



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE
CIENCIAS EXPERIMENTALES

**PURIFICACIÓN DE GST HUMANA MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON COBALTO Y
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD TÉRMICA**

Departamento de Química y Física
Directores del Trabajo Fin de Grado:
Luis García Fuentes
Ana María Aguilera del Real

Memoria Trabajo Fin de Grado
Grado en Química
Elisa María Quero Montes
29 de Septiembre 2014

Purificación de GST humana mediante cromatografía de afinidad con Cobalto y estudios de estabilidad térmica.

Memoria del Trabajo Fin de Grado presentada por Elisa María Quero Montes.

Almería, 29 de Septiembre de 2014.

Fdo: Elisa María Quero Montes.

Directores del Trabajo Fin de Grado

Luis García Fuentes

Ana María Aguilera del Real

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mi familia, y en especial a mis padres, por todo el apoyo recibido tanto en los buenos como en los malos momentos, depositando siempre en mí un cariño y una confianza inigualables. Del mismo modo me gustaría mencionar a aquellos familiares que ya no están, pero que se sentirían muy orgullosos por este momento tan especial.

Seguidamente agradecer también a mis compañeros de clase, incluidos los de Grado en Ambientales que nos acompañaron durante el primer curso, por todos los momentos que hemos pasado juntos, tanto de risas y celebraciones como de enfados y agobios. A pesar de las diferencias y posibles conflictos originados en todos estos años, siempre han estado ahí y no habría sido lo mismo sin ellos.

También me gustaría agradecer a los técnicos de laboratorio por el apoyo que nos han dado en todo momento. Son unos grandes profesionales además de unas bellísimas personas, y me encantaría hacerles saber que, en general, los alumnos, siempre los tenemos presentes así como valoramos mucho su ayuda.

He dejado en último lugar a las personas a las que, junto con mi familia, debo y doy mi mayor agradecimiento:

-A Indalecio Quesada Soriano por todo el esfuerzo y empeño que ha puesto para que la realización de este trabajo fuera más amena, ofreciéndome una ayuda de forma totalmente altruista y desinteresada. Es grande como persona y como profesional, y alguien del cual se puede, y he aprendido mucho. Gracias por depositar en mí tanta confianza.

-A Luis García Fuentes y Ana María Aguilera del Real porque además de ser mis tutores del trabajo fin de grado han sido unos grandes profesores y unos grandes consejeros. Gracias a ellos he tenido una enorme oportunidad de aprendizaje y desarrollo tanto personal como profesional, y me encantaría agradecerles todo el apoyo, todos los consejos, todos los momentos alegres vividos durante esta experiencia, todos los conocimientos adquiridos y, sobre todo, el buen trato y lo bien acogida que me he sentido siempre. Por todo, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

I.

OBJETIVOS	3
------------------------	---

II.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
--	---

III.

EXPERIMENTAL	13
---------------------------	----

1. MATERIALES Y REACTIVOS	13
--	----

1.1. Cultivos celulares:	13
1.2. Purificación:	13
1.3. Electroforesis en gel:	13
1.4. Medidas de la concentración de proteína:	14
1.5. Ensayos de actividad:	14
1.6. FPLC:	14
1.7. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC):	14

2. MÉTODOS	14
-------------------------	----

2.1. Cultivos celulares:	14
2.2. Purificación:	15
2.3. Electroforesis en gel:	20
2.4. Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-visible):	21
2.5. Ensayo Bradford:	22
2.6. Ensayo de actividad:	23
2.7. FPLC:	23
2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC):	24

IV.

<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	29
1. CULTIVOS CELULARES:	29
2. PURIFICACIÓN:	30
3. ELECTROFORESIS EN GEL:	33
4. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VISIBLE): 34	
5. ENSAYO BRADFORD:	35
6. ENSAYO DE ACTIVIDAD:	37
7. FPLC:	37
8. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC):	39

V.

<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	45
--	----

VI.

<u>SUMMARY AND CONCLUSIONS</u>	49
---	----

VII.

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	53
----------------------------------	----

OBJETIVOS

I. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado (TFG) es la puesta a punto y optimización de un procedimiento de expresión y purificación preparativo de la enzima recombinante glutatión S-transferasa humana unida a un segmento de 6 histidinas en su extremo N-terminal. En dicho procedimiento se estudiarán las condiciones más adecuadas para la obtención de la máxima cantidad de proteína y pureza mediante el uso de una matriz de afinidad con iones Co^{2+} .

La pureza de la proteína purificada se examinará mediante electroforesis en SDS, cromatografía FPLC y medidas de actividad. Una vez puesto a punto el procedimiento de purificación se realizarán algunos ensayos de estabilidad térmica mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y sus resultados serán comparados con los determinados para la enzima en ausencia de la cola de histidinas.

***ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS***

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La producción de proteínas recombinantes constituye una de las aportaciones más importantes de la biotecnología moderna. Esta tecnología surgió hace unos 30 años con el objetivo de obtener proteínas de uso terapéutico en grandes cantidades, sin necesidad de que provengan de una fuente animal (Hamada *et al.*, 1994).

Las células poseen una gran cantidad de enzimas capaces de transformar una amplia variedad de compuestos con diferentes estructuras químicas y funciones, reduciendo o eliminando en muchos casos su posible toxicidad. Entre las enzimas presentes en las células y con capacidad protectora se encuentran las Glutathion S-Transferasas (GSTs). Estas enzimas presentan numerosas funciones, entre las que destacan la de actuar como catalizadores en la conjugación de una amplia variedad de compuestos electrofílicos, incluyendo agentes citotóxicos. Estas enzimas en humanos parecen estar implicadas en procesos de resistencia a fármacos anticancerígenos, ya que éstos son considerados por ellas como tóxicos y son eliminados. Concretamente, estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del sustrato fisiológico, glutatión reducido o GSH (L- γ -glutamil-L-cystenil-glicina), sobre compuestos electrofílicos tanto de naturaleza endógena como exógena (tóxicos ambientales, pesticidas,...) (Jakoby, 1978; Mannervik, 1985).

Estas proteínas han sido purificadas a partir de numerosas fuentes como plantas, peces, insectos, hongos, levaduras y bacterias (Wilce & Parker, 1994). No obstante, hoy día los estudios con ellas se realizan utilizando técnicas de ADN recombinante, en lugar de purificarlas a partir de fuentes naturales. La bacteria más ampliamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes, es *Escherichia coli* (*E. coli*) ya que presenta crecimiento rápido en medios sencillos y se conoce bastante bien su genoma y metabolismo. Además se tienen varios plásmidos (o vectores de expresión que contienen la información genética de la proteína a analizar) bien establecidos para la obtención de proteínas recombinantes terapéuticas.

La detoxificación de xenobióticos en las células transcurre de forma espontánea en 3 fases principales: en la primera fase, los xenobióticos son activados mediante la adición de un grupo funcional (por reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis), y en la segunda fase, estos compuestos, hidrofóbicos o no polares, se convierten en sustancias más solubles en agua y, por tanto, menos tóxicas para el organismo, debido a la conjugación de dichos xenobióticos activados con sustratos endógenos solubles como glutatión reducido (GSH). En la última fase se produce finalmente la eliminación o excreción de las células de estos compuestos conjugados o glutatiónilados evitando así los posibles efectos citotóxicos producidos por el/los xenobiótico/s. Sin embargo, el proceso de conjugación de los xenobióticos activados con GSH es más eficaz cuando intervienen las glutatión S-transferasas (GSTs) (Figura II-1). En este caso, las GSTs actúan como catalizadores biológicos de la reacción de conjugación, incrementando la solubilidad de los compuestos tóxicos. En este tipo de reacciones los sustratos (xenobióticos) suelen ser altamente electrofílicos, de modo que el GSH impide que éstos se unan covalentemente a macromoléculas intracelulares con el consiguiente efecto irreversible. De este modo los sitios electrofílicos quedan neutralizados y los compuestos tóxicos se hacen más solubles, siendo más fácil su posterior eliminación.

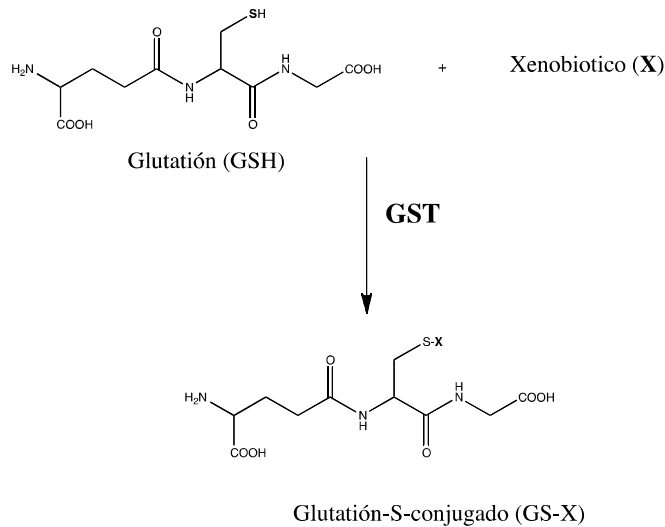


Figura II-1. Conjugaci3n del glutati3n reducido (GSH) con un xenobi3tico gen3rico, catalizado por la GST, resultando la formaci3n de un glutati3n-S-conjugado (Townsend & Tew, 2003).

La estructura b3sica de las subunidades de las GSTs est3 formada por dos dominios: el dominio N-terminal, que constituye aproximadamente la tercera parte de la subunidad, con una estructura $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ y cuyo centro est3 compuesto por 3 l3minas beta situadas entre h3lices alfa ($\alpha/\beta/\alpha$) (Figura II-2), y el dominio C-terminal que compone los otros dos tercios de la prote3na y est3 constituido por varias h3lices alfa, cuyo centro consiste en la agrupaci3n de 4 h3lices alfa.

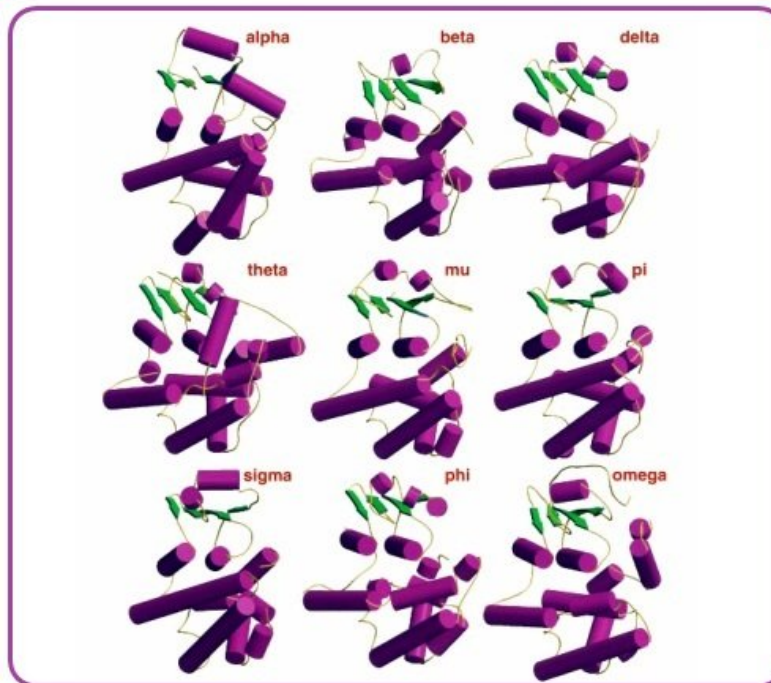


Figura II-2. Estructura com3n de las GSTs. Las h3lices est3n representadas como cilindros y las l3minas beta est3n representadas como flechas.

El dominio N-terminal contiene el sitio de unión del GSH, también llamado sitio G (ver Figura II-3), y cuya unión al sustrato GSH se establece fundamentalmente mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, mientras que el dominio C-terminal contiene el llamado sitio H (ver Figura II-3) y proporciona los elementos estructurales para el reconocimiento del segundo sustrato (cosustrato). Este sitio H es menos específico que el sitio G, ayudando así a definir la selectividad de cada tipo de GST hacia el cosustrato.

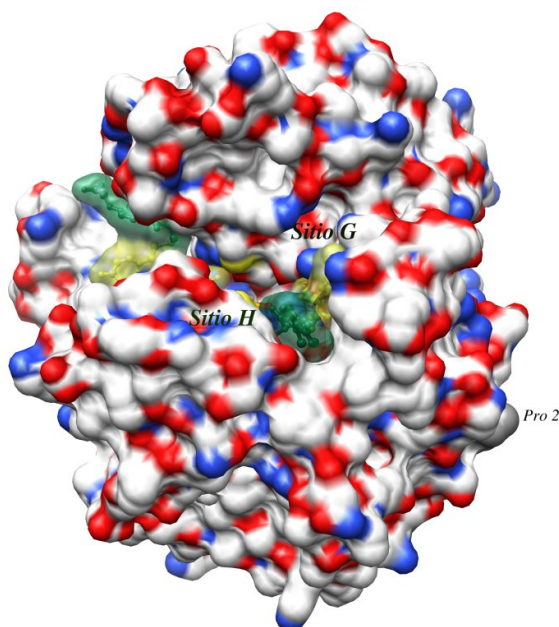


Figura II-3. Representación de los sitios G y H de la subunidad y el residuo prolina en el extremo N-terminal al que se ha unido el segmento de 6 histidinas.

