

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

DE LAS GLUTATIÓN TRANSFERASAS

Introducción: glutatión transferasas

Es un conjunto de enzimas que participan en los mecanismos de defensa frente a agentes nocivos como son los xenobióticos (destoxificación).

En general se puede afirmar que los xenobióticos hidrofóbicos son los más peligrosos ya que son más difíciles de eliminar por quedar pegados a las membranas. Otros xenobióticos pueden ser drogas, herbicidas, pesticidas, compuestos carcinogénicos y compuestos endógenos.

Lipohidroperóxidos

Compuestos endógenos

Eicosanoides (síntesis)

Los eicosanoides son compuestos con 20 atm. de carbono derivados del ácido araquidónico (tromboxanos, leucotrienos, prostaglandinas). Las GT participan en su biosíntesis.

Características cinéticas:

Las glutatión transferasas (GT) poseen un sitio específico para el glutatión (GSH) y catalizan todo tipo de reacciones en las que el glutatión actúe como nucleófilo (GS^-).

$\text{GSH GS}^- \text{GT GSX}$

H^+

X

Evidentemente la especie X será electrófila.

Existen cientos de compuestos que portan carbonos lo suficientemente electrofílicos para que puedan ser atacados por el glutatión, formándose el correspondiente tioéter.

Vgr.

cl SG

$\text{NO}_2 \text{NO}_2$

GSH

$+\text{HCl}$

$\text{NO}_2 \text{NO}_2$

El gas que se desprende es HCl aunque también puede ser nitrito y otros compuestos.

Al igual que ésta, hay otras moléculas que pueden ser atacadas, como por ejemplo los átomos alfa – beta insaturados.

Esto conforma el primer escalón en la formación de un compuesto genérico de excreción perteneciente al grupo de los ácidos mercaptúricos.

Posteriormente puede sufrir una transpeptidación, hidrólisis y resultar un compuesto N-acetilado.

De forma genérica la glutatión transferasa, en su afán de eliminar sustancias hidrofóbicas, actúa en dos etapas:

- En una primera etapa va a transformar a X en un metabolito primario más fácil de excretar porque le suele transferir grupos polares para ello. En la mayoría de los casos la cosa no queda aquí, sino que se procesa aún más. Es más, a veces este metabolito primario es más tóxico que X.
- En la segunda fase ese metabolito primario se une a otras sustancias presentes en la célula, entre ellas el glutatión (GSH).

El producto de esta segunda fase es un compuesto más hidrofílico y más fácil de excretar, teniendo también una vida media inferior.

Las glutatión transferasas son un grupo multigénico y multifuncional.

El glutatión es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina

El glutamato contiene el grupo amino.

El grupo SH de la cisteína es el centro activo del glutatión.

Las glutatión transferasas son diméricas, con un peso molecular de 50.000 aproximadamente. Las subunidades suelen ser iguales, aunque también pueden ser distintas.

En ratas se han aislado 14, y en humanos 8.

En general se agrupan en 5 clases:

, , , , microsomal (asociada a membranas) (cajón de sastre).

Purificación de proteínas

El proceso de purificación de proteínas abarca muchos puntos. Por lo tanto, aquí trataremos las principales.

Selección de una fuente adecuada

Las proteínas constituyen una función muy importante de la masa de todos los organismos.

Existen proteínas que desempeñan funciones idénticas en un gran número de organismos diferentes. Por supuesto existe habitualmente una variación considerable de las propiedades de una proteína concreta procedente de diversas fuentes. De hecho, variantes diferentes de una proteína determinada pueden aparecer en tejidos diferentes del mismo organismo o aún en compartimentos diferentes de la misma célula. Por esta razón, el aislamiento de una proteína puede simplificarse mucho por una elección juiciosa de su procedencia.

La elección debe basarse en criterios tales como la facilidad de obtener cantidades suficientes del tejido del que se aísla la proteína.

Rotura y solubilización

La primera etapa en el aislamiento de una proteína es la de conseguir su disolución. En algunos casos, como ocurre en el caso del suero sanguíneo, la naturaleza ya lo ha hecho. Sin embargo, la proteína debe ser liberada, habitualmente, de las células que la contienen. El método de elección para este procedimiento depende de las características mecánicas del tejido de procedencia, así como la localización de la proteína requerida en la célula.

