

NUEVO MÉTODO DE PURIFICACIÓN PARA PROTEÍNAS DE PROCARIOTES

RELACIONADAS CON ACTINA Y LAS PROTEÍNAS QUE SE LES ASOCIAN; PROCEDIMIENTO APLICABLE A LA PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ENRIQUECIDOS EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA

Keila Neri Alvarado^{1, 2},
Dr. Ricardo Mondragón³, Carlos A. Bautista², A.Q.B. Claudia K. Prieto², Dr. F. Javier Avelar⁴, M. en C. Ma. Consolación Martínez², Dra. Alma L. Guerrero Barrera^{2, 5}.

RESUMEN

Se desarrolló un método confiable y económico para purificar las proteínas de procariontes relacionadas con actina (PARP; del inglés «prokaryotic actin related proteins»), que incluye un ciclo de polimerización en condiciones bioquímicas similares a las necesarias para polimerizar actina eucarionte de músculo esquelético de conejo. A través de este ciclo se enriquecieron tanto las PARP, como las proteínas que se asocian en estas condiciones. Posteriormente, al aplicar una nueva técnica de electroelución simplificada, se recuperó casi el total de las proteínas enriquecidas. La electroelución simplificada es también aplicable para la purificación de actina eucarionte y sus proteínas asociadas (ABPs: «actin binding proteins»), provenientes de diversas fuentes eucariontes, como la actina de *Toxoplasma gondii*.

INTRODUCCIÓN

La diversidad del mundo biológico se forma de tres divisiones principales: Arquea, Procaría y

Eucaria. La división Eucaria está formada por cinco reinos: protista, fungi, plantae y animalia. Estos reinos poseen, como el nombre de la división a la que pertenecen lo indica, células eucariontes, las cuales tienen núcleo, organelos delimitados por membranas internas y citoesqueleto. El citoesqueleto es un organelo celular vital para la célula eucarionte. Es responsable del movimiento celular, se relaciona con el transporte intracelular de materiales y organelos, la formación de corrientes citoplásmicas, el anclamiento celular, la adhesión, la división celular, la transducción de señales (comunicación celular), la formación de filopodios, de ondulaciones celulares y pseudópodos, la fagocitosis, la polarización celular, la diferenciación, entre otras funciones indispensables para la célula eucarionte (Guerrero-Barrera et al., 2000; Tsuruta et al., 2003; Coll et al., 2003).

El citoesqueleto se compone de una serie de proteínas que forman filamentos de diferente grosor, conocidos como: filamentos gruesos (25 nm de diámetro: miosina, tubulina), filamentos intermedios (10 nm de diámetro: vimentina, lamina, queratina, etcétera), y microfilamentos (5-7nm de diámetro: actina) (Fig. 1). El citoesqueleto de actina es fundamental para la célula eucarionte, lo anterior ha sido probado experimentalmente pues las mutaciones en esta proteína son letales para la célula (Sheterline et al., 1998; Ilkovski et al., 2001). El citoesqueleto de microfilamentos se conforma por actina y sus proteínas asociadas («actin binding proteins» o ABP). A pesar de la importancia que tiene el citoesqueleto de microfilamentos, el origen de la actina permanece sin conocerse, por lo que diversos grupos de investigación han puesto su mirada en las células procariontes.

¹ Exbecaria del Verano de la Ciencia 2002.

² Departamento de Morfología. Centro de Ciencias Básicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Blvd. Universidad 940. Aguascalientes, Ags., 20100. MÉXICO. E-mail:alguerre@correo.uaa.mx, allianmx@yahoo.com

³ Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508. México, D.F., 07000. México.

⁴ Departamento de Fisiología y Farmacología. Centro de Ciencias Básicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

⁵ Autora para correspondencia.