La estructura cuaternaria de casi la totalidad de las GSTs consiste en dímeros formados por la interacción del dominio N-terminal de una subunidad con el dominio C-terminal de la otra. Estas conformaciones diméricas estabilizan la estructura terciaria de cada una de las subunidades. Estas isoenzimas existen como homodímeros o heterodímeros, con una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y con un sitio G y un sitio H por monómero, donde se encuentran una serie de residuos muy conservados (como Tyr, Ser, Cys,...). Las isoenzimas citosólicas se clasifican en al menos 7 familias (*alpha*, *kappa*, *mu*, *pi*, *sigma*, *theta* y *zeta*) diferenciadas en su secuencia de aminoácidos, sus propiedades inmunológicas y su papel fisiológico (Mannervik & Danielson, 1988; Oakley *et al.*, 1997; Allardyce *et al.*, 1999).

En la GST humana de la clase *pi* (hGST P1-1), al igual que la de las clases *alpha*, *mu* y *sigma*, el grupo hidroxilo del residuo tirosina (Tyr-7) participa activamente en el mecanismo de reacción, interaccionando con el grupo tiol del GSH y reduciendo su pK de 9 a 6-7 debido a la formación del complejo GSH-hGSTP1-1 en el que el protón del grupo tiol es liberado al medio (Caccuri *et al.*, 1999). Esta hGST P1-1 (Figura II-3) se encuentra en el núcleo celular y está asociada con la protección del

ADN frente al daño inducido por la doxorubicina (antibiótico antraciclino contra las células cancerosas), proporcionando resistencia a diversos fármacos anticancerígenos. La expresión de la hGST P1-1 es elevada en algunos tumores humanos como cánceres de pulmón, colon, ovarios, testículos, vejiga, bucal y riñón. Por lo tanto, conocer la estructura cristalina de las GST y su sitio de unión del GSH, junto con el desarrollo de análogos del GSH, permite el desarrollo de competidores e inhibidores intracelulares que pueden evitar la acción de estas enzimas en los tejidos tumorales además de mejorar la acción de los compuestos alquilantes en el tratamiento del cáncer (Hayes *et al.*, 2005; Sheeman *et al.*, 2001). Conocer en profundidad la función de esta enzima y el modo de interacción con ligandos es fundamental para poder desarrollar e investigar en posibles fármacos que actúen mitigando los procesos de resistencia generados por esta enzima.

Para realizar estudios químico-físicos son necesarias grandes cantidades de proteína y de elevada pureza. En este sentido, establecer procedimientos de sobreexpresión y purificación a gran escala constituye un punto básico para el desarrollo de cualquier estudio posterior.

EXPERIMENTAL

III. EXPERIMENTAL

1. MATERIALES Y REACTIVOS.

1.1. Cultivos celulares:

- LB (*Luria-Bertani*): 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl.
- Ampicilina (0,1 g/mL).
- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, IPTG 125 μ g/mL.
- Tris 50 mM, pH 8.
- Vasos de precipitado, Matraces Erlenmeyer y botellas de 2 L (2). Matraz Erlenmeyer de 250 mL. Probeta de 100 mL (1). Puntas para las micropipetas (grandes y pequeñas). Frasco (1) con 250 mL de medio de cultivo. Tubos Falcon.
- Campana de flujo laminar (Steril-Gemini).
- Centrífuga y rotor SLA-3000 (Sorvall).
- Placa agitadora orbital (Selecta).
- Balanza de precisión (Thermo).
- Autoclave (Selecta).

1.2. Purificación:

- Extracto de células (conservadas a -80 °C).
- Sonicador (Hielscher Ultrasonics UP400S).
- Tampón unión: Tris 50 mM, NaCl 500 mM a pH 8.
- Tampón de conservación de la proteína: Fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7.
- Centrífuga y rotores SLA-3000 y SS-34 (Sorvall).
- Columna con lecho de Cobalto HisTALON (GE Healthcare).
- Sistema de purificación ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare).
- Reactivo Bradford: Quick Start Bradford (Bio-Rad).
- Gradillas, tubos de ensayo, micropipetas y puntas.
- Concentradores Centriprep 30 (Millipore).

1.3. Electroforesis en gel:

- Geles para electroforesis en SDS al 12 % (Bio-Rad).
- Equipo para electroforesis Mini Protean II y fuente de alimentación (Bio-Rad).
- Disolución de la muestra: Tris 0,5 M pH 6,8 (1 mL), Glicerol (0,8 mL), SDS 10% (1,6 mL), 2-mercaptoetanol (0,4 mL), Azul de bromofenol (0,05 % p/v) (0,2 mL) y agua destilada hasta 8 mL.
- Tampón de desarrollo: Tris 0,125 M, Glicina 1 M y SDS 5 %, a pH 8,3.
- Colorante (azul de Coomassie) (Merck).
- Disolución de fijación/destinción: Metanol 40 % y ácido acético 7 %.
- Disolución de tinción: metanol 40 %, ácido acético 7 % y azul de Coomassie al 0,1 %.

1.4. Medidas de la concentración de proteína:

- Espectrofotómetro UV-visible (Thermo Scientific).
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.
- Tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7.
- Reactivo Bradford: Quick Start Bradford (Bio-Rad).
- Agitador de tubos (Ovan).

1.5. Ensayos de actividad:

- Espectrofotómetro UV-visible (Thermo Scientific).
- GSH 10 mM.
- CDNB 20 mM (frasco cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la luz).
- Tampón de actividad: Fosfato potásico 100 mM a pH 6,5.

1.6. FPLC:

- Equipo cromatográfico: FPLC Äkta Basic (GE Healthcare).
- Columna cromatográfica: Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare).
- Tampón de trabajo: Fosfato potásico 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7.

1.7. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC):

- Microcalorímetro VP-DSC (Microcal).
- Tampón para calorimetría: Hepes 10 mM a pH 7,5.

2. MÉTODOS.

2.1. Cultivos celulares:

El sistema más comúnmente utilizado para la expresión y purificación de proteínas recombinantes, y el que se empleará en este trabajo, es *E. coli* (*Escherichia coli*), ya que se trata de un método sencillo, rápido, de bajo coste y que proporciona buenos rendimientos (Kolm *et al.*, 1995; Quesada-Soriano *et al.*, 2011; Lichty *et al.*, 2005). El primer paso consiste en esterilizar los recipientes que se vayan a utilizar para este proceso, evitando así que otros microorganismos (contaminantes) puedan competir con nuestras células. A continuación se procede al cultivo de las células *E. coli* transformadas, en medio LB líquido con una concentración del antibiótico ampicilina (200 µg/mL). A estas células *E. coli* se les ha insertado un plásmido o vector de expresión que contiene la información genética de la proteína de interés, y que además codifica la resistencia al antibiótico utilizado. De este modo, el antibiótico eliminará todos aquellos microorganismos que carezcan de dicho plásmido.

Las células se dejan crecer primero en un precultivo con medio LB líquido y la misma concentración de ampicilina, para después crecerlas en un último cultivo (con mayor cantidad de medio LB líquido pero igual concentración de ampicilina). A este último cultivo se le realizan medidas espectrofotométricas a 600 nm hasta que alcancen

una absorbancia entre 0,5 y 0,6, momento en el cual se le adiciona el inductor IPTG. Estas medidas se realizan para buscar el punto óptimo de las células (cuando hay mayor cantidad de células en buen estado para poder generar nuestra proteína). El inductor permite el comienzo de la expresión de la proteína de interés por lo que se debe mantener el cultivo incubando durante 12-14 h (una noche) a 37 °C. Trascurrido este tiempo se centrifuga todo el volumen de células, equilibrando previamente los recipientes en una balanza. Finalmente, el precipitado obtenido se resuspende en tampón Tris 50 mM a pH 8, y se vuelve a centrifugar, recogiendo nuevamente el sólido.

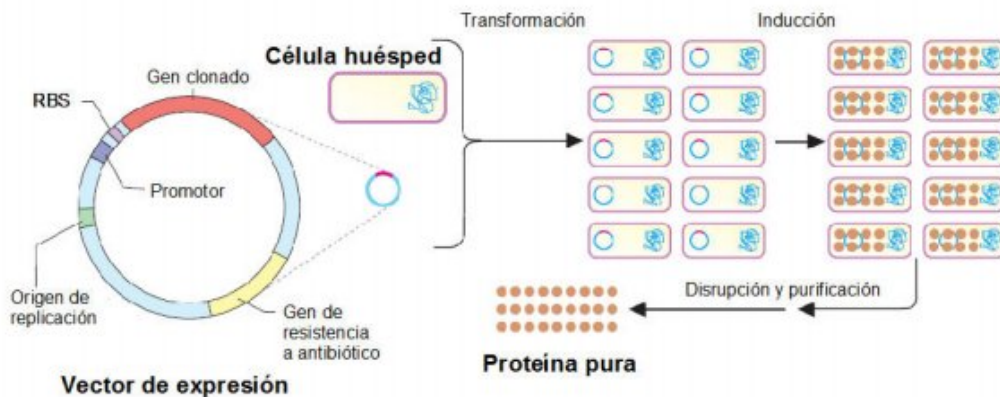


Figura III-1. El vector de expresión (plásmido) se introduce en la célula huésped (en este caso *E. coli*) tras clonar en él el gen de interés (RBS se trata de la secuencia de unión al ribosoma). Las células se multiplican y se induce la expresión de la proteína en el citoplasma de dichas bacterias (con el inductor IPTG). Finalmente tras romper dichas células se purifican del extracto celular.

2.2. Purificación:

Existen varios métodos de purificación de proteínas basados en las diferentes propiedades de las proteínas:

Característica	Procedimiento
Tamaño	Cromatografía de exclusión molecular
Polaridad	Cromatografía de interacción hidrofóbica (fase reversa)
Carga	Cromatografía de intercambio iónico
Selectividad (afinidad)	Cromatografía de afinidad

Tabla III-1. Técnicas cromatográficas más comunes para la purificación de proteínas.

La técnica más utilizada es la de adsorción de proteínas por cromatografía de afinidad, ya que produce mayor rendimiento en tan sólo una o pocas etapas con menor coste. Esto es debido a que en el resto de técnicas se obtienen también otros compuestos con iguales o similares características (tamaño, solubilidad, polaridad o carga), necesiándose otra u otras etapas de eliminación de dichos compuestos no deseados.

La cromatografía líquida de afinidad es una técnica de separación basada en la función biológica o en la estructura química de la biomolécula a purificar, que se puede

utilizar para sustancias contenidas en una mezcla biológica compleja, separando incluso formas nativas de las desnaturalizadas de una misma sustancia.

En este tipo de cromatografía la molécula de interés (por ejemplo, una proteína) es específica y reversiblemente adsorbida por un adsorbente que está formado por un ligando con afinidad por dicha molécula e inmovilizado sobre un soporte sólido o matriz. De este modo, la proteína es retenida por la fase estacionaria (adsorbente) mientras que el resto de compuestos (entre ellos otras proteínas) son eliminados a través de la fase móvil. Finalmente la muestra puede ser separada mediante la elución con una disolución que compita con el ligando desplazando a la proteína de interés. Todas estas etapas se encuentran representadas en la Figura III-2 de forma esquemática.

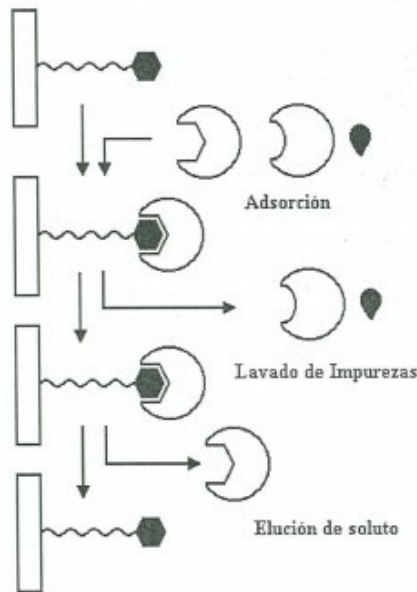


Figura III-2. Etapas de la adsorción de proteínas.

Dentro de los adsorbentes se pueden distinguir ligandos de varios tipos (Figura III-3): bioespecíficos con una especificidad limitada (receptores de hormonas, inhibidores, anticuerpos, etc.) o amplia (lectinas y cofactores), y ligandos pseudoespecíficos donde entrarían tanto moléculas biológicas (como aminoácidos e histidinas) como no biológicas (colorantes de triazinas, brazos hidrofóbicos e iones metálicos). Los más empleados para la cromatografía de afinidad en metales inmovilizados (IMAC), técnica utilizada en este trabajo, son los adsorbentes pseudoespecíficos no biológicos debido a varias ventajas que presentan frente a los ligandos bioespecíficos: pueden ser empleados en un rango más amplio de condiciones de operación, sus condiciones de elución son menos drásticas, son más baratos y se regeneran con mayor facilidad.

