

ABP-1 orientado al aprendizaje de bioquímica de proteínas. Preparando proteínas: a la caza de la inmortalidad

Mercedes Oñaderra Sánchez. Alicia Megías Fresno.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.
mos@bbm1.ucm.es amegias@bbm1.ucm.es

Resumen: este problema ABP se ha elaborado para el aprendizaje de Bioquímica por los estudiantes del primer curso del Grado en Biología en la UCM aunque podría ser utilizado en cualquier curso de Bioquímica General. Pretende ayudar a los alumnos a entender y aplicar conceptos básicos de técnicas de purificación y caracterización de proteínas. Elena y Juan son estudiantes de Biología y están realizando unas prácticas de Bioquímica en una empresa de Biotecnología dentro de un programa de colaboración universidad-empresa. Los estudiantes se enfrentan a un problema de purificación y caracterización de una molécula de naturaleza proteica. Los alumnos deben conocer la metodología fundamental para el aislamiento de proteínas. El fundamento, la aplicación y desarrollo de diversas técnicas instrumentales deberán ser la base de la resolución del reto de obtener una proteína altamente purificada que permitiría su utilización con fines terapéuticos. El desarrollo del proyecto encomendado a los alumnos les acerca a la interrelación ciencia básica y aplicación industrial o descubrimiento y utilización de moléculas biológicas con fines médicos, “un camino hacia la gloria” que entusiasma a los protagonistas del proyecto.

Palabras clave: Tipos de cromatografías. Electroforesis. Actividad enzimática. Características estructurales de proteínas. Rendimiento. Grado de pureza.

OBJETIVOS EDUCATIVOS

Objetivos generales

- Incidir en que los estudiantes reflexionen sobre la relación entre los conocimientos bioquímicos básicos y una aplicación de interés empresarial.
- Comprensión de las diferentes características de pureza de distintas muestras biológicas.
- Comprensión de la utilización de distintos métodos de separación de moléculas biológicas basados en sus diferencias estructurales.
- Iniciar a los alumnos en la búsqueda y manejo de información sobre técnicas de manejo en laboratorios bioquímicos.

Objetivos específicos

Después de realizar el problema ABP, los estudiantes serán capaces de:

- Manejar correctamente los criterios para utilizar diferentes técnicas bioquímicas.
- Entender las técnicas que se emplean para purificación de proteínas y su utilidad en situaciones diversas.
- Comprender cómo las características estructurales de una proteína permiten su separación de contaminantes.
- Entender los conceptos de actividad enzimática, cantidad de proteínas, rendimiento y grado de purificación.
- Discutir las características estructurales que se pueden deducir del comportamiento de proteínas en distintas metodologías utilizadas.
- Explicar un proceso de aislamiento proteico y comprender los distintos protocolos según la proteína buscada.
- Calcular distintos parámetros de una proteína y comprender su significado bioquímico.

METODOLOGÍA

- Actividad de aprendizaje cooperativo: Equipos formados por 3 alumnos.
- Presentación del problema en clase y puesta a disposición de los alumnos a través de la plataforma de docencia virtual (Campus Virtual de la UCM).
- Requisitos: Con alumnos de primer curso son necesarias las clases previas convencionales para explicar las propiedades estructurales de las proteínas y conceptos básicos sobre técnicas instrumentales de purificación.
- Tiempo disponible para la resolución del problema: 2 semanas.
- Tutorías: 2 horas en el aula. Se puede optar por la realización de tutorías externas formalizadas en grupos poco numerosos.
- Discusión del problema y evaluación del aprendizaje: Sesión única en el aula de 1 hora de duración utilizando una presentación de Power Point interactiva y un sistema de mandos electrónicos de respuesta ("clickers") para contestar a las cuestiones planteadas en la presentación. Se aconseja la presencia de un profesor adicional para la asistencia técnica.

PROBLEMA ABP

Elena y Juan están realizando prácticas en la empresa biotecnológica Farfunghi y les han encargado poner a punto la purificación de una proteína. Llevan dos meses

aprendiendo pegados a investigadores de distintos proyectos y ahora tienen que empezar a pensar por ellos mismos y actuar solos.

Elena: yo creo que en este tiempo hemos estudiado y realizado distintas técnicas de experimentación en bioquímica. Es el momento de ponerlas en práctica.

Juan: si, además nuestro proyecto tiene una vertiente empresarial que permitirá, si lo hacemos bien, la transferencia de resultados al sector productivo.

