

CAPÍTULO 1

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Gisela R. Franchini y Betina Córscico

Introducción

Con la finalidad de realizar estudios estructurales y funcionales de una proteína, uno de los pasos fundamentales es obtenerla en forma pura. Luego del proceso de purificación deben llevarse a cabo una serie de procedimientos que permitan controlar el grado de pureza y también realizar una caracterización inicial de dichas proteínas. Entre las técnicas bioquímicas más comúnmente utilizadas y que aportan información complementaria podemos mencionar las siguientes: electroforesis, cromatografía de exclusión molecular, centrifugación analítica y análisis de entrecruzamiento químico, entre otras.

Este capítulo está destinado a que el alumno tenga una primera aproximación a una serie de técnicas que permiten caracterizar y controlar el grado de pureza de una proteína. Si bien esto no pretende ser un manual técnico, se aportarán los fundamentos, los procedimientos básicos y el análisis de la información obtenida a partir de las técnicas que se describen.

1.1. Técnicas Electroforéticas

Es bien sabido que todo átomo o molécula con carga neta migrará al aplicarse un campo eléctrico. Las técnicas electroforéticas permiten la separación de macromoléculas de acuerdo a su masa, a su carga neta o a la relación entre ambas, forzándolas a atravesar por una matriz porosa mediante la aplicación de dicho campo eléctrico.

La electroforesis de macromoléculas es normalmente llevada a cabo mediante la siembra de una muestra en una matriz porosa embebida en una solución buffer que actúa como un tamiz molecular. Bajo la influencia de un voltaje aplicado, diferentes especies de moléculas en la muestra se moverán a través de la matriz a diferentes velocidades separándose unas de otras.

Las proteínas son macromoléculas que presentarán carga neta siempre y cuando se encuentren a un pH distinto de aquel correspondiente a su punto isoeléctrico (pI), siendo este último el pH específico al cual una proteína no presenta carga neta. Cuanto mayor sea el cociente carga/masa más rápido migrará la proteína en el campo eléctrico.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una herramienta muy útil para una gran cantidad de aplicaciones en lo que respecta a la caracterización estructural y/o funcional de una proteína. Esta técnica es simple, eficiente y se requiere de muy poco equipamiento y reactivos. Además, puede utilizarse en escala analítica o preparativa ampliando las posibilidades de su aplicación.

Por las razones mencionadas anteriormente es una de las primeras opciones para llevar a cabo al momento de caracterizar inicialmente una proteína. Es importante destacar que la electroforesis en geles de acrilamida también es útil para la caracterización, separación e identificación de otras macromoléculas.

Entre las aplicaciones destinadas al estudio de proteínas se destacan:

- Determinación de masa molecular
- Estado de agregación
- Estabilidad frente a desnaturalizantes químicos
- Actividad enzimática
- Interacción con otras macromoléculas

Geles de poliacrilamida unidimensionales

Nociones generales

Los geles pueden armarse con forma cilíndrica o como hojas muy delgadas de dimensiones variables. Los primeros se utilizan para isoelectroenfoco (IEF) o con fines preparativos, y los segundos son los más utilizados en el laboratorio para experimentos de rutina. En este apartado daremos principal importancia al uso y armado de los geles chatos.

En la mayoría de los equipos para electroforesis de proteínas que se utilizan en el laboratorio, el gel es montado entre dos cámaras que contienen soluciones buffer de una manera tal que la única conexión eléctrica entre estas cámaras es a través del gel (Figura 1.1A). En estos equipos denominados *verticales*, los geles se arman entre dos placas de vidrio utilizadas como soporte con ambos laterales y el fondo sellados y una separación de aproximadamente 1 mm. De esta manera, queda una cámara muy delgada pero uniforme donde se vuelca la solución para armar geles (Figura 1.1B).

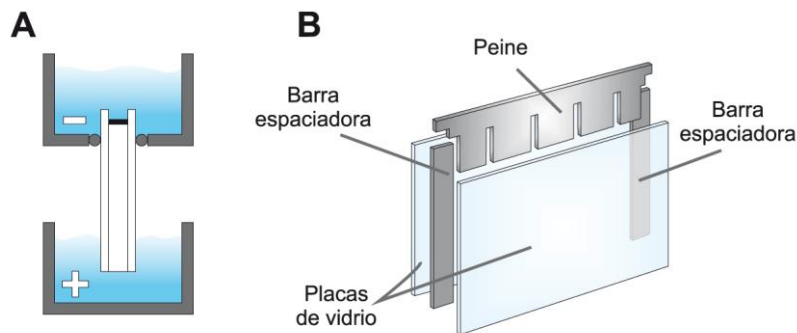


Figura 1.1. A) Corte transversal de un equipo de electroforesis vertical. B) Diagrama del sistema de armado de geles para equipos para electroforesis verticales. Los vidrios deben ser sellados de manera de poder generar una cavidad muy delgada donde volcar la mezcla para geles.

Propiedades de la acrilamida

El material más utilizado para el armado y posterior resolución de mezclas de proteínas es la acrilamida. Su uso en distintas concentraciones forma poros en un rango útil para separar la mayoría de dichas macromoléculas. Dentro de sus propiedades más sobresalientes encontramos que es químicamente inerte, transparente y es estable en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza

iónica. Además se consigue comercialmente de manera muy pura y a un relativo bajo costo. Es importante resaltar que el monómero de acrilamida es un potente toxico para el sistema nervioso central y periférico.

Aunque la acrilamida es una substancia muy nociva, se puede utilizar de manera segura. Todo el manejo, mezclado y manipulación del monómero de acrilamida debe llevarse a cabo dentro de una campana de extracción de gases utilizando guantes de látex. Una vez que el monómero ha polimerizado no es más tóxico, no obstante, como el proceso no es 100% eficaz, siempre habrá contaminación con monómero. Por esta razón, los geles deben ser tratados con la misma precaución que la solución del monómero.

Como con cualquier químico que se utilice en el laboratorio siempre hay que consultar la cartilla de bioseguridad (MSDS, de la sigla en inglés *Material Safety Data Sheet*) antes de usarlo. La acrilamida y los materiales contaminados con la misma deben ser descartados como desechos químicos.

Diseño experimental

Los aspectos más importantes a tener en cuenta al momento de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional por primera vez son los siguientes:

- tamaño de poro efectivo
- sistemas continuos o discontinuos
- condiciones disociantes o no disociantes
- método de detección a utilizar

- Tamaño de poro efectivo

El tamaño de poro efectivo está determinado por dos factores: a) la concentración de acrilamida y b) la concentración del entrecruzador químico,

que usualmente es bisacrilamida. %T y %C es la manera en que se denota la composición de los geles de poliacrilamida, siendo:

% T: concentración total de monómero utilizada para producir el gel (acrilamida + bisacrilamida) en gramos por ml (% p/v).

% C: el porcentaje en peso que representa el agente entrecruzador sobre el total de monómero que ha sido utilizado.

