

51
29



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLÁN"

" AISLAMIENTO DE UNA PROTEINA SIMILAR A ACTINA DE Salmonella typhimurium LT-2 "

T E S I S

Que para Obtener el Título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

OLIVERIO SANCHEZ URIBE

DIRECTOR: Dra. Mireya de la Garza Amaya



Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1988.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. OBJETIVOS	13
IV. MATERIALES Y METODOS.	
MATERIALES	14
1.- Cepa de <u>Salmonella typhimurium</u> LT-2	14
2.- Conejos para la elaboración de antisueros	14
3.- Reactivos químicos	14
4.- Medios de cultivo	15
5.- Soluciones y soluciones reguladoras	15
6.- Antisueros	16
7.- Fuente de poder	16
METODOS	17
1.- Conservación de las cepas bacterianas	17
2.- Esterilización de los medios de cultivo	17
3.- Purificación de actinas de conejo, pavo y pollo	17
a) Preparación de polvos cetónicos	17
b) Extracción de actina	18
c) Purificación de la actina por polimerización	18
4.- Obtención de extractos de células completas en forma de polvos cetónicos	19

	Página
5.- Obtención de las fracciones membranal y cito-- plásmica	20
6.- Obtención de la proteína similar a actina en <u>Salmonella typhimurium</u> LT-2	21
7.- Electroforesis unidimensional	22
a) Preparación de las muestras	22
b) Preparación de los geles y condiciones para -- la electroforesis	23
8.- Electroforesis bidimensional	23
9.- Método para detectar proteínas, por tinción con azul de Coomassie	25
10.-Métodos de Caracterización de proteínas	25
a) Determinación del peso molecular	25
b) Determinación del punto isoelectrico	26
c) Mapas unidimensionales de péptidos	26
11.-Purificación de actina para ser utilizada como antígeno	27
12.-Protocolo de inmunización	29
13.-Pruebas de inmunodifusión	30
a) Precipitación en tubo capilar	30
b) Doble inmunodifusión en portaobjetos	31
c) Titulación de sueros y antisueros	31
d) Reacciones de identidad	32
14.-Cuantificación de proteínas	33
a) Método de Lowry	33
b) Método de Bradford	34

	Página
V. RESULTADOS	35
1.- Purificación de actina de conejo	35
2.- Caracterización de la actina de conejo por electroforesis unidimensional	35
3.- Caracterización de la actina de conejo por electroforesis bidimensional	35
4.- Obtención de las fracciones membranal y -- citoplásmica de <u>Salmonella typhimurium</u> LT-2	39
5.- Electroforesis unidimensional de las fracciones membranal y citoplásmica y de los polvos cetónicos de la fracción membranal bacteriana	39
6.- Electroforesis bidimensional de las fracciones bacterianas	40
7.- Purificación de la proteína bacteriana con PII y PI semejante a actina de conejo	40
8.- Caracterización por digestión enzimática de la actina y de la proteína bacteriana similar a ésta	48
9.- Purificación de actinas de músculo de pollo y pavo y molleja de pavo	51
10.-Inmunodifusiones	53
VI. DISCUSION	57
VII. CONCLUSIONES	64
VIII. BIBLIOGRAFIA	66
IX. Abreviaturas	75
X. Lista de figuras y tablas	76

I. RESUMEN

En organismos eucariontes se ha visto que en el citoesqueleto, uno de sus componentes son los microfilamentos, los que están formados por polímeros de actina y miosina; algunas técnicas que son útiles para el estudio de proteínas del citoesqueleto las utilizamos para identificar una proteína similar a actina en Salmonella typhimurium LT-2, basadas en el hecho de que ya han sido realizadas en otro organismo procarionte como es el caso de Escherichia coli.

Las técnicas utilizadas en este trabajo fueron: electroforesis unidimensional, electroforesis bidimensional, purificación por ciclos de polimerización-despolimerización, proteólisis enzimática y elaboración de anticuerpos contra actinas de pavo, buscando la posibilidad de reacción cruzada con una fracción bacteriana.

Las fracciones membranal y citoplásmica obtenidas por el método de eliminación de la pared con lisozima y un extracto bacteriano total obtenido por sonicación, se corrieron en electroforesis unidimensional y bidimensional en geles de poliacrilamida-5% junto con actina de músculo esquelético de conejo, encontrándose en todos los casos la existencia de proteínas con PIs y PIs similares a actina de músculo esquelético de conejo.

Al intentar la purificación de la proteína bacteriana similar a la actina de conejo mediante ciclos de polimerización-des

polimerización en presencia y ausencia de KCl 0.10 M no se tuvo éxito. Tal purificación se probó con o sin inhibidores de proteasas (para impedir la autólisis bacteriana) y además con o sin tratamiento de acetona al extracto bacteriano. Este método se siguió para cada una de las tres fracciones mencionadas, con los mismos resultados.

Otra forma de caracterizar la posible actina presente en la bacteria fué utilizando el método de Cleveland. Después del tratamiento con proteasa V-8 de Staphylococcus aureus, se encontró que un péptido bacteriano se separó en 6 fracciones, mientras que la actina solo en 2; la movilidad de los péptidos resultantes de la actina de conejo es común con 2 péptidos de la fracción bacteriana.

Considerando el resultado anterior y que la actina es definida como una proteína altamente conservada se procedió a inducir la formación de anticuerpos contra actinas de músculo y molleja de pavo, mismas que fueron purificadas. También se purificó actina de músculo de pollo que sirvió de control. Los antiseros obtenidos se probaron por inmunodifusión y se encontró que éstos además de presentar reacción de precipitación con su respectivo antígeno (actina), también presentaban reacción de precipitación con actinas de otras fuentes y además con las fracciones bacterianas membranal, citoplásmica y sonicada de S. typhimurium LT-2.

II. INTRODUCCION :

El citoesqueleto se define como un conjunto de estructuras citoplásmicas que dan forma a la célula y que es un complejo estructural dinámico, que puede actuar como un elemento de soporte o experimentar cambios rápidos en estructura y disposición. La mayoría de las células eucarióticas son pleomórficas, ya que presentan alto grado de organización interna. Pueden cambiar de forma, producir movimientos en su interior con el fin de distribuir sus organelos y en ocasiones pueden migrar de un sitio a otro. (19, 24, 25 39).

Los constituyentes del citoesqueleto son: los microtúbulos, los filamentos intermedios, las microtrabéculas y los microfilamentos (19, 24, 25, 39).

Los microtúbulos son estructuras tubulares de longitud variable con diámetro de 25 nm, con grosor de pared de 5 nm; están constituidos por una proteína principal denominada tubulina. Esta proteína se ha conservado durante la evolución y forma un dímero de aproximadamente 115,000 daltones, resultado de la interacción de dos polipéptidos; uno de 53,000 daltones llamado alfa y otro de 55,000 daltones denominado beta (10, 19, 39, 44).

Los filamentos intermedios reciben ese nombre ya que su tamaño es intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos. Tienen un diámetro de 10 nm por lo que se conocen también como los filamentos de 100 Å, su longitud es variable y a veces

se asocian en haces. Estos filamentos intermedios no se ramifican y se han identificado en una gran variedad de células -- animales. Se definen cinco tipos de filamentos intermedios : de células mesenquimatosas, cuya proteína principal es vimentina (17), de células nerviosas (29, 62), de células musculares cuya proteína principal es desmina (37), de las células de la glia (61) y de las células epiteliales cuyas proteínas que lo componen se llaman citoqueratinas (49).

Las microtrabéculas o también denominadas matriz citoplásmica son los componentes menos estudiados del citoesqueleto. -- Se ha descrito en forma de redes finas de delicados filamentos de 3-6 nm de diámetro con la técnica de alto voltaje. Estos -- filamentos se interconectan entre sí formando una red fina o malla tridimensional que aparentemente conecta las estructuras celulares como microtúbulos, cisternas del retículo endoplásmico, polisomas o fibras de tensión. Aún no se conoce la naturaleza molecular de las microtrabéculas; sin embargo se sugiere que su proteína es muy similar a actina (19, 39).

Los microfilamentos están formados por los filamentos delgados (actina) y los filamentos gruesos (miosina). Ambos tienen una participación importante en mecanismos de contractilidad, motilidad y citocinesis (8, 18, 19, 39, 47, 63).

Los filamentos delgados miden de 5-7 nm de diámetro, son de longitud variable y por lo regular se encuentran como haces que tienen de 0.1 μ m a 0.2 μ m de diámetro. Existen en células -

musculares y no musculares, en ocasiones se asocian en la membrana plásmática y es posible visualizarlos como fibras de tensión que cruzan el citoplasma. Son polímeros de una proteína principal que tiene un PM de 43,000 daltones, denominada actina (8, 18, 19, 26, 33, 38, 39, 40, 51).

La actina es una proteína ubicua de las células eucarióticas (8, 19, 23, 25, 39). Se le ha encontrado con relativa abundancia en una gran variedad de células (19), tales como eritrocitos (64), plaquetas (60), plantas (7, 11, 30, 31, 40, 46, 55, 56, 57, 58), de cerebro de rata (40), corazón de bovino (71), de protozoarios (19, 39, 47, 63), etc.

La actina es una proteína conservada en la escala evolutiva y existen diferentes isoformas de ellas (1, 16, 21, 23, 43, 71, 76). Esto se demostró determinando la estructura primaria de las actinas obtenidas de diversas fuentes, encontrándose que por lo menos hay seis actinas que varían en algunos aminoácidos del extremo amino terminal, lo que produce algunas diferencias en el punto isoelectrónico. Las actinas de músculo tienen un PI de 5.4 y se les denomina alfa; las células no musculares tienen dos isoactinas diferentes, tienen un PI ligeramente más básico que la actina alfa y se les denomina beta y gamma (1, 16, 19, 22, 23, 70, 71, 72, 13, 43).

Dentro de la célula puede encontrarse la actina en dos formas: como proteína globular, a la que se da el nombre de actina G o monomérica; o constituyendo filamentos que resultan

de la polimerización de las unidades, denominada actina F o actina filamentososa (8, 19, 39).

La polimerización de la actina y los factores que intervienen en esta reacción han sido ampliamente estudiadas in vitro. Entre estos factores se han descrito proteínas asociadas a la actina, que modifican tanto la polimerización como su estado de agregación en la célula. Estas proteínas son varias y se ha hecho su clasificación bioquímica y funcional. De acuerdo a su modo de acción se han diferenciado en :

1.- Proteínas sensibles a calcio con propiedades de entrecruzar. Estas entrecruzan los filamentos de actina y estimulan la formación de racimos. Por ejemplo la proteína ARP en macrófagos o plaquetas, o la filenina en células de hígado, del cerebro, de la tiroides y del músculo estriado.

2.- Proteínas moduladoras de actina sensibles a calcio - que forman geles débiles, por ejemplo la alfa-actinina.

3.- Proteínas moduladoras de actina insensibles a calcio. Estas interactúan como la actina globular e impiden la polimerización. Un ejemplo es la profilina (13, 19, 28, 29, 32, 33, 39, 74).

Vistos al microscopio electrónico los filamentos de actina consisten de dos cadenas de actina globular de 4 nm de diámetro enrolladas formando una hélice, cuyos extremos se unen con las moléculas de miosina. Las estructuras que se forman al inte-

raccionar la actina con la cadena pesada de la miosina dan como resultado las características cabezas de flecha vistas por tinción negativa (19, 25, 39, 51).

Los filamentos gruesos están formados por miosina, que es una proteína soluble en altas concentraciones de sal. Está formada por seis polipéptidos: dos cadenas pesadas de 200,000 daltones y dos pares de ligeras de 20,000 y 16,000 daltones. Las cadenas pesadas forman fibras con extremos globulares o cabezas que se asocian a los filamentos de actina para la contracción del sarcómero. Cuando la actina se asocia a la miosina in vitro se activa la ATPasa de la miosina, independientemente de la presencia de calcio y es regulada por troponina y tropomiosina. Estas dos proteínas inhiben la interacción de la miosina y la actina en ausencia de calcio. En células no musculares, es importante la fosforilación de la miosina por mecanismos dependientes de calcio y una enzima cinasa específica (19, 39, 50, 59).

Existen dos metodologías básicas para el estudio de la estructura del citoesqueleto que son: la microscopía electrónica y la inmunofluorescencia (19, 36, 39).

La microscopía electrónica puede hacerse por tinción negativa, que permite observar sin necesidad de hacer cortes finos de estructuras particulares o fibrosas, o mediante la solubilización de la membrana y extracción de la matriz citoplásmica con el empleo de detergentes no iónicos, los que dejan como --

residuo una red de filamentos diferentes, que en conjunto representan el citoesqueleto, ya que las proteínas solubles y fosfolípidos son eliminados. (19, 35, 39, 51).

La inmunofluorescencia aprovecha la propiedad del citoesqueleto de poseer una secuencia muy similar de aminoácidos en sus proteínas por lo cual los anticuerpos preparados en contra de una de estas proteínas dan reacción cruzada con la misma proteína, pero de diferente fuente. Esta es el caso de tubulina y actina.

