

VCH-FC  
MAG-B  
P438e  
c.2

ESTUDIO INMUNOLOGICO DE MEMBRANAS DE TUBULOS  
TRANSVERSALES AISLADAS DE MUSCULO ESTRIADO  
DE RANA

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias

por  
**GONZALO FRANCISCO PEREZ ABAZUA**

1987

Director de Tesis : Dr. Mario Roseblatt Silber



Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N  
T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

GONZALO FRANCISCO PEREZ ABARZUA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Bioquímica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 23 de Diciembre de 1987.

Directores de Tesis:  
Prof. Mario Roseblatt

Prof. José Mingueli


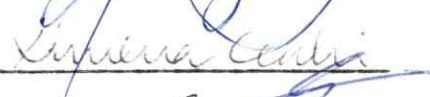
Comisión Informante de Tesis:  
Prof. Ximena Cecchi



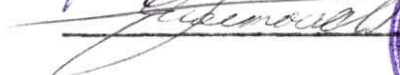
Prof. Osvaldo Alvarez

Prof. Alfredo De iovannes

Prof. Cecilia Hidalgo

Prof. Enrique Jaimovich

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_



Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunología Celular del Instituto de Nutrición y Tecnología en Alimentos (INTA) y en el Laboratorio de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Mario Rosemblatt Silber.



A mi madre



## AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta tesis ha sido valioso el apoyo y estímulo de muchas personas:

A Cecilia Gutierrez, mi compañera, quien además de acompañarme y alentarme realizó un esforzado y desinteresado trabajo de digitación de esta tesis.

Al Dr. Mario Roseblatt por su positiva orientación en mi formación científica.

Al Dr. Enrique Jaimovich por su estímulo y apoyo.

A Valeska Simon por sus valiosas enseñanzas respecto al trabajo de laboratorio.

A Carlos Medina, con quien mantuve largas y enriquecedoras conversaciones respecto a esta tesis y me ayudó en la diagramación de la misma.



## INDICE DE MATERIAS

	Página
Lista de Tablas	IX
Lista de figuras	X
Lista de Abreviaturas	XIII
<b>RESUMEN</b>	XV
<b>ABSTRACT</b>	XVI
<b>INTRODUCCION</b>	1
Aislamiento y purificación de fracciones de membrana de túbulos-T, MS y RS.	3
Enfoque inmunológico en el estudio de las membranas.	6
La enzima Mg+2ATPasa, un componente mayoritario de la membrana del túbulo-T.	9
Elección del material de estudio.	11
<b>OBJETIVOS</b>	12
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	13
<b>I. Materiales</b>	13
<b>II. Métodos</b>	14

	Página
Preparación de Membranas de músculo esquelético.	14
1.- Aislamiento de Túbulo-T y RS	14
2.- Aislamiento de MS	16
Preparación de Anticuerpos Policlonales.	18
Inmunización en conejo.	18
Preparación de Anticuerpos Monoclonales.	18
1.- Inmunización en ratones	18
2.- Fusión	19
a) Soluciones para la fusión	19
b) Fusión	19
3.- Análisis y selección de híbridos	23
4.- Expansión de hibridomas	23
5.- Clonación y congelación	24
6.- Obtención de líquido ascítico	25
7.- Purificación parcial de anticuerpos monoclonales	26
8.- Descongelamiento de hibridomas	26
9.- Determinación del isotipo de las inmunoglobulinas	26
Determinación del antígeno por ELISA.	27
Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.	28
Estimación de pesos moleculares en sistema PAGE-SDS.	29
Transferencia a filtro de nitrocelulosa y desarrollo del Inmunoblot.	30
Inmunoabsorción de la preparación de MS.	31
1.- Autoagregación del anticuerpo monoclonal mediante glutaraldehído y absorción	

	Página
de las membranas.	31
2.- Unión del anticuerpo monoclonal a gel de sepharose-4B activada con CNBr	32
Inmunofluorescencia.	33
1.- Disección, fijación y seccionamiento del músculo esquelético.	33
2.- Inmunofluorescencia indirecta.	35
Otros métodos	36
a) Determinación de la actividad por exclusión con azul de Trypan.	36
b) Determinación de la actividad de $Mg^{+2}$ ATPasa.	37
<b>RESULTADOS</b>	38
Preparación de Anticuerpos Monoclonales.	
Identificación del origen y pureza de las fracciones de membranas:-- -----	38
a) Elección de los ratones para las fusiones. Selección de hibridomas.	38
b) Reactividad de los AcMos con las distintas fracciones de membranas. Pureza de las preparaciones de membranas	41
c) Composición de proteínas	45
Identificación de los componentes específicos de membrana reconocidos por los anticuerpos monoclonales.	47



	Página
Localización <i>in situ</i> de los antígenos reconocidos por varios AcMo.	50
Efecto de varios AcMo sobre la actividad de la $Mg^{+2}$ ATPasa de túbulo-T.	51
Intentos de preparar una fracción purificada de membrana de superficie.	55
 <b>DISCUSION</b>	 61
Evaluación del origen y pureza de las preparaciones de membranas.	61
Reconocimiento de la $Mg^{+2}$ ATPasa por 2/34.4 y su localización subcelular.	65
Modulación de la $Mg^{+2}$ ATPasa por 2/34.4 y extrapolación <i>in vivo</i> .	68
 <b>CONCLUSIONES</b>	 75
 <b>GLOSARIO</b>	 79
 <b>REFERENCIAS</b>	 79

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I	
Resultados del análisis de las fusiones	40
Tabla II	42
Unión relativa de algunos anticuerpos representativos con varias fracciones de membrana de músculo de rana determinada por ELISA.	
Tabla III	43
Determinación del isotipo, cadena liviana y título anti-túbulo-T de las inmunoglobulinas de los anticuerpos monoclonales mediante por ELISA.	
Tabla IV	54
Efecto de los distintos anticuerpos sobre la actividad $Mg^{+2}$ ATPasa de túbulo-T de músculo esquelético de rana	
Tabla V	70
Características generales de la enzima $Mg^{+2}$ ATPasa en diferentes especies y tejidos.	

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de la disposición de las membranas de músculo esquelético involucradas en el proceso de excitación-contracción.	2
Figura 2. Esquema del protocolo de aislamiento de fracciones de membranas enriquecidas en túbulos-T y RS de músculo esquelético de rana.	15
Figura 3. Esquema del protocolo de aislamiento de una fracción de membrana enriquecida en MS de músculo esquelético de rana.	17
Figura 4. Esquema del protocolo de fusión para la obtención de AcMos anti túbulo-T.	22
Figura 5. Caracterización de un suero de ratón (fusión #2) anti túbulo-T.	39
Figura 6. Titulación de AcMos 2/34.4, 2/25.2 y 2/27.1 por ELISA.	44

Figura 7. Reactividad de los AcMos 2/34.4 y 2/25.2 contra las distintas fracciones de membranas analizados por ELISA.	46
Figura 8. Separación de proteínas de membrana en geles de poliacrilamida-SDS 10 % y localización de 2/34.4 en inmunoblot	48
Figura 9. Estimación de los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por 2/34.4 en PAGE-SDS 10%.	49
Figura 10. Patrones de tinción inmunohistoquímica del AcMo 2/34.4.	52
Figura 11. Dependencia de la concentración de 2/34.4 en la producción de Pi de la enzima $Mg^{+2}$ ATPasa.	56
Figura 12. Porcentaje de activación de la enzima $Mg^{+2}$ ATPasa a concentraciones crecientes de 2/34.4.	57
Figura 13. Estimulación de la actividad $Mg^{+2}$ ATPasa por AcMo 2/25.2 y 2/34.4.	58

- Figura 14. Comparación de la reactividad  
inmunológica entre vesículas de  
membranas no retenidas en el complejo  
inmunoabsorbente AcMo 2/34.4-Sepharose-4B  
activada por CNBr y preparaciones de MS  
control analizadas por ELISA. 60
- Figura 15. Caracterización de un suero anti MS  
por ELISA. 63
- Figura 16. Caracterización de un suero anti túbulo-T  
absorbido con una fracción enriquecida  
de MS de músculo esquelético de rana por ELISA. 64

## ABREVIATURAS

AcMo	: Anticuerpo Monoclonal
conA	: Concanavalina A
CNBr	: Bromuro de cianógeno
DMSO	: Dimetil Sulfoxido
E-C	: Excitación-contracción
ELISA	: Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
HAT	: Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
KDa	: Kilo Dalton
MS	: Membrana de superficie
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	: Solución fosfato salino
PEG	: Polietilenglicol
P/V	: Peso/volumen
RS	: Retículo sarcoplasmático
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SFB	: Suero fetal de bovino
SNR	: Suero normal de rana
TEMED	: N, N, N', N'-Tetrametilendiamina
TRIS	: Tris-(hidroximetil)Aminometano
Túbulos-T	: Túbulos transversales
Tween-20	: Monolaurato de Polioxietilen-sorbitol
2/34.4	: El primer número representa la fusión, el segundo número representa la especificidad, representando 1 una mayor reactividad con MS, 3 una mayor reactividad con

túbulo-T y 2 una reactividad similar para ambas preparaciones de membrana. El tercer número define el híbrido y el cuarto el clon.

## RESUMEN

Anticuerpos monoclonales --obtenidos utilizando como inmunógeno una preparación de membrana enriquecida en túbulos transversales de músculo esquelético de rana, se usaron en esta tesis por un lado para confirmar el origen y contribuir a la determinación de la pureza de las preparaciones de membranas de túbulo transversal y de membrana de superficie de músculo de rana y, por otro, para ser usados como sondas bioquímicas en el estudio estructural y funcional de un componente específico de estas membranas.

Se preparó una serie de anticuerpos monoclonales mediante la fusión de células esplénicas de un ratón BALB/C, inmunizado con una preparación de túbulos transversales de músculo esquelético de rana y células de mieloma de la línea NSD/2. Los anticuerpos se analizaron por ELISA contra las distintas preparaciones de membranas. Siete células que cumplían el criterio de análisis, se clonaron por dilución límite y se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones BALB/C, previamente tratados con Pristano para inducir la formación de tumores ascíticos, fuente de una gran cantidad de anticuerpos. Luego, las células se congelaron en nitrógeno líquido.

De estas siete líneas celulares, dos no presentaron reactividad con las preparaciones de membranas luego de clonadas, y cinco presentaron una unión preferencial en ELISA con la preparación de túbulos transversales y una baja reactividad con la preparación de retículo sarcoplasmático.



La unión de los anticuerpos monoclonales anti túbulos transversales a preparaciones de membranas de músculo de rana es compatible con una baja contaminación de vesículas de túbulos transversales en la preparación de retículo sarcoplasmático y con una contaminación significativa en la preparación de membrana de superficie.

En experimentos de inmunofluorescencia usando cortes de tejido de músculo esquelético de rana, estos anticuerpos presentaron patrones de fluorescencia asociados a la ubicación de la banda I, rica en túbulos transversales, y en el sarcolema. No se encontró fluorescencia a nivel de la banda A, rica en retículo sarcoplasmático.

En experimentos de Inmunoblot, tres de los anticuerpos monoclonales reconocieron una proteína, de 107 KDa. Esta proteína se identificó posteriormente como la enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa sobre la base de la modulación de la actividad de hidrolítica de la enzima por dos de los anticuerpos. Uno de estos anticuerpos, el 2/34.4, indujo una activación de la enzima de hasta cinco veces, en forma similar a como lo hacen algunas lectinas. Estos anticuerpos, en especial el 2/34.4, serían especialmente útiles tanto para el estudio del mecanismo y la función fisiológica de esta enzima, como para la identificación de membranas de túbulos transversales.

## ABSTRACT

Monoclonal antibodies raised against transverse tubule membranes were used both to evaluate the origin and purity of frog muscle membranes preparations isolated by conventional biochemical methods, and to study the structural and function of a specific macromolecular component of the transverse tubule membranes.

Starting with an antigenic membrane fraction enriched in frog muscle transverse tubules, several monoclonal antibodies were produced by fusion of spleen cells from an immunized BALB/C mouse with NS0/2 mouse myeloma cells. Antibodies were screened according to the reactivity with membrane fractions isolated from frog skeletal muscle. Seven cell lines, that fulfilled the screening criteria were cloned by limited dilution, were injected in the peritoneal cavity of BALB/C mouse to induce an ascitic tumor, rich in antibodies and were frozen in liquid nitrogen.

Of the seven antibodies, two did not present reactivity after cloning by limiting dilution, and the other five presented preferential binding to the transverse tubule membrane fractions using ELISA and a minimal binding to sarcoplasmic reticulum membrane fractions.

The binding of the monoclonal antibodies anti transverse tubules membranes allows us to detect a very low level of contamination with transverse tubules in the sarcoplasmic reticulum enriched membrane fraction and a significant contamination of T-tubules origin in the surface membrane enriched membrane fraction.

In immunofluorescent experiments with cryostatic sections of

frog muscle tissue these antibodies elicit fluorescence patterns associated with the I band, rich in transverse tubules and no fluorescence in the A band, rich in sarcoplasmic reticulum.

In Immunoblot experiments three of the antibodies recognized one protein; one with a molecular weight of 107 KD. That was identified as the  $Mg^{+2}$ ATPase. Some of the antibodies are able to modulate the enzyme activity; 2/34.4 is capable of activating this enzyme five-fold, as has been reported for some lectins. The antibodies raised in this study will be useful both for studying the mechanism and function of the  $Mg^{+2}$ ATPase and for the identification of transverse tubule membranes.

## INTRODUCCION

Existe actualmente un consenso respecto a la estructura básica de las membranas biológicas, en el cual las proteínas se encontrarían embebidas en una matriz lipídica, de acuerdo al "modelo de mosaico fluido" (Singer y Nicholson, 1972). En el caso particular del músculo esquelético, se ha demostrado que las proteínas integrales de los distintos sistemas de membrana que existen en la célula son diferentes. Esta disposición diferencial de las proteínas podría constituir la base del mecanismo en el proceso de acoplamiento excitación-contracción (E-C), mediante el cual el potencial de acción que se propaga por la membrana de superficie es capaz de producir la contracción de la célula muscular (Bastian y Nakajima, 1974).

Los túbulos transversales (túbulos-T) de músculo esquelético son invaginaciones de la membrana superficial (MS) que generan estructuras abiertas al espacio extracelular. En cortes longitudinales de músculo de anfibio se observan a nivel de la línea Z, línea que se sitúa en el centro de la banda I o isotrópica (una banda clara) (fig.1). Asociada también a la banda I se encuentran las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático (RS), sistema intracelular de membranas. El resto del RS se extiende en la banda A, o anisotrópica, una banda oscura para dar lugar al RS longitudinal (fig. 1, Martonosi, 1984).

Los túbulos-T permiten que la onda de despolarización de la membrana de superficie (MS), causada por el potencial de acción, se transmita hacia el interior de la fibra muscular (Bastian y Nakajima,

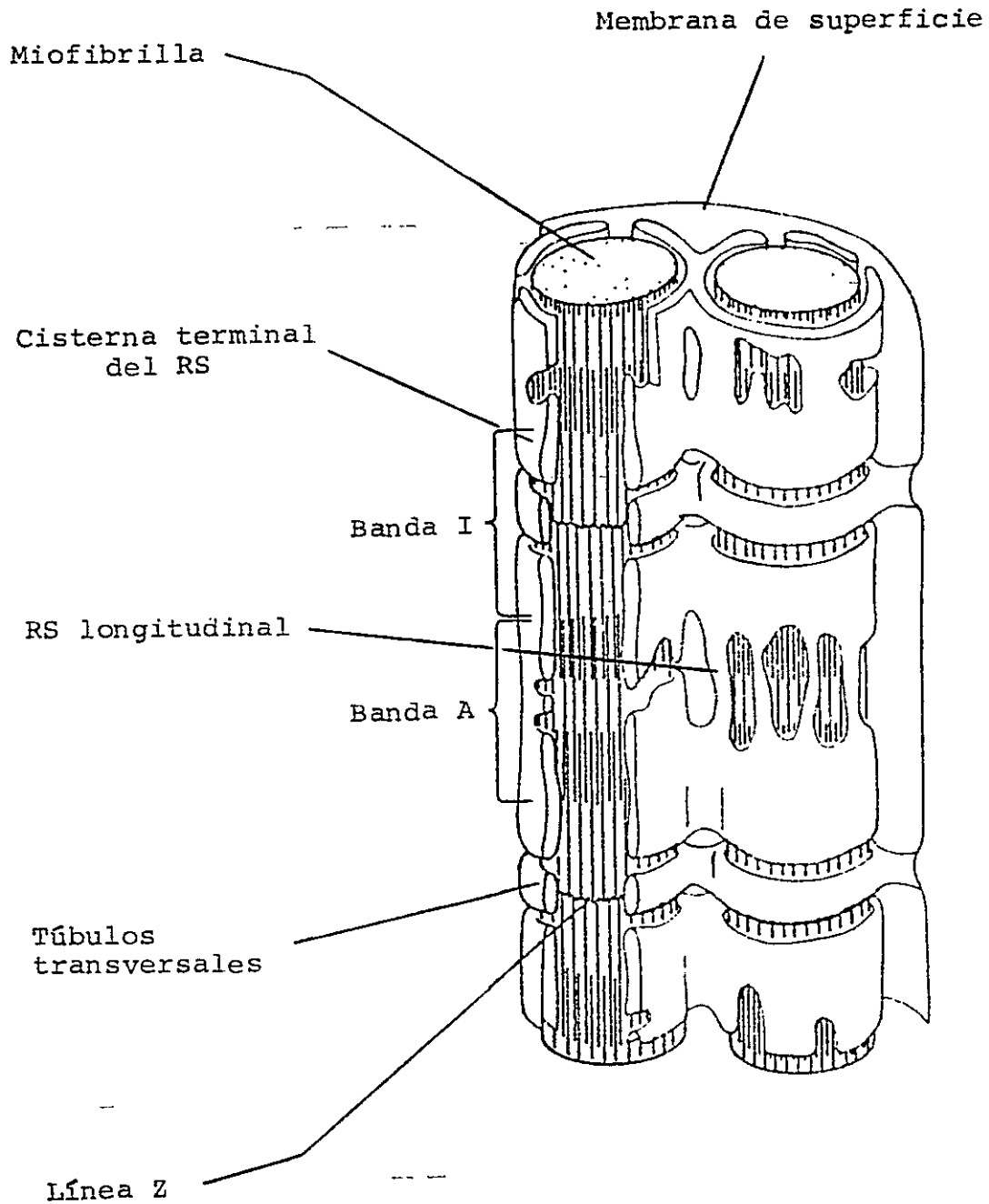


Figura 1. Esquema de la disposición de las membranas de músculo esquelético involucradas en el proceso de excitación-contracción (modificado de Alberts y col., Ed., 1983, Molecular Biology of the cell).

1974). La despolarización del túbulo-T induce, la liberación de calcio desde el sistema de membranas intracelular del RS (Martonosi, 1984). El calcio a su vez induce la contracción de la fibra muscular al unirse a la troponina, una proteína citoplasmática reguladora (Eisenberg y Hill, 1985).

Dentro del proceso del acoplamiento entre excitación y contracción en músculo esquelético, los mecanismos moleculares por los cuales la despolarización del túbulo-T induce la liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático permanecen aún no esclarecidos.

Una resolución del problema a nivel molecular requiere tener preparaciones de túbulo-T purificadas y un sistema que permita estudiar *in vitro* el rol en el acoplamiento E-C tanto de las membranas de túbulo-T como de RS.

#### Aislamiento y purificación de fracciones de membrana de túbulos-T, MS y RS.

Para establecer el rol de los túbulos-T en el proceso de acoplamiento E-C es necesario lograr la individualización de los componentes moleculares involucrados. Con este fin, es necesario obtener preparaciones puras de membranas de túbulo-T, RS y MS a fin de poder efectuar por un lado estudios bioquímicos significativos y por otro disponer de una metodología que permita relacionar estos estudios bioquímicos con funciones fisiológicas.

Varios grupos han ocupado diferentes procedimientos para aislar túbulos-T. Scales y Sabadini (1979) y Roseblatt y col. (1981) utilizaron básicamente una homogenización suave del músculo, seguida

por una incubación con 0.6 M KCl para remover proteínas contráctiles, y finalmente una sedimentación en gradiente de sacarosa para preparar una fracción de membranas enriquecida en túbulos-T. Otro método, empleado por Lau y col. (1977), se basa en disociar los túbulos-T de RS a partir de una fracción microsomal que contiene tríadas (estructura formada por la unión de una vesícula de túbulo-T a dos de RS), utilizando una prensa de French, para luego separar los túbulos-T en gradientes de sacarosa.

Estos investigadores han destinado grandes esfuerzos en determinar con certeza el origen y pureza de las membranas. Scales y Sabadini (1979) utilizaron estudios morfológicos ocupando criofractura para determinar el origen y pureza de preparaciones de túbulo-T. Lau y col. (1977) usaron ouabaína tritiada como marcador externo de membrana. Otro procedimiento es el empleado por Roseblatt y col. (1981) quienes utilizaron técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-túbulos-T de músculo esquelético de conejo. Otros criterios bioquímicos independientes utilizados son el alto contenido en colesterol (Roseblatt y col., 1981; Hidalgo y col., 1986) y alta densidad de sitios de unión para nitrendipina (bloqueador de canales de calcio) de los túbulos-T (Fosset y col., 1983; Jaimovich y col., 1986). Estos distintos estudios han permitido la identificación y obtención de preparaciones de membrana de túbulos-T altamente purificadas.