Si la proteína que interesa se encuentra en el citosol su liberación sólo requiere la apertura de la célula por ruptura (lisis). Es el método más sencillo y suave de efectuarla, conocido como lisis osmótica, las células se suspenden en una disolución hipotónica. Es decir, las células se hallan inmersas en una disolución en la que la concentración molar de los solutos es menor que la de la célula en su estado fisiológico normal. Bajo la influencia de las fuerzas osmóticas el agua difunde en la disolución intracelular más concentrada con lo que provoca el hinchamiento de las células y su explosión. Este método no es adecuado para las células bacterianas y células vegetales. El empleo de una enzima tal como la lisozima, que degrada químicamente las paredes celulares bacterianas suele resultar eficaz. Los detergentes o los disolventes orgánicos resultan útiles en el lisado de células pero deben adoptarse precauciones al emplearlas porque pueden originar la desnaturalización de la proteína que me interesa.

Muchas células necesitan de alguna especie de ruptura mecánica para su apertura.

Existen varios tipos de ruptura mecánica:

a) Teorías de corte sólidas: las modernas técnicas de corte sólidas son adaptaciones de la trituración con arena o un abrasivo efectuado a mano en un mortero. Actualmente, estos métodos se usan para el trabajo con células vegetales y bacterianas. Generalmente, las partículas abrasivas deben ser del mismo tamaño que las células y deben permanecer afiladas durante su trituración.

- Teorías de corte líquidas: los cortes pueden producirse mediante cuchillos, o en bolas, mezcladores, o mediante movimientos hacia arriba y hacia abajo de un émbolo o una bola en el seno de una suspensión celular.

Los mezcladores consisten esencialmente en hojas afiladas propulsadas a grandes velocidades. Esas hojas cortantes trabajarán en asociación con una cubeta de mezclado especial que contiene la suspensión y cuyas paredes están orientadas de arriba a abajo.

c) Desintegración por extracción a alta presión.

El aparato más frecuentemente usado es la celda francesa en la cual se abren las células por fuerza de cizalla al fluir una corriente pequeña a través de un pequeño orificio. Este método es especialmente útil para desintegrar células microbianas.

d) Desintegración mediante desintegración ultrasónica.

Se ha encontrado que las oscilaciones ultrasónicas de alta frecuencia son útiles para la desintegración celular. El principio por el que las ondas ultrasónicas rompen las células no se comprende por completo, pero se sabe que se producen altas presiones transitorias cuando las suspensiones se someten a la vibración ultrasónica. La principal desventaja de esta técnica es la de que se producen considerables cantidades de calor.

Estabilización

Una vez que se ha separado una proteína de su entorno natural, se halla expuesta a muchos agentes que pueden dañarla irreversiblemente. Estas influencias deben controlarse cuidadosamente en todas las fases de un proceso de purificación, si no el rendimiento en la proteína deseada puede reducirse mucho o aún desaparecer.

La integridad estructural de muchas proteínas es una función sensible al pH como consecuencia de sus numerosos grupos ácido – base. Para impedir las alteraciones de los materiales biológicos debidas a las variaciones en el pH, se disuelven rutinariamente en disoluciones también eficaces en el intervalo de pH en el que el material es estable.

Las proteínas se destruyen con facilidad por las temperaturas elevadas. Aunque las estabilidades térmicas de las proteínas varían ampliamente, muchas de ellas se desnaturalizan lentamente por encima de 25° C. Por esta razón, la purificación de las proteínas se realiza a temperaturas cercanas a 0°. Sin embargo, existen numerosas proteínas que precisan de temperaturas inferiores para su estabilidad. Recíprocamente, algunas proteínas son hábiles con el frío y se inestabilizan por debajo de temperaturas características. La estabilidad térmica característica de una proteína puede emplearse en ocasiones ventajosamente en su purificación. Una proteína termoestable que se halle en una mezcla cruda puede purificarse en gran medida mediante una calefacción breve de la mezcla, de modo que se desnaturalicen y precipiten la mayor parte de las proteínas contaminantes.