Aunque la alta conservación de las proteínas de este tipo puede presentar inconvenientes en la elaboración de anticuerpos, estos inconvenientes pueden ser superados con la desnaturalización de las proteínas con SDS, posteriormente reducción con glutaraldehído y por último reprecipitación con AlCl_3 . El producto es utilizado con adyuvantes obteniéndose buenos títulos de anticuerpos (19, 36, 39, 44).

La investigación bioquímica de los microfilamentos (actina y miosina), se inició con J. T Edsall en 1930 en proteínas contráctiles de músculo de conejo, quien extrajo en agua fría una fracción soluble a la que se denominó miógeno, encontrándose una buena cantidad de proteína residual que podía extraerse con KCl 0.6 M frío y precipitarse por dilución o por diálisis del extracto para disminuir la concentración de KCl . Tal proteína es la que ahora se conoce como miosina y este extracto además contiene una buena cantidad de actina. Poste-

riormente en 1939 Engelhart y su esposa Lyubinoba encontraron que la miosina preparada por el método anterior posee actividad enzimática; en presencia de iones Ca^{++} cataliza la hidrólisis del fosfato amino terminal del ATP, dando como resultado ADP y fosfato inorgánico. Teniendo este conocimiento y unido al hecho de que la miosina extraída con KCl 0.5 M frío al ser diluida precipitaba en forma de hebras delgadas, se propuso que la miosina estaba involucrada en el proceso contráctil dependiente de energía (3, 38, 39).

En 1941 Banga, Szent-Györgyi y en 1942 Straub descubrieron que además de la miosina se encontraba actina en el músculo esquelético de conejo. La actina fué aislada por primera vez en 1942 por Straub separando la proteína en forma viscosa de un complejo de actomiosina. En 1943 Straub reveló que la actina puede ser obtenida en forma viscosa (actina G o globular). --- Actualmente se definen dos componentes principales del músculo esquelético: actina y miosina, que representan aproximadamente un 80 % del aparato contráctil. Existen otros en menor proporción como son troponina y tropomiosina, proteína C, etc. (38, 39).

Se encuentran en la literatura un sinnúmero de reportes de trabajos de aislamiento, purificación y caracterización de actina y miosina de organismos eucariotes, en células musculares y no musculares. Actualmente se estudia con mucho interés la posible función que tiene la actina en protozoarios parásitos, a la cual se le atribuye participación en fenómenos tales-

como movimiento, adhesión, fagocitosis (47, 43). La localización de actina en trofozoitos de Entamoeba histolytica se ha hecho por técnicas de inmunofluorescencia usando un suero anti-actina, FITC-phalatoxina o con anticuerpos monoclonales contra actina; se localizó la fluorescencia en membrana y también en citoplasma. Algunas propiedades similares de actinas de músculo y amibas son: los pesos moleculares similares, la capacidad de polimerizarse y despolimerizarse in vitro y la unión a la fracción pesada de miosina. Existen diferencias in vitro como son la viscosidad de polímeros y la cinética de activación de la Mg-ATPasa. Además la actina de amibas no es capaz de unirse a DNAasa I, como las actinas musculares (47, 43).

Hay estudios que establecen la existencia de posibles proteínas del citoesqueleto de eucariontes en organismos procariontes. Se tienen reportes de la existencia de proteínas similares a actina y miosina en E. coli (43, 50, 51). En otros trabajos se establece la existencia en algunos procariontes como: Sarcospha (41), Staphylococcus aureus forma L (15), Micrococcus xanthus (5), Pseudomonas, Proteus y Photobacterium (75). --- Tales estructuras se llaman rapidosomas y algunos investigadores los llaman microtúbulos, que se forman y presentan en bacterias en forma L como el estafilococo o bien en bacterias en fase de degeneración por autólisis. Estas estructuras se han observado por microscopía electrónica (44).

En lo que concierne al estudio de la actina y la miosina de procariontes se cuenta con muy pocos reportes. Minkoff y -

Damadian (48) en 1976 proponen la existencia de proteínas similares a ellas en la bacteria E. coli. En este trabajo se postula que la actina participa en un fenómeno de hinchamiento celular que se relaciona con el transporte de K^+ a través de la membrana citoplásmica.

En 1978 Nakamura y Jatanabe (49) comprueban la existencia de proteínas similares a actina y miosina en E. coli. En este mismo año Nakamura, Takahashi y Jatanabe (51) afirman que en esta bacteria existen proteínas idénticas a la actina y la miosina de músculo esquelético de conejo.

Para identificar a la proteína similar a actina los autores antes mencionados utilizaron las técnicas siguientes :

1.- Movilidad en electroforesis unidimensional.

2.- Capacidad de polimerización y despolimerización in vitro . La técnica de purificación empleada es muy similar a la de Spudich y Watt para purificar actina de músculo esquelético de conejo por ciclos de polimerización-despolimerización en presencia y ausencia de KCl 0.1 M.

3.- Capacidad de activar la Mg-ATPasa de músculo.

La miosina se purificó por su solubilidad en KCl 0.6 M e identificada su movilidad en geles de poliacrilamida-5%.

La confirmación de la existencia de actina y miosina en E. coli se dió por resultados de estudios de microscopía electrónica en los que se observó la formación de filamentos gruesos de tamaño uniforme de 0.6 y 0.7 μ m de longitud y cerca

de 20 nm de ancho muy similares a los de músculo de conejo. También se observó la formación de filamentos delgados en KCl - 0,1 M de 5-9 nm, que son comparables a los de músculo de conejo.

También la fracción similar a actina se decoró con mero-miosina posada de músculo (HFM) y presentó una estructura en forma de flecha, esta estructura desapareció en presencia de - ATP.

Hasta la fecha, no se han hecho experimentos que demuestran la presencia de actina y miosina en Salmonella typhimurium, enterobacteria muy similar bioquímica y genéticamente a E. coli.

III. OBJETIVOS :

- a) Demostrar la existencia en Salmonella typhimurium LT-2 de una proteína similar a actina, cuya presencia está plenamente demostrada en eucariontes.
- b) Buscar la localización de esta proteína en la bacteria.

IV. MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES :

- 1.- Cepa de Salmonella typhimurium LT-2. Protótipo, obtenida de la colección del difunto Dr. Demarec.
- 2.- Conejo machos de la raza Nueva Zelanda de 6 meses de edad.
- 3.- Reactivos químicos.

Fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, ácido acético, carbonato ácido de sodio, carbonato de sodio, azida de sodio, ácido bórico, tetraborato de sodio y citrato de sodio fueron de J. T. Baker. Xalostoc, México.

Sulfato de cobre pentahidratado, tartrato de sodio y potasio, reactivo de Folin, etanol, ácido fosfórico, cloruro de potasio, metanol y cloruro de aluminio fueron de Merck. Darmstadt. Rep. Fed. de Alemania.

Azul de Coomassie G-250, tris grado amortiguador y reactivo, lisozima, proteasa V-8 de Staphilococcus aureus, glicerol, ATP, glutaraldehido, marcadores de peso molecular, adyuvante completo e incompleto de Freund, inhibidores de proteasas y suero de chivo anti IgG de conejo fueron de Sigma Chemical Co., St. Louis MO. EUA.

Agar bacteriológico, agar G-S, dextrosa y peptona de caseína H fueron de Bioxon de México.

Acrilamida y bisacrilamida fueron de Sherve. Feinbiochemica Heidelberg. Rep. Fed. de Alemania.

La agarosa fué de Seakom (FMC) Corporation Marine Colloids Div. Rockland, ME. EUA.

Tomed y persulfato de amonio fueron de Bio-Rad Laboratories. Richmon, CA. EUA.

Las anfclinas fueron de Productos LKB. AB. Bromma, -- Suecia.

4.- Medios de cultivo.

DCG : Medio que contiene Davis normal, glicerol al 0.4 % y peptona de caseína H al 0.4 %.

DCg : Medio que contiene Davis normal, glucosa al 0.4 % y peptona de caseína H al 0.4 %.

5.- Soluciones y soluciones reguladoras (4).

- Solución reguladora de ácido bórico-bórax, 0.2 M y pH 8.8
- Soluciones reguladoras de fosfatos 0.1 M y 0.1 M de pH -- 7.0 y 7.4, respectivamente.
- Davis normal:

Se pesan por separado :

K_2HPO_4	0.0402 M
KH_2PO_4	0.072 M
$MgSO_4$	0.00083 M
$(NH_4)_2SO_4$	0.0075 M

Dado que su uso fue muy frecuente, se preparó al medio diez veces más concentrado (10 X). Además es importante disolver - cada soluto por separado y agregar al final al volumen deseado.

d) Inhibidores de proteasas (53).

EMSF	0.2	µl
UEM	50	mM
Leuoptina	100	mM
DIFF	5	mM

e) Solución salina fisiológica :

NaCl al 0.85 % (p/v), se distribuye en porciones de 100 ml y se esteriliza en autoclave.

f) Solución reguladora de tris.

g) Regulador TCK :

Tris HCl 0.01 M de pH 7.6, $MgSO_4$ 0.01 M y KCl 0.05 M .

5.- Anticueros.

La preparación de los anticuerpos se hizo en conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 6 meses de edad.

7.- Fuente de poder que proporcione hasta 800 voltios y corriente constante (útil para electroforesis uni y bidimensional).

MÉTODOS :

1.- Conservación de las cepas bacterianas.

La cepa bacteriana utilizada en este trabajo se conservó a 4°C con medio Davis normal, agar y peptona de caseína al 0.4% en tubo de tación de rosca, inclinado. Se resacaba en el mismo medio y se chequeaba periódicamente en agar 5-5.

2.- Esterilización de medios de cultivo.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 15 lb/pulg^2 de presión de vapor (121°C) por 15 minutos. En el caso de que se utilizara dextrosa se filtraba con membranas millipore.

3.- Purificación de actina de conejo, pavo y pollo.

(8, 19, 39).

a) Preparación de polvos actínicos.

De un conejo, pavo o pollo se obtuvieron los músculos de la espalda y del cuello (en el caso del pavo también la malleja), se limpiaron de tejido adiposo y se fraccionaron en trozos pequeños que se suspendieron en 5 volúmenes de una solución que contenía KCl 0.5 M y NaHCO_3 5 mM (amortiguador B) y se homogenizaron en un mortero a temperatura de mezcla de acetona y hielo seco. Este homogenizado se transfirió a vasos precipitados donde se agitó por 15 minutos a 4°C . La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a $5,000\text{ r.p.m.}$ a 4°C y la pastilla se lavó 3 veces con 5 volúmenes de agua, ajustando el pH después de cada lavado a 8.2 con Na_2CO_3 1 M . Después del úl-

El tiempo lavado la pastilla se resuspendió en 5 volúmenes de acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente. El tratamiento con acetona se repitió dos veces más y el precipitado final se colectó por filtración en papel Whatman 3 y se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente.

b) Extracción de la actina.

Se hizo una extracción a partir de polvos cetónicos con 20 volúmenes de un amortiguador que contenía CaCl_2 0.3 mM, ---- 2-mercaptoetanol 0.5 mM, ATP 0.2 mM y tris-HCl 2 mM de --- pH 8.0 (amortiguador S), durante 10 minutos a 0 °C. En seguida esta suspensión se filtro en embudo Buchner con papel Whatman número 1. El residuo y el filtro se lavaron con 10 volúmenes de amortiguador S. Los filtrados se mezclaron y se les cuantificó la concentración de proteína. Este extracto proteínico fue utilizado para la purificación de actina por polimerización.

c) Purificación de la actina por polimerización.

El extracto obtenido de los polvos cetónicos fue centrifugado 1 hora a 5,000 r.p.m., a 4 °C; el sobrenadante se ajustó a una concentración de 10 mM de KCl y 2 mM de MgCl, se agitó suavemente por 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación la suspensión se dejó agitando de 10-14 horas a 4 °C. El precipitado de actina polimerizada se resuspendió en el amortiguador S y se dializó contra este mismo amortiguador durante 1 día, cambiando el amortiguador cada 12 horas.

Durante la diálisis, la actina polimerizada (también llamada actina F) es despolimerizada a la forma monomérica o actina

G. La solución de actina 3 fue centrifugada a 30,000 r.p.m., a 4 °C, durante 3 horas. El ciclo de polimerización-despolimerización se repitió dos veces más en caso necesario.

4.- Obtención de extractos de células completas en forma de polvos catiónicos (48, 50).

- a) Se crecieron las bacterias en medio MCG durante 7-9 horas a 37 °C.
- b) Se cosecharon por centrifugación a 5,000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C.
- c) Se lavaron dos veces con solución de tris-HCl 10 mM de pH - 7.4 y se centrifugó a 5,000 r.p.m.; se resuspendieron en la misma solución y se agregaron inhibidores de proteasas.
- d) Se rompieron por sonicación en una unidad de ultrasonido (Manufacturing Scientific Equipment) a 0.9 Wp durante 2 minutos totales, repartidos en 9 tiempos de sonicación de 30 segundos con intervalos de 30 segundos.
- e) El homogenado se suspendió en 5 volúmenes de acetona durante 30 minutos con agitación ligera. Este tratamiento se hizo dos veces más, se filtró en papel Whatman número 3 y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche.

Los polvos catiónicos obtenidos se utilizaron para electroforesis uni y bidimensional y para la purificación de la proteína similar a actina.

5.- Obtención de las fracciones membranal y citoplásmica.

