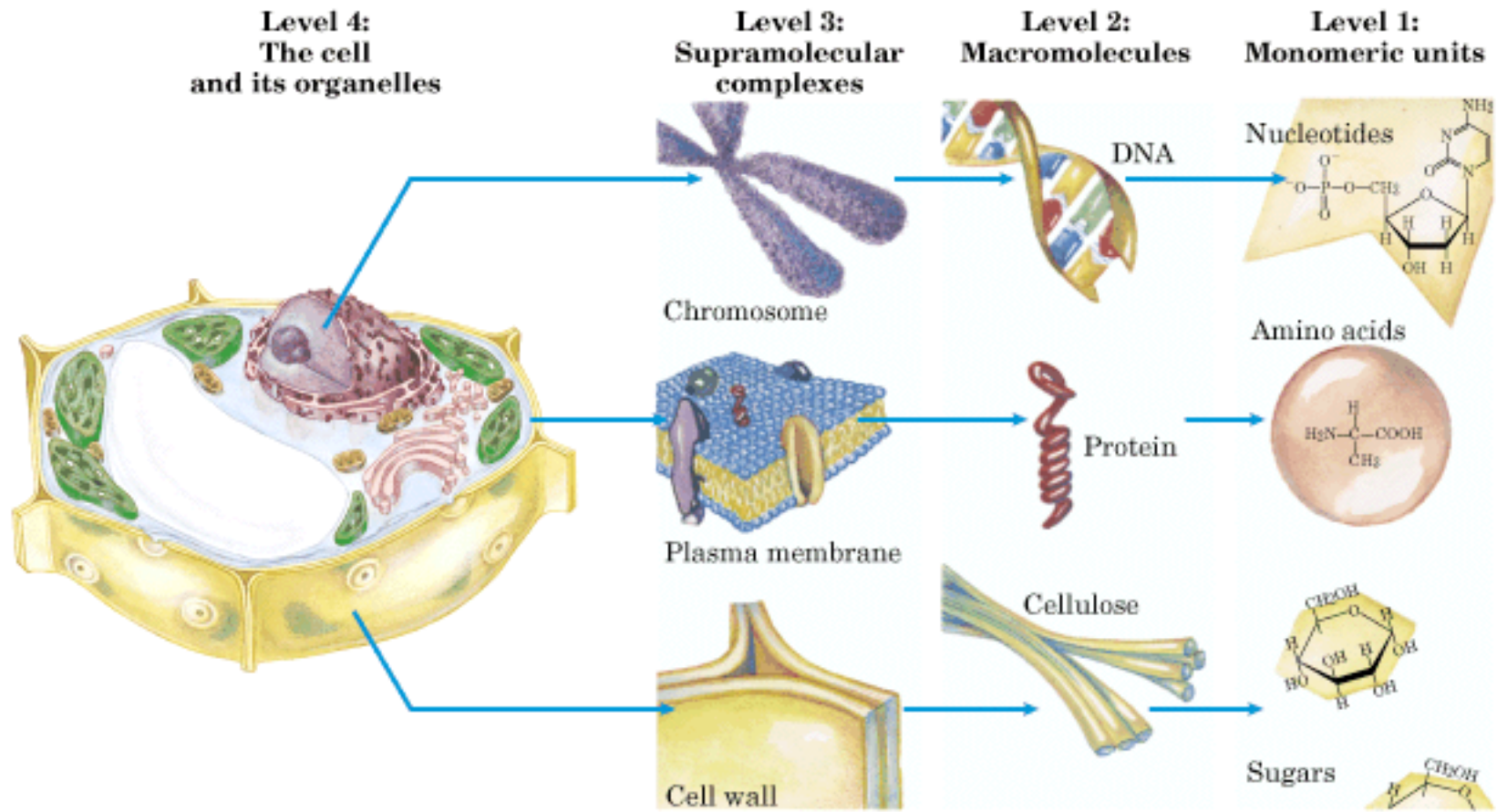


# **Introducción a las Proteínas**

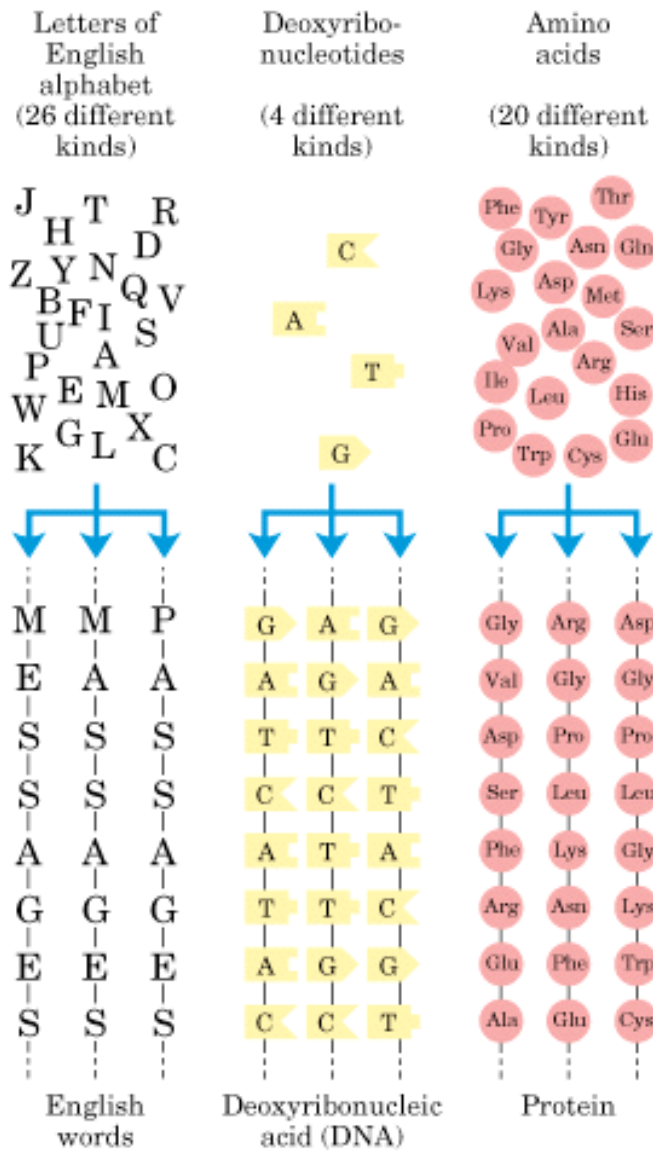
Carlos Morgan S.  
INTA, Universidad de Chile

# Contenidos

Nociones básicas de Proteínas: Aminoácidos;  
Quiralidad; Polaridad; Interacciones no covalentes;  
Absorbancia; Acidez y Basicidad; Enlace Peptídico;  
Estructura I, II, III, IV; Plegamiento; Denaturación;  
Clasificación de Proteínas; Función.



### Monomeric subunits



### Ordered linear sequences

For a segment of 8 subunits, the number of different sequences possible =

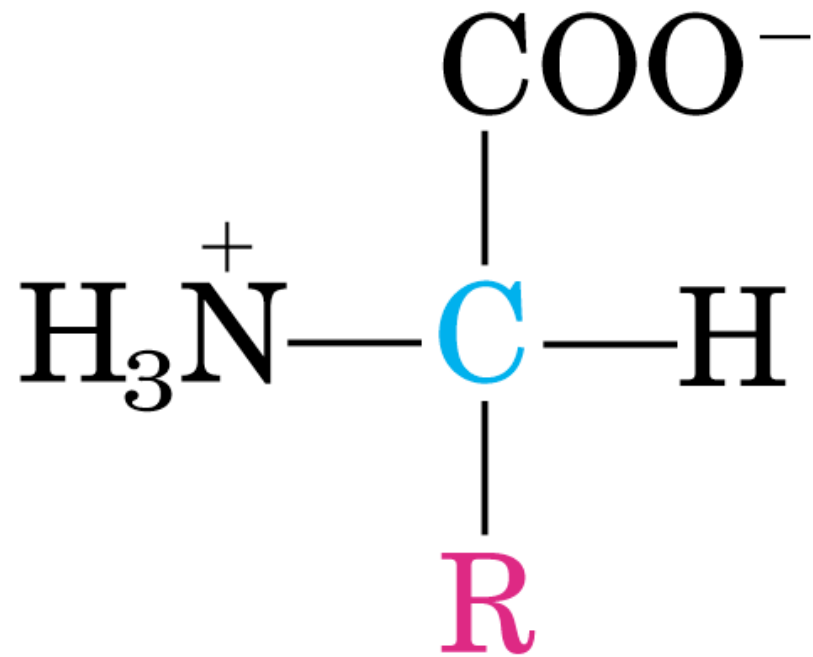
$$26^8 \text{ or } 2.1 \times 10^{11}$$

$$4^8 \text{ or } 65,536$$

$$20^8 \text{ or } 2.56 \times 10^{10}$$

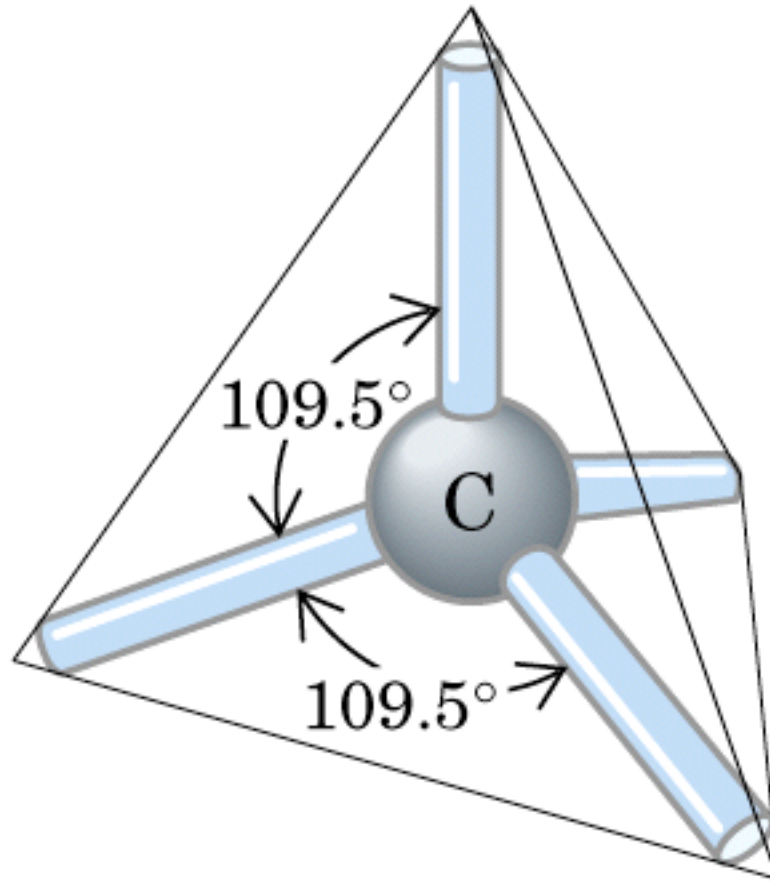
Una proteína es un polímero de  
(L)- $\alpha$ -aminoácidos.

## 1. Propiedades de los aminoácidos

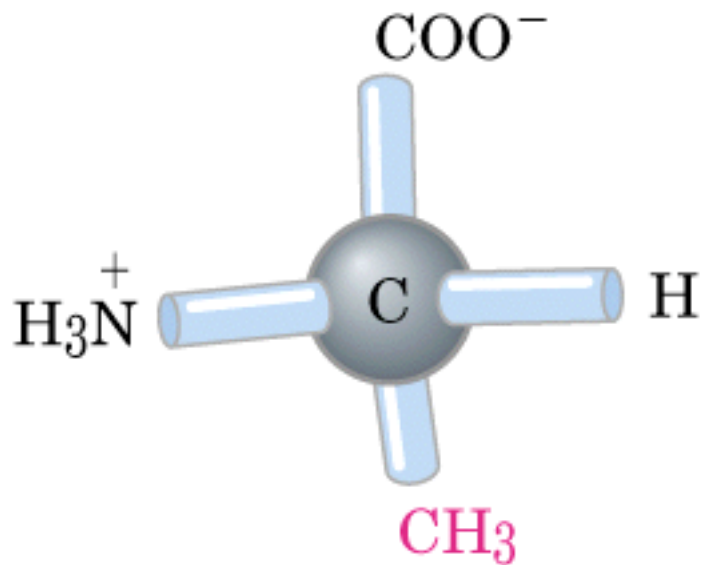


$\alpha$ -aminoácido denota que un mismo carbono une un grupo carboxilo y un grupo amino

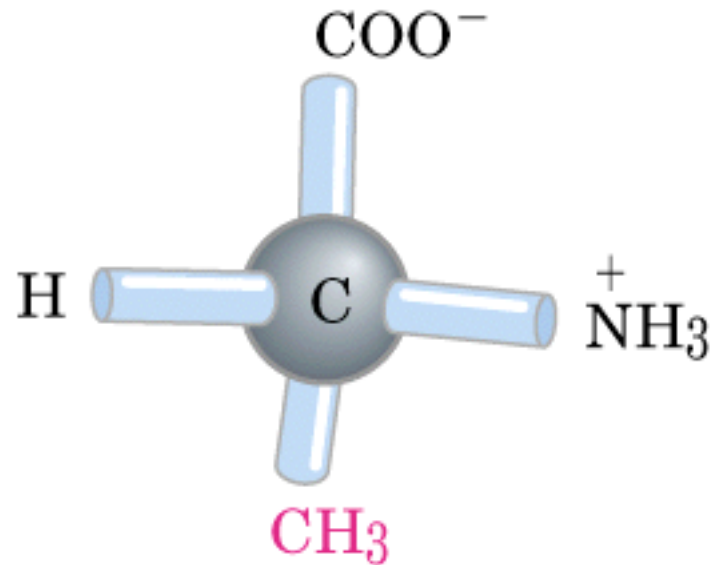
La estructura tetraédrica regular del átomo de carbono permite enlazar un máximo de 4 sustituyentes distintos. Dos isómeros son posibles. Uno, y su imagen en el espejo (enantiómeros). La relación de enantiomería es llamada quiralidad.



**(a)**



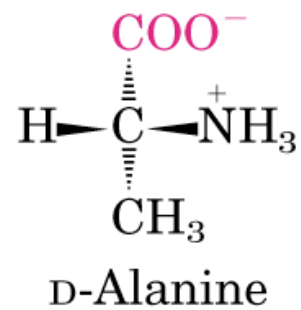
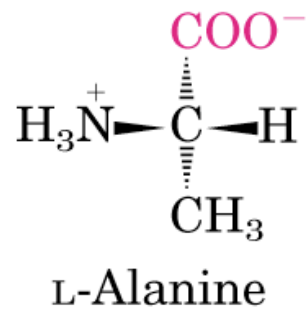
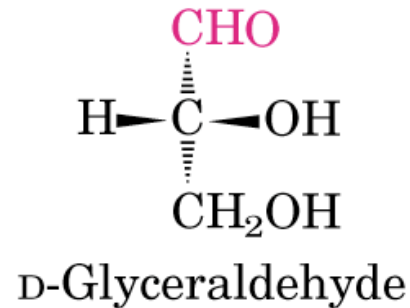
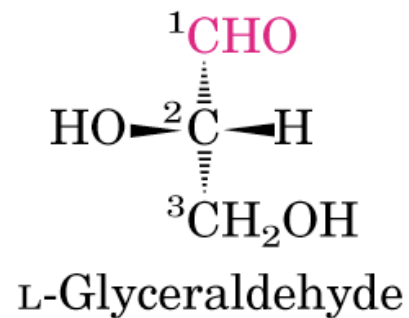
L-Alanine



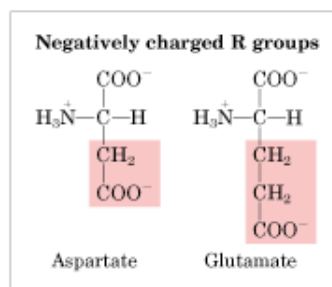
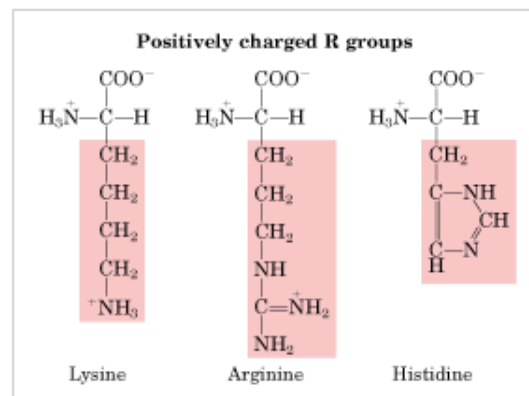
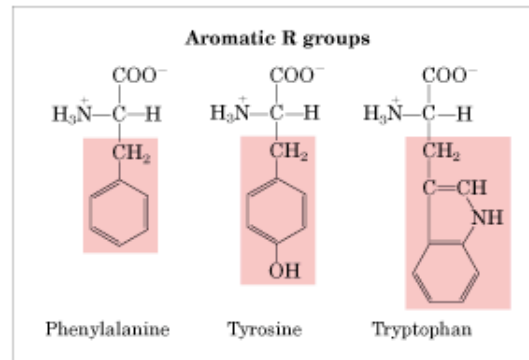
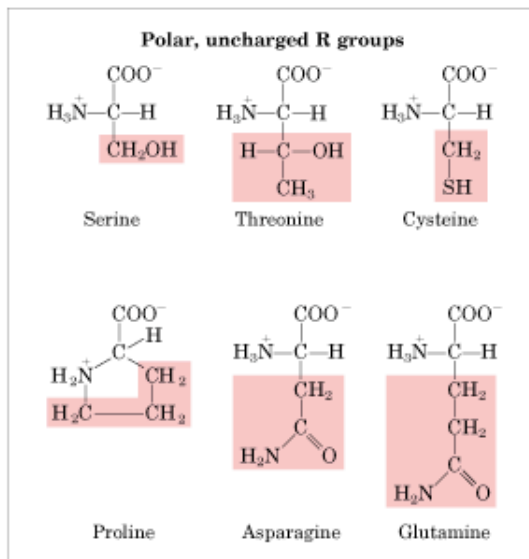
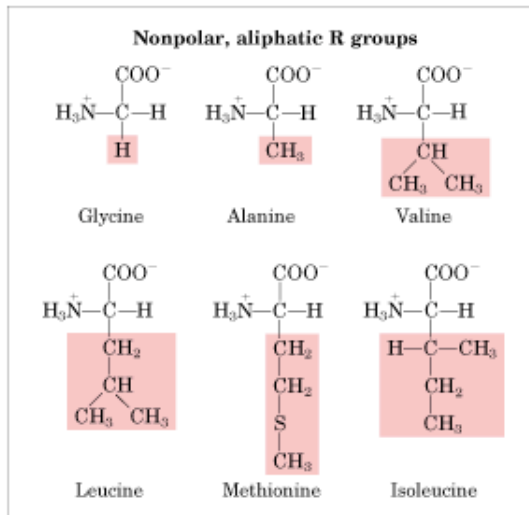
D-Alanine

L-aminoácido denota quiralidad, la capacidad de desviar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (levo-rotación).





La naturaleza ha seleccionado L-aminoácidos para formar proteínas y D-azúcares para formar Polisacáridos y ácidos nucleicos.



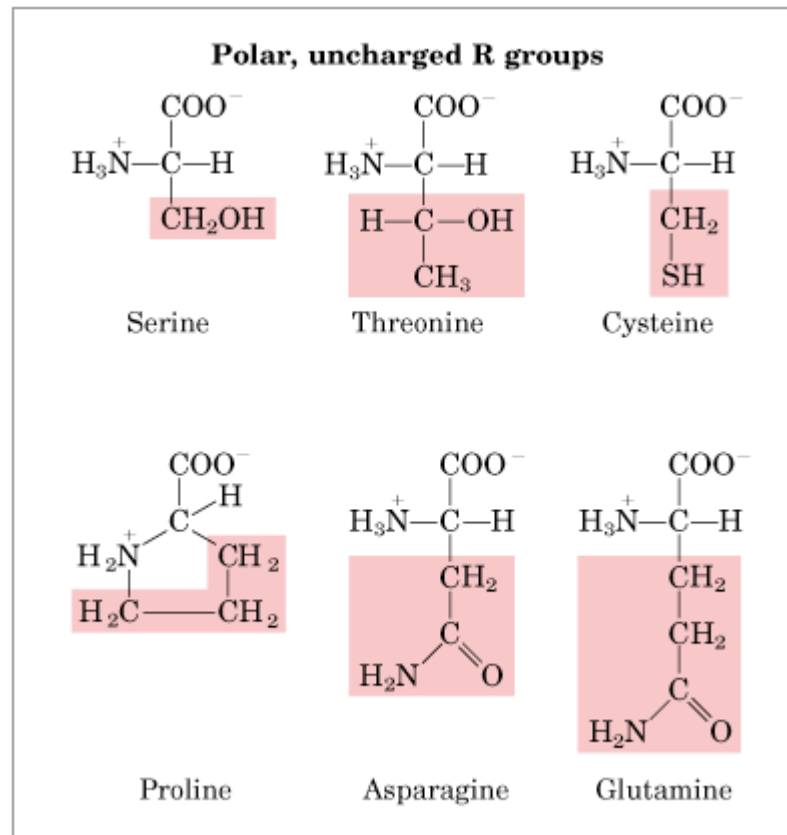
Potencialmente, con 20 aminoácidos  
Se podrían formar:

$20^2=400$  dipéptidos diferentes  
 $20^3=8000$  tripéptidos diferentes  
 $20^{100}=1.27 \times 10^{130}$

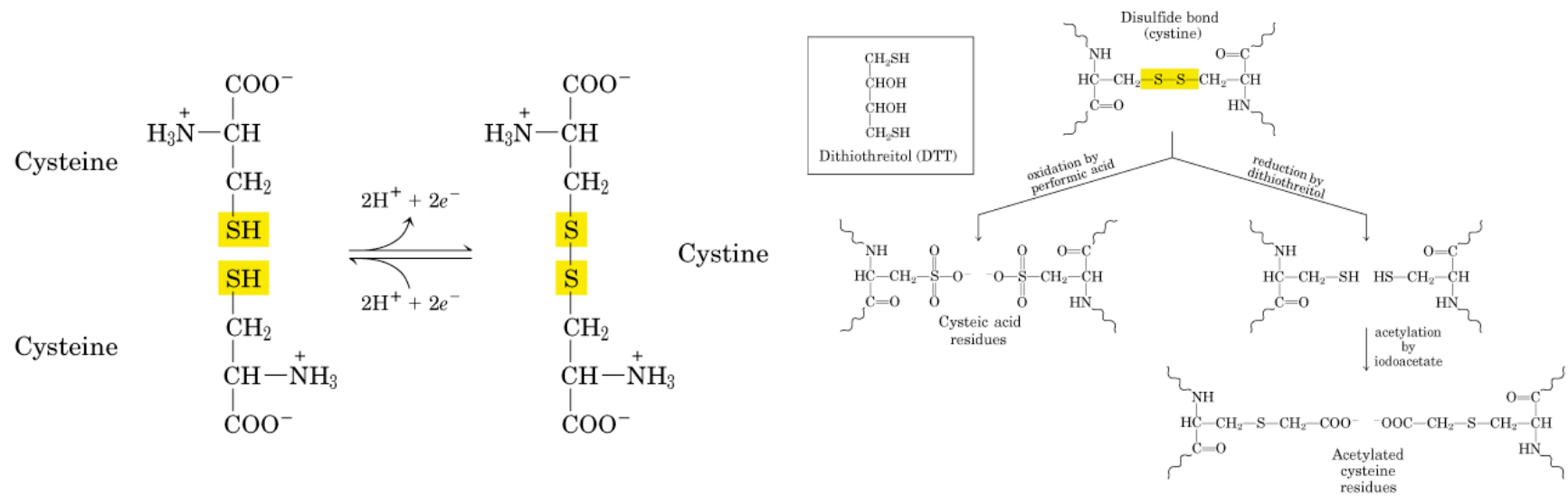
Proteínas diferentes conteniendo  
100 residuos de aminoácidos.

El número de átomos del universo  
Es estimada en  $9 \times 10^{78}$ .