A diferencia de los túbulos-T, la existencia de un método que permita obtener una preparación de MS de alto grado de pureza es actualmente un motivo de controversia. El método empleado más comunmente para el aislamiento de fracciones enriquecidas en MS tiene

como característica una etapa de extracción prolongada (12-16 h) en alta fuerza iónica (KBr 0.5 M, LiBr) para separar la membrana superficial del resto del sarcolema, seguido de centrifugación en gradiente de sacarosa (Kono y Colowick, 1961; Schapira y col., 1974; Mickelson y col., 1985; Barchi y col., 1979). Otros métodos empleados utilizan una extracción a 37 °C en solución alcalina (Rosenthal y col., 1965; Andrew y Appel, 1973). Seiler y Fleischer (1982) han descrito un procedimiento que sustituye la larga extracción en alta fuerza iónica por un período más corto (3 horas) de extracción en KCl 0.6 M en vez de KBr 0.5 M. Seiler y Fleischer descartan la existencia de contaminación con túbulos-T sobre la base de observaciones morfológicas. Sin embargo, Jaimovich y col (1986), observando la unión de [ $H^3$ ]-nitrendipina (un marcador específico del túbulo) y de derivados de [ $H^3$ ]-tetrodotoxina (TTX) a preparaciones de túbulo-T y MS, concluyen que preparaciones de MS aisladas mediante extracción en alta fuerza iónica (0.5 M KBr) de músculo esquelético de rana contendrían hasta un 40 % de contaminación con túbulos-T. Pareciera entonces que hasta este momento las preparaciones de membrana de superficie obtenidas por diversos métodos presentarían un alto grado de contaminación por túbulos-T (Hidalgo, 1986), lo que haría difícil extraer conclusiones de los estudios bioquímicos de MS. Por otra parte, estos métodos de preparación producen cambios en la estructura de MS (Boegman y col., 1970; Barchi y col., 1977), como la inactivación o remoción de proteínas intrínsecas en el caso de alta fuerza iónica y acción de proteasas endógenas en el caso de altas temperaturas. Estas alteraciones de la estructura constituyen variables que pueden incidir en la estimación de la pureza de las preparaciones de MS. Quizás un enfoque



adecuado que pueda aclarar un poco más este problema sea efectuar estudios inmunológicos de la MS, tanto inmunoquímicos como estudios *in situ* mediante anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra componentes específicos de MS. Estos permitirían determinar origen y pureza de las preparaciones de MS de una manera independiente y descartar la posibilidad que los resultados que indican una alta pureza provengan de un artificio de la preparación.

El RS se puede aislar mediante un procedimiento de homogenización suave del músculo, seguido de centrifugación diferencial y gradiente de sacarosa (Meissner, 1975). Del gradiente de sacarosa se pueden obtener dos tipos de vesículas provenientes de RS, vesículas pesadas y vesículas livianas (Meissner, 1975). Las vesículas livianas del RS provienen de la interface entre sacarosa al 30 y al 32,5 % y las pesadas, de la interface de soluciones de sacarosa de 38,5 y 42.1 % (Meissner, 1975) del gradiente (los túbulos-T se obtienen sobre la capa al 25 %). El origen y pureza de estas vesículas aisladas de RS se ha podido determinar mediante análisis enzimático y microscopía electrónica (Meissner, 1975). Los datos morfológicos obtenidos de criofractura indican que las vesículas livianas provienen del retículo longitudinal mientras que las vesículas pesadas de la cisterna terminal de RS (Meissner, 1975; Campbell y col., 1980).

#### Enfoque inmunológico en el estudio de las membranas.

La especificidad hacia un antígeno (o más bien hacia un epítipo) que presentan los anticuerpos los hace herramientas poderosas y versátiles en el estudio de los procesos biológicos. Es así como en la

caracterización de sistemas de transporte en membranas se han usado los anticuerpos con diversos fines, como por ejemplo; en el análisis de la distribución topológica de proteínas de membranas; en la purificación de proteínas de membrana mediante columnas de afinidad con anticuerpos, y en el estudio de relación estructura-función de proteínas de membrana sobre la base de las modificaciones en las funciones fisiológicas inducidas por anticuerpos específicos.

La descripción, en 1975, de la técnica de producción de anti-inmunoglobulinas homogéneas o monoclonales a partir de los híbridos de células somáticas por Köhler y Milstein, permitió disponer de un método más detallado para conseguir los objetivos señalados más arriba, que cuando se usan los anticuerpos policlonales. Es así como los AcMo presentan ventajas en su uso como sondas bioquímicas (Hybridoma techniques, 1980 ; Vernon y Herzenberg, 1980; Yelton y Scharff, 1981). En primer lugar, las células productoras de anticuerpos pueden ser congeladas y posteriormente recuperadas e inyectadas en ratones, produciendo tumores que forman grandes cantidades de anticuerpos. En segundo lugar, esta técnica permite la obtención de inmunoglobulinas homogéneas específicas para un determinado epítotope sin necesidad de realizar una serie de absorciones con antígenos que presentan reacción-cruzada, lo que en el caso del antisuero va acompañado generalmente de una pérdida del título (Yelton y Scharff, 1981). Otra de las ventajas que presenta esta técnica es la de permitir la generación de anticuerpos específicos a partir de antígenos impuros, lo cual, como se verá más adelante, es de gran relevancia en el desarrollo de esta tesis.

Se han hecho una serie de estudios inmunológicos con el fin de

identificar y caracterizar los componentes moleculares presentes en sistemas de membranas de músculo. Jorgensen y col. (1977, 1979, 1987) han realizado estudios con anticuerpos, principalmente con el fin de caracterizar y determinar la ubicación citológica de proteínas del RS, en especial la bomba de calcio, mediante inmunofluorescencia. Roseblatt y col. (presentado a publicación) han estudiado el rol de proteínas del túbulo-T en el fenómeno de acoplamiento excitación-contracción mediante AcMo anti túbulo-T de conejo. Estos investigadores han observado que un AcMo (2/23.2) inhibe la liberación de calcio del RS inducida por despolarización química *in vitro* sin afectar la liberación de calcio inducida por calcio mas Cafeína. Este AcMo identifica una proteína del "area de contacto" entre el túbulo-T y el RS de 27.8 KDa que participaría en la liberación de calcio del RS mediada por el túbulo-T. La unión de esta proteína al anticuerpo específico no afecta la integridad física de la tríada pero inhibe la comunicación entre el RS y el túbulo-T. Malouf y col (1986), también a partir de una preparación de membrana de túbulo-T de conejo, obtuvieron un AcMo (M177.1) que reconocería un epítoto asociado a la boca del túbulo en la MS. En un trabajo reciente, Malouf y col (1987) han obtenido un AcMo (21-4) específico anti túbulo-T de conejo que activaría canales de calcio sensibles a dihidropiridinas. El AcMo 21-4, por otra parte, inmunoprecipita una serie de polipeptidos con movilidad electroforética similar a la descrita para el receptor de dihidropiridinas. Estos trabajos y otros futuros ayudarán a la disección molecular de los procesos fisiológicos mediados por las proteínas de membrana y a esclarecer las diferentes etapas involucradas en el proceso de acoplamiento excitación-contracción.

La enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa, un componente mayoritario de la membrana del túbulo-T.

La enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa es la ATPasa más activa presente en el túbulo-T y su función es hasta ahora desconocida. En músculo esquelético de rana y de conejo la actividad enzimática presenta un valor cercano a 4  $\mu$ moles de Pi/mg x min (Hidalgo y col., 1986). Okamoto y col. (1985), han descrito que un 80% de la proteína integral en membrana de túbulo-T de músculo esquelético de pollo, corresponde a la enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa. Hidalgo y col. (1983) y Okamoto y col (1985), han logrado una purificación parcial de la enzima a partir de una preparación de túbulo-T de músculo esquelético de conejo y pollo, respectivamente. Los pesos moleculares relativos determinados son de 107 KDa para conejo y 102 KDa para pollo.

Las actividades  $Mg^{+2}$ ATPasas no se encuentran restringidas solo al músculo esquelético, sino que están presentes en una serie de otros tejidos (Beeler y col., 1985; Hammiyn y Senior, 1983; Pommier y col., 1975; Riordan y col., 1977; Jarett y Smith, 1974; Novogrodsky, 1972) aunque al parecer es en el músculo esquelético y cardíaco donde se encuentra una mayor actividad  $Mg^{+2}$ ATPasa (Beeler y col., 1985). No se sabe si todas estas actividades corresponden a la misma enzima, ya que sólo se ha purificado de músculo.

Aunque el peso molecular de la  $Mg^{+2}$ ATPasa es similar al de la  $Ca^{+2}$ ATPasa de RS, ambas enzimas presentan diferencias apreciables : a) La  $Mg^{+2}$ ATPasa es una glicoproteína sensible a estimulación por Concanavalina A (Con A) y aglutinina de germen de trigo; la  $Ca^{+2}$ ATPasa no es una glicoproteína y no es modificada por lectinas (Moulton y col

1986), b) La  $Mg^{+2}$ ATPasa puede distinguirse de la  $Ca^{+2}$ ATPasa en geles de electroforesis en dos dimensiones (Okamoto y col., 1985) y c) La  $Mg^{+2}$ ATPasa es activada por concentraciones milimolares de  $Mg^{+2}$  o  $Ca^{+2}$  y no es sensible a concentraciones de vanadato a las cuales la  $Ca^{+2}$ ATPasa y la  $Na^{+}/K^{+}$ ATPasa están completamente inactivadas (Sabadini y Okamoto, 1983).

No obstante estas notables diferencias, Damiani y col. (1987) recientemente han logrado establecer la existencia de un alto grado de homología estructural entre la  $Mg^{+2}$ ATPasa purificada de túbulo-T y la  $Ca^{+2}$ ATPasa aislada de RS de músculo esquelético de pollo, sobre la base de estudios combinados con técnicas inmunológicas, patrones de fragmentación peptídica y composición de aminoácidos. El conjunto de estos resultados sugiere que la  $Mg^{+2}$ ATPasa sería uno o más de los sistemas de transporte-extramitocondrial, junto con la  $Na^{+}/K^{+}$ ATPasa, la  $Ca^{+2}$ ATPasa de RS y la  $K^{+}/H^{+}$ ATPasa gástrica (Damiani y col., 1987). Sin embargo no se sabe que ión sería transportado por esta enzima. Existen una serie de homologías estructurales que sugieren que estas enzimas de membrana comparten un ancestro común (Kyte, 1981; MacLennan y col., 1985; Shull y col., 1985). Cabe destacar que las características particulares que presenta esta enzima no permiten descartar que sea un producto co o post transcripcional de la  $Ca^{+2}$ ATPasa y que despliegue características propias debido a la glicosilación misma y/o al ambiente lipídico en que se encuentra (Damiani y col., 1987). Respecto a esto último resulta interesante destacar que el colesterol, presente en gran cantidad en las membranas de túbulo-T, copurifica con la enzima (Hidalgo y col., 1983).

### Elección del material de estudio.

Los estudios bioquímicos de los componentes moleculares de las membranas de túbulos-T, MS y RS se han hecho principalmente en músculo de conejo mientras que los estudios electrofisiológicos, destinados a entender el proceso de acoplamiento E-C, se han realizado principalmente en músculo de rana. Para obtener una relación entre ambos tipos de análisis es fundamental confrontar resultados utilizando el mismo sustrato de estudio. Hidalgo y col. (1986) y Jaimovich y col.(1986) han logrado recientemente aislar preparaciones puras de túbulos-T de músculo esquelético de rana, caracterizándolas usando diversos marcadores bioquímicos, con lo cual se abre el camino a la realización de estudios tendientes a correlacionar la función fisiológica (acoplamiento E-C) con las correspondientes estructuras macromoleculares responsables.

## OBJETIVOS

En esta tesis se pretende avanzar en el estudio del origen y pureza de preparaciones de membrana de músculo esquelético de rana y en el estudio del rol de sus componentes macromoleculares. Con este fin se prepararon AcMos utilizando como inmunógeno una preparación de túbulo-T de músculo esquelético de rana. Estos anticuerpos se utilizaron con los siguientes objetivos específicos:

1) Contribuir a la determinación del origen y la pureza de las preparaciones de membranas de túbulo-T, RS y MS de músculo de rana.

2) Identificar los componentes específicos de la membrana del túbulo-T reconocidos por los AcMos.

3) Estudiar el posible efecto de los AcMos sobre la actividad funcional de los antígenos reconocidos. En particular, en caso de encontrar un AcMo contra una enzima de membrana, caracterizar el efecto de la unión del AcMo sobre la actividad enzimática.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Materiales

#### Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis , Mo. : Tween-20, TEMED, p-cloro-1-naftol, 8-azaguanina, amonopterina, medio HT, Tris, N, N metilen bis-Acrilamida, RPMI 1640, suero fetal de bovino, ácido pirúvico, streptomycin, dimetil sulfóxido, Pristano, Persulfato de amonio, azul de Trypan, azul de bromofenol, azida sódica, agua oxigenada, antisuero de cabra antiinmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa, anti suero de cabra antiinmunoglobulinas de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína, albúmina de suero de bovino. De Merck, Darmstadt, Alemania Federal, se obtuvieron : Acido acético, etanol, ácido clorhídrico, glutaraldehído y la mayoría de los reactivos de uso analítico. De Pharmacia Fine Chemicals, INC, N.Y : Sepharose-4B activada en CNBr. De Gibco Laboratories Grand Island Biological Company, Grand Island, N.Y, se obtuvieron : Adyuvante completo de Freund y L-glutamina. De BIO-RAD Laboratories, Richmond, Calif., se obtuvieron : Dodecilsulfato de sodio, acrilamida. De Cappel, Cooper Biomedical, inc., Malvern, P.A., se obtuvo : antisuero de cabra purificado por afinidad antiinmunoglobulinas de ratón (IgA, IgG, IgM) (especificidad por cadenas pesadas y cadenas livianas) conjugado a peroxidasa. De Laboratorio Chile, S.A., Santiago, Chile, se obtuvo : Penicilina G. Sódica 1000000 U.I.



## II. Metodos

### Preparación de membranas de músculo esquelético.

Las fracciones de membranas de túbulo-T y RS se obtuvieron a partir de músculo esquelético de rana (*Craudoiverbero caudoiverbero*), según métodos descritos por Hidalgo y col. (1986) y la preparación de MS se obtuvo según una modificación del método de Shapira y col. (1974).

#### 1.- Aislamiento de túbulo-T y RS.

El método consiste en la siguiente serie de pasos: Se toma de 100 a 200 g de músculo esquelético de las extremidades de ranas adultas, se limpia de tejido conectivo y vasos sanguíneos y se homogeniza en licuadora (Waring-Blendor) junto con cuatro volúmenes de solución KCl 100 mM; Tris-maleato 20 mM pH 7.0 (solución A). El homogenizado se centrifuga a 10.000 x g por 30 min (centrifuga Sorval RC2-B). El sobrenadante se filtra en gasa, se le agrega KCl hasta una concentración de 600 mM y luego se centrifuga a 100.000 x g por 60 min en solución A conteniendo 600 mM KCl, con el fin de eliminar las proteínas contráctiles. El sedimento se resuspende, se lava en solución A y se centrifuga a 100.000 x g por 60 min. Los microsomas obtenidos en el sedimento se resuspenden en solución sacarosa 300 mM Tris-maleato 20 mM pH 7.0 y se colocan sobre una gradiente discontinua de sacarosa de cuatro capas de 25%, 27.5%, 35% y 43% (p/v ajustado en refractómetro). Se centrifugan las gradientes a 100.000 x g por 12 a 16 hrs. (ultracentrifuga Beckman modelo-L Rotor SW-27). La banda liviana (sobre la capa de 25%) contiene túbulo-T esencialmente libres de RS, El RS

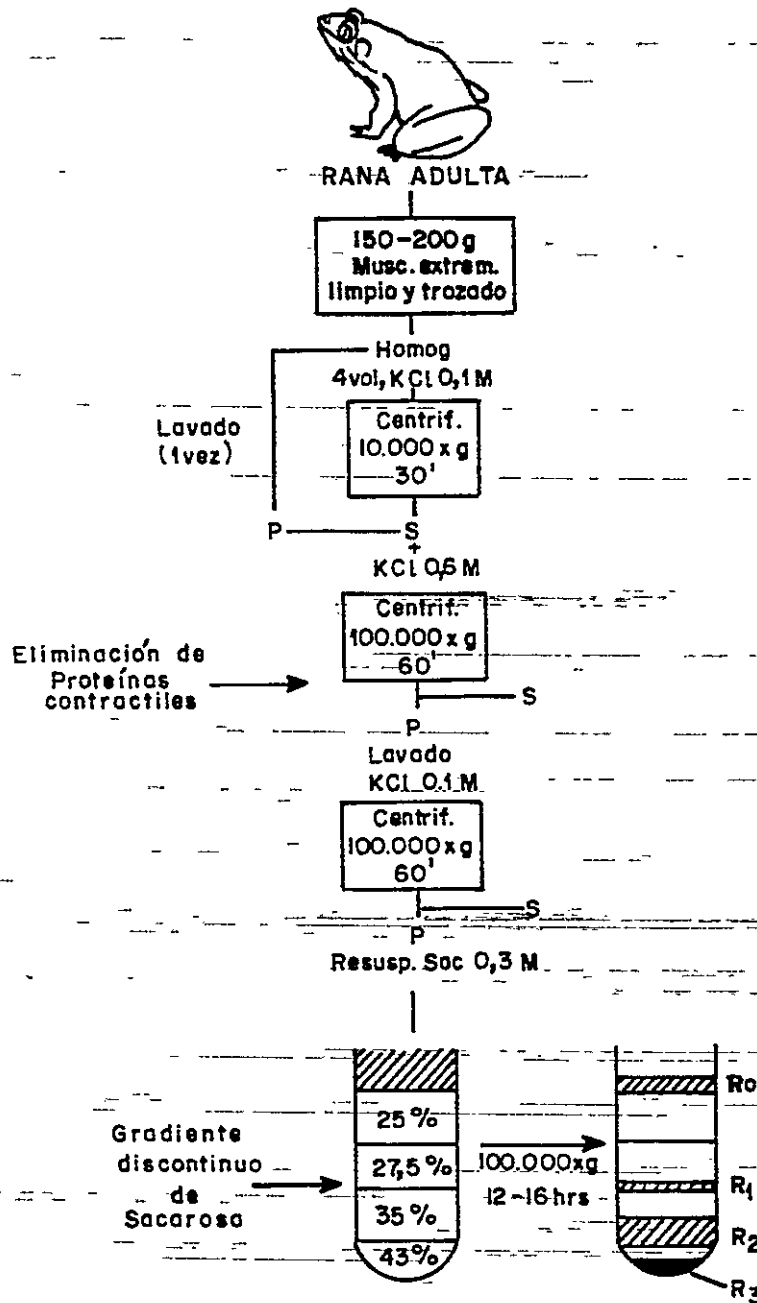


Figura 2. Esquema del protocolo de aislamiento de fracciones de membranas enriquecidas en túbulos-T y RS de músculo esquelético de rana. A partir de la gradiente de sacarosa se obtienen: (R<sub>0</sub>) una fracción de membranas de baja densidad enriquecida en túbulos-T; (R<sub>1</sub>) una fracción de membrana mezcla de túbulos-T y RS; (R<sub>2</sub>) una fracción de membrana enriquecida en RS liviano; (R<sub>3</sub>) una fracción de membrana enriquecida en RS pesado.

liviano se encuentra principalmente en la interfase 27.5-35% y el RS pesado se obtiene en el sedimento.

En los experimentos se ocupa principalmente la fracción liviana (túbulos-T) y la fracción obtenida de la interfase 27.5-35% (RS liviano). Las muestras se congelaron por inmersión en CO<sub>2</sub> sólido/acetona y se guardaron congeladas a -20 °C. El rendimiento usual de túbulo-T fue de 2 a 3 mg y de RS liviano de 20 a 30 mg por 150 g de músculo.