(20)

- a) Se crecieron las bacterias en dos litros de TCC durante 7-9 horas a 37 °C.
- b) Se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C.
- c) Se lavaron dos veces con solución reguladora de tria-HCl - 10 ml, de pH 7.4 con CaCl_2 5 mM.
- d) Las bacterias cosechadas se trataron con 120 mg de lisozima y 8 ml de regulador TTK más sacarosa al 20 %. Se dejó actuar la lisozima por 10-30 minutos.
- e) Se congeló y descongeló varias veces a - 70 °C y 37 °C. La congelación se realizó con una mezcla de acetona y hielo seco. Se observó un aumento en la viscosidad de la solución.
- f) Se añadió DNase II (a 10 ml de TTK se agregó 1 ml de solución patrón de 1 mg/ml). Se aspiró y expiró la mezcla con una pipeta varias veces, hasta quitar la viscosidad.
- g) Se eliminaron las células intactas centrifugando a 1,000 r.p.m. por 10 minutos.
- h) El sobrenadante se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 20 minutos y el sedimento se resuspendió en 5 ml o más de TTK.
- i) Se agregaron inhibidores de proteasas. Estos pueden agregarse en el paso (g) si no se hacen mediciones de actividades enzimáticas.

La fracción membranal y la fracción citoplásmica obtenidas por este método se separaron en dos partes; una se guardó en congelación y la otra se liofilizó.

6.- Obtención de la proteína similar a actina de Salmonella typhimurium LT-2 (49,50).

- a) Se cultivaron las bacterias en medio FCG durante 7-9 horas, a 37 °C.
- b) Se cosecharon por centrifugación a 5,000 r.p.m. a 4 °C por 15 minutos.
- c) Se suspendieron en solución tris-HCl 10 mM de pH 7.4 y se lavaron tres veces; por último se suspendieron en esta solución y se rompieron por métodos diferentes y se agregaron inhibidores de proteasas.
- d) La suspensión fragmentada se diluyó en 5 volúmenes de acetona y se agitó en forma continua por 1 hora a 4 °C.
- e) Se filtró la suspensión a través de papel Whatman número 3, se secó al aire el precipitado de acetona y se suspendió en una solución que contenía: tris-HCl 0.5 mM de pH 7.4, ATP - 0.2 mM, 2-mercaptoetanol 0.5 mM (solución despolimerizante). La suspensión se hizo en proporción de 5 volúmenes/gr de polvo catiónico.
- f) 1 volumen de la suspensión final se dializó contra 50 volúmenes de solución despolimerizante.
- g) La preparación se centrifugó por 15 minutos a 10,000 r.p.m. y a 4 °C, así sedimentaron las partículas celulares.
- h) El sobrenadante de la centrifugación anterior se centrifugó por 3 horas a 30,000 r.p.m. a 4 °C, de esta manera se eliminó el material insoluble.
- i) La proteína presente en el sobrenadante se polimerizó por -

umento en la concentración de sales. El sobrenadante se llevó a una concentración de KCl 0.1 M y $MgSO_4$ 0.2 mM y se agitó suavemente por 2 horas.

- j) La mezcla obtenida se centrifugó por 3 horas a 30,000 r.p.m. a 4 °C. De esta manera se obtiene la fracción polimerizada.
- k) La pastilla obtenida se suspendió en solución despolimerizante por toda la noche.

Se repitió dos veces más el ciclo de polimerización-despolimerización.

El intento de purificación de la posible actina se hizo a partir de rollos catódicos, del extracto crudo obtenido por sonicación y del extracto obtenido por eliminación de la pared con lisozima, y en todos ellos con la presencia y ausencia de inhibidores de proteasas.

7.- Electroforesis unidimensional (34).

a) Preparación de las muestras.

Las muestras a ser analizadas por electroforesis fueron disueltas en la solución de Laemmli (en algunas ocasiones fueron liofilizadas previamente). A continuación, se ajustaron a una concentración final de 2-mercaptoetanol de 5%, se calentaron a temperatura de ebullición del agua por 3-5 minutos y después de alcanzar la temperatura ambiente se colocaron en los pozos. La cantidad de proteína que se aplicó a cada pozo fue de 30-50 ug en extractos totales y de 5-10 ug en el caso de proteínas puras.

b) Preparación de los geles y condiciones para la electroforesis.

La electroforesis unidimensional se realizó en geles planos de 15 X 19 mm y de 1.5 mm de espesor. El gel separador o resolutivo se preparó a las concentraciones finales siguientes: acrilamida 10 %, bisacrilamida 0.27 %, SDS 0.1 %, tris-HCl 0.39 M de pH 9.8. La polimerización del gel se logró al agregar el persulfato de amonio al 0.05 % y temed al 0.08 %.

El gel concentrador se preparó a las concentraciones finales siguientes: acrilamida 5 %, bisacrilamida 0.14 %, tris-HCl 0.125 M, de pH 6.8. Para polimerizar el gel se agregó persulfato de amonio a una concentración final de 0.05 % y temed a una concentración final de 0.01 %.

La solución reguladora que se utilizó para electroforesis contenía: glicina 0.129 M, SDS 0.1 %, tris-HCl 0.025 M de pH 8.3. La electroforesis se realizó a 100 voltios durante el tiempo necesario para que el colorante utilizado como marcador llegara a 1 cm de la base del gel.

8.- Electroforesis bidimensional (53).

Las muestras para electroforesis en dos dimensiones se resuspendieron en solución de G'Farrell. Los geles cilíndricos para enfoque isoeléctrico median 12,5 cm de largo por 3mm de diámetro. La composición de los geles cilíndricos fué la siguiente: urea 9.16 M, acrilamida 3.7 %, bisacrilamida 0.02 % y anfólinas al 0.01 % en un rango de pH de 5-7. La polimerización de los geles se catalizó cuando se agregó persulfato de amonio y temed a las concentraciones finales de 0.01 % y 0.07 %

respectivamente. Durante la polimerización de los geles se pusieron 20 ul de urea 8 M, sobre la mezcla y se dejaron reposar por espacio de 1-2 horas. Después se reemplazó la urea 8 M por la solución de O'Farrell y sobre ésta se adicionaron 10 ul de agua bidestilada. Al término de 1-2 horas, se agregó nuevamente solución A y se agregaron las soluciones del ánodo y cátodo de la cámara electroforética. Para el ánodo se utilizó NaOH 0.02 M desionificada, y para el cátodo H_3PO_4 0.01 M. Los geles se recorrieron por 15 minutos a 200 voltios y 30 minutos a 600 voltios. En seguida se retiró la solución de NaOH y la solución A, se aplicaron las muestras sobre los geles y schreffer se adicionaron 10 ul de solución K (urea 8.0 M y anclinas al 0.05 %). La cámara se lleno de nuevo con NaOH 0.2 M y la electroforesis se desarrolló a 600 voltios por 15 horas y 600 voltios por 1 hora.

Cuando terminó la electroforesis, los geles se sacaron de los tubos por medio de presión de aire con una jeringa, o continuación se equilibraron con 10 ul de solución "C" de O'Farrell, por espacio de 1 hora, se retiró la solución "C" y los geles se guardaron a $-70^{\circ}C$ hasta que se usaron para la separación en la segunda dimensión.

Los geles que se utilizaron en la segunda dimensión se prepararon en las mismas condiciones que se describieron en la primera dimensión.

El gel cilíndrico se colocó en la parte superior del gel plano y se selló con agarosa al 1 % en solución "C" y se corrió

en las mismas condiciones que los geles para la separación unidimensional, excepto que el amortiguador de la cámara superior se le adicionaron unas gotas de azul de bromofenol concentrado, como colorante marcador del frente de migración electroforética. El gradiente generado en los geles cilíndricos de inoelectroforesis se midió fraccionando el gel sin equilibrar. Se tomaron fracciones de 5 mm del gel y se colocaron en frascos - vidrios que contenían 2 ml de agua bidestilada descalcificada, a continuación se agitaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se midió el pH en un potenciómetro convencional.

9.- Método para detectar proteínas, por tinción con azul de Coomassie (3, 19).

Para detectar proteínas por electroforesis unidimensional, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.025 % en ácido acético al 10 % y metanol al 50 % durante 1 hora. Luego los geles fueron destañados en la misma solución, pero sin colorante, durante 1 hora.

Finalmente se pasaron a una solución de ácido acético al 10 % en donde se dejaron toda la noche hasta que se destañaron totalmente.

10.- Métodos de caracterización de proteínas (19,34).

a) Determinación del peso molecular.

El peso molecular de las proteínas analizadas se determinó por electroforesis unidimensional comparando la distancia de migración en relación al frente del gel, con las distancias migradas por proteínas de pesos moleculares conocidos.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron :

proteína	PM
Fosforilasa.....	94,000 daltones
Albúmina	68,000 daltones
Ovoalbúmina	43,000 daltones
Anhidrasa carbónica	30,000 daltones
Inhibidor de tripsina	20,000 daltones

b) Determinación del punto isoeléctrico (53).

El punto isoeléctrico de las proteínas se calculó por electroforesis bidimensional de la siguiente manera: el gel se cortó en rebanadas de 0.5 cm, cada uno por separado se cubrió con 250 ul de agua bidestilada y se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. Al final de este tiempo se midió el pH con un potenciómetro convencional. Con los datos obtenidos se trazó la escala de pH del gel. Por interpolación en esta escala se calculó el PI de la proteína.

c) Mapas unidimensionales de péptidos (9).

Primero se separaron por electroforesis unidimensional las proteínas del extracto bacteriano, lo mismo que la actina de conejo purificada por ciclos de polimerización-despolimerización. Después se tiñeron los geles brevemente con azul de Coomassie al 0.1 % en metanol al 50 % y ácido acético al 10 % y se destiñeron con la misma solución, pero sin colorante; se eligieron las bandas que iban a someterse a digestión enzimática. Cada una de estas bandas se recortó y equilibró durante 30 mi-

nutos en una solución amortiguadora que contenía tris 0.025 M, SDS al 0.1 % y EDTA 0.001 M. Posteriormente las rebanadas del gel se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Para digerir las proteínas enzimáticamente y posteriormente separar los péptidos resultantes por electroforesis unidimensional se preparó un gel de poliacrilamida al 15 %, según descripción anterior, excepto que contenía EDTA a una concentración final de 0.001 M.

En cada pozo del gel, se colocó con la espátula una rebanada de la proteína que iba a ser digerida. Posteriormente se cubrió con 10 μl de tris 0.125 M de pH 6.8, SDS al 0.5 %, glicerol al 20 %, azul de bromofenol al 0.0015 % y encima de esta solución se colocaron 10 μl de la misma solución que contenía la concentración deseada de la enzima y glicerol al 10 %. La enzima que se utilizó en este trabajo fue la proteasa V-8 de Staphylococcus aureus. Los gels se corrieron a 100 voltios hasta que el colorante indicador alcanzó el gel separador. En este momento la fuente de poder se apagó durante 30 minutos para permitir que la digestión enzimática se llevara a cabo. Transcurrido este tiempo el gel se corrió a 125 voltios, hasta que el indicador llegó al frente del gel. Una vez terminada la corrida los gels se tiñeron con azul de Coomassie.

11) Purificación de actina para ser utilizada como antígeno (39).

La actina se purificó por ciclos de polimerización-des-

polimerización, según método de Spudich y Platt 1971. Las ---
 fuentes de obtención fueron de músculo y molleja de pavo. La
 purificación final de actina se efectuó por electroforesis --
 unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS, usando el sis-
 tema de Laemmli 1970; la preparación de la proteína parcialmen-
 te purificada (1-2 mg/ml) se solubilizó por 5 minutos en buffer
 de muestra (solución que contiene: 50-100 mM de 2-mercaptoetanol,
 glicerol al 10 %, SDS al 2 % y tris-HCl 0.08 M de pH 6.8 y unas
 gotas de azul de bromofenol y se analizó sobre un gel preparati-
 vo de poliacrilamida-SDS. Al final de la corrida la placa --
 del gel se tiñó por un tiempo de 15-25 minutos en azul de Coom-
 massie al 0.25 %, etanol al 47.5 % y ácido acético al 10 % y -
 luego se destiñeron en etanol al 20 % y ácido acético al 7.5 %.

Las bandas de interés (actina) fueron cortadas y neutrali-
 zadas exhaustivamente en tris-HCl de pH 6.8 y 0.01 M y la pro-
 teína fué eluida por incubación en un buffer de muestra con ---
 2-3 cambios cada 12 horas a 37 °C. Después de la elución la -
 proteína se dializó contra NH_4HCO_3 0.05 M y luego se liofilizó
 y se determinó proteína por métodos de Lowry y Bradford. Luego
 la proteína liofilizada se disolvió en un pequeño volumen de --
 NaCl 0.15 M y fosfato de sodio 0.01 M de pH 7.2 y se precipitó
 con AlCl_3 , el pH disminuyó y se reajustó a 7.0 con NaOH 1 M.
 El producto de este precipitado se trató con glutaraldehído -
 al 0.1 % por un tiempo de 2-10 horas a temperatura ambiente,
 luego del tratamiento con glutaraldehído se volvió a reprecipi-
 titar con AlCl_3 y se reajustó el pH a 7.0 .

