

## **ARTICULOS ORIGINALES**

# **OPTIMIZACION DE LA RESOLUCION ELECTROFORETICA DE LA BANDA 2.1 Y DE LAS BANDAS 4.1a Y 4.1b DEL CITOESQUELETO DE MEMBRANA DEL ERITROCITO HUMANO**

Enrique Salcedo<sup>1</sup> Moisés Wasserman<sup>2</sup>

## **INTRODUCCION**

Durante años de trabajo en el modelo *Plasmodium falciparum*-eritrocito humano hemos observado una insuficiente separación de la banda 2.1 (ankirina, 215Kd) con respecto a la banda 2 ( $\beta$ -espectrina, 225Kd) cuyas masas moleculares se diferencian en 10Kd (lo que representa menos del 5% de la masa de las proteínas). En el sistema discontinuo de Laemmli, éstas comigran (1). Similar problema se encuentra entre las bandas 4.1a(80Kd) y 4.1b(78Kd); cuya diferencia representa el 2,5% de la masa molecular de éstas.

Como pieza clave en la invasión del *Plasmodium falciparum* al eritrocito humano, se encuentra el citoesqueleto de membrana de este último el cual es analizado continuamente por el personal del laboratorio en geles denaturantes de poliacrilamida dentro de un campo electroforético. Recientemente reportamos un patrón de fosforilación en donde la banda 2 parece defosforilarse y la Banda 4.1 fosforilarse (2). Lo anterior ha sido difícil definirlo a una proteína en particular por la no separación de las bandas mencionadas.

La banda 2.1 es una fosfoproteína monomérica y globular presente en cerca de 100.000 copias por célula. Une el citoesqueleto a la membrana plasmática formando un puente entre  $\beta$ -espectrina y banda 3. Presenta una variante que corre como

banda 2.2 en SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato), originada de un "splicing" alternativo del cual se traduce un péptido sin un inserto de 17Kd en el extremo carboxi-terminal (3). Por las características que le da el inserto a la banda 2.1, ésta se ubica a una distancia mayor a la esperada por la diferencia teórica. Es excepcionalmente sensible a proteólisis, altamente hidrofóbica y con gran tendencia a la adsorción y agregación.

La banda 4.1 es un fosfodímero que representa el 5% de la masa del citoesqueleto. La banda 4.1a posee en su extremo carboxi-terminal un fragmento de 2Kd más que su homóloga la 4.1b; los dos péptidos se originan de un mismo gen. Tienen una función dual al promover una alta afinidad entre espectrina y F-actina y a la vez unir este enmallado a la membrana en asociaciones con glicoforinas A y C y banda 3. La banda 4.1 posee una alta afinidad por Glicoforina A, B, Banda 3 y residuos de fosfatidilserina (predominan en la cara citoplasmática de la membrana del eritrocito) (4).

En el presente trabajo se logró separar ankirina respecto a  $\beta$ -espectrina y las bandas 4.1a y 4.1b entre sí. Para lo anterior, se trabajaron sistemas electroforéticos del tipo SDS-PAGE discontinuo en geles homogéneos (5), variando las concentraciones totales de acrilamida (%T) dentro de dos rangos: 5%-8% para la zona de alto peso

1 Profesor asociado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. Jefe del Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, Colombia.

2 Médico interno, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia; Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, Colombia.

molecular y de 10%-13% para la zona de peso molecular intermedio (6); manteniendo una concentración relativa de bisacrilamida (%C) constante inicialmente en 5% (para cualquier %T un %C=5 asegura el menor radio de poro posible) (7). A partir del %T óptimo se redujo este %C hasta un punto igualmente óptimo con una mayor separación a la ya lograda. Dependiendo de las concentraciones donde se encontró la más alta separación y la mejor resolución, se realizaron finalmente gradientes de %T lineales que abarcaron las concentraciones que dieron mejor resultado para una y otra zona estudiada.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención de membranas

Eritrocitos empacados tipo O(+) en CPD-A a 4°C a los cuales se les separó de leucocitos por centrifugación en Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma, Chem. Co., St. Louis) fueron sometidos a lisis hipotónica según el método de Dodge, J. T., 1963(8). Las membranas obtenidas fueron almacenadas en buffer muestra en proporción 1:2 a -70°C. La concentración de proteínas fue estimada por una modificación del método de Bradford (8).

