

Tópicos en Biofísica Molecular

2do Cuatrimestre de 2015

Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

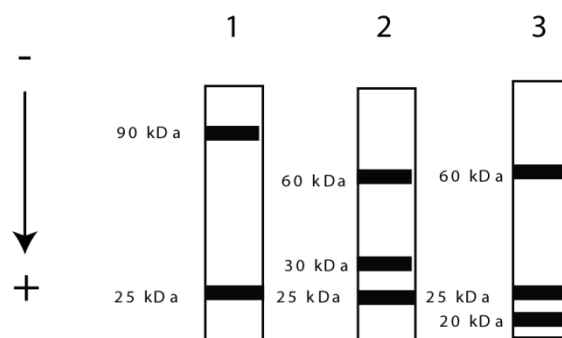
Guía 4: Electroforesis – Northern, Southern y Western blots.

Problema 1

Una proteína en su estado nativo tiene un peso molecular de 107.000 Daltons (107 kDa).

a) Deduzca su estructura cuaternaria (número de subunidades, PM de cada una de ellas, uniones que las estabilizan y glicosilación de subunidades) a partir de los resultados de los siguientes geles de poliacrilamida en los que se sembró la proteína pura, la cual fue previamente sometida a tres tratamientos (por separado) que se indican abajo. Al final de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con Coomassie Blue, que es un colorante azul que tiene afinidad por las estructuras peptídicas.

Tratamiento previos	1	2	3
SDS	Si	Si	Si
Mercaptoetanol	No	Si	Si
Endo-H	No	No	Si



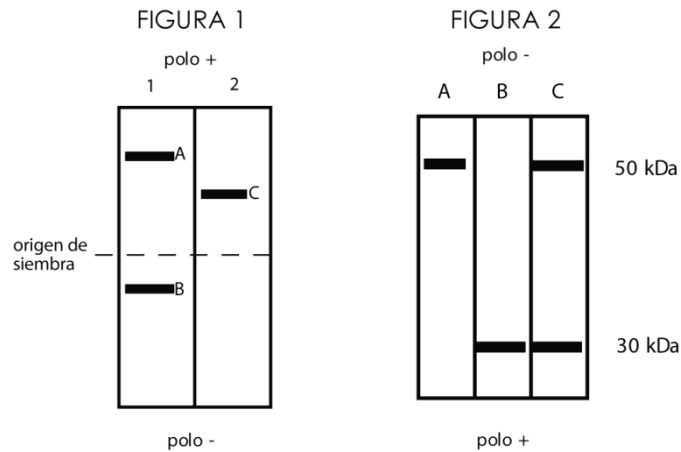
b) ¿Qué tratamiento previo sugiere Ud. para determinar sin ambigüedad a qué polipéptido están unidas las moléculas de azúcar?

c) La sensibilidad del Coomassie Blue es tal que es capaz de detectar a partir de aprox. 0.2µg de proteína/banda. ¿Cree Ud. que es correcto afirmar que una proteína está pura si se observa una sola banda en un gel teñido con ese colorante?

d) En el tratamiento 3, ¿cree Ud. que la enzima Endo-H se agregó antes o después de tratar con SDS y Mercaptoetanol?

Problema 2

Un investigador letón tiene serios problemas para caracterizar una enzima que ha purificado y la acción que tiene sobre ella el compuesto X, un aparente activador. En la Fig. 1 se ve una migración en un gel nativo de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie. En la calle 1, la proteína se incubó previamente con el compuesto X mientras que en la 2, no.



Con el material proteico eluido a partir de cada una de las tres bandas del gel nativo (A, B y C), él hizo un ensayo de actividad, en presencia o ausencia del compuesto X (ver tabla).