Otra forma de preparar el antígeno fué la siguiente : si se tiene la certeza de que la actina este completamente pura, se disuelve en solución reguladora de muestra y se calienta - por 3-5 minutos en baño maría a 100 °C. La proteína solubilizada (1 mg/ml) se precipita directamente con $AlCl_3$ al 1 %, -- alternativamente se trata con glutaraldehído al 0.1 % por un tiempo de 2 a 10 horas a temperatura ambiente. Después del tratamiento con éste último se trata con $AlCl_3$ al 0.1 % ---- (recuérdese que cuando se precipite con $AlCl_3$ el pH disminuye y que es necesario reajustarlo a 7.0 con $NaOH$ 1 M).

El precipitado obtenido (antígeno) se guardó a 4 °C o -- bien en congelación a -20 °C, ya que es muy estable.

12) Protocolo de inmunización (6, 12, 39, 52).

El esquema de inmunización en conejos machos de la raza - Nueva Zelanda fué el siguiente:

Se inocularon dos antígenos preparados de fuente diferente y en forma diferente (para cada antígeno un conejo).

Día 0 : Los conejos fueron sangrados de la vena marginal de la oreja, para obtener el suero control.

Día 1 : Se tomaron 0.3 del precipitado de proteína, se mezcló con un volumen igual de ACF y se inyectó al animal por vías subcutánea e intramuscular.

Día 14 : Se tomaron 0.3 mg del precipitado de proteína y se -- mezclaron con igual volumen de AIF y se inyectaron al conejo por vías intramuscular y subcutánea, haciendo múltiples punciones.

Días : 28, 42, 56, 70. Se inocularon los conejos en forma simi-
lar al día 14.

Después de 7 días de la última inyección se inocularon 0.1 mg de precipitado cada dos días por vía intravenosa, haciendo un total de seis. Tres días después se inocularon 0.3 mg de precipitado por vía intravenosa y a los seis días 0.5 mg.

La obtención de la sangre se efectuó a los 7 días después de la última inyección de antígeno por punción en la vena margi-
nal en la oreja. La sangre se colocó en un tubo, se removi6 al coagulo con aplicador o espátula y se dejó durante toda la noche a 4 °C; el suero se colectó por centrifugación a 10,000 r.p.m. - por 10 minutos y se precipitó con un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio sobre hielo por 15 minutos. Las -- globulinas así obtenidas se centrifugaron a 10,000 r.p.m. por 10 minutos y dializaron contra solución reguladora de tris-"Cl de - pH 7.5 y 0.02 M, NaCl 0.15 M y ácido B-amino caproico 1 mM. Una parte de inmunoglobulinas (anticuerpos) se utilizó para pruebas de inmunodifusión y otra se guardó en congelación.

13.- Pruebas de inmunodifusión :

a) Precipitación en tubo capilar.

Por capilaridad fueron llenados varios tubos capilares con iguales volúmenes de antígenos (actina) con sus antisueros cor-
respondientes. Se mezclaron perfectamente por inversiones -- continuas y agitación, para después dejarlos reposar durante - 24 horas en posición vertical. La presencia de precipitado --- en la interfase indicó la reacción antígeno-anticuerpo. Los - antígenos también se mezclaron con sueros normales obtenidos --

de los conejos, antes de inmunizar usándose como controles.

b) Doble inmunodifusión en portaobjetos (5, 12, 14, 52, 54).

En portaobjetos, limpios y desengrasados colocados sobre una base fija perfectamente horizontal se vertieron 4 ml de solución reguladora de bicarbonatos de pH 8-8.2 y 0.02 M con agarosa al 1 %. La horadación de los pozos se hizo en forma hexagonal con un diámetro de 2-3 mm y la distancia entre éstos y un pozo central fué de 6 mm. Los pozos se llenaron con pipetas Pasteur y las placas se colocaron dentro de una cámara húmeda a temperatura ambiente, examinando con detalle las líneas de precipitación después de 1-6 días. Para eliminar los falsos positivos debido a la reacción no específica de la proteína C reactiva con polisacáridos de la preparación, las placas se suspendieron en citrato de sodio al 5 % durante 45 minutos. Luego los gels se lavaron con solución reguladora de fosfatos por 24 horas. Las placas ya lavadas se colocaron en una estufa bacteriológica a 36 °C; una vez deshidratadas se tincieron con anidoblock al 0.1 %, eliminando el exceso de colorante con una solución de metanol, ácido acético glacial y agua destilada en proporción 5 : 1 : 4 respectivamente.

c) Titulación de sueros y antisueros (4, 6, 12, 14, 52, 54).

Se efectuó por la técnica de inmunodifusión de Cuchterlony. A cada uno de los sueros obtenidos de los conejos (I, II) preparados contra actinas de músculo y molleja de pavo respectivamente, se les hicieron las siguientes diluciones en PBS o SS 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Las cuales fueron dis-

tribuidas en los pozos de la periferia de un hexágono siguiendo el sentido de las manecillas del reloj. El pozo central fué llenado con su correspondiente antígeno (actina) en concentración de 1 mg/ml.

En estas inmunodifusiones se detectó la reacción antígeno-anticuerpo y también en cuáles diluciones del suero se presentaba tal reacción.

Se utilizaron también diluciones similares y distribuidas de igual forma al caso anterior, pero colocando en el centro la fracción sonicada de S. typhimurium LT-2, para establecer la posible reacción cruzada.

Ensayos similares fueron efectuados con los sueros normales o preinmunes.

En la mayoría de los casos anteriores se presentaban reacciones de precipitación con el suero concentrado o bien hasta la dilución 1:8 (en algunos casos sólo hasta la dilución 1:2); por lo que se procedió a utilizar la dilución 1:2 para las pruebas siguientes.

d) Reacciones de identidad .

- Cada una de las actinas se colocó en el centro de un sistema de inmunodifusión a una concentración de 1 mg/ml y a su alrededor se llenaron los pozos con los sueros normales (preinmunes) y los antisueros.

- El extracto bacteriano obtenido por sonicación se colocó en el pozo central a una concentración de 5 mg/ml y en los pozos que lo rodean se llenaron con sueros preinmunes y antisueros contra actina. Lo mismo se efectuó con la fracción membranal y la fracción citoplásmica de la bacteria.

- Cada antisuero se colocó en el pozo central de un sistema de inmunodifusión y a su alrededor se llenaron con las actinas de músculo de conejo, músculo de pollo, molleja o músculo de pavo; todas a una concentración de 1 mg/ml. En los pozos restantes se adicionó extracto sonificado de la bacteria en concentración de 5 mg/ml y por último en suero comercial anti IgG de conejo preparado en chivo a una dilución 1:100 o bien albúmina bovina con concentración de 1 mg/ml; ambos como controles.

14.- Cuantificación de proteínas.

a) Método de Lowry, 1951 (42).

El color final es el resultado de la reacción de Biuret de proteína con el ión cobre en alcali y la reducción del fosfotungstato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína tratada. Las lecturas se hacen a 750 m μ . Para soluciones más concentradas las lecturas pueden realizarse cercanas a 500 m μ .

Técnica :

Patrón de albúmina de 100 μ g/ml. Rango de 20-100 μ g de proteína.

Soluciones :

- a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 0.5 %
- b) Tartrato de sodio y potasio al 2 %
- c) Carbonato de sodio al 2 % en NaOH 0.1 N
- d) 1 volumen de "a" + 1 volumen de "b"
- e) 50 volúmenes de "c" + 1 volumen de "d"

1.- Colocar en tubos de ensayo la solución de proteína conteniendo entre 20-100 ug de proteína. En caso necesario ajustar el volumen a 1 ml.

2.- Agregar 5 ml de solución (e), mezclar y dejar reposar por 10 minutos.

3.- Agregar 0.5 ml de reactivo de Folin, agitar y dejar reposar 30 minutos.

4.- Leer a 750 m μ y calcular la concentración por interpolación en la curva patrón.

b) Método de Bradford, 1976 (3).

Reactivos : Solución de azul de Coomassie G-250; disolver 100 mg en 50 ml de etanol al 95 %, agregar 100 ml de H_3PO_4 al 85 % w/v, diluir a 1 litro.

Técnica :

Colocar en tubos de ensayo 0.1 ml de solución de proteína que contenga entre 10-100 ug. Agregar 5 ml de azul de Coomassie y mezclar por inversión o vortex. Medir la absorbancia a 595 nm, después de 2 minutos y antes de 1 hora. El blanco deberá contener 0.1 ml de solución reguladora y 5 ml de reactivo de azul de Coomassie. El problema se resuelve por interpolación en curva.

V. RESULTADOS .

1.- Purificación de actina de conejo.

La purificación de actina de conejo se inició a partir de 100 gr de músculo, obtenido inmediatamente después de sacrificar al animal. De esta cantidad se obtuvieron 20 gr de polvos catiónicos. Una vez que se efectuaron los ciclos de polimerización-despolimerización se encontró que por cada gramo de polvo catiónico se obtuvieron 10 mg de actina.

2.- Caracterización de la actina de conejo por electroforesis unidimensional.

Se hizo la electroforesis colocando en el pozo del gel - 5-10 ug de proteína pura. La movilidad de esta proteína se comparó con proteínas cuyo Pi era conocido y se verificó su pureza. Se encontró en algunos casos un péptido mayoritario con movilidad similar a la ovoalbúmina, cuyo Pi es de 47,300 - daltones e igual a la actina pura comercial. En otros casos solo se observó un solo péptido con movilidad igual a la actina comercial y al marcador de Pi . (figura 1)

3.- Caracterización de la actina por electroforesis bidimensional.

Se verificó de nuevo el Pi de la actina purificada y su Pi de 5.4. El Pi de la proteína se calculó según la curva de recalibración obtenida por el gradiente de pH formado en el gel y tomando en cuenta la movilidad de las proteínas. (figuras 2 y 3).

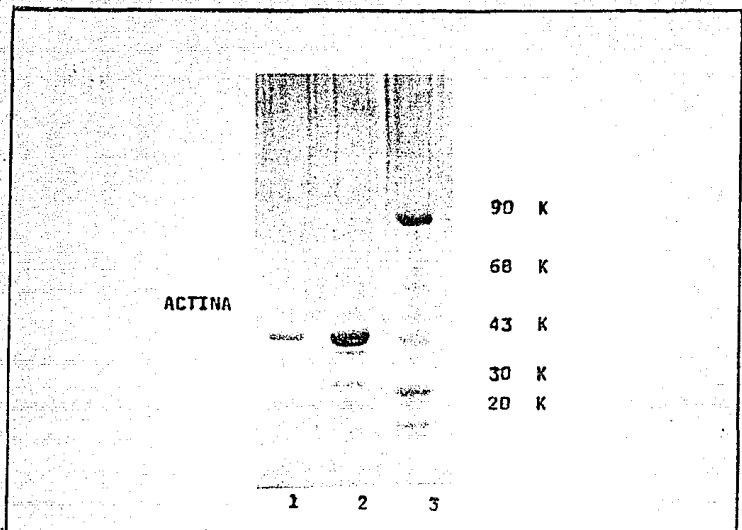


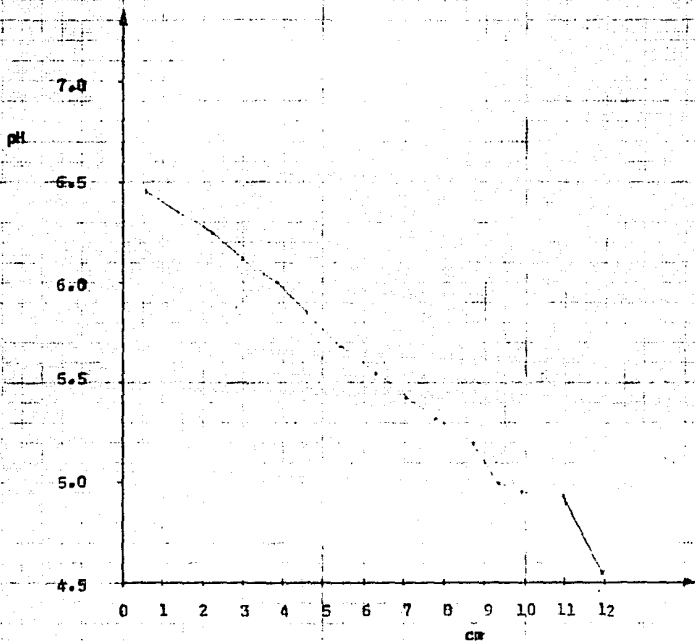
Figura 1 : Electroforesis unidimensional de la actina purificada de músculo esquelético de conejo.

Carril 1 : Actina pura comercial de músculo esquelético de conejo.

Carril 2 : Actina y otras proteínas de músculo esquelético de conejo, obtenidas al final del primer ciclo de polimerización-despolimerización.

Carril 3 : Marcadores de peso molecular, cuya movilidad en el gel sirve para determinar el PM de la actina.

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO.



MOVILIDAD DE LAS PROTEINAS EN EL GEL

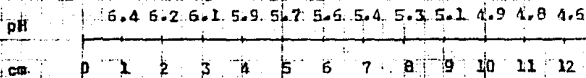


Figura 2.