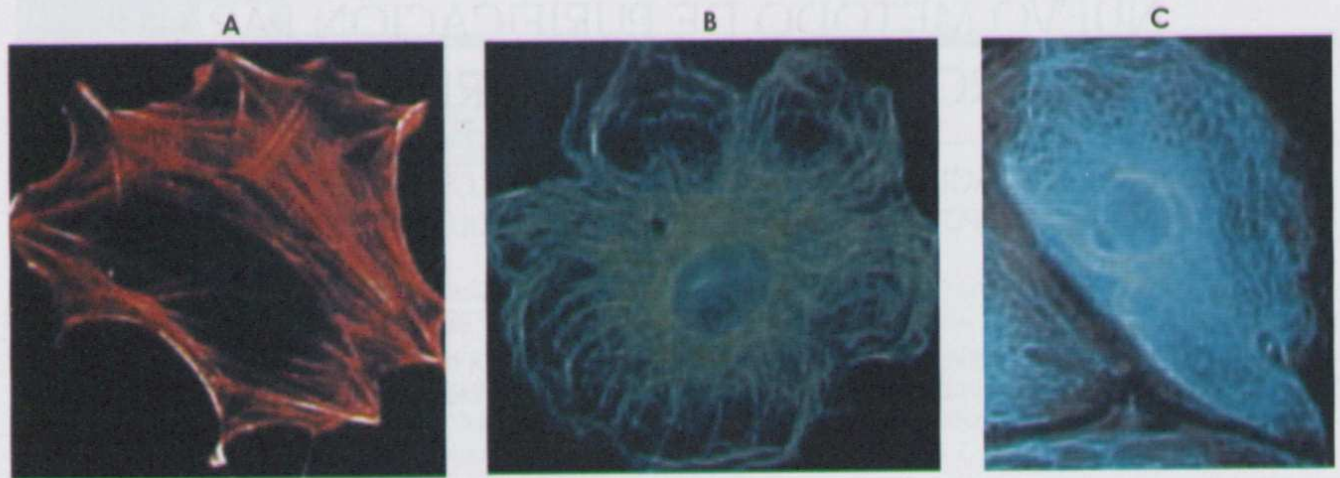


Figura 1. Componentes del citoesqueleto eucarionte. a) microfilamentos, teñidos con faloidina rodaminada. b) filamentos gruesos de tubulina marcados con un anticuerpo policlonal anti-tubulina y reconocidos con un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína c) filamentos intermedios, reconocidos con un anticuerpo anti-queratina.

Durante la década de los 60 del siglo XX, se aportaron evidencias de la presencia de componentes similares a la actina en *Escherichia coli* (De la Garza et al., 2001). Posteriormente, a finales de la década de los 70, grupos como el de Minkoff y Damadian, y el de Nakamura y Watanabe, en Japón, aislaron y purificaron una proteína con comportamiento bioquímico de actina en esa misma bacteria. Otros grupos aislaron esta actina procarionte a partir de *Mycoplasma pneumoniae* (Neimark, 1977). Sin embargo, los métodos empleados resultaron poco reproducibles. En 1992, Barnett y Cunningham reportaron una metodología para purificar la proteína con comportamiento de actina a partir de *Streptococcus pyogenes*, similar a los procedimientos desarrollados por nuestro grupo para purificar este péptido a partir de bacterias tan diferentes entre sí como *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Anabaena cylindrica* y *A. variabilis* (Guerrero-Barrera, 1993). Esta metodología se basaba en la purificación de la proteína por afinidad a la enzima DNasal, propiedad exclusiva de la actina eucarionte, empleando un extracto total bacteriano. Sin embargo, la eficiencia de este método resultó ser muy baja. A partir de una pastilla celular bacteriana húmeda de aproximadamente 2 ml (10 mg de proteína total), proveniente de un cultivo de 50 ml en franca fase de crecimiento (logarítmica), se obtenían aproximadamente 50 µg de proteína purificada, diluida en volúmenes de 25 ml o mayores. En contraste, el método perfeccionado aquí propuesto, permite purificar a partir del mismo material celular, 200 µg de proteína sin diluir; es decir, cuadruplica la eficiencia y presenta además

la ventaja de no diluirla. Este método incluye un ciclo de polimerización que permite enriquecer las PARP (en las mismas condiciones en las que polimeriza la actina eucarionte), así como las proteínas que se le asocian. Estas proteínas enriquecidas son posteriormente purificadas por medio de una nueva técnica de electroelución simplificada, la cual permite su recuperación casi total, sin diluir. Esta nueva técnica de electroelución simplificada es también un desarrollo de nuestro laboratorio y presenta ventajas importantes con respecto al método tradicional, además de ser más económica y simple.