Fuente de la enzima	Acitividad enzimática (con X)	Actividad enzimática (sin X)
Banda C	100	2
Banda A	100	100
Banda B	2	2

Ya bastante confundido, el científico letón decidió correr esos polipéptidos anteriormente extraídos a partir de cada una de las bandas (A, B y C) en un gel de poliacrilamida, pero esta vez con SDS (Fig. 2). Luego de ver el resultado, respiró aliviado:

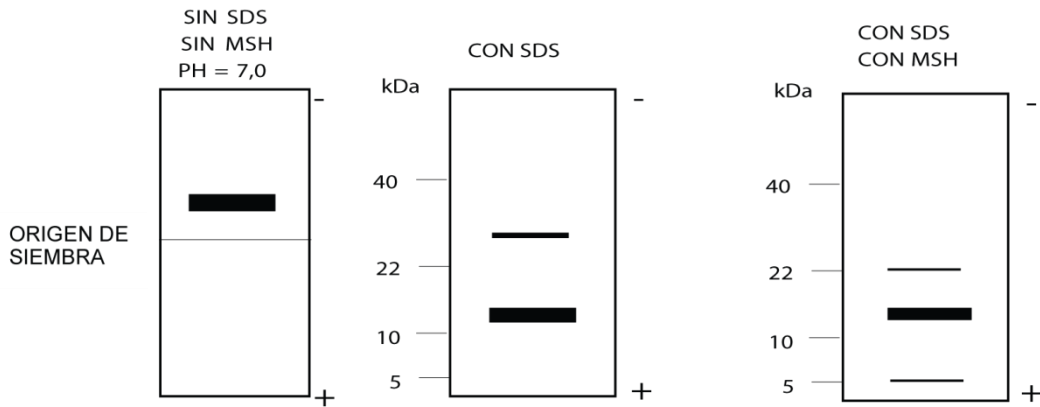
- ¿Cómo es la estructura de la proteína y cómo la afecta el compuesto X?
- ¿Por qué en el gel nativo la muestra se siembra en el medio del gel?
- ¿Cómo explica que la banda A haya migrado más rápido que la B en el gel nativo?
- ¿Cómo haría para determinar si la enzima se une al compuesto X y, si lo hace, a qué subunidad?

Problema 3

En los '90 nuestro país fue sacudido por la noticia de la aparición de casos de cólera que fueron en aumento debido a malas condiciones sanitarias. *Vibrio cholerae* es la bacteria responsable de la diarrea aguda observada en esta enfermedad. El aislamiento y caracterización de la misma data del siglo antepasado. Sin embargo, su biología molecular y celular comenzó a conocerse recién en los años 80 del siglo pasado, debido principalmente a las investigaciones de John Mekalanos, de la Harvard Medical School.

El proceso infeccioso implica la supervivencia de *V. cholerae* al pH ácido del estómago, su motilidad a través del intestino y la secreción por parte del vibrión de una **toxina proteica de 87 kDa** compuesta por los productos de 2 genes, llamados ctx A y ctx B. El producto de ctx A es un polipéptido de 27 kDa y el de ctx B, uno de 12 kDa. El polipéptido A sufre una modificación post-traducciona.

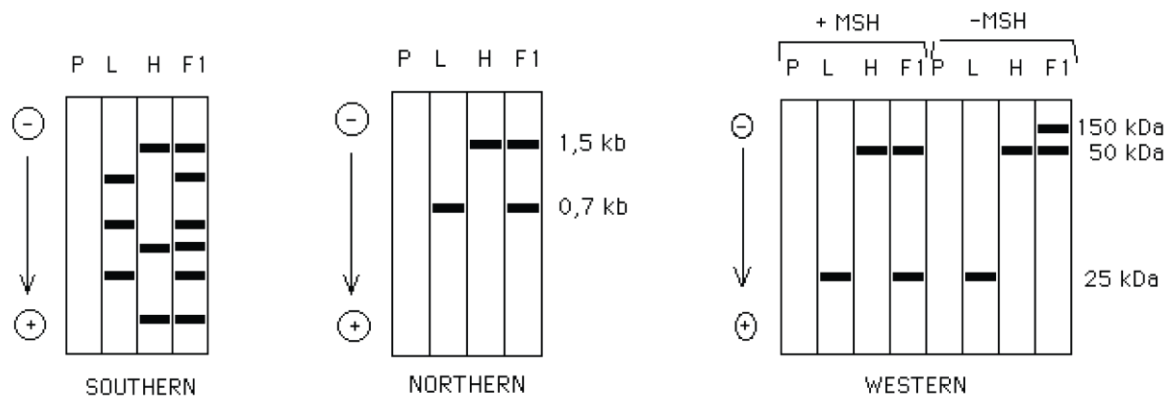
Se realizaron los siguientes geles de poliacrilamida con la toxina purificada:



- Haga un dibujo de la molécula de toxina que muestre el n° de subunidades de cada clase, el tipo de unión entre las mismas y la característica saliente del producto del gen ctx A.
- ¿Cuántos aminoácidos tiene la toxina aproximadamente? Dato: PM de cada aminoácido = 110 Da.
- ¿De qué signo es la carga eléctrica neta de la toxina a pH = 7? ¿Cómo se modificaría su carga neta y actividad biológica a pH = 12?
- ¿Qué modificación post-traducciona sufre?

Problema 4

En noviembre de 1989 (Nature 342,76-78, 1989) un grupo de la Scripps Clinic de USA publicó un revolucionario trabajo en el cual describen la producción de inmunoglobulinas (anticuerpos) de ratón en plantas de tabaco transgénicas. Obtuvieron 2 plantas transgénicas: L, que expresa el cDNA de la cadena liviana de la inmunoglobulina de ratón y H, que expresa el cDNA de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. A su vez cruzaron sexualmente plantas L y H; y de las semillas obtuvieron plantas de la generación F1. Con los DNAs genómicos, mRNAs y extractos proteicos de las plantas transgénicas L, H, F1 y de plantas no transgénicas (P), hicieron sendos experimentos de Southern, Northern y Western. Datos: Las cadenas livianas de las inmunoglobulinas tienen un peso molecular de 25 kDa y las pesadas 50 kDa. Cada anticuerpo está formado por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas.



Southern: DNA de plantas cortado con la enzima de restricción HindIII. Sonda: mezcla de clones de cDNA de cadena pesada y liviana marcados con ^{32}P . Condiciones de hibridación: baja sal.

Northern: mRNA de las mismas plantas. Sonda: la misma que se utilizó en el Southern.

Western: Extracto de proteínas de las mismas plantas. "sonda" del Western: anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón marcados radioactivamente.

MSH = mercaptoetanol

- Describe los resultados del Southern y saque conclusiones.
- ¿Qué patrones de bandas habría observado en cada calle del Southern si la hibridación y el lavado se hubieran hecho en alta sal? Justifique.
- Describe los resultados del Northern y saque conclusiones.
- Describe los resultados del Western y saque conclusiones.
- ¿Qué resultados habría obtenido en el Western, si en lugar de revelarlo con anticuerpos anti-inmunoglobulinas totales de ratón, hubiera usado anticuerpos anti-cadena pesada de ratón exclusivamente? Haga el dibujo del Western y justifique.
- ¿Piensa que estas plantas transgénicas podrían tener alguna aplicación práctica?

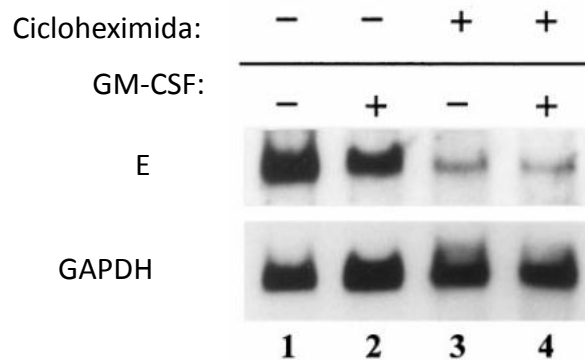
Problema 5

En un estudio sobre la expresión de un gen, al que llamaremos E, se realizó el Northern blot mostrado en la figura. Para ello, se trataron células de médula de hueso con cicloheximida y el factor de crecimiento GM-CSF, según se indica en la figura (+ presencia, - ausencia). El Northern blot se reveló con una sonda contra el gen E y otra contra GAPDH.

Cicloheximida: inhibidor de la traducción en eucariota.

