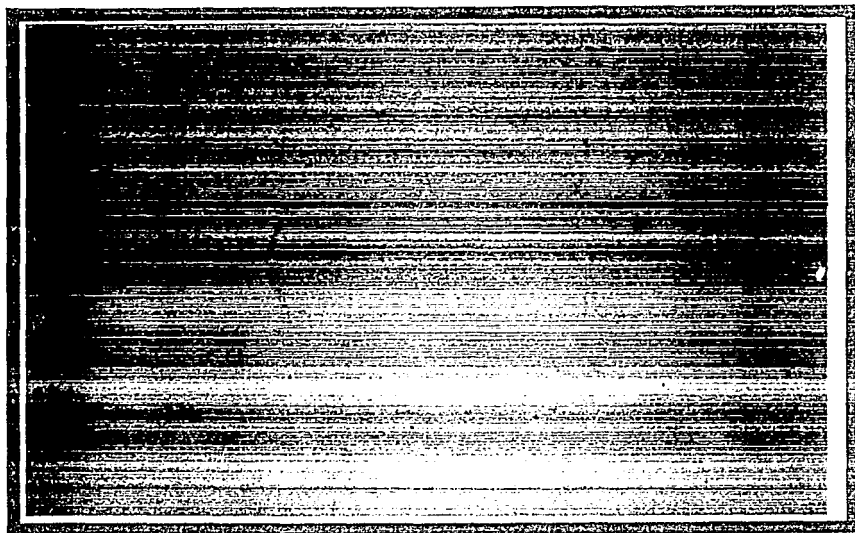
**Figura 11.** Inmuntinción de secciones radiales del nódulo de frijol. A. Nódulo teñido con anticuerpos anti profilina purificados (Campo Claro (CC)) amplificación X 273. B. Nódulo teñido con suero preinmune (CC). C. Acercamiento de A. sobre un haz vascular (CC), amplificación X 1736. D. Acercamiento de B. (CC). E. Lo mismo que en C. (Campo Oscuro (CO)). F. Lo mismo que en D. (CO). G. Acercamiento de C. (Contraste de Fases (CF)) amplificación X 5468. H. Acercamiento de D. (CF). I. Acercamiento de A. sobre las células infectadas y no infectadas del nódulo (CF). amplificación X 5468 J. Acercamiento de B. sobre las células infectadas y no infectadas del nódulo (CF). K. Nódulo teñido con anticuerpos anti leghemoglobina purificados (CC) amplificación X 273. L. Acercamiento de K. sobre la zona de infección (CC) amplificación X 2734. M. Acercamiento de K. sobre un haz vascular (CC) amplificación X 1736. N. Lo mismo que en M. (CO). Ñ. Acercamiento de M. (CF) amplificación X 5468. O. Acercamiento de K. sobre las células infectadas y no infectadas (CF).