METODOLOGÍA

Microorganismos. Se emplearon cultivos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, crecidos en 50 ml de infusión cerebro-corazón (DIFCO), adicionado con 10 µg/ml de NAD, en fase logarítmica de crecimiento.

Ciclo de polimerización. Las células fueron cosechadas a 10 000 g durante 10 min a 4°C y lavadas tres veces con solución salina de fosfatos (Guerrero-Barrera et al., 1996). Se prepararon polvos acetónicos empleando acetona a -20°C, efectuando cinco lavados de la pastilla celular con el solvente (Guerrero-Barrera et al., 1999). Las PARP fueron extraídas siguiendo el método de Guerrero-Barrera y col., 1999. Brevemente, la pastilla celular fue diluida en 1 ml de amortiguador de despolimerización y agitada suavemente durante 2 h a 4°C, (Tris 2mM pH 7.4, CaCl₂ 2mM, 2-mercaptoetanol 5mM, ATP 0.1mM). Se centrifugó

10 min a 14 000 rpm durante 5 min. y se recuperó el sobrenadante, el cual fue ajustado a 5 mM de EGTA, 5mM de ATP, 2mM de MgCl₂ y 50 mM de KCl. Esta mezcla se agitó suavemente durante 2 h a 37°C para favorecer la polimerización de las PARP. La mezcla se centrifugó a 10 000 g durante 5 min; posteriormente el sobrenadante se ultracentrifugó a 150 000 g durante 3 h a 4°C.

Eliminación de sales. La pastilla se recuperó en amortiguador de despolimerización y las sales fueron eliminadas empleando el método previamente reportado (Guerrero-Barrera et al., 1999;), basado en el procedimiento de Wessel y Flügge (1984). Brevemente, 100 µl de la mezcla se trataron con 300µl de metanol, 100 µl de cloroformo y 300 µl de agua destilada, agitando fuertemente. Después la mezcla se centrifugó 1 min a 10 000 g y la fase acuosa eliminada, la proteína se precipitó con 400µl de metanol absoluto.

Separación electroforética e identificación de las PARP. Las muestras obtenidas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliácridamida al 10% (Laemmli, 1970). Las PARP fueron identificadas mediante el reconocimiento con anticuerpos policlonales específicos, empleado la técnica de Western Blot (Guerrero-Barrera et al., 1999).

Electoelución simplificada. Las PARP identificadas fueron cortadas con una navaja de bisturí estéril. Las bandas así obtenidas fueron recuperadas en un tubo estéril para microcentrifuga y posteriormente lavadas cinco veces con agua desionizada para eliminar el detergente y el metanol. Las bandas así obtenidas fueron cuidadosamente maceradas con el émbolo de una jeringa para insulina hasta obtener geles finamente molidos. Se prepararon geles de poliácridamida al 10% como se describió arriba. Los geles finamente molidos fueron colocados en los carriles, posteriormente, se añadió amortiguador de muestra con 10% de 2-mercaptoetanol y se realizó la electroforesis en una mini cámara Bio-Rad (Mini Protean III) a 80V durante 1.5 h.

Corroboración de la identidad de las PARP. Para comprobar la identidad de las PARP, las proteínas purificadas por electroelución simplificada se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa y se reconocieron con anticuerpos policlonales anti-PARP de *A. pleuropneumoniae*, empleando un anticuerpo secundario peroxidado.