## 2.- Aislamiento de MS

El método consiste en la siguiente serie de pasos. Se homogeniza 100 a 200 g de músculo de las extremidades de rana adulta *Craudoiverbera caudoiverbera* en solución sacarosa 250 mM, EDTA 0.5 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.4 y se centrifugan a 1.000 x g por 15 min. Para disociar la membrana de superficie de fibras de colágeno y otros constituyentes de la membrana basal del sarcómero, el sedimento obtenido por centrifugación a baja velocidad se incuba 16 a 18 hr en una solución de KBr 500 mM, EGTA 50 mM, Tris-HCl 16 mM (pH 8.5). Luego se tamiza por una malla de poro de 0.5 mm de diámetro y el tamizado se centrifuga a 2.500 x g por 15 min. El sobrenadante obtenido de esta manera se centrifuga a 100.000 x g por 60 min. El sedimento se resuspende en KCl 600 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) y se centrifuga a 100.000 x g por 60 min. El sedimento se resuspende en sacarosa 300 mM, Tris-maleato 20 mM (pH 7.0) y se centrifuga en gradiente discontinua de sacarosa de capas de 20.5% y 29.4% (p/v, ajustado en refractómetro). En los experimentos se ocupa la fracción liviana que se recoge sobre la capa de 20.5%, la cual se congela como se describe para túbulo-T y RS y se

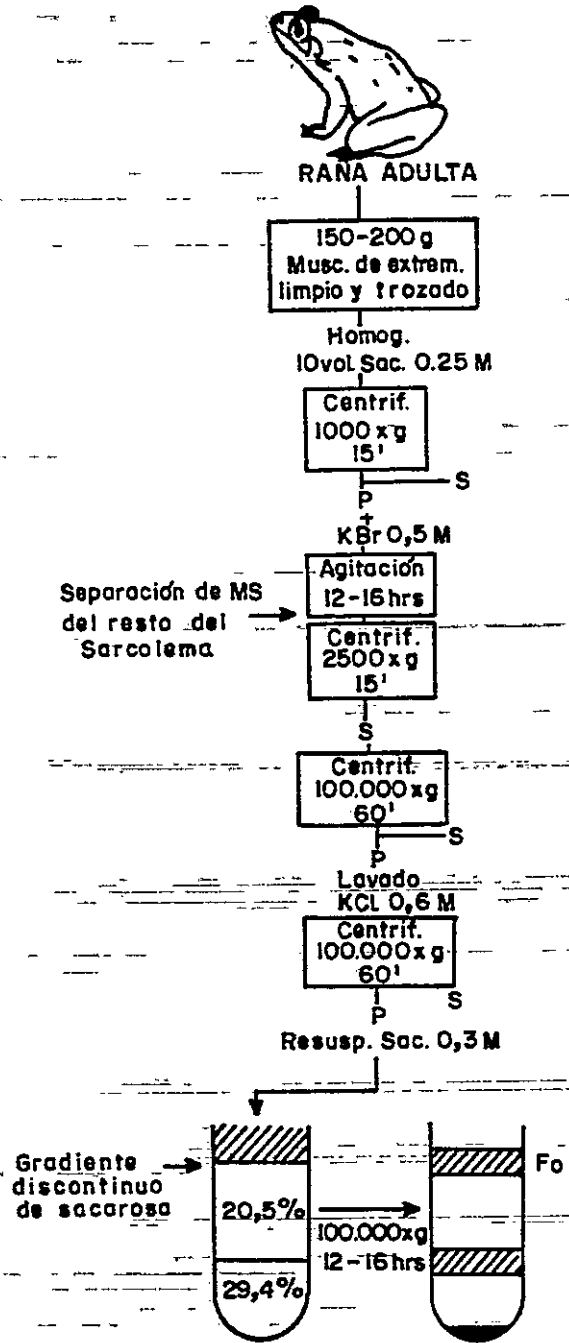


Figura 3. Esquema del protocolo de aislamiento de una fracción de membrana enriquecida en MS de músculo esquelético de rana. A partir de la gradiente de sacarosa se obtiene : Fo, una fracción de membrana de baja densidad enriquecida en MS.

guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El rendimiento de MS es de 1 a 2 mg por 150 g de músculo. A todas las preparaciones de membranas se les hace una determinación de proteínas según una modificación del método de Lowry, calibrado usando albúmina de suero de bovino como patrón (Hartree, 1972).

### Preparación de Anticuerpos Policlonales

#### Inmunización en conejos

Se utilizaron conejos blancos (Newzealand) hembras de 3 a 4 Kg de peso. Antes de la inmunización se sangraron (30 ml por conejo) para obtener suero preinmune como control. La inmunización se realizó mediante inyecciones intradérmicas en la espalda del animal de 0.8 mg de preparación de túbulo-T (2 mg/ml) emulsionado en igual volumen de solución de adyuvante completo de Freund. Cuatro semanas después se efectuó una inoculación idéntica con el fin de inducir la respuesta inmune secundaria. A los diecisiete días se sacó una muestra de sangre y se analizó el suero mediante ELISA con preparaciones de túbulo-T, MS y RS. Debido a que el análisis del suero fue positivo, se procedió a un sangramiento mayor (20 ml) cuatro días después. El suero obtenido de esta manera se guardó congelado en porciones pequeñas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Preparación de Anticuerpos Monoclonales

#### 1.- Inmunización en ratones

Se inmunizaron ratones BALB/C hembras de aproximadamente 6

semanas de edad con inyecciones intraperitoneales de 100  $\mu$ g de preparación de túbulos-T emulsionado en igual volumen de adyuvante completo de Freund en los días 1, 7 y 14. Se analizó el suero por ELISA y se eligieron dos ratones con el más alto título contra túbulo-T. El antisuero y el suero preinmune se guardaron congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en porciones de 50  $\mu$ l para ser usados como control en el análisis de la fusión. El día 30 se dió una inyección de refuerzo intravenosa por la cola del animal con 20  $\mu$ g de preparación de túbulo-T y 3 días después se realizaron las fusiones.

## 2.- Fusión

### a) Soluciones para la fusión

- RPMI 1640 : Se reconstituye en agua bidestilada y desionizada (para un litro) y se le agregan  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, L-glutamina 50  $\mu$ g/lit, piruvato 50  $\mu$ g/lit, penicilina 50 U/lit, estreptomyciná 50 U/lit. Se ajusta la solución a pH 7.0 con NaOH o HCl 1 N y se filtra por un filtro (Millipore HA, 0.45  $\mu$ m).

- Medio HT : Contiene medio RPMI 1640, 20% SFB suplementado con hipoxantina 0.1 mM, timidina 0.016 mM.

- Medio selectivo HÁT : Contiene medio RPMI 1640, 20% SFB suplementado con hipoxantina 0.1 mM, timidina 0.016 mM y aminopterina 0.0004 mM.

### b) Fusión

El desarrollo de esta técnica permite la formación de hibridomas secretores de anticuerpos homogéneos generados de un solo clon. Estas células híbridas se forman de la fusión de linfocitos B

normales, secretores de un anticuerpo particular, y linfocitos B tumorales no secretores. La selección de los híbridos de linfocitos B y células de mieloma se produce al crecer las células resultantes de la fusión celular en medio selectivo HAT, medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. Aminopterina es un inhibidor de la principal vía de síntesis de nucleótidos, la célula para sobrevivir tiene que usar una vía alternativa para la síntesis de éstos. La célula de mieloma es deficiente en una de las enzimas requeridas en la vía alternativa, la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRTasa), por lo tanto, las células de mieloma y los híbridos mieloma-mieloma son eliminados. Por otro lado los linfocitos B y las células híbridas linfocitos B-mieloma son capaces de sobrevivir utilizando una fuente exógena de timidina e hipoxantina. La eliminación de los linfocitos B ocurre en forma pasiva ya que son capaces de sobrevivir en cultivo solo un tiempo limitado (alrededor de dos semanas).

Las fusiones se realizaron usando los esplenocitos de los ratones inmunizados con la preparación de túbulos-T y células de mieloma de la línea celular NS0/2 con polietilenglicol (PEG) como agente fusionante, según el protocolo de Köhler y Milstein (1975) con algunas modificaciones.

Cada bazo fue sacado asépticamente y transferido a una placa de Petri con medio RPMI 1640 (en campana de flujo laminar, Alfonso Wolf y Co., Santiago, Chile). Se limpiaron los bazos de toda la grasa adherida y luego se cortaron a la mitad disgregándose mecánicamente con agujas, con el fin de extraer las células. Se aspiró el sobrenadante con pipetas y se vertió en un tubo de 12 ml. Se lavó dos veces más los

restos de bazo con el fin de extraer el mayor número posible de células. Luego se dejó decantar el sobrenadante con el fin de eliminar los restos de bazo en suspensión. Se tomó sólo la suspensión celular; esta se transfirió a un tubo de 50 ml y las células se centrifugaron a  $250 \times g$  durante 10 min (Centrifuga International modelo PR-2. Rotor 253). Luego de la centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI 1640/bazo. Se aspiró repetidas veces con el fin de que la grasa se adhiriera a las paredes de la pipeta. Después de eliminar la grasa, se agregó 9 ml de RPMI/bazo y se contaron las células (100  $\mu$ l de células + 90  $\mu$ l azul de Tripán). Se obtuvo alrededor de  $1 \times 10^8$  células esplénicas/bazo. Por otra parte, se resuspendieron las células de mieloma en 20 ml de medio RPMI 1640 y se contaron (50  $\mu$ l de células + 50  $\mu$ l de azul de Tripán). Se agregó el volumen de suspensión para una razón aproximada de 1/10 células de mieloma/células esplénicas ( $1.3 \times 10^7 / 1 \times 10^8$ ). Se centrifugaron las células a  $250 \times g$  durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se centrifugó por segunda vez sólo hasta llegar a  $250 \times g$ , aspirando posteriormente el sobrenadante con el fin de dejar un botón de células muy seco (tubo cónico). Luego se resuspendieron las células con varios golpes en el mesón y se agregó 1 ml de PEG al 50 % a  $37^\circ C$  en medio de cultivo RPMI 1640 durante 1 min, agitando el tubo suavemente. Luego se incubó por 1 min a  $37^\circ C$  con agitación continua, se agregó 1 ml de RPMI durante 1 min y luego 20 ml de RPMI durante 10 min, agitando suavemente. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 200 ml de medio selectivo HAT. Se distribuyeron 200  $\mu$ l por pozo en placas de cultivo (placas de poliestireno de Falcon Becton Dickinson and Co., Oxnard, Ca.) de 96 pozos



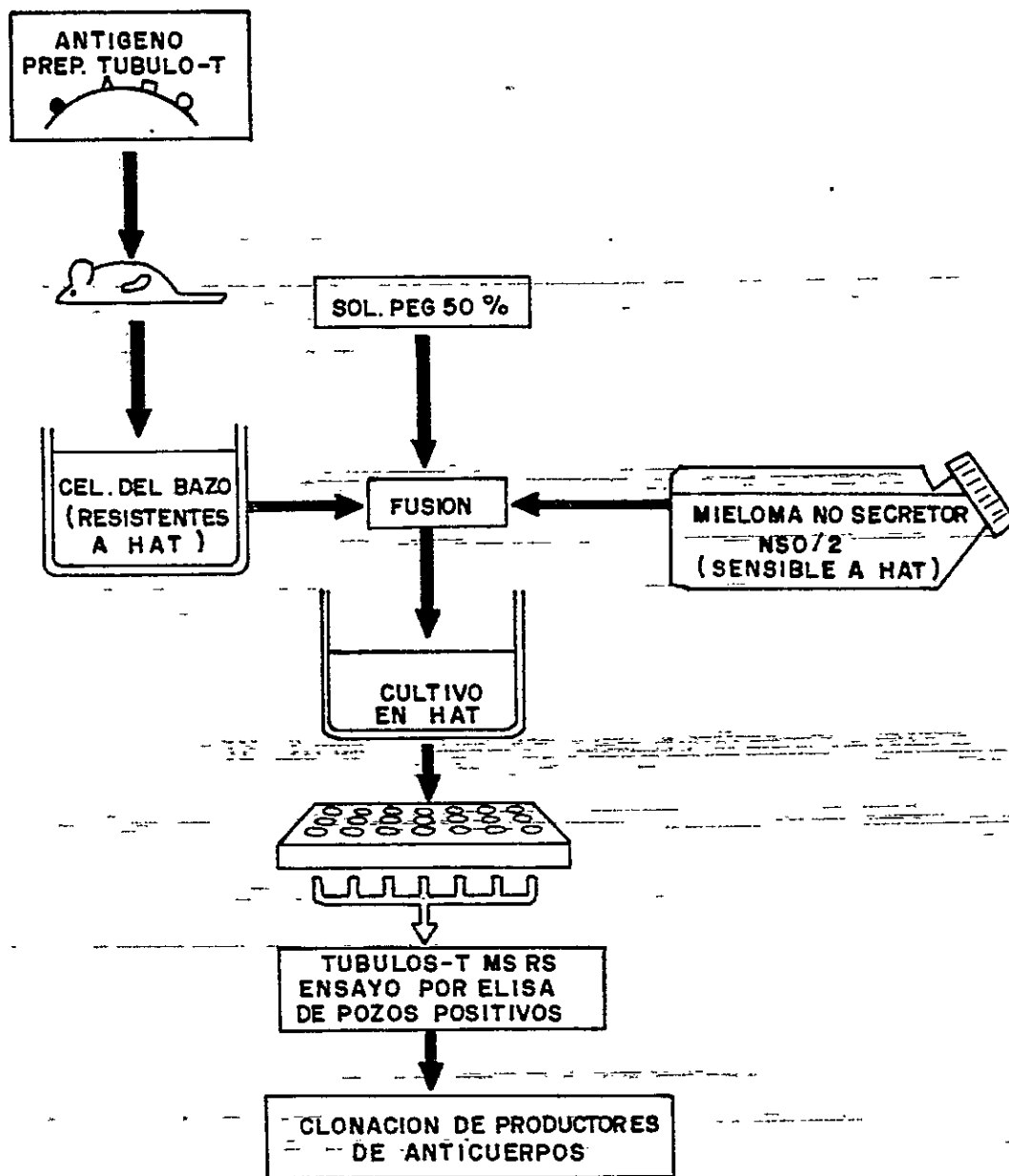


Figura 4. Esquema del protocolo de fusión para la obtención de AcMos anti-túbulo-T.

y se colocaron en incubador (GCA Automatic CO<sub>2</sub> incubator, GCA Corporation, Chicago, Illinois) a 37 °C en una atmósfera húmeda, la cual contenía un 5% de CO<sub>2</sub>. Se cambió medio en los días 1, 3, 5 y 7 agregando (100 µl) de medio selectivo HAT conteniendo 20% SFB. El día 9 se ensayaron los sobrenadantes de las primeras colonias por ELISA y los últimos por aparecer se ensayaron en el día 40. Se agregó una gota de SDS 10% a los pozos contaminados.

### 3.- Análisis y selección de híbridomas.

Se ensayaron los híbridomas productores de anticuerpos mediante ELISA comparando la reactividad de los sobrenadantes, diluidos 1/3 en solución fosfato salino (KCl 0.072 mM , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.022 mM , NaCl 18,120 mM , Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O 1,290 mM a pH 7.2) y detergente Tween 20 (Monolaurato de polioxiétilen-sorbitol) 0.05% con preparaciones de tubo-T, MS y RS (200 ng/pozo). Como control positivo se utilizó antisuero preparado en ratón (dilución 1/100 en PBS Tween).

### 4.- Expansión de híbridomas

Alrededor de 14 días después de iniciada la fusión se cambió de medio selectivo HAT a medio HT, 20% SFB. Esta transición es necesaria antes de empezar a utilizar medio RPMI-1640, ya que permite diluir la aminopterina remanente intracelular.

De 40 híbridos que reaccionaron con las preparaciones de membrana (ver tabla I), 28 se transfirieron a pozos de 2 ml en placas de 24 pozos. Se procedió de la siguiente manera: a pozos con 1.5 ml de medio

HT- SFB 10% se les agregó 150  $\mu$ l de medio con células. El pozo original se rellenó con 100  $\mu$ l medio HT-SFB 10%, con el fin de crear un duplicado, el cual protege contra la pérdida de la línea celular. De estos 28 híbridos, 12 se pasaron a botella. Para esto se sacó una alícuota del pozo de la placa de 24 y se colocó en una botella con 5 ml de medio RPMI1640 suplementado con 20 % SFB.

Por último se seleccionaron 7 híbridos para su clonación, congelación y producción de líquido ascítico. Después de expandir las células, antes de clonar, se congeló la línea madre con el fin de evitar la posible pérdida de la línea celular. Una pequeña porción de las células se dejó para la formación de clones.

#### 5.- Clonación y Congelación

La clonación de las líneas celulares se efectuó por dilución límite. Este método se basa en la probabilidad de encontrar sólo una célula por pozo en la placa de cultivo al diluirse los hibridomas en la forma adecuada. La célula única forma una colonia que se reconoce por su forma esférica en el microscopio invertido.

Se usaron timocitos de ratón BALB/C joven como células nodrizas (sin estas células, la célula única es incapaz de sobrevivir). Para la extracción de los timocitos, se empleó un procedimiento similar al utilizado para las células esplénicas. Las células tímicas se resuspendieron en 5 ml de RPMI suplementado con 20% de SFB. Se determinó la concentración celular y posteriormente se diluyeron alrededor de  $10^5$  timocitos/pozo(100 $\mu$ l) en una placa de cultivo. Por otro lado se diluyeron las células híbridas de tal manera de dejar una

concentración final de 2 células por pozo en la primera mitad y una célula por pozo en la segunda mitad de la placa de cultivo.

Finalizada la distribución de las células en las placas, se guardaron en el incubador por aproximadamente 12 hr para equilibrar el pH, sellándose luego las placas con cinta autoadhesiva por lo menos por 7 días. Al cabo de este tiempo se observaron los pozos por medio del microscopio invertido (Swift Instrument International S.A.) para detectar los pozos con colonias únicas (monoclonales). Al cabo de 10 días los sobrenadantes de los pozos monoclonales se sometieron a ELISA. Se seleccionaron tres pozos por clon para proliferación, congelación y obtención de líquido ascítico.

Para congelar los híbridos, alrededor de  $5$  a  $10 \times 10^6$  células, se centrifugaron a  $250 \times g$  por 10 min. Posteriormente las células se disgregaron cuidadosamente golpeando suavemente el tubo con la mano. Sobre las células se agregó 1 ml de medio de congelación frío (SFB-10% DMSO) y se trasladaron a ampollas las cuales se guardaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 hrs. Luego se transfirieron a un tanque de  $\text{N}_2$  líquido ( $-170^{\circ}\text{C}$ ) (MVE cryogenics, Ins., New Prague, Minnesota).

#### 6.- Obtención de líquido ascítico.

Para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales, se hicieron crecer los hibridomas *in vivo* en la cavidad peritoneal de ratones BALB/C.

Se inocularon intraperitonealmente ratones BALB/C, previamente tratados con 0.5 ml de Pristano 10 y 3 días antes, con alrededor de  $5 \times 10^6$  células de hibridoma (tres ratones por cada

hibridoma). Después de 10 días aproximadamente se observó la aparición del tumor ascítico. Se esperó hasta que se acumulara una gran cantidad de líquido ascítico y luego éste se extrajo por punción y se centrifugó a 250 x g por 10 min, con el fin de eliminar las células. Al sobrenadante se le agregó azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) al 0.05% con el fin de impedir su contaminación y se guarda a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 7.- Purificación parcial de anticuerpos monoclonales (AcMo)

Los anticuerpos se purificaron a partir del líquido ascítico mediante precipitación con una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.0 hasta una relación 1/1 (v/v) con el líquido ascítico. El precipitado se resuspendió y dializó contra solución tris-Maleato 20 mM Sacarosa 300 mM pH 7.0.

#### 8.- Descongelamiento de hibridomas.

Las ampollas se descongelaron en un baño a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Inmediatamente después de descongeladas y mientras aún queda un trozo de hielo en el tubo se vertieron en tubos de 5 ml RPMI-SFB 20% y se centrifugaron las células a 200 x g durante 10 min, resuspendiéndose en 5 ml de RPMI-SFB10%. 24 hrs más tarde se determinó la viabilidad.

#### 9.- Determinación del isotipo de las inmunoglobulinas.

La determinación del isotipo, así como del tipo de cadena liviana de los anticuerpos monoclonales se realizó por medio de ELISA usando un KIT de Zymed lab. Inc.(USA). En este caso se usó el anticuerpo monoclonal como antígeno, a una concentración de 1  $\mu\text{g/pozo}$ . Como

segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo purificado de cabra conjugado con Peroxidasa-anti-IgG (cadena liviana y pesada) de ratón. El complejo inmune se detectó utilizando como cromógeno el ABTS (2,2-azino-di(3-ethyl bezthiazoline sulfonic acid)).

#### Determinación del antígeno por ELISA

La técnica de ELISA (Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida) permite detectar con un alto grado de sensibilidad el complejo antígeno-anticuerpo. Lo que se hace es adsorber el antígeno a una fase sólida (plástico). Después de lavar, se agrega el anticuerpo que reconoce el antígeno unido al plástico. El complejo antígeno-anticuerpo se reconoce a su vez por un segundo anticuerpo (dirigido contra el primero) unido a una enzima, cuyo producto es coloreado y puede ser reconocido en un espectrofotómetro.