Los aminoácidos pueden diferenciarse por su polaridad, propiedades ácido-base, Hidrofobicidad, tamaño, flexibilidad conformacional, reactividad química, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

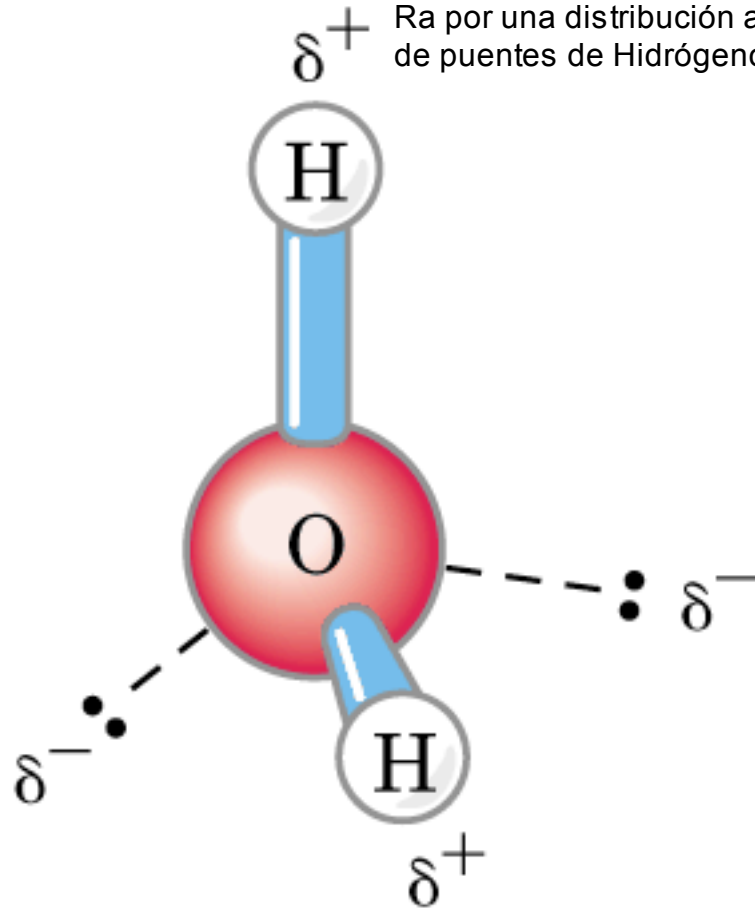


Las cadenas laterales de estos aminoácidos son capaces de establecer puentes de Hidrógeno

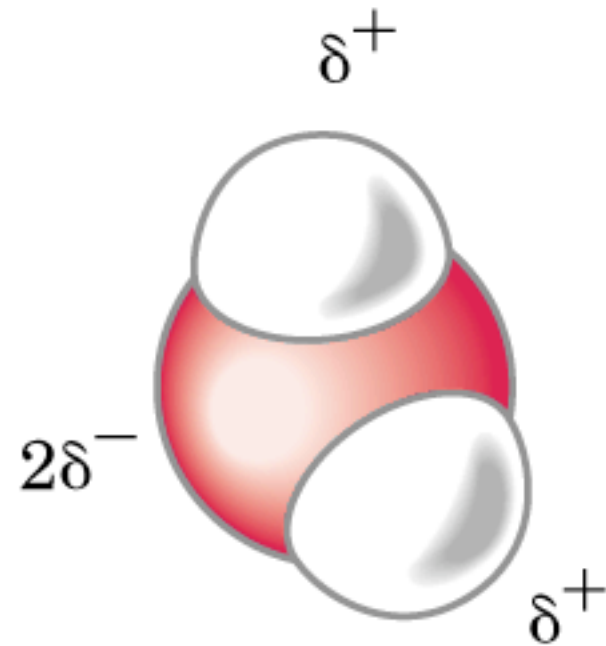


La oxidación de 2 cisteínas vecinas permite formar puentes disulfuro. Estos enlaces pueden unir covalentemente cadenas polipeptídicas diferentes o también imponerle restricciones espaciales a una misma cadena polipeptídica.

El agua tiene la estructura de un dipolo eléctrico gracias a la alta electronegatividad del oxígeno en relación al hidrógeno, de modo que los electrones de enlace tienden a acercarse hacia el oxígeno. Este dipolo no posee cargas formales sino que se genera por una distribución asimétrica de los electrones de enlace. Permite la formación de puentes de Hidrógeno.



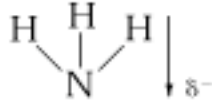
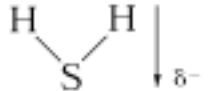
**(a)**



**(b)**

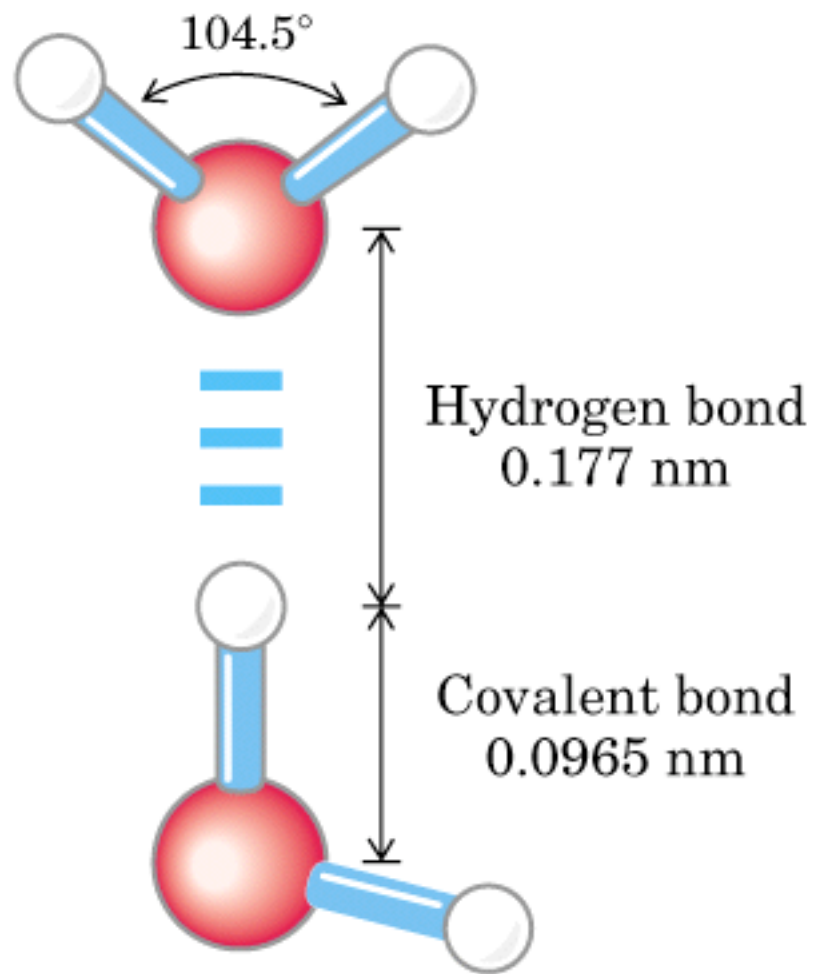
Ejemplos de polaridad. Una molécula lineal será apolar cuando los vectores que forman el dipolo se anulan.

table 4-3

Solubilities of Some Gases in Water			
Gas	Structure*	Polarity	Solubility in water (g/L) <sup>†</sup>
Nitrogen	N≡N	Nonpolar	0.018 (40 °C)
Oxygen	O=O	Nonpolar	0.035 (50 °C)
Carbon dioxide	$\begin{array}{c} \delta^- \quad \delta^- \\ \longleftarrow \quad \longrightarrow \\ \text{O}=\text{C}=\text{O} \end{array}$	Nonpolar	0.97 (45 °C)
Ammonia		Polar	900 (10 °C)
Hydrogen sulfide		Polar	1,860 (40 °C)

\*The arrows represent electric dipoles; there is a partial negative charge ( $\delta^-$ ) at the head of the arrow, a partial positive charge ( $\delta^+$ ; not shown here) at the tail.

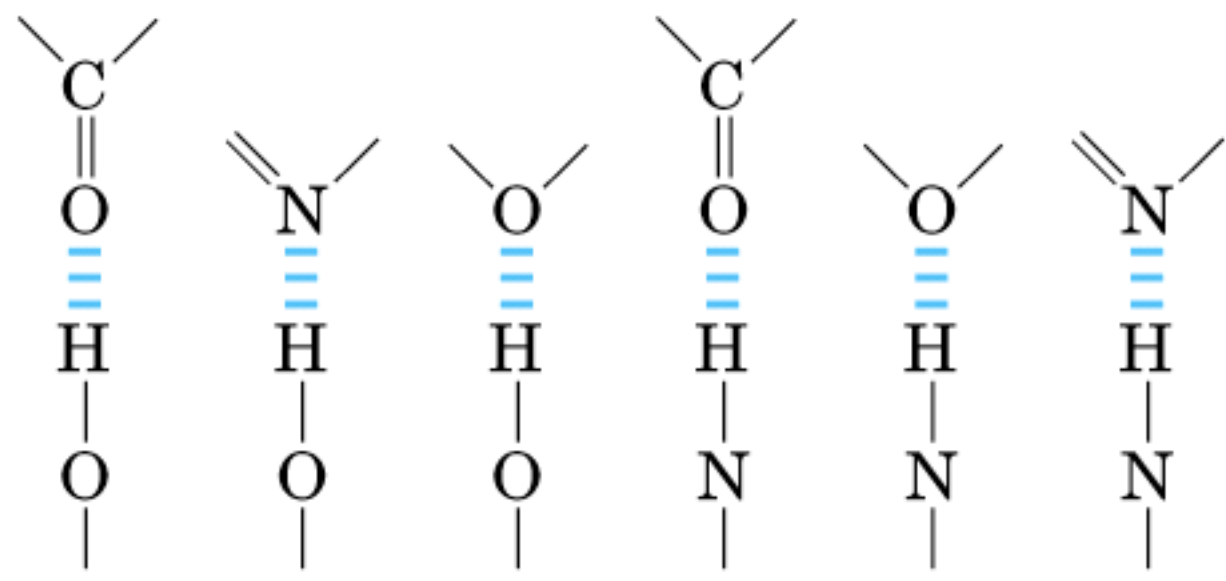
<sup>†</sup>Note that polar molecules dissolve far better even at low temperatures than do nonpolar molecules at relatively high temperatures.



**(c)**

Hydrogen  
acceptor

Hydrogen  
donor

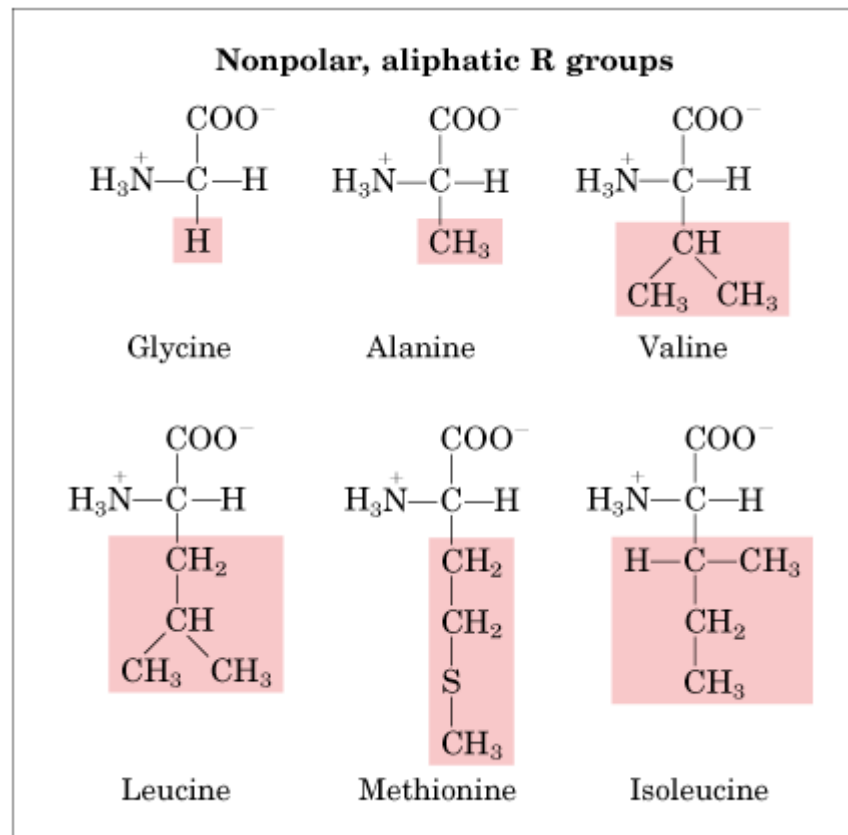


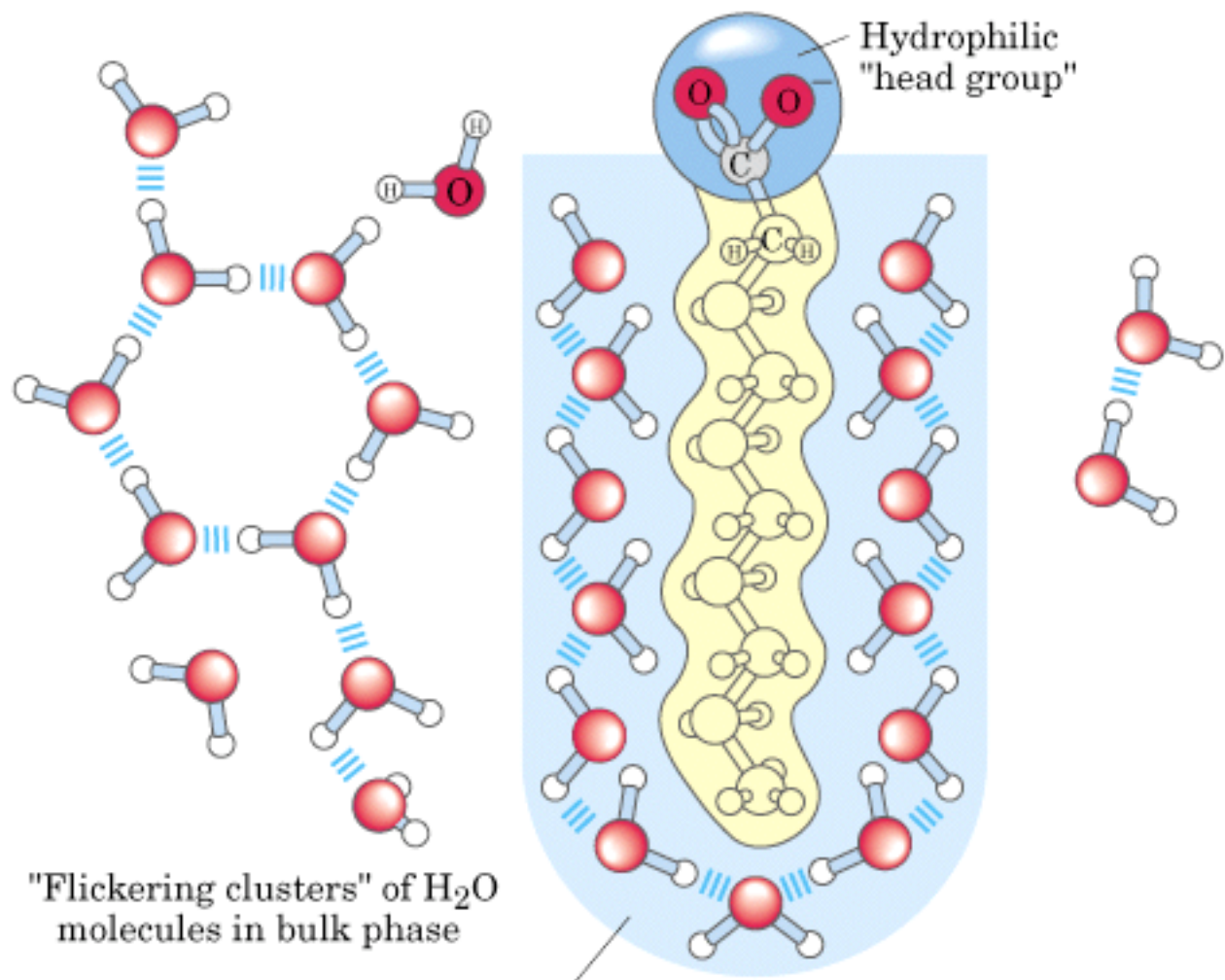


1 H																	2 He
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra		<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>↖ Lanthanides</p> <p>↖ Actinides</p> </div> </div>														

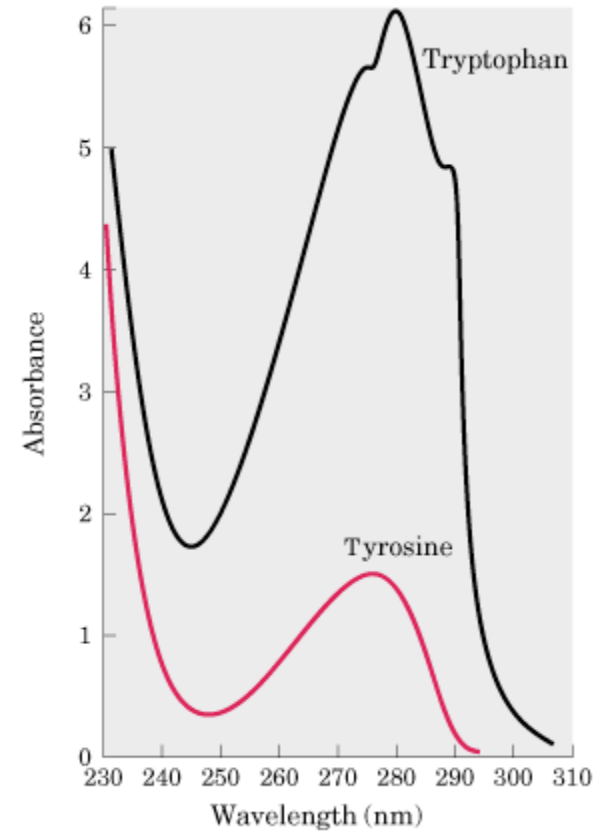
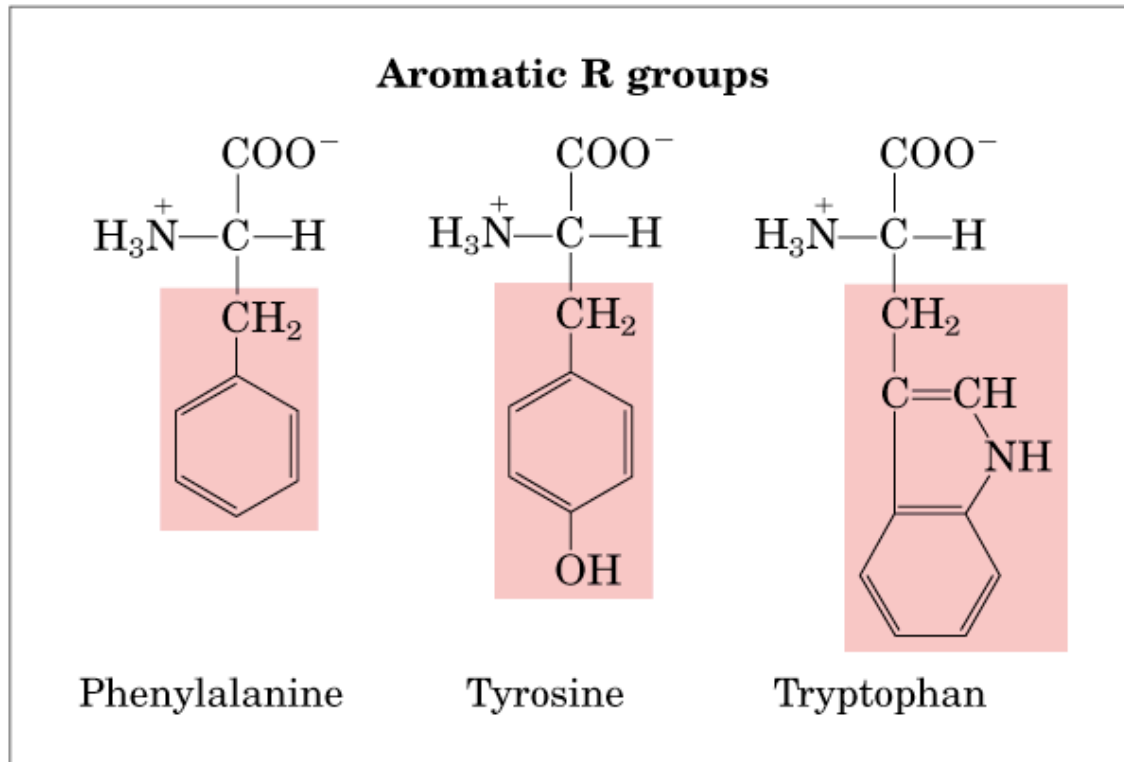
Bulk elements  
 Trace elements

Las cadenas laterales no polares interactúan a través de interacciones hidrofóbicas, tales como Interacciones de Van der Waals, que corresponden a interacciones débiles, en estrechos rangos de Distancia (en el radio de Van der Waals). Los grupos apolares son incapaces de formar interacciones Polares, tales como puentes de Hidrógeno o interacciones iónicas.



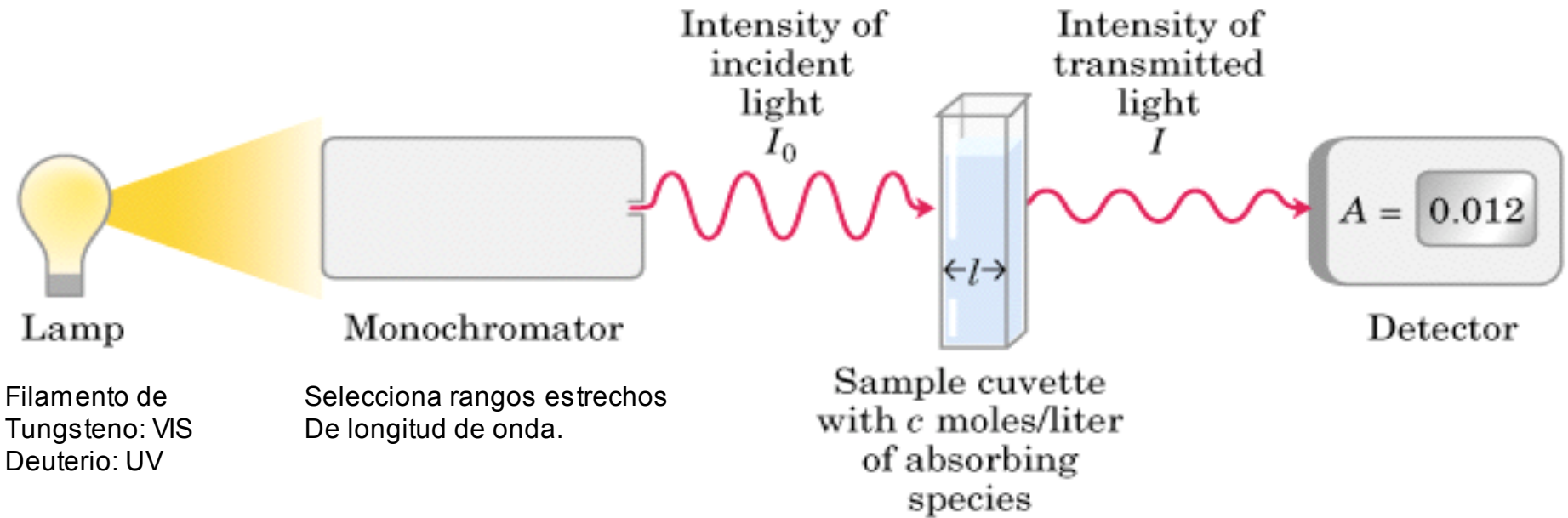


(a)



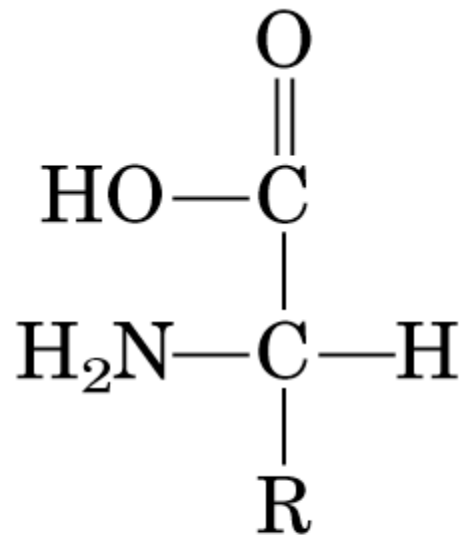
Los residuos aromáticos absorben luz ultravioleta, alrededor de los 280 nm de longitud de onda. Estos grupos son capaces de formar interacciones hidrofóbicas, principalmente entre grupos aromáticos.

Un cromóforo es una molécula capaz de absorber luz en un cierto rango de longitudes de onda característico, en el espectro UV-VIS. La absorbancia de un compuesto en solución es medida en un espectrofotómetro.

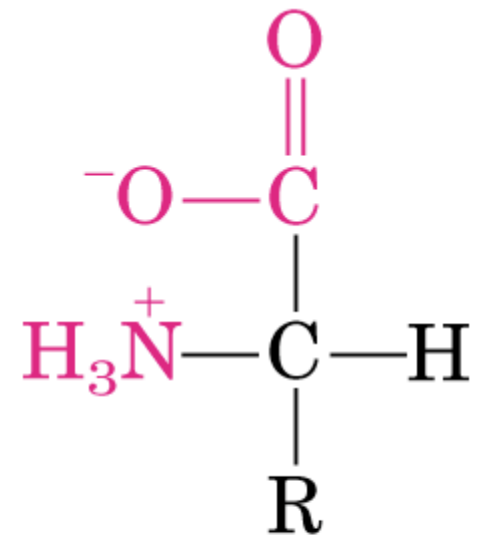


$$\text{Si } A > 0; I < I_0 \quad A = \log(I_0/I)$$

$A$ , absorbancia;  $I_0$ , intensidad de luz incidente;  $I$  intensidad de luz transmitida al atravesar la muestra en un trayecto  $l$ .