Figura 12

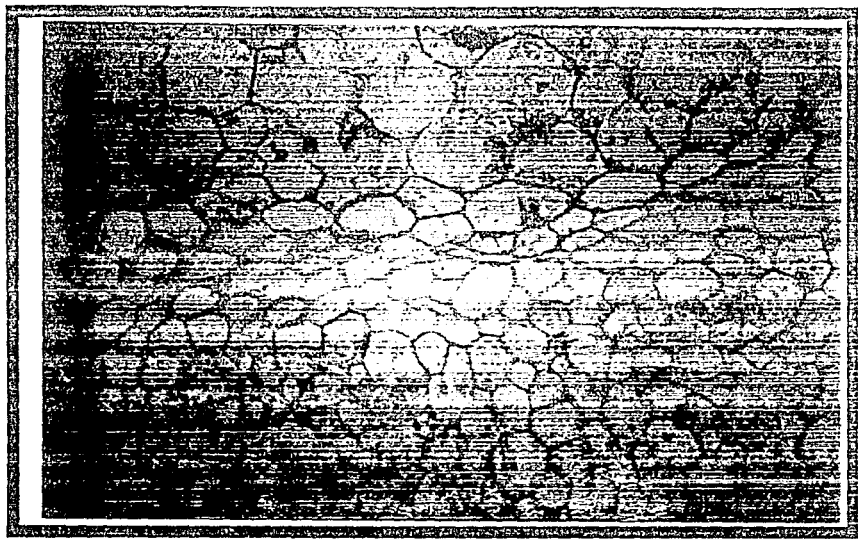
A



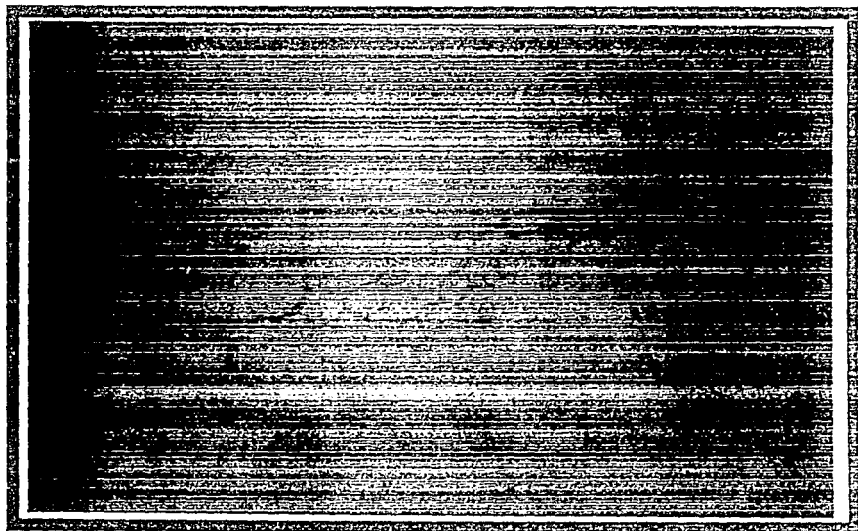
B



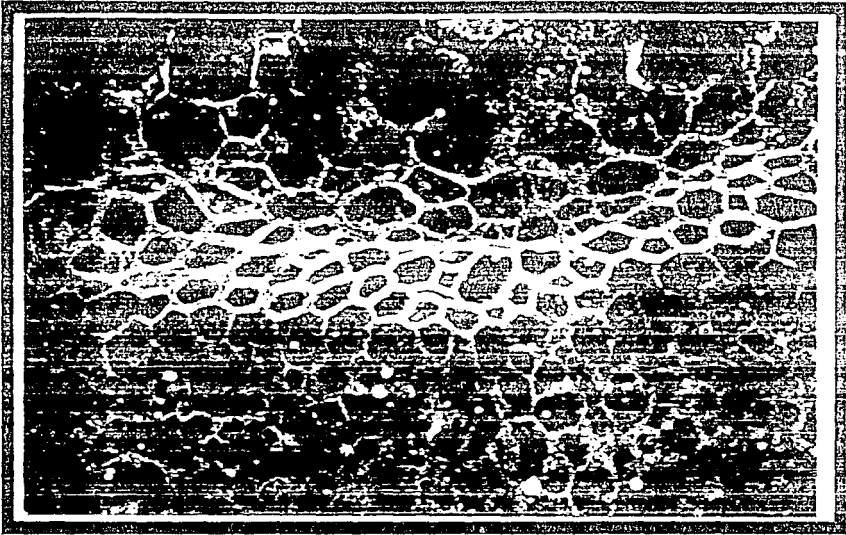
C



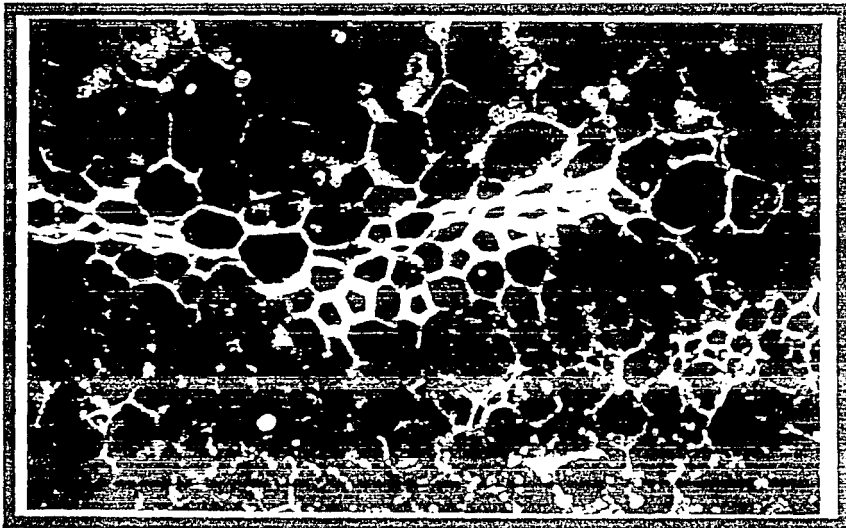
D



E



F



G



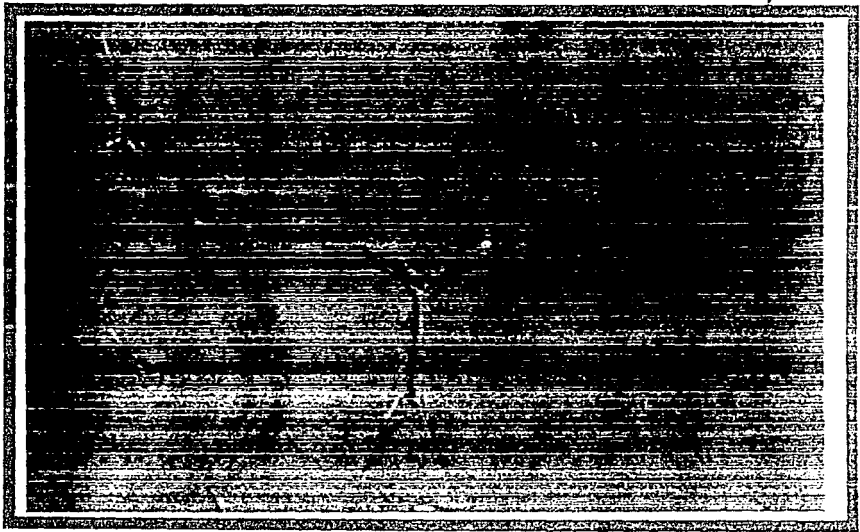
H



I



I



**Figura 12.** Inmunotinción de secciones transversales de raíz de frijol (corona). A. Corona teñida con anticuerpos anti profilina purificados (CC) amplificación X 273 B. Corona teñida con anticuerpos anti leghemoglobina purificados (CC). C. Acercamiento de A. sobre un haz vascular (CC) amplificación X 1736. D. Acercamiento de B. sobre un haz vascular (CC). E. Lo mismo que en C. (CO). F. Lo mismo que en D. (CO). G. Acercamiento de E. (CF) amplificación X 5468. H. Acercamiento de F. (CF). I. Parénquima externo de la corona, acercamiento de A. (CF) amplificación X 5468. J. Parenquima externo de la corona, acercamiento de B. (CF).

Figura 13

A



B





C



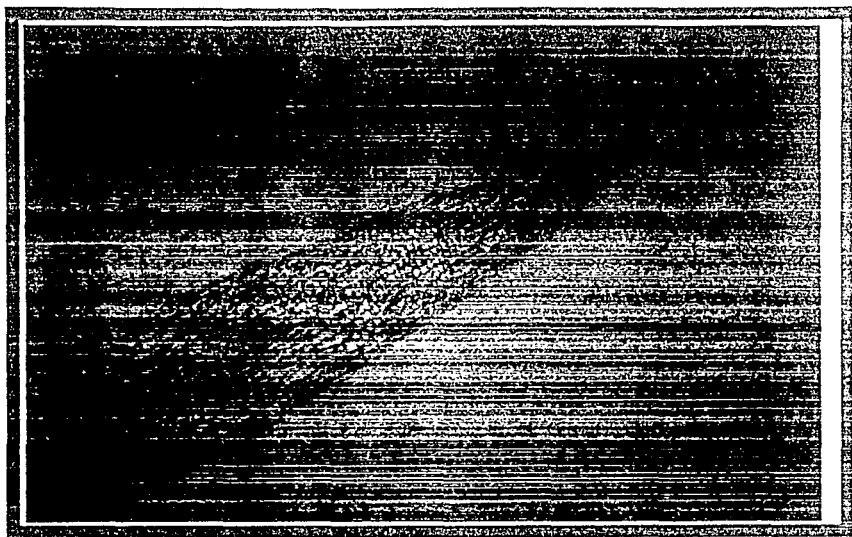
D



**Figura 13.** Inmunotinción de secciones longitudinales de la zona de emergencia de las raíces secundarias de la corona de raíz de frijol. A. Tinción con anticuerpos antiprofilina purificados (CC) amplificación X 694. B. Acercamiento de A. (CF) amplificación X 5468. C. Acercamiento de A. (CC) amplificación X 1736. D. Lo mismo que en C. (CC).