Elena: tienes razón. Nos piden que purifiquemos una molécula con actividad antitumoral que podría tener en biomedicina una repercusión importante.

Juan: ¿te imaginas que pasase todas las pruebas y fases para ser utilizada contra un cáncer, por ejemplo de colon, y viéramos nuestra proteína en el mercado y además salvando muchas vidas?

Elena: me parece un sueño. Nos tenemos que tomar el proyecto muy en serio. Necesitamos obtener esta molécula muy pura y con el mayor rendimiento posible. ¡Manos a la obra!

Estudios previos que Elena y Juan han revisado exhaustivamente en la bibliografía otorgaban a un extracto crudo obtenido del crecimiento de un hongo una actividad antitumoral y pretenden obtener la molécula responsable de esa actividad que, según las referencias bibliográficas, es una enzima con una actividad acoplada a una deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . Deben obtener esa proteína con un alto grado de pureza que asegurará la minimización de efectos secundarios y además suficiente cantidad de material para poder hacer después una caracterización exhaustiva que permita en un siguiente estadio su utilización biomédica. Después de la centrifugación del extracto de partida que supone el hongo en crecimiento en un medio adecuado, se añadió sulfato amónico al sobrenadante hasta alcanzar una concentración final del 50% (Fig. 1 A). Así se consiguió precipitar, entre otras proteínas, la enzima en cuestión, atendiendo al diferente perfil de solubilidad según la fuerza iónica que presentan distintas proteínas. Tras recuperarlo mediante centrifugación, el material precipitado se dializó y liofilizó disolviéndose en 3 ml de Tris 0.1 M, pH 7.0, Una alícuota se chequeó en una electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS con β -mercaptoetanol (Fig. 1 B).

A la vista de los resultados, estos 3 ml se aplicaron en una columna de Sephadex G-100, equilibrada en el mismo tampón. Elena y Juan conocen bien como “funciona” la cromatografía de penetrabilidad; han preparado un esquema (Fig. 2) que les ha ayudado a comprender el proceso.

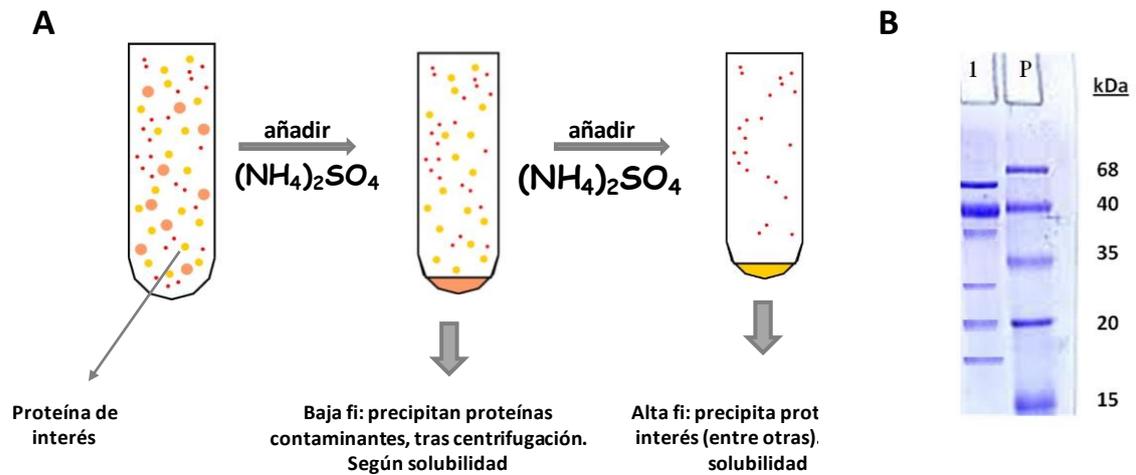


Figura 1. A. Esquema de una precipitación de proteínas con sales (sulfato amónico). B. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y mercaptoetanol de una alícuota del precipitado dializado (pocillo 1). Se presenta (pocillo P) la migración de proteínas patrón de distintas masas moleculares.