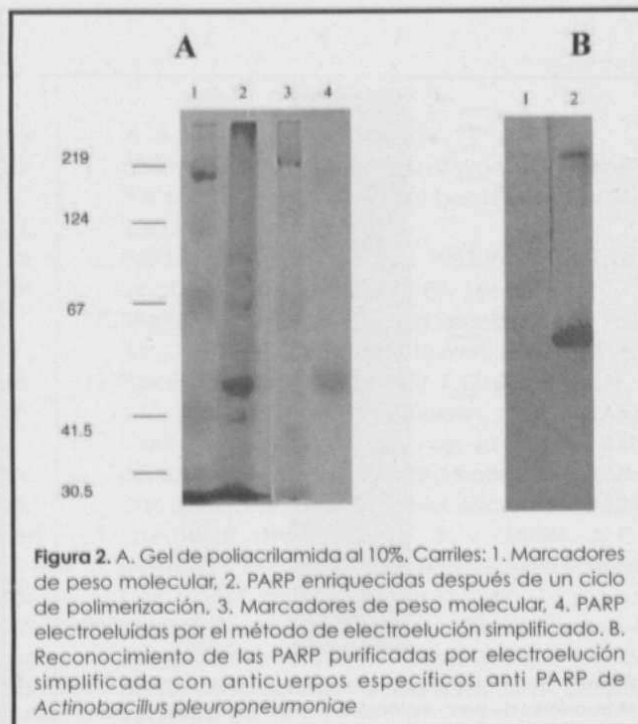


Figura 2. A. Gel de poliácridamida al 10%. Carriles: 1. Marcadores de peso molecular, 2. PARP enriquecidas después de un ciclo de polimerización, 3. Marcadores de peso molecular, 4. PARP electroeluidas por el método de electroelución simplificada. B. Reconocimiento de las PARP purificadas por electroelución simplificada con anticuerpos específicos anti PARP de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

RESULTADOS

Como se muestra en la figura 2A, las PARP obtenidas a través de la electroelución simplificada, tienen un alto grado de pureza y una concentración adecuada (50 µg por carril). Estas proteínas al ser sometidas al nuevo procedimiento de electroelución mantuvieron sus propiedades antigénicas al ser reconocidas por anticuerpos específicos (figura 2B). El alto grado de pureza y la concentración de las PARP así purificadas permite su secuenciación.

La electroelución simplificada mostró los mismos resultados cuando se aplicó para la purificación de la actina del protozooario *Toxoplasma gondii* (datos no mostrados). Aunado a estos resultados, esta nueva técnica de electroelución permitió purificar algunos polipéptidos asociados a la actina procarionte, enriquecidos durante el ciclo de polimerización inicial (figura 3).

DISCUSIÓN

Las bacterias son los organismos más antiguos sobre la biósfera y representan la división biológicamente más diversa sobre la Tierra (Madigan et al., 2000).

Los procariontes son capaces de sobrevivir y prosperar en todos los nichos existentes en el