Nonionic  
form



Zwitterionic  
form

La forma de zwitterion predomina a pH fisiológico

La ecuación de Henderson-Hasselbach rige la disociación de cualquier ácido o base débil a un pH determinado. Sin embargo, no predice el comportamiento de un poliácido, tal como una proteína.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$



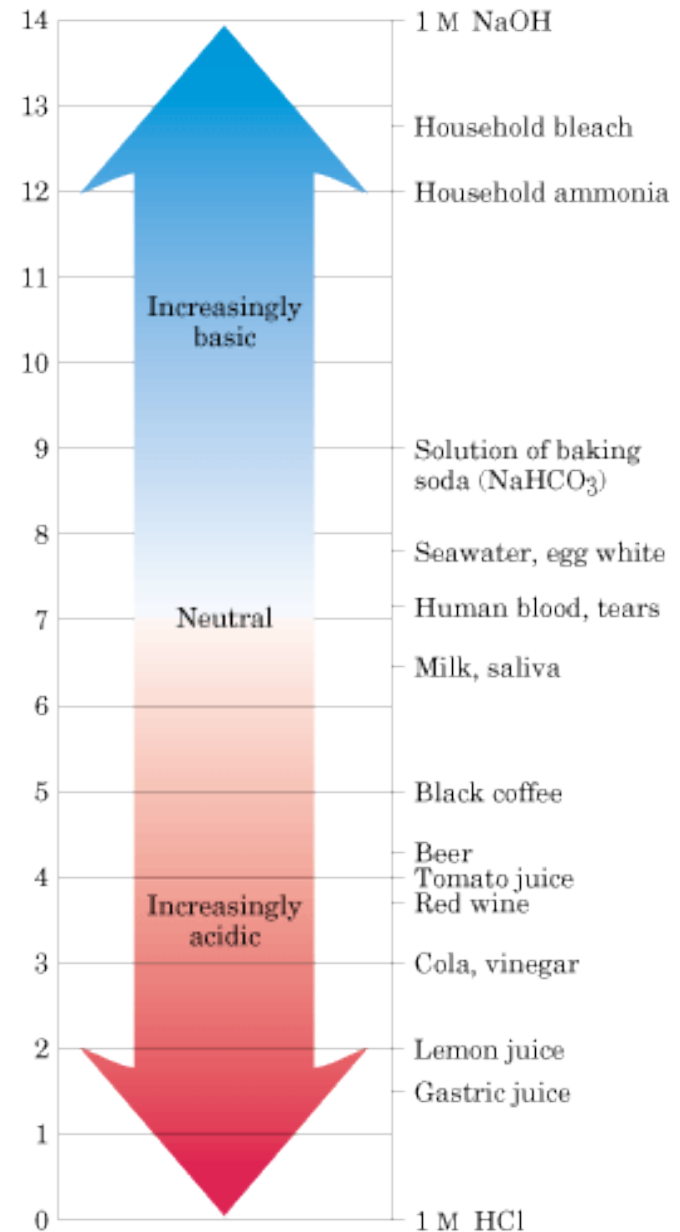
$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

table 4-5

### The pH Scale

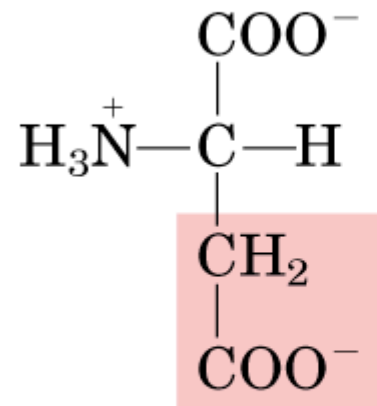
$[\text{H}^+]$ (M)	pH	$[\text{OH}^-]$ (M)	pOH*
$10^0$ (1)	0	$10^{-14}$	14
$10^{-1}$	1	$10^{-13}$	13
$10^{-2}$	2	$10^{-12}$	12
$10^{-3}$	3	$10^{-11}$	11
$10^{-4}$	4	$10^{-10}$	10
$10^{-5}$	5	$10^{-9}$	9
$10^{-6}$	6	$10^{-8}$	8
$10^{-7}$	7	$10^{-7}$	7
$10^{-8}$	8	$10^{-6}$	6
$10^{-9}$	9	$10^{-5}$	5
$10^{-10}$	10	$10^{-4}$	4
$10^{-11}$	11	$10^{-3}$	3
$10^{-12}$	12	$10^{-2}$	2
$10^{-13}$	13	$10^{-1}$	1
$10^{-14}$	14	$10^0$ (1)	0

\*The expression pOH is sometimes used to describe the basicity, or  $\text{OH}^-$  concentration, of a solution; pOH is defined by the expression  $\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$ , which is analogous to the expression for pH. Note that in all cases,  $\text{pH} + \text{pOH} = 14$ .

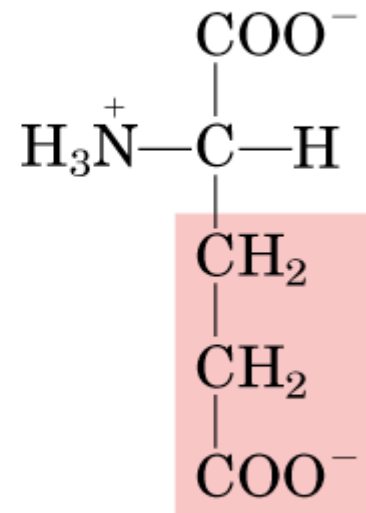




## Negatively charged R groups

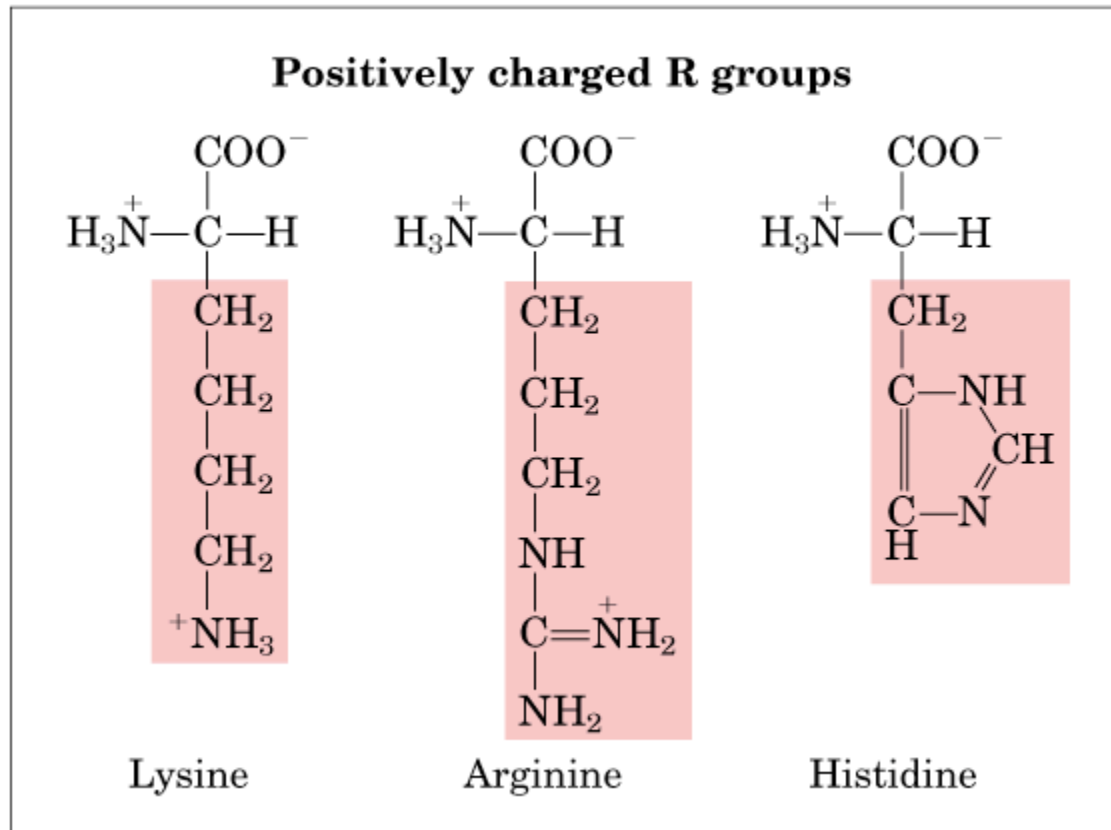


Aspartate



Glutamate

Cadenas laterales ácidas, pueden formar interacciones iónicas, dependientes del pH

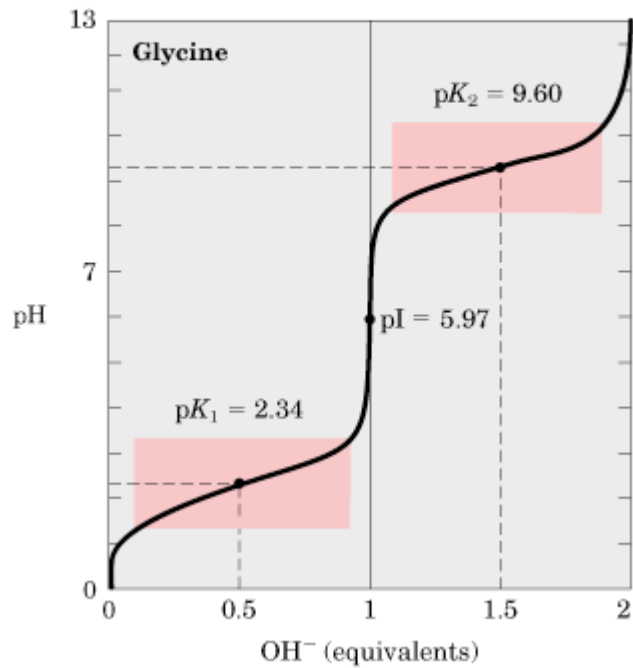
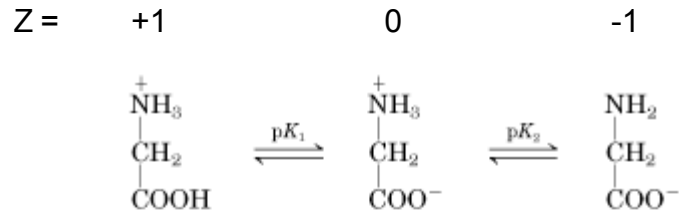


Estas cadenas laterales tienen propiedades ácido-base, pueden formar interacciones iónicas.

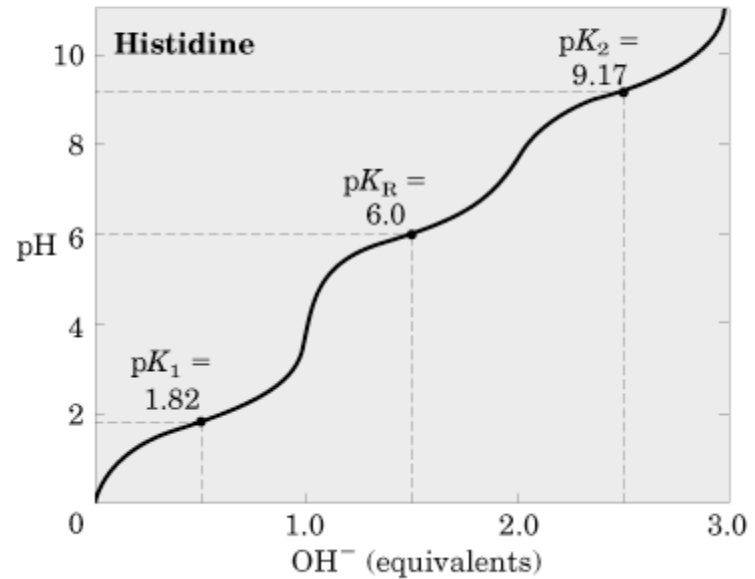
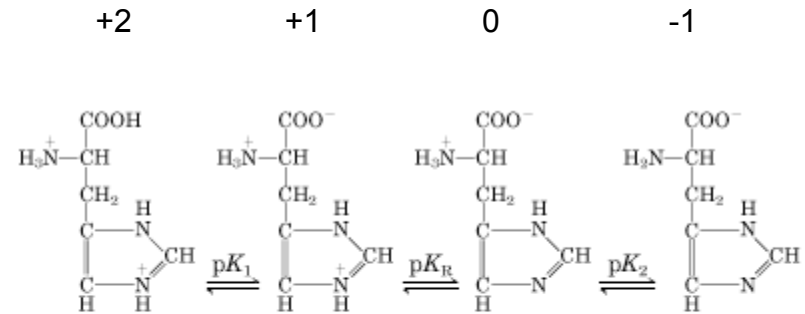
## Cálculo del Punto isoeléctrico (pI) de un aminoácido.

El punto isoeléctrico (pI) corresponde al valor de pH al cuál una molécula tiene carga neta (z) igual a cero.

En un zwitterion simple,  $pI = (pK_1 + pK_2)/2$  (a); Para un aminoácido de cadena lateral ácido-base, pI es el promedio De los pK entre la especie con carga +1 y -1 (b).



(a)



(b)

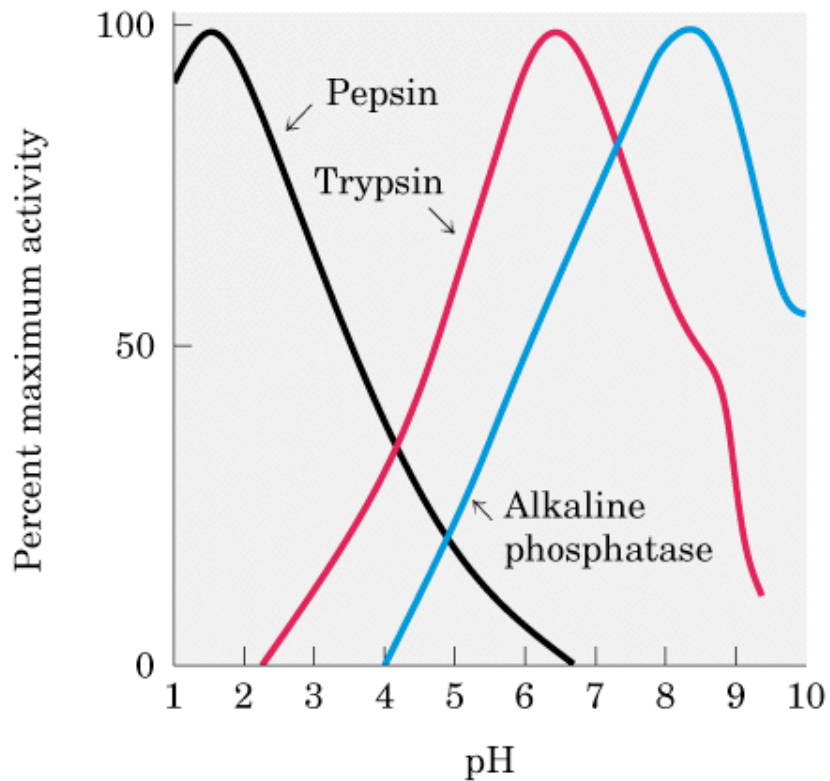


table 5-7

### The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

Treatment*	Cleavage points†
Trypsin	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillaris</i> protease	Arg (C)
Chymotrypsin	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease	Asp, Glu (N)
Pepsin	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

\*All except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

Distintas proteasas digieren proteínas a distintos valores de pH.

Al trabajar con proteínas, es importante conocer la clasificación de los aminoácidos en relación a sus características de polaridad, hidrofobicidad, y propiedades ácido-base, así como sus nombres y abreviaturas en los códigos de 1 y 3 letras.

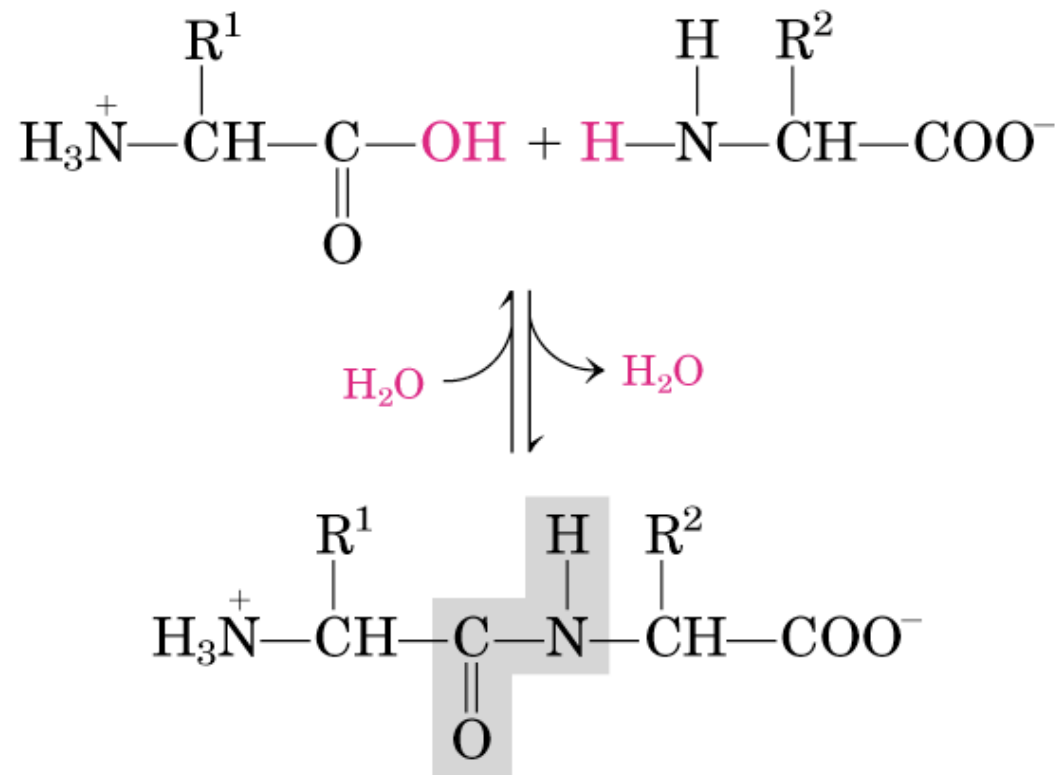
table 5-1

Properties and Conventions Associated with the Standard Amino Acids									
Amino acid	Abbreviated names		$M_r$	$pK_a$ values			pI	Hydropathy index <sup>a</sup>	Occurrence in proteins (%) <sup>†</sup>
				$pK_1$ (-COOH)	$pK_2$ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	$pK_R$ (R group)			
<b>Nonpolar, aliphatic R groups</b>									
Glycine	Gly	G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanine	Ala	A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Valine	Val	V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu	L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile	I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met	M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
<b>Aromatic R groups</b>									
Phenylalanine	Phe	F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr	Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Tryptophan	Trp	W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
<b>Polar, uncharged R groups</b>									
Serine	Ser	S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Proline	Pro	P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Threonine	Thr	T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Cysteine	Cys	C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn	N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamine	Gln	Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
<b>Positively charged R groups</b>									
Lysine	Lys	K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His	H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg	R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
<b>Negatively charged R groups</b>									
Aspartate	Asp	D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamate	Glu	E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

<sup>a</sup>A scale combining hydrophobicity and hydrophilicity of R groups; it can be used to measure the tendency of an amino acid to seek an aqueous environment (- values) or a hydrophobic environment (+ values). See Chapter 12. From Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105 - 132.

<sup>†</sup>Average occurrence in over 1150 proteins. From Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed) Plenum Press, NY, pp. 599-623.

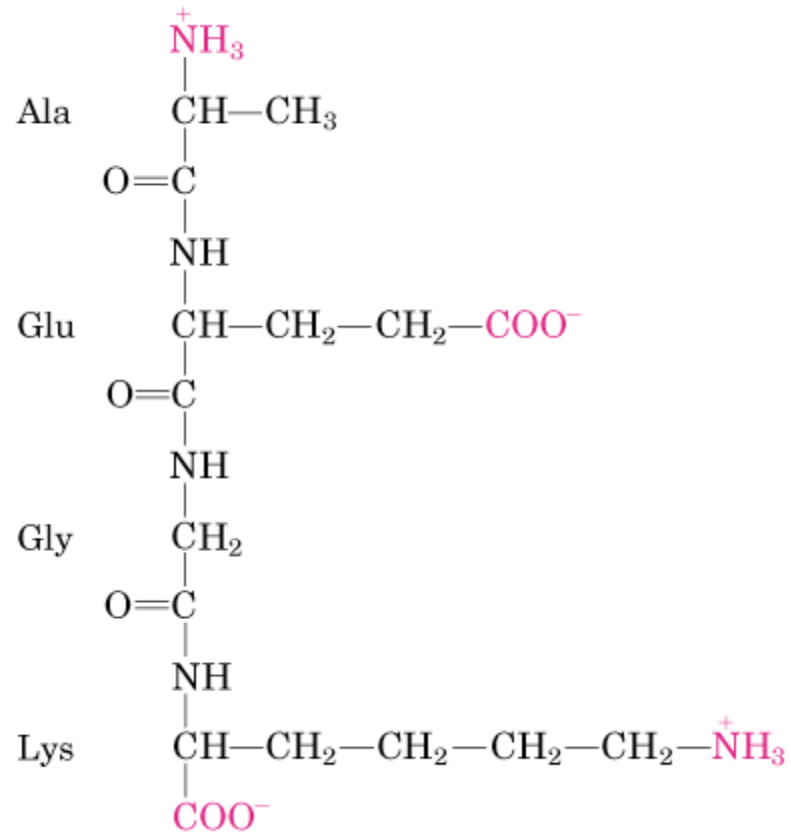
## 2. Niveles de la estructura de las proteínas y métodos de análisis



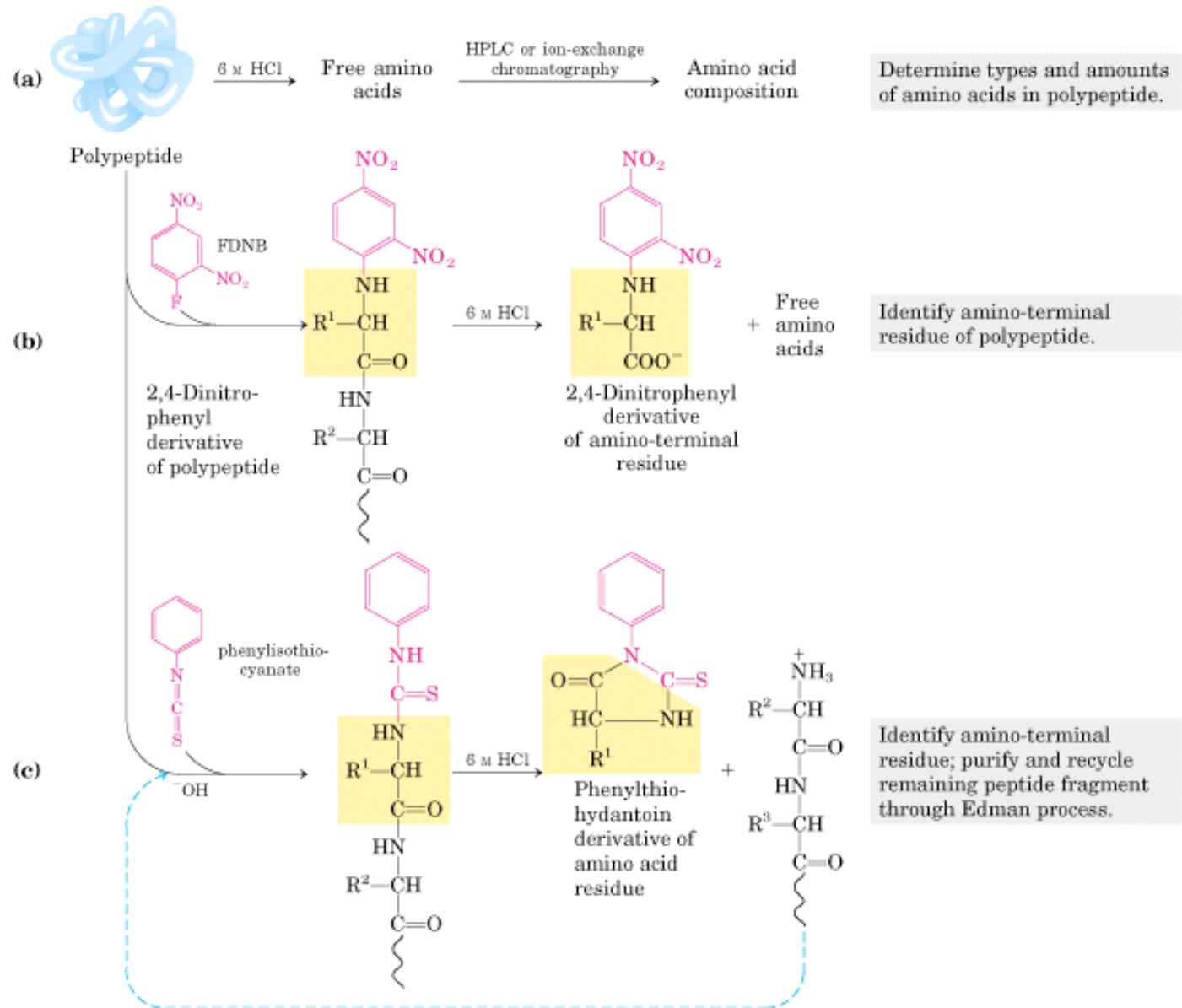
Un péptido se define por la formación de al menos un enlace peptídico. El enlace peptídico se forma entre un grupo  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo provenientes de dos aminoácidos.