Cuanto mayor es la concentración de acrilamida, menor será el poro efectivo. En cambio, si consideramos el efecto de la bisacrilamida, observamos que existe una concentración máxima hasta la cual veremos una disminución en el tamaño de poro, este valor ha sido calculado alrededor de $C = 5\%$. Cruzado ese umbral, el tamaño de poro comenzará a crecer (Fawcett, 1966).

La concentración de acrilamida en un gel es un factor determinante que puede afectar mucho el resultado de una corrida electroforética. De esta manera si se quiere obtener una buena resolución entre dos proteínas es factible encontrar una concentración óptima para tal fin. Para el caso de una muestra con una mezcla de proteínas, encontrar una concentración óptima de acrilamida es muy difícil por lo cual uno deberá optar por ensayar distintas condiciones hasta encontrar aquella concentración que permita observar a los distintos miembros de la mezcla de la mejor manera posible.

¿Qué estrategia puede utilizar un investigador que va a analizar una mezcla de proteínas por primera vez mediante electroforesis en geles de poliacrilamida? Una posibilidad es hacer una corrida inicial utilizando un gel 7,5 % de acrilamida y en base a este resultado hacer una segunda elección, por ejemplo entre 5 y 15 % de acrilamida. Una segunda opción sería realizar un gel en gradiente de poliacrilamida donde se prepara el gel utilizando un equipo generador de gradientes y por lo tanto la concentración de acrilamida aumenta a medida que se avanza en el gel, disminuyendo el tamaño de poro efectivo (Figura 1.2).

Los geles en gradiente son ampliamente utilizados para la caracterización de mezclas de proteínas ya que amplía el rango de masas moleculares a ser analizadas en un mismo gel. Los límites usuales son 3-30% T en gradientes de tipo lineal dependiendo del tamaño de las proteínas a ser separadas. Una de

las principales ventajas de estos geles en gradiente es que las proteínas están continuamente atravesando áreas del gel con un tamaño de poro menor teniendo esto un efecto concentrador. Si bien estos geles en gradiente son muy útiles, pueden ser poco reproducibles.

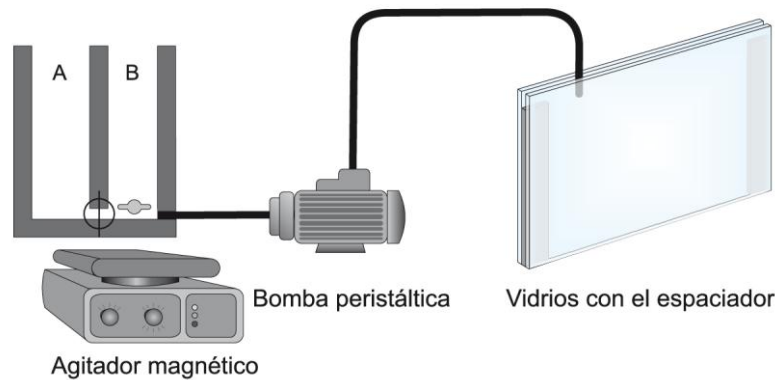


Figura 1.2. Equipo para generar un gradiente en geles de poliacrilamida. A y B se refieren al reservorio y cámara de mezclado donde se encuentra un buzo metálico que gira impulsado por un agitador magnético ubicado por debajo. Las cámaras A y B están conectadas por la parte inferior con una pequeña llave que permite abrir o cerrar. La cámara B está conectada con el equipo para armar geles a través de una bomba peristáltica.

Si, por el contrario, lo que se quiere es encontrar la concentración de acrilamida óptima para la resolución de dos proteínas se deberá tener en cuenta el tamaño y carga de las proteínas en cuestión. Este parámetro se podrá determinar midiendo su movilidad en geles de diferente concentración de acrilamida. Finalmente se construye un diagrama de Ferguson (Ferguson, 1964) donde se grafica el $\log_{10}(R_f)$ en función de la concentración de monómero (% T), siendo R_f el cociente entre la distancia recorrida por la proteína y la distancia recorrida por un colorante o proteína estándar. Construyendo los diagramas de Ferguson el aspecto de la carga de la proteína es eliminado ya que la pendiente K_r (coeficiente de retardo) es una medida únicamente del tamaño molecular (Figura 1.3) (Andrews, 1986).

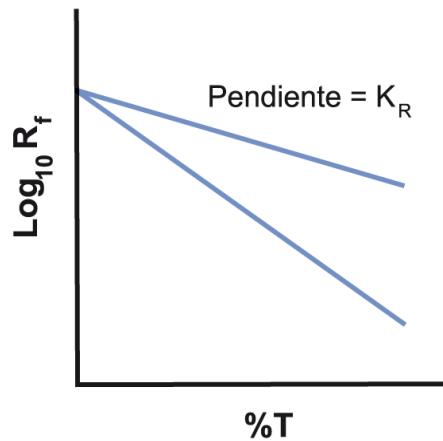


Figura 1.3. Diagrama de Ferguson para dos proteínas hipotéticas distintas. En este caso se puede observar como a mayores % T las proteínas presentan una movilidad distinta y podrían resolverse mejor.

- ¿Geles continuos o discontinuos?

Geles continuos son aquellos en los cuales los iones presentes en los buffers son los mismos a un mismo pH, tanto en la muestra como en el gel y los reservorios que contienen los electrodos. En estos sistemas las proteínas son cargadas o sembradas directamente en el gel en el cual se van a separar o resolver (Figura 1.4A). Este tipo de sistema es más recomendable para proteínas en su estado nativo dado que las mismas necesitan condiciones estables a lo largo de toda la corrida, especialmente si luego se quiere realizar una medida de su actividad. Otro factor a tener en cuenta es que la muestra debe ser lo más concentrada posible dado que no habrá un efecto concentrador determinado por el gel (ver más adelante).

Por el contrario, los *geles discontinuos* son aquellos que utilizan diferentes iones en los buffers presentes en los geles de aquellos presentes en los buffers de los reservorios de los electrodos. La mayoría de los geles discontinuos tienen diferencias no solo en la composición de los buffers sino también en sus pH. Los geles suelen estar divididos en dos regiones: un gel concentrador y uno separador (Figura 1.4B).

La principal ventaja de los geles discontinuos es la posibilidad de sembrar una mezcla de proteínas relativamente diluida y aun así obtener una buena resolución. Esto se logra preparando un gel denominado concentrador que presenta un tamaño de poro más grande y un pH menor al del gel separador, que contiene poro más pequeño. De esta manera la muestra se siembra directamente en el gel concentrador, y por un efecto de retardo en las proteínas más chicas, debido al pH, con respecto a las más grandes, que avanzan por existir un poro más grande, se logra un efecto de apilamiento antes de ingresar al gel separador.