Figura 14

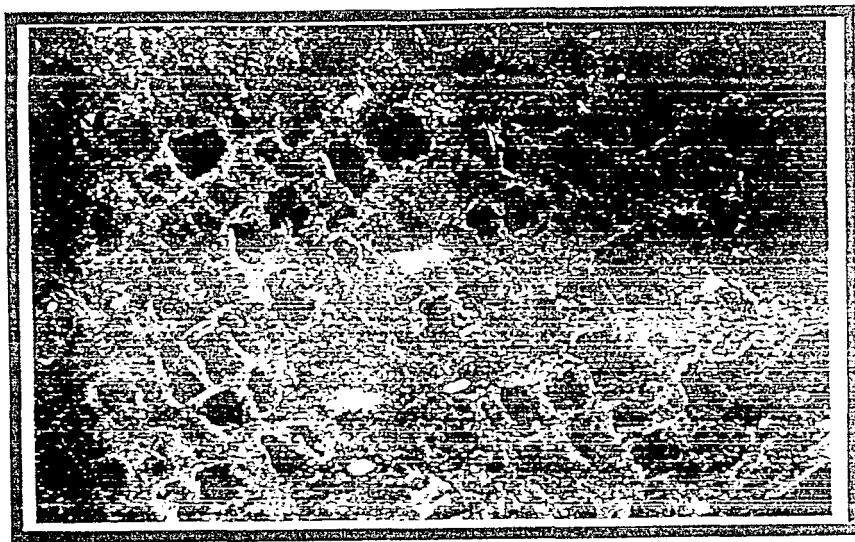
A



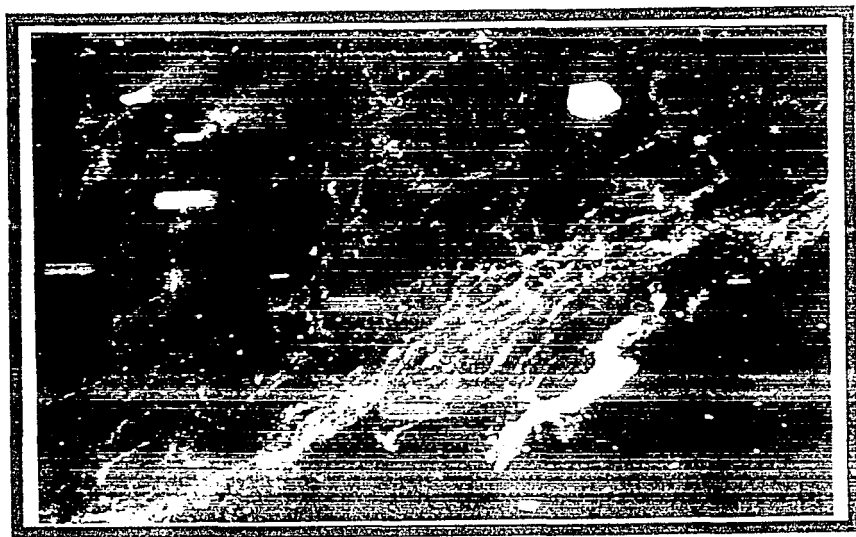
B



C



D



E



F



**Figura 14.** Inmunotinción de secciones longitudinales de punta de raíz. A. Tinción de una punta de raíz con anticuerpos antiprofilina purificados (CC) amplificación X 273. B. Acercamiento de A. (CC) amplificación X 1736. C. Lo mismo que en B. (CO). D. Punta de raíz teñida con un anticuerpo anti leghemoglobina purificado (CO) amplificación X 1736. E. Acercamiento de B. (CC) amplificación X 5468. F. Lo mismo que en E. (CF).

## DISCUSION

### Purificación de una proteína con alta afinidad por Poliprolina

La existencia de una proteína con alta afinidad por poliprolina y con un tamaño de 14 KDa sugiere que se ha purificado una profilina vegetal. A pesar de que las profilinas no contienen una estructura primaria muy conservada, todas las profilinas reportadas hasta la fecha tienen una alta afinidad por este poli aminoácido. La importancia biológica de esta afinidad es todavía desconocida, pero debido a que se encuentra tan conservada y la afinidad es tan elevada, es de esperar que exista algún tipo de relación de la profilina con proteínas ricas en prolina.

En lo referente al bajo rendimiento que se obtiene en la purificación y al hecho de que solamente una parte de la profilina inicial pueda ser recuperada a pesar de que el 80% de la profilina inicial es secuestrada por la matriz de afinidad; se sugiere que la afinidad de la profilina de frijol por la poliprolina es mayor que la reportada en otros sistemas, lo que hace muy difícil la elución, por lo que hacen falta condiciones más desnaturalizantes que las reportadas. También podría deberse que dada a la actividad proteolítica existente en los tejidos vegetales, una parte de la proteína se degrada durante la purificación. Eso explicaría únicamente la degradación de una parte de la proteína, y no de casi

el 60 %. La explicación más plausible es que éste bajo rendimiento de recuperación se deba a ambos fenómenos.

El grado de pureza alcanzado después de la purificación por filtración en gel o por electroforesis es del 99%. Esto permitió generar anticuerpos con una alta especificidad, un análisis de aminoácidos confiable y una secuencia parcial. Los anticuerpos generados produjeron un alto título (detectando el polipéptido en Western Blots con diluciones del suero mayores de 1:10000 y en menos de 1 µg de extracto), lo que podría deberse a la alta capacidad inmunogénica de la profilina vegetal (Valenta, R. et al. 1991).

A pesar del bajo rendimiento, el factor de purificación es muy elevado, obteniéndose una proteína 90% pura en un sólo paso, lo que equivale a casi mil veces de purificación. Esto hace de este procedimiento un protocolo ideal para preparar profilina a partir de extractos vegetales los que se caracterizan en tener una alta actividad proteolítica.

Otra ventaja de este método de purificación es que permite manejar un volumen muy grande de extracto. Es muy común que las proteínas en los extractos vegetales se encuentren altamente diluidas debido a la gran cantidad de líquido que caracteriza a la célula vegetal por contener vacuolas. Con el procedimiento de afinidad se puede secuestrar un 80% de la profilina inicial sin necesidad de concentrar el extracto ni de cromatografiarlo por una columna. Este proceso se realiza en menos de 2 hr.

El hecho de tener que desnaturalizar a la proteína para



separarla de la matriz de afinidad no significa mayor problema debido a que las profilinas se pueden renaturalizar muy fácilmente, simplemente dializándolas para eliminar todo el DMSO o la uréa (Kaiser et al. 1989). Sería interesante investigar si el SDS unido a la profilina podría desplazarse con un exceso de Tritón X-100 y de esta forma renaturalizar a la proteína.

Es importante resaltar que no se hicieron experimentos para demostrar que la proteína se encuentra en su conformación nativa ni para demostrar que se trata de una proteína asociada a actina. Se intentó demostrar esta asociación pero existieron dos problemas difíciles de superar. El primero fue la falta de una actina homóloga, la dificultad de purificar la actina vegetal y los bajos rendimientos que se obtienen hizo imposible efectuar los experimentos de afinidad. La otra opción era utilizar la actina heteróloga, para lo que se purificó actina de músculo de pollo. Debido a las grandes concentraciones necesarias para alcanzar la constante de disociación reportada para profilina y actina heterólogas (de 60 a 80  $\mu\text{M}$ ) no se pudo distinguir de una asociación específica de la inespecífica. Otro experimento que es posible realizar y que demuestra la afinidad de la profilina por la actina es calcular las veces que incrementa la profilina el intercambio del nucleótido de la actina. En otros sistemas este aumento es hasta de mil veces, así que aunque el sistema sea heterólogo el incremento probablemente será significativo.

También resultaría interesante demostrar que la profilina vegetal se une como otras profilinas a PIP<sub>2</sub>. Esta demostración hace

necesaria una profilina nativa y condiciones lo suficientemente controladas para demostrar que esta asociación es específica.

#### Caracterización de la isoforma

El identificar a la profilina en los diferentes tejidos del frijol como son las hojas, los nódulos y las raíces hace pensar que se trata de una proteína importante para el correcto funcionamiento de la célula vegetal, probablemente participando en la regulación de la actina y el metabolismo de los fosfolípidos.