### Electroforesis

A partir de soluciones de acrilamida al 30% y bisacrilamida al 2%, se prepararon, para el volumen necesario, soluciones de gel separador a los %T y %C planeados, teniendo en cuenta que el %B =  $T \times C / 100$  y %A = T-B como concentraciones finales, fueron geles homogéneos cuyo gel concentrador fue constante para todos (1). El buffer del gel concentrador se compone de Tris.Cl/SDS (0,125M Tris.Cl; 0,1% SDS) ph 6,8 en ddH<sub>2</sub>O, buffer separador Tris.Cl/SDS (0,375M Tris.Cl; 0,1% SDS) ph 8,8 en ddH<sub>2</sub>O. Buffer muestra: Tris.Cl 0,125M, Glicerol 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,001%, beta-mercaptoetanol 2%, ph 6,8 en ddH<sub>2</sub>O. Buffer de corrida: Tris 25mM, glicina 3,75%, SDS 0,25%, en ddH<sub>2</sub>O. Azida

de sodio 200mM en ddH<sub>2</sub>O. TEMED (tetrametilendiamina) y persulfato de amonio al 10% (10µl y 50µl respectivamente para el gel separador y 30µl y 5µl para el gel concentrador). Los gradientes se prepararon en un rango de 5% a 10% de %T con la solución de mayor concentración en la cámara mezcladora, Temed y persulfato agregados inmediatamente antes de iniciar el flujo controlado por bomba peristáltica a 3ml/min.

### Tinciones

Azul de Coomassie: fijación y tinción con Metanol 50%, ácido acético 10% y Coomassie brilliant blue R250 al 0,05%, por un lapso mínimo de seis horas. Destinción en metanol 5% y ácido acético 7% en agitación suave. Tinción de plata: según Kit N° AG-25 de SIGMA (Chemical Company).

### Mediciones

Tomamos como puntos de referencia la zona central de más fuerte tinción en cada banda. El coeficiente de migración retardada (Rf) para cada banda es la distancia del borde inicial del gel separador a la banda sobre la distancia del borde inicial del mismo gel al frente de corrida.

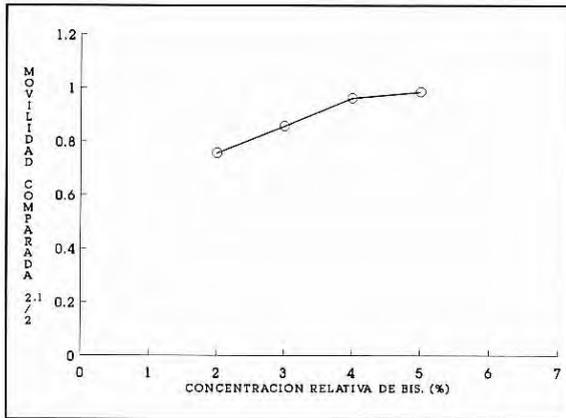
La movilidad comparada es igual a la distancia desde la banda más inferior al frente de corrida sobre la distancia de la banda superior (del par a separar) al frente de corrida.

## RESULTADOS

La separación medible y óptima resolución de las bandas 2.1 y 4.1a y 4.1b es evidenciable a %T puntuales y %C que oscilan en un rango en donde se escoge una concentración dada según se desee mantener dentro del gel un bandeo amplio o no. Donde la resolución se catalogue de óptima, se tendrán las condiciones aconsejadas tanto en concentraciones como en tinción.