En esta tesis se ocuparon placas de poliestireno (Falcon). El antígeno se incubó 12 a 13 horas a temperatura ambiente o 3 horas a 37°C en solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM,  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  34,9 mM,  $\text{Na}_2\text{N}_3$  0,02% pH 9.6. Los lavados y el bloqueo de la placa para prevenir la unión inespecífica del antígeno al plástico se efectuaron en PBS-Tween pH 7.2 (una hora a temperatura ambiente). El segundo anticuerpo usado fue antisuero de cabra purificado por afinidad anti-inmunoglobulinas de ratón (IgA, IgG, IgM) (especificidad por cadenas livianas y pesadas) conjugado a peroxidasa, diluido 1/700 en PBS-tween. El sustrato utilizado fue  $\alpha$ -fenilendiamina al 0.2% y se agregó  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.02% en solución ácido cítrico 24 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  51 mM, pH 5.0. Se detuvo la

reacción con 100µl de  $H_2SO_4$  2,5 N por pozo a un tiempo determinado según la aparición de un color amarillo. La densidad óptica (D.O.) del producto coloreado se midió en un espectrofotómetro de ELISA (Titertek Multiskan MC, Flow laboratories) a una longitud de onda de 492 nm. Con el fin de comparar, todos los valores de D.O. a 490 nm representan valores extrapolados a un tiempo de 10 min. Los valores medidos experimentalmente no fueron superiores a 0,8.

#### Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.

Las preparaciones de membranas de túbulo-T, MS, RS y muestras de suero normal de rana (SNR), así como las proteínas patrón se solubilizaron en SDS y sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10%, siguiendo fundamentalmente el método descrito por Laemmli (1970). El gel separador fue de acrilamida 10% *N,N'*-metilen-bis-acrilamida 0.127%, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05%, Temed 0.1% en Tris 375 mM-HCl pH 8.8. La solución del gel separador se desgasificó y se completó hasta 3/4 partes del volumen entre dos placas de vidrio (18 x 17 cm x 1 mm). Una vez polimerizado el gel bajo *n*-butanol por alrededor de 30 min a temperatura ambiente, se eliminó el butanol y se lavó con agua destilada. Se agregó luego el gel concentrador compuesto por acrilamida al 3.9%, *N,N'*-metilen-bis-acrilamida 0.1%, SDS 0.1%, Temed 0.1%, persulfato de amonio 0.03% en Tris 125 mM-HCl pH 6.8. Se introdujo una peineta con 13 dientes de 0,6 cm de ancho por 1 cm de alto en el gel concentrador. Una vez polimerizado el gel concentrador (30 min), se sacó la peineta quedando los espacios correspondientes para colocar las muestras, se

retiró el sello inferior y se colocó el gel en la cámara de electroforesis (Jordan Scientific Corporation). La solución de electrodos corresponde a Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%, pH 8.3. Las muestras de proteínas fueron disueltas en relación 1/1 en solución que contiene Tris 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 1,25%, Glicerol 25%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 1,25% y azul de Bromo fenol 0,00125%. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 2 min y se cargaron los pocillos del gel con ellas. La electroforesis se hizo habitualmente a voltaje constante, manteniendo 70 V hasta que el colorante de referencia (Azul de Bromofenol) migrara al inicio del gel separador y se mantuvo a 140 V hasta que el colorante migran al final del gel (Fuente de poder E-C-103, E-C Apparatus Corporation). El gel se tiñó por inmersión de 4 a 8 hr en una solución que contenía azul de Coomasie al 0,25%, ácido acético 10% y Metanol 50%. Luego, se lavó el gel con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se colocó en una solución de destañido que contenía ácido acético al 10% y Metanol 50% hasta obtener un gel transparente. Se secó mediante vacío sobre papel Whatman Nº 1.

#### Estimación de pesos moleculares en sistema PAGE-SDS.

Para obtener una estimación del peso molecular de las bandas de proteínas reveladas en el gel, migraron en el gel de poliacrilamida, conjuntamente con las muestras las siguientes proteínas patrón: alfa-lactoalbúmina (14,2 KDa), inhibidor de tripsina (20,1 KDa), tripsinógeno (24 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), seroalbúmina (66 KDa), fosforilasa B (97,4 KDa)  $\beta$ -galactosidasa (11,6



KDa) y miosina (205 KDa). Se graficó la migración electroforética relativa en función del logaritmo del peso molecular relativo de las proteínas de calibración.

#### Transferencia a filtro de Nitrocelulosa y desarrollo del inmunoblot.

Esta técnica permite identificar el antígeno al cual se une un anticuerpo. La lógica de la técnica se basa en que las proteínas se unen fuertemente al papel de nitrocelulosa, siendo de esta forma más accesible al anticuerpo que dentro de un gel de poliacrilamida.

Para realizar la transferencia se utilizó el método de Towbin y col (1979). Después de la electroforesis el gel se colocó sobre un papel filtro Whatmann 3MM. Sobre el gel se colocó el papel de nitrocelulosa previamente hidratado en solución de transferencia; Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20%. A su vez sobre el papel de nitrocelulosa se coloca otra hoja de papel filtro Whatman 3MM. Para evitar tener burbujas atrapadas entre el gel y la nitrocelulosa, se pasó suavemente una espátula sobre el papel filtro que queda en contacto con la nitrocelulosa. Este "emparedado" se colocó entre dos esponjas duras de 0.5 cm de ancho, que a su vez están apoyadas en dos placas de Plexiglas que tienen orificios para permitir la libre difusión de los electrolitos. Este "emparedado" se colocó en la cámara de transferencia con el ánodo(+) conectado en el lado de la nitrocelulosa (Trans-Blot Cell, BIORAD, Laboratories Richmond, Ca.). Se conectó la cámara de transferencia a la fuente de poder y se transfirió durante toda la noche a 60 volts y a 4 °C. Al final de la transferencia el gel se tiñe con azul de

Coomasie para determinar el grado de transferencia.

El papel de nitrocelulosa se incubó 1 hora con agitación en una solución SFB 7.5%- PBS pH 7.2, con el fin de saturar los sitios de unión de proteínas a la nitrocelulosa. Se lavó tres veces en PBS-Tween en intervalos de 10 min. Luego se incubó con los anticuerpos monoclonales (1.3 µg/ml) diluido en PBS-Tween por tres horas a temperatura ambiente con agitación constante. Se volvió a lavar y se incubó con el segundo anticuerpo, antisuero de cabra purificado, conjugado a peroxidasa, con afinidad a antinmunoglobulinas IgA, IgM e IgG (Cappel) a una dilución 1/700 en PBS-Tween por una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se volvió a lavar, y se desarrolló la reacción ocupando como sustrato 4-cloro-1-naftol. Para ello, se pesó 30 mg del sustrato, se disolvieron en 10 ml de Metanol y esta solución se agregó a 50 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM a pH 7.4. Para empezar la reacción se agregó 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% con agitación. Se detuvo la reacción mediante tres lavados con agua destilada.

#### Inmunoabsorción de la preparación de MS.

Este método se utilizó con el fin de separar fracciones de membranas mediante un anticuerpo específico. La inmunoabsorción de la preparación de MS se realizó de acuerdo a los siguientes protocolos:

1.- Autoagregación del anticuerpo monoclonal mediante glutaraldehído y absorción de las membranas.

Alrededor de 13 mg del AchE purificado se autoagregaron con una concentración final de glutaraldehído al 0.5%. Para este efecto a 9 ml

de la solución con AcMo se le agregó 1 ml de glutaraldehído al 2.5%, en porciones de 50  $\mu$ l, con agitación. El complejo AcMo-glutaraldehído se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y 14 horas a 4  $^{\circ}$ C con agitación. Se agregó nuevamente 1 ml de glutaraldehído al 2.5%, se dejó 2 horas a temperatura ambiente y se detuvo la reacción agregando 1 ml de lisina 2.5 M por cada 4 ml en PBS pH 7.2. Se lavó en solución de lisina, homogenizando y centrifugando cada vez a 10.000 x g por 10 min, hasta obtener un valor de la D.O. a 280 nm en el sobrenadante cercano al control (solución de Lisina). Posteriormente se resuspendió y guardó el complejo AcMo- glutaraldehído en solución sacarosa 0.3 M, azida sódica 0.1% en Tris Maleato 20 mM pH 7.0. El paso siguiente fue a partir de este complejo inmunoabsorber la preparación de MS. Para este fin, el complejo se mezcló con una preparación de MS (alrededor de 2 mg de proteínas), se incubó 48 horas a 4 $^{\circ}$ C con agitación y luego se centrifugó a 250 g por 10 min con el fin de separar el complejo de las membranas no absorbidas. Se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante (membranas no absorbidas).

## 2.- Unión de AcMo a gel Sepharosa-4B activado por CNBr .

El procedimiento para acoplar el AcMo al gel de Sepharosa (Pharmacia 1979) fue el siguiente: 1g de gel se lavó en un filtro de vidrio Buchner (30 ml) con una solución HCl 1mM (200 ml) por 15min. Luego el gel se mezcló en un tubo de ensayo con 10 mg de 2/34.4 disuelto en 5 ml de solución NaHCO<sub>3</sub> 100 mM- NaCl 150 mM pH 8.2 (solución A) y se incubó dos horas a temperatura ambiente y 14 hrs a 4  $^{\circ}$ C con agitación. Posteriormente se lavó con 200 ml de la solución A en filtro Buchner y

cualquier grupo reactivo remanente fue bloqueado con etanolamina 1 M pH 8.0 por 2 horas. Se usaron tres ciclos de lavados para sacar la proteína no acoplada, cada ciclo consistió en un lavado a pH 4.0 en solución acetato de sodio 1M-NaCl 1M, seguido de un lavado a pH 8.0 en solución Borato 0.1 M- NaCl 1M. Por último se guardó el complejo AcMo-Sepharosa en solución Sacarosa 300 mM-Azida sódica 0.05%-Tris Maleato 20 mM pH 7.0 a 4 °C.

El siguiente paso fue inmunoabsorber la preparación de MS. Con este fin el complejo AcMo-Sepharosa se mezcló con preparaciones de MS de alrededor de 1.5 mg y se incubó dos horas en hielo con agitación manual cada 15 min. Se centrifugó a 250 x g por 2 min y se extrajo el sobrenadante. Nuevamente se agregó la solución amortiguadora con Sacarosa 0.3 M- Tris Maleato 20 mM pH 7.8 y se centrifugó a 250 x g por 2 min, el sobrenadante obtenido se juntó con el anterior. Con el fin de concentrar las membranas se centrifugó el sobrenadante a 100.000 x g por 1 hora y luego se resuspendió en el mismo solución anterior y se determinó la concentración de proteínas.

Se usaron los siguientes criterios para analizar las fracciones de membranas no absorbidas:

- a) Reactividad con AcMo-mediante ELISA
- b) Comparación de las bandas de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS10%.

#### Inmunofluorescencia:

- 1.- Disección, fijación y seccionamiento de músculo

esquelético.

Se disectaron fibras musculares, de 2 a 3 mm de diámetro de músculo esquelético de rana adulta (*C. caudivertens*) e inmediatamente se amarraron a palitos y se estiraron a aproximadamente 120% de su longitud en reposo. Las miofibrillas se fijaron según Jorgensen y col.(1979) con algunas modificaciones.

Con el fin de obtener soluciones de paraformaldehído al 2% y al 1%(p/v), se preparó una solución concentrada al 4% para lo cual se agregó un gramo de paraformaldehído a 25 ml de agua destilada a 70 °C (en campana), se esperó que llegue a 65°C y se agregó 3 gotas de NaOH 1N con lo cual la solución se aclaró. Los cortes de tejido se sumergieron de 30 a 45 min en solución Krebs-Henseleit (NaCl 145 mM, KCl 2.6 mM, CaCl<sub>2</sub> 4.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Glucosa 10 mM). Luego se incubaron las miofibrillas en una solución de paraformaldehído 2% en PBS pH 7.2 conteniendo CaCl<sub>2</sub> 4.5 mM por 2 horas., seguido de una incubación en una solución de paraformaldehído 1%- glutaraldehído 0.25% en PBS pH 7.2 conteniendo CaCl<sub>2</sub> 4.5 mM por 3 horas. Se lavaron las miofibrillas en una solución de PBS pH 7.2 con CaCl<sub>2</sub> 4.5 mM por 30 min y luego se sumergieron en una solución de lisina, HCl 80 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5 durante 16 horas con el fin de bloquear los sitios reactivos remanentes. Finalmente las miofibrillas se guardaron a 4 °C en una solución de sacarosa 600 mM en PBS pH 7.2-CaCl<sub>2</sub> 4.5 mM. La congelación del tejido se realizó según método descrito por Molinè y Gleener (1964). Las fibras musculares (en sacarosa 600 mM) se cubrieron con una fina capa de

almidón (para electroforesis) y se sumergieron directamente en  $N_2$  líquido ( $-170^\circ C$ ) por, a lo menos, un minuto. Aunque Moline y Gleener se refieren a polvo de talco químico como el más efectivo en la preservación de la morfología del tejido, no encontramos diferencias significativas entre la congelación en  $N_2$  líquido directo ocupando almidón y el método más comúnmente utilizado del isopentano (Jorgensen y col., 1979), mirando la morfología por microscopía óptica. En cambio, la congelación en  $N_2$  líquido del tejido no recubierto con polvo de almidón presentó alteraciones apreciables en la morfología. Se ocupó el método de congelación del tejido recubierto en polvo de almidón por dos motivos: primero, por la dificultad en disponer del isopentano y segundo, por ser un método más fácil, seguro y rápido.

Secciones longitudinales de 6 a 8  $\mu m$  se cortaron en crióstato (Lipshaw electric cryotome cryostat, Lipshaw Manufacturing Co., Detroit, Mich.) a  $-20^\circ C$  y posteriormente se fijaron en etanol al 70% por 5 min. a  $4^\circ C$ .

## 2.- Inmunofluorescencia indirecta.

Esta técnica se basa en la determinación del complejo antígeno-anticuerpo *in situ*, mediante un segundo anticuerpo unido a una molécula fluorescente (Fluoresceína o Rodamina). El segundo anticuerpo usado en esta tesis fue suero preparado en cabra, antinmunoglobulinas de ratón, unido a fluoresceína (Sigma). Previo a su dilución, este se centrifugó a  $100.000 \times g$  durante 30 min con el fin de eliminar agregados.

Las secciones de cortes de tejido de músculo recogidas en

cubreobjetos se incubaron 30 min a temperatura ambiente con suero normal de cabra (0.1mg/ml), para prevenir la unión inespecífica. Se lavó cinco veces en PBS y luego se incubó con el primer anticuerpo diluido en PBS pH 7.1 por 1 hr. a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS, las secciones se incubaron con el segundo anticuerpo diluido 1/100 en PBS, en oscuridad por una hora a temperatura ambiente. Se lavó en PBS y se tñieron las secciones con Azul de Evans 0.5% por 5 min con el fin de eliminar el fenómeno de autofluorescencia. Posteriormente las secciones se montaron en portaobjetos en PBS 10% Glicerol. Las observaciones y fotografías se realizaron en un microscópio Zeiss en excitación Azul, Filtro BP450-490, FTS10, LP520.

#### Otros métodos

a) Determinación de la viabilidad por exclusión con azul de Trypan.

El número o porcentaje de células viables puede ser determinado tñiendo una población celular con azul de Trypan. Las células vivas excluyen el colorante, mientras que las células muertas lo incorporan permitiendo una distinción visual entre células vivas y células muertas. El azul de Trypan se preparó a una concentración de 0.2% (p/v) en solución PBS pH 7.2. Las células se mezclaron con la solución de azul de Trypan en razones de 1/2 y 1/10 según la concentración de las poblaciones celulares estimada por observaciones al microscopio invertido. Posteriormente las células en azul de Trypan se colocaron en un hemocitómetro y se contó el número de células viables (no tñidas) y las células no viables (tñidas) en un número de células totales no

inferior a 200.

b) Determinación de la actividad de  $Mg^{2+}$  ATPasa.

Este método permite determinar la tasa de hidrólisis de ATP, midiendo la cantidad de fosfato liberado en el tiempo. La reacción se llevó a cabo a 25°C en una solución que contenía KCl 100 mM-  $MgCl_2$  6 mM- EGTA 1 mM- Histidina 30 mM ajustado a pH 7.2 con Tris base. La reacción se comenzó al agregar de las preparaciones de membranas, a concentraciones de 20-50  $\mu$ g de proteína por ml, y se detuvo a diferentes tiempos agregando 0.25 ml SDS 10% a 0.5 ml de solución de reacción. El fosfato inorgánico liberado se determinó por colorimetría según el método de Fiske y Subarow (1925).



## RESULTADOS

### Preparación de Anticuerpos Monoclonales. Identificación del origen y pureza de las fracciones de membranas.

a) Elección de los ratones para las fusiones. Selección de hibridomas.

Se obtuvieron los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra antígenos de membrana usando una fracción de membrana enriquecida en túbulos-T como inmunógeno.

La elección de los ratones BALB/C, inmunizados con túbulos-T para ser ocupados en la fusión, se realizó analizando el suero inmune por ELISA contra las distintas preparaciones de membranas (túbulo-T, MS y RS). Se seleccionaron dos ratones, de un total de cuatro, con los títulos más altos anti-túbulo-T (fig 5, titulación antisuero de ratón, fusión #2). De los otros dos, uno no presentó diferencia respecto al suero control (preinmune) y el otro presentó un título anti-túbulo-T bajo.

En la Tabla I se observa que de 375 hibridomas analizados contra las diferentes preparaciones de membranas, túbulo-T, MS y RS por ELISA, alrededor de cuarenta hibridomas mostraron una reacción positiva con estas membranas. Treinta presentaban una reactividad preferencial con el túbulo-T y diez una reactividad preferencial por MS aunque con actividades bajas (medidas como la D.O. a 492 nm en 10 min). No se encontró ningún hibridoma que reaccionara solamente con las MS. Finalmente sólo siete híbridos productores de anticuerpos anti-túbulo-T se seleccionaron para su posterior clonación por dilución límite, 5 de los

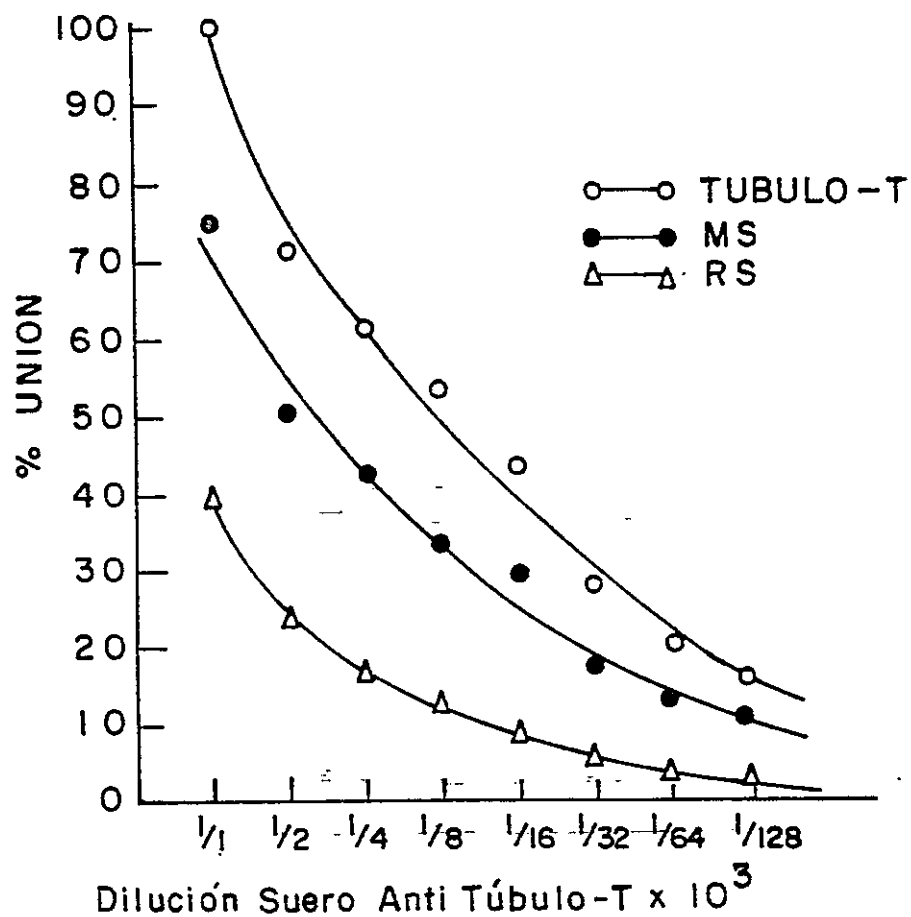


Figura 5. Caracterización de un suero de ratón (fusión #2) anti-túbulo-T. Los ELISA se llevaron a cabo sensibilizando placas de poliestireno con 100 ng/pozo de túbulo-T (○), MS (●), RS (△) aislado de músculo estriado de rana. Las diluciones del antisuero son como se expresa en la abscisa. La reactividad inmunológica (D.O. a 490 nm/10 min) se expresó en términos de % de unión antígeno-anticuerpo, es decir, el 100% corresponde a la D.O. más alta observada. En todos los casos se restaron los valores de los controles respectivos. Las curvas se dibujaron a mano alzada.

TABLA I

Resultado del análisis de las fusiones.