La presencia de una sola isoforma tanto en nódulo como en raíz, sugiere que mismo gen se expresa en ambos tejidos, a diferencia de la actina que tiene una expresión diferencial de isoformas en ambos tejidos. El número de isoformas en hoja es desconocido debido a las dificultades para contrarrestar la actividad proteolítica en hojas. Es importante investigar el punto isoeléctrico de la profilina de hoja para lo que se puede utilizar la proteína eluída de la matriz de afinidad, a fin de compararlo con los resultados de raíz y nódulo.

El punto isoeléctrico de la mayoría de las profilinas reportadas, especialmente de aquellas que tienen más homología con la profilina de frijol, se encuentran alrededor de 5, al determinarlo teóricamente.

## Composición de aminoácidos

Los resultados de la composición de aminoácidos apuntan fuertemente a que la proteína purificada es una profilina, incluso la mayor similitud es con la profilina de polen, a pesar de que no se determinaron la prolina, el triptofano ni la cisteína. La comparación de los dos análisis realizados mostró una fuerte discrepancia en la cantidad de glutámico/glutamina determinado. Esto podría deberse a que el segundo análisis se realizó con una proteína precipitada con TCA, hervida, electrocromatografiada, teñida con coomasie-acético-metanol y tratada toda la noche con metanol al 50%; cualquiera de estos pasos pudo haber introducido la variación. Asumiendo un error en la determinación de Glx se utilizó el resultado del primer análisis, más parecido al del polen, para las comparaciones que se presentan en la tabla III.

El menor valor obtenido al comparar a la profilina de frijol contra otras proteínas fue con la de polen. Esta similitud casi resulta ser menor de 50, lo que permite considerar a ambas proteínas como la misma. Otras profilinas también presentaron un gran parecido (menos de 100) con la proteína vegetal. Por su relación filogenética era de esperarse que la proteína de levadura y la de *Physarum* resultaran más parecidas que el resto. Lo que es muy desconcertante, es que las profilinas de *Acanthamoeba* (especialmente la II y la III) sean tan diferentes al resto de las profilinas y especialmente a la de frijol.

Otro resultado importante que arrojó el análisis de la

composición, es que la proteína de frijol tiene un alto contenido de tirosinas. Una parte importante de la regulación del citoesqueleto subcortical se realiza mediante la fosforilación de estos residuos, sería interesante averiguar si alguna de estas tirosinas se encuentra fosforilada.

### Secuencia

Es muy probable que la profilina del frijol se encuentre bloqueada en el amino terminal, como lo están las profilinas de *Acanthamoeba*, y aunque no se menciona un bloqueo, la proteína de polen no fue secuenciada a partir del amino terminal, sino que se utilizaron fragmentos tripticos. El hecho de que la proteína de frijol no revelara la presencia de aminoácidos al someterse a la degradación de Edman es señal de que se encuentra bloqueada. Para obtener la secuencia se digirió la proteína con la proteasa V8 de *S. aureus* que principalmente cortó en dos sitios, generándose dos fragmentos; el de menor tamaño (6 KDa) se secuenció. Es extraño que a pesar de que la profilina tiene varios glutámicos, la proteasa solamente pudiera digerir en dos. Tal vez esto tenga alguna relación con la baja cantidad de señal de glutámico que se obtiene al hacer el análisis de aminoácidos de la proteína preparada de forma similar.

La secuencia obtenida comprende 30 aminoácidos que se alinean casi perfectamente con la secuencia de polen. Para la comparación se incluyó el glutámico en el extremo amino que es en donde la

proteasa corta. El alineamiento también da un alto porcentaje de identidad con otras profilinas, lo que demuestra sin lugar a dudas que la proteína purificada es un profilina muy similar a la de otros sistemas vegetales y parecida a la de otros eucariontes.

#### Inmunocuantificación

Quiero hacer notar que los resultados de la inmunocuantificación son preliminares y que si los incluyo en este trabajo es para resaltar la utilidad de las herramientas desarrolladas. Se realizó un experimento en el que los estándares se comportaron de manera lineal con altos coeficientes de correlación, lo mismo que las diluciones de las muestras. Me hubiera gustado introducir también la cuantificación de otros tejidos, pero el manejo de tantas muestras y sus diluciones resultaba muy complejo.

El hecho de que se observe una presencia diferencial en las diferentes regiones del germinado se podría explicar de varias maneras. La primera, debido a que no existe un duplicado del experimento, es que se trate de un artefacto experimental y que la diferencia no exista. Si confiamos en que un segundo experimento confirmara los resultados, se puede sugerir que la concentración de profilina en las diferentes partes del germinado tiene alguna importancia. Para generar estas diferencias en la concentración de la profilina es necesario algún tipo de regulación que podría ser a nivel de la degradación del producto, la traducción de éste o la

transcripción de su mensajero. Todas estas hipótesis son contrastables y sería interesante saber en cuál o cuáles niveles se encuentra regulada la profilina.

La mayor concentración de la profilina en la zona de emergencia de las raíces secundarias hace pensar que tal vez el citoesqueleto participe activamente en el proceso de diferenciación que genera estas estructuras. Los nódulos se generan a partir de meristemos similares a los que generan a estas raíces. No sería extraño encontrar que la regulación del citoesqueleto se ve alterada durante la generación de un meristemo que va a dar lugar a un nódulo en lugar de una raíz.

Las puntas presentan la menor concentración específica de proteína, casi 10 veces menos que la de la corona. Una concentración muy similar es alcanzada en las hojas embrionarias. Se observa un gradiente en la concentración de profilina que tiene un máximo en la corona, Esto hace pensar que existe algún tipo de regulación a nivel del organismo entero y que muy probablemente se encuentre relacionado con la diferenciación. Se trata de distancias muy cortas en las cuales se encuentran diferencias de concentración importantes.

La concentración de la profilina en los nódulos es un poco menor a la de los hipocotilos y las radículas, y tres veces menor a la de la corona. Esta diferencia sugiere que en los nódulos la actividad de remodelación citoesquelética en la que la profilina participa no debe tener la misma importancia que en la corona o las raíces secundarias recién brotadas. A pesar de eso la profilina

representa una elevada proporción de la proteína total del nódulo.

Si la expresión de la profilina se encuentra regulada, se puede esperar que la actina también lo esté. Aunque podría ser que la concentración de profilina se encuentre regulando a la actina y que la expresión de esta no cambie. Es importante a la hora de realizar el duplicado del experimento analizar los filtros con un anticuerpo antiactina (por desgracia no contamos con uno generado contra la actina vegetal, ni con suficiente actina vegetal para generar una curva estándar confiable) a fin de comparar ambos resultados.

#### Immunolocalización

Los experimentos de inmunolocalización también se realizaron de forma preliminar a fin de demostrar la utilidad de las herramientas generadas.

Se utilizaron anticuerpos purificados con el objeto de disminuir cualquier señal no específica, se observó que los cortes adherían inespecíficamente los anticuerpos, por lo que se hizo necesario bloquear con un 5% de albúmina para reducir el fondo al mínimo. Una vez estandarizadas las condiciones de localización fue posible obtener controles negativos sin ninguna señal. El más convincente fue el generado con un anticuerpo anti leghemoglobina purificado, el cual no dió señal contra los tejidos de raíz y sí una fuerte señal contra la zona de infección de los nódulos. Este anticuerpo fue purificado exactamente igual que el anti profilina.