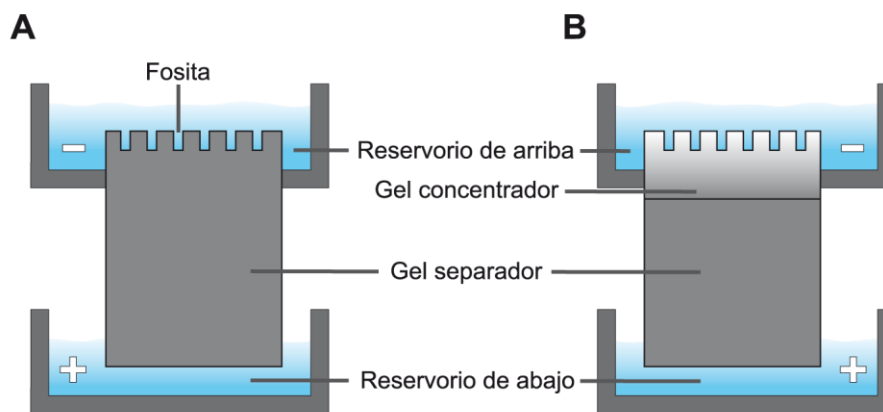


Figura 1.4. A) Gel continuo, las muestras son sembradas en fositas formadas directamente en el gel que va a separar las proteínas; B) Gel discontinuo, las muestras son sembradas en pequeñas fositas formadas en el gel concentrador.

- ¿Geles disociantes o no disociantes?

Dependiendo de cuál es el fin último de las proteínas que serán sometidas a una electroforesis, se deberá decidir sobre las condiciones en las cuales se realizará la corrida. La mayoría de los estudios que se realizan utilizando geles de poliacrilamida se hacen en condiciones disociantes. Esto significa que tanto los buffers como la preparación de la muestra tendrán componentes desnaturizantes que permitirán la disociación de aquellos complejos proteicos en sus correspondientes subunidades polipeptídicas y la pérdida de la estructura tridimensional nativa de las proteínas. Los agentes desnaturizantes

más utilizados son el dodecil sulfato de sodio (SDS) y la urea. El primero es un detergente iónico muy fuerte y la urea es un desestructurante del agua que afectara la capa de solvatación de las proteínas (agente caotrópico).

Entre las electroforesis unidimensionales disociantes la técnica de SDS-PAGE (de sus siglas en inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), es probablemente la más utilizada de rutina en los laboratorios. Es un gel de tipo discontinuo diseñado por Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970). Sus aplicaciones más comunes son la determinación de la masa molecular (ver detalle más adelante) y el estado de pureza de las muestras de proteínas durante los procesos de purificación.

Esta técnica separa a las proteínas exclusivamente de acuerdo a su tamaño. Durante su preparación para ser sembrada en el gel, la muestra debe ser desnaturalizada calentándola a 100°C durante al menos 5 minutos en presencia de SDS. Adicionalmente, dependiendo de la muestra a ser analizada, también se agregan grupos –tiol (β -mercaptoetanol o ditioneitol) que determinarán la reducción de los puentes disulfuro presentes en las proteínas y permitirá observar los posibles oligómeros que conforman una proteína en forma independiente. En estas condiciones, los distintos polipéptidos de la muestra unirán SDS en una proporción de peso constante (1.4 mg de SDS por mg de proteína) y todos adoptarán una forma similar de varilla. Esto hará que las proteínas adopten una carga neta negativa uniforme haciendo que migren siempre hacia el ánodo y solamente de acuerdo a su tamaño. Las proteínas más grandes se retrasaran más y moverán más lentamente, mientras que lo opuesto ocurrirá para las más pequeñas.

Es una buena práctica incluir un marcador de peso molecular en una de las calles del gel que permita la comparación y, eventualmente, el cálculo de la masa molecular de la proteína de interés. Es importante también que dicho marcador contenga proteínas que estén por encima y debajo del peso molecular de nuestra incógnita.

En la electroforesis en condiciones nativas (no disociantes) se preserva la interacción entre subunidades proteicas, su estructura y su actividad biológica. En este tipo de geles es muy importante la correcta selección del pH al cual se

va a realizar la corrida dado que las proteínas migrarán de acuerdo a su relación carga/masa intrínseca.

Los geles no desnaturizantes permiten la resolución de proteínas en su estado nativo, ya sea monomérico o un complejo, que va a retener su estructura terciaria y en muchos casos su función. Es recomendable para este tipo de corridas electroforéticas utilizar sistemas continuos de manera de no enfrentar a la proteína con cambios en el pH o el tamaño de poro durante la corrida. Cambios en el pH del medio generaran cambios en la carga neta de las proteínas y por lo tanto afectará la separación de las mismas. Cuanto mayor sea la diferencia entre el pH del buffer del entorno y el punto isoelectrico de las proteínas menor será el tiempo de la corrida electroforética y las bandas serán menos difusas. Obviamente se deberá tener en cuenta el rango de pH en el cual las proteínas en cuestión son estables. Si bien hay rangos conocidos de pH para las proteínas se deberían ajustar las condiciones de corrida para cada una de ellas.

- Métodos de detección

La cantidad de proteína a sembrar en cada calle del gel va a depender de dos factores: i) la complejidad de la muestra y ii) el método de detección de las proteínas a ser utilizado. Para el primer caso, cuanto mayor cantidad de proteínas distintas tenga la muestra mayor será, dentro de ciertos límites, la cantidad que deba sembrar por calle en un gel para conseguir observar todas las bandas. Considerando un gel de rutina de dimensiones pequeñas (8 x 7 cm) la cantidad de proteína variará de aproximadamente 1 a 20 μg por calle. Cantidades mayores a 50 μg de proteína por calle afecta el desarrollo de la corrida y puede generar artefactos.

Por otra parte, la elección del método de detección es un factor muy importante al momento de diseñar una corrida electroforética. Para las cantidades de proteína mencionadas en el párrafo anterior, el Coomassie Brilliant Blue es el más comúnmente utilizado.

Para muestras con cantidades 10 veces menores de proteínas (0,1-1 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se requerirá de un método más sensible como es la tinción con plata (Hames, 1990). En algunos casos incluso se requiere de un método aún más sensible, como puede ser el inmunoblotting que utiliza anticuerpos asociados a enzimas que amplificarán la señal.

Si se desea detectar una actividad enzimática, en principio podría realizarse luego de la corrida electroforética para lo cual se debería cortar el gel con la banda de interés y realizar una elusión en una solución buffer adecuada de acuerdo a las propiedades de la enzima. Esta práctica puede ser muy laboriosa, con lo cual otra posibilidad más conveniente sería la de determinar la actividad enzimática *in situ*. La principal limitante es que los métodos de detección existentes son adecuados solo para una cantidad relativamente pequeña de enzimas y los resultados son muy difíciles de cuantificar. Es importante mencionar que los geles más convenientes para este tipo de detección son aquellos de tipo nativo.

Por último, mencionaremos los geles en los cuales se incluye el sustrato de la enzima cuya actividad quiere ser medida en la matriz del gel. Un ejemplo es la medida de actividad de la glucógeno fosforilasa (Lerín, 2004), donde se incorpora almidón en la mezcla del gel y se deja polimerizar. Luego se realiza una corrida electroforética en condiciones nativas y se realiza una tinción con yodo. En este caso será una tinción de tipo negativa, ya que donde se encuentre la enzima se habrá degradado el almidón y este no se teñirá con el yodo, pudiéndose observar una región blanquecina.