Los adsorbentes de IMAC presentan una alta afinidad debido a los complejos que los iones metálicos pueden formar con las proteínas. Con ligandos como iminodiacetato (IDA), N,N,N-tris(carboximetil)-etilendiamina (TED) o ácido nitrilotriacético (NTA) entre otros, inmovilizados en un soporte sólido inerte (normalmente celulosa, agarosa o sílica), los iones divalentes de metales de transición, particularmente Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} , forman complejos de coordinación dando lugar

a quelatos polidentados con sitios de coordinación libres que podrán interactuar con la proteína de interés a través de los grupos imidazol de histidinas.

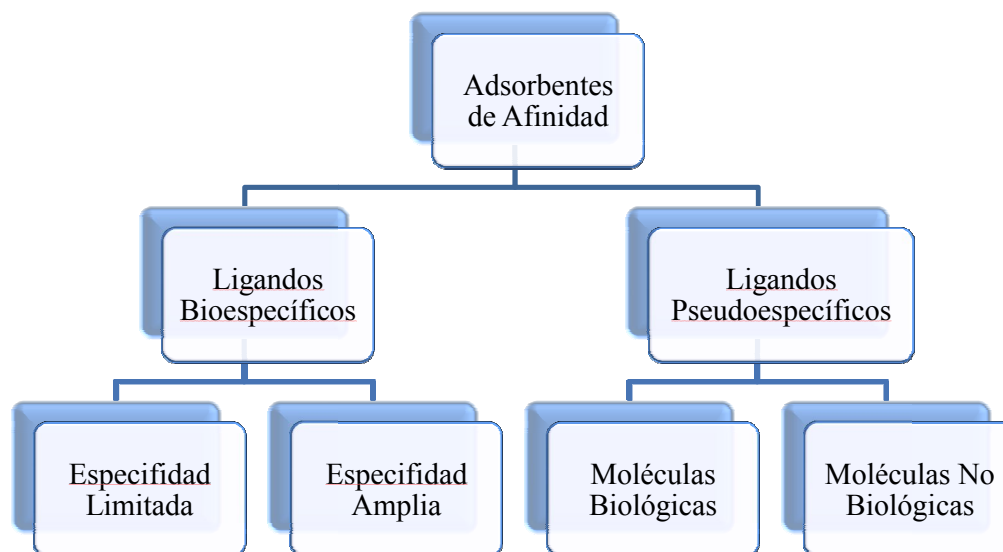


Figura III-3. Tipos de ligandos en adsorbentes de afinidad.

Son muchos los factores que pueden afectar a la selectividad de la unión metal-proteína: pH, fuerza iónica, tipo de metal, densidad del ligando, la vecindad de las histidinas en la superficie de las proteínas, la carga, etc. El diseño de proteínas recombinantes con un péptido fusionado en el aminoácido N-terminal o la sustitución de aminoácidos específicos por histidina en la superficie de la molécula, son sólo algunas de las estrategias utilizadas para la creación de sistemas de expresión de proteínas, los cuales tienen un protocolo de purificación implícito sobre el que se realizan modificaciones para la obtención de mejores resultados.

En este trabajo se purifica hGST P1-1 que contiene un segmento de 6 histidinas (HisGST P1-1) en su extremo N-terminal utilizando una columna (HisTALON Gravity Column) con lecho de Co^{2+} (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) (Block *et al.*, 2009), acoplada a un sistema compacto de separación por cromatografía líquida ÄKTA Prime Plus (Figura III-4).

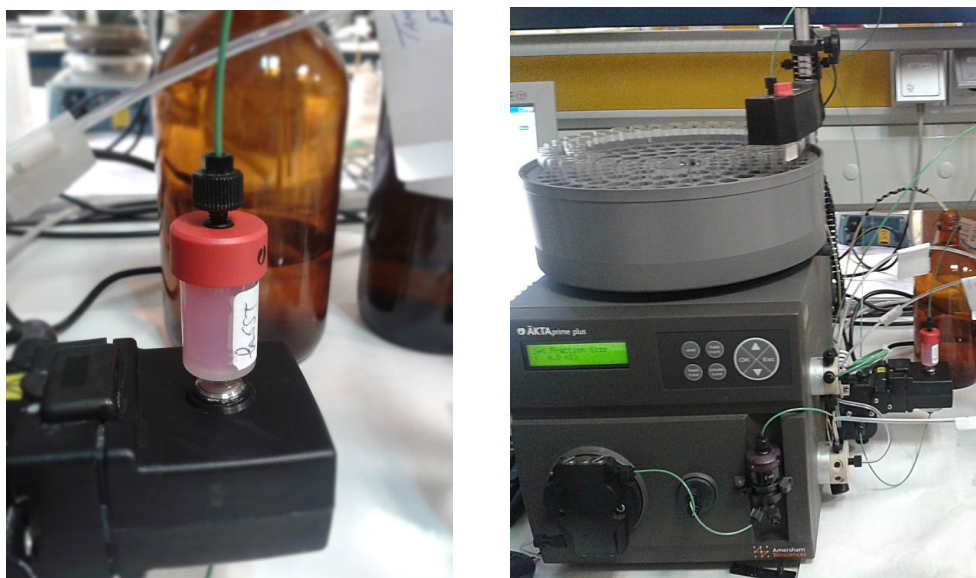


Figura III-4. Vista general de la columna cromatográfica HisTALON (imagen izquierda) y del equipo de cromatografía (imagen derecha) ÄKTA Prime Plus.

El volumen de la columna utilizada fue de 5 mL y el flujo aplicado en todas las etapas de la purificación de 0,5 mL/min. Esta columna está formada por partículas de agarosa reticuladas con un grupo quelante inmovilizado (Porath & Olin, 1983; Porath *et al.*, 1975). El agente quelante (denominado comercialmente como TALON) es un ligando tetradentado cargado con iones Co^{2+} , al cual se coordinan con una gran selectividad las histidinas (Knecht *et al.*, 2009), que es compatible con todos los reactivos usados normalmente en la técnica IMAC (Tabla III-2) y que permite trabajar tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. Las condiciones utilizadas en este trabajo son nativas y por tanto toda la purificación se realiza en cámara fría.

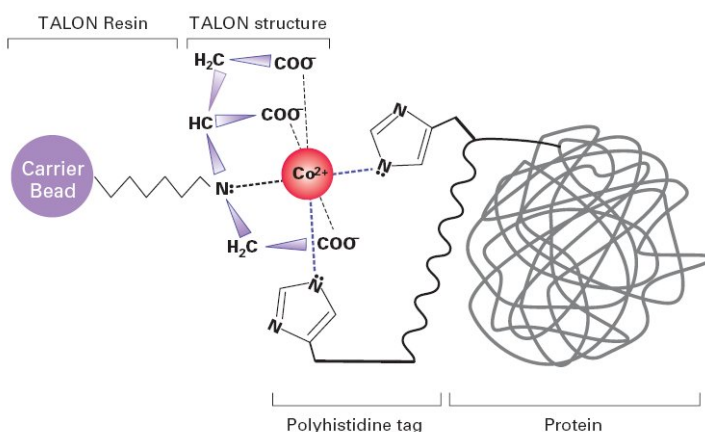


Figura III-5. Diagrama de la interacción del lecho la columna HisTALON con el segmento de histidinas terminal de una proteína.

Reactivo	Concentración aceptable
2-mercaptoetanol	10 mM
CHAPS, SDS, sarcosil	1%
Etanol & Etilenglicol	30%
HEPES	50 mM
Glicerol	20 %
Hidrocloruro de guanidina	6 M
Imidazol	≤ 500 mM at pH 7,0 to 8,0, para elución
KCl	500 mM
MES	50 mM
MOPS	50 mM
NaCl	1 mM
NP-40	1 %
TRIS	50 mM
Triton TM -X 100	< 1%
Urea	8 M

Tabla III-2. Reactivos compatibles con la columna TALON.

Antes de iniciar la purificación se deben romper las células (lisis celular) ya que la proteína que nos interesa se encuentra en su interior. La ruptura de estas células se realiza mediante sonicación por ultrasonidos y en frío. Una vez finalizada la etapa de sonicación se centrifuga todo el extracto celular recogiendo el sobrenadante, el cual se coloca en el sistema de inyección de muestras del sistema de purificación (ÄKTA Prime Plus). Se ensayaron dos procedimientos de purificación: 1) en gradiente (0 mM a 200 mM de imidazol) y 2) en escalón (con imidazol 200 mM). En ambas purificaciones se monitoriza y se registran todos los pasos de la purificación:

- *Equilibrado:* Previamente a la inyección de la muestra, la columna se equilibra con tampón de unión, pasando por ella al menos 5 volúmenes de columna (5x5 mL).

- *Toma de muestra:* La muestra, en tampón de unión, se introduce automáticamente mediante el sistema de inyección correspondiente y va pasando por la columna a flujo constante. La proteína quedará retenida (unida) a la matriz de la columna, y el resto de componentes de la muestra serán arrastrados por el tampón.

- *Lavado 1:* Una vez pasado todo el extracto celular, se hace pasar al menos 2 volúmenes de columna (10 mL) de tampón de unión para eliminar los posibles restos que hayan quedado, dejando así nuestra proteína retenida en la columna.

- *Elución:* A continuación se libera la proteína de la matriz de la columna haciendo pasar por ésta el tampón de elución (gradiente o escalón).

- *Lavado 2:* Finalmente se hace un lavado total de la columna dejando que pase tampón de elución por la columna para eliminar restos de la proteína u otras proteínas que hayan podido quedar fuertemente retenidas al lecho de la columna.

La salida de la columna, de todos los pasos anteriores, es siempre fraccionada y recogida en un colector de fracciones asociado al equipo de purificación.

2.3. Electroforesis en gel:

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. La carga neta que presentan todas las proteínas a cualquier pH distinto al de su punto isoelectrico le otorga esa capacidad de migrar en presencia de un campo eléctrico, pero lo hacen a distintas velocidades según su carga y la forma de la molécula, por lo que esta técnica se puede utilizar tanto para la separación como para la identificación de algunas proteínas.

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), técnica conocida como SDS-PAGE. A su vez, dentro de este método el más empleado es el de Laemmli (Laemmli, 1970), en el que se utiliza un gel separador donde se realiza la separación de las proteínas en función de su masa molecular, y un gel apilador o compactador donde se aplica la muestra, ambos con pH y porosidad distintos (Figura III-6). Este es el método empleado en este trabajo.

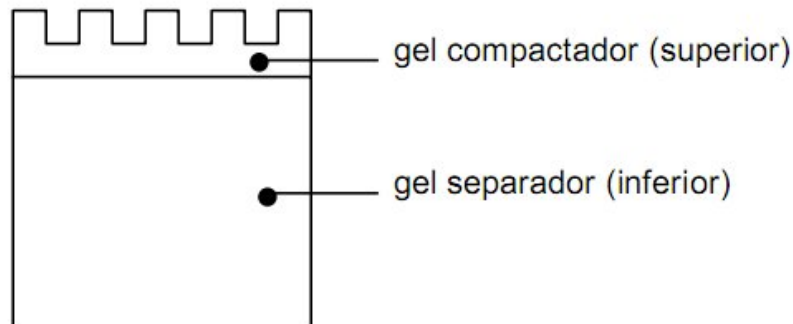


Figura III-6. Esquema general de un gel de SDS-PAGE, compuesto por dos geles de distinta porosidad y pH, los cuales cumplen funciones distintas para aumentar el poder de resolución.

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. Se forman por copolimerización de acrilamida con la bisacrilamida, en una reacción iniciada por la descomposición de persulfato de amonio, la cual está catalizada por TEMED (tetrametiletilendiamina). El SDS provoca la desnaturalización de la proteína debido a su capacidad para unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante (1,4 gramos de SDS por cada gramo de proteína). Luego en estas condiciones existe una relación directamente proporcional entre la movilidad de la proteína y la masa molecular de las subunidades que la constituyen.

El montaje (Figura III-7) se realiza siguiendo una serie de pasos, en los cuales se ensamblan seguidamente los siguientes elementos:

Gel de poliacrilamida
 ↓
 Placas de vidrio
 ↓
 Bloque de plástico
 ↓
 Núcleo de electrodos
 ↓
 Cubeta rellena de tampón



Figura III-7. Esquema (izquierda) e imagen (derecha) del montaje de la cubeta de electroforesis.