La señal de la profilina citoplasmática y homogénea en los tejidos de la raíz, concuerda con la solubilidad de la proteína y su localización en otros sistemas. Era de esperarse que una fracción de la proteína se encontrara asociada a la membrana, no se observó dicha distribución, aunque las preparaciones no permiten discernir claramente las estructuras subcelulares.

El nódulo presentó una distribución diferente a la de la raíz. Existe señal en todas las células, pero se encontró mayor señal en la endodermis del nódulo, en el tejido vascular y en el núcleo de las células infectadas. Esta señal en el núcleo se encontró también con la leghemoglobina, lo que podría deberse a su pequeño tamaño (14 KDa).

El hecho de que la profilina se encuentre distribuida homogéneamente en el citoplasma de todas las células, refuerza la visión de que se trata de una proteína importante para la célula vegetal y que es necesario seguir investigándola a fin de conocer su función *in vivo*.

#### Perspectivas

En el presente trabajo se purificó y caracterizó parcialmente una profilina vegetal, esta proteína es la tercera de las proteínas asociadas a actina, caracterizada de células vegetales. Inicialmente no contábamos más que con un ensayo que había demostrado ser eficaz en otros organismos y otros tejidos. Ahora tenemos una profilina pura, un anticuerpo que la reconoce y una



secuencia parcial, que nos permiten continuar con la caracterización fina de este polipéptido.

Resulta esencial para continuar la investigación la clonación del cDNA correspondiente a la profilina de *P. vulgaris*. Esto se puede lograr buscando en una genoteca de expresión con el anticuerpo o generando un oligonucleótido con la secuencia predada a partir de la secuencia de aminoácidos. El obtener esta clona permitiría terminar de secuenciar la proteína, calcular el número de genes que la codifican y estudiar la regulación de su transcripción en diferentes tejidos. También sería posible sobreexpresar y disminuir (mRNA antisentido) la cantidad del producto bajo la acción de un promotor tejido específico a fin de entender su funcionamiento *in vivo*.

Otro experimento revelador sería la microinyección de profilina fluoresceinada en células vegetales durante la división. El comportamiento de la actina durante éste proceso ya ha sido estudiado y resulta ser muy dinámico. Si efectivamente la profilina es un regulador de la actividad de la actina *in vivo*, podría demostrarse con estos experimentos.

El hecho de que la proteína se pueda inmunolocalizar en cortes gruesos, apunta hacia que es posible su inmunodetección ultraestructural. Quizas la señal se vea disminuida debido a lo delgado de los cortes necesarios para la microscopía electrónica, pero esto permitiría saber si existe alguna asociación de la profilina con las membranas u otras estructuras subcelulares. Especialmente el núcleo resulta interesante, por su gran cantidad

de membranas y la presencia de un simbiote.

Este trabajo es un camino abierto para aumentar el conocimiento del citoesqueleto vegetal. Es de vital importancia para continuar con el estudio de este sistema la purificación y caracterización de otras proteínas asociadas a actina, como la  $\alpha$ -actinina, la gelsolina, la fragmina, etc. Este tipo de proteínas pueden ser purificadas eficientemente con columnas de afinidad de actina F. (Miller, et al., 1989).

## CONCLUSIONES

1) Se purificó la profilina de *P. vulgaris* de varios tejidos, al igual que otras profilinas tiene una alta afinidad por poli-L-prolina. Existe únicamente una isoforma en nódulos y raíces.

2) Se generaron anticuerpos específicos, contra la profilina purificada de hipocotilo, que reconocen nanogramos del polipéptido a diluciones del suero mayores de 1:10000.

3) El análisis de aminoácidos y la secuencia parcial de la profilina confirmaron la identidad de la proteína y revelaron una gran similitud con otra profilina vegetal.

4) Los experimentos preliminares de inmuno-cuantificación sugieren que la expresión de la profilina podría encontrarse regulada en diferentes tejidos. Es importante repetir estos experimentos para confirmar los resultados.

5) La inmunolocalización de la profilina en cortes de raíz y de nódulo demuestran que se trata de una proteína presente en todos los tipos celulares, y en mayor cantidad en las células acompañantes de los haces vasculares.

## BIBLIOGRAFIA

Abe, S. You, W. Davies, E. (1991) Protein bodies in corn endosperm are enclosed by and enmeshed in F-actin. *Protoplasma*. 165:139-149.

Aderem, A. (1992) Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *TIBS*. 17:438-443.

Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Watson, J.D. (1989) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. pp. 1218.

Ampe, C. Sato, M. Pollard, T.D. Vandekerckhove, J. (1988) The primary structure of the basic isoform of *Acanthamoeba* profilin. *Eur. J. Biochem.* 170:597-601.

Ampe, C. Vandekerckhove, J. Brenner, S.L. Tobacman, L. Korn, E.D. (1985) The amino acid sequence of *Acanthamoeba* profilin. *J. Biol.Chem.* 260:834-840.

Andersland, J.M. Jagendorf, A.T. Parthasarathy, M.V. (1992) The isolation of actin from pea roots by DNase I affinity chromatography. *Plant Physiol.* 100:1716-1723.

Baker, E.J. Keller, L.R. Schloss, J.A. Rosebaum, J.L. (1986) Protein Synthesis Is Required for Rapid Degradation of Tubulin mRNA and Other Deflagellation-Induced RNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell Biol.* 6:54-61.

Baskin, T.I. Cande. W.Z. (1990) The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:277-315.

Bermudes, D. Margulis, L. Tzertzinis, G. (1987) Prokaryotic origin of Undulipodia. Application of the Panda Principle to the Centriole Enigma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 503:187-197.

Beynon, R.J. Bond, J.S. (1989) Proteolytic enzymes: a practical approach. Oxford University Press. pp.259.

Binette, F. Benard, M. Laroche, A. Pierron, G. Lemieux, G. Pallotta, D. (1990) Cell-specific expression of a profilin gene family. *DNA and Cell Biol.* 9:323-334.

Blasco, R. Cole, N.B. Moss, B. (1991) Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J. Virology.* 65:4598-4608.

Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 22:248.

Bretscher, A. (1991) Microfilament Structure and Function in the Cortical Cytoeskeleton. Ann. Rev. Cell Biol. 7:337-374.

Brewin, N.J. (1991) Development of the legume root nodule. Annu. Rev. Cell Biol. 7:191-126.

Buchen, B. Braun, M. Hejnowicz, Z. Sievers, A. (1993) Statoliths pull on microfilaments.. Protoplasma. 172:38-2.

Cantley, L.C. Auger, K.R. Carpenter, C. Duckwort, B. Graziani. A. Kapeller, R. Soltoff, S. (1991) Oncogenes and Signal Transduction. Cell. 64:281-302.

Cao, L. Babcock, G.G. Rubenstein, P.A. Wang, Y. (1992) Effects of profilin and profilanctin on actin structure and function in living cells. J. Cell Biol. 117:1023-1029.