TABLA 1. Separación de la banda 2.1

%T	%C	Visualización	Separación	Resolución	Rf	Observaciones
8	5	NO	NO		0,047	Rf BANDA 2
7	5	SI	NO		0,05 0,06	BANDA 2 BANDA 2.1
6	5	SI	0,5 mm	Aceptable	0,098 0,111	Artefactos espectrinas
5	5	SI	2 mm 1,7mm	Buena	0,2 0,21 0,28 0,3	Artefactos en espectrinas. Desaparecen al aumentar el gel concentrador (Plata)
5	4	SI	2,5mm 2,5mm	Optima	0,28 0,32  0,367  0,4	Azul Coomassie. Tinción de plata
5	3	SI	3mm	Optima	0,57 0,63	Tinción de plata. En azul de Coomassie no tiñe el bandeaje completo.
5	2	SI	5mm	Optima	0,7 0,78	En tinción de plata desde C=5% corre una banda inferior a Ankirina, 2,2?.
5	1	NO				Azul de Coomassie. Gel de difícil manejo.



Gráfica 1. Movilidad comparada de las bandas 2.1 y 2 en el rango de %C a partir de un %T=5 constante. Con la medición de la migración de cada banda como movilidad comparada, se obtiene así una única línea con un punto de corte del cual se toman concentraciones de T y C convenientes. Aquí con %T=5 y cualquier %C≤4 se separan las bandas en mención.

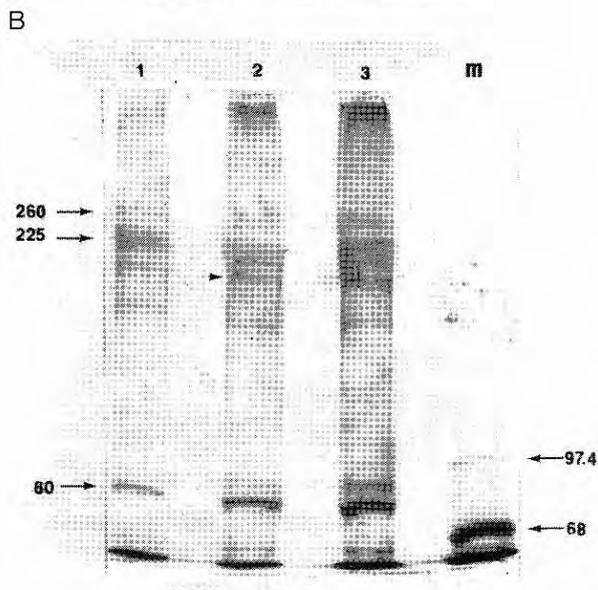
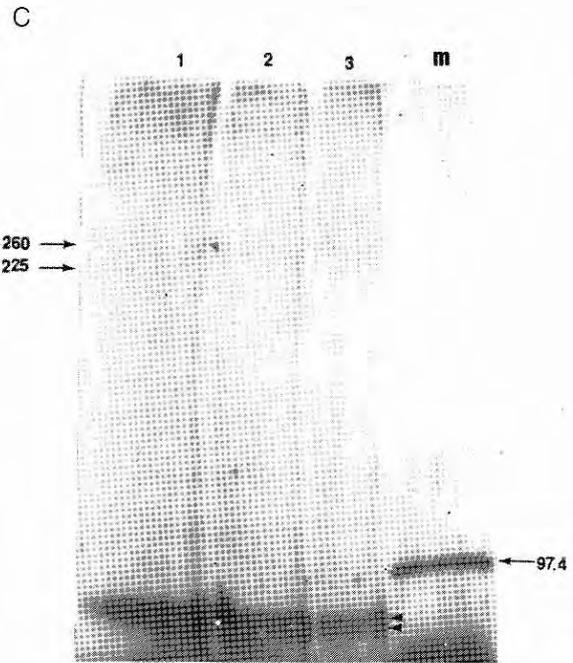
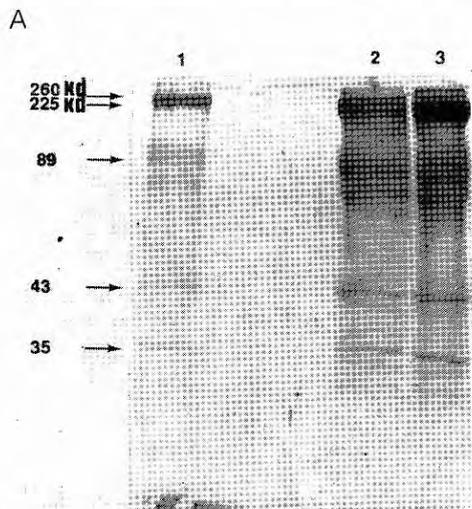