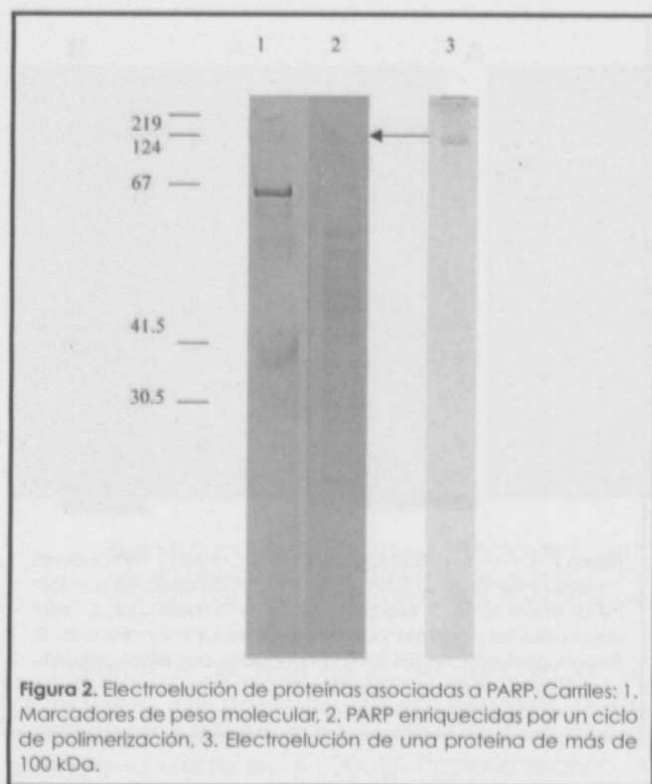


Figura 2. Electroelución de proteínas asociadas a PARP. Carriles: 1. Marcadores de peso molecular, 2. PARP enriquecidas por un ciclo de polimerización, 3. Electroelución de una proteína de más de 100 kDa.

planeta. Se desarrollan incluso en profundidades de hasta 3500 a 4000 m bajo el nivel del mar, en ausencia total de oxígeno y energía solar. También se encuentran en las inhóspitas profundidades de las minas, 4 km por debajo de la corteza terrestre, reproduciendo recubrimientos de oro y diamantes (Ekendahl y Pedersen, 1994; Takai et al., 2001).

Las bacterias son las responsables de la generación y el mantenimiento de la atmósfera oxidante de la Tierra (única en el sistema solar y hasta ahora en el universo) (Madigan et al., 2000). Se encuentran como poblaciones comensales de todos los phyla que conforman la diversidad del mundo biológico, siendo indispensables para su supervivencia. Han explorado todos los mecanismos metabólicos y probablemente todos los aún no descubiertos (Needham et al., 2000).

No obstante la sorprendente ubicuidad, diversidad y versatilidad de las formas de vida procariontes, uno de los dogmas fundamentales de la Biología Celular ha sido la ausencia de un citoesqueleto en las bacterias, a pesar de que este organelo es fundamental para la mayoría de las funciones vitales de la célula eucarionte, tal y como se ha descrito anteriormente (De la Garza et al., 2001).

Nuestro grupo de investigación ha proporcionado evidencias bioquímicas y funcionales a favor de la presencia de un citoesqueleto bacteriano de actina. Sin embargo, la principal dificultad presente es la susceptibilidad que tiene este componente a la proteólisis durante el proceso de purificación. Debido a lo cual, se han diseñado técnicas específicas para recuperar la mayor parte de las proteínas procariontes relacionadas con actina, provenientes de diversas fuentes bacterianas (Guerrero-Barrera, 1993; Guerrero-Barrera et al., 1996, 1999, 2000).

El aporte principal de este trabajo es el diseño y la estandarización de un método simplificado y eficiente de purificación para las PARP. Aplicando un ciclo de polimerización en las mismas condiciones que la actina de músculo esquelético forma filamentos (en el músculo es la principal fuente de actina) (Pardee y Spudich 1982; Guerrero-Barrera et al., 1999). El ciclo se realiza en presencia de inhibidores de proteasas, para evitar la degradación de las PARP. Este ciclo inicial de polimerización permite además enriquecer las proteínas que se asocian al citoesqueleto de actina procarionte. Otro paso fundamental del procedimiento consiste en precipitar la proteína con una mezcla de metanol, cloroformo y agua (Guerrero-Barrera et al., 1999), el cual elimina el exceso de sales y evita la diálisis; lo cual permite recuperar casi totalmente las PARP.

El nuevo método de electroelución simplificado permite purificar los péptidos específicos que se enriquecen con el ciclo de polimerización. De esta forma, empleando este método se pudieron purificar con una alta eficiencia (200 μ g de proteína sin diluir) las PARP, así como sus proteínas asociadas.