En el gel se aplican pequeñas alícuotas de las fracciones a examinar (toma de muestra, lavado, elución, extracto de proteína, proteína dializada y un marcador que contiene una serie de proteínas de diferente masa molecular en el intervalo de la masa molecular de nuestra proteína). Si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol (u otro reductor como el ditiotreitól), los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados (reducidos), de modo que las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales. La movilidad electroforética relativa está relacionada con el logaritmo de la masa molecular. Realizando un gráfico con los estándares de masa molecular conocida se obtiene una línea patrón en la cual se pueden interpolar muestras de masa molecular desconocida. La movilidad se puede evaluar de distintas formas, siendo una de ellas, simplemente midiendo la distancia recorrida (en mm) por la banda desde el pocillo. Representando esta distancia, para cada una de las proteínas patrón, frente al logaritmo de la masa molecular se obtiene la recta patrón.

2.4. Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-visible):

Un espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una disolución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa la muestra, un electrón absorbe dicha energía y es promovido del estado fundamental a un estado excitado, para finalmente volver a su estado inicial emitiendo parte de esa energía absorbida. La fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia ($T = I/I_0$), pero por efectos prácticos se utiliza, en su lugar, la absorbancia ($A = -\log T$).

Para la determinación espectrofotométrica de la concentración de nuestra proteína, y debido a que las proteínas absorben en la región ultravioleta (alrededor de 280 nm), se utilizan en nuestro caso cubetas de cuarzo, ya que no absorben radiación en esta región y por tanto no causan interferencias en la medida. El equipo con el que se ha trabajado es de doble haz, por lo que la medida se realiza frente a una referencia constituida únicamente por el tampón que contiene a la proteína, en nuestro caso, tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7. De este modo en el espectro obtenido se observa un pico característico alrededor de 280 nm correspondiente a nuestra proteína.

Una vez obtenida la absorbancia a 278 nm y siguiendo la Ley de Lambert-Beer, se puede estimar la concentración de nuestra proteína, C :

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Siendo “ A ” la absorbancia en el punto máximo del espectro, “ ε ” el coeficiente de extinción molar (el cual es característico para cada sustancia, y tiene un valor de $54.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 278 nm), “ l ” la longitud de la cubeta ($l = 1 \text{ cm}$) y “ C ” la concentración de proteína en la disolución.

2.5. Ensayo Bradford:

Se trata de un ensayo colorimétrico de cuantificación de proteínas basado en el cambio en el máximo de absorbancia cuando un colorante hidrofóbico (Azul de Coomassie G-250 “reactivo Bradford”), interacciona con la proteína formando un complejo de color azul (Figura III-8) (Bradford, 1976). Esto es debido a que la unión del colorante a la proteína estabiliza la especie aniónica de color azul, la cual es detectada a 595 nm. Para que esto ocurra, la proteína debe tener residuos de aminoácidos básicos o aromáticos. Este ensayo es más sensible frente a la presencia de contaminantes en las muestras de proteínas en comparación con otros ensayos de cuantificación de concentración de proteínas, y además requiere de la realización previa de diluciones de las muestras antes de su análisis. Sin embargo, es un método que se lleva a cabo con mayor rapidez y facilidad, a la vez que presenta mayor sensibilidad que las medidas de absorbancia a 280 nm (Ramagli & Rodriguez, 1985). Del mismo modo, se obtiene una medida de la concentración de proteína más exacta que en el caso del ensayo espectrofotométrico. La intensidad del color del complejo formado depende de la concentración de la proteína en la muestra. Por tanto, la cantidad de complejo presente en la solución es una medida de la concentración de proteína. Esta concentración se obtiene interpolando a partir de una recta patrón.

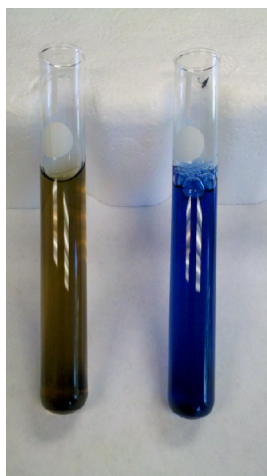
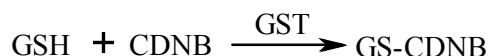


Figura III-8. Tubos que contienen: reactivo Bradford sin proteína (izquierda), y reactivo Bradford y proteína (derecha).

2.6. Ensayo de actividad:

La actividad enzimática es una medida de la cantidad de enzima activa presente en la muestra y del nivel de actividad de la misma. Una unidad usualmente utilizada es la actividad específica, referida a la actividad de una enzima por miligramo de proteína. Ésta es dependiente de condiciones como la temperatura, pH y concentración, por lo que conviene fijar y trabajar siempre bajo dichas condiciones establecidas. La medida de actividad enzimática de GST se realizó según los métodos descritos por Habig y Jakoby (Habig *et al.*, 1974; Jakoby & Habig, 1980), siguiendo espectrofotométricamente la absorbancia a 340 nm producida por la absorción en la región visible del complejo formado en la reacción.

La reacción general que cataliza la GST es (Salinas & Wong, 1999):



La formación del complejo GS-CDNB (amarillento) es muy rápida en presencia de dicha enzima, por lo que debe realizarse la mezcla de ambos sustratos inmediatamente antes de la realización de la medida en el espectrofotómetro. Una vez realizada una medida a un blanco que contiene únicamente el tampón, se realiza la medida a la muestra de proteína (con GSH y CDNB) monitorizando la absorbancia a 340 nm en función del tiempo.

De la pendiente del tramo lineal se obtiene la velocidad de la reacción que corresponde a la actividad. La unidad de actividad (U) se define como los micromoles de producto formado en 1 minuto en las condiciones óptimas del ensayo (temperatura, pH, concentración de sustrato, etc...). La pendiente inicial (en el tramo comprendido entre t_1 y t_2 , 30 segundos aproximadamente) deducida espectrofotométricamente se expresa como $\Delta A_{340}/\text{min}$. Utilizando la ecuación de Lambert-Beer, el coeficiente de extinción para el producto (GS-CDNB) a 340 nm ($\epsilon_{340} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el espesor de la cubeta (1 cm), se deducen las unidades de actividad (U). Para la obtención de una buena linealidad durante la duración del ensayo son necesarios aprox. 1-2 μg de enzima. La actividad específica (U/mg) será el cociente entre el número de unidades y los mg de proteína en el ensayo, y se calculará mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} \left(\frac{U}{\text{mg}} \right) = \frac{A_{340}(t_2) - A_{340}(t_1)}{(t_2 - t_1) \cdot \epsilon_{340} \cdot (\text{mg GST})}$$

2.7. FPLC:

La técnica cromatográfica de FPLC (Fast Pressure Liquid Chromatography) está basada en los cromatógrafos líquidos de alta resolución (HPLC) a presiones no demasiado altas.



Figura III-9. Equipo cromatográfico de FPLC ÄKTA Basic (GE Healthcare)

Se ha utilizado, en nuestro caso, una columna de exclusión molecular o tamiz molecular (Superdex 200 10/300 GL). Se trata de una cromatografía líquida en la cual una mezcla de proteínas es separada en base a su retención (dependiente de la masa molecular) en la fase estacionaria utilizando como fase móvil la correspondiente disolución tampón. En nuestro caso, el cromatograma resultante muestra la señal detectada (absorbancia a 280 nm) frente al tiempo de retención (o volumen de retención). Comparando con la recta patrón correspondiente en la que se representa el $\log M_w$ frente al tiempo de retención en min (t_r) o volumen de retención, se puede estimar, la masa molecular de nuestra proteína.

2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC):

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una herramienta muy útil para los estudios de predicción del mecanismo del plegamiento de las proteínas, así como para determinar la estabilidad térmica de las proteínas y estudiar los factores que afectan a dicha estabilidad. También nos da información acerca de la reversibilidad del proceso de desplegamiento térmico de la proteína en cuestión, además de otras cuestiones, como por ejemplo, el efecto que provoca la presencia de un ligando sobre la estabilidad de la proteína a analizar (Quesada Soriano *et al.*, 2006). Esta técnica proporciona información termodinámica de interés, fundamentalmente en el caso en que el proceso de desplegamiento térmico inducido sea reversible.

Consiste en calentar una muestra (por ejemplo, una proteína) y una disolución de referencia a igual temperatura y a una cierta velocidad de barrido (K/min). Al calentar ambas celdas (muestra y referencia) se produce una transición inducida por la temperatura (por ejemplo, la desnaturalización de una proteína) y la muestra absorbe parte del calor que se le está suministrando a la celda. Como resultado, la célula de la muestra tendría una temperatura algo inferior a la de la celda de referencia, pero el sistema de control del equipo suministra una potencia calorífica adicional para que ambas mantengan la misma temperatura. Esta potencia en exceso es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre las dos celdas y sus contenidos. De esta forma se obtiene la capacidad calorífica del soluto en función de la temperatura (Figura III-10) (Sánchez-Ruiz, 1992).

Para obtener la traza calorimétrica final (“Traza resultante” en la Figura III-10) es necesario realizar una serie de pasos que esquematizamos en la Figura III-10. Inicialmente, en cualquier experimento de este tipo, hay que registrar la traza calorimétrica correspondiente a la disolución tampón que contenga a la proteína (llamada “línea base instrumental” en la Figura III-10) y posteriormente registrar la traza correspondiente a la proteína (llamada “muestra” en la Figura III-10). A continuación, con ayuda del software proporcionado por el instrumento, restamos la línea base instrumental de la traza de la proteína y normalizamos los datos de capacidad calorífica introduciendo el valor de la concentración utilizada (ver Figura III-10). Finalmente, hay que corregirle a la traza, la que se llama línea base química. Existen distintas formas de trazar esta línea base siendo la más utilizada la llamada “spline correction” que consiste básicamente en trazar una línea base con “cierta curvatura” en la zona del pico que simule de forma suave la tendencia de la señal en la zona de la transición. Estas correcciones las realiza de forma automática el software de análisis correspondiente. Una vez corregida la señal aparecerá la gráfica de DSC final (ver Figura III-10).

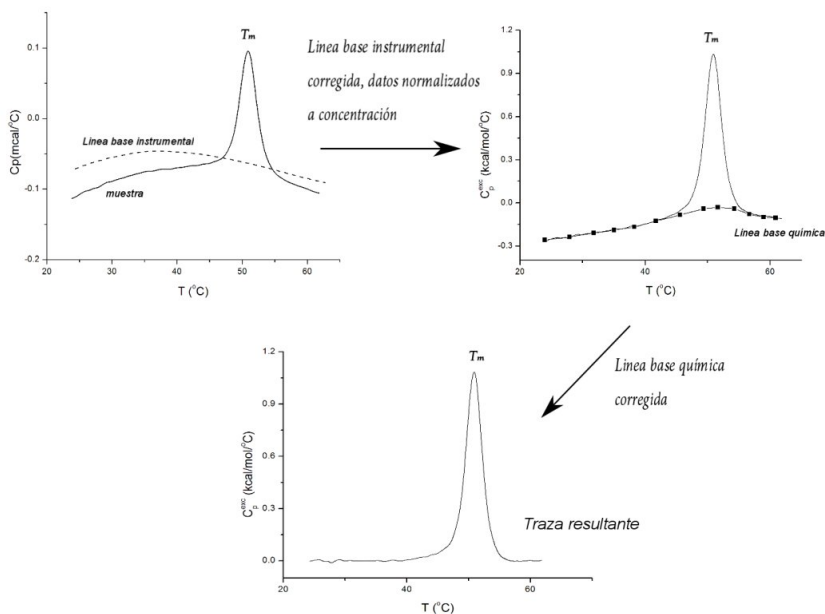


Figura III-10. Traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Correcciones de línea base instrumental y química.

En este trabajo se realiza un experimento con la proteína purificada, y seguidamente con otra alícuota de proteína a la misma concentración que antes y a la que se le adiciona como ligando GSH a 1 mM. El máximo de cada pico representa la temperatura máxima a la cual se desnaturaliza térmicamente la proteína, de modo que comparando en ambas gráficas se puede deducir si la presencia de ligando estabiliza o no a la proteína pura. Cuando mayor sea la afinidad del ligando por la proteína, tanto mayor va a ser el desplazamiento en el valor del máximo de la curva de capacidad calorífica (Ortiz-Salmerón *et al.*, 2001; Ortiz-Salmerón *et al.*, 2003).

Además, se puede examinar la reversibilidad de la proteína recalentando la muestra inmediatamente después de enfriar la celda con la muestra que se calentó en el primer barrido. Con esto se demuestra si el sistema vuelve al estado inicial (nativo) después del enfriamiento. Para evitar en muchos casos de irreversibilidad, que la proteína se desnaturalice y que simplemente el calentamiento produzca el desplegamiento, es frecuente, cortar la traza al pasar el máximo del pico y enfriar inmediatamente la muestra para realizar seguidamente un segundo barrido. En algunos casos, este corte en el barrido de temperatura, sin dejar que se resuelva el pico en su totalidad, no evita que el desplegamiento esté asociado a la desnaturalización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este Trabajo Fin de Grado (TFG) se ha sobreexpresado y purificado la proteína hGST P1-1 que tiene unida en la prolina de su extremo N-terminal un segmento de 6 histidinas (HisGSTP1-1) utilizando bacterias *E. coli* transformadas. Tras la sobreexpresión se ensayaron dos procedimientos de purificación mediante cromatografía de afinidad y se caracterizó la proteína purificada por varios métodos.