Carlsson, L. Nystrom, L.E. Sundkvist, I. Markey, F. Lindberg, U. (1977) Actin polimerization is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. J. Mol. Biol. 115:465-483.

Cho, S.O. Wick, S.M. (1990) Distribution and function of actin inthe developing stomatal complex of winter rye (*Secale cereale* cv.Puma). Protoplasma. 157:154-164.

Clayton, L. Lloyd, C.W. (1985) Actin organization during the cell cycle in meristematic plant cells.. Exp. Cell Res. 156:231-238.

Cooley, L. Verheyen, E. Ayers, K. (1992) chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. Cell. 69:173-184.

Cox, G. Hawe, C.R. van der Lubbe, L. Juniper, B.E. (1987) High-voltage electron microscopy of whole, critical-point dried plant cells. 2. Cytoskeletal structures and plastid motility in *Selaginella*. Protoplasma. 140:173-186.

Cremer, F. Van de Walle, C. (1985) Method for extraction of proteins from green plant tissues for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 147:22-26.

Deutscher, M.P. (1990) Guide to protein purification. Methods in enzymology. 182:1-894.

DiNubile, M.J. Southwick, F.S. (1985) Effects of macrophage profilin on actin in the presence and absence of acumentin and gelsolin. J. Biol. Chem. 260:7402-7409.

Doring, V. Stick, R. (1990) Gene structure of nuclear lamin LIII of *Xenopus laevis*; a model for the evolution of IF proteins from a

lamin-like ancestor. EMBO. 9:4073-4081.

Drubin, D.G. Mulholland, J. Zhu, Z. Botstein, D. (1990) Homology of a Yeast Actin-Binding Protein to Signal Transduction Proteins and Myosin-I. Nature. 343:288-290.

Frieden, C. (1985) Actin and Tubulin Polymerization: The Use of Kinetic Methods to Determine Mechanism. Ann. Rev. Biophys. Chem. 14:189-210.

Gelfand, V.I. Bershadsky, A.D. (1991) Microtubule Dynamics: Mechanism, Regulation, and Function. Ann. Rev. Cell Biol. 7:93-116.

Goldschmidt-Clermont, P.J. Machesky, L.M. Baldassare, J.J. Pollard, T.D. (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. Science. 247:1575-1578.

Goldschmidt-Clermont, P. Kim, J.W. Machesky, L.M. Rhee, S.G. Pollard, T.D. (1991a) Regulation of phospholipase C-gamma1 by profilin and tyrosine phosphorylation. Science. 251:1231-1233.

Goldschmidt-Clermont, P.J. Machesky, L.M. Boberstein, S.K. Pollard, T.D. (1991b) Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. J. Cell Biol. 113:1081-1089.

Goodbody, K.C. Lloyd, C.W. (1990) Actin filaments line up across



Tradescantia epidermal cells, anticipating wound-induced divisionplanes. Protoplasma. 157:92-101.

Grain, J. (1986) The Cytoeskeleton in Protists: Nature, Structure, and Functions. Int. Rev. of Cytol. 104:153-249.

Grolig, F. Williamson, R.E. Parke, J. Miller, C. Anderton, B.H. (1988) Myosin an  $Ca^{2+}$ -sensitive streaming in the alga Chara: two polypeptides reactin with a monoclonal anti-myosin and their localization in the streaming endoplasm.. Eur. J. Cell. Biol. 47:22-31.

Gundersen, G.G. Khawaja, S. Bulinski, J.C. (1987) Postpolymerization Detyrosination of a  $\alpha$ -Tubulin: A Mechanism forSubcellular Differentiation of Microtubules. J. Cell Biol. 105:251-264.

Haarer, B.K. Brown, S.S. (1990) Structure and function og profilin. Cell Motil. Cytoskel. 17:71-74.

Haarer, B.K. Lillie, S.H. Adams, E.M. Magdolen, V. Bandlow, W. Brown, S.S. (1990) Purification of profilin from Saccharomyces cerevisiae and analysis of profilin-deficient cells. J. Cell Biol. 110:205-114.

Hansson, A. (1988) Protein kinase C-dependent phosphorylation of

profilin is specifically stimulated by phosphatidylinositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150:526-531.

Harmon, A.C. Putnam-Evans, C. Cormier, M.J. (1987) A calcium-dependent but calmodulin independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol.* 83:830-837.

Harris, E.L.V. Angal, S. (1989) Protein purification methods: a practical approach. Oxford University Press. pp. 317.

Hartwing, J.H. Chambers, K.A. Hopcia, K.L. Kwiatkowski, D.J. (1989) Association of profilin with filament-free regions of human leukocyte platelet membranes and reversible membrane binding during platelet activation.. *J. Cell. Biol.* 109:1571-1579.

Hartwing, J.H. Thelen, M. Rosen, A. Janmey, P.A. Narin, A.C. Aderem, A. (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature.* 356:618-622.

Hepler, P.K. Cleary, A.L. Gunning, B.E.S. Wadsworth, P. Wasteneys, G.O. Zhang, D.H. (1993) Cytoskeletal dynamics in living plant cells. *Cell Biol. Intern.* 17:127-142.

Heslop-Harrison, J. Helsop-Harrison, Y. (1992) Cyclical transformations of the actin cytoskeleton of hyacinth pollen

subjected to recurrent vapour-phase hydration and dehydration.  
Biol. Cell. 75:245-252.

Hightower, R.C. Meagher, R.B. (1985) Divergence and differential expression of soybean actin genes. EMBO J. 4:1-8.

Hoefer Scientific Instruments (1988-1989) Catálogo. pp. 126-176.

Kabsch, W. Vandekerckhove, J. (1992) Structure and Function of Actin. Ann. Rev. Biophys. Struct. 21:49-76.

Kaiser, D. Goldschidt-Clermont, P.J. Levine, B.A. Pollard, T.D. (1989) Characterization of renatured profilin purified by urea elution from Poly-L-Proline agarose columns. Cell Motil. Cytoskel. 14:251-262.

Kaiser, D.A. Sato, M. Ebert, R.F. Pollard, T.D. (1986) Purification and characterization of two isoforms of Acanthamoeba profilin. J. Cell. Biol. 102:221-226.

Kakimoto, T. Shibaoka, H. (1987) Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. Protoplasma. 140:151-156.

Kakimoto, T. Shibaoka, H. (1988) Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nuclei complexes isolated from cultured tobacco

cells.. Protoplasma. Suppl. 2:95-103.

Kato, T. Tonomura, Y. (1977) Identification of myosin in *Nitella flexilis*. J. Biochem. (Tokyo). 82:77-782.

Kersey, Y.M. Hepler, P.K. Palevitz, B.A. Wessels, N.K. (1976) Polarity of actin filaments in characean algae. PNAS. 73:165-167.

Kirschner, M. Mitchinson, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. Cell. 45:329-342.

Kuroda, K. (1990) Cytoplasmic streaming in plant cells. Int. Rev.Cytol. 121:267-307.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lal, A.A. Korn, E.D. (1985) Reinvestigation of the inhibition of actin polymerization by profilin. J. Biol. Chem. 260:10132-10138.