	Fusión 1	Fusión 2	Total
Total de híbridos analizados vs. túbulo-T, MS y RS.	101	274	375
Híbridos positivos anti-túbulo-T	9	31	40
Híbridos seleccionados	2	5	7

El análisis de los hibridomas se realizó por ELISA según se describe en métodos experimentales. Se seleccionaron como positivos aquellos híbridos que presentaban una D.O. (a 490 nm/10 min), con túbulos-T, entre 1 y 5 (15 híbridos con alta reactividad) y entre 0.1 y 1.0 (15 híbridos con baja reactividad). Además, se seleccionaron hibridomas con reactividades más bajas, entre 0.06 y 0.1 pero que mostraban unión preferencial con MS (N=10).

cuales presentaban una reactividad anti túbulo-T alta y los otros dos eran de reactividad preferencial anti-MS (con valores bajos en D.O. en 10 min). Estos últimos (1/13.2 y 1/16.2, tabla II) no mostraron actividad luego de ser clonados posiblemente debido a la baja actividad que presentaban.

La Tabla III muestra el isotipo, el tipo de cadena liviana y el título de algunos de los anticuerpos ocupando túbulo-T como antígeno. AcMo 2/34.4 es del tipo IgG<sub>1</sub>, inmunoglobulina predominante en la respuesta inmune secundaria y cuyo peso molecular descrito es de alrededor de 150 KDa (Eisen, 1980). Los anticuerpos 2/25.2, 2/27.1 y 1/12.3 corresponden a inmunoglobulinas del tipo M, predominantes en la respuesta inmune primaria con un peso molecular descrito de 900 KDa (Eisen, 1980).

b) Reactividad de los AcMos con las distintas fracciones de membranas. Pureza de las preparaciones de membrana.

El título (correspondiente a una dilución de AcMo determinada) de los anticuerpos, definido como la concentración de AcMo necesaria para obtener un 50% de la unión máxima, se determinó, a partir de curvas de titulación usando como antígeno 1.000 ng de túbulo-T/pozo. Este valor permite formarse una idea de la afinidad de los anticuerpos por su antígeno. El AcMo 2/34.4 presentó un título de alrededor de 35 ng/pozo (correspondiente a una dilución del líquido ascítico de  $1/3,7 \times 10^4$ ), que es aproximadamente 6 veces menor que el valor que presentó 2/27.1 y 20 veces menor que 2/25.2 (Tabla III, fig 6).

La reactividad de los antisueros con las membranas está dada

TABLA II

Unión relativa de algunos anticuerpos representativos con varias fracciones de membrana de músculo de rana determinada por ELISA.

Nº CLON	INMUNIZADO CON	REACTIVIDAD CON		
		túbulo-T	MS	RS
2/34.4	Túbulo-T	1.0	0.34	0.23
4/2 A7 <sup>1</sup>	Túbulo-T	1.0	0.23	0.08
2/27.1	Túbulo-T	1.0	0.77	0.25
2/25.2	Túbulo-T	1.0	0.72	0.26
2/12.3	Túbulo-T	1.0	0.70	0.20
1/16.2 <sup>2</sup>	Túbulo-T	1.0	3.6	1.70
1/13.2 <sup>2</sup>	Túbulo-T	1.0	3.0	2.0

La reactividad anti-antígenos de membranas se determinó a partir de los sobrenadantes celulares de los híbridos (antes de ser clonados) según métodos experimentales. Todos los valores de reactividad se expresaron en relación al que presenta la preparación de túbulo-T, al cual se le asignó un valor de 1.0

1. Línea celular que se perdió antes de poder clonarse.
2. No presentaron reactividad luego de ser clonados.

TABLA III

Determinación del isotipo, cadena liviana y título anti-túbulo-T de las inmunoglobulinas de los anticuerpos monoclonales mediante ELISA.

Hibridomas	Isotipos	C.Livianas	Título anti-túbulo-T <sup>1</sup> ng/pozo
2/34.4	IgG1	k	35
2/27.1	IgM	k	220
2/25.2	IgM	k	680
2/21.2	N.D.	N.D.	N.D.
2/12.3	IgM	k	N.D.

1. El título anti-túbulo-T está expresado como la concentración de AcMo necesaria para obtener el 50% de la unión máxima en placas de poliestireno previamente sensibilizadas con 1000 ng/pozo de túbulo-T aislado de músculo esquelético de rana.

N.D. No determinado.

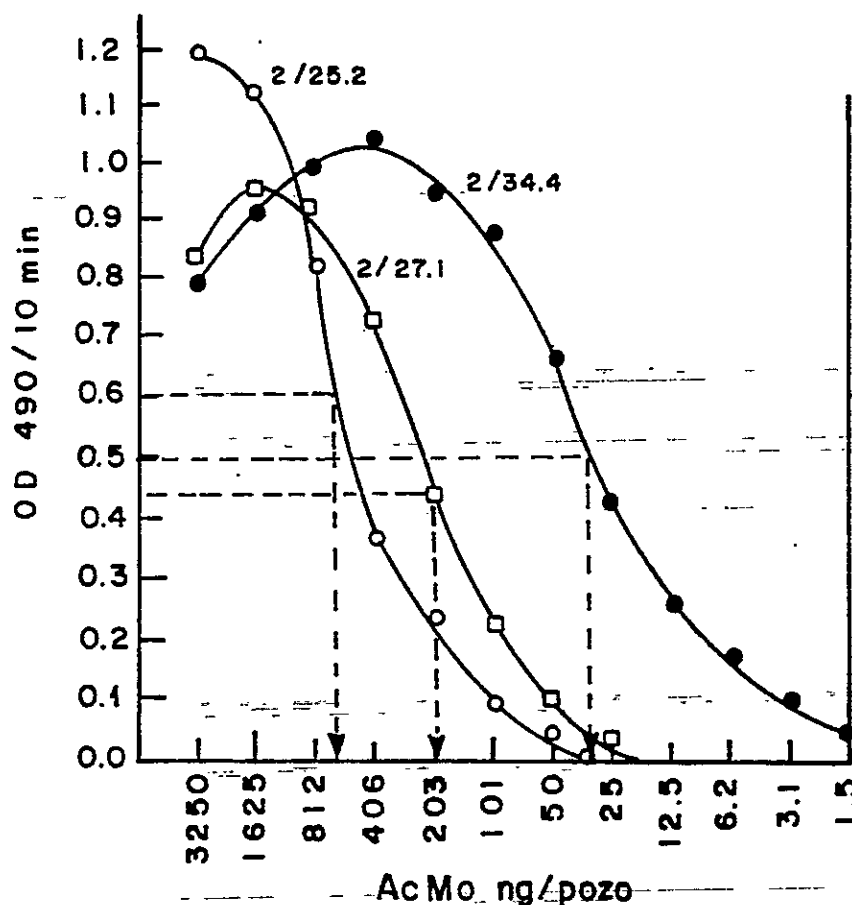


Figura 6. Titulación de AcMos 2/34.4, 2/25.2 y 2/27.1 por ELISA. Los ELISA se llevaron a cabo sensibilizando placas de poliestireno con 1000 ng de túbulos-T aislados de músculo esquelético de rana. Las concentraciones de los AcMos (parcialmente purificados) son como se expresa en la abcisa, 2/34.4 (●), 2/25.2 (○) y 2/27.1 (□). La reactividad se expresó en terminos de D.O. a 490 nm/10 min (ordenada). El título anti-túbulo-T se definió como la concentración de AcMo con la que se obtiene el 50 % de la unión máxima. En todos los casos se restaron los valores de los controles respectivos. La D.O. a 490 nm representa valores extrapolados a un tiempo de 10 min. Los valores medidos experimentalmente no fueron superiores a 0,8.

por poblaciones heterogéneas de anticuerpos (respuesta policlonal), por otro lado la reactividad de los AcMos corresponde a un solo anticuerpo. Este fenómeno explicaría que el antisuero ( fusión #2 ) (fig 5) presente una reactividad cruzada mayor que los AcMo 2/25.2 y 2/34.4 ( provenientes de la fusión de esplenocitos del ratón #2 (fig 7) ) con preparación de MS y RS. En el antisuero existirían anticuerpos que reconocen epítopes comunes a todas las membranas.

En fig 7 se puede observar que AcMos 2/34.4 y 2/25.2 en ELISA presentan una afinidad relativamente mayor por las membranas de túbulo-T, la reacción cruzada con MS y RS que presentan 2/34.4 y 2/25.2 es semejante. Al medir la reactividad de tres preparaciones diferentes de membranas (túbulo-T, MS y RS) con el AcMo 2/34.4, se puede establecer un limite superior aproximado de la reactividad cruzada que es de hasta un 5 % para RS y de un 25 % para MS. Estos valores se estimaron a partir de la relación porcentual de las concentraciones de preparaciones de RS y MS con la concentración de la preparación de túbulo-T a un mismo porcentaje de unión determinado ( con preparaciones de RS y MS no se obtenían valores de un 50%) a partir de los gráficos de % de unión vs concentración de antígeno de membrana. Cabe hacer notar que las curvas no son paralelas por lo que se obtienen valores de reactividad cruzada diferentes según el % de unión que se fije, es por ello que sólo se establecieron límites superiores.

### c) Composición de proteínas

Preparaciones de túbulo-T y MS en geles de poliacrilamida en SDS 10% presentaron una composición de proteínas compleja (fig 8a).



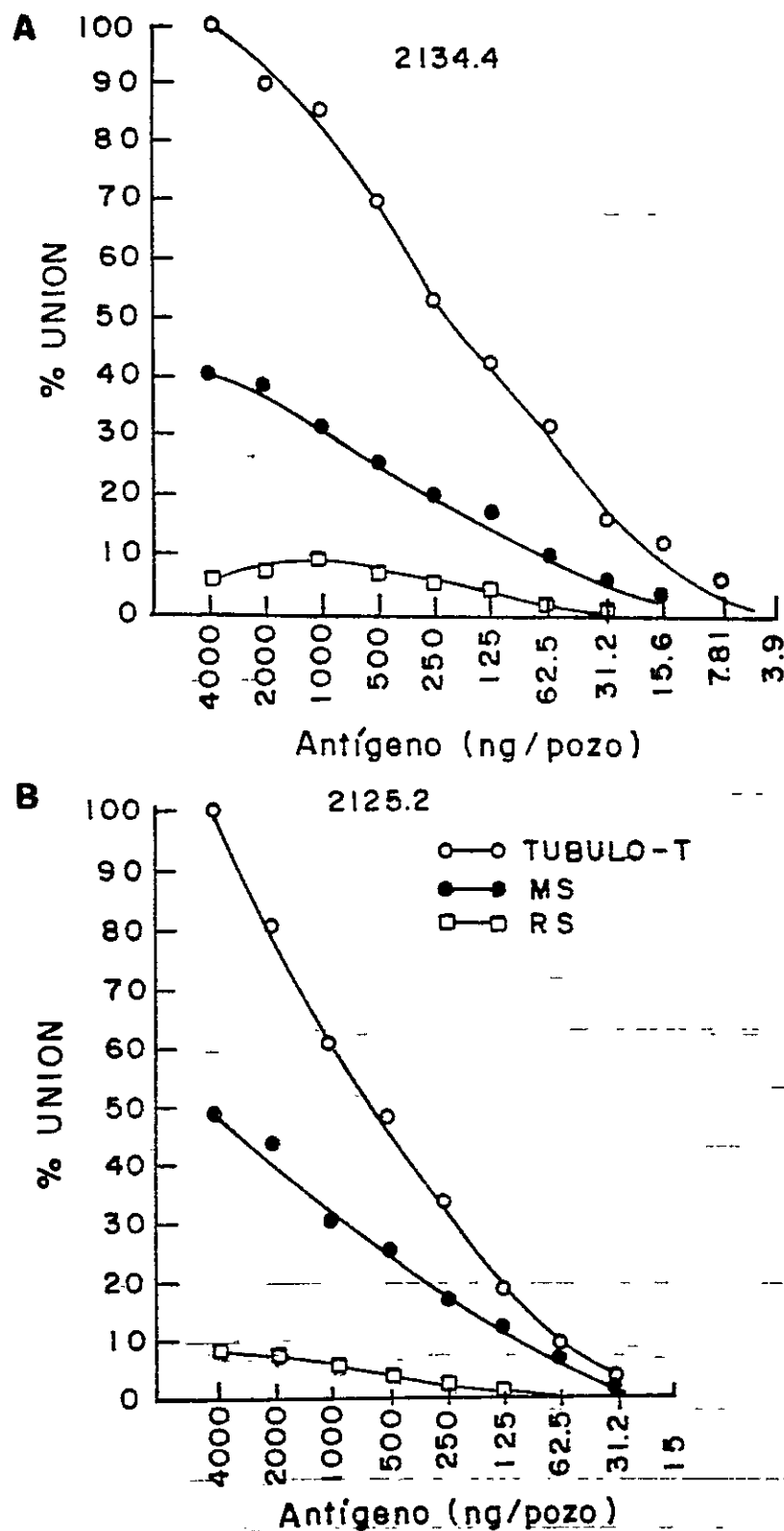


Figura 7. Reactividad de los AcMos 2/34.4 y 2/25.2 contra las distintas fracciones de membranas analizadas por ELISA. Los ELISA se llevaron a cabo sensibilizando placas de poliestireno con túbulo-T (○), MS (●) y RS (□), aislado de músculo esquelético de rana, a concentraciones decrecientes como se expresa en la abscisa de la figura. La reactividad en D.O. a 490 nm/ 10 min se expresó en términos de % de unión, es decir, el 100% corresponde a la D.O. más alta observada (ordenada). A) Dilución de ActMo 2/34.4 de 1/5000, B) dilución de ActMo 2/25.2 de 1/1000.

Aunque ambas preparaciones de membrana tienen una serie de bandas comunes los patrones electroforéticos exhiben algunas diferencias apreciables. La preparación de MS presentó dos bandas de proteínas intensas una de 200 KDa y una de 45 KDa, que aparecieron con menor intensidad en la preparación de túbulo-T. Esta última, por otro lado, tiene una banda de 54 KDa que no apareció en MS. El RS liviano, presentó un menor número de bandas y una banda intensa característica de peso molecular 100 KDa que corresponde a la enzima  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa.

#### Identificación de los componentes específicos de membrana reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

La especificidad del AcMo 2/34.4 (así como de los AcMos 2/25.2, 2/27.1 y 2/12.3) se examinó estudiando su unión a las proteínas presentes en las diferentes fracciones de membrana, túbulo-T, MS y RS. Las proteínas de cada una de estas fracciones se separaron en geles de poliacrilamida y las fracciones de túbulo-T y RS se transfirieron a papel de nitrocelulosa antes de ser expuestos a cada AcMo o a líquido ascítico producido por células NS0/2 como control. La Fig 8b muestra que el AcMo 2/34.4 se une a dos bandas de proteína en preparaciones de túbulo-T, una de peso molecular 107 KDa y la otra menos intensa de 90 KDa (ver figura 9 para la estimación de pesos moleculares). Por otra parte ninguna banda de proteína presente en RS reaccionó con este AcMo.

En experimentos controles con NS0/2 y con las proteínas estándares de P.M. expuestos a el AcMo 2/34.4, no aparece ninguna banda positiva en inmunoblot. En otro control, se efectuaron inmunoblots de

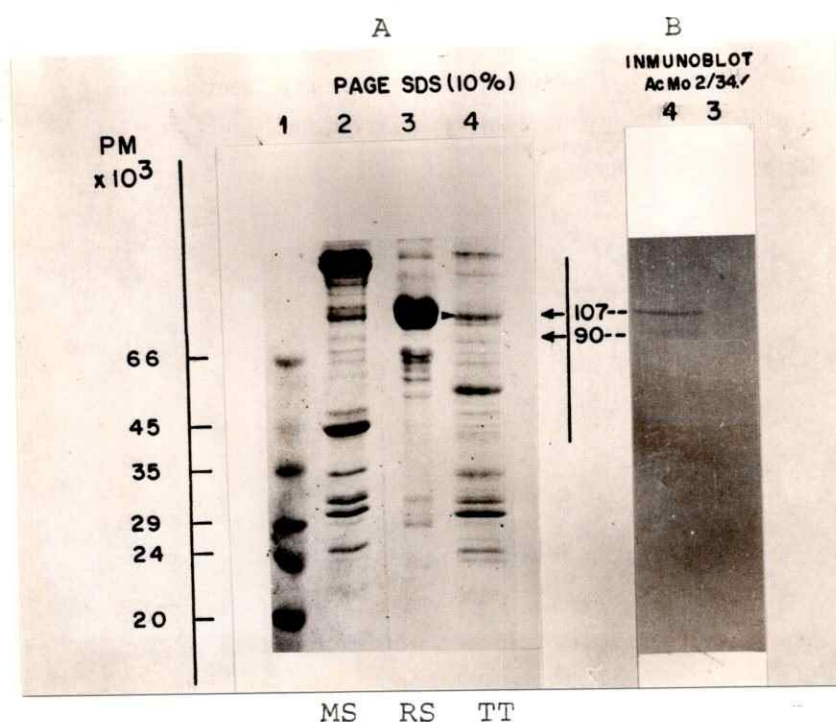


Figura 8. Separación de proteínas de membrana en geles de poliacrilamida-SDS 10% y localización de 2/34.4 en Inmunoblot. Las proteínas de membrana se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % y se tiñeron con Azul de Coomasie (A); o fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (B) donde se analizó la especificidad del AcMo 2/34.4. (ver métodos experimentales) Carril 1, proteínas estándar; carril 2, 40  $\mu$ g de MS; carril 3, 40  $\mu$ g de RS; carril 4, 40  $\mu$ g de túbulo-T. Todas las preparaciones fueron aisladas de músculo esquelético de rana. Los inmunoblot 3 y 4 corresponden a carriles 3 y 4 del gel de poliacrilamida SDS 10%.

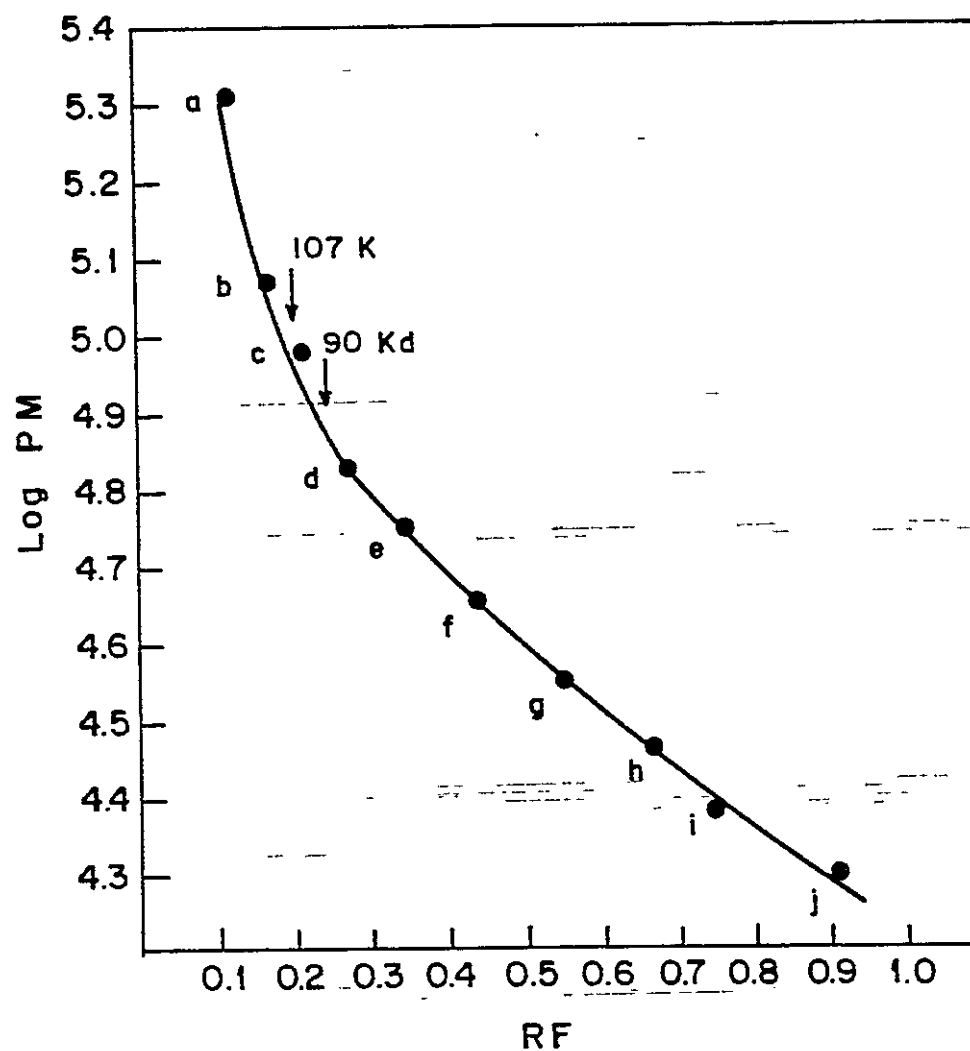


Figura 9. Estimación de los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por 2/34.4 en PAGE-SDS 10%. Los pesos moleculares se estimaron de la curva de calibración construida con los siguientes patrones: a) Miosina (205 KDa), b) B-galactosidasa (116 KDa), c) Fosforilasa B (97.4 KDa), d) Seroalbúmina (66 KDa), e) Ovoalbúmina (45 KDa), f) Gliceraldehído-3P-deshidrogenasa (36 KDa), g) Anhidrasa carbónica (29 KDa), h) Tripsinógeno (24 KDa), i) Inhibidor de Tripsina (20.1 KDa), j) Lactoalbúmina (14.2 KDa).

proteínas presentes en el suero de rana (resultados no mostrados). Estos muestran que 2/34.4 reconoce en el suero una proteína que comigra con la proteína de 90 KDa reconocida en la preparación de membrana de túbulo-T. De este resultado surge la posibilidad, el 2/34.4 tiene reacción cruzada con una proteína del suero de peso molecular de 90 KDa y que es aislada en conjunto con las vesículas de membrana. Hay pruebas que indican que proteínas del suero pueden quedar atrapadas en vesículas de túbulo-T durante el proceso de aislamiento (Roseblatt y col., 1981).