Aplicaciones de geles de poliacrilamida unidimensionales

- *Determinación de la masa molecular utilizando SDS-PAGE*

Una de las principales aplicaciones de los geles unidimensionales es la determinación de masa molecular (M) utilizando la técnica SDS-PAGE, es decir, en condiciones disociantes. Cabe destacar que la determinación de masa

molecular también se puede emplear utilizando corridas electroforéticas con proteínas en su estado nativo mediante diagramas de Ferguson. Estos diagramas han sido muy útiles para determinar el tamaño molecular de proteínas en su estado nativo (Hames, 1990).

En estas condiciones, un gráfico de la movilidad relativa (R_f) versus log de la M de polipéptidos conocidos describe una recta, es decir una relación directamente proporcional entre ambos parámetros. Los polipéptidos antes mencionados son de masa molecular conocida y se utiliza la distancia que estos han recorrido para construir la curva estándar (Figura 1.5). Es importante también tener en cuenta que la relación entre el $\log_{10} M$ molecular y la distancia recorrida (r) es lineal solo en un determinado rango de masas moleculares, y este variará con la concentración de los geles y el sistema de buffers utilizado.

- Geles en gradiente de urea corridos transversalmente. Curvas de desnaturalización.

Entre las aplicaciones posibles para los geles unidimensionales encontramos los geles en gradiente de urea corridos transversalmente. En este tipo de geles se realiza un gradiente de urea y luego se realiza la corrida electroforética con el gel rotado 90° (Figura 1.6). De esta manera el gradiente que fue generado de abajo hacia arriba durante su preparación se encuentra de derecha a izquierda durante la corrida. Cabe destacar que el tamaño de poro, es decir la concentración de acrilamida y el agente entrecruzador, es uniforme pero lo que varía es la concentración de urea (0-8M). Se siembra la proteína en su forma nativa en una única calle que tiene prácticamente el mismo largo que el gel permitiendo que la muestra se enfrente con todo el gradiente realizado (0-8 M urea) de manera simultánea.

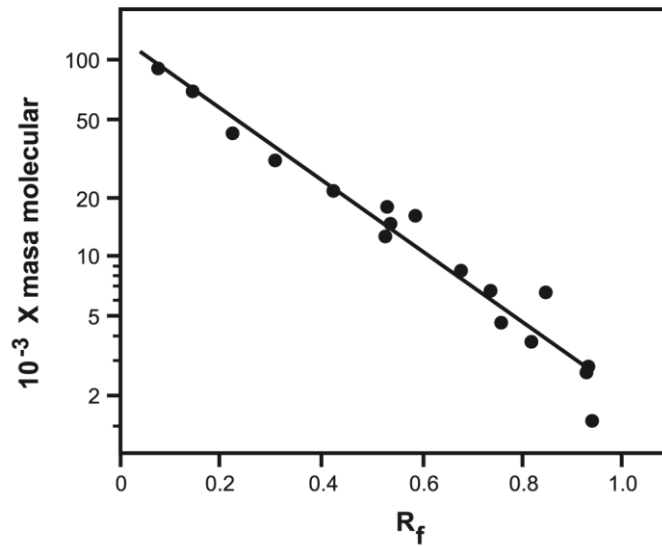


Figura 1.5. Curva de calibración mostrando la movilidad relativa R_f en función del log de la masa molecular de distintos polipéptidos. Las R_f son expresadas de acuerdo al frente de corrida con el colorante azul de bromofenol.

El objetivo principal de este tipo de electroforesis es monitorear la desnaturalización en el equilibrio de proteínas inducida por un agente químico como la urea, así como también estudiar la disociación de proteínas oligoméricas. Es importante notar que el cloruro de guanidinio no es adecuado para usar como agente desnaturizante, ya que al ser una sal, los iones se verían afectados por la aplicación del campo eléctrico determinando artefactos de corrida.

Luego de utilizar el método de detección adecuado se observara idealmente y dependiendo de la proteína una curva de tipo sigmoidea. En la misma se podrán distinguir: una región denominada pretransición representada principalmente por el estado nativo; una región intermedia denominada transición de características más difusas correspondiente a una población mixta con proteínas tanto en su estado nativo como desplegado y por último una tercera región denominada de postransición que está representada principalmente por el estado desplegado. De esta manera se puede obtener información sobre la termodinámica y cinética del proceso de desnaturalización de una proteína (Figura 1.6).

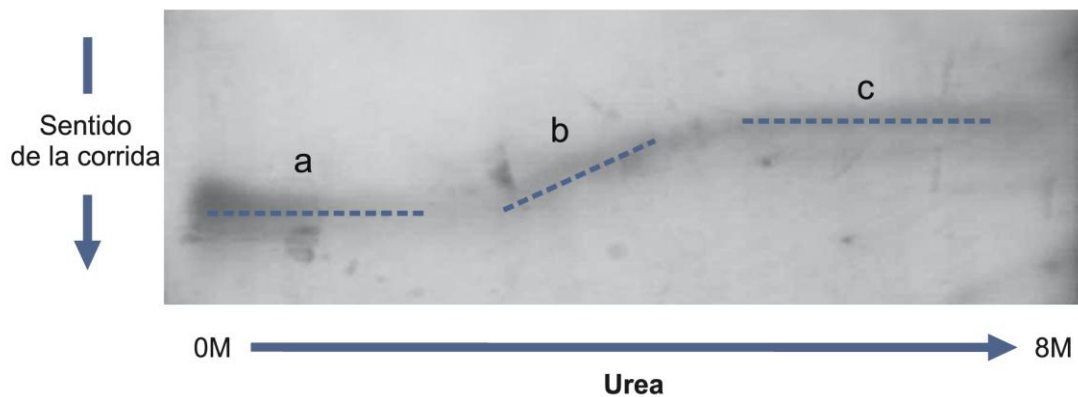


Figura 1.6. Gel en gradiente de urea corrido transversalmente. En la imagen se observa la electroforesis usando un gradiente lineal de urea (0-8M) de una variante abreviada de la proteína que une ácidos grasos de intestino de rata (IFABP). Se destacan las regiones de pretransición (a), transición (b) y postransición (c).

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica de alta resolución para la separación de una gran variedad de moléculas de interés biológico como metabolitos, drogas, amino ácidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Al igual que con los geles de poliacrilamida descritos anteriormente con EC se realiza una separación en base a la relación carga masa. Una diferencia considerable con respecto a los geles de tipo SDS-PAGE es que se pueden utilizar una gran variedad de matrices y sistemas de buffers. Esto determina una gran flexibilidad en el diseño de protocolos de separación óptimos.

CE emplea una columna capilar fusionada con sílica, que puede o no estar derivatizada con otros grupos funcionales. En contraste con los geles de tipo SDS-PAGE, las bandas de proteínas no pueden ser fijadas o teñidas ya que están en una fase móvil. La separación, es en esencia, análoga a la técnica de HPLC (por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Sin embargo, la separación por CE se basa en parámetros electroforéticos. Esta técnica es particularmente útil para la determinación de la pureza de una muestra y para una rápida, eficiente y cuantitativa evaluación de las técnicas de

purificación. Para más detalles ver Current Protocols in Protein Science, Capítulo 10.