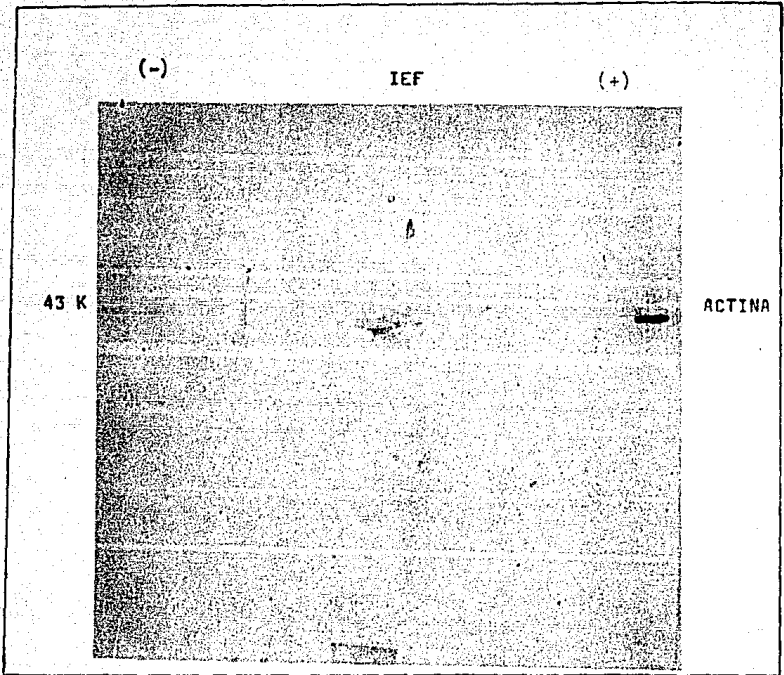


Figura 3 : Electroforesis bidimensional de la actina purificada de músculo esquelético de conejo PI 5.4 .

Los valores de P_M y P_I indicados antes son los que reportan diversos autores para actina de músculo esquelético de conejo.

4.- Obtención de las fracciones membranal y citoplásmica de Salmonella tychimurium LT-2.

La masa total obtenida de la coquecha de los cultivos bacterianos una vez lavados, fué de 50 gramos de peso húmedo. De esta cantidad se obtuvieron las fracciones membranal y citoplásmica. Una vez separadas, la fracción membranal se trató con acetona y se obtuvieron un total de 15 gramos de polvos cetónicos. De la fracción citoplásmica se conservó una parte en congelación a 0°C y otra se liofilizó.

5.- Electroforesis unidimensional de las fracciones membranal y citoplásmica y de los polvos cetónicos de la fracción membranal bacteriana.

A los extractos obtenidos de la bacteria se les cuantificó la cantidad de proteína por los métodos de Lowry y Bradford. Se disolvieron 80 μg de cada fracción en 40 μl de solución reguladora de muestra y se separaron electroforéticamente junto con la actina de conejo previamente purificada, los marcadores de P_M y en algunos casos actina pura comercial (figuras 4, 5, 10).

Obsérvese que los patrones electroforéticos de la fracción membranal y sus polvos cetónicos son idénticos, mientras que la fracción citoplásmica es diferente a éstas, aunque se comportan

varios péptidos. En todas las fracciones aparece un péptido con movilidad igual a la actina y al marcador de PM de 43,000 daltones.

6.- Electroforesis bidimensional de las fracciones bacterianas.

Se hizo una separación por isoelectroenfoque de cada una de las fracciones obtenidas de *Salmonella*.

En la figura 6 se muestra el gel de la fracción membranal en el que aparece un péptido con PM y PI similares a la actina de músculo de conejo. También se pueden observar 2 péptidos que tienen un PI similar a la actina de conejo, pero el PI para uno es más básico, mientras que para el otro es más ácido que el de actina de conejo que es de 5.4.

En la figura 7 se presenta el gel de la fracción citoplásmica, en este se observa la presencia del péptido con PM y PI similar a actina, sin embargo los otros dos péptidos presentes en la fracción membranal no son observados.

En la figura 8 se tiene el gel de la electroforesis bidimensional de los polvos acetónicos obtenidos de la fracción membranal y se tiene el mismo resultado que en el caso de la figura 5.

7.- Purificación de la proteína bacteriana con PM y PI semejante a actina de conejo.

Se hizo por el método para *E. coli* de Nakamura y Watanabe de 1978 y que tiene mucho en común con el de Spudich y Watt 1971, para purificar actina de músculo de conejo. Se utiliza--

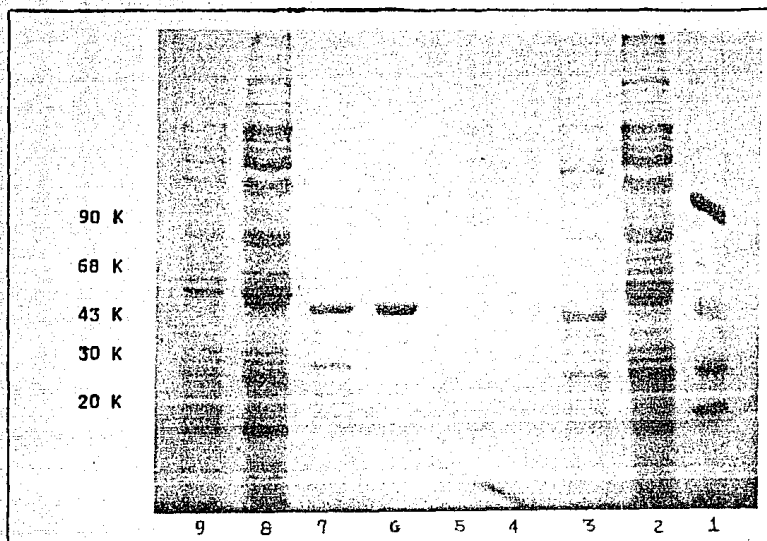


Figura 4 : Electroforesis unidimensional de extractos obtenidos de Salmonella typhimurium LT-2 comparados con el actina de músculo esquelético de conejo.

- Carril 1 : Escalera de peso molecular
 Carril 2 : Fracción membranal obtenida por el método de Kaback.
 Carril 3 : Fracción citoplásmica obtenida por el método de Kaback.
 Carril 4 : Lisozima.
 Carril 5 : DNasa.
 Carril 6 : Actina pura (comercial) de músculo de conejo.
 Carril 7 : Actina purificada de músculo de conejo.
 Carril 8 : Fracción sonicada.
 Carril 9 : Polvo catiónico de la fracción sonicada.

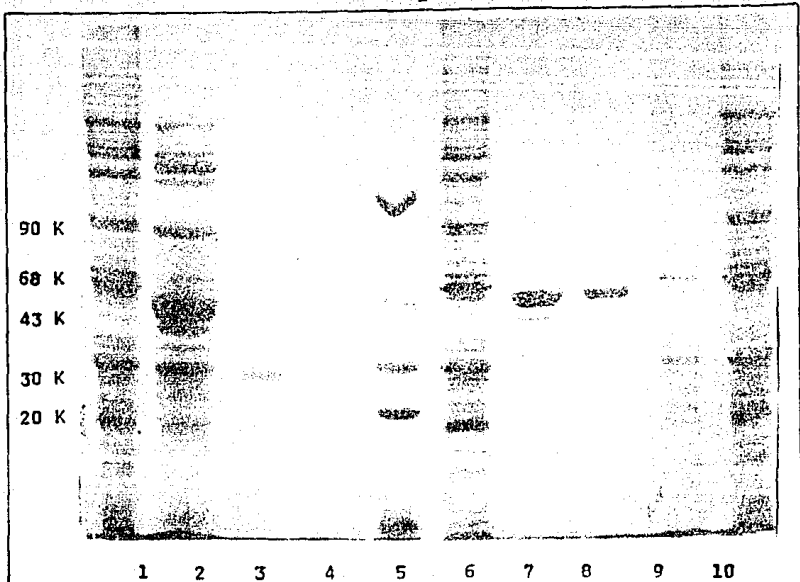


Figura 5 : Electroforesis unidimensional de extractos obtenidos de Salmonella typhimurium LT-2, actina y marcadores de peso molecular.

Carril 1 : Polvo cetónico obtenido de la fracción sonicada

Carril 2 : Fracción sonicada de la bacteria.

Carril 3 : DNAasa.

Carril 4 : Lisozima.

Carril 5 : Marcadores de peso molecular.

Carril 6 : Polvo cetónico preparado de la fracción membranal.

Carril 7 : Actina de conejo sámpura.

Carril 8 : Actina de conejo pura.

Carril 9 : Fracción citoplásmica de la bacteria.

Carril 10 : Fracción membranal de la bacteria.

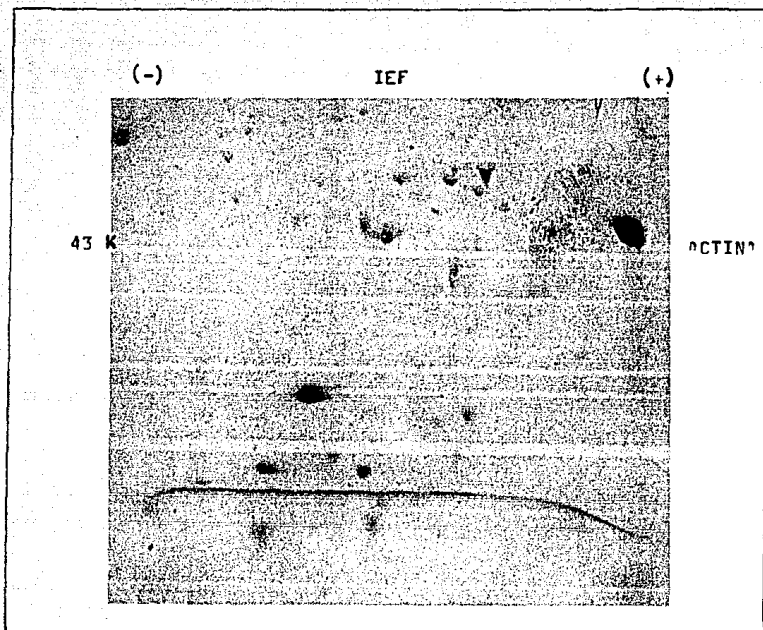


Figura 6 : Electroforesis bidimensional de la fracción membranal de Salmonella typhimurium LT-2, obtenida por eliminación de la pared con lisozima.

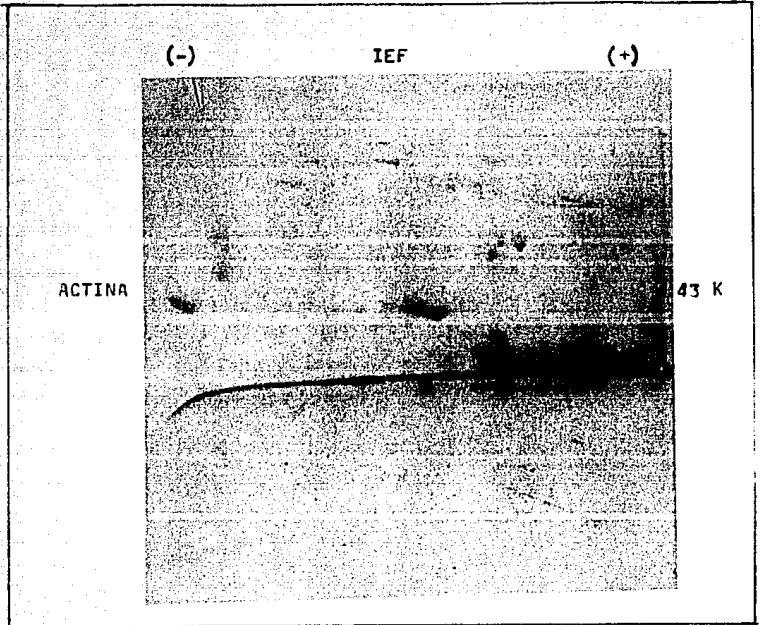


Figura 7 : Electroforesis bidimensional de la fracción citoplásmica de Salmonella typhimurium LT-2, obtenida por --eliminación de la pared con lisozima.

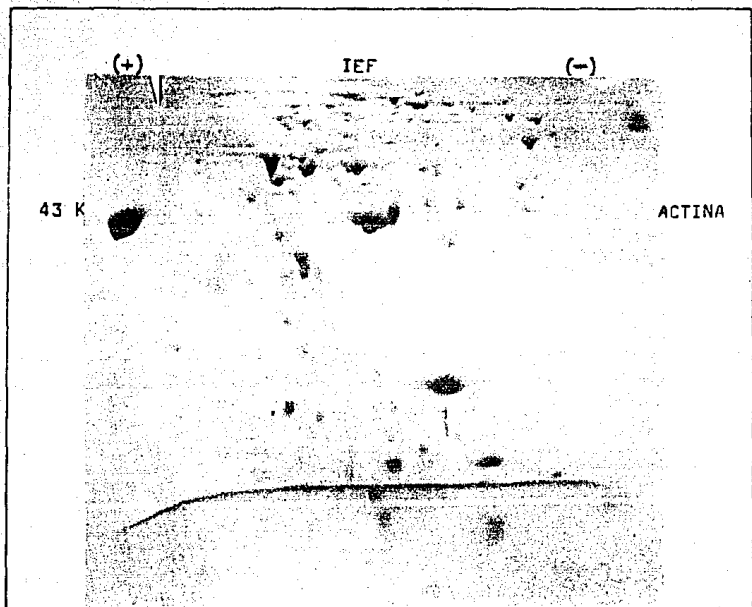


Figura 3 : Electroforesis bidimensional de los polipéptidos catiónicos preparados a partir de la fracción membranal, obtenida de Salmonella typhimurium LT-2 por eliminación de la pared con lizozima.