Cabe destacar que los AcMo 2/27.1 y 2/25.2 se unen, en transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa, a las mismas proteínas que 2/34.4 aunque se obtienen bandas significativamente más débiles (resultados no mostrados).

#### Localización *in situ* de los antígenos reconocidos por varios

##### AcMo.

La posición de los túbulos-T es a nivel de la línea Z en músculo esquelético de anfibios (Eckerd y Randolph, 1983). Esto permite determinar, a nivel de la resolución del microscopio óptico, si la distribución de los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos es compatible con la localización de los túbulos-T.

Se trataron las secciones longitudinales de músculo esquelético de rana, de 6  $\mu$ m, con los AcMo 2/34.4, 2/27.1, 2/25.2 y NS0/2 como control. En general la distribución de estos tres anticuerpos fue similar, siendo la intensidad de fluorescencia mayor con 2/34.4. La fluorescencia debido a 2/34.4 se encuentra en dos regiones de la célula

muscular: a) Patrones de fluorescencia débil en la banda I rica en túbulo-T (fig 10a) b) Patrones de fluorescencia fuerte asociada a la entrada de la banda I en la MS (fig 10b) y a nivel del sarcolema (fig 10c). Por otro lado, no se observa una fluorescencia significativa a nivel de la banda A rica en retículo sarcoplásmico.

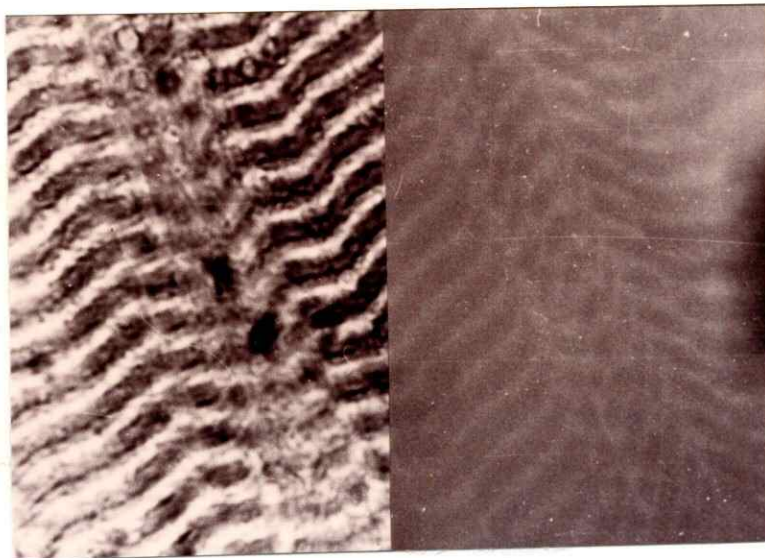
#### Efecto de varios AcMo sobre la actividad de la $Mg^{2+}$ ATPasa de túbulo-T.

El peso molecular de la proteína de membrana reconocida en Inmunoblot por los AcMo 2/34.4, 2/25.2 y 2/27.1, es similar al descrito para  $Mg^{2+}$ ATPasa de músculo esquelético de pollo y conejo (ver fig 8) (Okamoto y col., 1985; Hidalgo y col., 1983). Este hecho nos sugirió la posibilidad de que la molécula blanco reconocida por estos AcMo fuera la enzima  $Mg^{2+}$ ATPasa presente en la membrana de los túbulos-T. Con el fin de investigar esta posibilidad se determinó el efecto de estos anticuerpos sobre la actividad enzimática de la  $Mg^{2+}$ ATPasa. Al igual que la enzima en músculo de rata (Beeler y col., 1983; Beeler y col., 1985) y a diferencia de la de músculo de conejo (Hidalgo y col., 1983) y de pollo (Moulton y col., 1986), la  $Mg^{2+}$ ATPasa de músculo de rana presenta una cinética temporal particular (Hidalgo y col., 1986). La cantidad de Pi liberado aumenta de manera lineal por un período de tiempo corto, "fase rápida", después del cual la tasa de liberación de Pi decrece de manera significativa en el tiempo, "fase lenta" (Hidalgo y col., 1986).

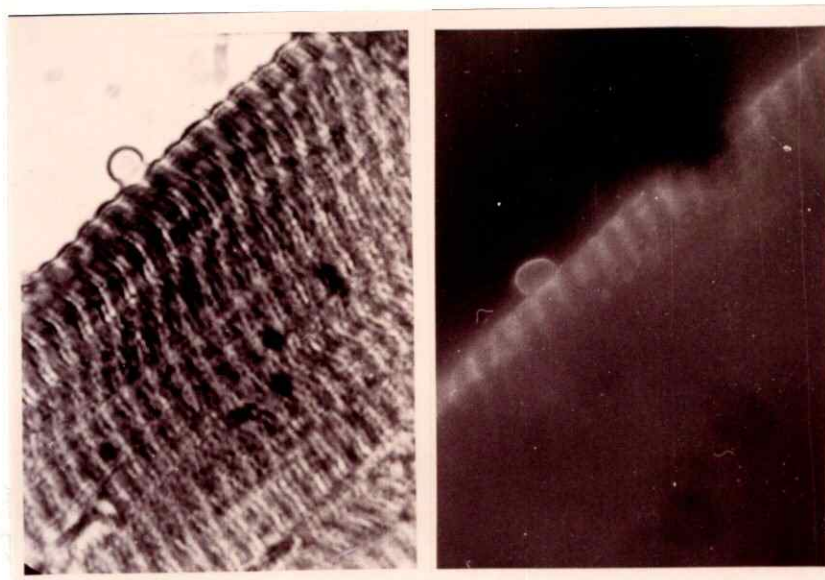
En la tabla IV se observa que al preincubar estos AcMo con una fracción de túbulo-T por 30 min a 25 °C, sólo el AcMo 2/34.4 indujo un

Figura 10. Patrones de tinción inmunohistoquímica del ActMo 2/344. Las secciones se tiñeron con antisuero de cabra antiinmunoglobulinas de ratón unido a fluoresceína-isotiocianato. A) Microfotografía compuesta de imágenes de contraste de fase y fluorescencia de secciones de músculo esquelético de rana obtenidas en crióstato (6µm). Microfotografías de regiones idénticas en la sección del tejido se cortaron por la mitad, y mitades adyacentes se montaron en concordancia. La imagen de la derecha representa la fluorescencia y la de la izquierda la del contraste de fase. Se observan patrones de fluorescencia asociados a la banda clara I (rica en túbulos-T). B) Microfotografía de cortes de tejido realizado en condiciones similares a A, mostrando el borde de la fibra. En el análisis de los cortes de tejido también fue posible observar una fluorescencia más fuerte asociada a la entrada de la banda I en la MS. C) Esta microfotografía corresponde a una foto en colores donde se observa un fondo rojo dado por la tinción de contraste Azul de Evans y la fluorescencia color amarillo. En la foto de la derecha es posible observar una fluorescencia fuerte a nivel del sarcolema, la foto de la izquierda corresponde a un experimento control con líquido ascítico NSD/2 a la misma dilución del anticuerpo (1/500).

A



B



C

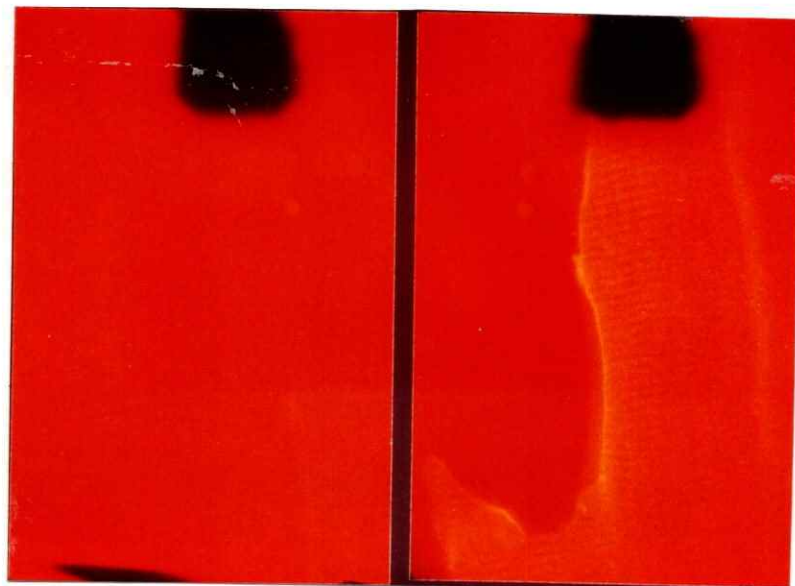




TABLA IV

Efecto de los distintos anticuerpos sobre la actividad  $Mg^{+2}$ ATPasa de túbulo-T de músculo esquelético de rana.

Túbulos-T	AcMo	Actividad $Mg^{+2}$ ATPasa	%estimulación
20 $\mu$ g/ml	-	0.317	0
20 $\mu$ g/ml	2/25.2	0.310	- 8
20 $\mu$ g/ml	2/27.1	0.365	16
20 $\mu$ g/ml	2/12.3	0.355	12
20 $\mu$ g/ml	2/12.2	0.317	0
20 $\mu$ g/ml	2/34.4	0.620	96
0	2/34.4	0.000	-

Las preparaciones de túbulos-T se preincubaron con los AcMos a una concentración de 2  $\mu$ g/ml por 30 min a 25 °C. La reacción enzimática se realizó según el protocolo descrito en los métodos experimentales. La tasa de liberación de Pi, en la fase lenta de la enzima, se expresa en  $\mu$ mol/mg x min.

efecto significativo en la actividad de la enzima, produciendo una estimulación que duplicó la tasa de liberación de Pi en la fase lenta. Por otro lado, 2/34.4 por si solo no presenta actividad de hidrólisis de ATP.

En las figuras 11 y 12 se observa que la magnitud de la estimulación en la actividad de  $Mg^{2+}$ ATPasa de túbulo-T por parte del AcMo 2/34.4 depende de la concentración de éste, llegando a obtenerse hasta cinco veces de estimulación a una relación 1/1 (en gramos) de anticuerpo/proteína. El 50% de la estimulación máxima se obtiene a una relación 0.35/1 de anticuerpo/proteína. En la figura 13 se observa que el AcMo 2/25.2 también produjo una estimulación de la enzima aunque a concentraciones mayores que 2/34.4, lo que concuerda bien con la diferencia en el título obtenido en ELISA.

#### Intentos de preparar una fracción purificada de membrana de superficie.

El valor de hasta un 25 % en la reactividad cruzada que presenta la preparación de MS con el AcMo anti-túbulo-T 2/34.4 concuerda bien con una ubicación preferencial de la  $Mg^{2+}$ ATPasa en el túbulo-T. Por sobre la base de esto, pensamos en un principio, que este anticuerpo podía servir para separar por afinidad las membranas de túbulo-T que contaminan las de MS y así obtener una preparación altamente purificada de MS.

Para este fin, se inmuoabsorbió la preparación de MS, mediante dos protocolos: con 2/34.4 entrelazado con glutaraldehído y con 2/34.4 unido a Sepharose activada por CnBr. La proporción de vesículas

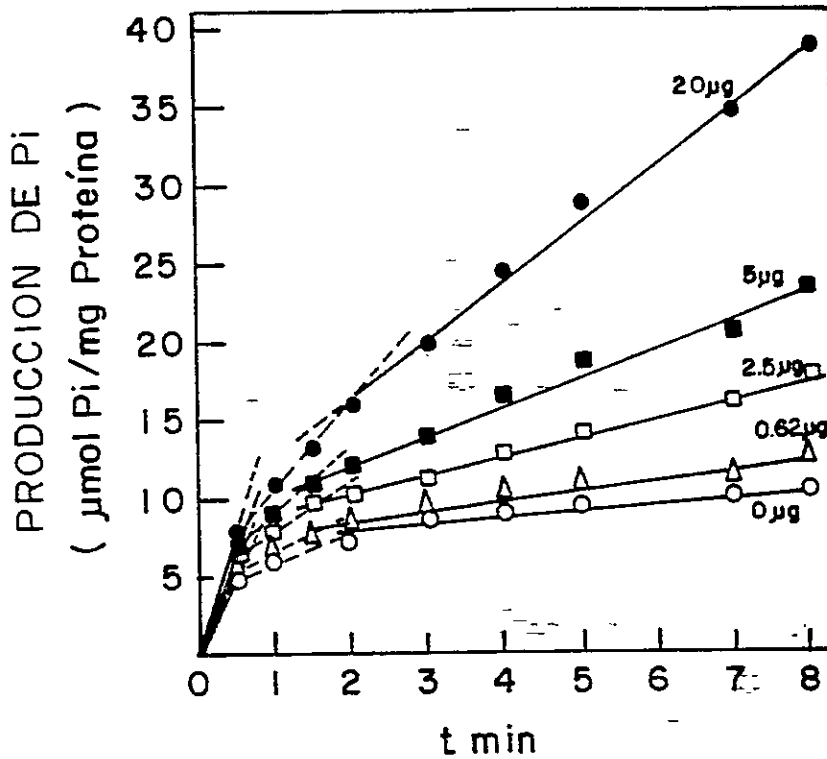


Figura 11. Dependencia de la concentración de 2/34.4 en la producción de Pi de la enzima  $Mg^{+2}ATPasa$  AcMo 2/34.4 se preincubó con túbulos-T aislados de músculo esquelético de rana por 30 min a 25 °C. La producción de Pi, expresada como  $\mu\text{mol}$  de Pi/ mg proteína (ordenada), se determinó según se expresa en métodos experimentales. La concentración de proteína de túbulo-T ocupada en el ensayo fue de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las concentraciones de 2/34.4 fueron: Control (○)  $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 0.62  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (△), 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (□), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (■) y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (●).

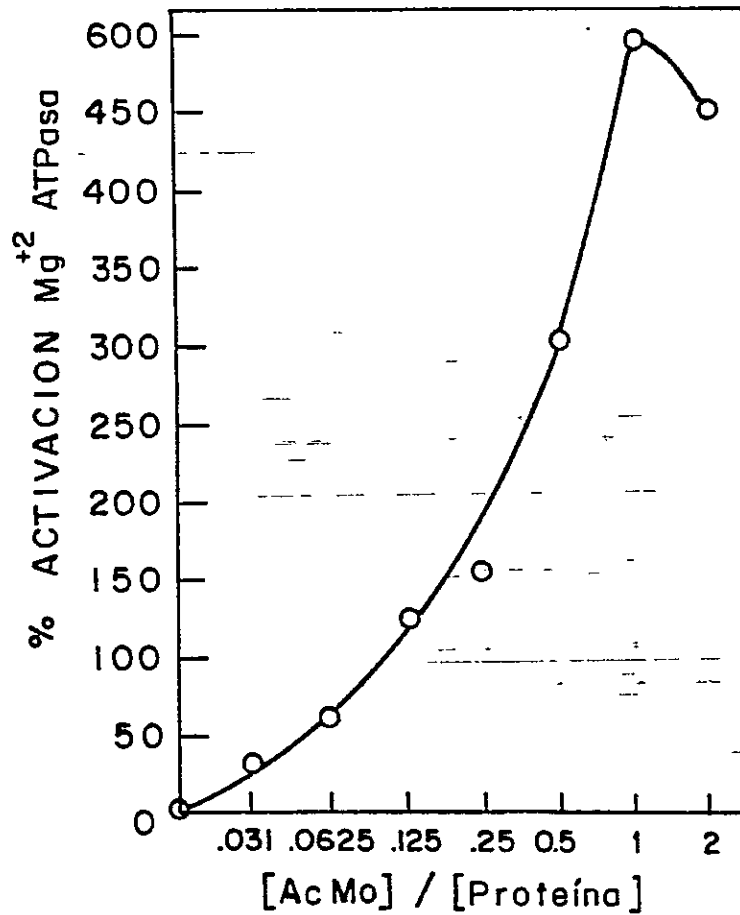


Figura 12. Porcentaje de activación de la enzima  $Mg^{+2}$ -ATPasa en la fase lenta del enzima a concentraciones crecientes de 2/34.4. Los % de activación de la enzima  $Mg^{+2}$ -ATPasa en la fase lenta de la enzima se calcularon a partir del control (0.%) (ordenada). Las concentraciones del AcMo 2/34.4 se expresan en relación AcMo/proteína total en túbulos-T como se indica en la ordenada.

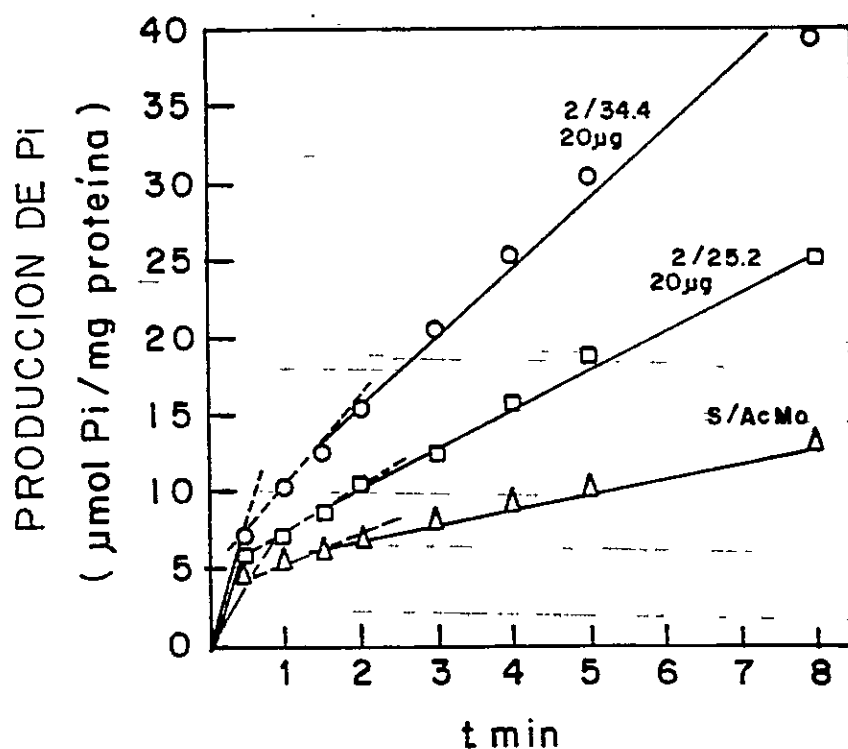


Figura 13. Estimulación de la actividad  $Mg^{+2}ATPasa$  por AcMos 2/25.2 y 2/34.4. AcMos 2/25.2 y 2/34.4 se preincubaron con túbulos-T aislados de músculo esquelético de rana por 30 min a 25 °C. La producción de Pi, expresada como  $\mu\text{mol}$  de Pi/mg proteína (ordenada) se determinó de acuerdo a lo descrito en métodos experimentales. La concentración de proteína ocupada en el ensayo fue de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las concentraciones de anticuerpos fueron: Control ( $\Delta$ ) s/AcMo, 2/25.2 ( $\square$ ) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2/34.4 (O) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

de membranas retenidas en el inmunoabsorbente, determinadas por un método modificado de Lowry (Hartree, 1972), fue de un 30% en el primer caso y de un 60% en el segundo. Las vesículas no retenidas, obtenidas mediante ambos protocolos, presentan en ELISA una reactividad con el AcMo 2/34.4 similar al control (fig 14). Por otro lado los patrones electroforéticos en geles de acrilamida al 10% en SDS, son similares a los de membranas sin tratar (experimentos no mostrados). Estos resultados indican que las vesículas no retenidas no muestran un enriquecimiento en MS con respecto al control. Esto podría deberse a una distribución de la  $Mg^{2+}$ ATPasa tanto en túbulo-T como en MS, aunque posiblemente en concentraciones menores en MS de acuerdo a los resultados de ELISA (fig 7). Otra explicación posible es que el antígeno de 90 KD reconocido por 2/34.4 sea el que está presente en túbulo-T y en MS.