Isoelectroenfoque (IEF)

El isoelectroenfoque (IEF) es una técnica de alta resolución que separa a las proteínas de acuerdo a sus valores de pI. A diferencia de las técnicas de electroforesis descritas en las secciones anteriores donde el pH establece una densidad de carga constante y por lo tanto una movilidad uniforme; la densidad de carga de superficie de un compuesto anfotérico en IEF cambia continuamente, y va decreciendo de acuerdo a su curva de titulación. Un compuesto anfotérico se mueve a lo largo del gradiente de pH hasta que alcanza su posición de equilibrio, donde el pH del medio es el mismo que el de su pI, su movilidad se torna cero y la molécula se detiene.

El gradiente de pH es creado y mantenido por el pasaje de una corriente eléctrica a través de una solución de compuestos anfóteros que tienen pI muy parecidos, determinando un rango de pH. El transporte electroforético causará que los anfóteros (mezclas de poliaminoácidos con diferentes propiedades de carga y por lo tanto diferentes valores de pI) se agrupen en zonas muy estrechas de acuerdo a sus pI y por ende generando un gradiente de pH, que se incrementa desde el ánodo (carga positiva) hasta el cátodo (carga negativa). De esta manera, proteínas que son muy similares estructuralmente y presentan pI que difieren tan poco como 0,01 unidades de pH, pueden ser resueltas. En IEF proteínas que tienen una carga neta positiva migrarán hacia el cátodo y ganará o perderá protones hasta que alcance el valor de pH en el gradiente que iguale a su pI. De la misma manera, proteínas que presenten carga neta negativa migrarán hacia el ánodo y perderá o ganará protones hasta que alcance el valor de pH igual a su pI. Una vez que una proteína ha migrado hasta la posición donde el pH es iguala a su pI, se concentrará y focalizará. Una mezcla de proteínas a la que se aplica IEF se separa de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. Utilizando un método correcto de detección, las proteínas

aparecerán como bandas bien definidas a través del gradiente de pH. El IEF se puede realizar tanto en una escala analítica (10 μg) como preparativa (1-10 mg).

La buena resolución de la técnica requerirá de la optimización tanto del gradiente de pH como de la intensidad el campo eléctrico aplicado a través de dicho gradiente de pH. Típicamente, se usa un amplio gradiente de pH en experimentos preliminares y, de acuerdo al comportamiento de la proteína de interés y el objetivo del ensayo, se selecciona un rango de pH más estrecho para mejorar la resolución.

La preparación de la muestra también requiere de optimización, ya sea para una escala analítica como para una preparativa. Las proteínas en la muestra tienen que estar perfectamente solubilizadas y libres de sales que puedan interferir con el proceso de focalización. A veces, la solubilización de proteínas puede requerir la presencia de urea o detergentes no iónicos para poder mantener el gradiente de pH continuo y poder generar bandas bien focalizadas.

Electroforesis bidimensionales

En una electroforesis bidimensional se realizan dos corridas unidimensionales secuenciales sobre una misma muestra de proteínas, y se considera cada corrida como una dimensión distinta.

La primera dimensión es una IEF, mediante la cual se separan las proteínas de acuerdo a sus pI. De esta manera las distintas proteínas de la muestra quedan focalizadas a lo largo de un gradiente de pH inmovilizado en un gel o en una cinta. Luego, el gel o la cinta se ponen sobre un gel de tipo SDS-PAGE (Figura 1.7). La segunda dimensión es un SDS-PAGE en el cual, como se ha descrito anteriormente, las proteínas serán separadas de acuerdo a su masa molecular (Figura 1.7). La diferencia radica en que las distintas proteínas no serán sembradas en calles separadas sino que partirán desde los distintos puntos focalizados que se generaron durante la corrida de la primera dimensión (IEF). Al final de la corrida de la segunda dimensión el gel es teñido utilizando

una técnica apropiada apareciendo las distintas proteínas como puntos en el gel (Figura 1.8).

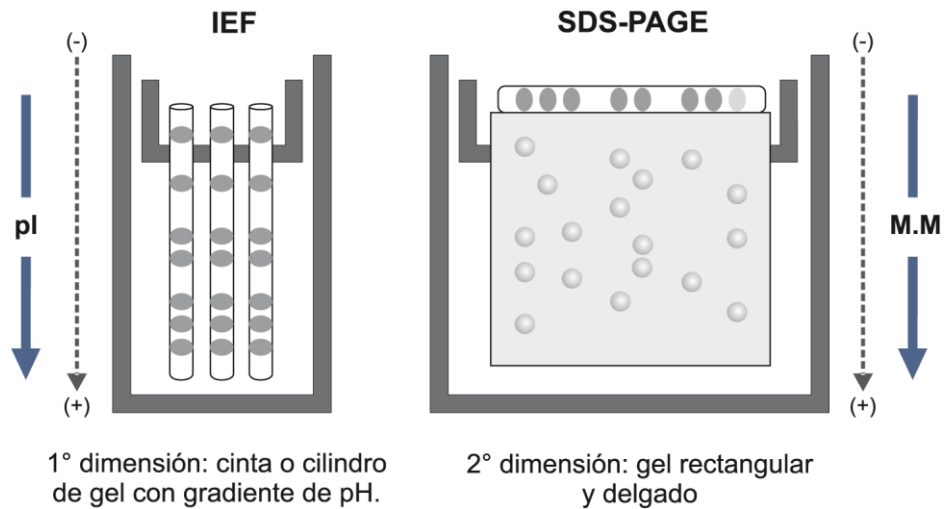


Figura 1.7. Diagrama mostrando cómo se realiza un gel bidimensional. Primero se realiza la primera dimensión donde las proteínas se separan de acuerdo a su *pl*. Luego las cintas de *pH* son sembradas en un SDS-PAGE con una inclinación de 90°. En la segunda dimensión las proteínas se resuelven de acuerdo a su masa molecular (M.M).

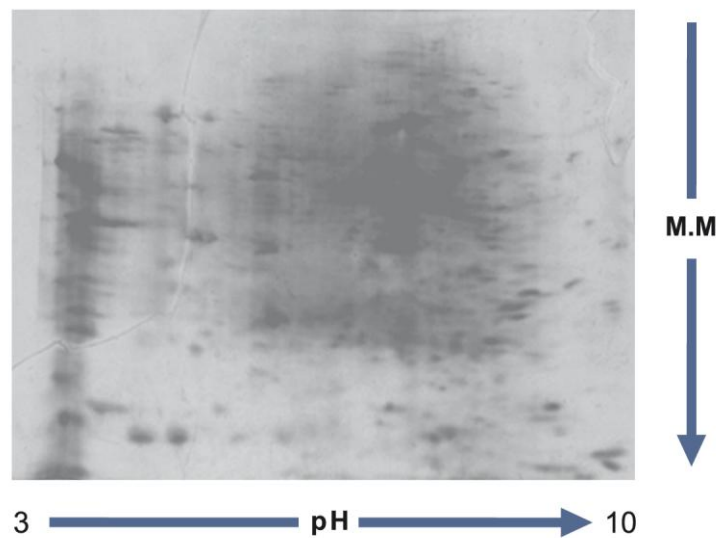


Figura 1.8. Imagen de un gel bidimensional de un lisado de células de la línea Caco-2 de carcinoma de colon humano. Se puede observar como las proteínas han sido resueltas en la primera dimensión de acuerdo a sus *pl* y de acuerdo a sus masas moleculares (M.M) en la segunda dimensión que fue corrida a 90°. El revelado fue realizado utilizando una tinción de plata.