Existen varios métodos de purificación de proteínas (cromatografía de intercambio iónico, de absorción, de exclusión molecular, de afinidad y precipitación), pero se ha observado que el más eficaz es el de afinidad, debido a que se trata de una técnica de purificación que produce mayores rendimientos en tan sólo una etapa.

Aunque esta proteína sin modificar es comúnmente purificada con rendimiento y pureza elevada mediante cromatografía de afinidad en una columna derivatizada con GSH, uno de los dos sustratos de la reacción (Egaas *et al.* 1994; Hoarau *et al.*, 2002; Singhal *et al.* 1992; 1996), en este trabajo se examina un procedimiento de purificación alternativo, utilizando una proteína modificada en su extremo N-terminal, que puede ser de utilidad para aplicarlo como estrategia de purificación en mutantes cuya mutación afecte a la afinidad de unión hacia el GSH y para los que el procedimiento tradicional sería inadecuado.

La cola de histidinas acoplada al extremo N-terminal de la proteína le otorga una cierta afinidad por los iones Ni^{2+} y Co^{2+} . En este caso, se ha utilizado una columna comercial TALON cargada con iones Co^{2+} . Debido a que la proteína de interés es la única que contiene una etiqueta-His, interaccionará con el ión metálico de la matriz mientras que el resto de las proteínas no se unirán o muy débilmente y serán eluidas de la columna durante el paso de la muestra (extracto). Finalmente la proteína es eluida con una solución de imidazol que compete con el ión metálico por las histidinas presentes en dicha proteína.

A continuación se indican todos los pasos y procedimientos seguidos.

1. CULTIVOS CELULARES:

- Preparación de medios de cultivo:

Se preparan 4,5 L del medio de cultivo LB: se disuelve cloruro sódico, triptona y extracto de levadura en agua destilada para un volumen de 2 L y se transfiere a una botella de 2 L (este proceso se realiza 2 veces). El medio litro de medio de cultivo restante se realiza enrasando en un matraz de 500 mL y transfiriéndolo a una botella de medio litro. A continuación se introducen todas las botellas con los medios de cultivo y todo el material necesario en la autoclave.

- Siembra de los precultivos:

Se adicionan 100 mL del medio de cultivo en 2 matraces de 250 mL diferentes, y se le añaden 100 μL del antibiótico ampicilina y 4 μL de las células *E. coli* transformadas. Se tapan los matraces con tapones de algodón y papel de aluminio y se

introducen en un incubador a 37 °C y en suave agitación durante 12-14 h (normalmente una noche). Los otros litros con los medios de cultivo se dejan tapados a 4 °C.

- Siembra de los cultivos:

Se adiciona 1 mL del antibiótico ampicilina en las botellas de 2 L que contienen el medio de cultivo y seguidamente se transfiere a un erlenmeyer de 2 L. Se añaden 30 mL del precultivo, se tapan con algodón y papel de aluminio y se dejan en el incubador a 37 °C durante 3 horas, comprobando el crecimiento de las células hasta que la absorbancia a 600 nm se encuentre entre 0,5-0,6. A continuación se adiciona sobre dichos matraces 1 mL del inductor IPTG 0,5 mM, y se dejan en el incubador (tapados) durante 14 h (normalmente una noche).

- Centrifugación de los cultivos celulares:

Se transfieren los cultivos a tubos de centrifuga (equilibrándolos en una balanza, Figura IV-1) y se introducen por parejas enfrentados en el rotor de la centrifuga (SLA-3000, 7000 rpm). Tras cada ciclo centrifugación (20 min) se desechan los sobrenadantes. Finalmente, el precipitado obtenido se resuspende utilizando el mínimo volumen de tampón de resuspensión, Tris 50 mM a pH 8, sobre el mismo tubo de centrifuga que contiene las células. Una vez resuspendidas se dividen en dos fracciones (en tubos Falcon), se equilibran nuevamente en la balanza, y se centrifugan (rotor SLA-3000, 7000 rpm) volviéndose a desechar el sobrenadante. Las dos fracciones del precipitado de células final (Figura IV-1) se congelan a -80 °C hasta su uso posterior.



Figura IV-1. Imagen de la balanza con los medios de cultivo para equilibrar (izquierda) y precipitado de células final (derecha)

2. PURIFICACIÓN:

Cada una de las dos fracciones de células obtenidas en la etapa anterior, se utiliza para cada uno de los dos procedimientos de purificación ensayados.

Se han utilizado dos procedimientos de purificación utilizando cromatografía de afinidad con el fin de conocer los resultados de cada uno y examinar el más idóneo para obtener la máxima cantidad de proteína y con suficiente pureza. En ambos procedimientos se llevaron a cabo siguiendo una serie de etapas:

- 1) Resuspensión de las células en el correspondiente tampón de unión.
- 2) Sonicación de las células.

- 3) Centrifugación.
- 4) Purificación.

Por tanto, antes de iniciar la purificación se redisuelven las células correspondientes a una de las dos fracciones de la etapa anterior en unos 30 mL de tampón de unión (A) y se rompen en frío mediante sonicación. Seguidamente se centrifuga el extracto celular (rotor SS-34, 18000 rpm, 40 min), también en frío, utilizándose el sobrenadante para la purificación de la proteína.

Para los dos procedimientos de purificación (en gradiente y en escalón) se utilizan dos disoluciones tampón: tampón de unión (A) y de elución (B):

- ✓ Tampón de unión (A): Tris 50 mM, NaCl 500 mM para un volumen total de 1 L, a pH 8.
- ✓ Tampón de elución (B): Tris 50 mM, NaCl 500 mM e imidazol 200 mM para un volumen total de 250 mL, a pH 8.

Purificación en gradiente (gradiente de 0 a 200 mM de imidazol):

Se coloca la columna de cobalto en el sistema de purificación, se introduce la muestra en el sistema de inyección de la muestra y se programa el instrumento con los siguientes datos (Tabla IV-1):

	Equilibrado	Toma de muestra	Lavado 1	Elución	Lavado 2
Tampón A	25 mL	-	25 mL	Gradiente lineal	-
Tampón B	-	-	-	(50 mL)	25 mL
Muestra	-	40 mL	-	-	-

Tabla IV-1. Etapas y volúmenes utilizados en las diferentes etapas de la purificación en gradiente de imidazol.

En este caso, en el paso de elución se programa un gradiente lineal de imidazol de 0 a 200 mM con los tampones A y B. Las etapas anteriores las realiza el equipo cromatográfico de forma automática e igualmente, la disolución eluida de la columna durante todo el proceso es recogida automáticamente en un colector en fracciones de 4 mL.

El perfil cromatográfico se muestra en la Figura IV-2:

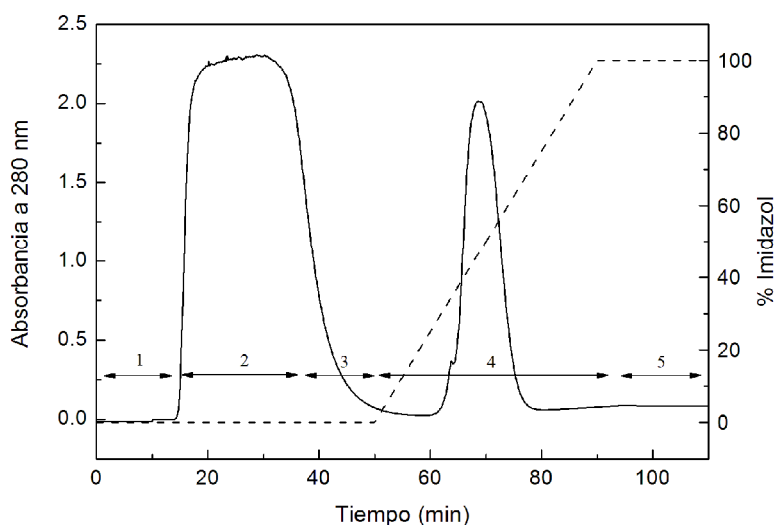


Figura IV-2. Purificación en gradiente (0-200 mM de imidazol). En esta gráfica se han señalado las distintas etapas de la purificación: 1. Pre-equilibrado; 2. Toma de muestra; 3. Lavado 1; 4. Elución; 5. Lavado 2.

Se extraen algunas alícuotas de unos 15 μ L de las fracciones de las etapas de toma de muestra y de elución en distintos tubos de ensayo y se le añaden 200 μ L del reactivo Bradford. La aparición de color azul intenso indicará la presencia de proteína.

Purificación en escalón de imidazol (200 mM de imidazol):

Los tampones a utilizar son los mismos que en el caso anterior y las etapas y volúmenes empleados se indican en la Tabla IV-2.

	Equilibrado	Toma de muestra	Lavado 1	Elución	Lavado 2
Tampón A	25 mL	-	30 mL	-	-
Tampón B	-	-	-	40 mL	10 mL
Muestra	-	50 mL	-	-	-

Tabla IV-2. Pasos y volúmenes utilizados en las diferentes etapas de la purificación en escalón de imidazol.

En este caso, en las etapas de elución y lavado se utiliza el mismo tampón (tampón B).

El procedimiento empleado es el mismo que para la purificación en gradiente anterior, salvo que en este caso, se programa que tras el paso de lavado 1 con el tampón A (etapa 3, en la Figura IV-3) se introduzca directamente (escalón) el tampón B con 200 mM de imidazol:

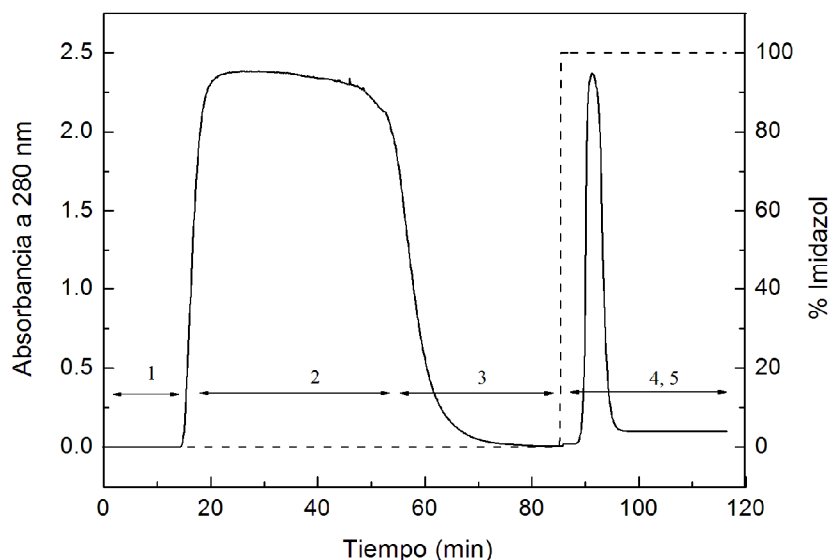


Figura IV-3. Purificación en escalón de imidazol. En esta gráfica se han señalado las distintas etapas de la purificación: 1. Pre-equilibrado; 2. Toma de muestra; 3. Lavado; 4. Elución 200 mM imidazol; 5. Lavado 2.

Una vez recogidas todas las fracciones de los distintos pasos de las dos purificaciones (gradiente y escalón de imidazol), se realiza electroforesis en SDS y una vez identificada la proteína en las fracciones de la elución, se junta, concentra y dializa la proteína eluida en tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7 y se procede a los siguientes ensayos de caracterización. Para conservarla durante tiempo se congela a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. ELECTROFORESIS EN GEL:

Se extraen alícuotas de aproximadamente $50\text{ }\mu\text{L}$ de algunos tubos que contienen la disolución que ha pasado por la columna en las distintas etapas de la purificación. Estas alícuotas las usamos para realizar una electroforesis en SDS (condiciones desnaturizantes). Sobre estas alícuotas (en tubos eppendorf) se adiciona un volumen similar de “disolución de la muestra”. Se introducen en un baño y se calientan durante unos minutos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Así aseguramos la completa desnaturización de las muestras de proteína. Con ayuda de una jeringa Hamilton colocamos, una vez montado todo el sistema de placas para la electroforesis y con tampón de desarrollo (ver Figura III-5 en la sección de Métodos), aproximadamente $10\text{ }\mu\text{L}$ en cada calle del gel. Igualmente en una de las calles colocamos el marcador de masas moleculares (calle 1 en Figura IV-4) y en las calles 6 y 7 (Figura IV-4) la proteína purificada mediante gradiente y en escalón, respectivamente. A continuación se conectan los terminales de los electrodos de la cubeta a la fuente de alimentación a 80 V hasta que el colorante de cada una de las calles se encuentre a poca distancia del extremo inferior del gel, momento en el que se da por finalizada la electroforesis. A continuación procedemos a desmontar las placas y comenzar el revelado y visualización.