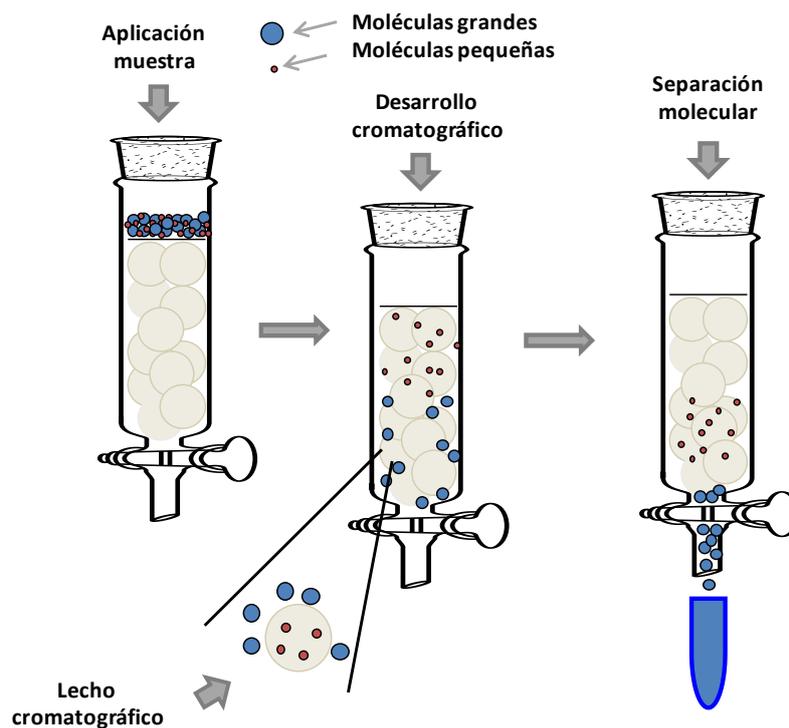


Figura 2. Esquema del fundamento de la separación de proteínas en cromatografía de penetrabilidad.

El eluido de la columna se analizó por medio de un espectrofotómetro de flujo continuo, midiéndose su absorbancia a 280 nm. Dicho eluido se recogió en fracciones de 2 ml con ayuda de un colector. El perfil de elución de esta cromatografía se muestra en la Figura 3 A. En línea continua se representa la A_{280} y en discontinua el perfil de

actividad enzimática. En ella aparecen además unas flechas que indican las posiciones en las que eluyen proteínas patrón de masa molecular conocida (indicada en kDa en la propia figura), que se han empleado para calibrar la columna. Para seguir la purificación, Juan y Elena han realizado electroforesis en geles de poliácridamida en SDS con β -mercaptoetanol y han obtenido tras esta etapa los resultados que aparecen en la figura 3 B.

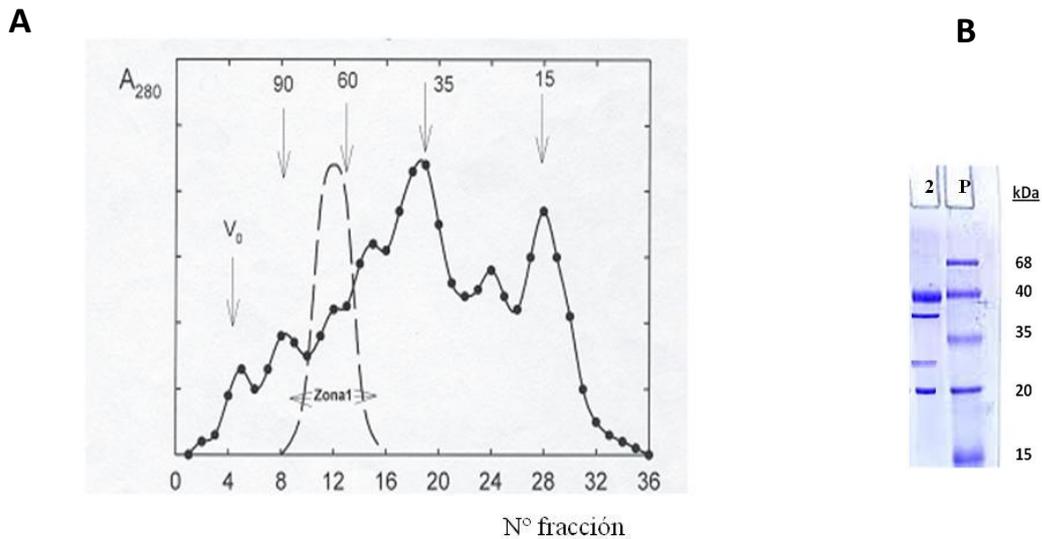


Figura 3. A. Perfil de la cromatografía realizada en Sephadex G-100. B. Electroforesis en geles de poliácridamida con SDS y mercaptoetanol de una alícuota de la zona 1 (pocillo 2). Se presenta (pocillo P) la migración de proteínas patrón de distintas masas moleculares.