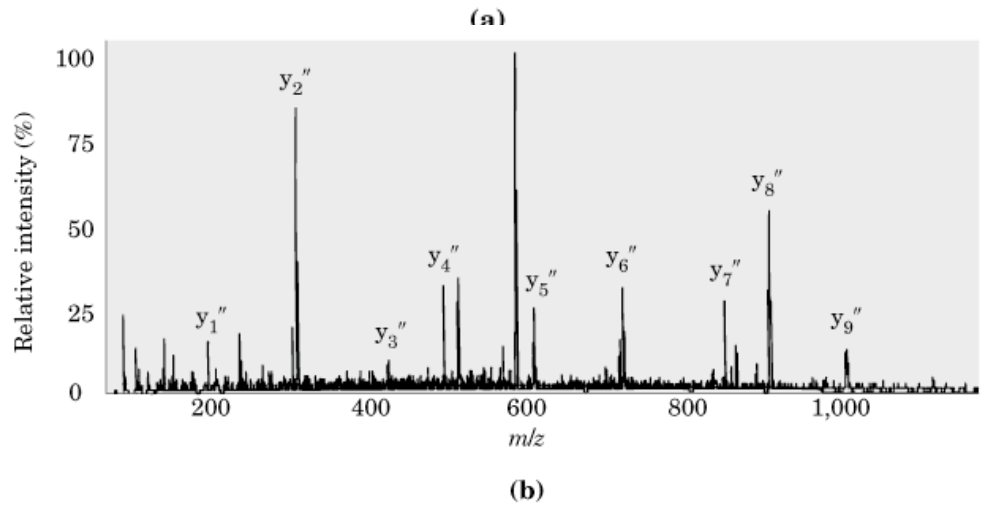
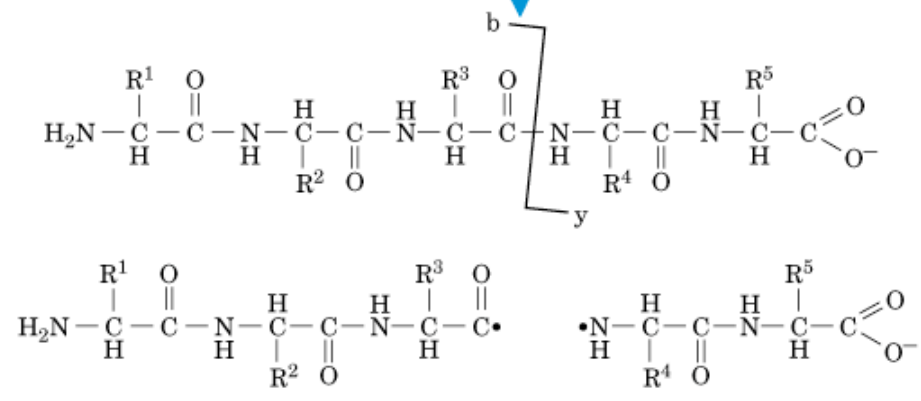
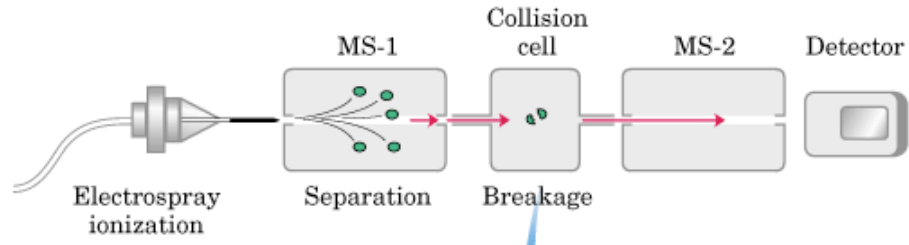
La estructura primaria de una proteína es su secuencia de aminoácidos, es característica de cada proteína y Puede ser determinada mediante métodos químicos o físicos.



La degradación de Edman (c) es un método químico para determinar la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) en una cadena polipeptídica.

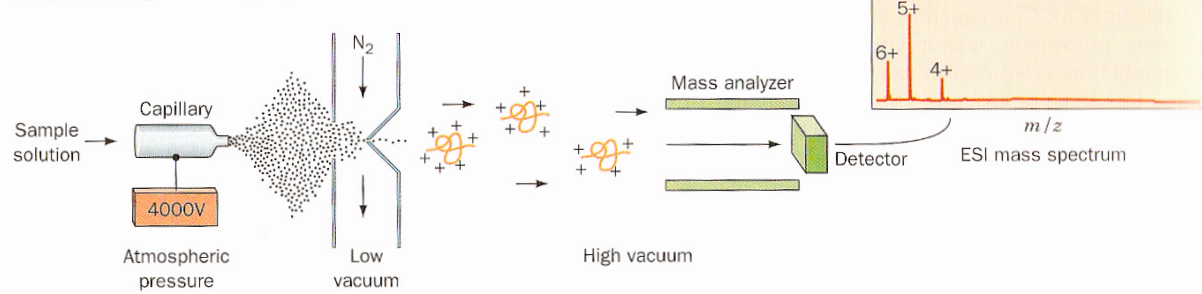


La espectrometría de masas es un método físico usado para determinar la estructura primaria de una proteína

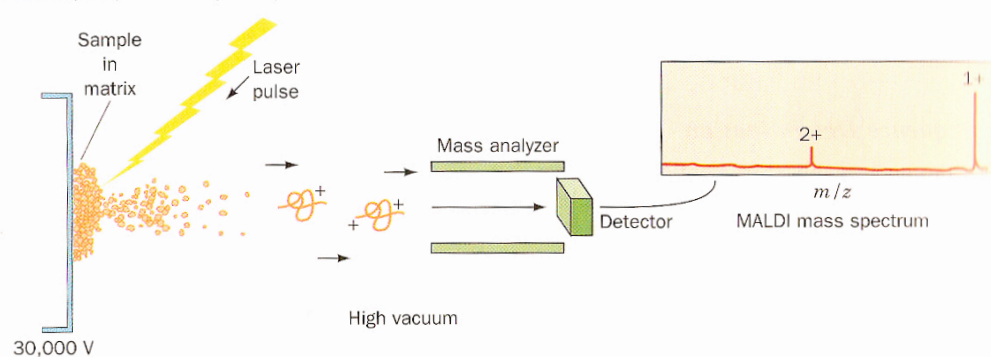


En la espectrometría de masas (MS, del inglés), la muestra de proteínas es particulada finamente, ionizada mediante pulsos de alta energía, y fragmentada en iones moleculares. Estos fragmentos son separados por su relación masa/carga ( $m/z$ ) en un analizador de tiempo de vuelo. Éste corresponde a un campo eléctrico en el vacío, dentro del cuál los Fragmentos son alineados en un campo magnético, y alcanzan el detector, de acuerdo a su  $m/z$ . El registro obtenido muestra un Número de señales que corresponden a los fragmentos producidos. Estos vienen a ser Como piezas de un rompecabezas, Sólo una solución es posible para que todas las Piezas calcen y den la estructura l Completa. Tal solución es hallada Usualmente por contraste contra Bases de datos o incluso manualmente. El patrón de fragmentación de una molécula es propio de cada molécula y constituye una huella digital.

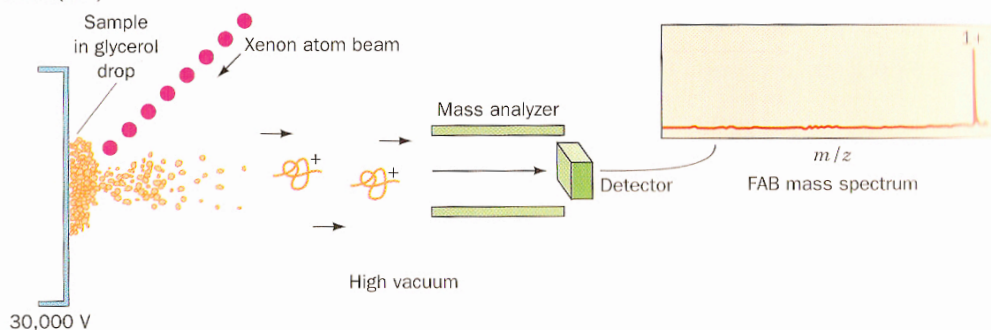
(a) Electrospray ionization (ESI)



(b) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)

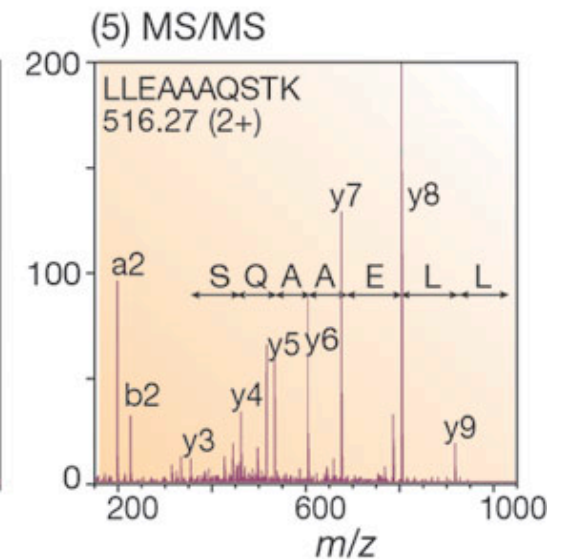
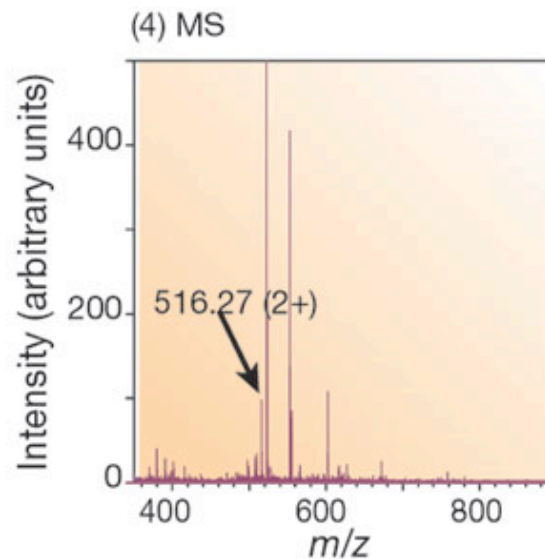
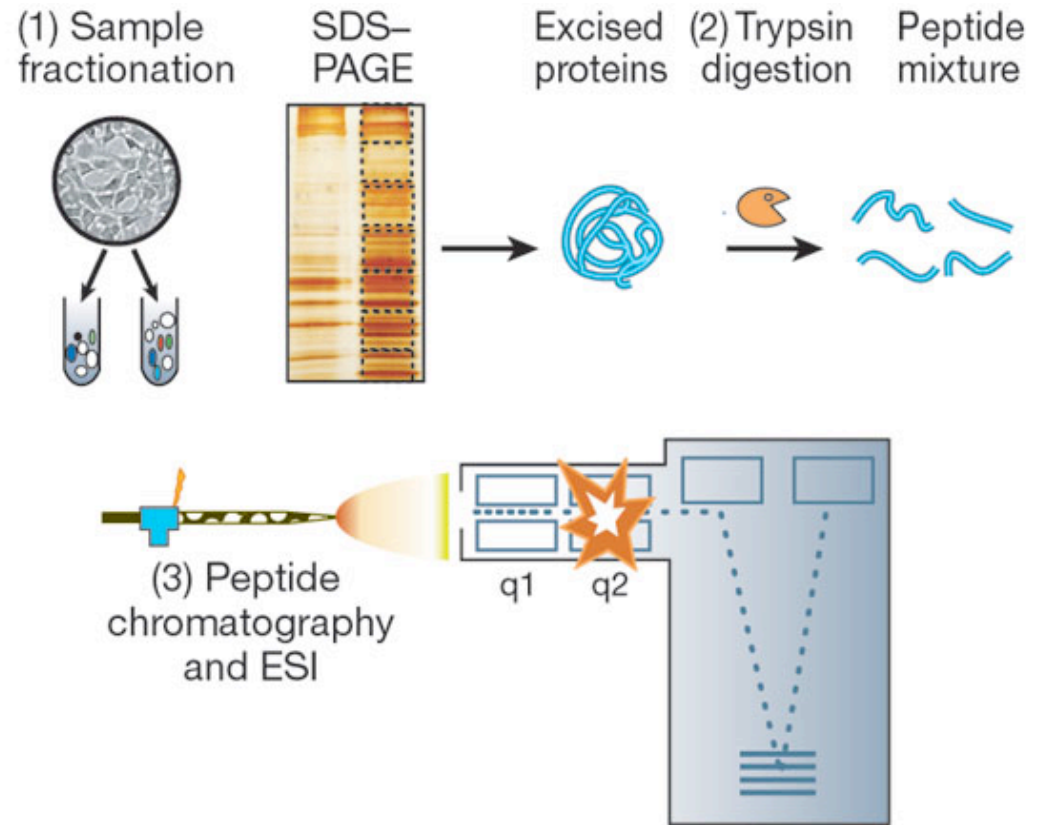


(c) Fast atom bombardment (FAB)

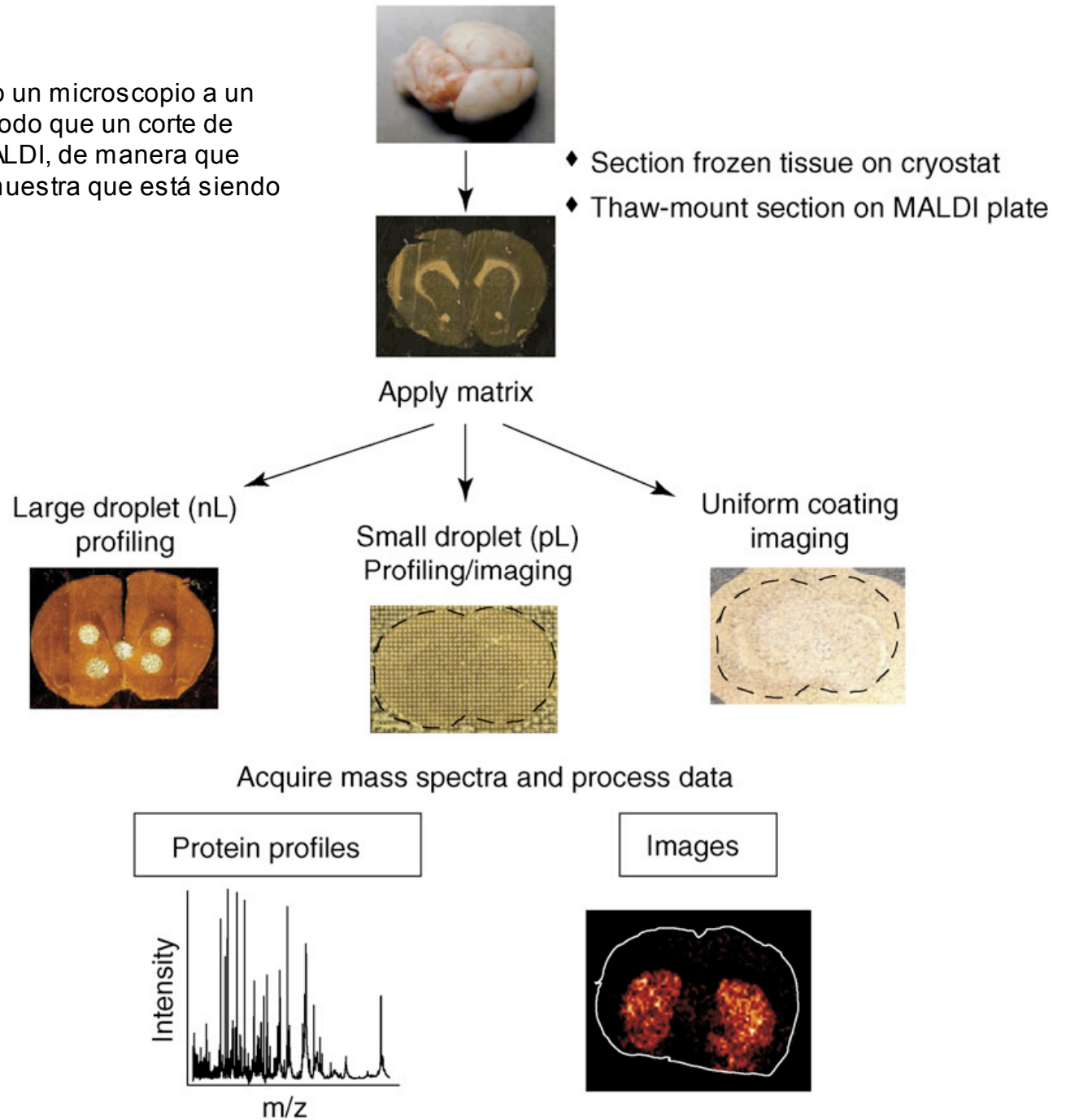


... of the gas phase ions required for ... bombardment (FAB). In ESI, a stream of dry  $N_2$  or some other

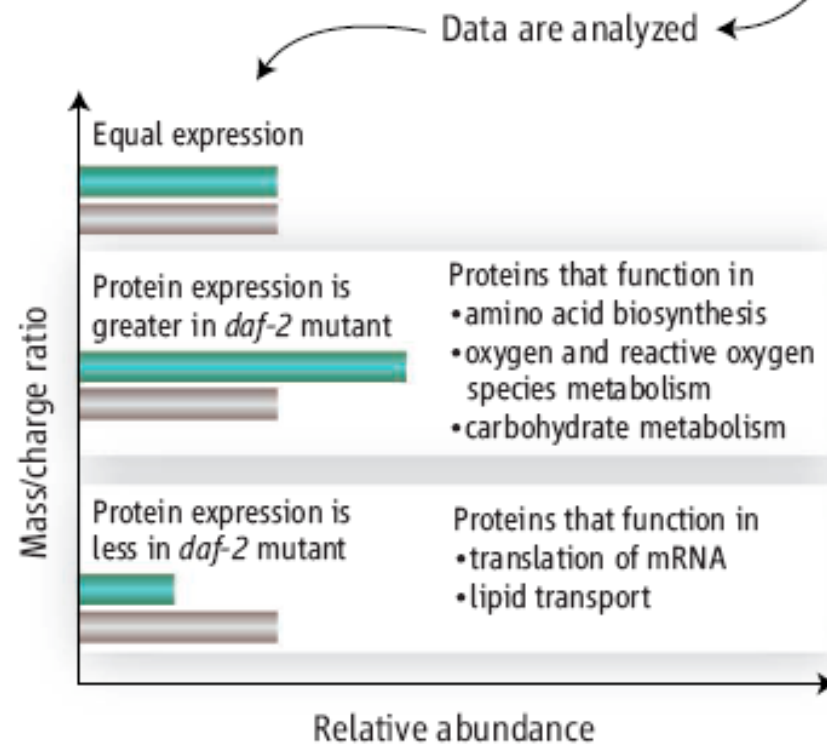
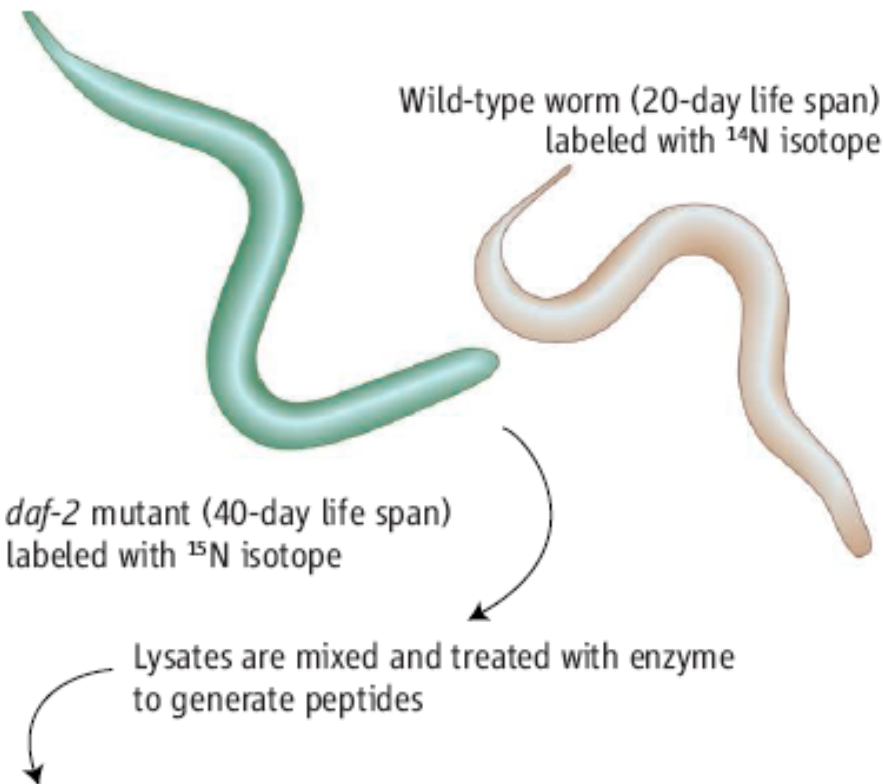
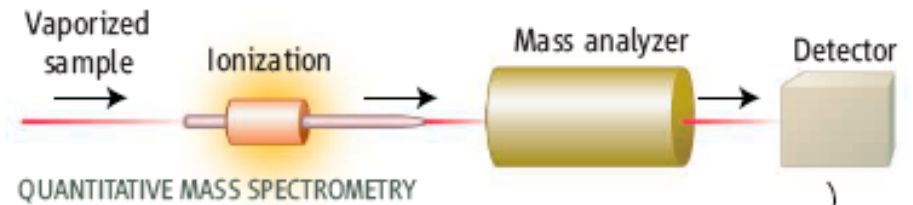
Varios métodos analíticos pueden ser Usados en conjunto para averiguar estructuras. En este ejemplo, la muestra Biológica fue fraccionada y luego analizada por SDS-PAGE (1). La banda de interés fue electroeluida del gel, es decir fue liberada del gel electricamente, luego fue digerida Con tripsina bajo condiciones controladas (tripsinización) (2), y la mezcla de péptidos resultantes fue separada por métodos cromatográficos (3). Luego, los péptidos purificados se sometieron a MS (4), y la señal de mayor tamaño fue analizada y dirigida a un segundo MS (5) dónde fue fragmentada en trozos más pequeños que permitieran su fácil identificación.



Avances recientes han acoplado un microscopio a un Espectrómetro de masas, de modo que un corte de Tejido puede ser sometido a MALDI, de manera que Se puede analizar por MS una muestra que está siendo Observada al microscopio.



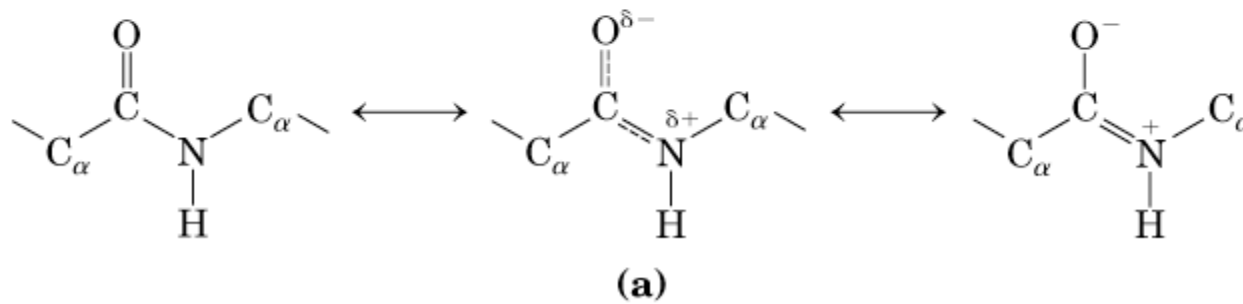
Otro avance reciente en MS es la comparación cuantitativa de dos proteomas. En este caso, un gusano mutante para el Gen *daf-2* (en verde) vive el doble de tiempo que el animal normal (en blanco). El mutante se crece en un medio rico en El  $^{15}\text{N}$ , de modo que cada una de sus proteínas pesara 1 g/mol más que el normal por cada N que haya en la estructura. Al mezclar la muestra de proteínas de ambos animales Se obtendrán patrones de fragmentación correspondientes A la colección de proteínas expresadas en cada individuo (proteoma). De este modo es posible determinar los Cambios en el proteoma en cada condición y obtener Una lista de proteínas sospechosas del fenotipo En cuestión.