Lancelle, S.A. Cresti, M. Hepler, P.K. (1987) Ultrastructure of the cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of *Nicotiana glauca*. Protoplasma. 140:141-150.

Larsson, H. and Lindberg, U. (1987) The effect of divalent cations on the interaction between calf spleen profilin and different

actins.. Biochei. Biophy. Acta. 953:95-105.

Lassing, I. Lindberg, U. (1988) Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex. J. Cell. Biochem. 37:255-267.

Lassing, I. Lindberg, U. (1988) Evidence that the phosphatidylinositol cycle is linked to cell motility. Exp. Cell Research. 174:1-15.

Lichtscheidl, I.K. Lancelle, S.A. Hepler, P.K. (1990) Actin-endoplasmic reticulum complexes in Drosera. Protoplasma. 155:116-126.

Lin Qiao. Grolig, F. Jablonsky, P.P. Williamson, R.E. (1989) Myosin heavy chains: detection by immunoblotting in higher plants and localization by immunofluorescence in the algae Chara. Cell Biol. Int. Rep. 13:107-117.

Lind, S.E. Janmey, P.A. Chaponnier, C. Herbert, T. Stossel, T.P. (1987) Reversible binding of actin to gelsolin and profilin in human platelet extracts. J. Cell Biol. 105:833-842.

Lindberg, U. Schutt, C.E. Hellsten, E. Tjader, A.C. Hult, T. (1988) The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. Biochem. Biophys. Acta. 967:391-403.

Liu, X. Yen, L.F. (1992) Purification and characterization of actin from maize pollen. *Plant Physiol.* 99:1151-1155.

Lloyd, C.W. Pearce, K.J. Rawlins, D.J. Ridge, R.W. Shaw, P.J. (1987) Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil. Cytoskel.* 8:27-36.

Lloyd, C.W. Traas, J.A. (1988) The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. *Drug studies. Development.* 102:211-221.

Lynn, D.H. (1981) The organization and evolution of microtubular organelles in ciliated protozoa. *Biol. Rev.* 56:243-292.

Ma, Y.Z. Yen, L.F. (1989) Actin and myosin in pea tendrils. *Plant Physiol.* 89:586-589.

Machesky, L.M. Goldschmidt-Lermont, P.J. Pollard, T.D. (1990) The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase-C. *Cell Regulation* 1:937-950.

Magdolen, V. Drubin, D.G. Magee, G. Bandlow, W. (1993) High levels of profilin suppress the lethality caused by over production of actin in yeast cells. *FEBS* 316:41-47.

Magdolen, V. Oechsner, U. Muller, G. Bandlow, W. (1988) The intron-containing gene for yeast profilin (PFY) encodes a vital function. *Mol. Cell. Biol.* 8:5108-5115.

Matsudarira, P.T. (1989) A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press. Inc. pp.131.

McCurdy, D.W. Williamson, R.E. (1987) An actin-related protein inside pea chloroplasts. *J. Cell Sci.* 87:449-456.

McCurdy, D.W. Sammut, M. Gunning, B.E.S. (1988) Immunofluorescence visualisation of arrays of transverse cortical actin microfilaments in wheat root-tip cells. *Protoplasma.* 147:204-206.

McCurdy, D.W. Gunning, B.E.S. (1990) Reorganization of cortical actin microfilaments and microtubules at preprophase and mitosis in wheat root-tip cells: a double label immunofluorescence study. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 15:76-87.

McCurdy, D.W. Williamson, R.E. (1991) Actin and actin-associated proteins. The cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press. pp. 3-14.

McLean, B.G. Eubanks, S. Meagher, R.B. (1990) Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *The Plant Cell.*

2:335-344.

Meagher, R.B. (1991) Divergence and differential expression of actin gene families in highe plants. *Int. Rev. Cytol.* 125:139-163.

Metcalf III, T.N. Szabo, L.J. Schubert, K.R. Wang, J.L. (1984) Ultrastructural and immunochemical analyses of the distribution of microfilaments in seedlings and plants of *Glycine max.* *Protoplasma.* 120:91-99.

Metcalf III, T.N. Szabo, L.J. Schubert, K.R. Wang, J.L. (1980) Immunochemical identification of an actin-like protein from soybean seedlings. *Nature* 285:171-172.

Miller, K.G. Field, C.F. Alberts, B.M. (1989) Actin-binding proteins from *Drosophila* embryos: A complex network of interacting proteins detected by F-actin affinity chromatography. *J. Cell Biol.* 109:2963-2975.

Mockrin, S.C. Korn, E.D. (1980) *Acanthamoeba* profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochem.* 19:5359-5362.

Moon, R.T. Nicosia, R.F. Olsen, C. Hille, M. Jeffery, W.R. (1983) The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: developmental changes in the association of messenger RNA. *Dev.*



Biol. 95:447-458.

Nishida, E. (1985) Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochem.* 24:1160-1164.

Nishida, E. Iida, K. Yonezawa, N. Koyasu, S. Yahara, I. Sakai, H. (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *PNAS.* 84:5262-5266.

Noegel, A.A. Schleicher, M. (1989) The contractile system in non-muscle cells: Involvement of actin and actin-binding proteins. Chapter 4:57-82.

O'Farrell, P.M. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:4007.

Ohnaka, K. Inoue, A. (1979) Identification of myosin in a flowering plant, *Egeria densa*. *J. Biochem.* 85:375-378.

Parke, J. Miller, C. Anderton, B.H. (1986) Higher plant myosin heavy-chain identified using a monoclonal antibody. *Eur. J. Cell Biol.* 41:9-13.

Parthasarathy, M.V. (1985) F-actin architecture in coleoptile epidermal cells. *Eur. J. Cell Biol.* 39:1-12.

Payraastre, B. van Bergen, E.N. Henegouwen, P.M.P. Breton, M. den Hartigh, J.C. Plantavid M. Verkleij A.J. Boonstra J. (1991) Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: Effect of epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 115:121-128.

Peattie, D.A. (1990) The Giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasit. T.* 6:52-56.

Pierson, E.S. Kengen, H.M.P. Derksen, J. (1989) Microtubules and actin filaments co-localize in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. and *Lilium longiflorum* Thumb. *Protoplasma.* 150:75-77.

Pollard, T.D. Cooper, J.A. (1984) Quantitative analysis of the effect of acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochem.* 23:6631-6641.

Pollard, T.D. Cooper, J.A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 55:987-1035

Putnam-Evans, C.L. Harmon, A.C. Cornier, M.J. (1990) Purification and characterization of a novel protein kinase from soybean. *Biochemistry.* 29:2488-2495.

Putnam-Evans, C.L. Harmon, A.C. Palevitz, E.A. Fechtmeier, M.

Cormier, M.J. (1989) Calcium dependent protein kinase is localized with F-actin in plant cells. *Cell Motil. Cytoskel.* 12:12-22.

Reichstein, E. Korn, E.D. (1979) Acanthamoeba Profilin.. *J. Biol. Chem.* 254:6174-6179.

Rorycki, M. Schutt, C.E. Lindberg. U. (1991) Affinity chromatography-based purification of profilin:actin. *Methods in Enzymology.* 196:100-118.