Una alícuota de 50 μ l de cada una de dichas fracciones se empleó para desarrollar un ensayo de actividad específico para la enzima que se pretendía purificar. Dicho ensayo consiste en una reacción catalizada por una deshidrogenasa NAD^{+} -dependiente acoplada a la de la proteína objeto de estudio (Fig. 4).

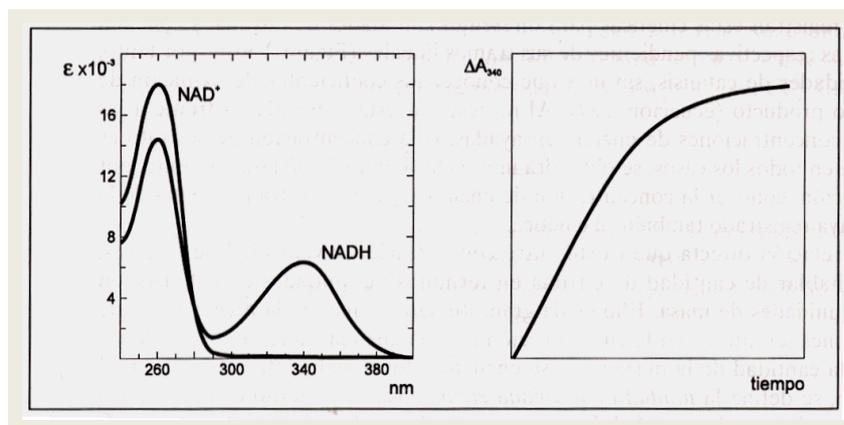


Figura 4.- Espectros de absorción de NADH y NAD^{+} . Registro gráfico de la cinética de una reacción catalizada por una deshidrogenasa dependiente de NAD^{+} .

A la vista de los resultados cromatográficos y electroforéticos, Juan y Elena decidieron recoger las fracciones correspondientes a la zona 1 y aplicarlas en otra columna, ahora de DEAE-celulosa, equilibrada en el mismo tampón Tris antes mencionado. Tenían muy presente cómo ocurre la separación en una cromatografía de intercambio iónico que han resumido en un esquema (Fig. 5).

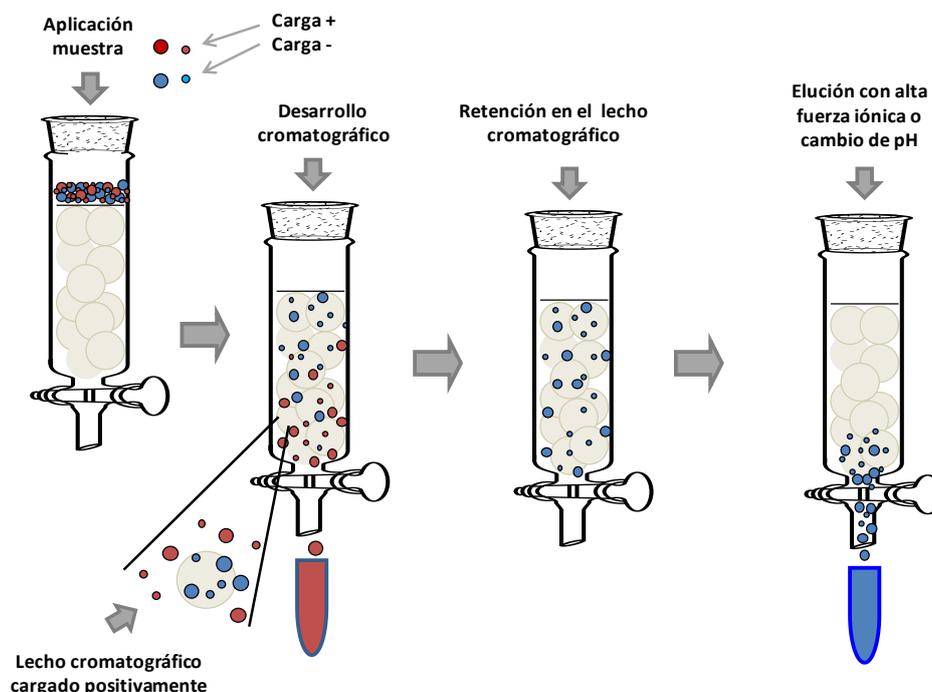


Figura 5.-Esquema del fundamento de la separación de proteínas en cromatografía de intercambio iónico.