Figura 1. Separación de la banda 2.1 y 4.1 a de 4.1b.A: A%T=8 y %C=5, se observa una única banda 2(225 kD) y una única banda 4.1(80 kD), sistema usado comúnmente; tinción en azul de Coomassie. B: %T=5 y %C=4, se ven las bandas 2 y 2.1 (cabeza de flecha en el interior de la foto) separadas 2,5mm, permaneciendo una buena parte del barrido total del citoesqueleto, tinción en nitrato de plata. C: %T=10 y %C=0,5, bandas 4.1a y 4.1b evidenciabiles (dos cabezas de flecha en el interior de la foto), 1,5mm de separación, tinción nitrato de plata. m: marcadores de peso molecular.

TABLA 2. Separación de las bandas 4. 1a y 4. 1b

%T	%C	Visualización	Separación	Resolución	Rf	Observaciones
13	5			NO	0,11	BANDA 4.1
12	5			NO	0,14	BANDA 4.1
11	5			NO	0,21	Artefacto, banda tiñe fuerte debajo de 4,2 que atraviesa el gel.
10	5			NO	0,25	Igual artefacto
10	5			NO	0,23	Se repite no tiñe artefacto.
10	4			NO	0,28	La banda 4.2 no se tiñe bien.
10	3			NO	0,37	Ensanchamiento de la banda 4.1. Hay una leve separación, apenas visible.
10	2	SI		<1mm	0,48 0,49	BANDA 4. 1a BANDA 4. 1b
10	1	SI		<1mm	Buena 0,63 0,647	BANDA 4. 1a BANDA 4. 1b
10	1	SI		<1mm	Buena 0,63 0,65	Tinción de plata. Artefacto, banda que atraviesa el gel en región similar al artefacto anterior.
10	.8	SI		1mm	Optima 0,65 0,67	BANDA 4. 1a BANDA 4. 1b Azul de Coomassie.
10	.5	SI		1.5mm	Optima 0,89 0,91	Tinción de plata. Artefacto similar al anterior.