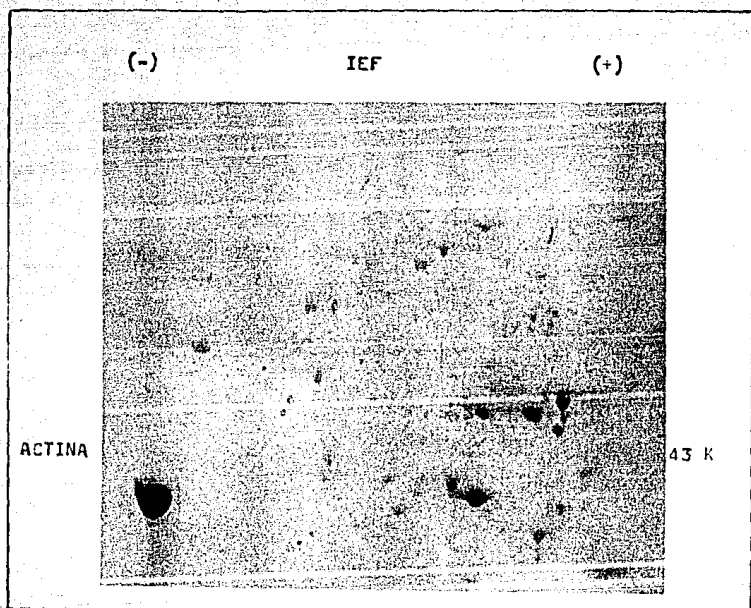


Figura 9 : Electroforesis bidimensional de la fracción asociada de Salmonella typhimurium LT-2.

con los polvos cetónicos de la fracción membranal.

Se tomaron muestras de cada uno de los ciclos de polimerización que se hicieron y se les cuantificó la cantidad de proteínas por los métodos de Lowry y Bradford. Estas muestras fueron corridas en electroforesis unidimensional y se encontró que en los primeros ciclos se encontraban patrones electroforéticos similares al extracto original, sin embargo en las extracciones últimas no se detectó péptido alguno.

Se pensó en la posibilidad de que durante el tratamiento de la bacteria para obtener la fracción membranal en donde se alternan la congelación y descongelación, la posible proteína actina pierda sus propiedades de polimerización-despolimerización, o bien la acción de enzimas proteolíticas que alteren sus propiedades. Esta última opción fue eliminada ya que se intentó la purificación a partir de la fracción membranal de la proteína en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas. También se intentó la purificación a partir de la fracción membranal directamente ya que no se observó ninguna ventaja al tratar la fracción membranal con la acetona y formar los polvos cetónicos. No se tuvo éxito a pesar de que se inició la purificación a partir de 15 gramos de polvo cetónico o bien 50 gramos de fracción membranal (peso húmedo).

Otro método de homogenización bacteriana utilizada fue la sonicación. La fracción sonicada de la bacteria presentó patrones electroforéticos similares a la fracción membranal, tanto -

para electroforesis unidimensional como bidimensional (figuras 4, 5, 9 y 10).

La purificación de la posible actina bacteriana se inició a partir de los polvos catiónicos obtenidos de la fracción sonicada. Se tomaron muestras en cada uno de los ciclos de polimerización-despolimerización y se les cuantificó proteína por los métodos de Lowry y Bradford, a cada una de las muestras se les tomo la cantidad necesaria para electroforesis unidimensional como bidimensional. Se obtuvieron resultados similares al anterior, en los primeros ciclos se presentaban patrones similares al obtenido con los polvos catiónicos y en las últimas muestras no se observó polipéptido alguno.

La purificación también se intentó a partir de la fracción sonicada or da sin tratar con acetona, con la presencia ó ausencia de inhibidores de proteasas y sin embargo en todos los casos no se tuvo éxito en la purificación.

8.- Caracterización por digestión enzimática de la actina de conejo y de la proteína bacteriana similar a ésta.

En el patrón electroforético resultante de la hidrólisis con proteasa V-8 de S. aureus, para la proteína bacteriana se detectaron un mayor número de péptidos. En la actina de conejo se presentaron 2 péptidos de los cuales ambos tienen la misma movilidad que dos de los péptidos totales presentes en la bacteria (figura 11).

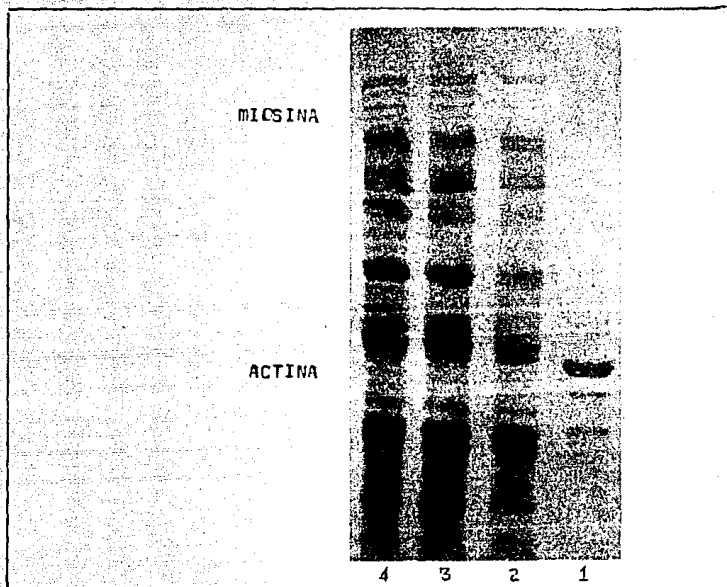


Figura 10 : Electroforesis unidimensional de extractos bacterianos y actina de conejo.

- Carril 1 : Actina con miosinas y otras proteínas obtenidas al final del primer ciclo de polimerización-despolimerización de músculo de conejo.
- Carril 2 : Fracción membranal de Salmonella typhimurium LT-2.
- Carril 3 : Polvo catiónico de la fracción membranal.
- Carril 4 : Fracción sonicada de Salmonella typhimurium LT-2.

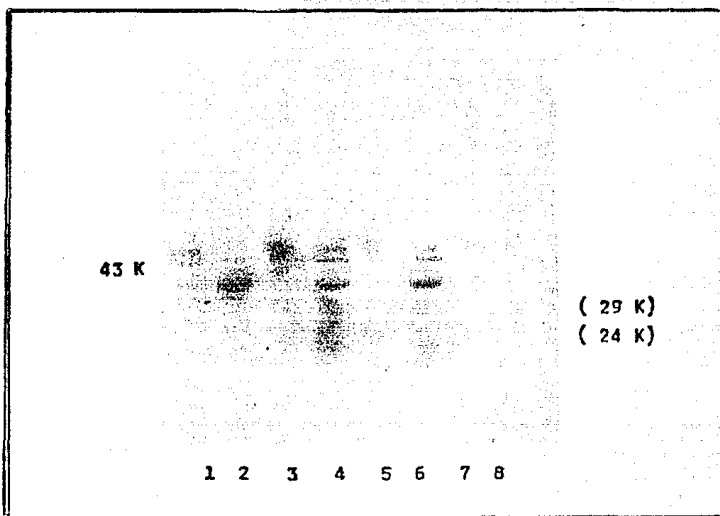


Figura 11 : Electroforesis de los péptidos resultantes de la proteólisis de la actina y de la proteína similar a ésta de Salmonella typhimurium LT-2.

Carriles 1, 2, 4, 6 ; Proteínas bacterianas con 25, 50, 100 y 150 ug/ml de enzima, respectivamente.

Carriles 3, 5 ; Actina de conejo con 50 y 100 ug/ml de enzima - respectivamente.

Carril 7 : Actina de conejo sin proteólisis.

Carril 8 : Proteína bacteriana similar a actina, sin proteólisis.

9.- Purificación de actinas de músculo de pollo, músculo y ---
molleja de pavo.

La purificación se hizo por el método de Scudich y Jett -
1971. Las actinas obtenidas de músculo y molleja de pavo se -
purificaron por varios ciclos de polimerización-despolimeriza-
ción, ya que fueron utilizadas para la elaboración de anti-
cuerpos en conejos (figura 12).

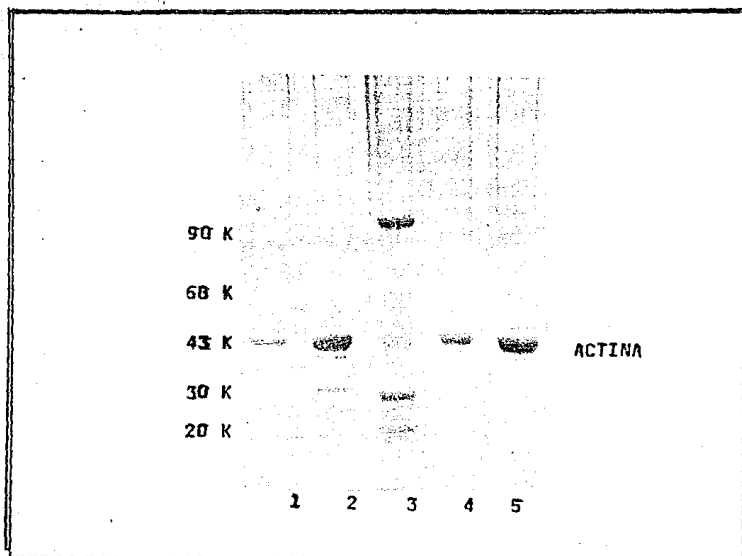


Figura 12 : Electroforesis unidimensional de actinas de diversas fuentes.

Carril 1 : Actina de músculo de pollo.

Carril 2 : Actina de músculo de conejo (semipura).

Carril 3 : Marcadores de peso molecular.

Carril 4 : Actina de molleja de pavo.

Carril 5 : Actina de músculo de pavo.

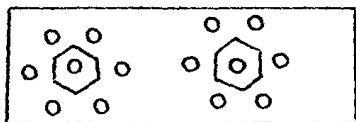
Como se muestra, se presentó reacción cruzada entre los -
antisueros I & II con la actina de conejo.

d : similar a (a), pozo central fracción bacteriana sonicada
(5 mg/ml).

e : similar a (b), pozo central fracción bacteriana sonicada
(5 mg/ml).

En ambos casos se presentó una banda de precipitación ---
hasta la dilución 1 : 4 .

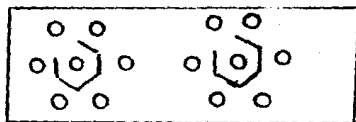
C.- Reacciones cruzadas de los antisueros I y II contra acti-
nas de diferentes fuentes (1 mg/ml) y contra extractos -
de Salmonella (5 mg/ml).



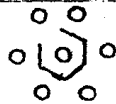
a



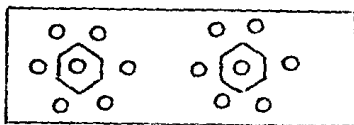
b



c



d



e

f

a : pozo central : suero hiperinmune I, dilución 1 : 2 .
poros de la periferia : 1, actina de músculo de pavo; 2,
actina de mollaja de pavo; 3, de músculo de conejo; 4, de
músculo de pollo; 5, fracción sonicada bacteriana; 6, sue-
ro anti IgG de conejo preparado en chivo, dilución. 1:100
(control positivo).

- b** : similar a (a), pozo central: suero hiperinmune II.
- c** : similar a (a). Pozo 6, albúmina bovina 1 mg/ml (control negativo).
- d** : similar a (c), pozo central : suero hiperinmune II.
- e** : similar a (a), pero los pozos de la periferia contienen :
 1, actina de músculo de pavo; 2, de músculo de pollo; --
 3, de músculo de conejo; 4, 5, 6 fracciones bacterianas cito-lésmica, membranaral e sonicada respectivamente.
- f** : similar a (e), pozo central : suero hiperinmune II.

Quando se hicieron los experimentos recíprocos, colocando en el pozo central las diferentes fracciones de Salmonella y en la periferia los anticuerpos específicos contra actina, se obtuvieron resultados similares a los anteriores.

RESULTADOS DE LAS INMUNODIFUSIONES DE LOS SUEROS NORMALES Y
LOS ANTISUEROS CON ACTINAS Y LAS FRACCIONES BACTERIANAS.