Esta segunda cromatografía se eluyó mediante un gradiente lineal de 0-500 mM NaCl. El eluido se sometió a los mismos análisis que en la cromatografía en Sephadex. El resultado se muestra en la figura 6 A, representándose igualmente tanto la A_{280} como la actividad enzimática. Los números que aparecen en ordenadas corresponden a concentraciones mM de NaCl del gradiente lineal. En este caso se combinaron las fracciones de 2 ml de la zona 2 y una alícuota del conjunto se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 6 B).

Elena estaba contentísima con el resultado. Sin embargo, su tutor le ha dicho que en esas condiciones no pueden utilizar la muestra. Han decidido hacer una cromatografía de afinidad. Juan no conocía en qué se basaba esta técnica y Elena le ha enseñado este esquema (Fig. 7).

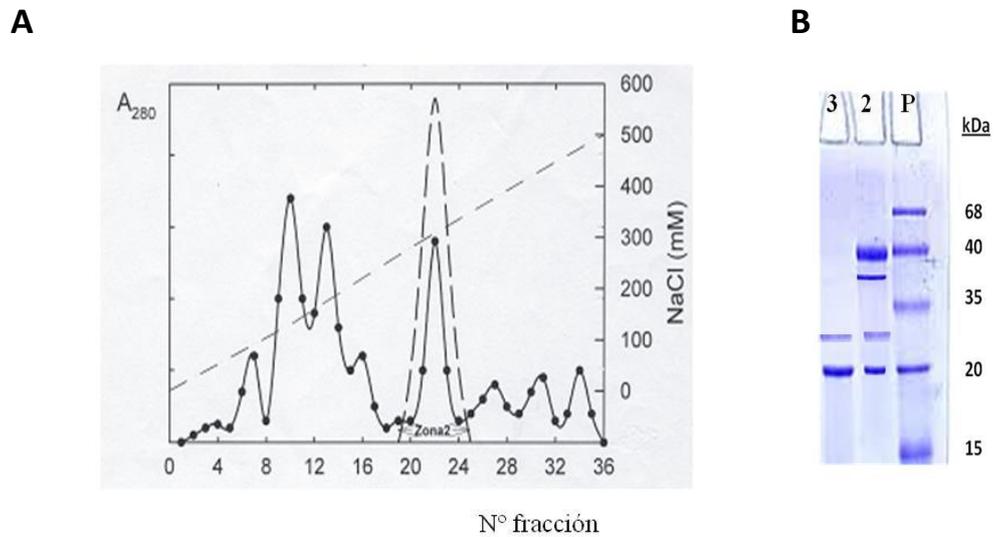


Figura 6. A. Perfil de la cromatografía realizada en DEAE-celulosa eluyendo con un gradiente de NaCl. B. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y mercaptoetanol de una alícuota de la zona 2 (pocillo 3) y de la zona 1 correspondiente a la cromatografía en Sephadex de la etapa anterior (pocillo 2). Pocillo P: migración de proteínas patrón de distintas masas moleculares.