La resolución de los geles bidimensionales es tal que muestras tan complejas como lisados celulares conteniendo varios miles de proteínas diferentes pueden ser analizados.

Si bien se pueden aislar proteínas de interés directamente del gel para luego enviarlo a una determinación por espectrometría de masas, el uso más frecuente que se le da a esta técnica bidimensional es la de observar variaciones en los patrones de expresión de distintos tejidos sometidos a distintos tratamientos.

1.2. Cromatografía de Permeación por Geles

La Cromatografía es una técnica que puede ser usada para el aislamiento de macromoléculas o para analizar sus propiedades estructurales. En particular la cromatografía de permeación o filtración por geles puede ser usada para determinar la masa molecular de macromoléculas. La cromatografía de permeación por geles puede separar proteínas de acuerdo a su tamaño dado que las proteínas más grandes no pueden entrar en la estructura porosa de la matriz y viajan a lo largo de la columna relativamente rápido (Figura 1.9). Las proteínas de menor tamaño entran a través de los poros de la matriz y su movimiento a lo largo de la columna es más lento.

La base de este tipo de cromatografía como herramienta analítica es la relación lineal entre el logaritmo de la masa molecular de la macromolécula y su coeficiente de distribución (K_d):

$$K_d = (V_e - V_o) / (V_i - V_o)$$

Donde V_e es el volumen de elusión de la macromolécula de interés (volumen de eluyente colectado entre la aplicación de la muestra en la columna y la elusión de la molécula de la columna), V_o es el volumen muerto (el volumen de elusión de una molécula que queda excluida) y V_i es el volumen de elusión de una molécula pequeña que penetra los poros de la matriz.

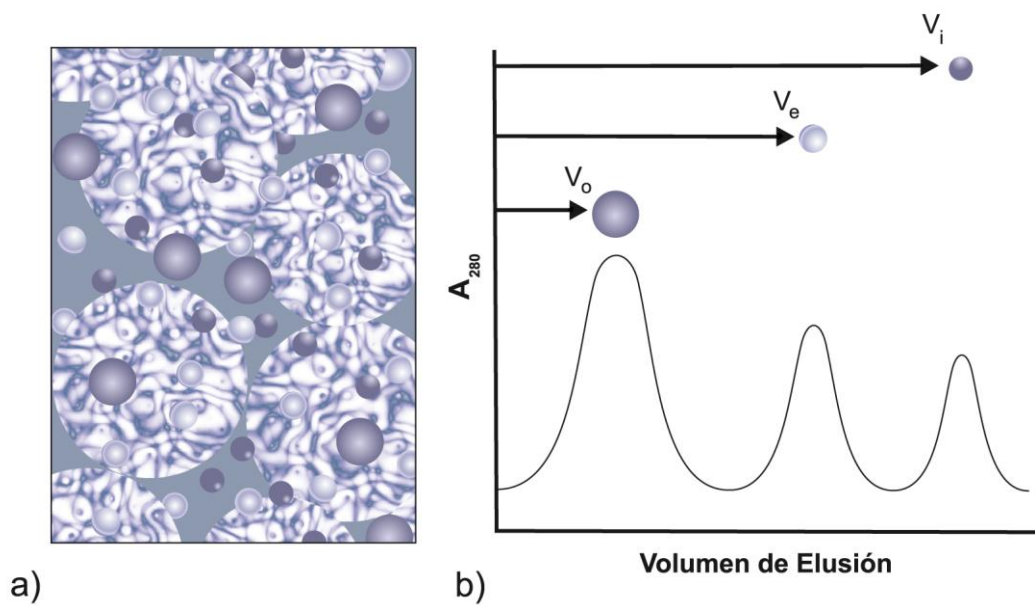


Figura 1.9. Filtración por geles de moléculas. V_i : volumen de elusión de moléculas que penetran a través de los poros de la matriz. V_o : volumen de elusión de moléculas que quedan excluidas de los poros de la matriz. V_e : volumen de elusión de la molécula de interés.

La determinación de la masa molecular mediante filtración por geles requiere de la calibración de la columna a través de la medición de los K_d de una serie de moléculas de masa conocida.

La filtración por geles separa a las moléculas de acuerdo a su radio de Stokes (R_s). El R_s es función de la masa y la forma de la molécula. En el caso de dos moléculas con idéntica masa pero distintas estructuras, una molécula elongada tiene R_s mayor que una esférica.

Las moléculas con R_s grande no penetran los poros de la matriz del gel de filtración y por lo tanto tienen un K_d pequeño. Las moléculas con R_s pequeño, entran a través de los poros de la matriz y como resultado tienen un K_d alto.

La estabilidad de los medios de filtración por geles junto con la amplia variedad de condiciones de elusión, hacen posible el análisis de proteínas en distintas condiciones:

- a) Condiciones Nativas: usando buffers que promueven el estado nativo de la proteína de interés. Esto permite la determinación de la masa molecular de proteínas monoméricas y oligoméricas.
- b) Condiciones Desnaturalizantes: en las que se usan agentes desnaturalizantes (cloruro de guanidinio, urea, etc.) en las que se disrumen

las interacciones inter e intramoleculares. Bajo estas condiciones se determina la masa de subunidades individuales.

Para una determinación adecuada de la masa molecular se requiere:

1. Una columna de filtración con el medio del rango de fraccionamiento adecuado.
2. Moléculas de calibración con masas por encima y por debajo de la de la molécula de interés.
3. Para las condiciones nativas, buffers que promuevan la estabilidad de la molécula, mientras que minimizan las interacciones de la misma con la columna. Condiciones de elusión idénticas para el estándar.
4. En condiciones desnaturizantes, se emplean buffers con el agente desnaturizante tanto para la muestra como para el estándar.

Esta técnica es aplicada rutinariamente en los laboratorios donde se realiza análisis estructural de proteínas. El tipo de equipamiento necesario es mínimo. Existe una gran variedad de matrices de distinto rango de fraccionamiento disponibles comercialmente.

1.3. Ultracentrifugación Analítica

La ultracentrifugación analítica (UCA) es el método más riguroso que permite determinar la masa molecular de proteínas y otras macromoléculas y obtener información acerca de su forma y grado de oligomerización.