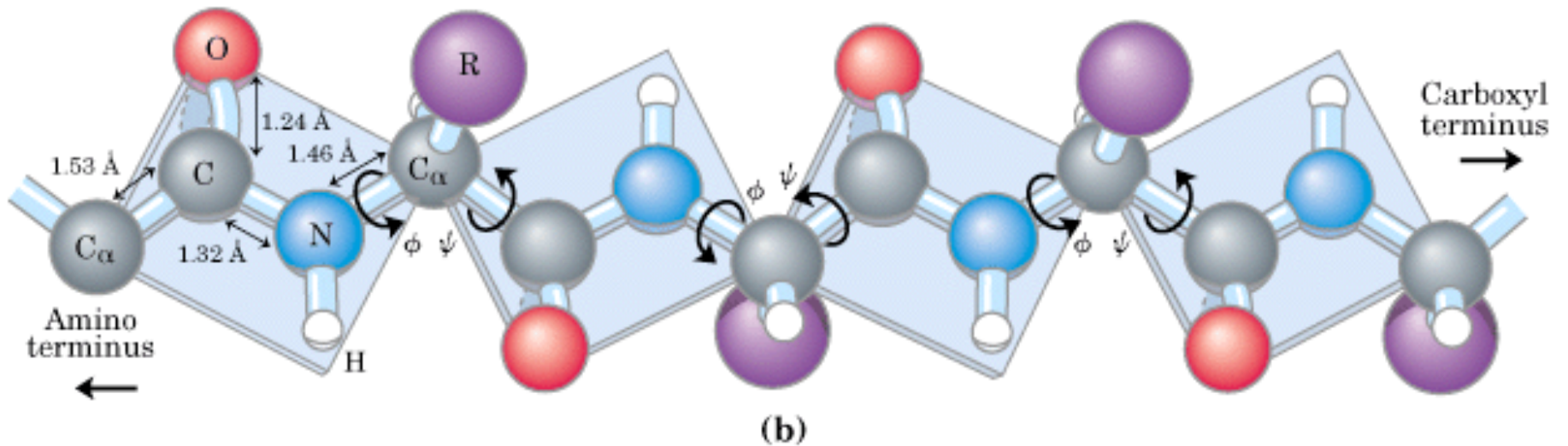
**Revealing relevant factors.** A mass spectrometry approach quantitates the abundance of proteins in a long-lived worm mutant (*daf-2*), providing clues to the organism's increased life span.

El enlace peptídico define a un péptido, y tiene carácter parcial de doble enlace. Por ello, el enlace peptídico es plano y no permite la libre rotación de sus sustituyentes.

The carbonyl oxygen has a partial negative charge and the amide nitrogen a partial positive charge, setting up a small electric dipole. Virtually all peptide bonds in proteins occur in this trans configuration; an exception is noted in Figure 6–8b.

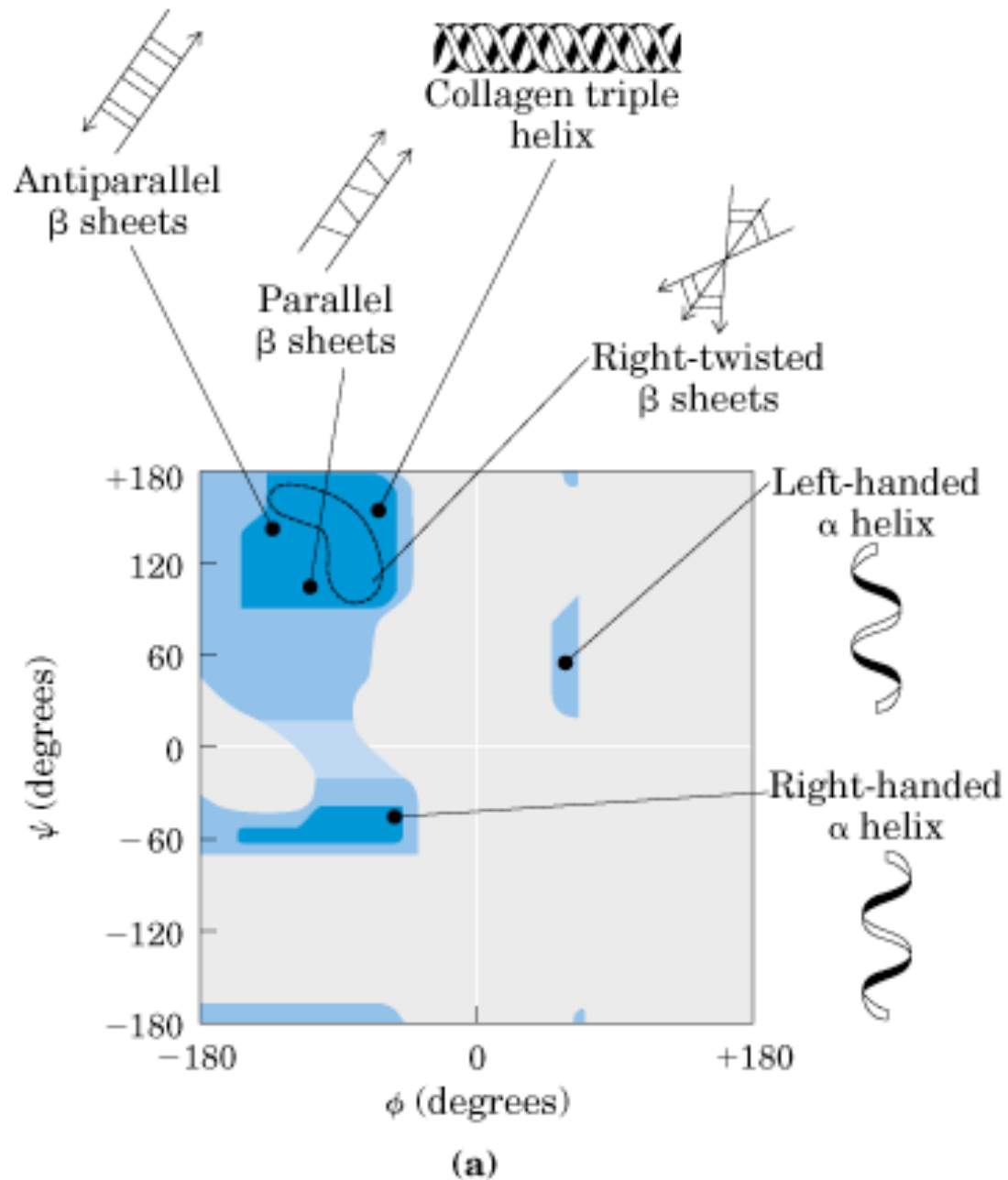


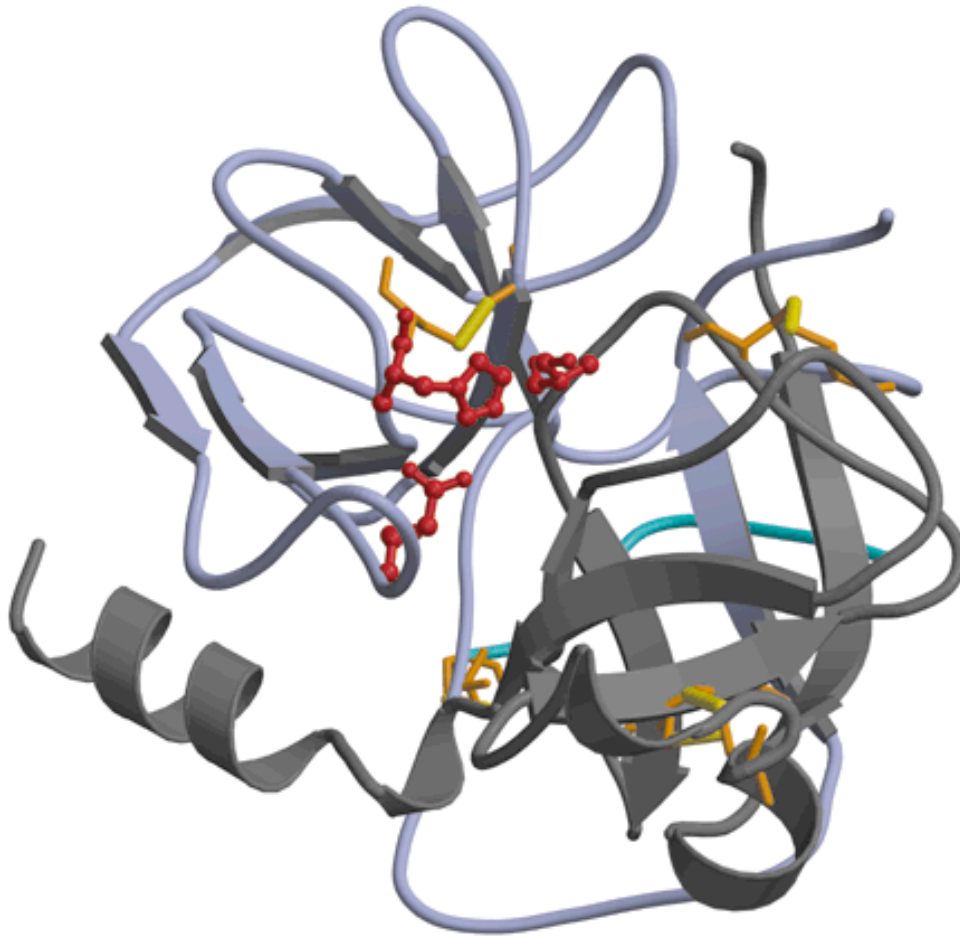




Los ángulos de torsión en torno al Carbono alfa permiten flexibilidad conformacional a la cadena principal (cadena polipeptídica, sin considerar los grupos de cadena lateral, característicos de cada aminoácido).

Un subconjunto restringido de valores para los ángulos de torsión de la cadena principal son observados en proteínas y Se pueden distinguir rangos de valores esperados para cada estructura secundaria.





La proteína para ser funcional adopta una estructura definida, llamada usualmente su estado nativo.

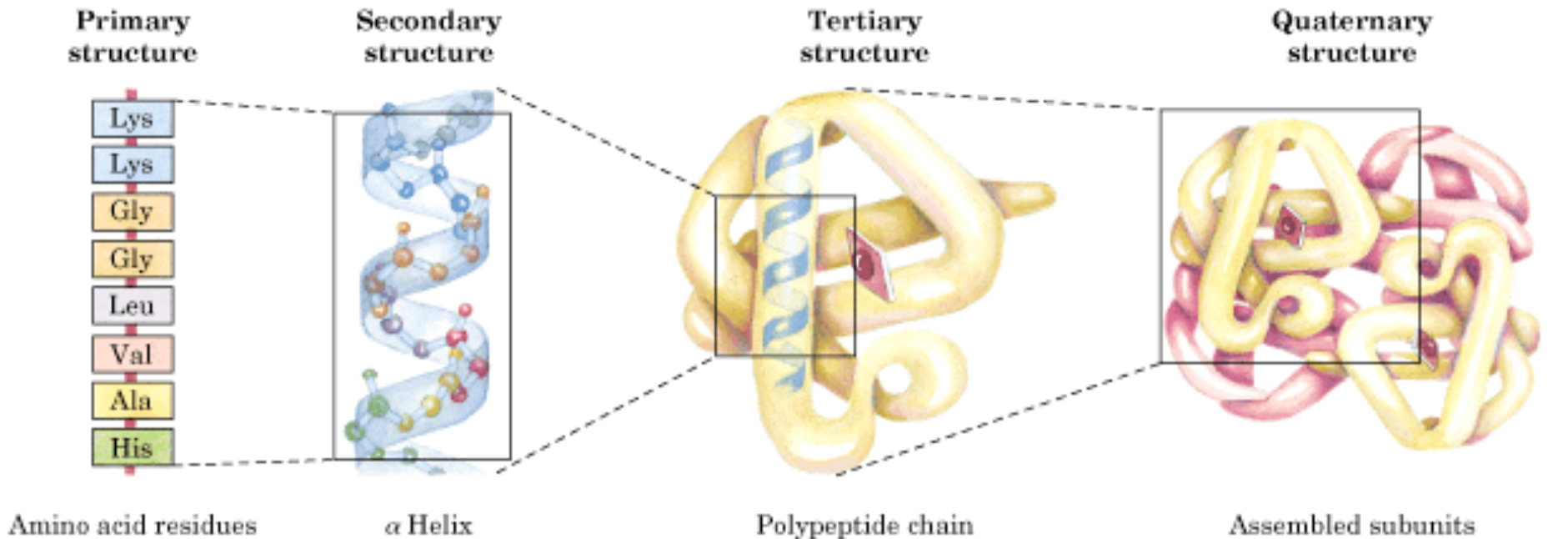
Denaturación: El estado nativo se puede perder Por la acción de la temperatura, fuerza iónica, detergentes, agentes oxidantes, y caotrópicos.

**Principio de Anfinsen:**

**“La estructura tridimensional de una proteína está determinada por la secuencia de aminoácidos”.**

Pese a numerosos progresos, el código de plegamiento, es decir, la predicción del estado nativo en base a la secuencia de aminoácidos aún no ha sido elucidado.

# Niveles de la estructura de proteínas



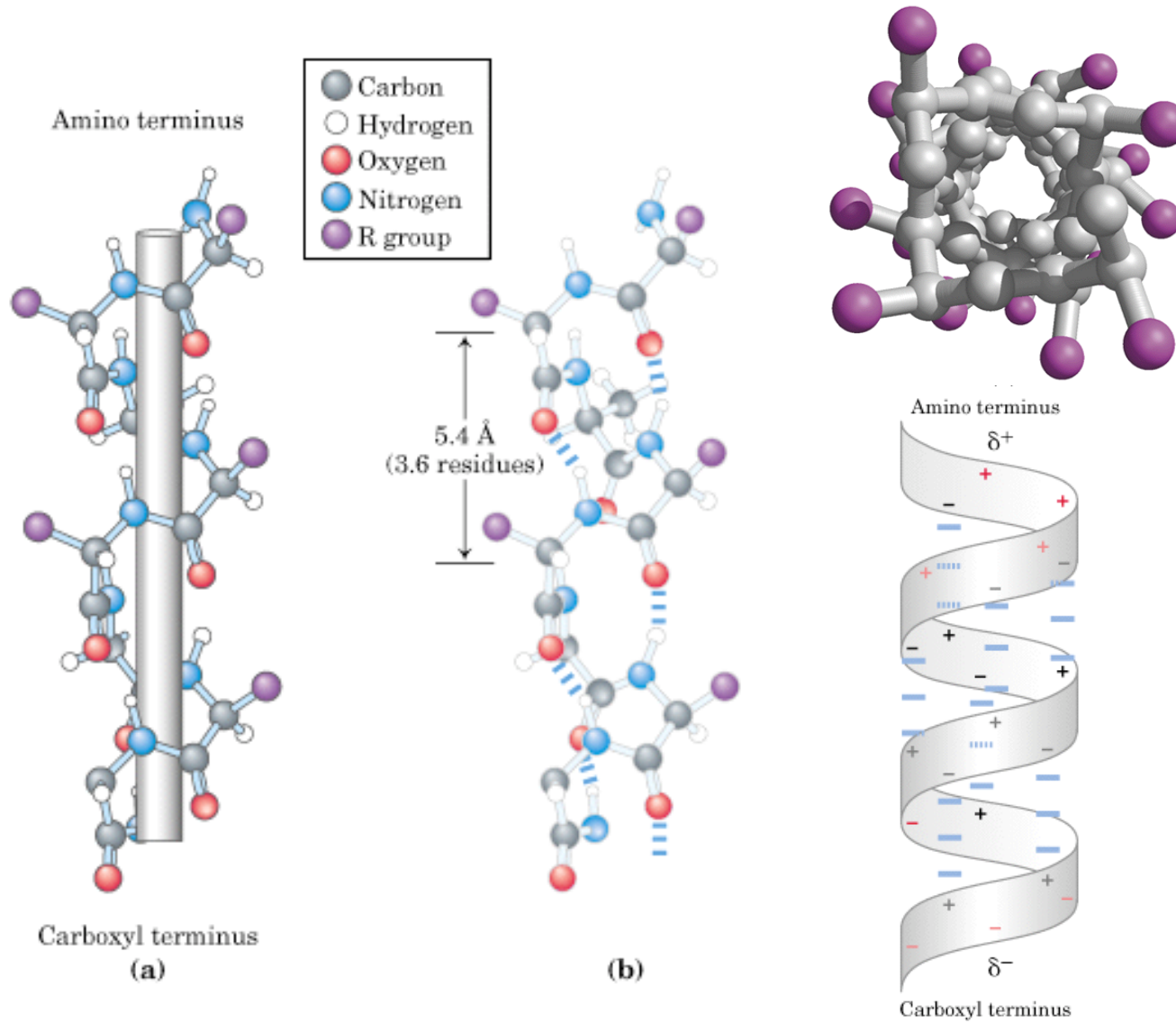
I: secuencia de aminoácidos

II: Estructura 3D Estabilizada por Puentes de Hidrógeno De cadena principal (establecidos por el Grupo amida formado Por el enlace peptídico

III: Estructura 3D de una Cadena polipeptídica Completa. Involucra arreglos de Estructura II (estructura super-II) e interacciones de cadena lateral, mediante puentes de Hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas (puentes salinos) y eventualmente, puentes disulfuro.

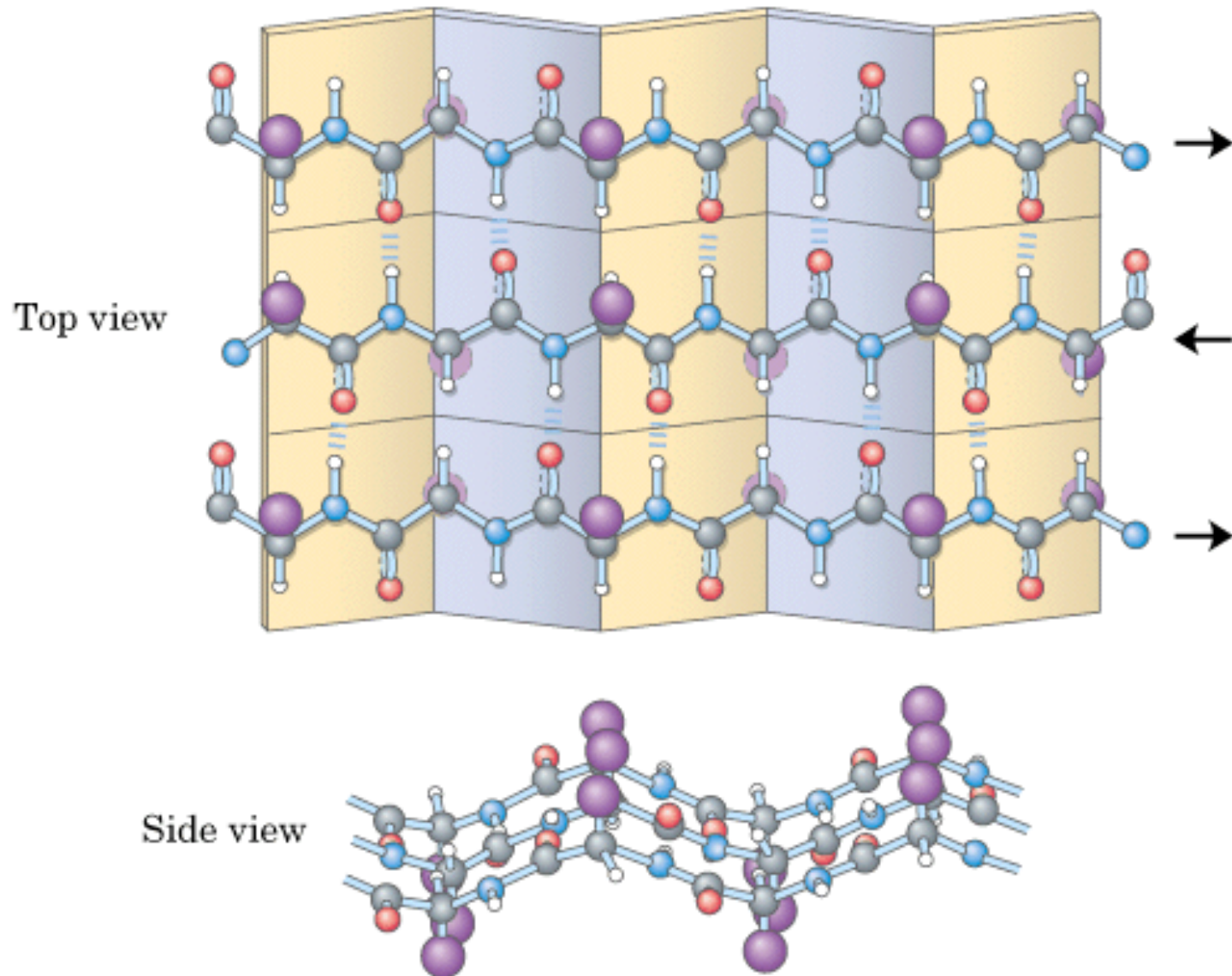
IV: Ensamble de cadenas Polipeptídicas en un complejo Funcional. Todas las interacciones Presentes en III pueden estar Presentes en IV

## Estructuras secundarias: el alfa hélice



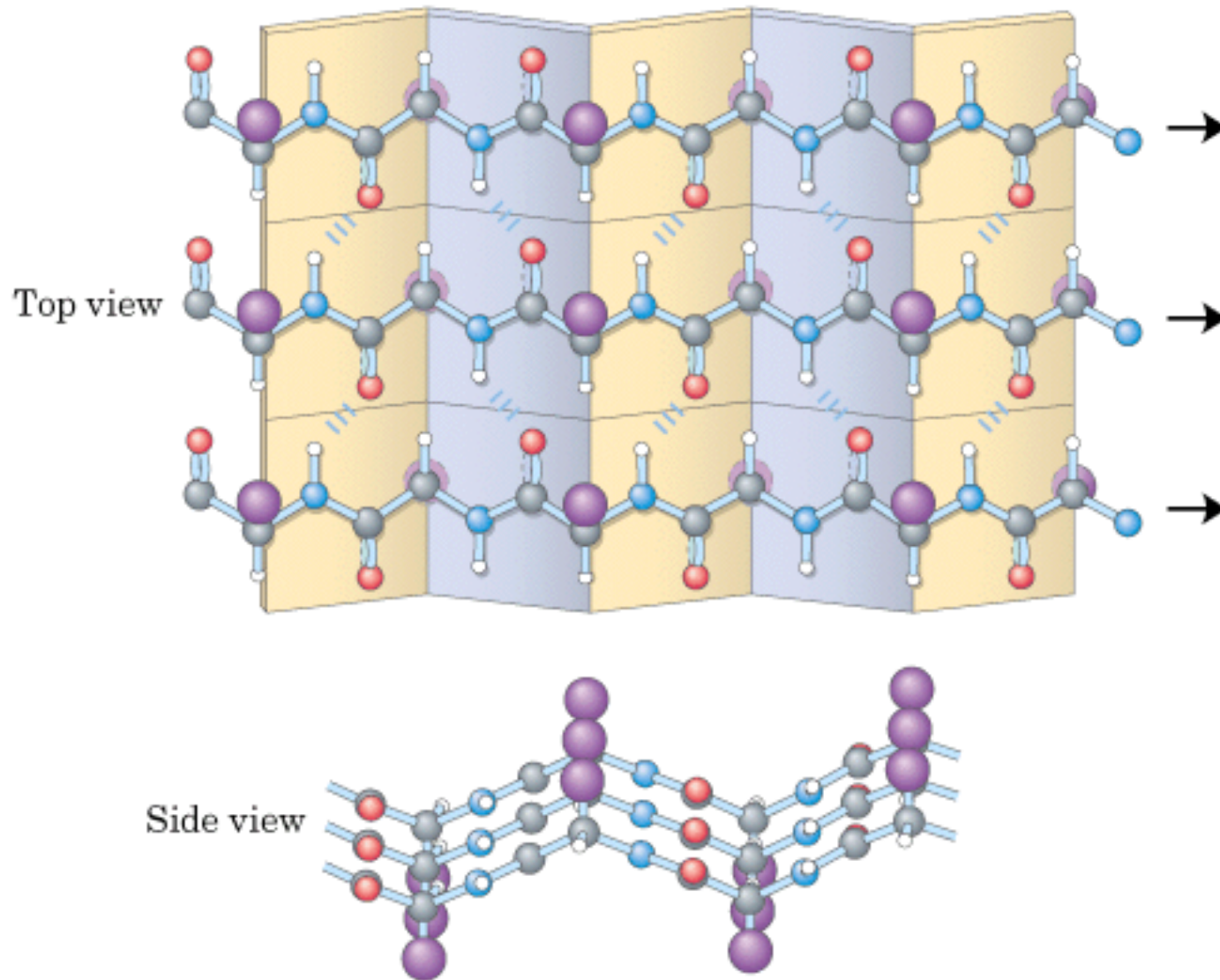
**Hoja  $\beta$  antiparalela** (los puentes de H corren perpendiculares a la cadena principal).  
Una hoja  $\beta$  es el arreglo de varias hebras  $\beta$ .