- *Visualización de las bandas:*

Se introduce el gel de la electroforesis en el “tampón de fijación” de las bandas (ver Materiales para detalles), y se deja unos minutos. A continuación se traslada el gel a la “disolución de tinción” para comenzar el teñido de las bandas con proteína en cada una de las calles. Pasado un tiempo, se comienza el proceso de destinción con tapón de fijación/destinción.

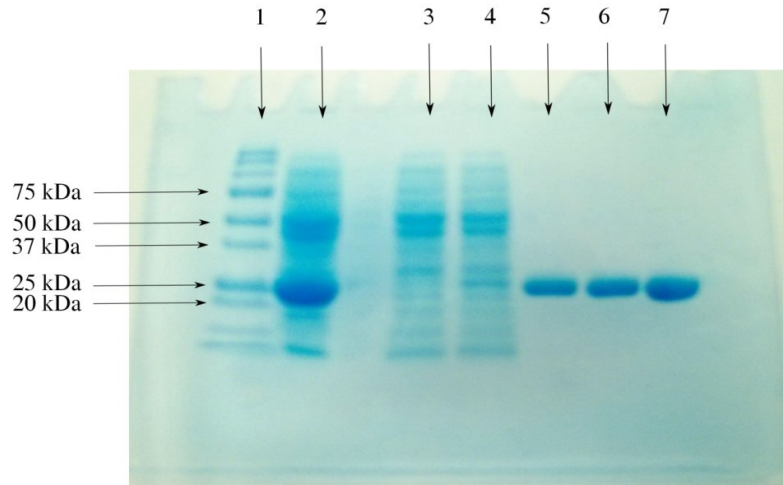


Figura IV-4. Revelado del gel de electroforesis con la proteína HisGST P1-1. Calle 1: Marcador de pesos moleculares conocidos; calle 2: Extracto inicial; calle 3: Toma de muestra (salida de la columna tras el paso del extracto); calle 4: lavado 1; calle 5: Proteína eluida; calles 6 y 7, proteína dializada, resultante de la purificación con gradiente y en escalón, respectivamente.

Dado que la proteína tiene una masa molecular de aproximadamente 25 kDa/subunidad la banda de ésta en el gel debe aparecer sobre esa masa molecular. En la Figura IV-4 se puede observar (calle 2) la presencia de la proteína (banda intensa alrededor de los 20-25 kDa) en el extracto inicial (procedente de la sonicación) que se introduce en la columna. Además las calles 3 y 4 correspondientes a la salida de la columna durante la toma de muestra y al lavado 1, no muestran banda de la proteína. Esto indica por una parte, que tras el paso por la columna nuestra proteína queda retenida (ausencia de la banda en dicha calle) y por otra, que durante el lavado 1 no se eluye la proteína. En cambio, en la calle 5 correspondiente a una muestra obtenida durante la elución, se observa únicamente la banda de la proteína. En las calles 6 y 7, se puede observar la pureza, tanto para la purificación por gradiente como para la purificación en escalón. Por tanto, en principio, la pureza parece ser similar con independencia del procedimiento de purificación a emplear (gradiente o escalón).

4. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VISIBLE):

En una cubeta de cuarzo se introducen 1 mL de tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7 (tampón en el que se encuentra la proteína purificada, concentrada y dializada), y se hace una medida que servirá de referencia. Después, en otra cubeta similar se adicionan 100 μ L de la proteína purificada sobre 1000 μ L del mismo tampón con que se hizo el blanco, y se realiza la correspondiente

barrido espectrofotométrico desde 240 hasta 500 nm. Se sigue el mismo procedimiento en ambas purificaciones, resultando un espectro similar. En la Figura IV-5 se muestra uno de estos espectros. Se observa claramente el pico a aproximadamente 280 nm, característico de las proteínas y debido a la absorción de las tirosinas y los triptófanos.

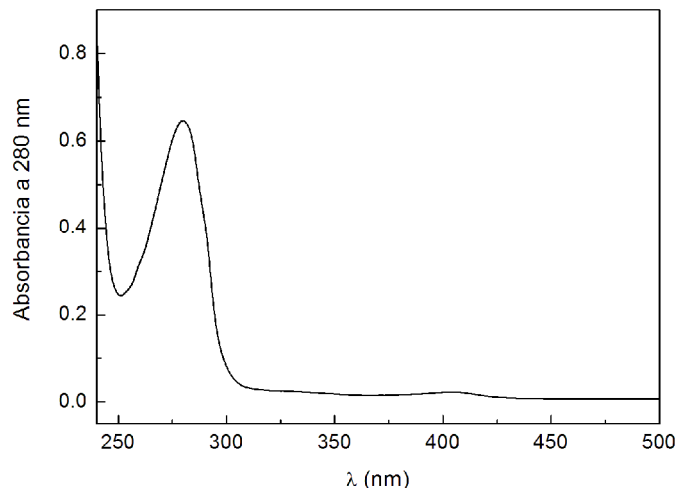


Figura IV-5. Espectro UV-visible de una muestra de proteína HisGST P1-1 purificada en tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7.

Aplicando la ley de Lambert-Beer, y para una absorbancia de 0,649 obtenida para la proteína purificada por gradiente a 278 nm se deduce que la concentración es $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (12 μM). Teniendo en cuenta la dilución que se hizo (100/1100) y el peso molecular estimado para la proteína con la cola de histidinas (49592 g/mol):

$$1,2 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \cdot \frac{1100 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \cdot \frac{49592 \text{ mg}}{\text{mmol}} = 6,55 \text{ mg/mL}$$

Por tanto, para el volumen total de proteína recogido de 5 mL, la cantidad de proteína obtenida, a partir de los 2 L de volumen de cultivo, fue de 32,73 mg para la purificación en gradiente.

Realizando el mismo procedimiento para la proteína purificada por escalón, y con una absorbancia obtenida de 0,950 a 278 nm, la concentración deducida fue 9,52 mg/mL, lo que proporciona una cantidad de proteína (para los 4 mL recogidos) de 38,08 mg para los 2 L de cultivo.

5. ENSAYO BRADFORD:

Inicialmente, antes de proceder a la determinación de la concentración de la proteína mediante este ensayo, se debe realizar la recta patrón correspondiente. Para ello, se utilizan una muestra de disolución de albúmina bovina comercial de concentración conocida (disolución patrón). Se preparan 100 μL de distintas diluciones de esta disolución patrón (según indica el protocolo comercial) en el mismo tampón en el que se va realizar la determinación de la concentración de nuestra proteína (fosfato

sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7). A continuación se añaden 5 mL de reactivo Bradford a cada una de las diluciones, se agitan en un vortex y se dejan en reposo durante 5 min, al cabo de los cuales se determina la absorbancia a 595 nm. En la Figura IV-6 se muestra la recta patrón correspondiente representando la absorbancia frente a la concentración de proteína de cada dilución en mg/mL.

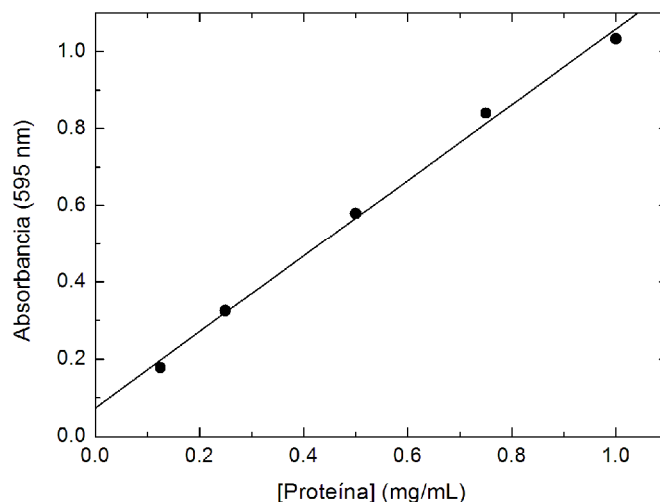


Figura IV-6. Recta patrón para la determinación de la concentración de proteína mediante el reactivo Bradford.

A continuación se procede a la determinación de la concentración de nuestra proteína, operando de forma similar a lo realizado anteriormente. Así, se hacen tres diluciones de la proteína purificada con el tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 5 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7. La primera dilución es 1/10, de la cual se toman 100 μ L, y, en tubo de ensayo, se le añaden 5 mL del reactivo Bradford. Se agita y se deja 5 minutos reposando. Se realiza un blanco en el espectrofotómetro con el reactivo Bradford y, una vez pasados esos 5 minutos, se introduce en el espectrofotómetro la dilución preparada anteriormente. Una vez finalizada la medida de absorbancia, se realiza la misma operación para una dilución 1/75 y otra para una 1/100.

Interpolando el valor medio de la absorbancia a 595 nm para las tres diluciones, la concentración de proteína obtenida para la purificación en gradiente fue de 5,78 mg/mL. Por consiguiente, para los 5 mL de proteína total recogidos a esta concentración, la cantidad de proteína obtenida (en mg) fue 28,93 mg.

Realizando el mismo procedimiento para la proteína purificada por escalón, la concentración deducida fue de 8,42 mg/mL, lo que proporciona una cantidad de proteína (en los 4 mL) de 33,70 mg.

Por tanto, la cantidad de proteína total cuantificada por ambos métodos (espectrofotométrico y Bradford) es similar, tanto para la purificación por gradiente como para la purificación por escalón. Este resultado pone de manifiesto, la validez de cualquiera de los dos métodos como procedimiento de cuantificación de esta proteína.

6. ENSAYO DE ACTIVIDAD:

Se preparan los reactivos para el ensayo (GSH 10 mM, CDNB 20 mM) y tampón de actividad: Fosfato potásico 100 mM a pH 6,5. Así, se pesan 30 mg de GSH en un tubo y se disuelven en 10 mL del tampón de actividad. En otro tubo, se pesan 20 mg de CDNB y se disuelven en 5 mL de etanol puro (se introduce en ultrasonidos durante unos 20 minutos y se deja tapado con papel de aluminio). A continuación se prepara una dilución 1/1000 de la proteína purificada con el objetivo de tener una disolución de proteína lo suficientemente diluida para el ensayo (1-2 μ g).

Una vez preparados los reactivos se procede a la medida de actividad. Se adicionan en una cubeta de plástico 850 μ L del tampón de actividad, 100 μ L de la disolución de GSH, 20 μ L de la dilución de la proteína y, de forma rápida, se adicionan 50 μ L de la disolución de CDNB. Inmediatamente se introduce la cubeta en el espectrofotómetro y se realiza la medida. La Figura IV-7 muestra un registro de uno de los ensayos de actividad.

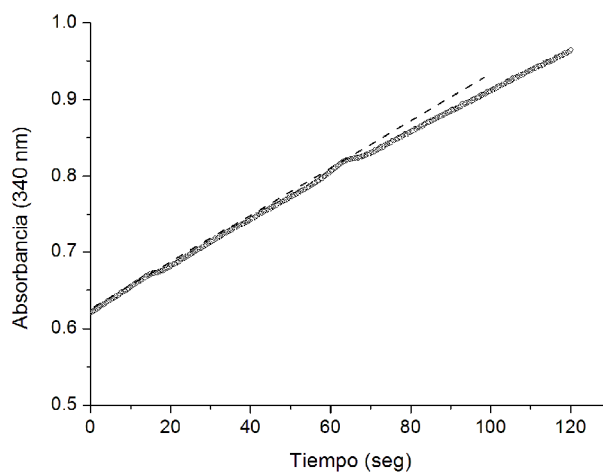


Figura IV-7. Ensayo de actividad de HisGST P1-1.

Las medidas de la actividad específica (U/mg) de la proteína obtenida por gradiente y por escalón fueron de aproximadamente 72 y 83 U/mg, respectivamente. Estos valores, son similares, dentro del error experimental, a los obtenidos en las mismas condiciones para la proteína en ausencia de cola de histidinas (70-90 U/mg) (Huang *et al.* 2008; Ricci *et al.* 1995).

7. FPLC:

Se equilibra la columna de Superdex 200 con tampón fosfato potásico 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 0,1 mM a pH 7, y se deja equilibrando el sistema hasta el día siguiente a un flujo de 0,3 mL/min. Al día siguiente, se aumenta el flujo a 0,5 mL/min y se pasa tampón de equilibrado durante media hora. A continuación se inyectan en el equipo cromatográfico (Äkta Basic) a 0,5 mL/min 100 μ L de una mezcla comercial de patrones de masa molecular conocida compuesta por ferritina (440 kDa), conalbúmina (75 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa).

El cromatograma resultante se muestra en la Figura IV-8.