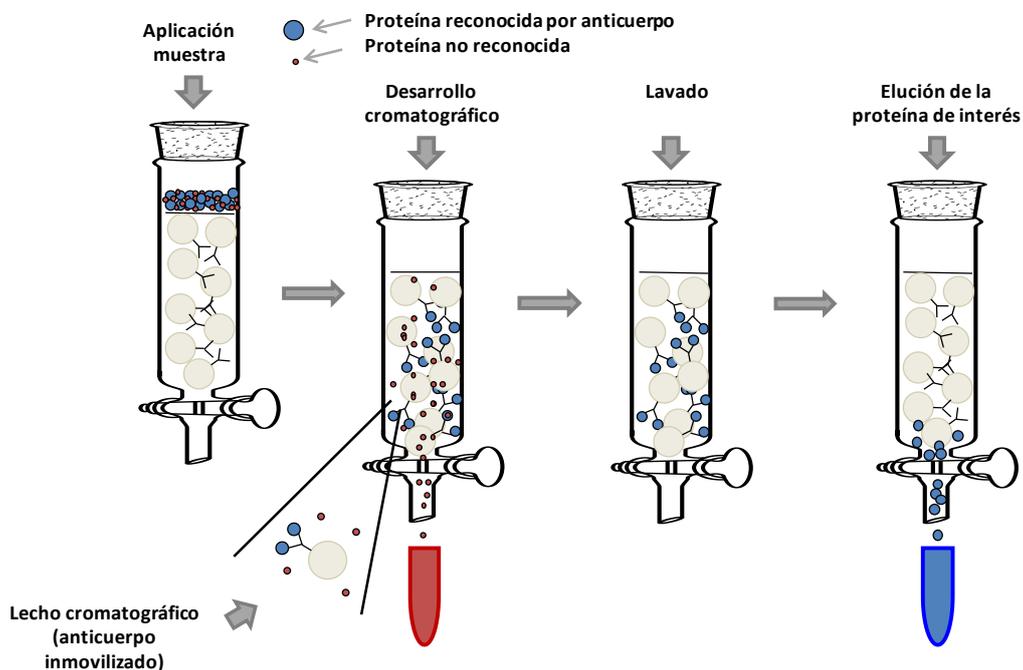


Figura 7. Esquema del fundamento de la separación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Esta etapa les ha supuesto trabajar duro pues han necesitado poner a punto la cromatografía de afinidad, que no ha sido fácil, y han tenido que realizar previamente una diálisis de la muestra para conseguir ponerla en las condiciones adecuadas.

Tras esta etapa, el control electroforético les ha mostrado el transcurso de la purificación como aparece en la figura 8.

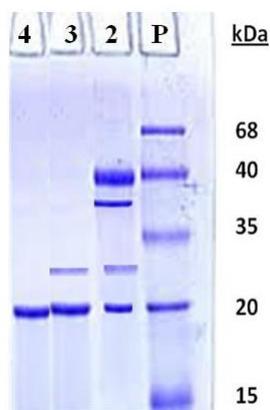


Figura 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y mercaptoetanol de una alícuota con actividad del resultado de la cromatografía de afinidad (pocillo 4). Los pocillos 3 y 2 corresponden a las zonas 2 y 1 respectivamente de las cromatografías realizadas en las etapas anteriores. Se presenta (pocillo P) la migración de proteínas patrón de distintas masas moleculares.

Juan y Elena se encuentran orgullosos de su trabajo. Después de varios meses de esfuerzo parece que tienen un método de purificación estupendo. Están ya escribiendo el informe. Su proteína está dispuesta para posteriores estudios. Sin embargo su tutor les comenta que deben hacer una tabla de purificación. ¿Qué es eso? pregunta Elena. Juan comenta: ¡menos mal que hemos ido guardando alícuotas de cada paso de la purificación! Le explica a su compañera lo que tienen que hacer y después de obtener experimentalmente los valores que aparecen en la tabla 1 están en condiciones de rellenar todos las celdas y elaborar juntos la tabla de purificación.

Etapa	Volumen (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/mg)	Purificación (nº)	Rendimiento (%)
1	133	7.5		30				
2	3	150		1067				
3	16	3.12		162.5				
4	8	1.25		256.25				
5	3	0.66		633.3				

Tabla 1. Tabla de purificación de la proteína. La etapa 1 se corresponde con el extracto crudo. La etapa 2 se refiere a la precipitación salina. Las etapas 3, 4 y 5 se refieren a los resultados obtenidos en las cromatografías de penetrabilidad, intercambio iónico y afinidad, respectivamente.

La estancia en el laboratorio de Juan y Elena se acaba, pero todavía creen que pueden conocer algo acerca de la proteína que ya consideran de la familia. En los

estudios cromatográficos y electroforéticos que han llevado a cabo se han encontrado con resultados relativos a la masa molecular de la proteína aparentemente dispares que están analizando. Han completado el estudio con una electroforesis (pocillo 2) de la proteína purificada que han realizado en condiciones no reductoras (sin mercaptoetanol). Además han hecho un espectro de absorción UV-VIS de la proteína purificada y han encontrado el resultado que se muestra (Fig. 9).