**(a) Antiparallel**



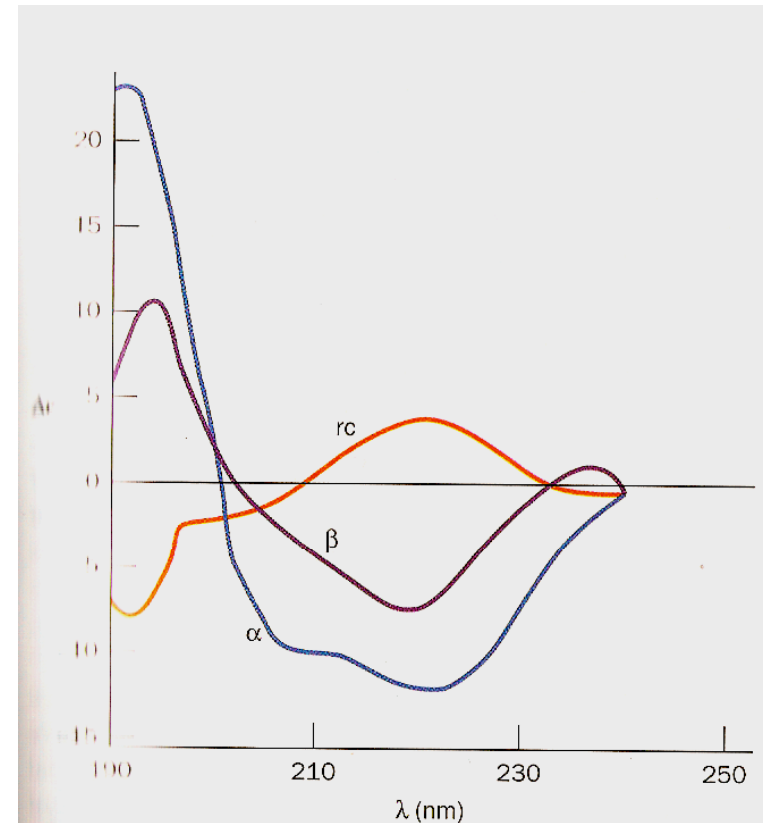
**Hoja  $\beta$  paralela.** Los puentes de H corren oblicuos a la cadena principal

**(b) Parallel**



## Determinación experimental del contenido de estructuras secundarias

Las estructuras secundarias de proteínas pueden ser determinadas mediante dicroísmo circular, una técnica, en principio, similar al de la espectrofotometría sólo que ahora se incide luz circularmente polarizada sobre la muestra. Para la luz polarizada en cada sentido (izquierda o derecha), una molécula quiral presenta dos valores de su coeficiente de extinción molar  $\epsilon_L$  y  $\epsilon_R$ . La diferencia entre ambas ( $\Delta\epsilon$ ) es graficada contra la longitud de onda incidente y se obtiene un espectro de dicroísmo circular. En la figura se muestran los espectros característicos de alfa hélice ( $\alpha$ ), hoja  $\beta$  y una cadena desestructurada (random coil, rc).



**FIGURE 9-10 Circular dichroism (CD) spectra of polypeptides.** Polypeptides in the  $\alpha$  helix,  $\beta$  sheet, and random coil (rc) conformations were determined from the CD spectra of proteins of known X-ray structures. By comparing these spectra with the absorption spectra in Fig. 9-9, it can be seen that  $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$  is a small difference of two large numbers. [After Saxena, V.P. and Wetlaufer, D.B., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* **66**, 971 (1971).]



table 6-2

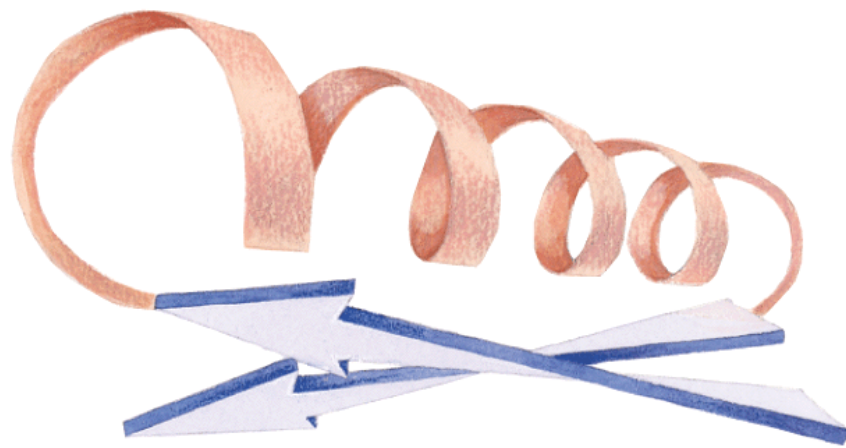
**Approximate Amounts of  $\alpha$  Helix and  $\beta$  Conformation in Some Single-Chain Proteins\***

Protein (total residues)	Residues (%)	
	$\alpha$ Helix	$\beta$ Conformation
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (307)	38	17
Cytochrome <i>c</i> (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0

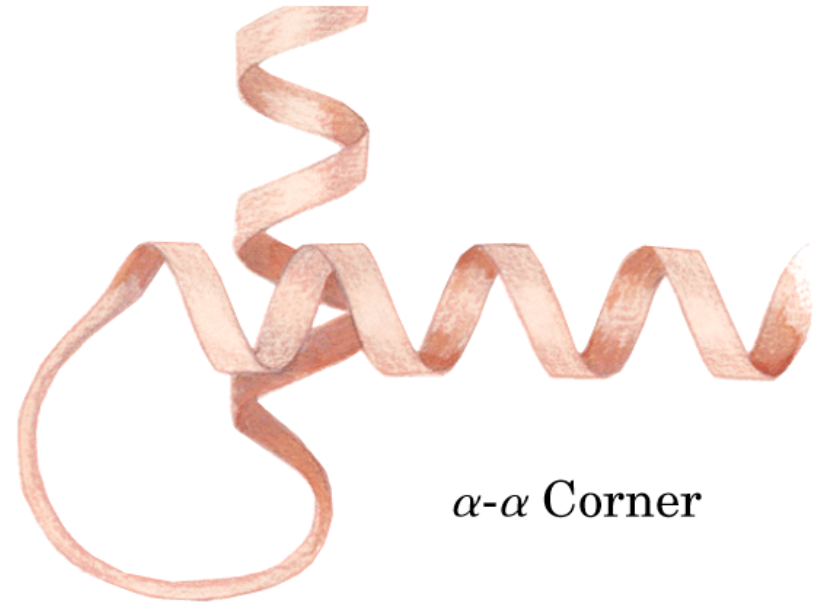
**Source:** Data from Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W.H. Freeman and Company, New York.

\*Portions of the polypeptide chains that are not accounted for by  $\alpha$  helix or  $\beta$  conformation consist of bends and irregularly coiled or extended stretches. Segments of  $\alpha$  helix and  $\beta$  conformation sometimes deviate slightly from their normal dimensions and geometry.

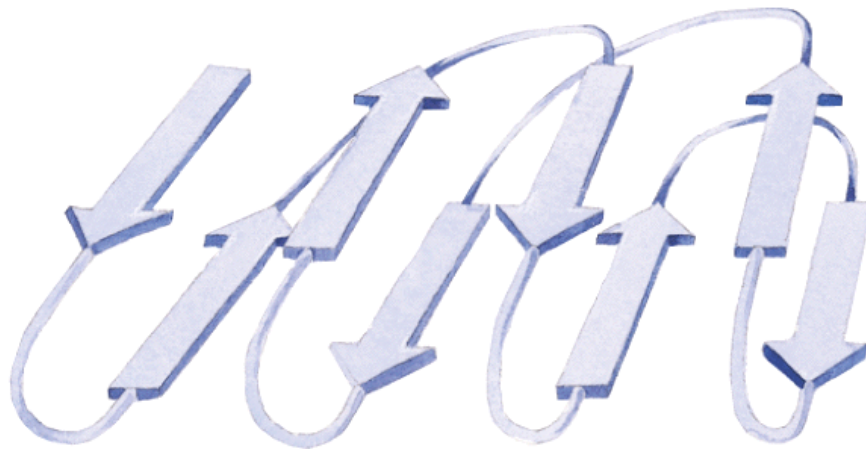
**Estructura Super Secundaria (super-II).** Corresponde a arreglos regulares de estructuras II



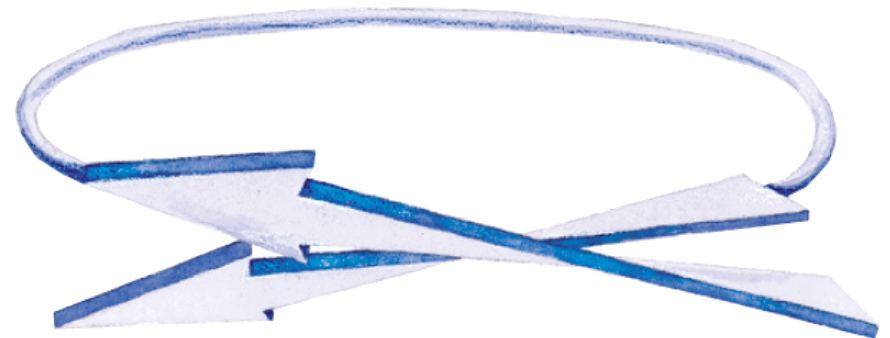
**(a)**  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  Loop



$\alpha$ - $\alpha$  Corner



**(b)** Typical connections in an all- $\beta$  motif



**(c)** Right-handed connection between  $\beta$  strands

Se asume que la estructura nativa  
Corresponde al mínimo energético  
Global. Sin embargo, numerosos mínimos locales  
pueden ser identificados. Algunos de ellos pueden  
Corresponder a intermediarios en el camino  
de plegamiento de la proteína.

**Paradoja de Levinthal:**

El tiempo en segundos, requerido para  
Que una proteína explore todas las conformaciones  
Posibles se estima como

$$t = 10^n / 10^{13};$$

donde n = número de residuos en la  
Estructura I.

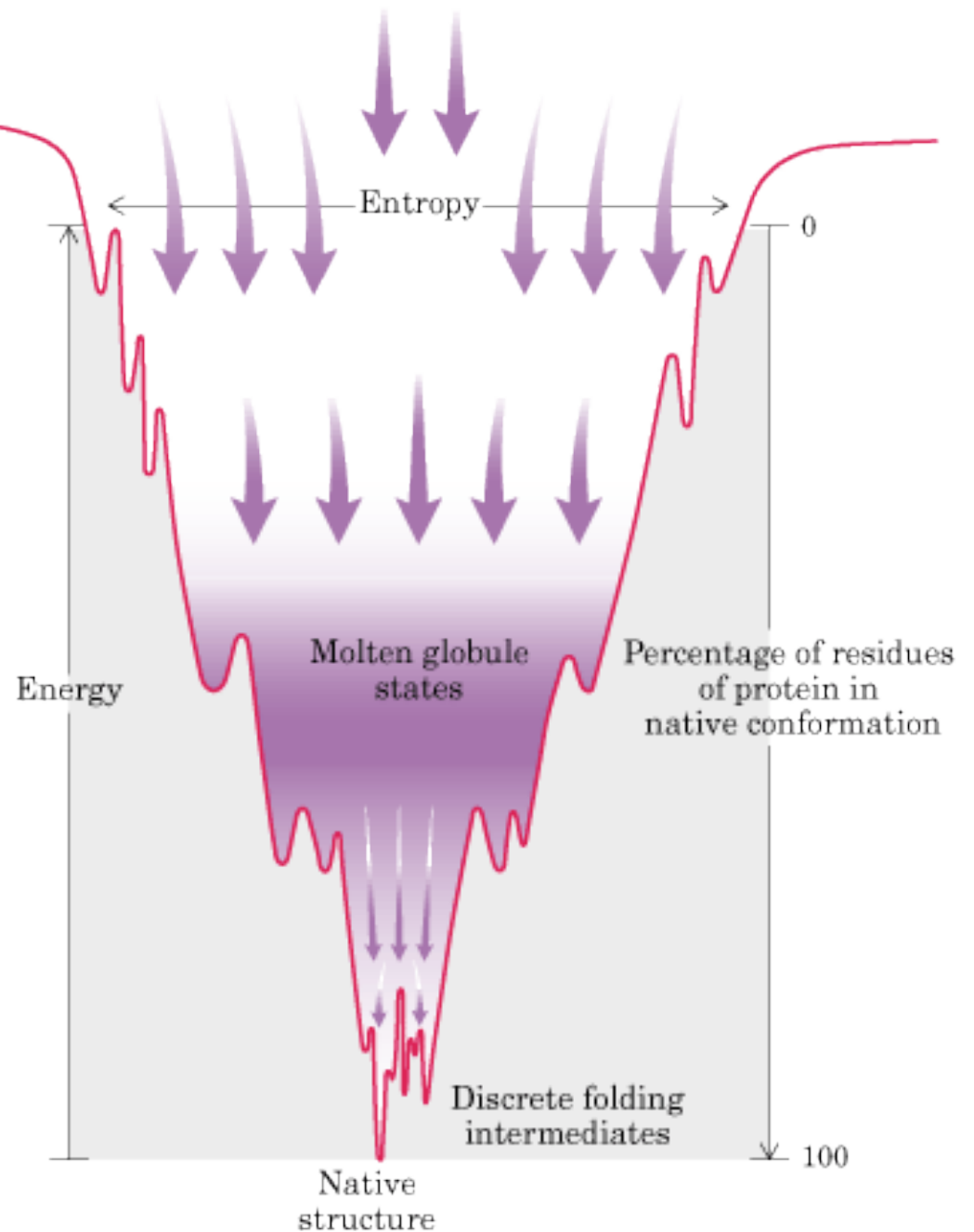
Para una proteína de 100 residuos,  
 $t = 10^{87}$  s

Esto es mucho más que la edad del  
Universo, estimada alrededor de  
 $20 \times 10^9$  años =  $6 \times 10^{17}$  s.

Luego,

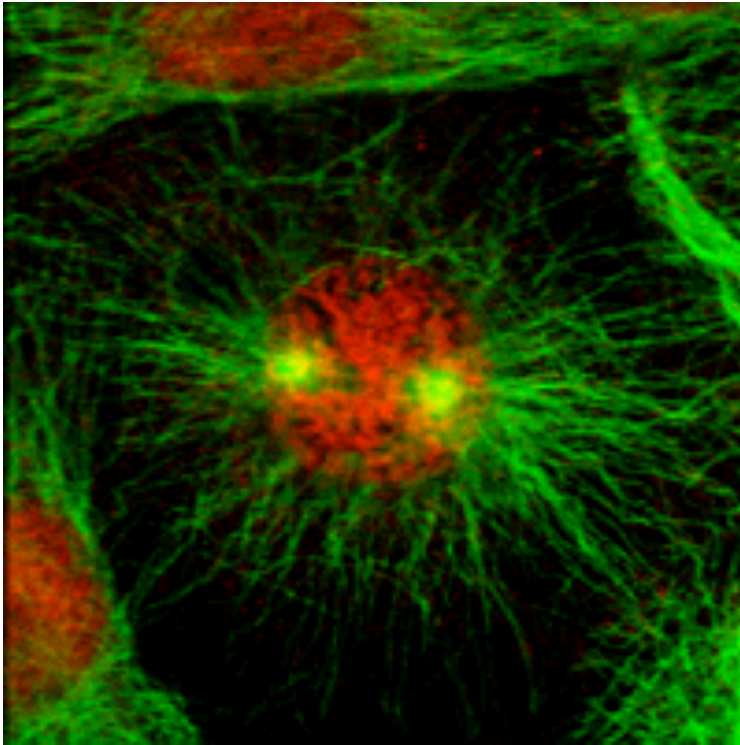
**“Es imposible que una proteína  
explora todo su espacio conformacional  
para adoptar su estado nativo. Ciertos  
Caminos de plegamiento deberían ser  
identificados para cada proteína”**

Beginning of helix formation and collapse



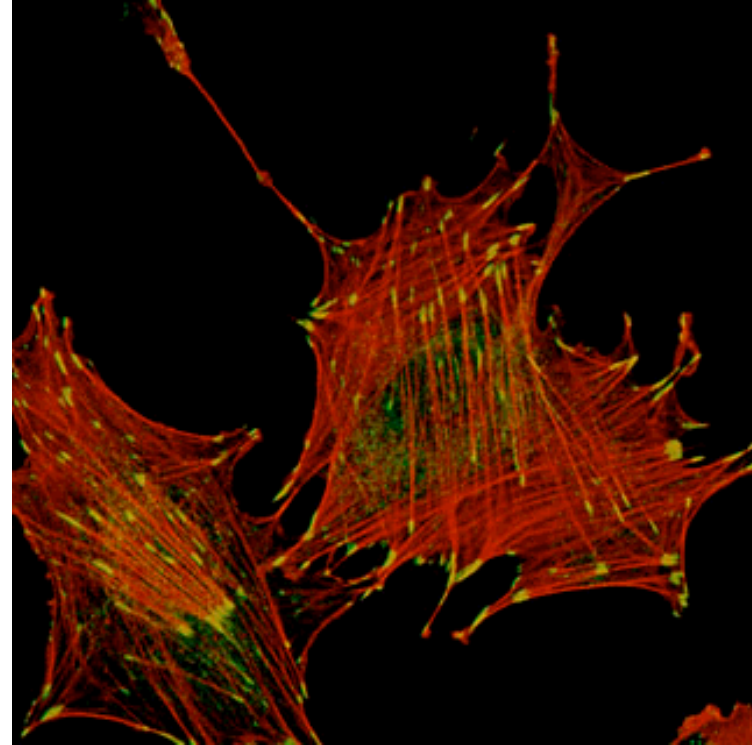
3. Métodos de separación de proteínas de proteínas.  
Electroforesis, cromatografías y Técnicas de afinidad.

# INMUNOFLOURESCENCIA



**ANTICUERPO PRIMARIO  
ANTI-TUBULINA**

**ANTICUERPO SECUNDARIO  
FLOURESCEINA**



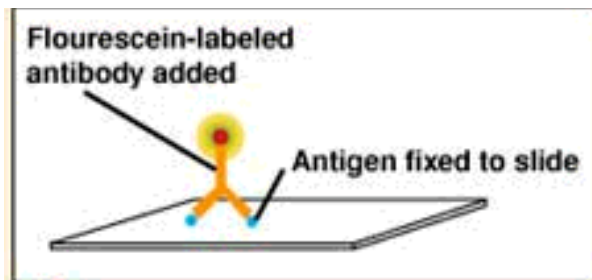
**ANTI-ACTINA**

**RODAMINA**

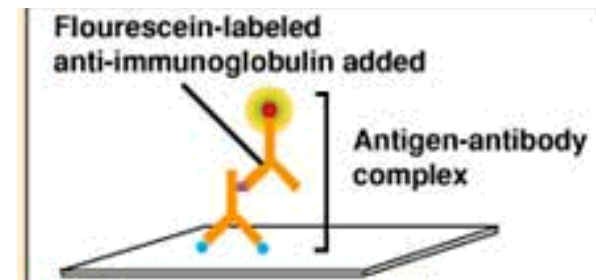
- **INMUNOHISTOQUIMICA/INMUNOFLUORESCENCIA**  
**DETECTA LA PRESENCIA DE UNA PROTEINA EN UNA**  
**CELULA/TEJIDO/ORGANISMO PERMITIENDO CONOCER**  
**SU EXPRESION ESPACIAL**

### INMUNOFLUORESCENCIA

#### A) DIRECTA



#### B) INDIRECTA



INCUBACION

LAVADO

VISUALIZACION EN  
MICROSCOPIO

## Electroforesis en solución (teoría)

Electroforesis es una técnica de separación de proteínas y ácidos nucleicos basados en su migración en un campo eléctrico. En solución:

$$Ez = 6\Pi\eta r v$$

Donde E, campo eléctrico; z, carga eléctrica del analito;  $\eta$ , viscosidad del medio; r, radio de Stokes (similar Al radio hidrodinámico), v, velocidad de migración.

Luego,  $\mu_o = z/6\Pi\eta r$  (Tiselius, 1937)

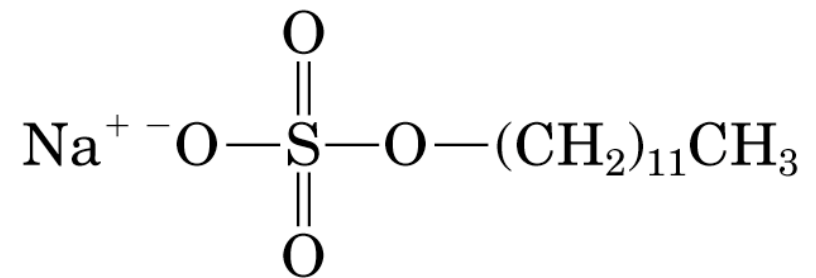
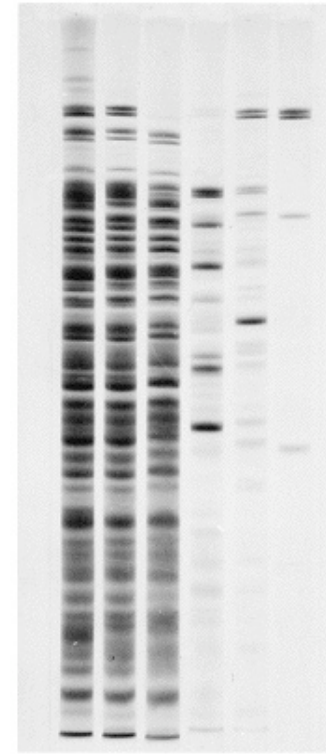
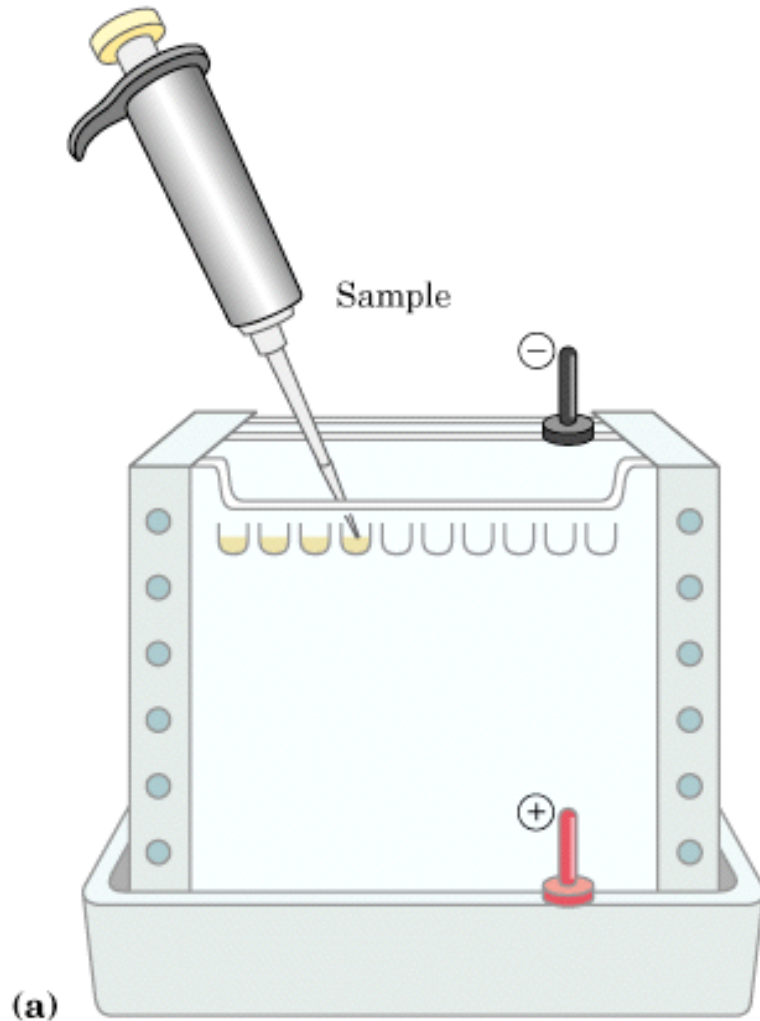
Donde  $\mu_o$  es la migración electroforética en solución, o también llamada migración específica.

La electroforesis en solución fue reemplazada por la electroforesis en gel. En el caso de separar proteínas Se realiza electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, del inglés "SDS-Polyacrylamide Gel electroforesis). El gel funciona como soporte y es un medio poroso capaz de filtrar las proteínas por su tamaño (las moléculas pequeñas atraviesan el gel más rápido), mientras que el campo eléctrico aplicado sobre el gel, Permite su separación por carga. La acción del detergente aniónico, SDS permite imprimirle a la proteína denaturada Una carga eléctrica negativa, aproximadamente proporcional a su masa. En SDS-PAGE, se cumple aproximadamente que:

$$\mu = \mu_o (A - \log MW)/A,$$

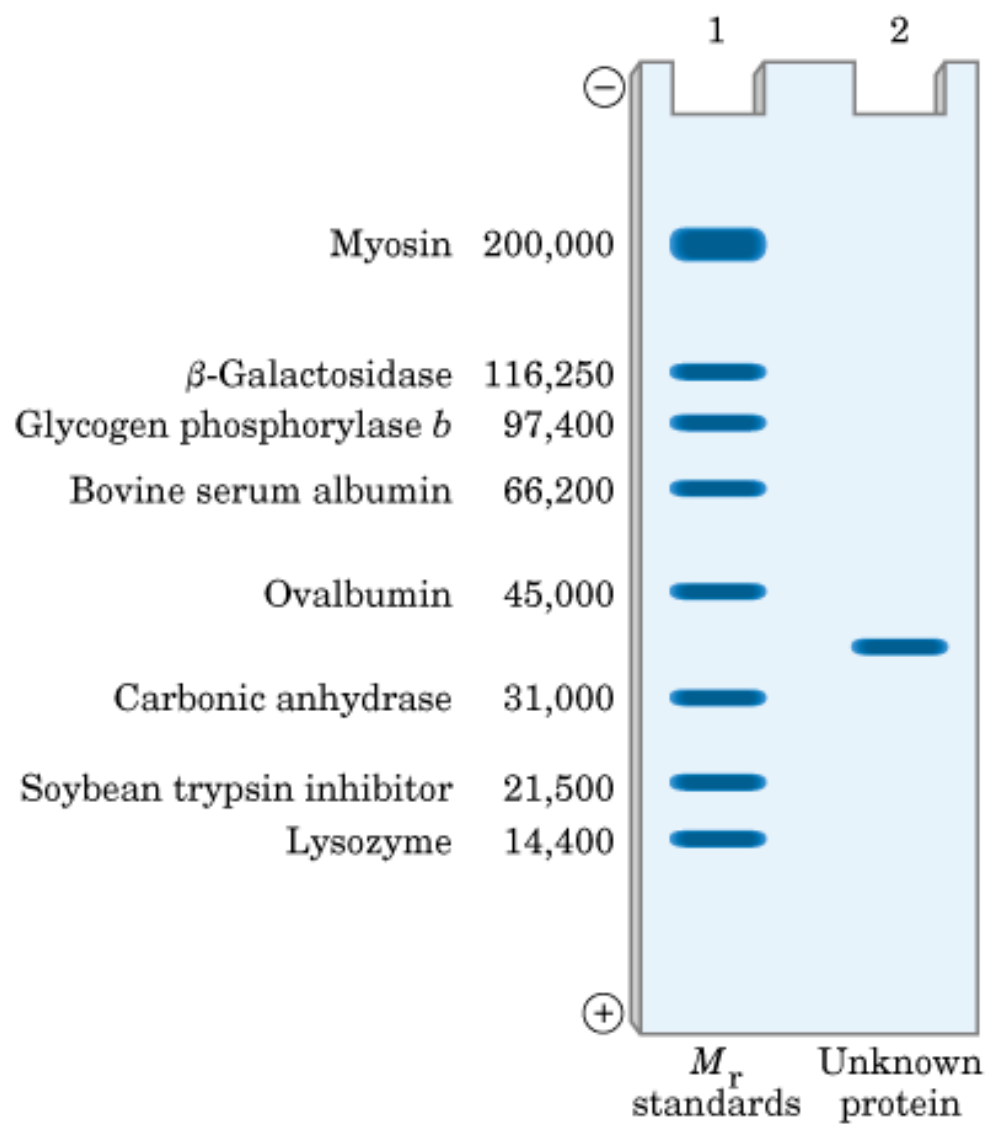
Donde MW, peso molecular en daltons (g/mol); A = logMW<sub>o</sub>, una especie de tamaño tal que no migraría en el gel;  $\mu$ , migración en mm. Luego  $\mu$  es inversamente proporcional al logMW, con una pendiente  $\mu_o/A$ , y un intercepto  $\mu_o$ .