SUEROS	ACTINAS DE				FRACCIONES			ANTI IgG DE CONEJO PREPARADA EN CHIVO	ALBUMINA BOVINA
	MUSCULO DE		MOLEJA DE		FM	FC	FS		
	POLLO	CONEJO	PAVO	PAVO					
NORMALES									
I	-	-	-	-	-	-	-	+	-
II	-	-	-	-	-	-	-	+	-
HIPERINMUNES									
I	+	+	+	+	+	+	+	+	-
II	+	+	+	+	+	+	+	+	-

FM : FRACCION MEMBRANAL
FC : FRACCION CITOPLASMICA
FS : FRACCION SONICADA

TABLA I

VI. DISCUSIÓN :

Se purificó actina de músculo esquelético de conejo por el método de Spudich y Watt, en el cual se alternaban ciclos de -- polimerización-despolimerización en presencia y ausencia de KCl 0.1 M y ultracentrifugaciones. Se verificó la pureza y el PM de la actina por electroforesis unidimensional corriendo a la vez actina pura comercial y otros marcadores de peso molecular -- como son : fosforilasa, albúmina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina; cuyos pesos moleculares son 94,200, 68,000, 43,000, 30,000, 20,000 daltones respectivamente. Encontrándose que en el gel de poliacrilamida-5% la proteína purificada tiene la misma movilidad que la actina pura comercial y que la ovoalbúmina, que es el marcador de PM utilizado, cuyo -- valor corresponde a 43,000 daltonas. También se caracterizó -- esta proteína por electroforesis bidimensional encontrándose -- un PI similar al reportado en la bibliografía para alfa-actina; en algunos casos cuando se toman muestras de proteínas en los -- primeros ciclos de polimerización-despolimerización, se encon- -- tró que además de la actina también se obtenía micrina y otras -- proteínas.

También se purificaron actinas de músculo de pollo y pavo y de molleja de pavo, utilizando el mismo método y solamente -- se verificó su movilidad en geles de poliacrilamida-SDS (elec- -- troforesis unidimensional), encontrándose que es la misma que la actina de conejo y la ovoalbúmina. Con los resultados an- -- teriores consideramos que el método de purificación de actina --

para fuentes de músculo y molleja de pavo, músculo de conejo y pollo es excelente, ya que se puede obtener actina pura y con muy buenos rendimientos.

En el presente trabajo se estudiaron por electroforesis unidimensional las fracciones membranal y citoplásmica obtenidas por el método de Kaback y una fracción obtenida por sonicación. Se observó en los gels de poliacrilamida-SDS que la fracción membranal y la fracción sonicada presentan patrones electroforéticos similares encontrándose un péptido con la misma movilidad que la actina y que el marcador de PM utilizado, además de otros péptidos con muy pequeña diferencia en su movilidad. El patrón electroforético de la fracción citoplásmica es diferente a las fracciones anteriores, sin embargo presenta el péptido mencionado anteriormente. Al analizar por isoelectroenfoque se observó en las fracciones membranal y en la sonicada un polipéptido con el PM y PI similar a la actina de conejo y otros dos péptidos con el PM similar, pero uno con el PI más ácido y otro con el PI más básico que ella. En la fracción citoplásmica solo se observó el péptido con PM y PI similar a actina.

Teniendo los resultados anteriores se procedió a intentar su purificación por el método de Nakamura y Watanabe, mismo que utilizaron Minkoff y Damadian para purificar actina de E. coli y que es similar al de Spudich y Watt para purificar actina de músculo de conejo.

Durante la purificación de la posible actina bacteriana se tomaron muestras de las fracciones en los diferentes ciclos de polimerización-despolimerización y se analizaron por electroforesis unidimensional. En las primeras muestras se observaron patrones similares a los presentados para las fracciones membranal y sonicada o bien citoplásmica, sin embargo para las muestras que se tomaron en los ciclos finales no se observó péptido alguno.

El tratamiento con acetona a los homogeneizados de conejo, pavo y pollo hace que se vean enriquecidos en actina. En nuestro caso particular si se parte de 100 gramos de músculo de conejo se obtienen de este aproximadamente 20 gramos de polvos cetónicos. Por cada gramo de polvo cetónico se obtienen entre 10 y 15 mg de proteína pura. Si se disuelven en buffer de muestra los polvos cetónicos preparados a partir de cualquier fuente ya sea conejo, pollo o pavo, se encuentra actina como componente principal en la electroforesis. En el caso de los extractos bacterianos analizados no se observó similar enriquecimiento (los datos establecen que a partir de 300 gramos de peso húmedo de bacterias se logran obtener 50 mg de proteína pura). En nuestro trabajo se inició la purificación a partir de 50 gramos (peso húmedo) y considerando los resultados obtenidos en E. coli, se esperaba obtener 5 mg de proteína pura). Sin embargo no hubo éxito en la purificación, aún cuando los extractos finales se liofilizaron y se les cuantificó la cantidad de proteína, ningún polipéptido fué observado en la ---

electroforesis unidimensional. La purificación de la posible actina de *Salmonella* se intentó de diferentes formas sin tener éxito. A partir de fracciones bacterianas obtenidas por eliminación de la pared con lisozima y de fracciones obtenidas por sonicación, tratadas o no con inhibidores de proteasas y con o sin acetona.

Algunas consideraciones importantes son las siguientes: que la posible actina de *Salmonella* haya perdido su capacidad de polimerización-despolimerización, o bien que esta propiedad no la lleve a cabo en las condiciones en que la efectúan otras actinas. Que la actina bacteriana no este expresando sus propiedades de polimerización-despolimerización, o bien que los péptidos observados en las electroforesis sean el resultado de la lisis de otro con mayor peso molecular.

Otra forma de caracterización de la posible actina de *S. typhimurium* LF-2 fué por el método de Cleveland. Para ello se utilizó la enzima proteasa V-9 de *Staphylococcus aureus*, la concentración de enzima que mejor nos definió las bandas de péptidos fué de 50 ug/ml. Para la actina de conejo se encontraron 2 péptidos, mientras que para la proteína bacteriana 6, dos de estos últimos comparten con la actina de conejo la misma movilidad, lo que nos hace suponer que algunas porciones de estructuras primarias sean similares.

Considerando lo anterior y tomando en cuenta que la actina es una proteína altamente conservada, se procedió a elaborar --

anticuerpos contra esta proteína de leche y músculo de pavo. Se detectaron por inmunodifusiones bandas de precipitación de los antisueros con sus respectivas actinas después de 60 días de inyecciones constantes del antígeno. Al comparar con otras proteínas se advierte que tardó 4 veces más en producir anticuerpos en el conejo, respecto a la albúmina bovina.

En todos los casos analizados se observó una sola banda de precipitación, tanto en los antisueros con su respectiva actina, como con actinas de otras fuentes o bien con las fracciones bacterianas, razón por la cual se puede pensar que la bacteria contiene actina.

Una forma de comprobar lo anterior sería eluir la banda correspondiente a actina de la bacteria y utilizarla como antígeno y verificar si también da reacción de identidad con las actinas de diversas fuentes. Otra técnica de gran utilidad sería la de Towin 1979 (67), conocida como inmunotransferencia en la cual se aprovecha la separación electroforética de las proteínas para luego transferirse a otro medio de soporte como es el papel de nitrocelulosa. La banda de interés cuya movilidad es la misma que actina es detectada por una reacción inmunológica colorida.

Es también recomendable tener diferentes criterios, como por ejemplo intentar su purificación por otras técnicas como extracción en columnas de intercambio iónico, en columnas de sephadex o en DEAE-celulosa, etc. (19, 26, 39, 63).

En el caso que se logrará su purificación se verificaría si ésta es capaz de polimerizar y despolimerizar y en que condiciones lo haría. Los filamentos formados podrían ser observados al microscopio electrónico y podrán ser comparados con los filamentos de actina. También se demostraría si esta molécula es capaz o no de unirse a la fracción pasada de miosina (HMM) de conejo. Otros estudios de utilidad serían la formación del complejo actina-miosina y verificar su movilidad en electroforesis, observando si la proteína al formar el complejo desaparece del lugar que generalmente ocupa.

Otro criterio útil en caracterizar a la actina, sería ver la capacidad para formar el complejo con la DNAasa I. Si la fracción de la bacteria de nuestro interés se une a esta enzima luego podrá ser disociado con formamida o bien hidrocloreuro de guanidina (Zechel, 1980), (2, 27, 35, 77). Esta caracterización además es también una forma de purificación.

Con nuestros resultados se pueda pensar que tenemos una proteína similar a actina en la fracción membranal y en la fracción citoplásmica de Salmonella typhimurium LT-2 aunque faltarian otros criterios para confirmarlo.

Posiblemente la actina bacteriana sea expresada cuando la bacteria sufre una alteración en el transporte de potasio o algún otro evento relacionado con tal proteína.

En el caso de los microtúbulos cuyo componente esencial es

la tubulina, proteína también altamente conservada en eucariontes y en algunos procariontes cuando están en fase lag de crecimiento (Pseudomonas, Photobacterium, Proteus, Saprospira), -- estos microtúbulos se conocen como rapidosomas, estructuras -- que se presentan en estafilococos de forma L, la cual no es -- una condición normal de crecimiento de la bacteria, careciendo de pared celular.

En nuestro caso no se trabajó con cultivos que estuvieran en la fase lag de crecimiento, sino en plena fase log.

Con respecto a la purificación de la posible actina de -- S. typhimurium LT-2 en la preparación de extractos no se hizo con la prensa french como ha sido reportado, sino por sonicación y por eliminación de la pared con lisozima más ciclos de congelación-descongelación, esta homogenización puede ser el -- factor determinante para no purificar la proteína de interés, ya que por los métodos utilizados no se tuvo éxito.

VII. CONCLUSIONES

- Se encontró por electroforesis unidimensional, una proteína en las fracciones membranal, citoplásmica y sonicada de Salmonella typhimurium LT-2 con movilidad similar en el gel de poliacrilamida-SDS a las actinas de músculo de conejo, pavo y pollo y de molleja de pavo, y que es igual a la ovoalbúmina que tiene un PM de 43,000 daltones. Además se encontraron otras proteínas en las fracciones bacterianas con una ligera mayor movilidad que las actinas y el marcador de PM correspondiente.
- Por electroforesis bidimensional se encontró que la proteína bacteriana además de tener un PM similar a la actina de conejo tiene un PI similar a ésta. También se detectaron en las fracciones bacterianas membranal y sonicada 2 proteínas más con PM similar a actina, pero con un PI más ácido y otra con el PI más básico.
- No se logró purificar la posible actina presente en las fracciones bacterianas, por ciclos de polimerización-despolimerización en condiciones similares descritas para otras actinas.
- En la proteólisis enzimática con proteasa V-8 de Staphylococcus aureus, la actina presentó 2 péptidos; mientras que una proteína bacteriana presentó 6. Dos de los péptidos de la proteína bacteriana tuvieron la misma movilidad que los de

actina.

- Se purificaron actinas de músculo de pollo, de músculo y molleja de pavo. Las dos últimas fueron utilizadas como antígenos en la elaboración de anticuerpos contra actina en conejos.
- Los sueros hiperinmunes obtenidos presentaron reacciones de precipitación en las inmunodifusiones con sus respectivos antígenos (actinas), con actinas de otras fuentes como la actina de músculo de conejo y de músculo de pollo, así como también con las fracciones membranal, citoplásmica y sonicada de S. typhimurium LT-2 .
- Los sueros normales obtenidos antes de inocular el antígeno a los conejos no presentaron reacciones de precipitación en las inmunodifusiones ni con las actinas, ni con las fracciones bacterianas.
- Con nuestros resultados consideramos que existe una proteína similar a actina en S. typhimurium LT-2, pero que es importante su purificación para confirmar que la actina existe en la bacteria, por lo que en el presente trabajo se incluyen algunas técnicas como alternativas para lograrlo.

VIII. BIBLIOGRAFIA .

- 1.- Alving, R. E. and Le'vi, K. (1966). "N-terminal sequence of Actin". Biochemistry 5 : 2597-2601.
- 2.- Elikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T. and -- Linberg, U. (1978). "Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of Deoxyribonuclease I". Cell 15 : 935-943.
- 3.- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye". Anal. Biochem. 72:248-254.
- 4.- Bryan, L. J. (1975). "Principles and Techniques of Practical Biochemistry". 1a. Ed. William Clowes and Sons. London, -- Great Britain.
- 5.- Burchard, A. C., Burchard, R. P. and Kletzel, J. A. (1977). "Intracellular, Periodic Structures in The Bliken Bacterium Mycoboccus xanthus". J. Bacteriol. 132 : 666-672.
- 6.- Campbell, D. H., Harvey, J. S., Cromer, H. E., Sussdorf, D. H. (1964). Methods in Immunology . 2a. Imp. W. A. Benjamin Inc. New York. USA.
- 7.- Clayton, L. and Lloyd, C. J. (1985). "Actin organization -- during the cell cycle in meristematic plant cells". Exptl.-Cell. Res. 156 : 231-236.
- 8.- Clarke, M. and Spudich, J. A. (1977). "The Role of Actin - and Myosin in Cell motility and Shape determination". -- Ann. Rev. Biochem. 46 : 797-822.
- 9.- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. J. and --