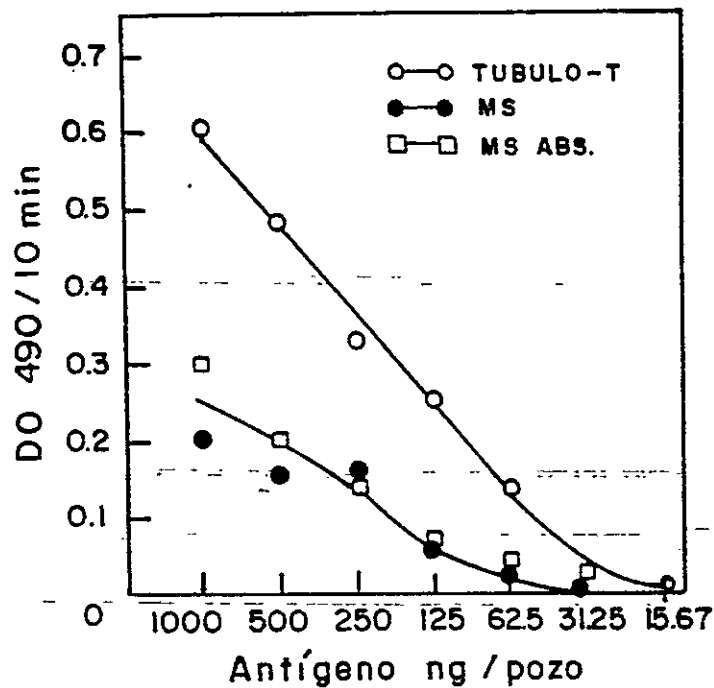


Figura 14. Comparación de la reactividad inmunológica entre vesículas de membranas no retenidas en el complejo inmunoabsorbente AcMo 2/34.4-Sepharose-4B activada por CNBr y preparaciones de MS control analizadas por ELISA. Se absorbieron preparaciones de MS con el complejo inmunoabsorbente según el protocolo descrito en métodos experimentales. Se sensibilizaron placas de poliestireno con túbulos-T (○), MS (●) y vesículas no retenidas (□) aisladas de músculo esquelético de rana a las concentraciones que se indican en la abscisa. AcMo 2/34.4 se usó a una dilución de 1/5000. En todos los casos, se restaron los valores de los controles respectivos. La D.O. a 490 nm representa valores extrapolados a un tiempo de 10 min. Los valores medidos experimentalmente no fueron superiores a 0,8.

## DISCUSION

### Evaluación del origen y pureza de las preparaciones de membranas.

Los resultados obtenidos en esta tesis ocupando técnicas inmunológicas e inmunocitoquímicas con AcMos, apoyan y presentan información adicional sobre los criterios bioquímicos usados por Jaimovich y col. (1986) y por Hidalgo y col. (1986), para estudiar el origen y pureza de las membranas de músculo-esquelético de rana. En base a los análisis por ELISA e Inmunoblot de la unión del AcMo 2/34.4 a las preparaciones de membrana de túbulo-T y RS, se desprende que la preparación de túbulo-T es inmunológicamente diferenciable de la preparación de RS. El análisis inmunohistoquímico por otro lado, apoya la idea que las vesículas de baja densidad obtenidas de la gradiente de sacarosa se originan a partir del sistema de membranas de túbulo-T.

La preparación de RS liviano, no presenta al parecer una contaminación significativa con membrana de túbulo-T ya que: 1) Presenta en ELISA una reactividad inferior a un 5 % con AcMos anti túbulo-T (fig 7), 2) En PAGE-SDS no comparte las proteínas de bajo peso molecular presentes en la preparación de túbulo-T (fig 8a) y 3) No presenta reactividad con el AcMo-2/34.4 al transferir las proteínas al papel de nitrocelulosa (fig 8b).

Por otro lado nuestros resultados concuerdan con los obtenidos estudiando el ligámen de [ $H^3$ ]-nitrendipina y unión de derivados de [ $H^3$ ]-tetrodotoxina (TTX), que indicarían una alta contaminación por



membranas de túbulo-T en la preparación de MS (Jaimovich y col., 1986). Esta conclusión surge de la siguiente serie de pruebas: 1) Los antisueros obtenidos a partir de preparaciones de túbulo-T y de MS son indistinguibles en cuanto a su reactividad inmunológica con estas distintas preparaciones de membranas (fig 15). 2) Las preparaciones de MS y túbulo-T comparten un gran número de bandas de proteínas en PAGE-SDS (Fig 8a). y 3) La preparación de MS presenta una reactividad cruzada de hasta un 25 % de unión con los AcMos anti túbulo-T en ELISA (fig 7). 4) En experimentos de absorción mediante incubaciones sucesivas con preparaciones de MS de un suero anti-túbulo-T preparado en conejo, no se observa un enriquecimiento en anticuerpos anti túbulo-T, sino que una disminución cercana al 100% tanto en la reactividad del antisuero con las preparaciones de túbulo-T como de MS (fig 16). Los resultados presentados en los puntos 1, 2 y 3 podrían también interpretarse de otra manera si se considera que las membranas de túbulo-T y MS pueden compartir una variedad de macromoléculas debido a la continuidad entre estas dos membranas (los túbulos-T provienen de invaginaciones de la MS). Los resultados podrían deberse entonces a una reacción cruzada entre estas dos membranas a causa de antígenos compartidos. Sin embargo el punto 4 mencionado más arriba limita esta interpretación dado que mediante las absorciones el antisuero se debería haber enriquecido en aquellos anticuerpos específicos para el túbulo-T.

Estos resultados ilustran el cuidado que se debe tener al interpretar los datos obtenidos a partir de vesículas de baja densidad por extracción en alta fuerza iónica (método más comunmente usado para el

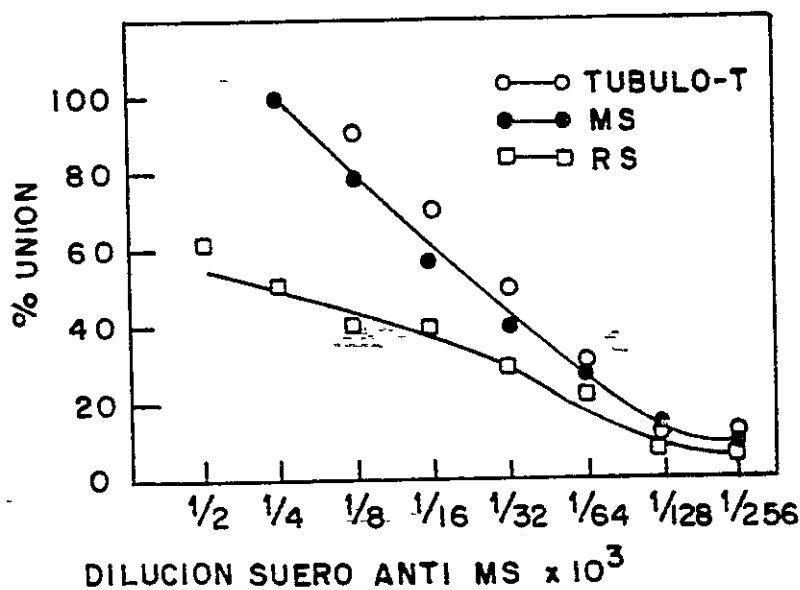


Figura 15. Caracterización de un suero anti-MS por ELISA. Los sueros anti-MS se obtuvieron a partir de la inmunización de ratones BALB/C con preparaciones de MS de músculo de rana, de manera similar a la descrita para las preparaciones de túbulo-T (ver métodos experimentales). Los ELISA se llevaron a cabo sensibilizando placas de poliestireno con 200 ng/pozó de túbulo-T (○), MS (●) y RS (□) de músculo de rana. La dilución del antisuero es como se expresa en la abscisa de la figura. En todos los casos se restaron los valores de los controles respectivos.

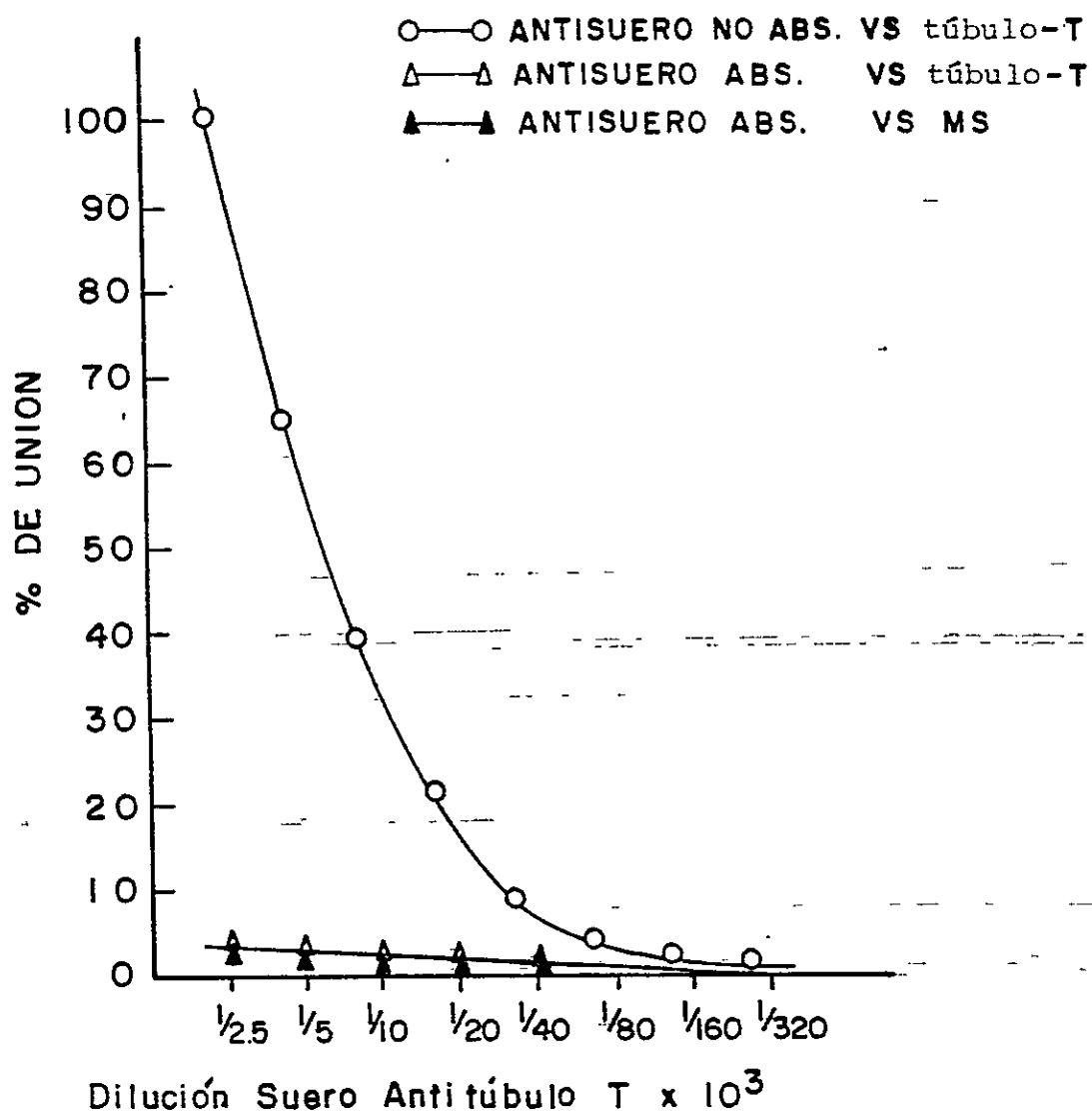


Figura 16. Caracterización de un suero anti-túbulo-T absorbido con una fracción enriquecida de MS de músculo esquelético de rana por ELISA. Suero de conejo anti-túbulo-T (dilución 1/2000) en un volumen de 600  $\mu$ l se absorbió tres veces con 8  $\mu$ g de MS, incubando cada vez 2 h a temperatura ambiente y 24 h a 4 °C. Después de cada incubación se centrifugó a 12.000 x g por 15, recuperándose el sobrenadante. Los ELISA se llevaron a cabo sensibilizando placas de poliestireno con 200 ng/pozo de túbulo-T y MS de músculo esquelético de rana. Las diluciones del antisuero absorbido se expresan en la abscisa. Antisuero control ocupando como antígeno túbulo-T (○), antisuero absorbido ocupando como antígeno túbulo-T (△) y MS (▲).

aislamiento parcial de MS). Jaimovich y col. (1986) y Barchi y col. (1979) llegaron a similares conclusiones. Este último concluye que la fracción de MS obtenida por extracción en LiBr sería una mezcla de MS y túbulo-T.

Otra variable que incide en la interpretación de estos resultados es el método de aislamiento en alta fuerza iónica. Por ejemplo Boegman y col. (1970) observaron que al incubar una fracción de membrana obtenida antes del fraccionamiento en gradiente de sacarosa en alta fuerza iónica se producía una inhibición drástica de la actividad de la enzima  $Mg^{+}ATPasa$ . Esto explicaría la aparente discrepancia entre los resultados que demuestran por un lado una actividad mínima de esta enzima en preparaciones de MS (Roseblatt y col., 1981; Sabadini y Okamoto, 1983) y por el otro una alta contaminación por túbulos-T en esas preparaciones (Jaimovich y col., 1986; Barchi y col., 1979).

Dos factores parecen incidir en la dificultad de obtener una fracción de MS altamente purificada; por un lado la continuidad que presenta con la membrana de túbulo-T y por otro la pequeña fracción que representa del total de membrana del músculo esquelético. Peachey (1965) estimó, que existe alrededor de siete veces más túbulo-T que MS y cinco a seis veces más RS que túbulo-T en el músculo esquelético de rana.

#### Reconocimiento de la $Mg^{+2}ATPasa$ por 2/34.4 y su localización subcelular.

El hecho que el AcMo-2/34.4 reconoce, en experimentos de transferencia a papel de nitrocelulosa, una proteína de peso molecular de 107 KD y que induce una estimulación dramática de la actividad

Mg<sup>2+</sup>ATPasa *in vitro*, es una indicación que el antígeno al que se une 2/34.4 corresponde a la enzima Mg<sup>2+</sup>ATPasa o a una proteína relacionada estrechamente con ésta y del mismo peso molecular. Cabe destacar que sobre la base de la investigación bibliográfica realizada, esta sería la primera demostración de la obtención de AcMos anti-Mg<sup>2+</sup>ATPasa. Existen anticuerpos policlonales contra la enzima de músculo esquelético de pollo (Damiani y col., 1987), pero a diferencia de los obtenidos en esta tesis, estos tendrían un efecto inhibitorio sobre la enzima.

Los AcMos contra la proteína de 107 KDa de túbulo-T (Mg<sup>2+</sup>ATPasa) no presentan reactividad cruzada con una proteína de 100 KDa presente en RS (Ca<sup>2+</sup>ATPasa). Así mismo los anticuerpos policlonales anti-Mg<sup>2+</sup>ATPasa de músculo de pollo no presentan reactividad cruzada con la Ca<sup>2+</sup>ATPasa de RS (Damiani y col., 1987).

#### Localización subcelular de la enzima.

Nuestros resultados señalan que los patrones de unión del AcMo 2/34.4 en cortes de tejido de músculo esquelético corresponden a una fluorescencia variable en la banda I (rica en túbulo-T, fig 10a), siendo más fuerte en la entrada del túbulo-T en la MS decayendo hacia el interior de la fibra (fig 10b) y una fluorescencia fuerte a nivel de la MS (fig 10c), sin aparecer en la banda A (rica en RS). En el análisis de los cortes de tejido se observa que la fluorescencia no es constante, existiendo regiones de la fibra sin fluorescencia. La fluorescencia débil que se observa a nivel de la banda I y las áreas sin fluorescencia pueden explicarse por la incidencia de dos factores: 1) Dependiendo del nivel y el

ángulo del corte de la cuchilla en el crióstato, este puede dejar expuesta la membrana del túbulo-T o la unión del anticuerpo. 2) Puede existir un problema de acceso del anticuerpo a la  $Mg^{+2}$ ATPasa, si 2/34.4 se uniera al lado de la enzima que da hacia el citoplasma, sólo en cierto tipo de cortes puede quedar la enzima expuesta al anticuerpo.

Resultados que apoyan una interpretación de este tipo provienen de los estudios de Barchi y col. (1977), donde en experimentos de unión con ConA *in situ* en músculo esquelético de rata se encontró una fluorescencia predominante en el sarcolema y una unión débil y variable en el túbulo-T y membrana nuclear, no observándose unión a nivel de RS o mitocondrias.

En resumen, estos resultados concuerdan con una ubicación de la  $Mg^{+2}$ ATPasa a nivel del túbulo-T y su ausencia en la membrana del RS. Con respecto a su localización en la MS se hace difícil la interpretación debido al hecho de que *in situ* la MS es sólo una parte del sarcolema existiendo una compleja red de proteínas sobre esta membrana (membrana basal), el anticuerpo podría estar reaccionando con algunas de estas proteínas que contengan los mismos epítopes que la  $Mg^{+2}$ ATPasa.

Respecto a la presencia o ausencia de la enzima en la MS existen pruebas contradictorias. En primer lugar la diferencia en la actividad de hidrólisis de ATP por la  $Mg^{+2}$ ATPasa de preparaciones de túbulo-T y MS no parece consistir en un parámetro acertado para descartar una ubicación de la  $Mg^{+2}$ ATPasa a nivel de la membrana de superficie, como se discutió anteriormente. Malouf y Meissner (1979) mediante técnicas citoquímicas enzimáticas de microscopía electrónica,

encuentran la actividad de hidrólisis del ATP de la  $Mg^{+2}$ ATPasa en músculo esquelético de pollo asociada a la membrana de túbulo-T y MS. Sin embargo, Damiani y col. (1987) en estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos anti- $Mg^{+2}$ ATPasa de músculo de pollo, observan una unión preferencial a nivel del túbulo-T sin observarse tinción a nivel de la MS.

Los resultados de inmunoabsorción de preparaciones de MS con el AcMo 2/34.4, donde no se observa una purificación de la MS, pueden explicarse con una ubicación de la  $Mg^{+2}$ ATPasa a nivel de la MS, pero también con un reconocimiento del antígeno de 90-KD presente en la MS que tiene reacción cruzada con este anticuerpo (fig 8b). Por otro lado 2/34.4 presenta sólo un 25 % de reactividad con las preparaciones de MS lo cual está de acuerdo con los niveles de contaminación de túbulo-T para estas preparaciones (Jaimovich y col., 1986). El conjunto de estos resultados no permite afirmar la presencia de la  $Mg^{+2}$ ATPasa a nivel de la MS, pero tampoco descartarla.

Cabe destacar el cuidado que se debe tener con respecto a la extrapolación de la ubicación subcelular de la enzima en estudios de una especie a otra debido a que pueden existir diferencias especie-específicas en la localización subcelular. Sería necesario hacer un estudio citoquímico enzimático de la localización de la  $Mg^{+2}$ ATPasa en músculo de rana.

#### Modulación de la $Mg^{+2}$ ATPasa por 2/34.4 y extrapolación *in vivo*

Los anticuerpos pueden tener una serie de efectos en las actividades de las proteínas a las cuales se unen: Pueden no afectar su

actividad, inhibirlas o activarlas, dependiendo del sitio al cual se unen en la estructura terciaria de la proteína. Respecto a este último efecto, aunque menos frecuente que los dos anteriores, existen una serie de casos descritos en la literatura donde AcMos estimulan la actividad de proteínas, imitando parcial o totalmente la acción de agonistas específicos. Entre estos podemos mencionar AcMos que inducen un aumento del calcio intracelular en erizo de mar (Trimmer y col., 1986), activación del sistema que genera inositol-(1,4,5)-trifosfato en una célula tumoral "Natural Killer" de rata (Seaman y col., 1987), la activación del transporté de glucosa pero no de la actividad quinasa del receptor de insulina humano (Forsayeth y col., 1987) y la activación del canal de calcio sensible a dihidropiridinas de la membrana del túbulo-T ya mencionado en la introducción (Malouf y col., 1987).

En esta tesis se aisló un anticuerpo 2/34.4, que activa en forma dramática la actividad de la  $Mg^{+2}$ ATPasa (107 KD) (tabla V). Esta activación es similar a la descrita para ConA, que estimula la actividad de  $Mg^{+2}$ ATPasa en una serie de tejidos (tabla V). Jarrett y Smith (1974) encuentran que ConA e insulina estimulan la actividad de  $Mg^{+2}$ ATPasa en membrana plasmática de adipocitos de rata. Pommier y col. (1975) por otro lado observan la estimulación temprana de la  $Mg^{+2}$ ATPasa y la  $Na^{+}/K^{+}$ ATPasa en células intactas y preparaciones de membrana en linfocitos de ratón. Estos autores sugieren un posible rol de la  $Mg^{+2}$ ATPasa en la estimulación de linfocitos.