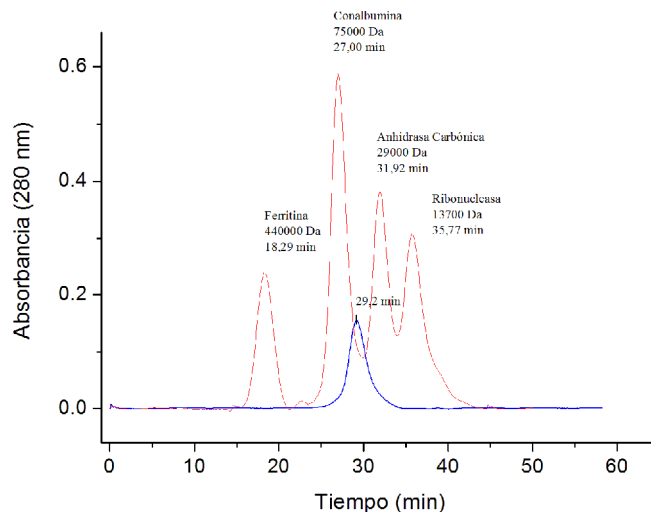


Figura IV-8. Cromatograma obtenido mediante FPLC utilizando un detector UV-visible a longitud de onda de 280 nm. El flujo fue de 0,5 mL/min. Se muestran superpuestos los cromatogramas de un kit de patrones de masa molecular conocida: Ferritina (440 kDa), conalbúmina (75 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa), y el correspondiente a la proteína purificada HisGST P1-1.

A continuación y en las mismas condiciones, una vez reequilibrado nuevamente el equipo en el tampón de trabajo, se inyectan 100 μ L de la proteína y se registra el cromatograma (Figura IV-8). Como puede observarse se obtiene un solo pico a un tiempo de retención de 29,2 min. La presencia de un solo pico, junto a lo visualizado mediante electroforesis, indica de la pureza de la muestra.

Construyendo la recta patrón correspondiente ($\log M_w$ vs t_r) utilizando los datos obtenidos del cromatograma de la mezcla de patrones se puede interpolar el valor de la masa molecular de nuestra proteína (Figura IV-9). Este valor es similar con el valor de la masa molecular deducido de la secuencia.

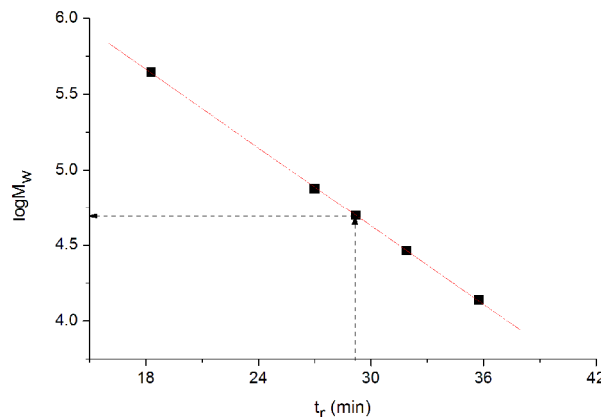


Figura IV-9. Recta patrón de FPLC. Se ha interpolado el valor del tiempo de retención correspondiente a nuestra proteína para deducir la masa molecular.

El valor de masa molecular obtenido a partir de la recta es de 49770 g/mol (mientras que el deducido a partir de la secuencia de la proteína con el segmento de histidinas fue de 49592 g/mol).

8. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC):

Se ha determinado la estabilidad térmica de la proteína purificada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). La velocidad de barrido (rampa de temperatura) utilizada en este estudio fue de 1,5 K/min.

Primeramente, la proteína purificada fue dializada en tampón Hepes 10 mM a pH 7,5. Antes de introducir la proteína en la célula de medida del calorímetro, es necesario realizar previamente varios registros calorimétricos de la solución que contiene a la proteína (tampón) y que servirán como línea base o referencia. Para ello, se llenan las células de medida y referencia con tampón y se programa un ciclo de varios registros a la velocidad de barrido indicada anteriormente. Tras varios barridos las señales (trazas) deben coincidir y en ese caso, se puede dar por concluido el experimento de referencia, tomando como línea base instrumental (o referencia), cualquiera de los registros que aparecen superpuestos. A continuación, se prepara una muestra de la proteína dializada, a una concentración de 4 μM y se introduce en la célula de medida del calorímetro (dejando la célula de referencia con tampón) y se registra la capacidad calorífica (traza calorimétrica) desde aproximadamente 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 85 $^{\circ}\text{C}$. La Figura IV-10 (línea continua) muestra la traza calorimétrica resultante una vez corregida (sustraída) la línea base instrumental y química. El perfil calorimétrico muestra un pico endotérmico centrado en 55,1 $^{\circ}\text{C}$, y que corresponderá al valor de T_m (temperatura de máxima estabilidad).

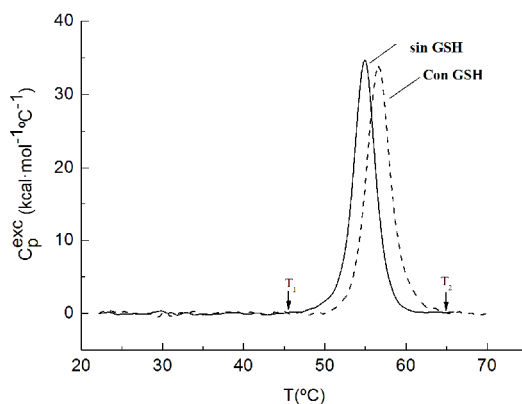


Figura IV-10. Trazas calorimétricas para el desplegamiento térmico de HisGST P1-1 en ausencia y en presencia de GSH en tampón Hepes 10 mM, pH 7,5. La velocidad de barrido fue de 1,5 K/min y la concentración de proteína 4 μM .

Por otro lado, con objeto de examinar si este proceso de desplegamiento térmico es o no reversible, se realiza adicionalmente un experimento de calorimetría con otra muestra de similar concentración y realizando previamente la línea base con el tampón. Para ello, se realiza un ciclo térmico con la muestra de proteína compuesto por tres etapas: 1) calentamiento de la muestra a 1,5 K/min desde 20 $^{\circ}\text{C}$ a 56,5 $^{\circ}\text{C}$ (un poco

después del valor de T_m); 2) Enfriamiento de la muestra desde 56,5 °C hasta 20 °C lo más rápidamente posible tal y como lo hace el instrumento; 3) Recalentamiento de la muestra desde 20 °C hasta 84 °C a una velocidad de barrido de 1,5 K/min. Si analizamos los resultados obtenidos (Figura IV-11) se observa que el registro de la muestra tras el segundo barrido (recalentamiento) no presenta ninguna señal en el lugar en el que aparecía el pico en el primer barrido, indicando que tras el primer barrido la muestra de proteína se despliega y desnatura de forma simultánea, siendo por tanto el proceso irreversible. Por tanto, la proteína una vez desplegada se desnatura y es incapaz de replegarse por enfriamiento para un posterior desplegamiento.

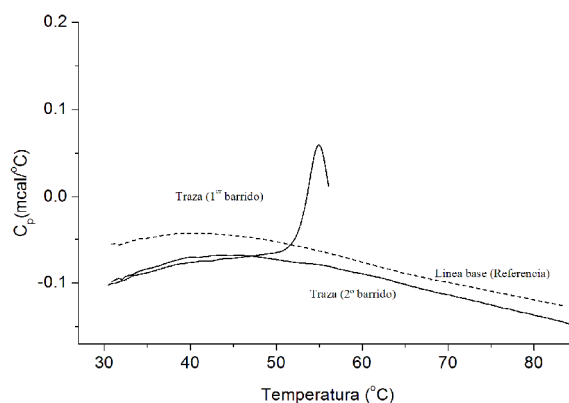


Figura IV-11. Perfiles calorimétricos para una muestra de proteína HisGST P1-1 4 μ M, en tampón Hepes 10 mM, pH 7,5. La muestra tras el primer barrido y enfriamiento se le vuelve a efectuar un segundo barrido. Se indica también la traza del tampón (referencia).

El valor de T_m obtenido (temperatura de máxima estabilidad), concuerda, dentro del error experimental, con el obtenido para esta misma proteína pero sin cola de His, lo que indica que la cola de His adicionada sobre el extremo N-terminal parece no influir, al menos de forma significativa en la estabilidad térmica de la enzima. Por tanto, en principio, cualquier estudio de estabilidad térmica que se realice con esta proteína debería ser extrapolable al que se obtendría con la proteína sin modificar. Esta temperatura es característica de esta proteína y depende también, aunque ligeramente, de las condiciones del medio en cuestión. El valor de T_m , corresponde a la temperatura a la que el 50% de las moléculas de proteína están plegadas y el otro 50% desplegadas. Si en principio, consideramos la situación más simple para este proceso de desplegamiento: $N \xrightleftharpoons{K} D$, donde N corresponde al estado nativo (plegado) y D al estado desplegado, el valor de $K=[N]/[D]$ sería 1 a $T=T_m$, y por tanto el valor del cambio de energía libre de Gibbs a dicha temperatura sería cero, $\Delta G(T_m)=-RT \ln K = 0$.

Otros parámetros que se pueden deducir de la traza calorimétrica son el cambio de entalpía, ΔH , y el cambio de entropía, ΔS , del proceso de desplegamiento.

Teniendo en cuenta que

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p$$

y la señal que se registra corresponde a C_p , el cambio de entalpía, ΔH , será el área bajo el pico calorimétrico y cuyo valor en este caso es 128 kcal/mol.

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p^{exc} dT$$

Igualmente, el valor del cambio de entropía, ΔS , se puede deducir del área bajo la curva de C_p^{exp}/T frente a T , ya que:

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{C_p^{exc}}{T} dT$$

Así, transformando los datos de la traza de la Figura IV-10 y representando C_p^{exp}/T frente a T , del área bajo el pico se obtiene un valor para el cambio de entropía, $\Delta S = 392$ cal/mol. Finalmente, ya que $\Delta G(T) = \Delta H - T\Delta S$, se podrían calcular los valores de ΔG en el intervalo de temperatura del pico, es decir, entre T_1 y T_2 . Se puede comprobar fácilmente a partir de los valores de ΔH y ΔS obtenidos que ΔG en T_m es cero, tal y como anteriormente habíamos indicado.

La presencia de ligandos u otros aditivos (codisolventes) adicionados a la disolución de proteína suelen modificar la estabilidad térmica. Concretamente, la presencia de ligandos, unidos a la proteína, altera sus propiedades térmicas. Para examinar este efecto, hemos adicionado el ligando GSH, a una concentración 1 mM a una muestra de proteína a concentración 4 μ M. Se ha realizado un barrido de calorimetría, en condiciones similares a las utilizadas para la muestra sin ligando y descritas anteriormente (mismo tampón, velocidad de barrido, etc.). En la Figura IV-10 se recoge la traza obtenida para esta muestra con el ligando GSH (línea discontinua). Se observa que igualmente al caso anterior (sin GSH) se obtiene un solo pico, centrado en este caso a 56,6 °C (T_m). La forma del pico es similar, así como el tamaño al obtenido en ausencia de ligando. Igualmente se ha obtenido que en presencia de GSH el proceso de desplegamiento térmico es irreversible. El aumento en el valor de T_m , comparado con el obtenido para la proteína sin GSH, indica que el ligando estabiliza la proteína. El incremento de T_m es aproximadamente 1,5 °C, lo que indica, que la estabilización proporcionada por este ligando es pequeña, lo que puede justificarse por la moderada afinidad de este ligando por la enzima. Generalmente, cuanto mayor sea la afinidad de un ligando por una enzima (proteína) mayor será el efecto en la estabilización de la enzima.

De forma similar a lo descrito anteriormente, se pueden deducir los valores de ΔH (área bajo el pico calorimétrico de la representación C_p^{exp} vs T) y ΔS (área bajo el pico calorimétrico de la representación de C_p^{exp}/T vs T) para la traza en presencia de GSH. Los valores de ΔH y ΔS obtenidos en este caso, fueron aproximadamente 136 kcal/mol y 417 cal/mol, respectivamente.

Analizando conjuntamente los resultados obtenidos (T_m , ΔH y ΔS) para la enzima en ausencia y en presencia de ligando se pueden deducir las siguientes conclusiones:

Las trazas calorimétricas en ausencia y en presencia de ligando (GSH) muestran un perfil muy similar, aunque con valores de T_m algo diferentes. Esto puede ser indicativo de un mecanismo de desplegamiento muy similar en ambos casos.

El ligando GSH estabiliza la enzima, aunque sólo ligeramente ($\sim 1,5$ °C), como consecuencia de la afinidad moderada de este ligando a esta proteína.

Los valores del ΔH y ΔS tanto en ausencia de ligando (128 kcal/mol y 592 cal/mol) como en presencia (136 kcal/mol y 417 cal/mol) son positivos. Esto indica que el proceso de desplegamiento térmico es desfavorable entálpicamente (endotérmico) y favorable entrópicamente. Estos valores positivos son normales en procesos de desplegamiento térmico, como consecuencia por una parte, de la ruptura de las interacciones entre los aminoácidos de la proteína en su forma plegada (enlaces de hidrógeno, interacciones de van del Waals, interacciones iónicas,...) lo cual es desfavorable energéticamente (entalpía positiva) y por otra, del aumento del desorden de las moléculas de agua (favorable entrópicamente) como consecuencia del desplegamiento producido por el aumento de temperatura.