Adicionalmente, la electroelución simplificada resulta un método rápido, sencillo y económico que no necesita de una cámara especial, además no emplea membranas de diálisis, en las que las proteínas se adhieren, provocando poca eficiencia. La electroelución simplificada puede también aplicarse para purificar y caracterizar todo tipo de polipéptidos enriquecidos en un gel de poliácridamida (referencia personal del Dr. Gutiérrez Campos, Departamento de Química UAA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnett, L. A. y Cunningham, M. W. 1992. Evidence for actinlike protein in an M protein-negative strain of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 60: 3932-3936.
2. Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A., y Pérez, P. 2003. Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* 14: 313-323.
3. De la Garza, M., Guerrero-Barrera, A. L., y Segura-Nieto, M. 2001. The cytoskeleton in prokaryotes. *Recent Res. Devel. Microbiology. Research Sing Post, Trivandrum, India* 5:139-169.
4. Ekendahl, S., y Pedersen, K. 1994. Carbon transformation by attached bacterial population in granitic groundwater from deep crystalline bed-rock on the Stripa research mine. *Microbiology* 140: 1565-1573.
5. Guerrero-Barrera, A. L., 1993. Proteínas de procariontes relacionadas con actina. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias en la especialidad de Biología Celular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
6. Guerrero-Barrera, A. L., García, C., M., Villalba, J. D., Segura-Nieto, M., Gómez-Lojero, C., Reyes, M. E., Hernández, J. M., García R. M. y De la Garza, M. 1996. Actin-related proteins in *Anabaena* spp and *Escherichia coli*. *Microbiology* 142:1133-1140.
7. Guerrero-Barrera, A. L., De la Garza, M., Mondragón, R., García, C.M., y Segura-Nieto, M. 1999. Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology* 145: 3235-3244.
8. Guerrero-Barrera, A. L., Segura-Nieto, M., and De la Garza, M. 2000. ¿Tienen citoesqueleto las bacterias? *Mensaje Bioquímico XXIII*. Editado por la Facultad de Medicina de la UNAM. pp. 137-157.
9. Ilkovi, B., Cooper, S., T., Nowak, K., Ryan, M.M., Yang, N., Schnell, C., Durling, H. J., Roddick, L. G., Wilkinson, I., Kornberg, A.J., Collins, K.J., Wallace, G., Gunning, P., Hardeman, E.C., Laing, N. G. y North, K. N. 2001. Nematine myopathy caused by mutations in the muscle alpha-skeletal-actin gene. *Am J. Hum. Genet.* 68: 1333-1433.
10. Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganism*. Simon & Shuster International Group. Ninth Edition.
11. Minkoff, L., y Damadian, R. 1976. Actin like protein from *Escherichia coli*. Concept of cytotonus has the missing link between cell metabolism and biological ion exchange resins. *J. Bacteriology* 125: 353-365.
12. Nakamura, K. y Watanabe, S. 1978. Myosin and actin from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 84:1453-1458.
13. Needham, C., Hogland, M., MacPherson, K. y Dodson, B. 2000. *Intimate Strangers*. ASM Press.
14. Neimark, H. 1977. Extraction of an actin-like protein from the prokaryote *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4041-4054.
15. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-625.
16. Pardee, J. D. y Spudich, J. A. 1982. Purification of muscular actin. *Methods Enzymol.* 85: 164-181.
17. Shterline, P., Clayton, J. and Sparrow. *Actin*. Fourth edition. *Protein Profile*. Oxford University Press. 1998.
18. Takai, K., Moser, D. P., Onstott, T. C., Spoelstra, N., Pfiffner, S.M., Dohnalkova, A. y Fredrickson, J. K. 2001. *Alkaliphilus transvaaliensis* gen. nov., sp. nov., and extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1245-1256.
19. Tsuruta, B., Hopkinson, S. B. y Jones, J. C. 2003. Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 54:122-134.
20. Wessel, D., y Flügge, U. L. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.

Agradecimientos

El trabajo es financiado por el proyecto CONACYT clave 38823-N y por el apoyo a nuevos profesores de tiempo completo PROMEP 2002, así como por la Universidad Autónoma de Aguascalientes proyectos: PIB 0108 (2001) y PIBB 0203 (2002).

Se agradece la asesoría técnica de los Q.F.B. Mónica Mondragón y Delfino Godínez, así como de la Biol. Magda Elizabeth Reyes López.