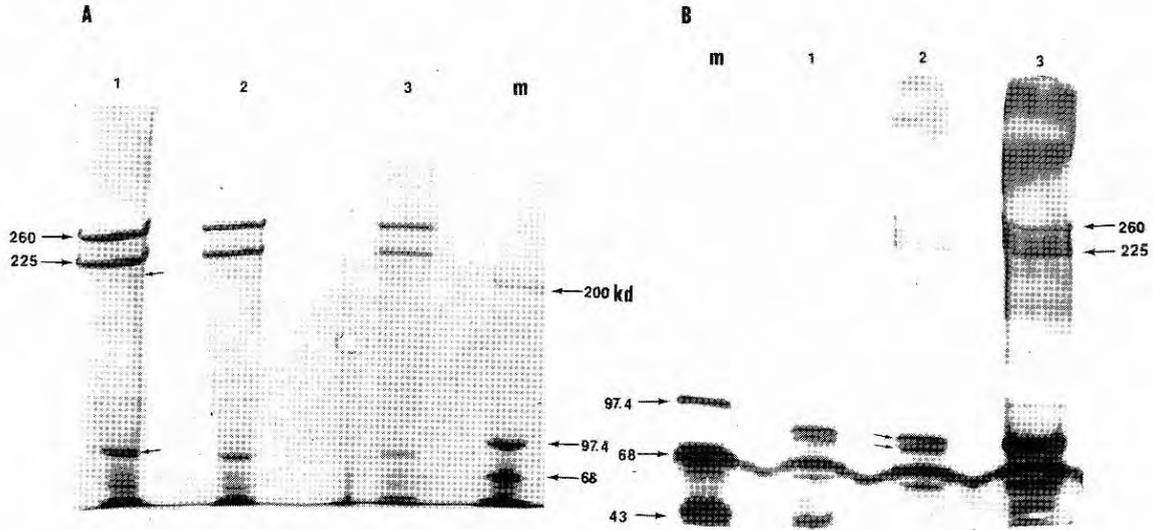
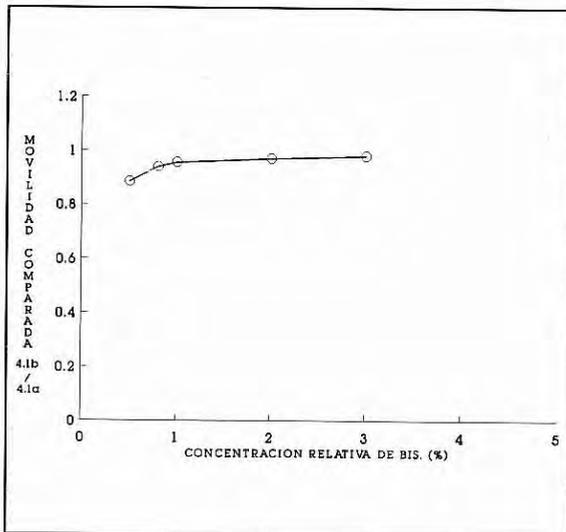


Figura 2. Gradiente lineal continuo. %T= 5-10 y %C=1 constante. A: Tinción azul de Coomassie, banda 2.1 señalada en el interior de la foto, la banda cuatro 4.1 se observa muy poco separada. B: Tinción en nitrato de plata, es equivalente al gradiente A, se observan muy bien las dos bandas separadas 4.1a y 4.1b (flechas en el interior de la foto). m: marcadores de peso molecular.



Gráfica 2. Movilidad comparada de las bandas 4.1a y 4.1b en el rango de %C, para un %T constante igual a 10. Aquí la pendiente de la línea a partir de %C≤1 evidencia una separación de solo 1,5 mm, distancia para una diferencia de 2Kd.

## DISCUSION

La separación de ankirina (banda 2.1) se logra con un %T=5, %C≤4, cantidad de proteína a sembrar ≥5μg, recomendable teñir con nitrato de plata. Con las bandas 4.1a y 4.1b se logra en un %T=10, %C≤2, cantidad de proteína ≤1μg, tinción azul de Coomassie. Con el gradiente previo, se logra un bandeo general con igual o menor resolución que los homogéneos. Observaciones y mediciones más exactas ameritan estos últimos para cada región en estudio.

La correlación y reproducibilidad del bandeo es buena en los gradientes, el cálculo de los pesos moleculares según el Logaritmo de %T en el sitio donde se ubique la banda es más consistente y más cercano a lo teórico.

Teniendo en cuenta la consistencia a través de los tetraplicados de gradientes, considero que el sistema montado es reproducible y confiable.