El principio es muy simple: Las proteínas y otras macromoléculas en solución, sólo sometidas a la fuerza gravitacional de la tierra, se mantiene uniformemente distribuidas sin sedimentar debido a sus movimientos térmicos aleatorios (Brownianos). Sólo cuando están sometidas a una enorme fuerza de aceleración, sedimentan. Las moléculas más grandes se moverán más rápido hacia abajo en el tubo de la centrífuga. El movimiento de las partículas es detectado realizando mediciones de Absorbancia en el UV/visible o alternativamente, índice de refracción. El método posee dos ventajas

fundamentales: 1) permite estudiar macromoléculas y complejos macromoleculares en solución y 2) es un método absoluto (no requiere estandarización). Los dos experimentos más frecuentes empleando UCA son los de *velocidad de sedimentación* y *equilibrio de sedimentación*. La elevada precisión y exactitud del análisis de sedimentación se debe a que está firmemente basado en la termodinámica y todos los términos de las ecuaciones que describen el comportamiento de sedimentación se pueden determinar experimentalmente.

En la medición de *velocidad de sedimentación*, el rotor gira a velocidades muy altas, de tal forma que la sedimentación sobrepasa a la difusión. La macromolécula se aleja del eje de rotación en forma de un frente delgado. En combinación con otros datos como el coeficiente de difusión (D), se puede usar este experimento para determinar el peso molecular (PM) y obtener información acerca de la forma de la macromolécula.

En las mediciones de *equilibrio de sedimentación*, la velocidad del rotor es baja, de tal forma que hay un balance entre la sedimentación y la difusión. Esto conduce a una distribución estable (en el equilibrio) de la macromolécula en la celda. De esta manera, la posición depende sólo del tamaño y no de la forma. Esta forma de medir es más precisa, pero lleva más tiempo. Esto último puede ser problemático en el caso de muestras inestables. Se puede resolver utilizando celdas más pequeñas.

Instrumentos

Una ultracentrífuga analítica hace girar un rotor en una cámara al vacío (para disminuir el calentamiento friccional y la turbulencia aerodinámica) a una velocidad controlada constante muy alta (hasta 80.000 rpm) y temperatura controlada constante. Además debe permitir el registro de la distribución de concentración de la muestra a tiempos establecidos (Figura 1.10).

- *Rotores*: Los rotores para UCA deben soportar un stress gravitacional enorme. A 60.000 rpm, un rotor de ultracentrífuga típico genera un campo

centrífugo en la celda de alrededor de $250.000 \times g$. Esto quiere decir que una masa de 1 gr experimenta un peso aparente de 250 Kg. Además el rotor debe permitir el pasaje de la luz a través de la muestra que se está centrifugando.

- *Celdas*: las celdas para UCA también deben soportar las altas fuerzas gravitacionales y deben permitir el paso de la luz. Generalmente se trata de una cavidad de aleación de aluminio con los laterales constituidos por dos ventanas gruesas de cuarzo.

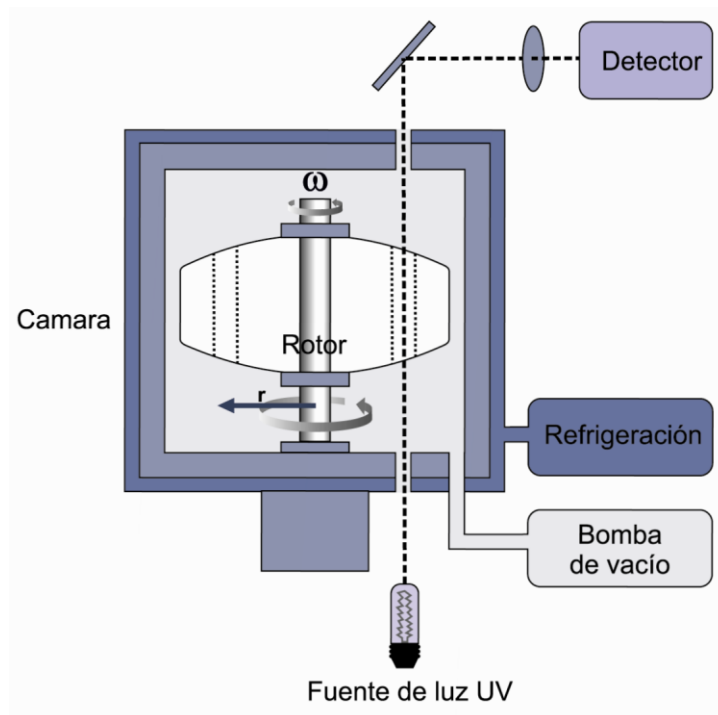


Figura 1.10. Esquema del sistema óptico y las características del rotor de una ultracentrífuga analítica. ω es la velocidad angular de rotación, y r es la distancia de la proteína al eje de rotación.

Aplicaciones de la ultracentrifugación analítica

Determinación de PM

Permite la medición directa del PM del soluto en su estado nativo y tal como existe en solución, sin necesidad de calibración. El método es aplicable a moléculas de un amplio rango de PM, desde varios cientos (sacarosa) hasta varios millones (partículas virales y organelas). El método es aplicable a proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (cualquier sustancia cuya Absorbancia o índice de refracción sea distinto del solvente).

Análisis de sistemas asociados

El método se puede aplicar al estudio de cambios en el PM cuando las moléculas se asocian para formar estructuras más complejas. La mayoría de las funciones biológicas dependen de las interacciones entre macromoléculas. La UCA permite determinar el PM del complejo tal como existe en solución y en forma independiente de su forma. Los experimentos de *equilibrio de sedimentación* permiten estudiar un amplio rango de interacciones incluyendo la unión de macromoléculas a pequeños ligandos, la autoasociación de macromoléculas y las interacciones macromoleculares heterogéneas. Debido al proceso de sedimentación, dentro de la celda habrá un rango de concentraciones, desde muy baja en el menisco, hasta una mucho mayor en el fondo de la celda. Asimismo, la concentración relativa de las especies asociadas será mayor en el fondo y el análisis del PM promedio como función del radio puede dar información acerca de la estequiometría y la fuerza de la asociación. La UCA es particularmente sensible para el examen de interacciones débiles o transitorias. Este tipo de asociación es de importancia biológica y de difícil estudio por otros métodos.

Velocidad de sedimentación

En este tipo de ultracentrifugación, la proteína está sometida a la acción de tres tipos de fuerzas: centrífuga (centrípeta), flotación y friccional. El efecto de las mismas se expresa en la siguiente ecuación:

$$\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Lf} = \frac{v}{\omega^2 r} \quad \text{Ec. 1.1}$$

Donde M es el PM de la proteína, \bar{v} es el volumen específico parcial de la proteína, ρ es la densidad de la solución, L es el número de Avogadro, f es el coeficiente de fricción de la proteína, v es la velocidad a la que se mueve la proteína, ω es la velocidad angular de rotación, y r es la distancia de la proteína al eje de rotación.