GM-CSF: factor de crecimiento presente en médula ósea, que estimula la proliferación de leucocitos (glóbulos blancos).

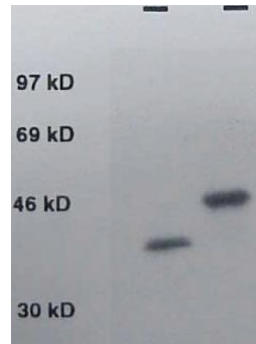
GPDH: gen de "mantenimiento", presente en todos los tipos celulares y cuyos niveles de expresión no se ven afectadas por factores de crecimiento, ni tratamiento con cicloheximida.



- Estimar las cantidades relativas del mRNA del gen E en el Northern blot (calles 1-4)
- ¿Por qué se incluyó GAPDH en el experimento?
- ¿Qué conclusión puede sacar de este experimento, respecto a la expresión del gen E?

Problema 6

Usando una regresión lineal, estime el peso molecular de las dos bandas en la siguiente figura. Considerar las marcas negras en la parte superior de las calles como el punto de siembra.



Problema 7

En un estudio sobre la actividad de una proteasa del virus del SIDA, se incubó a la proteasa del HIV purificada, junto con un la proteína PRC, un sustrato para la proteasa, y se agregaron diferentes sustancias. Luego de la incubación se corrieron las muestras en un SDS-PAGE, que se tiñó con “azul de Coomassie”, un colorante que marca todas las proteínas presentes.

Calle 1: Marcador de peso molecular

Calle 2: Proteasa del HIV

Calle 3: Proteína genérica llamada PRC

Calle 4: PRC + Proteasa de HIV

Calle 5: PRC + Proteasa de HIV + 0.01mM del inhibidor de proteasas “pepstatina”

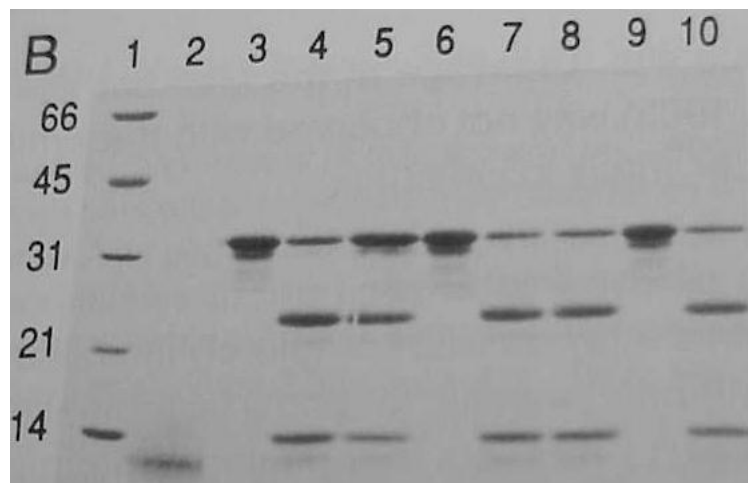
Calle 6: PRC + Proteasa de HIV + 0.1mM pepstatina

Calle 7: PRC + Proteasa de HIV + 0.1mM del inhibidor de proteasas “antipaina”

Calle 8: PRC + Proteasa de HIV + 1mM antipaina

Calle 9: PRC + Proteasa de HIV + 0.02% m/v SDS (detergente iónico)

Calle 10: PRC + Proteasa de HIV + 5 mM EDTA (secuestra cationes divalentes)



- ¿a qué proteína corresponda cada una de las bandas del gel?
- ¿Cuáles de los inhibidores de proteasas es efectivo contra la proteasa del HIV?
- ¿Qué ocurre al incubar la reacción de proteólisis en presencia de SDS?
- ¿Qué podemos concluir de la incubación con EDTA? Nota: Muchas proteasas requieren presencia la presencia de iones para actuar.

BIBLIOGRAFÍA

- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia IBMC - cátedra Dr. A. Kornblitt, FCEN, UBA.
- Exámenes de la materia *Molecular Biology* (Bio304) - cátedra Dr. A. Malcom Campbell - Department of Biology - Davidson College