Los valores de ΔH y ΔS en ambos casos (ausencia y presencia de GSH) son muy similares entre sí, lo que indica que la presencia del ligando no modifica sustancialmente la energética del mecanismo de desplegamiento de la proteína.

Tras la realización de ambos métodos de purificación y comprobación de la presencia de nuestra proteína mediante el uso de reactivo Bradford se puede deducir que el método con el que se logra la obtención una mayor cantidad de proteína es por escalón de imidazol.

***RESUMEN Y
CONCLUSIONES***

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objetivo fundamental de este Trabajo Fin de Grado (TFG) consistía en la puesta a punto de un procedimiento de sobreexpresión y purificación de la enzima GST humana de la clase pi (hGST P1-1) modificada por su extremo N-terminal con un segmento de seis histidinas y utilizando una columna de afinidad con iones Co^{2+} . Se han evaluado dos procedimientos de purificación: utilizando eluciones de imidazol (i) con un gradiente lineal y (ii) en escalón. La proteína purificada se ha caracterizado mediante varias técnicas (electroforesis, espectrofotometría, FPLC y calorimetría diferencial de barrido (DSC)). De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha puesto a punto un procedimiento de sobreexpresión y purificación para la enzima GST humana modificada con cola de histidinas que permite obtener suficiente cantidad de muestra (aprox. 30 mg de proteína a partir de 2 L de cultivo). Dicha cantidad de proteína es similar a la obtenida mediante purificación por afinidad en una columna derivatizada con GSH.
2. La proteína es purificada en un solo paso, tanto en la purificación realizada por gradiente de imidazol (0-200 mM imidazol) como la purificada en escalón (200 mM imidazol).
3. La pureza mediante ambos procedimientos es similar, aunque el rendimiento es algo mayor mediante la purificación por escalón de imidazol.
4. Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido indican que la estabilidad térmica de la proteína no se ve sensiblemente afectada por la presencia de la secuencia de histidinas en el extremo N-terminal.
5. La presencia de GSH (sustrato de GST) aumenta débilmente la estabilidad térmica de la proteína.

La importancia de los resultados obtenidos radica en que se ha examinado un procedimiento de purificación alternativo al comúnmente utilizado para esta proteína (por cromatografía de afinidad con GSH) mediante modificación con una cola de histidinas en su extremo N-terminal. Aunque la enzima no modificada se purifica con rendimiento y pureza elevada mediante cromatografía en columna con GSH, este método puede ser utilizado como estrategia alternativa para la purificación de mutantes cuya afinidad por GSH sea muy baja y, en consecuencia, la purificación con una columna de GSH sea inadecuada. En este caso, una construcción del mutante con una cola de histidinas en el extremo N-terminal puede ser la alternativa a seguir para el estudio de ese mutante. Por último, como es deducible de estos estudios, se demuestra que la presencia de dicha cola de histidinas no afecta a la actividad de la enzima ni a su estabilidad térmica.

***SUMMARY AND
CONCLUSIONS***

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The main focus of this work was the development of a procedure for the expression and purification of a human GST pi-class enzyme modified by a 6-histidine-tag linked to the N-terminal, along with the use of an affinity chromatography column with Co^{2+} ions. Two purification procedures have been evaluated with imidazole: (i) using elution with a linear gradient and (ii) using a step gradient. The purified protein was characterized by several experimental techniques (electrophoresis, spectrophotometry, Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) and differential scanning calorimetry (DSC)). The results reported in this study can be summarized as follows:

1. The procedure provides a large amount of sample (*ca.* 30 mg of protein from 2 L of culture). This amount is similar to that obtained by affinity purification on a column derivatized with GSH.
2. The protein is purified in one step, whether the purification is performed by linear gradient (0-200 mM imidazole) or by step gradient (200 mM imidazole).
3. The protein purity in both procedures is similar, although the yield is slightly higher when using the step-gradient procedure.
4. Differential scanning calorimetry (DSC) results indicate that the thermal stability of the protein is not significantly affected by the presence of the histidine-tag sequence at the N-terminal.
5. The presence of GSH (the GST substrate) hardly increases the thermal stability of the protein.

These results are important since they show a new and alternative purification procedure to that typically used for this protein (by using affinity chromatography with GSH); instead, modification is carried out with a 6-histidine tag linked to the protein's N-terminus. Moreover, this procedure can be used as an alternative strategy for purification of mutants whose GSH affinity is low; in such cases, GSH column purification is not adequate. The construction of the mutant with a polyhistidine tag at the N-terminus may be an alternative when performing future studies with this mutant. Furthermore, the results presented here demonstrate that the presence of this tail does not significantly affect either enzyme activity or thermal stability.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Allardyce, C.S.; McDonagh, P.D.; Lian, Lu-Yun; Wolf, C.R. y Roberts, G.C.** (1999) *The role of tyrosine-9 and the C-terminal helix in the catalytic mechanism of Alpha class glutathione S-transferases*, *Biochem. J.* 343, 525-531.
- Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J. y Schäfer, F.** (2009) *Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A review*, *Methods Enzymol.* 463, 439-473.
- Bradford, M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Caccuri, A.M.; Antonini, G.; Board, P.G.; Parker, M.W.; Nicotra, M.; Lo Bello, M.; Federici, G. y Ricci, G** (1999) *Proton release on binding of glutathione to alpha, Mu and Delta class glutathione transferases*, *Biochem. J.* 344, 419-425.
- Egaas, E.; Falls, J.G.; Svendsen, N.O.; Ramstad, H.; Skaare, J.U.; Dauterman, W.C.** (1994), *Strain- and sex-specific differences in the glutathione S-transferase class pi in the mouse examined by gradient elution of the glutathione-affinity matrix and reverse-phase high performance liquid chromatography*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1243, 256-264.
- Geng, M.; Wang, L.; Chen, X.; Cao, R. y Li, P.** (2013) *The association between chemosensitivity and Pgp, GST- π and Topo II expression in gastric cancer*, *Diagn. Pathol.* 8, 198.
- Goodrich, J.M. y Basu, N.** (2012) *Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals*, *Toxicol. in vitro* 26, 630-635.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J. y Jakoby, W.B.** (1974) *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*, *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hayes, J.D.; Flanagan, J.U. y Jowsey, I.R.** (2005) *Glutathion transferases*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- Hamada, S.; Kamada, M.; Furumoto, H.; Hirau, T. y Aono, T.** (1994) *Expression of glutathione S-transferase- π in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy*, *Gynecol. Oncol.* 52, 313-319.
- Hoarau, P.; Garello, G.; Gnassia-Barelli, M.; Romeo, M. y Girard, J.P.** (2002) *Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussates**, *Eur. J. Biochem.* 269, 4359-4366.
- Huang, Y.; Misquitta, S.Y. Blond, S.; Adams, E. y Colman, R.** (2008) *Catalytically active monomer of Glutathione S-transferase π and key residues involved in the electrostatic interaction between Subunits*, *J. Biol. Chem.* 283, 32880-32888.

- Jakoby, W.B** (1978) *The glutathione S- transferases: A group of multifunctional detoxification proteins*, Adv. Enzymol. 46, 383-414.
- Jakoby, W.B. y Habig, W.H.** (1980) *Glutathione transferase, in enzymatic basis of detoxification*, (Jacoby W.B. ed.) 2, 63-94, Academic Press, New York.
- Lichty, J. J.; Malecki, J. L.; Agnew, H.D.; Michelson-Horowitz, D.J. y Tan, S.** (2005) *Comparison of affinity tags for protein purification*, Protein Expression and Purification 41, 98-105.
- Knecht, S.; Ricklin, D.; Eberle, A.N. y Ernst, B.** (2009) *Oligohis-tags: Mechanisms of binding to Ni²⁺- NTA surfaces*, J. Mol. Recognit. 22, 270-279.
- Kolm, R. H.; Stenberg, G.; Mikael, W. y Mannervik, B.** (1995) *High-level bacterial expression of human glutathione trans-ferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA*, Protein Expression Purif. 6, 265-271.
- Laemmli, U.K.** (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 227, 680-685.
- Mannervik, B.** (1985) *The isozymes of glutathione transferase*, Adv. Enzymol. 57, 357-417.
- Mannervik, B. y Danielson, U.H.** (1988) *Glutathione transferases structure and catalytic activity*, CRC Crit. Rev. Biochem. 23, 283-337.
- Oakley, A.J. ; Rossjohn, J.; Bello, M.L. ; Caccuri, A.M. ; Federichi, G. y Parker, M.W.** (1997) *The three-dimensional structure of the human Pi class glutathione transferase P1-1 in complex with the inhibitor ethacrynic acid and its glutathione conjugate*, Biochemistry 36, 576-585.
- Ortiz-Salmerón, E.; Yassin, Z.; Clemente-Jimenez, M.J.; Las Heras-Vázquez, F.J.; Rodríguez-Vico, F.; Barón, C. y García-Fuentes, L.** (2001) *A calorimetric study of the binding of S-alkylglutathiones to glutathione S-transferase*, Biochim. Biophys. Acta 1548, 106-113.
- Ortiz-Salmerón, E.; Nuccetelli, M.; Oakley, A.J.; Parker, M.W.; Lo Bello, M. y García Fuentes, L.** (2003) *Thermodynamic description of the effect of the mutation Y49F on human glutathione transferase P1-1 in binding with glutathione and the inhibitor S-hexylglutathione*, J. Biol. Chem. 278, 46.938-46.948.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I. y Belfrage, G.** (1975) *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*, Nature 258, 598-599.
- Porath, J. y Olin, B.** (1983) *Inmobilized metalion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ion*, Biochemistry 29, 1621-1630.

- Quesada-Soriano, I.; García-Maroto, F., García-Fuentes, L.** (2006) *Kinetic study on the irreversible thermal denaturation of Schistosoma japonicum glutathione S-transferase*, *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 979-984.
- Quesada-Soriano, I.; Parker, L.J.; Primavera, A.; Wielens, J.; Holien, J.K.; Casas-Solvas, J.M.; Vargas-Berenguel, A.; Aguilera, A.M.; Nuccetelli, M.; Mazzetti, A. P.; Lo Bello, M. ; Parker, M.W. y García-Fuentes, L.** (2011) *Diuretic drug binding to human glutathione transferase P1-I: potential role of Cys-101 revealed in the double mutant C47S/Y108V*, *J. Mol. Recognit.* 24, 220-234.
- Ramagli, L.S. y Rodriguez, L.V.** (1985) *Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer*, *Electrophoresis* 6, 559–563.
- Ralat, L.A.; Manevich, Y.; Fisher, A.B. y Colman, R.F.** (2006) *Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and Glutathione S-transferase π with activity changes in both enzymes*, *Biochemistry* 45, 360-372.
- Ricci, G.; Lo Bello, M.; Caccuri, A.M.; Pastore, A.; Nuccetelli, M.; Parker, M.W. y Federichi G.** (1995) *Site-directed mutagenesis of human Glutathione transferase P1-I*, *J. Biol. Chem.* 270, 1243-1248.
- Romero, A.; Mart, M.; Oliva, B. et al.** (2012) *Glutathione S-transferase P1 c.313A>G polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patients*, *Ann. Oncol.* 23, 1750-1756.
- Salinas, A.E. y Wong, M.G.** (1999) *Glutathione S-transferases—a review*, *Curr. Med. Chemistry* 6, 279-309.
- Sánchez-Ruiz, J.M.** (1992) *theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry*, *Biophys. J.* 61, 921-935.
- Sheeman, D.; Meade, G.; Foley, V.M. y Dowd, C.A.** (2001) *Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily*, *Biochem. J.* 360, 1-16.
- Shi, R; Li, W.; Zhang, X. et al.** (2011) *A novel indirubin derivate PHII-7 potentiates adriamycin cytotoxicity via inhibiting P-glycoprotein expression in human breast cancer MCF-7/ADR cells*, *Eur. J. Pharmacol.* 669, 38-44.
- Singhal, S. S.; Ahmad, H.; Sharma, R.; Gupta, S.; Haque, A.K. y Awasthi, Y.C.** (1991) *Purification and characterization of human muscle Glutathione S-transferases: Evidence that Glutathione S-transferase cCorresponds to a locus distinct from GST1, GST2, and GST3*, *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 64-73.
- Singhal, S.S.; Saxena, M.; Ahmad, H.; Haque, A.K. y Awasthi, Y.C.** (1992) *Glutathione S-transferases of human lung: Characterization and evaluation of the protective role of the α -class isozymes against lipid peroxidation*, *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 232-241.

Singhal, S.S.; Yallampalli, C.; Singhal, J.; Piper, J.T.; Awasthi, S. (1996) *Purification and characterization of glutathione S-transferases of rat uterus*, Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 1271-1283.

Townsend, D.M. y Tew, KD (2003) *The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance*, Oncogene 22, 7369–7375.

Wilce, M.C. y Parker, M.W. (1994) *Structure and function of glutathione S-transferases*, Biochim. Biophys. Acta 1205, 1-18.