Schmit, A.C. Lambert, A.M. (1987) Characterization and dynamics of cytoplasmic F-actin higher plant endosperm cells during interphase, mitosis, and cytokinesis. *J. Cell. Biol.* 105:2157-2166.

Schutt, C.E. Lindberg, U. Myslik, J. Strauss, N. (1989) Molecularpacking in profilin:actin crystals and its implications. *J. Mol. Biol.* 209:735-746.

Seagull, R.W. (1989) The plant cytoskeleton. *CRC Crit. Rev. Plant.Sci.* 8:131-167.

Seagull, R.W. Falconer, M.M. Weerdenburg, C.A. (1987) Microfilaments: dynamic arrays in plant cells. *J. Cell. Biol.* 104:995-1004.

Segura, M. Lindberg, U. (1984) Separation of non-muscle isocactins

in the free form or as profilactin complexes. J. Biol. Chem. 259:3949-3954.

Shariff, A. Luna, E. (1992) Diacylglycerol-stimulated formation of actin nucleation sites at plasma membrans. Science. 256:245-247.

Sherwin, T. Gull, K. (1989) Visualization of detyronisation along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoeskeleton duplication in Trypanosomes. Cell. 57:211-221.

Singer, R.H. Langevin, G.L. Lawrence, J.B. (1989) Ultrastructural visualization of cytoskeletal mRNAs and their associated proteins using double-label in situ hybridization. J. Cell Biol. 108:2343-2353.

Southwick, F.S. Young, C.L. (1990) The actin released from profilin-actin complexes is insufficient to account for the increase in F-actin in chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes. J. Cell Biol. 110:1965-1973.

Stryer, L. (1988) Biochemistry. W.H. Freeman & Company. pp. 1089.

Tan, Z. Boss, W. (1992) Association of phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol monophosphate kinase, and diacylglycerol kinase with the cytoskeleton and F-actin fraction of carrot (*Daucus carota* L.) cells grown in suspension culture. Plant Physiol.

100:2116-2120.

Tanaka, I. Wakabayashi, T. (1992) Organization of the actin and microtubule cytoskeleton preceding pollen germination. *Planta*. 186:473-482.

Tanaka, M. Shibata, H. (1985) Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are profilin and a profilactin. *Eur. J. Biochem.* 151:291-297.

Tang, X. Hepler, P.K. Scordilis, S.P. (1989) Immunochemical and immunocytochemical identification of a myosin heavy chain polypeptide in *Nicotiana* pollen tubes. *J. Cell Science*. 92:569-574.

Theriot, J.A. Mitchison, T.J. Tilney, L.G. Portnoy, D.A. (1992) The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature*, 357:257-260.

Tilney, L.G. Bonder, E.M. Coluccio, L.M. Mooseker, M.S. (1983) Actin from thymine sperm assembles on only one end of an actin filament: A behavior regulated by profilin. *J. Cell Biol.* 97:112-124.

Tobacman, L.S. Korn, E.D. (1982) The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase

activity by *Acanthamoeba* profilin. J. Biol. Chem. 25:4166-4170.

Towbin, H. Staehelin, T. Gordon, J. (1979) PNAS. 76:4350.

Traas, J.A. Doonan, J.H. Rawlins, D.J. Shaw, P.J. Watts, J. Lloyd, C.W. (1987) An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. J. Cell. Biol. 105:387-395.

Tseng, P.C.H. Runge, M.S. Cooper, J.A. Williams, R. C. Pollard, T.D. (1984) Physical, immunochemical, and functional properties of *Acanthamoeba* profilin. J. Cell Biol. 98:214-221.

Tuderman, L. Kuutti, E.R. Kivirikko, K.I. (1975) An affinity-column procedure using Poly(L-proline) for the purification of Prolyl Hydroxylase. Eur. J. Biochem. 52:9-16.

Turkina, M.V. (1987) Actin and myosin filaments from the conducting tissues of *Heracleum sosnowskyi*. Plant Physiol. Biochem. 25:689-696.

Vahey, M. Titus, M. Trautwein, R. Scordilis, S. (1982) Tomato actin and myosin: contractile proteins from a higher land plant. Cell Motil. Cytoskeleton. 2:131-147.

Valenta, R. Duchene, M. Pattenburger, K. Sillaber, C. Valent, P.

Bettelheim, P. Ereitenbach, M. Rumpold, H. Kraft, D. Scheiner, O. (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 253:557-559.

Valenta, R. Sperr, W.R. Ferreira, F. Valent, P. Sillaber, C. Tejkl, M. Duchene, M. Ebner, C. Lechner, K. Kraft, D. Scheiner, O. (1993) Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:88-97.

Vandekerckhove, J.S. Kaiser, D.A. Pollard, T.D. (1989) *Acanthamoeba* actin and profilin can be cross-linked between glutamic acid 364 of actin and lysine 115 of profilin.. *J. Cell Biol.* 109:619-626.

Villanueva, M.A. Ho, S.C. Wang, J.L. (1990) Isolation and characterization of one isoform of actin from cultured soybean cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 227:35-41.

Vojtek, A. Haarer, B. Field, J. Gerst, J. Pollard, T.D. Brown, S. Wigler, M. (1991) Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 66:497-505.

Weltman, J.K. Dowben, R.M. (1973) Relatedness among contractile and membrane proteins: Evidence for evolution from common ancestral genes. *PNAS*. 70:3230-3234.

Widada, J.S. Ferraz, C. Liautard, J.P. (1989) Total coding sequence of profilin cDNA from *Mus musculus* macrophage. *Nucleic Acids Research*. 17:2855.

Williamson, R.E. McCurdy, D.W. Hurley, U.A. Perkin, J. L. (1987) Actin of *Chara* giant internodal cells. *Plant Physiol*. 85:268-272.

Wu, F.S. Wang, M.Y. (1984) Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electroforesis from protease-rich plant tissue. *Anal. Biochem*. 139:100-103.

Xu, P. Lloyd C.W. Staiger, C.J. Drobak, B.K. (1992) Association of phosphatidylinositol 4-kinase with the plant cytoskeleton. *Plant Cell*. 4:941-951.

Yang, F. Demna, M. Warren, V. Dharmawerdhane, S. Condeelis, J. (1990) Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* elongation factor 1a. *Nature*. 347:494-496.

Young, V.B. Falkow, S. Schoolnik, G.K. (1992) The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: Internalization of invasin-bearing bacteria by eucaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. *J. Cell Biol*. 116:197-207.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Sánchez, al Dr. Lourival Possani, al Dr. David Romero, a la Dra. Alejandra Covarrubias y al Dr. Miguel Lara por la revisión de este trabajo.

Al personal del bioterio y en especial a la M.V.Z. Elizabeth Mota Moreno y al Tec. Sergio Gonzales Trujillo por asesorarme con el manejo de los conejos.

Al M.C. Fernando Zamudio por relizar la secuencia de aminoácidos.

Al personal de la Unidad de Análisi y Síntesis del IBB por obtener un análisis de aminoácidos.

A Raúl Noguez por su ayuda para realizar la figura 1.