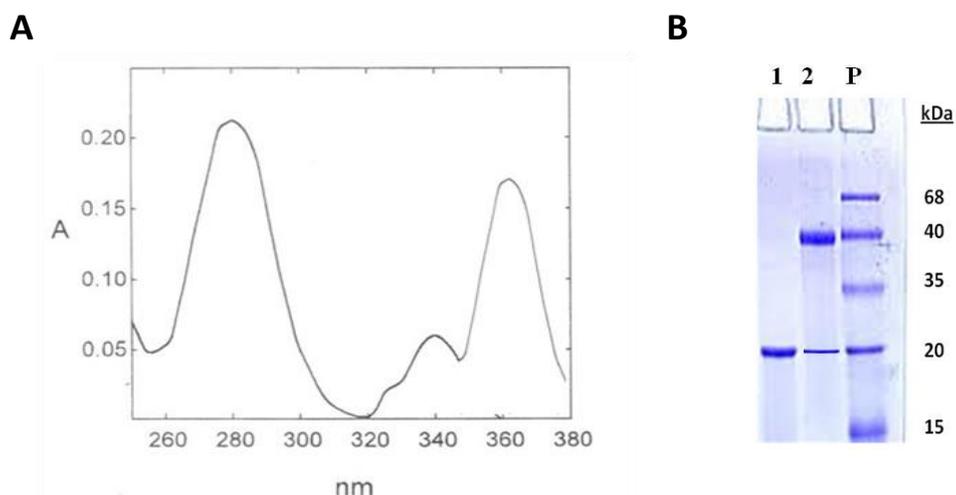


Figura 9. A. Espectro de absorción de la proteína purificada. B. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de una alícuota de la muestra con actividad obtenida en la cromatografía de afinidad. Condiciones de la electroforesis: Pocillo 1, con mercaptoetanol; Pocillo 2, sin mercaptoetanol. Pocillo P: migración de proteínas patrón de distintas masas moleculares.

Para completar el estudio, Juan y Elena han realizado unos ensayos sobre la capacidad antitumoral de la proteína que han purificado. Han tratado células de carcinoma de colón con la proteína estudiada y los resultados obtenidos les han entusiasmado (Fig. 10).

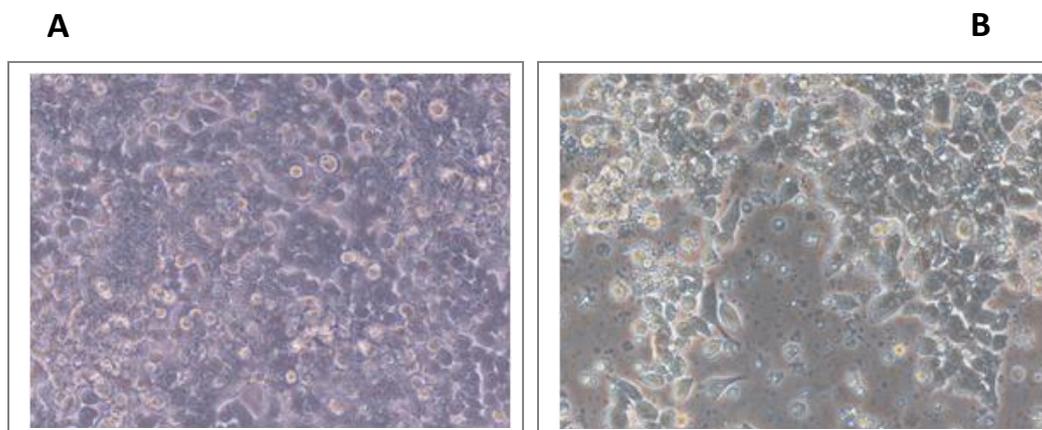


Figura 10. A. Micrografía óptica con contraste de fase de células de carcinoma de colon. B. Estas mismas células en presencia de la proteína obtenida después de un tratamiento de 6 horas. Cortesía Dra. N. Olmo.

¡Están exultantes!“Su proteína” está purificada y presenta actividad antitumoral. Es posible que gracias a su trabajo se consiga un nuevo avance en la lucha contra el cáncer.

CUESTIONES

1. Dado que lo que se pretendía era el aislamiento de la enzima en cuestión, ¿considera adecuado el método seguido? Razone su respuesta.
2. ¿Qué es V_0 en la figura 3? ¿Cómo cree que se ha determinado? ¿En que consiste calibrar una columna de cromatografía de penetrabilidad?
3. ¿Cuál es la masa molecular de la proteína estudiada?
4. ¿A qué concentración de NaCl eluye en la cromatografía de intercambio iónico? ¿Considera que se trata de una proteína ácida o básica? ¿Habría otras formas de eluir la proteína de la cromatografía de intercambio iónico?
5. ¿Cómo se lleva a cabo el ensayo de actividad de una enzima NAD^+ -dependiente? ¿Por qué cree que se acopla el ensayo de actividad de la proteína en cuestión a un ensayo enzimático NAD^+ -dependiente?
6. Respecto a la cromatografía de afinidad ¿cree que es una técnica de purificación eficaz? ¿Por qué se ha utilizado como última etapa en el aislamiento?
7. Rellene y comente la tabla de purificación de la proteína.
8. A la vista del espectro de absorción UV-VIS de la proteína ¿se trataría de una heteroproteína?
9. ¿Para qué se utiliza el β -mercaptoetanol ¿Qué se puede decir acerca de la estructura cuaternaria de la proteína?
10. Respecto a la acción antitumoral de la proteína ¿cómo puede haber actuado la molécula obtenida? Indague en el tema aunando conocimientos obtenidos en la asignatura Biología Celular.