# SDS-PAGE

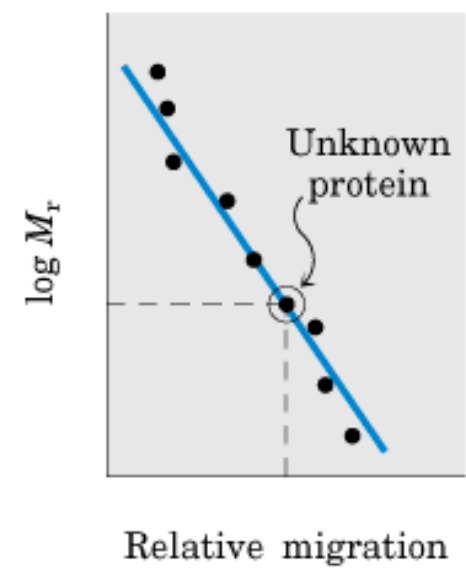


Sodium dodecyl sulfate  
(SDS)





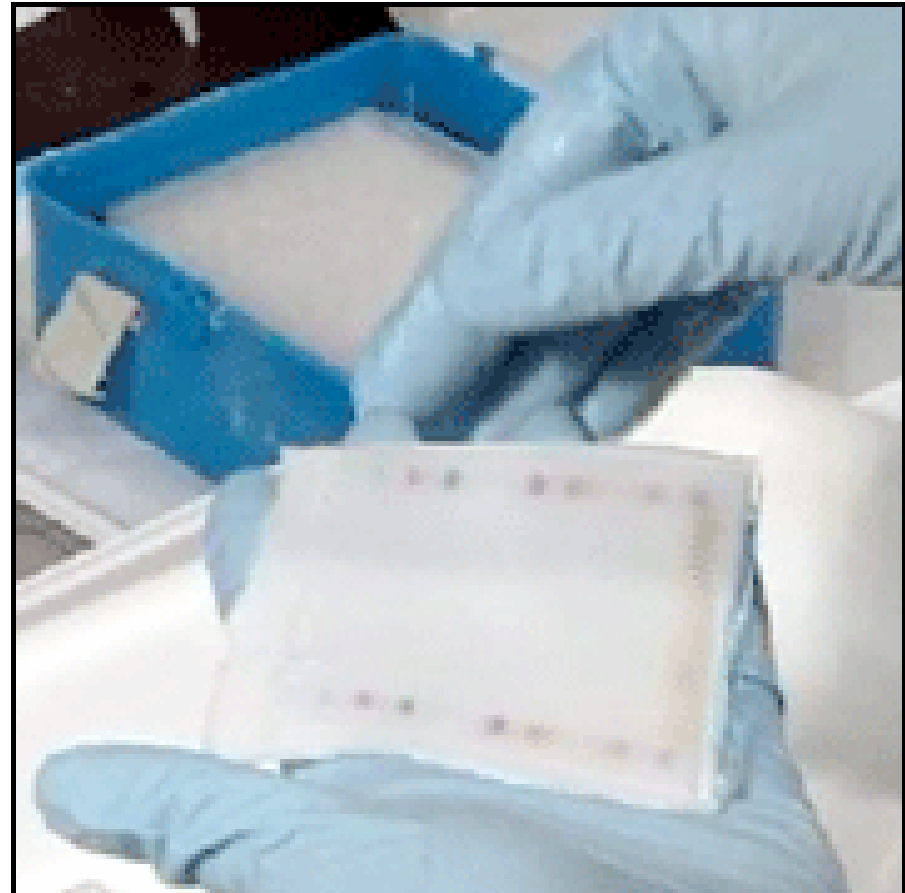
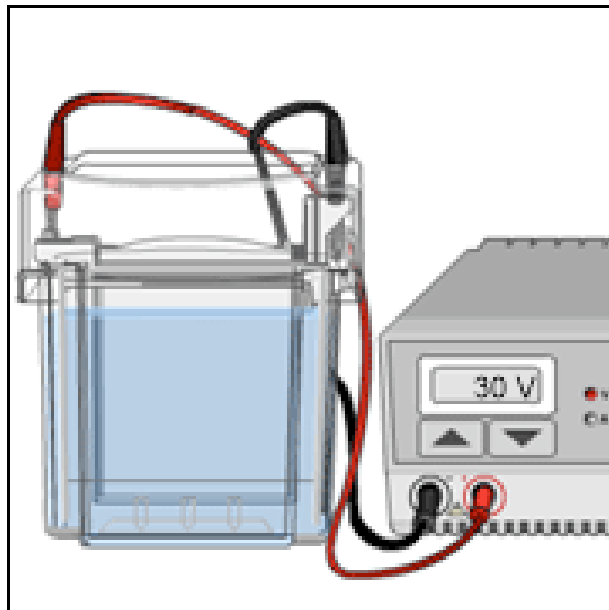
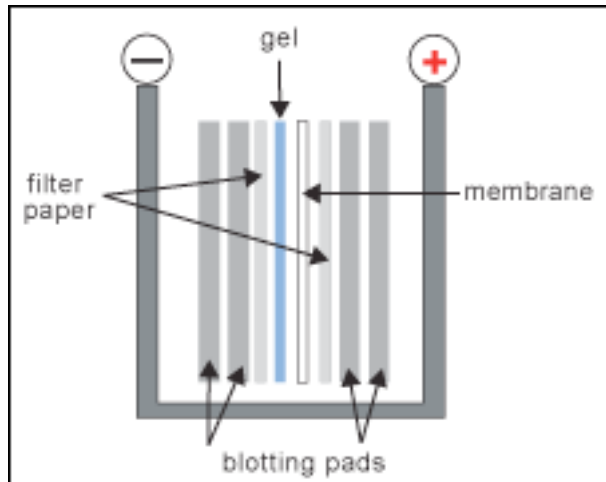
(a)



(b)

## WESTERN BLOT.

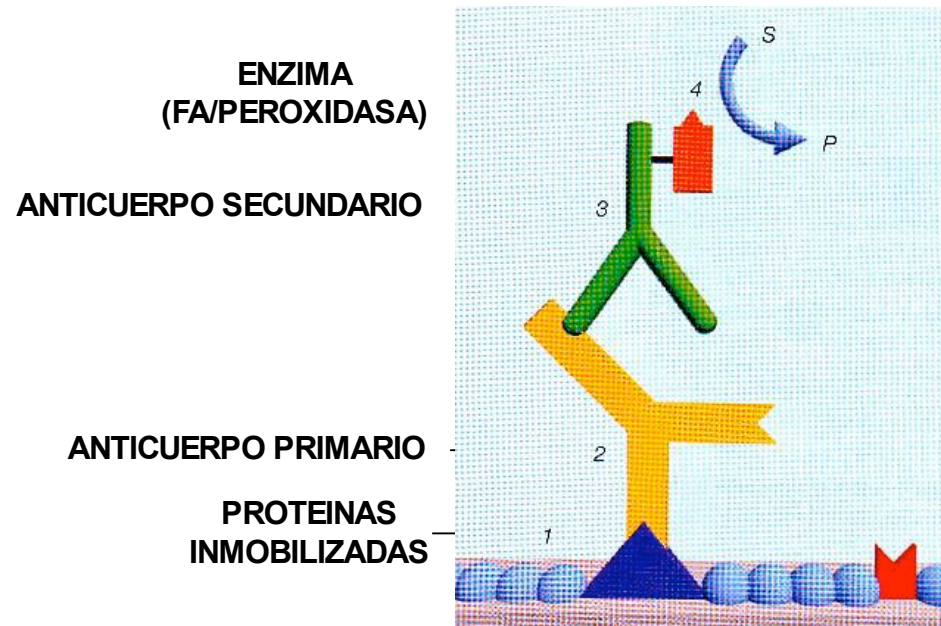
Transferencia electroforética de proteínas desde un gel a una matriz Sólida (ej. nitrocelulosa). Proteínas específicas son identificadas después de incubarlas con anticuerpos específicos y revelar la reacción antígeno-anticuerpo mediante una reacción coloreada o quimio-luminiscente.



# WESTERN BLOT

3. INCUBACION CON EL ANTICUERPO PRIMARIO
4. INCUBACION CON UN ANTICUERPO SECUNDARIO ACOPLADO A UNA ENZIMA (FOSFATASA ALCALINA O PEROXIDASA)
5. DETECCION

PROTEINAS



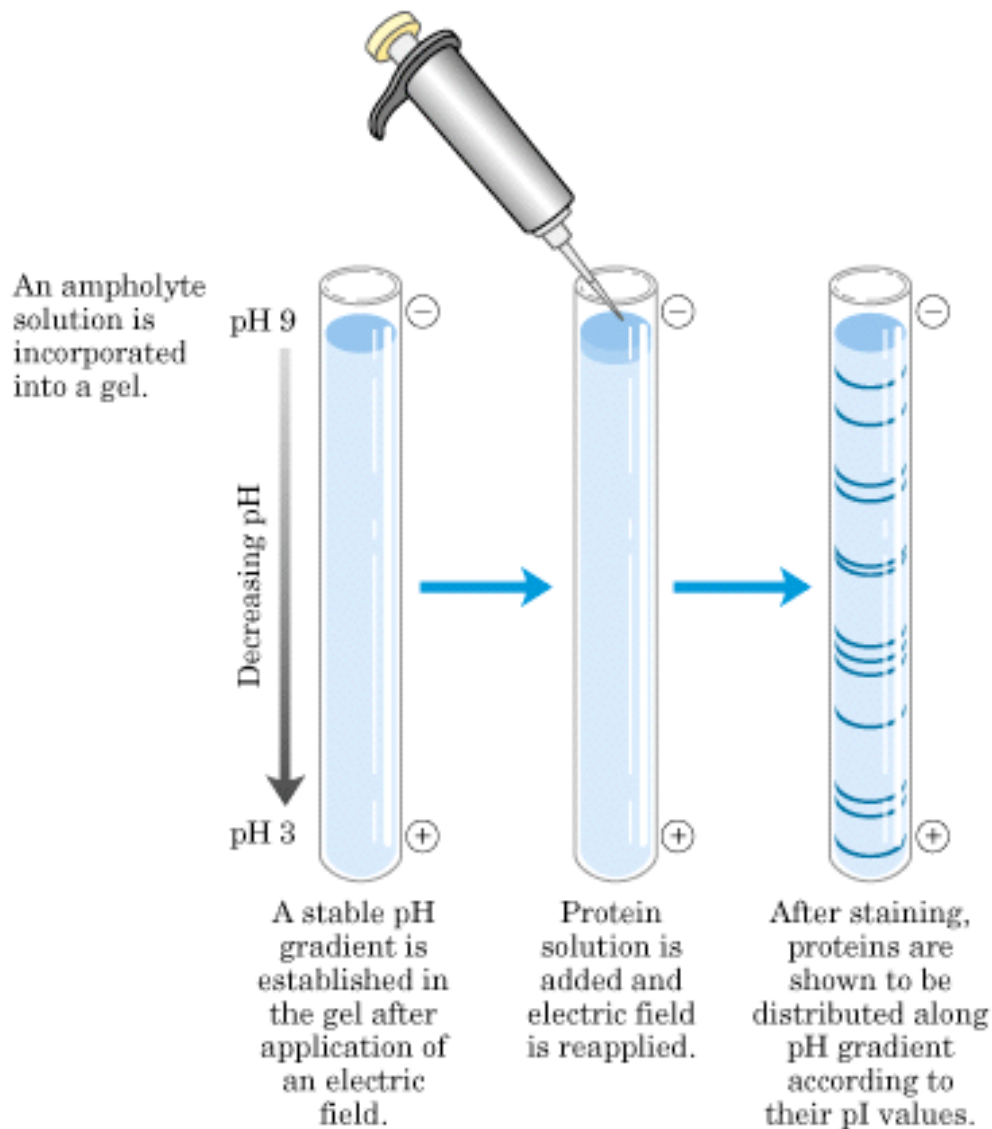
Las proteínas también pueden ser separadas por su punto isoeléctrico

table 5-6

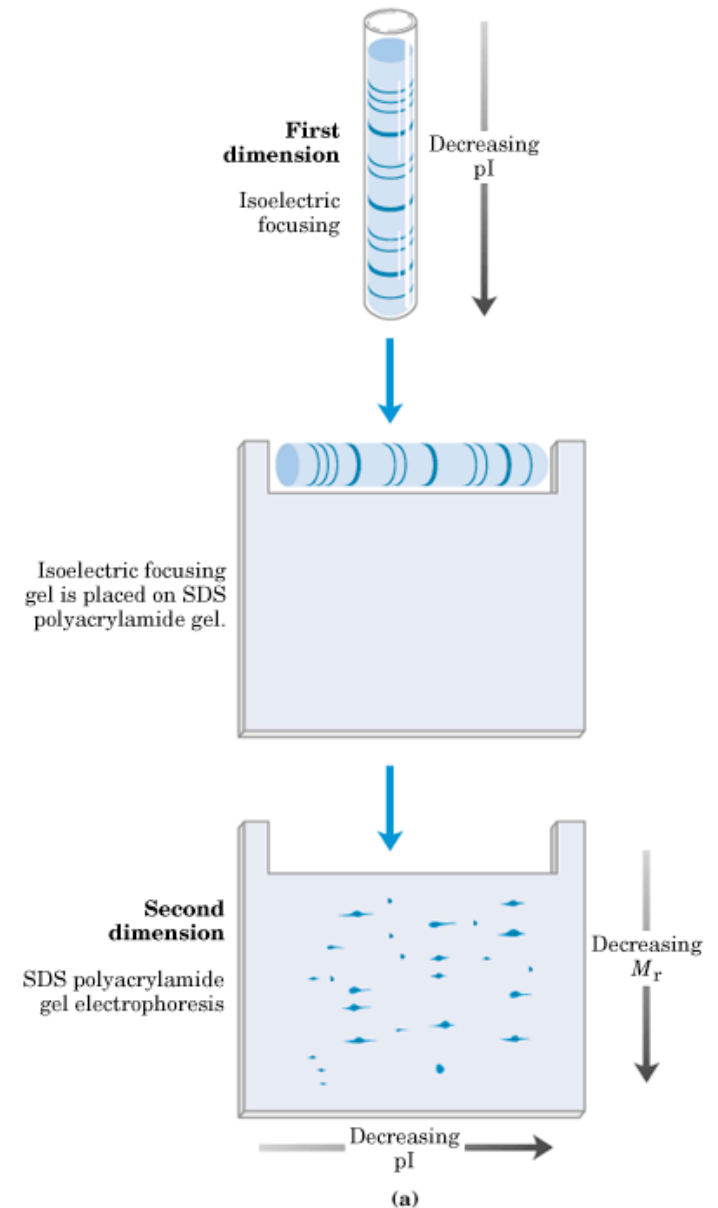
**The Isoelectric Points of Some Proteins**

<b>Protein</b>	<b>pI</b>
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
$\beta$ -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome <i>c</i>	10.7
Lysozyme	11.0

**Isoelectroenfoque:** Las proteínas migran en un campo eléctrico a través de un gradiente de pH. Las proteínas dejan de migrar cuando encuentran el pH que corresponde a su  $pI$  ( $z=0$ ).



**Electroforesis 2D:** Después de un isoelectroenfoque se corre un SDS-PAGE y se obtiene una separación en 2 dimensiones. Permite el análisis de muestras conteniendo muchas proteínas distintas. Se usa en Proteómica.



Las proteínas también pueden ser separadas sólo por su tamaño

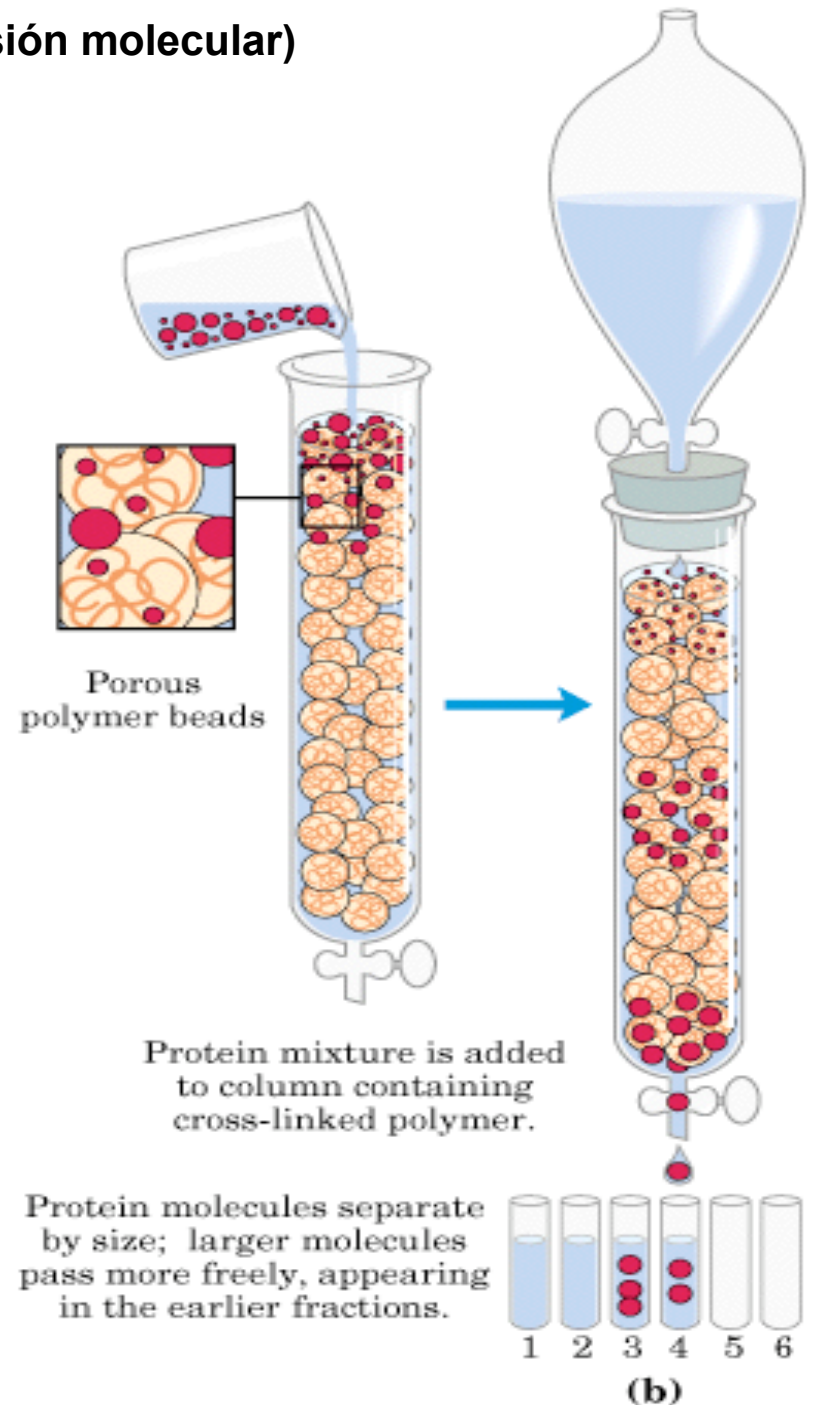
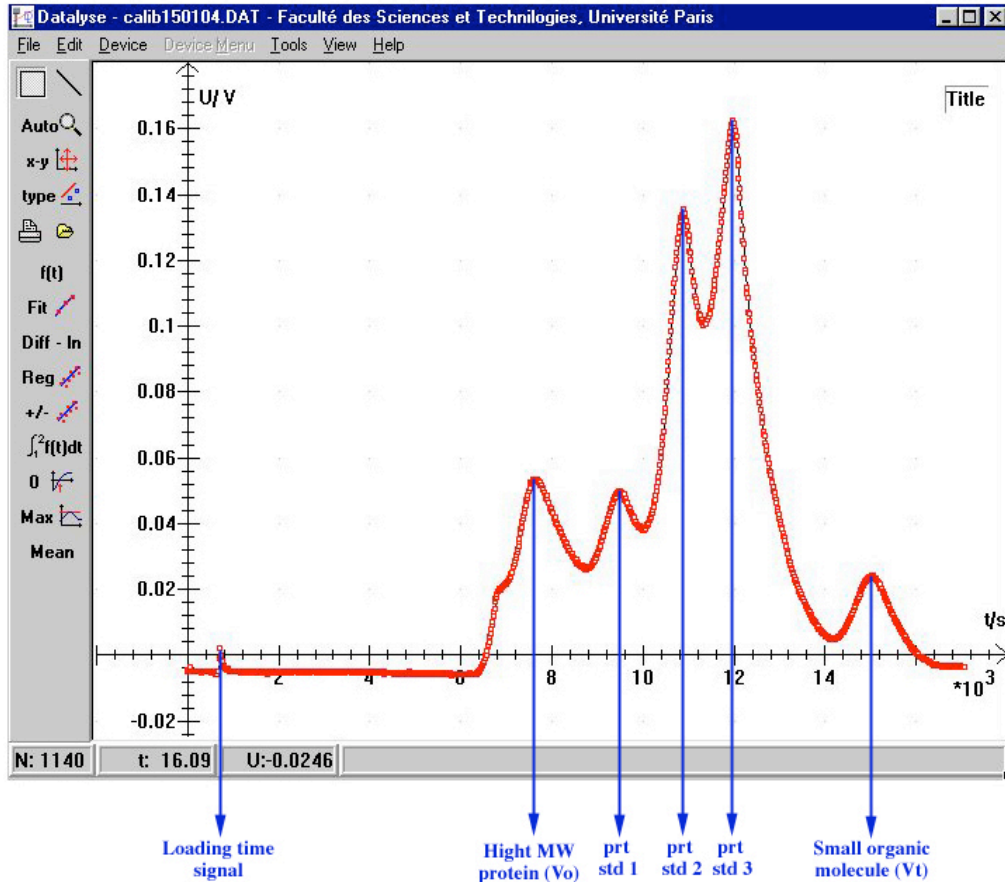
table 5-2

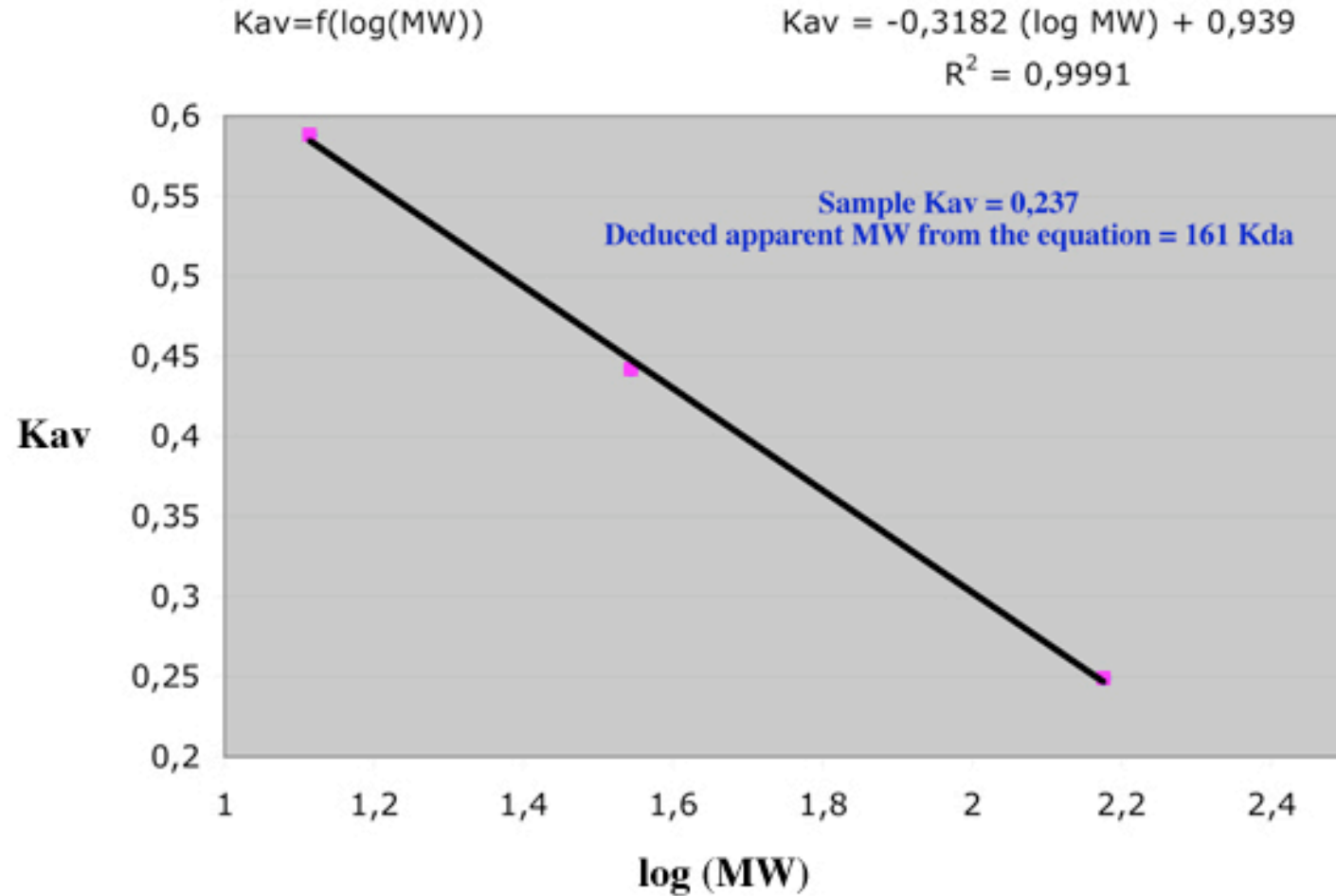
### Molecular Data on Some Proteins

	Molecular weight	Number of residues	Number of polypeptide chains
Cytochrome <i>c</i> (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (egg white)	13,930	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,890	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	21,600	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	22,000	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	68,500	609	1
Hexokinase (yeast)	102,000	972	2
RNA polymerase ( <i>E. coli</i> )	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase ( <i>E. coli</i> )	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1

# Cromatografía de Filtración en Gel (o de exclusión molecular)

Una matriz sólida porosa permite incluir en ella proteínas de bajo peso molecular (eluyen tardíamente de la columna porque recorren un camino más largo), y excluir proteínas de Mayor peso molecular (que no caben en los poros de la Fase sólida. La separación ocurre en solución.