TABLA 3. Gradiente lineal

%T=5-10	%C	Visualización	Separación	Resolución	Observaciones
	2	SI	SI		Aquí se correlaciona el logaritmo con logaritmo. peso molecular. La banda 2.1 se separa la 4.1 no.
	1	SI	SI	Buena	En azul de Comassie se separa la banda 2.1, 4.1 no. Mejor bandeaje.
	1	SI	SI	Buena	Tinción de Plata, mejor resolución de banda 4.1a y 4. 1b

Cuando se entra a resolver el tamaño de poro óptimo para una resolución óptima, en este caso entre proteínas en un gel de poliacrilamida, es indispensable y el objetivo mismo de ello es que sea reproducible. La búsqueda sistemática de lo anterior lo enmarcan en la electroforesis en gel de poliacrilamida cuantitativa (*Quantitative PAGE*). Los requisitos para dicha condición son: pureza de los reactivos, concentración de monómeros útil, concentración de inhibidores y estimuladores de la polimerización lo más ausentes y/o constantes posibles, pH no extremo, concentración de catalizadores que permitan una copolimerización en menos de 10 minutos y mantener el sistema a temperaturas entre 0 y 4°C.

La baja temperatura que recomiendan, permite por un lado controlar indirectamente la producción de radicales libres persulfato, proceso que es endotérmico y, por otro lado, una eliminación del calor producido por la polimerización, proceso que es exotérmico; uno y otro favorecen en últimas una polimerización a una tasa y a un radio de poro en un rango lo más estrecho posible.

Siempre se polimerizaron los geles antes de 10 minutos, es decir se garantizó una buena

eficiencia en la conversión de monómeros a polímero y una mínima longitud promedio de cadena para cada tipo de gel, esto en la medida que se limita el tiempo disponible y por ende un estado determinado de polimerización lo más similar de un gel a otro.

Lo anterior redundó en un tamaño de poro reproducible y Rf congruentes para lo esperado y confiabilidad en los pesos moleculares calculados para identificar las bandas de interés.

Separamos bandas dentro de un barrido completo de proteínas del citoesqueleto y membrana del eritrocito humano, lo cual no se había logrado protocolizar dentro del sistema discontinuo de Laemmli (ampliamente usado) y con el manejo de una variable (el radio promedio de poro).

La utilidad del trabajo estriba en la resolución óptima de proteínas de masa molecular conocida y en el análisis de cambios postransduccionales (lo más inmediato para nosotros son los cambios de fosforilación).

Como hallazgo paralelo en los geles que se tiñeron con plata %T=5 y %C=5, 4, 3 y 2 corrió persistentemente una banda inferior a 2.1 que al

parecer corresponde a la mencionada ankirina 2.2, claro esta que la prueba última sería inmunológica.

Las tinciones usadas fueron de utilidad. Para problemas donde se requiera aún más sensibilidad se puede intentar la tinción combinada de azul de Coomassie y plata cuya sensibilidad es sumatoria.

Se deja entonces un marco de referencia en el manejo de las concentraciones en los geles de poliacrilamida para separar adecuadamente las proteínas que se requieran con una buena aproximación en cuanto a tamaño de poro útil, además del problema específico resuelto aquí.

## REFERENCIAS

1. **Cohen CM, Gascard, P.** Regulation and postranslation modification of erythrocyte membrane and membrane skeletal proteins. *Seminars in Hematology*.1992, 29 244.
2. **Wasserman M, Vernot J.P, and Mendoza P.M.,** Role of calcium and erythrocyte cytoskeleton phosphorylation in the invasion of **Plasmodium falciparum**. *Parasitology Research* 1990;76: 681.
3. **Lux SE, Jhon KM, Bennett, V.** Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature*.1990; 344: 36.
4. **Shiffer KA, Georke J.** Interaction of erythrocyte protein 4.1 with phospholipids. A monolayer and liposome study. *Biochimica et biophysica Acta*.1988; 937: 269.
5. **Laemmli U K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.1971; 227: 680.
6. **Chrambach A, Rodbard, D.,** Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science*.1971, 172: 440. 30 April.
7. **Hames, B.D. and Rickwood, D.** Eds. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. Chap. 1. An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis. IRL Press.1981. First edition.
8. **Dodge, J.T., Mitchell, C., Hanahan, D.J.,** The preparation and biochemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys*.1963, 100: 119.
9. **Ausubel, F.M., Brent R., et al. Eds.,** Analysis of Proteins. Quantitation or Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2. 1991-1993; Part 10, Units I-II.