Si el segundo término $\frac{v}{\omega^2 r}$ se reemplaza por S , coeficiente de sedimentación:

$$S = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Lf} \quad \text{Ec. 1.2}$$

Valores de alrededor de 10^{-13} s son frecuentes para macromoléculas. Este valor es conocido como 1 unidad Svedberg (S).

Un experimento de Velocidad de Sedimentación comienza con la solución de la muestra distribuida uniformemente en la celda de la centrifuga. Bajo la influencia de la fuerza centrípeta, las partículas más densas que el solvente comenzarán a moverse hacia el fondo. En la Figura 1.11 se esquematiza un perfil típico de concentración vs. distancia. Se mide la velocidad de movimiento (v) del frente de la macromolécula a lo largo de la celda (alejándose del eje de rotación).

Para cada tiempo t , la distancia recorrida por el frente de la macromolécula (el punto medio del frente) desde el eje de rotación es r . El coeficiente de sedimentación S se puede obtener del gráfico de $\ln r$ vs t , cuya pendiente es $\omega^2 S$. Conociendo la velocidad a la que gira el rotor se calcula ω .

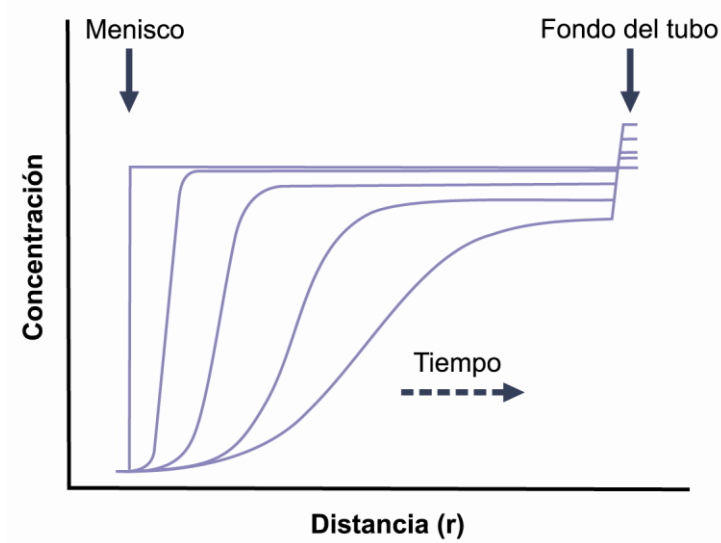


Figura 1.11. Experimento de Velocidad de Sedimentación. La concentración está graficada en función del radio desde el eje de rotación en distintos intervalos de tiempo.

La ecuación 1.2 muestra que podemos calcular el peso molecular (M), conociendo el coeficiente de sedimentación, el volumen parcial específico (se puede estimar a partir de la composición de amino ácidos), la densidad de la solución y el coeficiente de fricción.

Teniendo en cuenta que:

$$f = \frac{RT}{DL} \tag{Ec. 1.3}$$

donde D es el coeficiente de difusión.

Sustituyendo en la ecuación 1.2, se obtiene la ecuación 1.4 conocida como la ecuación de Svedberg (en honor al científico sueco Premio Nobel 1926):

$$M = \frac{RT S}{D(1-\bar{v}\rho)} \tag{Ec. 1.4}$$

Los valores de s para proteínas monoméricas dependen de la concentración, s disminuye levemente con el aumento de la concentración. En aquellas proteínas que forman dímeros, tetrámeros, etc., el valor de s aumentará con el aumento de la concentración hasta un cierto punto. Estos datos se pueden analizar para obtener constantes de asociación entre subunidades (Byron, 1996; van Holde, 1998).

Si conocemos el valor del PM obtenido a partir de otras mediciones, podemos usar los valores de M y s para obtener el valor de f , el coeficiente de fricción. El valor de f informa acerca de la resistencia de la proteína a moverse a través de la solución, y depende de dos factores, la forma y el grado de hidratación. Este último factor es calculable, siendo de alrededor de 0,3 gr de agua unida por gr de proteína. Este tipo de mediciones son usadas para determinar la forma de las proteínas en solución (Bermudez, 2002).

Equilibrio de Sedimentación

En este tipo de experimento, se genera una distribución estable de macromoléculas a lo largo de la celda, ya que hay un balance de las fuerzas de sedimentación y difusión. La distribución depende de la masa molecular y es independiente de la forma de la macromolécula y la viscosidad de la solución. Por lo tanto es posible obtener valores muy exactos de masa molecular y también permite caracterizar sistemas que se asocian (van Holde, 1998).

La ecuación que describe el gradiente de concentración (c) es la siguiente:

$$M = \left(\frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} \right) \frac{d(\ln C)}{dr^2} \quad \text{Ec. 1.5}$$

Haciendo un gráfico de $\ln c$ vs r^2 se obtiene una recta de cuya pendiente se calcula M .

El alejamiento de la idealidad de la solución de macromoléculas (provocado, por ejemplo, por interacciones entre moléculas de soluto) producirá una pequeña disminución en la masa determinada a concentraciones crecientes. Para resolver este error, se hacen determinaciones a diferentes concentraciones y luego se extrapola M a concentración cero.

Si las moléculas forman dímeros, tetrámeros, etc., el gráfico mostrará una curvatura hacia arriba. Ajustando una curva a los datos experimentales se puede encontrar un modelo que explique el comportamiento y determinar las

constantes de equilibrio del proceso y, en consecuencia, las fuerza de la interacción (van Holde, 1998).

Esta es una técnica muy poderosa para determinar la masa molecular de una macromolécula en solución. Una desventaja es el tiempo que puede tomar, lo que puede dificultar el estudio de moléculas inestables. Por otra parte el equipamiento requerido no siempre está al alcance de un laboratorio estándar.

Bibliografía

Andrews AT. Electrophoresis: Theory, Techniques and biochemical and clinical Applications. Oxford University Press, New York (NY), 1986.

Bermudez VP, MacNeill SA, Tappin I y Hurvitz J. J.Biol.Chem, 277: 36853-62, 2002.

Byron O. Analytical Ultracentrifugation, Chapter 16A. En Price NC (Ed.), Proteins Labfax, Bios Scientific Publishers, Oxford, 1996.

Fawcett JS, Morris CJOR. Molecular-sieve chromatography of proteins on granulated polyacrylamide gels. Separation Scy, 1: 9-26, 1966.

Ferguson KA. Starch-Gel electrophoresis. Application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. Metabolism, 13: 985-1002, 1964.

Hames BD and Rickwood D. Capítulo 1, Gel Electrophoresis of proteins. A practical approach 2nd Edition, Oxford University Press, Bath, 1990.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680, 1970.

Lerín C, Montell E, Nolasco T, García-Rocha M, Guinovart JJ, Gómez-Foix AM. Regulation of glycogen metabolism in cultured human muscles by the glycogen phosphorylase inhibitor CP-91149. Biochem J. 378: 1073-1077, 2004.

van Holde KE, Johnson WC y Ho PO. Chapter 5 Principles of Physical Biochemistry, Prentice Hall, Englewood Cliffs (NJ). 1998.