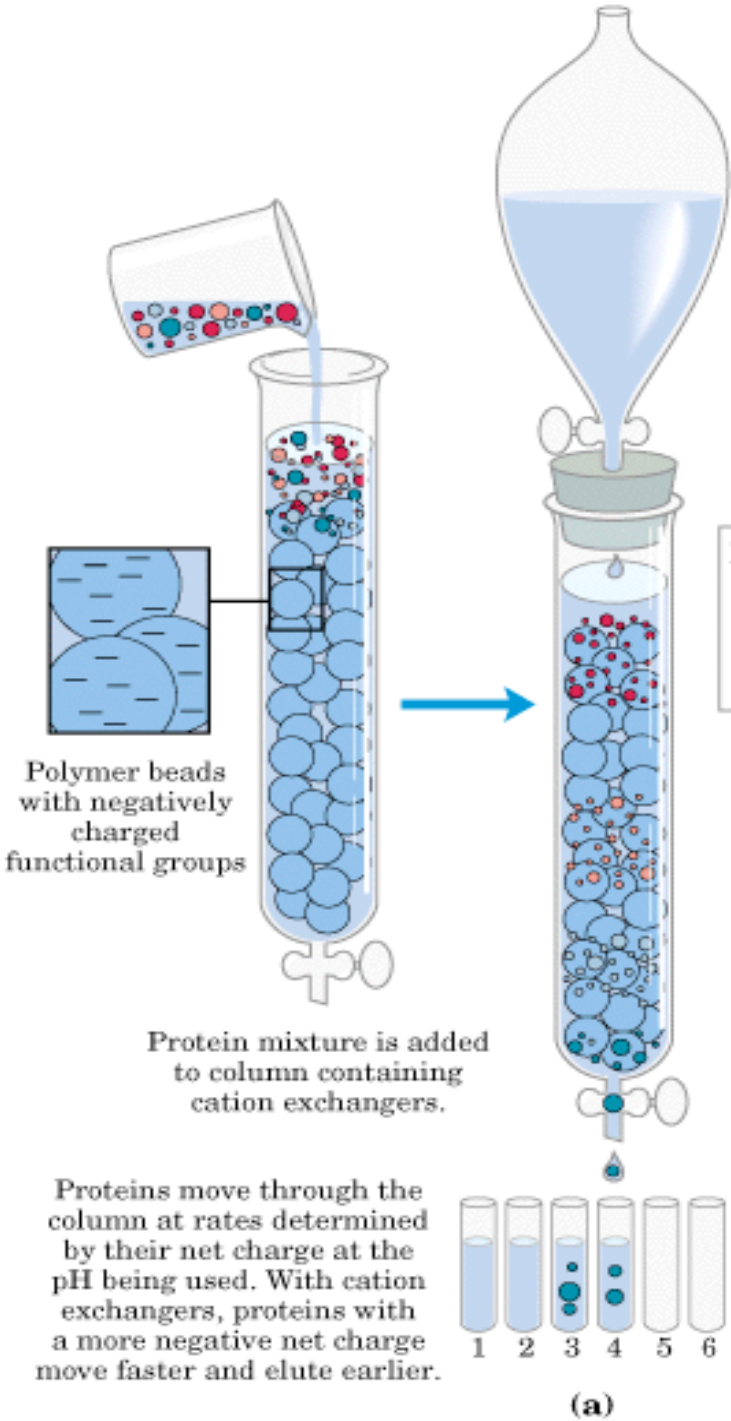


$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$ ; donde  $V_o$ , volumen de exclusión;  $V_e$ , volumen de elución;  $V_t$ , volumen total.



# Cromatografía de intercambio catiónico.

La matriz sólida (fase estacionaria) está cargada negativamente de modo que interactúa con cationes (cationes son retardados en la columna, mientras que los aniones son repelidos y eluyen inmediatamente). Los cationes pueden ser eluidos después de adicionar cationes que interactúen con la matriz, permitiendo la elución de proteínas básicas, esto es, cargadas positivamente. El mismo principio es usado para realizar cromatografías de intercambio aniónico, sólo que en este caso, la matriz está cargada positivamente y permite el intercambio de aniones (proteínas cargadas negativamente, proteínas ácidas).



Key:

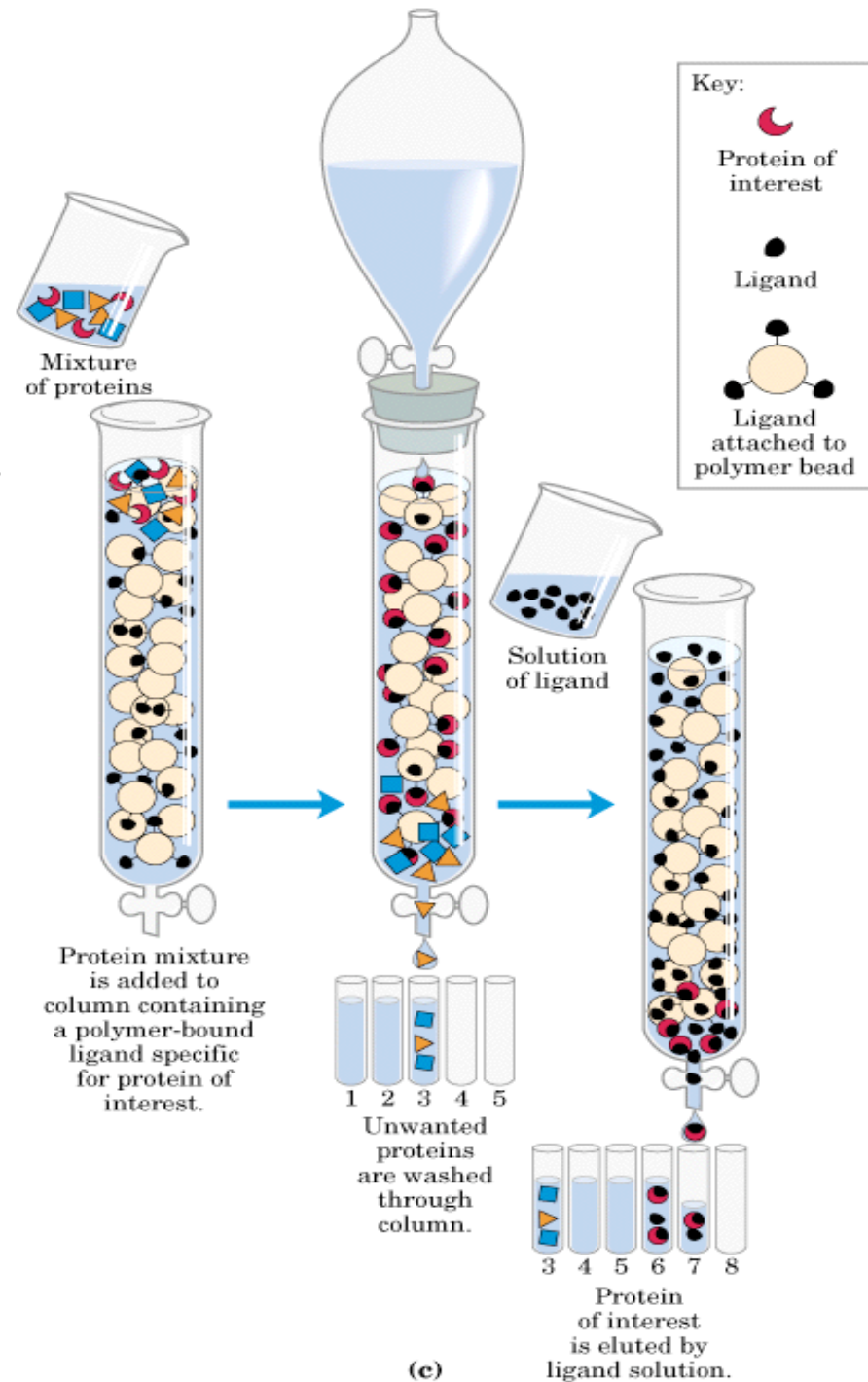
- Large net positive charge
- Net positive charge
- Net negative charge
- Large net negative charge

Ambos son casos de cromatografías de intercambio iónico.

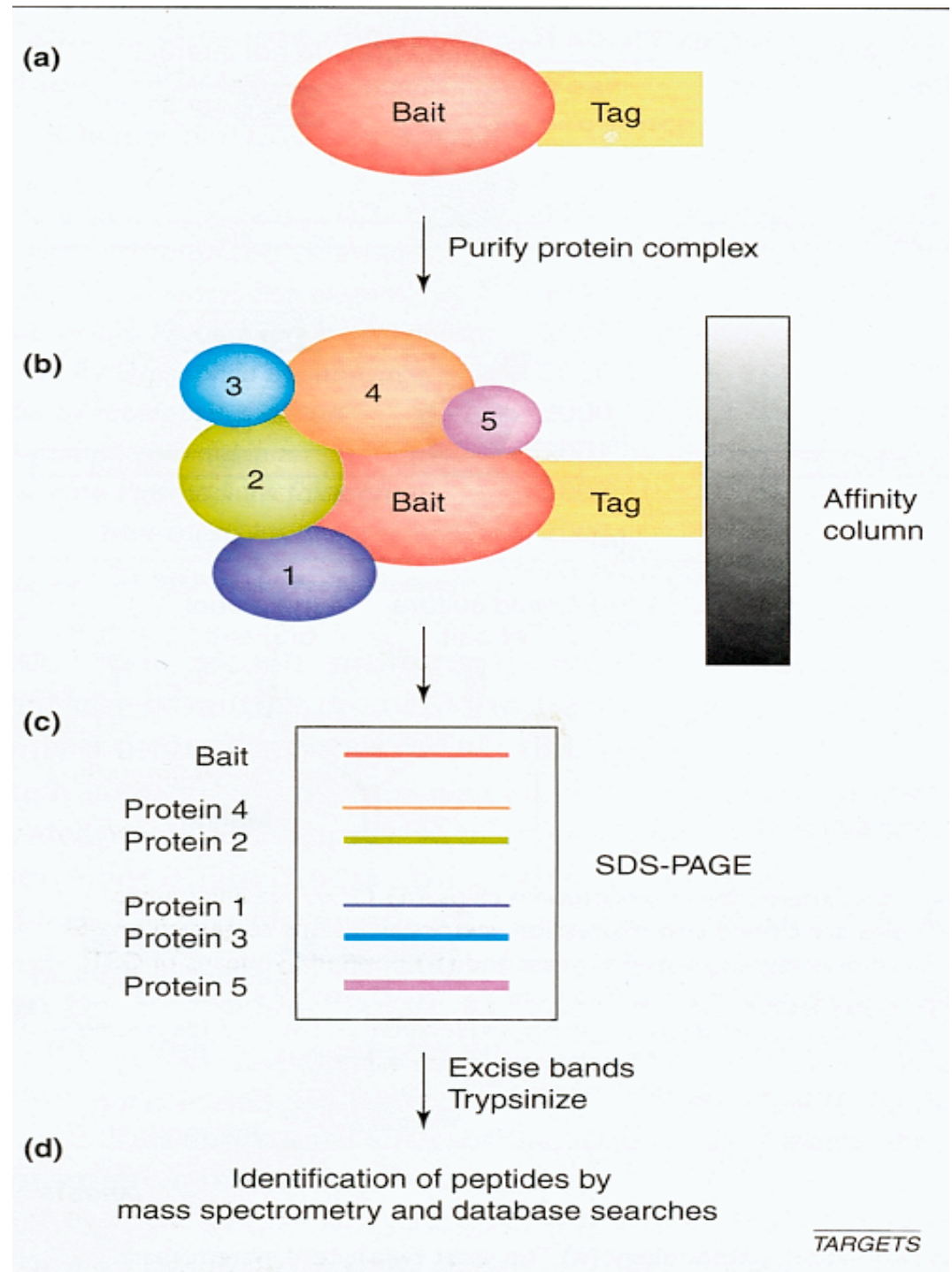
(a)

## Cromatografía de afinidad.

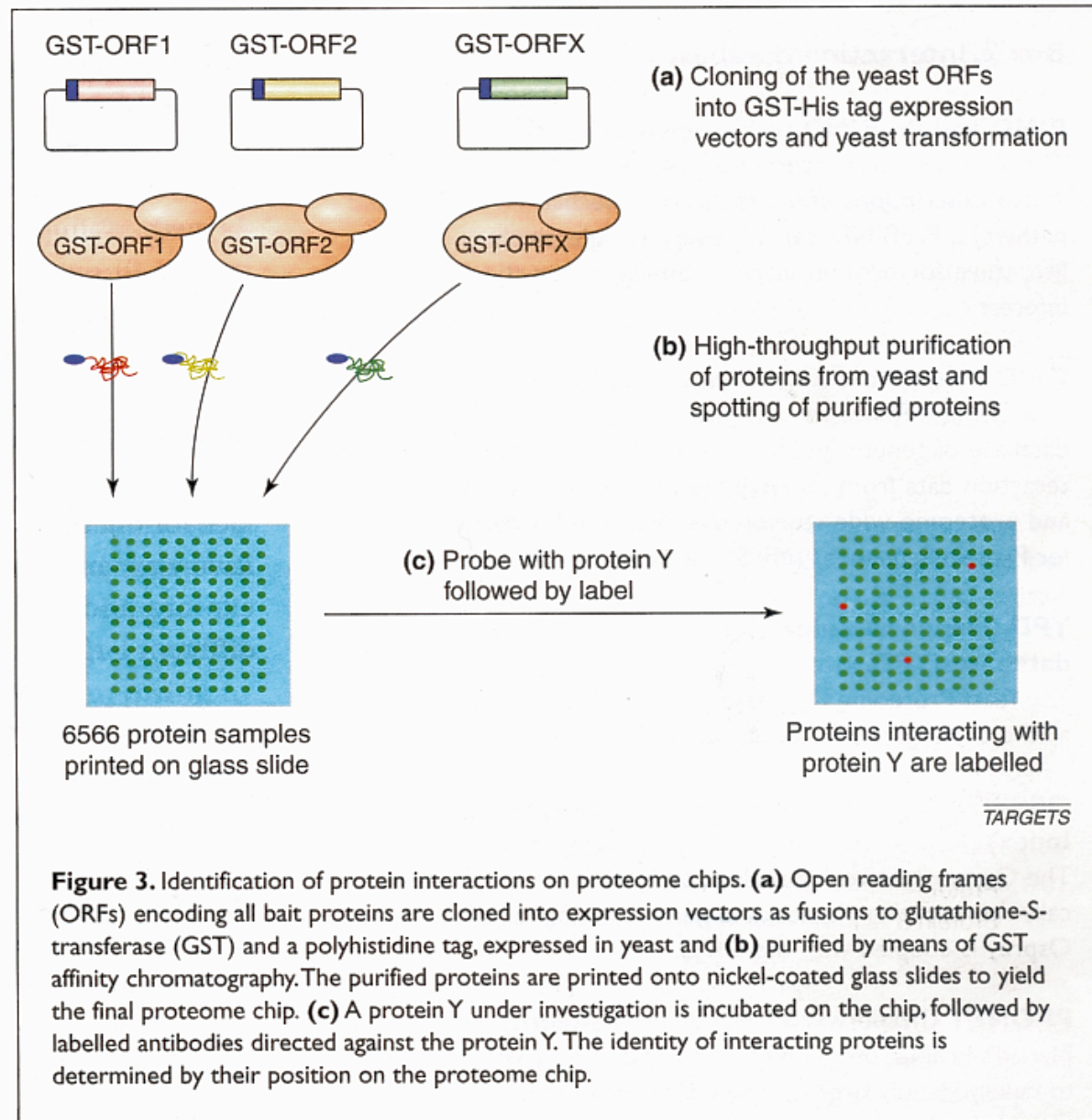
En este caso, un ligando específico de una Proteína de interés está unido covalentemente a la matriz sólida. La proteína que une el ligando Permanece incluida en la columna, y puede ser Eluida por la adición de ligando soluble en La fase móvil (solución). Se utiliza en los últimos pasos De una purificación. Es ampliamente usado en La purificación de proteínas recombinantes.



La cromatografía de afinidad ocupa muestras de proteínas en estado nativo, de modo que permite identificar proteínas que interactúan con otras formando Complejos que pueden tener un significado funcional. Después de un análisis electroforético, los componentes Del complejo pueden llegar a ser identificados.



El principio de afinidad se puede usar a gran escala para probar interacciones proteína -proteína de una colección Deproductos génicos. Es una aproximación usada en análisis proteómicos.



En la medida que se progresa en la purificación de proteínas, se pierde actividad total, pero se gana actividad específica

## table 5–5

**A Purification Table for a Hypothetical Enzyme\***

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

\*All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 137.

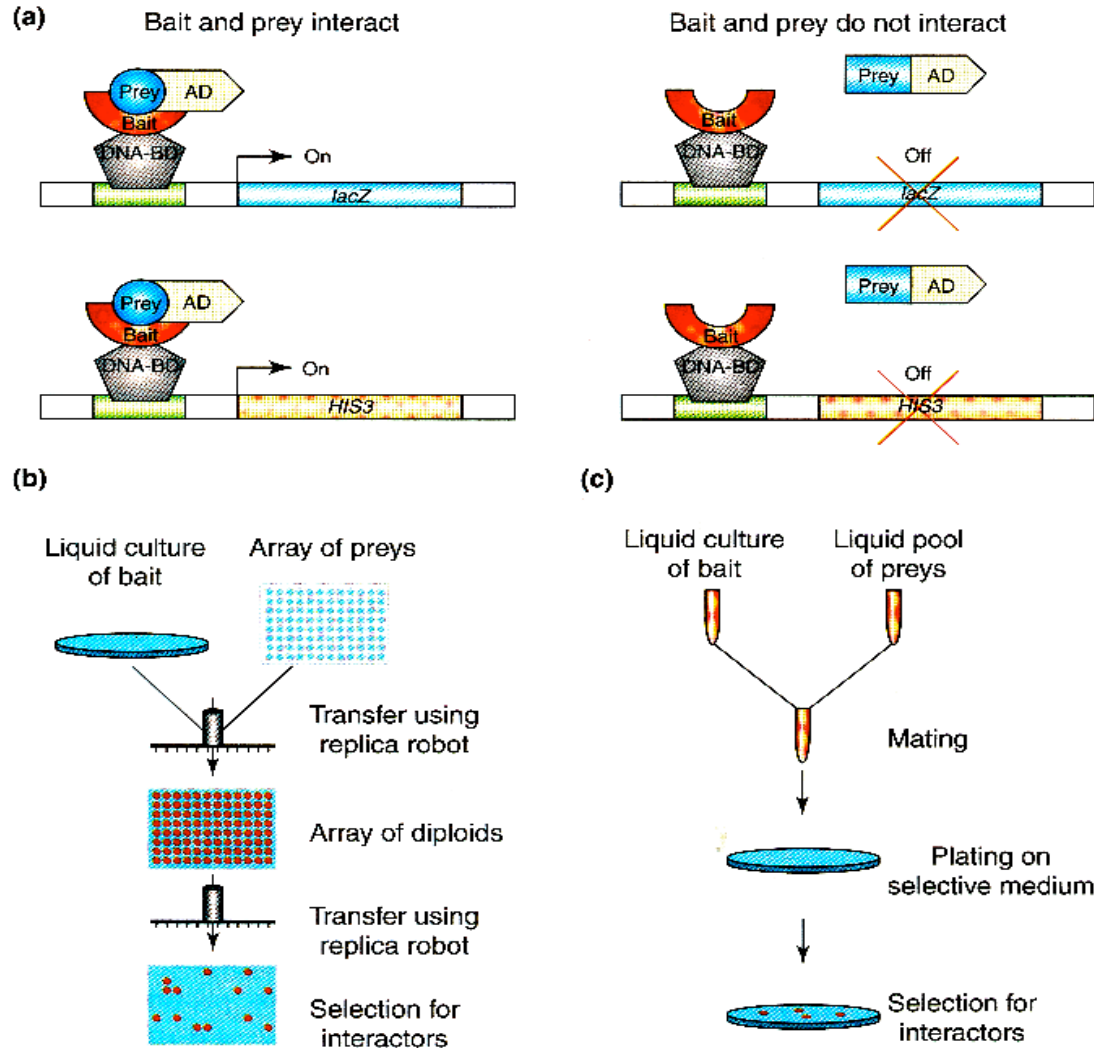
# Inmunoprecipitación

Ver demo en:

<http://www.bio.davidson.edu/courses/GENOMICS/IMPfolder/IMP.html>

El principio es similar al de la cromatografía de afinidad, sólo que se hace en ausencia de una columna. Un anticuerpo específico se une a bolitas de sefarosa. Dado el tamaño de las partículas de sefarosa, Permite la precipitación del antígeno específico, y también permite co-precipitar otras proteínas que interactúan con La proteína de interés.

**Sistema de Doble Híbrido.** Permite identificar interacciones entre proteínas *in vivo*. Una proteína de fusión con un Dominio de unión a DNA sirve como carnada, mientras que una proteína de fusión con un dominio de activación sirve como Presa. Cuando el dominio de activación y el dominio de unión a DNA se encuentran cerca, producto de la interacción entre la proteína carnada y la proteína presa, se activa la transcripción de un gen reportero que evidencia que la interacción Ocurrió. Todo el sistema debe ser expresado en una misma célula, usualmente en levaduras.



# Artefactos del sistema de doble híbrido

## **Falsos positivos:**

1. Si un factor de transcripción es usado como cebo
2. Por interacciones inespecíficas
3. Si el cebo o la presa afectan la viabilidad celular
4. Eventos aleatorios de origen desconocido

## **Falsos negativos:**

1. Impedimento estérico entre las proteínas de fusión previene la función del reportero
2. Inestabilidad de las proteínas de fusión
3. Falla en la localización subcelular relevante para la actividad del reportero

## **Identificación de los Artefactos:**

1. Confirmar la reproducibilidad de la interacción
2. Uso de múltiples reporteros
3. Uso de métodos independientes para determinar especificidad



## Método

## Ventajas

## Desventajas

**Doble híbrido**  
*in vivo*

Simple, barato y sensible

Falsos positivos

**Espectrometría de Masas**  
*in vivo*

Detecta complejos proteicos

Caro, sofisticado  
y lento (\*)

**Chips de proteínas**  
*in vitro*

Condiciones definidas

potencialmente  
no fisiológico (\*)

(\*) Requiere purificación de proteínas

# Referencias

- Lehninger, A. (1994) Principles of Biochemistry. 3rd ed.
- <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/contents.htm>
- Mathews & van Holde (1999). Biochemistry  
<http://www.aw-bc.com/mathews/>