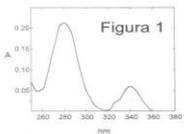
SESIÓN DE EVALUACIÓN: PRESENTACIÓN INTERACTIVA

La presentación mostrada corresponde a una parte de la utilizada en el curso 2012-2013 (Fig. 11). El contenido y las cuestiones-guía planteadas en el problema ABP

pueden ser fácilmente modificados para adaptar el caso a las necesidades de aprendizaje de los estudiantes. Igualmente es posible incluir otros aspectos para la utilización del ABP en la asignatura Biología Celular.

C 3

Figura 1



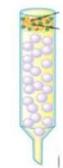
A. El aminoácido Histidina
 B. Una proteína homomérica
 C. Una proteína heteromérica
 D. Un grupo prostético
 E. Un oligonucleótido

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

C4

El volumen de exclusión en una cromatografía de penetrabilidad se calcula etuyendo:

A. mercaptoetanol
 B. azul de dextrano
 C. ferricianuro potásico
 D. H₂O tritiada
 E. dodecilsulfato sódico



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

C5

La cromatografía de intercambio iónico separa de acuerdo a diferencias en los componentes en:

A. carga a pH 7
 B. masa molecular
 C. carga al pH de la cromatografía
 D. espectro de absorción
 E. Coeficiente de extinción molar

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

C 6

La actividad específica de una muestra de proteína viene indicado como:

A. unidades de actividad enzimática
 B. mg de proteína total / ml
 C. mg de proteína total
 D. unidades de actividad enzimática/mg
 E. mg de proteína purificada/ mg proteína extracto crudo

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

C 7

La diálisis es una técnica de separación basada:

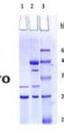
A. En el diferente color de los componentes
 B. En el tamaño de los componentes
 C. En la carga de los componentes
 D. En el pH al que precipitan los componentes
 E. En la naturaleza química de los componentes

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

C 8

El mercaptoetanol se utiliza en electroforesis de proteínas para:

A. tener las proteínas
 B. separar subunidades unidas por puentes salinos
 C. separar subunidades unidas por puentes disulfuro
 D. marcar el avance de la electroforesis
 E. marcador de pesos moleculares



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Figura 11.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía básica

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. y Stryer, L. 2008. *Bioquímica*. 6ª edición. Editorial Reverté.

García-Segura, J. M.; Gavilanes, J. G.; Martínez del Pozo A.; Montero F.; Oñaderra M. y Vivanco F. 2003. *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*. 2ª edición. Editorial Síntesis.

González de Buitrago, J. M.; Fernández B.; Lizarbe, M. A.; Megías A. y Rodríguez R. 1979. *Problemas de Bioquímica*. Editorial Alhambra.

Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.; Kreiger, M.; Scott, M. P.; Zipursky. L. y Darnell, J. 2006. *Biología Celular y Molecular*. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana.

Bibliografía específica

Gómez-Moreno Calder, C.; Sancho Sanz, J. 2003. *Estructura de proteínas*. Editorial Ariel Ciencia.

Lacadena, J.; Alvarez-García, E.; Carreras-Sangrà, N.; Herrero-Galán, E.; Alegre-Cebollada, J.; García-Ortega, L.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J. G. y Martínez del Pozo, A. 2007. Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol Rev.*, 31: 212-237.

Olmo, N.; Turnay, J.; González de Buitrago, G.; López de Silanes, I.; Gavilanes, J. G. y Lizarbe, M. A. 2001. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur. J. Biochem.*, 268: 2113-2123.

Tomé-Amat, J.; Menéndez-Méndez, A.; García-Ortega, L.; Batt, C. A.; Oñaderra, M.; Martínez-del-Pozo, A.; Gavilanes, J. G. y Lacadena, J. 2012. Production and characterization of scFvA33T1, an immunotoxin targeting colon cancer cells. *FEBS J.*, 279:3022-3032.

Wilson, K. y Walter J (eds.) 2005. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry and Molecular Biology*. 6ª edición. Cambridge University Press.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Fundamentals of Biochemistry
www.wiley.com/college/fob/anim

TheScientist
<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/32971/title/Tumor-Snipers/>

Recibido: 21 diciembre 2011.
Aceptado: 4 septiembre 2013.