- Laemmli, U. K. (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in SDS and analyses by gel electrophoresis". *J. Biol. Chem.* 252 : 1102-1106.
- 10.- Cleveland, D. J. and Kirchner, E. (1981). "Autoregulatory control of the expression of α and β -tubulins: Implications for microtubule assembly". *C. S. H. S.* 7. 3. 46 : 171-193.
- 11.- Condeelis, J. S. (1974). "The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of Amarillis belladone". *Exp. Cell. Res.* 88 : 435-439.
- 12.- Córdova, A. F. y Estrada, F. S. (1973). Fundamentos de Inmunología e Inmunquímica. (Ed. Washington D. C. USA.
- 13.- Craig, S. J. and Pollard, T. D. (1982). "Actin bindings - Proteins". *Trends. Biochem. Sci.* 7 : 88-92.
- 14.- Crowle, A. J. (1961). "Immunodiffusion" 2a Imp. Academic Press Inc. USA.
- 15.- Eda, T., Kanda, Y., Mory, C. and Kimura, S. (1977). "Microtubular Structures in a Stable Staphylococcal L-Form". *Journal of Bacteriology* 132(2) : 1024-1026.
- 16.- Elzinga, M., Collins, J.H., Kuchl, J. P. and Wolstein, P. S. (1973). "Complete amino-acid sequence of actin rabbit skeletal muscle" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70 : 2687-2691.
- 17.- Franke, W. J., Schmid, E., Hinter, S., Geborn, E. and Jabwe, N. (1979). "Widespread occurrence of intermediate sized filaments of vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates". *Exp. Cell Res.* 123 : 25-46.
- 18.- Flores, L. M. (1979). "Isoformas de actina de Molléja de -

- Pollo durante el Desarrollo Embrionario de Pollo". Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Biología Celular. CINVESTAV-IPN .
- 19.- Frederiksen, D. W. and Cunningham, L. W. (1982). "Structural and Contractile Proteins". Academic Press Inc. USA.
- 20.- Futai, M. (1974). "Orientation of membrane vesicles from *Escherichia coli*. Prepared by Different Procedures". *J. Membrane Biol.* 15 : 15-28.
- 21.- Flyberg, E. A., Beverly, J., Bond, H, Hershey, D., Fixter, K. S. and Davidson, N. (1981). "The actin genes of *Drosophila* : Protein coding regions are highly conserved but intron positions are not". *Cell* 24 : 107-116.
- 22.- Gaetjens, E. and Parany, M. (1966). "N-Acetyl aspartic acid in G-actin". *Biochem. Biophys. Acta.* 117 : 176-193.
- 23.- Garrels, J. L. and Gibson, W. (1976). "Identification and characterization of multiple forms of actin". *Cell* 9:793-805.
- 24.- Goldman, R. D., Milsted, A., Schless, S. A., Stanger, J. and Yerna, M. (1979). "Cytoplasmic fibers in mammalian cells". *Ann. Rev. Physiol.* 41 : 703-722.
- 25.- Goldman, R. D., Pollard, T. and Rosenbaum, J. (1976). "Cell Motility". Cold Spring Harbor, New York USA. Vols.a-c.
- 26.- Hatano, S. and Loribe, K. (1977). "A Simple Method for The Isolation of F-Actin from Myxomycete plasmodia". *J. Biochem.* 82 : 201-205.
- 27.- Hitchcock, S. E., Carlsson, L. and Linberg, U. (1976). "Depolymerization of F-Actin by Deoxyribonuclease I".

Cell Z : 531-542.

- 28.- Hoffman, P. and Lasek, R. (1975). "The slow component of axonal transport". J. Cell Biol. 66 : 351-356.
- 29.- Howell, S. L. and Tyhurst, M. (1981). "Regulation of actin polymerization in rat islets of Langerhans". J. Biochem. 192 : 381-383.
- 30.- Ilker, R. A., Breinbach, R. J. and Murphy, T. M. (1979). "Partial purification of actin from wheat germ". Phytochem. 18 : 1781-1784.
- 31.- Jackson, J. T. and Doyle, B.G. (1977). "Characterization of actin from root tips of Phaseolus vulgaris". J. Cell. Biol. 75 : 268-272.
- 32.- Korn, E. D. (1978). "Biochemistry of Actomyosin-dependent Cell motility". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 588-599.
- 33.- Korn, E. D. (1982). "Actin polymerization and its regulation by proteins from non muscle cells". Physiol. Rev. 62 : 672-737.
- 34.- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins -- during the assembly of head of bacteriophage T 4" Nature (London) 227 : 680-685.
- 35.- Lazarides, E. and Linberg, U. (1974). "Actin is the Naturally Occurring Inhibitor of Deoxyribonuclease I". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71 (12) : 4742-4746.
- 36.- Lazarides, E. and Weber, K. (1974). "Actin antibody : the specific visualization of actin filaments in cells non-muscle". Proc. Natl. Acad. Sci. 71 : 2268-2272.
- 37.- Lazarides, E. and Balzer, D. R. (1978). "Specificity of ---

- desmin to avian and mammalian muscle cells". *Cell* 14 : 429-438.
- 38.- Lehninger, A. L. (1982). Biogénica. 2a. Edición. Ediciones Omega S. A. Barcelona, España.
- 39.- Leslie, W. (1982). Methods in Cell Biology. Vol. 24. Academic Press Inc. USA.
- 40.- Levilliers, H., Peron, R., Coffe, M. G. and Pudles, J. -- (1984). "Actin purification from a gel of rat brain extracts". *Biochimie*. 56 : 531-536.
- 41.- Lewin, R. A. and Kisthe, J. (1965). "Formation of thapsigones in Saprospira". *Canadian Journal of Microbiology* - 11 : 935-938.
- 42.- Lowry, C. H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- 43.- Lu, R. C. and Elzinga, M. (1977). "Partial amino-acid sequence of brain actin and its homology with muscle actin" *Biochemistry* 16 : 5901-5906.
- 44.- Margulis, L., Lebrig, T. and Chase, D. (1978). "Microtubules in Prokariotes". *Science* 200 : 1118-1124.
- 45.- Mckeeown, M. and Firtel, R. A. (1981). "Differential expression and 5' end mapping of actin genes in Dictyostelium". *Cell* 24 : 799-807
- 46.- Metcalf, T. H., Szabo, J. L., Van, J. L. (1980). "Immunological Identification of Actin-Like protein from soybean seedlings". *Nature* 285 : 171-175.
- 47.- Maiza, I., Sabanero, M., Cazares, F., and Bryan, J. (1983).

- "Isolation and Characterization of Actin from Entamoeba histolytica". J. Biol. Chem. 258 (5) : 3935-3941.
- 48.- Minkoff, L., and Damadian, R. (1976). "Actin Like proteins from Escherichia coli : Concepts of Cytotonus as the --- Missing Link Between Cell Metabolism and the Biological --- Ion-Exchange Resin". J. Biol. Chem. 125(1) : 353-365..
- 49.- Koll, R., Franke, W.W. and Schiller, D. L. (1982). "The --- catalog of human cytokeratins". Cell 31 : 11-24.
- 50.- Nakamura, K., and Watanabe. S. (1978). "Myosin Like and --- Actin Like from Escherichia coli K 12 C 600"
J. Biochem. 83 (5) : 1459-1470
- 51.- Nakamura, K., Takahashi, K. and Watanabe, S. (1978).
"Myosin and Actin from Escherichia coli K 12 C 600".
J. Biochem. 84 : 1453-1458.
- 52.- Nowotny, A. (1979). "Basic Exercises in Immunochemistry"
3a. Ed. Ed. Springer-Verlag USA.
- 53.- O'Farrell, P. H. (1975). "High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins". J. Biol. Chemistry 250(10): 4007-4021.
- 54.- Cuchterlony, G. (1949). "Antigen-Antibody Reactions in --- Gels". Acta Pathol. Microbiol. Scan. 26 : 507-515.
- 55.- Parthasarathy, M. V. and Uthletalor (1972). "Cytoplasmic microfilaments in plant cells" J. Ultrastructure Res. 38 : 46-49.
- 56.- Parthasarathy. M. V. and Desecreta, T. C. (1980).
"Microfilaments in plant vascular cells". Canadian J. - Botany 58 (7) : 807-811.

- 57.- Pesacreta, P. C., Carley, W. W., and Parthasarathy, M. V. (1982). "F-actins in conifer roots". P. W. A. S. 79 : 2898-2891.
- 58.- Pesacreta, P. C. and Parthasarathy, M. V. (1984). "Microfilaments bundles in the roots of a conifer, Chamcypans obtusa". Protoplasma 121 : 54-57.
- 59.- Pollard, T. D. and Gehring, R. J. (1974). "Actin and Myosin on Cell movements". Critical reviews in Biochemistry 2 : 1-65.
- 60.- Rosenberg, S., Stracher, S. and Lucas, R. (1981). "Isolation and Characterization of Actin-binding Protein - from Human Platelets". J. Cell Biol. 91 : 201-211.
- 61.- Rueger, D. C., Huesten, J. S., Dahal, D. and Pignami, A. (1979). "Formation of 100 Å filaments from purified glial fibrillary acidic protein in vitro". J. Mol. Biol. 135 : 53-58.
- 62.- Runge, M. S., Schlaepfer, W. J. and Williams, R. C. (1981). "Isolation and characterization of neurofilaments from mammalian brain". Biochemistry 20 : 170-175.
- 63.- Sabanero, M. y Meza, I. (1982). "Localización de actina en trofozoitos de Entamoeba histolytica (H1)". Arch. Invest. Méd. (México). 13 (3) : 37-42.
- 64.- Sachiko, T., Shoichiro, T., Harunori, I., Shingo, S., and Makoto, M. (1981). "Electron Microscopic Study of Reassociation of Spectrin and Actin with the Erythrocyte Membrane". J. Cell Biol. 90 : 70-77.
- 65.- Sanger, J. W. (1975). "Presence of actin during chromosomal movement". Proc. Natl. Acad. Sci. 72 : 2451-2455.

- 66.- Someya, A. and Tanaka, N. (1979). "Heavy Meromyosin and ATP-Binding Protein from Escherichia coli". FEBS LETTERS 101 (1) : 166-169.
- 67.- Towin, H., Staehelen, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic Transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications". Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (9) : 4350-4354.
- 68.- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). "Actin aminoacid sequences. Comparison of actins from calf thymus bovine brain an SV 40-transformed mouse 3 T 3 cells with rabbit skeletal muscle actin". J. of Biochem. 93 : 451-452.
- 69.- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). "Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75 : 1106-1110.
- 70.- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). "The aminoacid sequence of phisarum actin". Nature 276 : 720-721.
- 71.- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1979). "The complete aminoacid sequence of actins from hiving aorta, bovine heart, bovine fast, skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. A protein chemical analysis of muscle actin differentiation". Differentiation 14 : 126-133.
- 72.- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1981). "Actin typing on total cellular extracts". Eur. J. Biochem. 113 : 595-603.
- 73.- Weber, K. and Osborn, M. (1969). "The reality of molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-polyacrilamide

- Gel Electrophoresis". J. Biol. Chemistry 241(15): 4406-4412.
- 74.- Leeds, A. (1982). "Actin binding proteins: regulations of cell architecture and motility". Nature 296: 811-815.
- 75.- Yamamoto, T. (1957). "Presence of Rhabdosomes in Various Species of Bacteria and Their Morphological Characteristics". J. Bacteriol. 94 (5) : 1746-1756.
- 76.- Zafar, R. and Sodja, A. (1983). "Homology Between Actin-Codin and Its Adjacent Sequences in Widely Divergent Species". Biochemical and Biophysical Research Communications 111 (1) : 67-73.
- 77.- Zechel, K. (1980). "Dissociation of the DNA-cod-1 actin-complex by Formamide". Eur. J. Biochem. 110 : 337-341.

IX. ABREVIATURAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
DIFP	Diisopropil fluorofosfato
NP-40	Nonidet P-40
MEM	N-etil maleimida
PI	Punto isoelectrico
PM	Peso molecular
PFMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N' tetrametil-etilen diamina
TRIS	Solucion reguladora que contiene: tris, $MgCl_2$ y KCl .

X. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

	Página
Figura 1 : Electroforesis unidimensional de la actina purificada de conejo	36
Figura 2 : Curva de calibración de la movilidad de proteínas en el gel de poliacrilamida y el gradiente de pH formado para determinar el pI .	37
Figura 3 : Electroforesis bidimensional de la actina de músculo de conejo	38
Figura 4 : Electroforesis unidimensional de extractos de <u>Salmonella typhimurium</u> LT-2 comparados con la actina de músculo esquelético de conejo	41
Figura 5 : Electroforesis unidimensional de extractos de <u>S. typhimurium</u> LT-2, actina y marcadores de PE	42
Figura 6 : Electroforesis bidimensional de la fracción membranal de <u>S. typhimurium</u> LT-2	43
Figura 7.- Electroforesis bidimensional de la fracción citoplásmica de <u>S. typhimurium</u> LT-2	44
Figura 8 : Electroforesis bidimensional de los polvos catiónicos preparados a partir de la fracción membranal de <u>S. typhimurium</u> LT-2	45
Figura 9 : Electroforesis bidimensional de la fracción sonicada de <u>S. typhimurium</u> LT-2	46
Figura 10: Electroforesis unidimensional de extractos bacterianos y actina de conejo	49
Figura 11: Electroforesis de la proteólisis de la actina y la proteína similar a ésta de <u>S. typhimurium</u>	

LT-2

50

Figura 12: Electroforesis unidimensional de actinas de diversas fuentes	52
Figuras B (a,b,c,d y e) Titulaciones de sueros hiperinmunes	53
Figuras C (a,b,c,d,e y f) Reacciones cruzadas de antisueros y actinas y también las fracciones bacterianas	54
Tabla 1 : Resultados de las inmunodifusiones de los sueros normales y los antisueros con actinas y las fracciones bacterianas	55