Resulta interesante el hecho de que Beyer y col. (1980) hayan aislado una serie de lectinas endógenas de función desconocida a partir



TABLA V

CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA Mg<sup>+2</sup> ATPasa EN DIFERENTES ESPECIES Y TEJIDOS

Mg <sup>+2</sup> ATPasa tejido	PM (Kda)	Actividad uM Pi/mg/min.	Cinética temporal	Activación		[Agonista]/[Prot.-T-I] para Act.Max.	% Activ. máxima	Sitio unión del agonista	Localización sub-celular
				Lectina	Anticuerpo				
Musc. Estriado de:									
Pollo (Moulton y col., 1986)	102	2,65	Lineal	Si	-	1,5 <sup>1</sup>	600	-	Túbulo-T
Conejo (Hidalgo y col., 1983)	107	3,4	Lineal	No	No	-	-	-	Tubulo-T
Rata (Beeler y col., 1983)	-	5-25 <sup>1</sup>	Bifásica	Si	Si	-	-	+	Tubulo-T
Rana <sup>2</sup>	107 <sup>3</sup>	3,8 <sup>1,2</sup>	Bifásica <sup>2</sup>	Si <sup>4</sup>	Si <sup>3</sup>	1 <sup>3</sup>	500	Intracel <sup>3</sup>	Tubulo-T <sup>3</sup>
Linfocitos de rata (Novogrodsky y col., 1972)	-	0,06	-	Si	-	-	92	Extracel.	Membrana plasmática
Linfocitos B de ratón (Pamier y col., 1975)	-	0,121	-	Si	-	-	24,8	Extracel.	Membrana plasmática
Adipocitos de rata (Jaett y Smith, 1974)	-	0,8-1,0	Lineal	Si	-	-	-	-	Membrana plasmática
Hepatocitos de rata (Jordan y col., 1977)	-	-	-	Si	-	1	100	-	Membrana plasmática

1.- A partir de la fase rápida de la enzima  
 2.- Datos de Hidalgo y col, (1986).  
 3.- Datos de esta tesis  
 4.- Resultados no publicados de Hidalgo y col.

de músculo esquelético e hígado de pollo, dos tejidos que muestran una estimulación considerable de la  $Mg^{+2}ATPasa$  por ConA (tabla V). Sobre la base de esto, Moulton y col. (1986) proponen un posible rol de lectinas endógenas en la regulación de la  $Mg^{+2}ATPasa$  *in vivo*. La orientación con el lado citoplasmático hacia afuera de las vesículas de túbulo-T de músculo esquelético de rana (Hidalgo y col., 1986) en conjunto con la alta estimulación de la enzima que se observa con 2/34.4 sugieren una posible unión del ActMo por el lado citoplasmático de la enzima, lo que estaría en concordancia con la hipótesis de Moulton.

Con respecto al mecanismo molecular involucrado en la estimulación de la enzima, se discutirán a continuación los modelos propuestos, las pruebas que existen para apoyarlos y los aportes de esta tesis en este sentido.

Beeler y col. (1983), observan una inactivación de la enzima dependiente de ATP en músculo esquelético de rata. Las lectinas, el glutaraldehído y los anticuerpos contra vesículas de baja densidad impiden esta inactivación. Por otro lado los detergentes y las altas temperaturas la aumentan. Sobre la base de estos resultados, Beeler propone un modelo en el cual la especie activa de la enzima estaría en forma de complejo multimérico en el plano de la membrana y que la disociación de éste, promovida por ATP y detergentes, llevaría a la inactivación de la enzima con el tiempo. Las lectinas y los anticuerpos impedirían la disociación del complejo al entrelazar la enzima y los detergentes la favorecerían al aumentar la movilidad de la enzima en la membrana. Aunque este modelo presenta un alto valor explicativo,

algunos resultados recientes en la literatura y los obtenidos en esta tesis tienden a descartar un mecanismo de este tipo. Damiani y col. (1987) observaron en la enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa de túbulo-T de pollo (que es activada por Lectinas) una inhibición de la actividad enzimática por anticuerpos policlonales específicos para  $Mg^{+2}$ ATPasa. Por otro lado en esta tesis se observó que AcMos, agentes entrecruzantes mucho menos eficientes que los anticuerpos policlonales (Yelton y Scharff, 1981), inducen una activación dramática de la actividad de la enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa de túbulo-T de rana (también activada por Lectinas). Además, el hecho de que IgM (un pentámero) sea sobre 750-veces más eficiente en causar hemaglutinación que IgG (un dímero) (William, 1984), implica que la molécula de IgM debería ser más eficiente en entrecruzar el antígeno. Sin embargo esta diferencia no se observa en la activación de la enzima por los AcMos 2/34.4 (una IgG-4) y 2/25.2 (una IgM) (fig 13). Otra prueba en contra de esta hipótesis proviene de los resultados de Hidalgo y col. (1986) en donde encuentran que la actividad  $Mg^{+2}$ ATPasa es afectada de manera diferente por varios detergentes (algunos inhibiéndola y otros activándola), todos los cuales presumiblemente aumentan la movilidad de la enzima en la membrana.

Moulton y col. (1986) no encuentran una inactivación dependiente de ATP de la  $Mg^{+2}$ ATPasa de túbulos-T de músculo esquelético de pollo en ausencia de lectinas. Sin embargo, ConA es capaz de estimular sustancialmente la actividad de la  $Mg^{+2}$ ATPasa. Este efecto es específico para  $Mg^{+2}$ ATPasa, ya que ConA no estimula la actividad de la enzima  $Ca^{+2}$ ATPasa del RS ni la actividad de la enzima  $Na^{+}/K^{+}$ ATPasa.

Moulton y col. postulan un mecanismo en el cual la enzima poseería un sitio catalítico y un sitio regulador en el mismo polipéptido. Se propone que ConA interferiría en la interacción del ATP con un sitio regulador o que bloquea la comunicación entre un sitio regulador y el sitio catalítico. Parte de las pruebas para este modelo proviene del hecho de que ConA no estimula la actividad de  $Mg^{+2}$ ATPasa si ATP se encuentra presente antes de la adición de ConA y no se necesita la hidrólisis del nucleótido.

En analogía con el modelo de Moulton y col. resulta atractivo postular que el AcMo 2/34.4 se une a un sitio en la  $Mg^{+2}$ ATPasa, regulador y conformacionalmente activo. En este sentido resulta interesante destacar que AcMo 2/34.4 (activante) se genera a partir de la enzima nativa presente en la fracción de membrana de los túbulos-T. En cambio los anticuerpos policlonales anti- $Mg^{+2}$ ATPasa de pollo (inhibitorios) (Damiani y col., 1987) se obtuvieron a partir de la enzima aislada de proteínas denaturadas en SDS a partir de geles de poliacrilamida. Es posible que en las condiciones de desenrollamiento de las proteínas después del tratamiento con SDS la molécula pueda perder sitios conformacionalmente activos.

Por otro lado, en ELISA no encontramos que la unión de 2/34.4 a túbulo-T se viera afectada por la preincubación de las membranas con ConA a concentraciones de hasta 5  $\mu$ g/pozo (resultados no mostrados). Estos resultados sugerirían que el AcMo 2/34.4 se uniría a la enzima en un sitio diferente de ConA y que la estimularía por un mecanismo distinto al del mitógeno. Sin embargo se necesitan experimentos adicionales antes de interpretar estos resultados.

Con respecto al posible rol fisiológico de esta enzima, Beeler y col. (1985) han propuesto a la  $Mg^{+2}$ ATPasa como una ectoenzima cuya función sería la de hidrolizar ATP extracelular. Sin embargo, por un lado los resultados de Malouf y Meissner (1979) sobre la localización de la enzima  $Mg^{+2}$ ATPasa de músculo de pollo *in situ*, por técnicas enzimáticas, indican una orientación del sitio de hidrólisis de ATP hacia el lado intracelular y por otro, los resultados de Hidalgo y col. (1986) con respecto a la orientación de las vesículas de túbulo-T tienden a descartar esta hipótesis, al menos en la célula muscular. Damiani y col. (1986) por otro lado presentan pruebas preliminares respecto a la actividad de  $H^{+}$ /ATPasa de la enzima, las cuales que no han sido confirmadas mas allá.

Resumiendo, aunque el rol fisiológico de esta enzima en el músculo permanece aún oscuro, el hecho de que la  $Mg^{+2}$ ATPasa corresponda a una proteína mayoritaria del túbulo-T y presente una alta actividad ATPásica *in vitro* es una fuerte indicación de que esta enzima estaría jugando un rol importante en la fisiología del músculo. Creo que los trabajos en esta enzima van a ser cada vez mas numerosos y permitirán ir dilucidando esta incógnita. En este sentido los AcMos aislados en esta tesis, en especial el 2/34.4, ofrecen enormes posibilidades como sondas moleculares en el estudio de esta enzima.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvieron AcMos que interactúan con la membrana de túbulo-T aislada.
- 2.- La unión de los AcMos a preparaciones de membrana de músculo de rana es compatible con una baja contaminación de vesículas de túbulo-T en la preparación de RS y una contaminación significativa de vesículas de túbulo-T en la preparación de MS.
- 3.- El análisis inmunohistoquímico confirma la unión de 2/34.4 a nivel del túbulo-T y su ausencia en la membrana de RS.
- 4.- Uno de estos AcMos, 2/34.4 reconoce en inmunoblot a una proteína de peso molecular 107 KDa que corresponde a la  $Mg^{+2}$ ATPasa.
- 5.- 2/34.4 anti- $Mg^{+2}$ ATPasa 107 KDa no presenta reactividad cruzada con la proteína de 100 KDa que corresponde a la enzima  $Ca^{+2}$ ATPasa de RS, tanto en ELISA como en Inmunoblot.
- 6.- La unión de 2/34.4 a la  $Mg^{+2}$ ATPasa aumenta la actividad de esta enzima de la misma manera que lo hacen algunas lectinas.

7.- Considerando que los AcMos no son buenos agentes de entrecruzamiento, la activación de la enzima ocurriría por una unión directa del AcMo a ella y no por entrecruzamiento de la enzima en el plano de la membrana.

## GLOSARIO

Ayuvante : Sustancia que estimula de manera inespecífica la respuesta inmune generada por un antígeno.

Ayuvante completo de Freund : Mezcla de aceite mineral y un emulsificador, que contiene micobacterias muertas. -- --

Anticuerpo : Molécula producida por los linfocitos B en la respuesta inmune y que reconocen los antígenos combinandose de manera específica. - - - - -

Antígeno : Molécula que induce la formación de anticuerpos.

Clon : Familia de células u organismos con una constitución genética idéntica.

Epítoto : Región del antígeno que se combina con el sitio de unión del anticuerpo.

Hibridomas : Línea celular generada "in vitro" a partir de la fusión de dos tipos celulares diferentes.

Inmunógeno : Sinónimo de antígeno.

Isotipo : Variación genética dentro de una familia de proteínas que permite separarlas en clases. Ejemplo : Clase de inmunoglobulinas.



Monoclonal : Derivado de un solo clon.

Mieloma : Linfoma producido a partir de células de línea B.

Policlonal : Término que se refiere a los productos originados a partir de un número de células de diferente tipo.

Reacción cruzada : Reactividad de un anticuerpo con antígenos diferentes al que indujo la inmunización.

## REFERENCIAS

Affinity chromatography. Principles and methods. Catalogo Pharmacia fine chemicals 1979, pg 24-27.

Andrew, C. and Appel, S. 1973. Macromolecular characterization of muscle membranes. Proteins and sialic acid of normal and denervated muscle J. Biol. Chem. 248: 5156-5163.

Barchi, L., Bonilla, E. y Wong, M. 1977. Isolation and characterization of muscle membranes using surface-specific labels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 34-38.

Barchi, R.L., Weigele, J.B., Chalikian, D.M. y Murphy, L.E. 1979. Muscle surface membranes preparation methods affect apparent chemical properties and neurotoxin binding. Biochim. Biophys. Acta 550: 59-76.

Bastian, J. y Nakajima, S. 1974. Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle. J. Gen. Physiol. 63: 257-278.

Beeler, T.J., Gable, K.S. y Keffer, J.M. 1983. Characterization of the membranes bound  $Mg^{+2}$ ATPase of rat skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 734: 221-234.

Beeler, T.J., Wang, T., Gable, K. y Lee, S. 1985. Comparison of the rat

microsomal  $Mg^{+2}$ ATPase of various tissues. Arch. Biochem. Biophys. 243: 644-654.

Beyer, E.C., Zweig, S.E., Barondes, S.H. 1980. Two lactose binding lectins from chicken tissues. J. Biol. Chem. 255: 4236-4239.

Campbell, K. P., Franzini-Armstrong, C. y Shamoo, A. E. 1980. Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the "sarcoplasmic reticulum feet" associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 602: 97-116.

Damiani, E., Dahms, A.S., Moulton, M.P. y Sabadini, R.A. 1986. Identification of a skeletal muscle transverse tubular  $H^{+}$  Pump. Fed. Proc. 45: 1942.

Damiani, E., Margreth, A., Furlan, A., Dahms, A.S., Arnn, J. y Sabadini, R.A. 1987. Common structural domains in the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{+2}$ ATPase and the transverse tubule  $Mg^{+2}$ ATPase. J. Cell Biol. 104: 461-472.

Eckerd y Randolph. 1983. Animal Physiology cap 5: 361. Editores W. H. Freeman and Co., San Francisco. USA.

Eisen, H.N. 1980. Immunology : an introduction to molecular and cellular principles of the immune responses. Harper & Row Publishers, pg 342-350.

Eisenberg y Hill, T.L. -1985. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. Science 227: 999-1006.

Fiske, C.H. y Sabbarow, Y. 1925. A colorimetric method for determination of orthophosphate. J. Biol. Chem. 66: 375-400.

Forsayeth, J.R., Caro, J.F., Sinha, M.K., Maddux, B.A. y Goldfine, I.D. 1987. Monoclonal antibodies to the human insulin receptor that activate glucose transport but not insulin receptor kinase activity.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 3446-3451.

Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E. y Lazdunski, M. 1983. [<sup>3</sup>H] Nitrendipine receptors in skeletal muscle. Properties and preferential localization in transverse tubules. J. Biol. Chem. 258: 6086-6091.

Hamlyn, J. y Senior, A.E. 1983. Evidence that Mg<sup>+2</sup>-or Ca<sup>+2</sup>-activated adenosine triphosphatase in rat pancreas is a plasma-membrane ecto-enzyme. Biochem. J. 214: 59-68.

Hartree, E.F. 1972. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: 422-427.

Hibrydoma techniques, EMBQ, SKMB course. 1980. Basel, Coldsmi Harbor, New York 11724.

Hidalgo, C. 1986. Isolation of muscle membranes containing functional ionic channels. En " Ionic channels in cells and model systems (Latorre, R.), ed., Plenum Press, New York.

Hidalgo, C., Gonzalez, M.E. y Lagos, R. 1983. Characterization of the  $\text{Ca}^{+2}$  or  $\text{Mg}^{+2}$  ATPase of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. 258: 13937-13945.

Hidalgo, C., Parra, C., Riquelme, G. y Jaimovich, E. 1986. Transverse tubules from frog skeletal muscle. Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation. Biochim. Biophys. Acta 855: 79-88.

Ikemoto, N., Antoniu, B., Kim, D.H. 1984. Rapid calcium release from the isolated sarcoplasmic reticulum is triggered via the attached transverse tubular system. J. Biol. Chem. 259: 13151-13158.

Jaimovich, E., Donoso, P., Liberona, J.L. y Hidalgo, C. 1986. Ion pathways in transverse tubules. Quantification of receptors in membranes isolated from frog and rabbit skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 855: 89-98.

Jarett, L. y Smith, R.M. 1974. The stimulation of adipocyte plasma membrane magnesium ion-stimulated adenosine triphosphatase by insulin and concanavalin A. J. Biol. Chem. 249: 5195-5199.

Jorgensen, A.D., Kalnins, V., y MacLennan, D.H. 1979. Localization of

sarcoplasmic reticulum proteins in rat skeletal muscle by immunofluorescence. *J. Cell Biol.* 80: 373-384.

Jorgensen, A.O., Kalnins, V.I., Zubrzycka, E., MacLennan, D.H. 1977. Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *J. Cell Biol.* 74: 287-298.

Jorgensen, A.O. y McGuffe, L.J. 1987. Immunoelectron microscopic localization of sarcoplasmic reticulum proteins in cryofixed, freeze-dried, and low-temperature-embedded tissue. *J. Histochem Cytochem.* 35(7): 723-735.

Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495-97.

Kono, T. y Colowick, S.P. 1961. Isolation of skeletal muscle cell membranes and some of its properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 520-533.

Kyte, J. 1961. Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport. *Nature* 292: 201-204.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage. *Nature (Lond.)* 227: 680-685.

Lau, H., Caswell, A.H. y Brunschwig, .1977. Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 5565-5574.

MacLennan, D.H., Brand, C.J., Korczak, B., Green, N.M. 1985. Amino acid sequence of  $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$  dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature (Lond.)* 316: 696-700.

Malouf, N.N., Coronado, R., McMahon, D., Meissner, G. y Gillespie, G.Y. 1987. Monoclonal antibody specific for the transverse tubular membrane of skeletal muscle activates the dihydropyridine-sensitive  $\text{Ca}^{+2}$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5019-5023.

Malouf, N.N. y Meissner, G. 1979. Localization of an  $\text{Mg}^{+2}$  or  $\text{Ca}^{+2}$  activated ("basic") ATPase in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 122: 233-250.

Malouf, N.N., Taylor, S., Gillespie, G.Y., Bynum, J.M., Wilson, P.E. y Meissner, G. 1986. Monoclonal antibody specific for the T-tubule of the skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 347-355.

Martonosi, A.N. 1984. Mechanism of  $\text{Ca}^{+2}$  release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 64: 1240-1320.

Meissner, G. 1975. Isolation and characterization of two types of

sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 389: 51-68.

Mickelson, J.R. y Louis, C.F. 1985. Components of purified sarcolemma from porcine skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 112-126.

Moline, S.W. y Gleener, G.G. 1964. Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 777-783.

Moulton, M.P., Sabaddini, R.A., Norton, K.C. y Dahms, A.S. 1986. Studies on the transverse tubule membrane MgATPase. Lectin induced alterations of kinetic behavior. *J. Biol. Chem.* 261: 12244-12251.

Novogrodsky .1972. Concanavalin A stimulation of rat lymphocyte ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 266: 343-349.

Okamoto, V.R., Moulton, M.P., Runte, E.M., Kent, C.D., Lebherz, G.H., Dahms, A.S. y Sabaddini, R.A. 1985. Characterization of transverse tubule membrane proteins: Tentative identification of the  $Mg^{+2}$ ATPase. *Arch. Biochim. Biophys.* 237: 43-54.

Peachey, L.D. 1965. The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* 25: 204-231.

Pommier, G., Ripert, G., Azoulay E. y Depieds, R. 1975. Effect of concanavalin A on membrane bound enzyme from mouse lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 389: 483-494.



Riordan, J.R., Slavik, M. y Kartner, N. 1977. Nature of the lectin-induced activation of plasma membrane  $Mg^{+2}$ ATPase. *J. Biol. Chem.* 252: 5449-5455.

Roseblatt, M.S., Antoniu, B., Ikemoto, N. Inmunological analysis of the mechanism of functional coupling of the transverse tubule and sarcoplasmic reticulum membranes. Presentado a publicación a J. B. C.

Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C. e Ikemoto, N. 1981. Inmunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256: 8140-8148.

Rosenthal, S.L., Edelman, P.M., Schwartz, L.L. 1965. Method for the preparation of skeletal muscle sarcolemma. *Biochim. Biophys. Acta.* 109: 512-517.

Sabadini, R.A. y Okamoto, R.V. 1983. The distribution of ATPase activities in purified transverse tubular membranes. *Arch. Biochim. Biophys.* 223: 107-119.

Scale, D. y Sabadini, R.A. 1979. Microsomal T system. A stereological analysis of purified microsomes derived from normal and dystrophic skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 83: 33-46.

Schapiro, G., Doboc, Z.I., Piau, J.P. y Delain, E. 1974. An improved technique for preparation of skeletal muscle cell plasma membrane.

Biochim. Biophys. Acta 345: 348-358.

Seaman, W.E., Eriksson, R.D. y Imboden, J.B. 1987. Inositol triphosphate is generated by a rat natural killer cell tumor in response to target cell or to crosslinked monoclonal antibody OX-34: possible signaling rol for the OX-34 determinant during activation by target cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4239-4243. 5

Seiler, S. y Fleischer, S. 1982. Isolation of plasma membrane vesicles from rabbit skeletal muscle and their use in ion transport studies. J. Biol. Chem. 257: 13862-13871.

Shull, G.E., Schwartz, A. y Lingrel, J.B. 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase deduced from a complementary DNA. Nature (Lond.). 316: 691-695.

Singer, J.L. y Nicholson, G.L. 1972. The fluid mozaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731.

Trimmer, J.S., Schackmann, R.W. y Vacquier, V.D. 1986. Monoclonal antibodies increase intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  in sea urchin spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 9055-9059.

Towbin, H., Stehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4354-4356.

Vernon, T.O. y Herzenberg, L.A. 1980. Inmunoglobuline-producing hybrid cell lines. Selected methods in cellular immunology. Editores, Mishell, B. B. y Shiigi, S.M.; Freeman, W. H. and Co. San Francisco, USA.

William, E. P. Fundamental immunology 1984, Raven Press New York, pg 640.

Yelton, D.E. y Scharff, M.D. 1981. Monoclonal antibodies: A powerfull new tool in biology and medicine. Ann. Rev. Biochem. 50: 657-80.