Las células contienen proteasas y otras enzimas degradativas. Las enzimas degradativas pueden inactivarse a valores de pH y de temperatura que no lesionen a la proteína que interesa. Otra posibilidad es que estas enzimas puedan inactivarse específicamente por agentes químicos sin que afecten a la proteína deseada.

Algunas proteínas son más resistentes a la degradación proteolítica. Esto puede ser utilizado en su purificación manteniendo activas a las proteasas presentes. Esta técnica, llamada de autólisis simplifica la purificación debido a que en general resulta más fácil eliminar selectivamente los productos de degradación de las proteínas contaminantes que las especies inalteradas.

En general, las proteínas se desnaturalizan cuando sus concentraciones son pequeñas y también por contacto con superficies de modo que una disolución de proteínas debe conservarse relativamente concentrada y manipularla de modo que la formación de espuma sea mínima.

Otro factor a considerar en la estabilidad de las proteínas es la presencia de iones metálicos. Todos los tejidos suelen tener cationes divalentes que pueden alterar nuestra enzima, con lo cual se le suelen añadir agentes quelantes como el EDTA.

Por último comentar que también se suelen poner agentes reductores porque al lisar la célula se genera un medio muy oxidante.

Ensayo :

En la purificación de cualquier sustancia debe encontrarse algún medio para la determinación cuantitativa de su presencia.

Gran parte del material del cual está siendo extraída se parece mucho a la proteína que interesa.

El método de identificación de una proteína debe ser:

- simple y rápido
- específico

– cuantitativo.

Entre los métodos de determinación de proteína más directos se encuentran los aplicables a las enzimas que catalizan reacciones que rinden productos que se identifican con facilidad. Puede ser que un producto exhiba una absorción espectroscópica característica o fluorescencia que pueda ser determinada. (Es de la que nosotros hemos usado en la primera etapa).

Otra posibilidad es que la reacción enzimática pueda producir o consumir ácido de modo que el enzima pueda determinarse con valoraciones ácido – base.

Las proteínas que no son enzimas fueron en principio más problemáticas puesto que su determinación cuantitativa se realizaba por observación de sus efectos biológicos. Por ejemplo la presencia de una hormona puede revelarse por el efecto que produce sobre un tejido u organismo completo. Evidentemente estos métodos no eran nada precisos ni reproducibles.

Las técnicas inmunoquímicas permiten identificar con facilidad cantidades pequeñas de proteínas específicas. Estos métodos aportan técnicas de determinación de proteínas cuya sensibilidad y discriminación es elevada. Emplean anticuerpos que son proteínas producidas por el sistema inmune del animal en respuesta a la introducción de una proteína extraña. Este anticuerpo se une específicamente a la proteína extraña.

Los anticuerpos obtenidos del suero sanguíneo de un animal que ha sido inmunizado frente a una proteína concreta son los productos de muchas células productoras de anticuerpos diferentes. Son los denominados anticuerpos policlonales. Todo anticuerpo reconocerá un punto muy concreto de la proteína extraña. A cada uno de esos puntos se les denomina con el nombre de epítomos.

Actualmente se ha desarrollado mucho la producción de anticuerpos monoclonales, anticuerpos que solo reconocen un epítomo concreto de una proteína. Estos anticuerpos se producen a partir de unas células inmortales denominadas hibridomas. Son el resultado de una hibridación de una célula productora de un tipo de anticuerpo determinado con una célula tumoral. Esto se hace porque las células productoras normales mueren muy rápido entre otras cosas.

Aquí detallaré dos técnicas inmunoquímicas:

– Radioinmunoensayo (RIA)

– Elisa

Radioinmunoensayo (RIA)

Es un método que nos permite una determinación cuantitativa de mi proteína utilizando la radiactividad.

El método está basado en la determinación del grado de competencia entre un estándar marcado radiactivamente y mi muestra con un anticuerpo.

Básicamente consiste en lo siguiente:

Supongamos una proteína X * marcada radiactivamente.

Si yo pongo en disolución a esta proteína X*, centrifugo y quito al sobrenadante la cantidad de radioactividad que me queda es 0 porque no ha precipitado nada (no queda exactamente 0 porque siempre queda algo pegado en las paredes y esto ha de tenerse en cuenta).

Si en una misma disolución pongo una cantidad Y de anticuerpo, al centrifugar, en el tubo me va a quedar una cantidad de radiactividad que es proporcional a la cantidad de proteína marcada X*, que al unirse con el anticuerpo me ha precipitado.

Si en esas mismas condiciones pongo proteína sin marcar, la cantidad de radiactividad recogida en el tubo será menor, ya que para la misma cantidad de anticuerpo Y habrá una competencia entre proteína X sin marcar y la X*.

Entonces sobre la base de este razonamiento se puede obtener una curva patrón u por medidas de radioactividad se puede obtener la cantidad de proteínas presentes en una muestra.

Este método tiene el inconveniente de que estamos trabajando con radiactividad.

Elisa

Es un método parecido al anterior, pero en este caso en lugar de utilizar radiactividad se utiliza una actividad enzimática.

Los pasos a seguir en el método de Elisa son los siguientes:

- 1- El anticuerpo frente a la proteína de interés se inmoviliza sobre un sólido inerte tal como poliestireno.
- 2- La disolución que va a ser investigada para la determinación de proteína se aplica a la superficie recubierta de anticuerpo en las condiciones que el anticuerpo se une a la proteína.
- 3- El complejo anticuerpo – proteína que resulta se hace reaccionar ulteriormente con un segundo anticuerpo específico para la proteína, al que se ha unido por covalencia un enzima que pueda determinarse con facilidad.
- 4- Después de eliminar por lavado el exceso de anticuerpo con enzima unido, se efectúa la valoración del complejo anticuerpo – proteína – anticuerpo – enzima, con lo que se conoce la cantidad de proteína presente. Esa valoración puede hacerse por medidas fotométricas.

Ambos métodos son empleados con profusión para detectar cantidades pequeñas de proteínas específicas y otras sustancias biológicas.

Estrategias generales para la purificación

Hemos de tener en cuenta que cualquier muestra biológica es una mezcla de un gran conjunto de macromoléculas. En principio, el aislamiento de una proteína, y en general de una macromolécula es una tarea complicada. Existen distintos puntos característicos que pueden diferenciar unas macromoléculas de otras. Esos puntos son:

- Salubilidad
- Carga neta y distribución superficial de la carga
- Tamaño
- Polaridad (Hace referencia a los grupos hidrofóbicos de la superficie)
- Propiedades de absorción

- Especificidad de imán

Solubilidad ! Técnicas de precipitación

Resto ! Técnicas cromatográficas

Las interacciones que se van a considerar son tres:

- Enlaces de hidrógeno: importantes a bajas temperaturas
- Interacciones hidrofóbicas: se hacen importantes a altas temperaturas y elevadas concentraciones salinas
- Interacciones iónicas: poco importantes a altas concentraciones salinas.

Salubilidad

Los múltiples grupos ácido-base de una proteína determinan que sus propiedades de salubilidad dependan de la concentración de sales disueltas, de la polaridad del disolvente, del pH y de la temperatura. Las diferentes proteínas varían mucho en sus salubilidades bajo un conjunto dado de condiciones. Ciertas proteínas precipitan de su disolución en condiciones en las que otras permanecen completamente solubles. Este efecto se emplea rutinariamente como base de la purificación de una proteína.

Efecto de la concentración salina

La salubilidad de una proteína en disolución acuosa es una función sensible a las concentraciones de las sales disueltas. La concentración de sal se expresa como fuerza iónica.

$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$ = concentración molar

z_i = carga

La salubilidad de una proteína a una fuerza iónica determinada varía con el tipo de iones que se hallan en disolución. El orden de eficacia de estos diversos iones para influir sobre la salubilidad de la proteína es muy semejante para las diferentes proteínas y se debe principalmente al tamaño de los iones y de la hidratación.

La solubilidad de una proteína cuando la fuerza iónica es pequeña aumenta, en general, con la concentración de la sal.