

RELACION ENTRE EL RECEPTOR DE LA FAVINA Y LA GALACTOSIL URIDIL TRANSFERASA DE LA MEMBRANA DE ERITROCITOS

María Inés Silva, Virginia Montes de Gómez
Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, A.A. 14490, Santafé
de Bogotá, Colombia.

Keywords: Galactosil transferasa, Receptor de Favina, Lectina.

RESUMEN

La extracción y purificación de un receptor de la favina fue realizada a partir de la membrana de eritrocitos, empleando para ello básicamente la cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa con miras a establecer su relación con la actividad de la Galactosa 1-fosfato Uridil Transferasa (EC 2.7.7.12), GUT.

Se obtuvo una proteína con un alto grado de pureza (determinada por electroforesis sobre poliacrilamida en ausencia y presencia de SDS) que presenta un peso molecular de 58.000 daltons y otra fracción que también interactúa con la favina y que contiene por lo menos seis proteínas de pesos moleculares entre 23.000 y 71.000 daltons.

La fracción cromatográfica que contiene la proteína de 58.000 daltons presenta actividad de GUT, sin embargo esta actividad es inestable y se pierde después de mantener la muestra a 4°C durante 24 horas.

De acuerdo a nuestros resultados, la dos actividades (receptor y actividad enzimática) no interfieren entre sí a pesar de encontrarse sobre la misma fracción proteica.

ABSTRACT

Extraction and purification of a favin receptor from the membrane of human erythrocytes was performed by ion exchange chromatography on DEAE delulose in order to stablish if there is a corelation with the Galactose 1-Phosphate Urydil Transferase (EC 2.7.7.12), GUT.

We obtained several proteins that interact with favin. One is a highly purified protein (according to the electrophoresis on polyacrilamide with and without SDS) with a molecular weight of 58000 daltons. There are at least other six proteins with molecular weights between 23000 and 71000 daltons.

The chromatographic fraction containing the 58000 daltons protein presents GUT activity; however such activity is unstable and is lost after 24 hours at 4°C.

According to our results, there is no relation between the activity of GUT and that of the receptor even both activities are found in the same proteic fraction. Presumably the activities lay on different active sites.

INTRODUCCION

Las interacciones receptor-huésped son mediadoras, en las células, de una gran variedad de procesos biológicos, de ahí que el estudio de los receptores celulares sea de gran importancia en la elucidación de los mecanismos de estos procesos (1, 2).

La galactosil uridil transferasa presente en membranas celulares es una proteína glicosilada, que presenta grupos manosídicos terminales unidos por unión alfa (lo cual la hace apta como candidata para receptor de lectinas del grupo que son inhibidas por la manosa), participa en el metabolismo de la galactosa iniciando su asimilación por parte de la célula; por tanto su estudio cobra especial interés en el caso de personas con problemas en el metabolismo de la lactosa.

Estudios realizados por Podolsky (3) indican que existe una correlación entre la aglutinación de algunas células por acción de la concanavalina A y la actividad enzimática de la galactosil transferasa en la membrana con una reducción parcial de la misma en presencia de la lectina, lo cual sugiere una relación entre el receptor de la concanavalina A y la actividad enzimática antes mencionada.

Teniendo en cuenta que la Favina es una lectina perteneciente al grupo de la concanavalina A, según clasificación de Mäkela reportada por Goldstein (4), en el presente trabajo se intenta determinar si existe una correlación entre el receptor de la favina en membrana de eritrocitos y la GUT, que permita utilizar la favina como prueba de diagnóstico inicial, sencillo y de bajo costo, en recién nacidos para detectar aquellos con problemas de galactosemia, a fin de iniciar un tratamiento adecuado (5).

Para la realización de este trabajo se planteó la posibilidad de extraer la enzima a partir de eritrocitos humanos, realizar una purificación de la misma empleando cromatografía de intercambio iónico, y verificar si presenta simultáneamente actividad de receptor de favina.

MATERIALES Y METODOS

Muestras:

Las muestras de sangre humana fueron suministradas por el Servicio Médico de la Universidad Nacional.

La galactosa 1P, la uridil difosfato glucosa (UDPG), la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), la UDPG deshidrogenasa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, fueron obtenidos de Sigma Chemical Company.

La **Favina** fue obtenida por cromatografía de afinidad sobre Sephacryl S-200 a partir de harina de haba según lo descrito por Anzola (6).

El Hemolizado: Se preparó siguiendo el método propuesto por Popjack (7) a partir de eritrocitos previamente lavados con solución isotónica.

Cromatografía de Intercambio iónico sobre DEAE-celulosa

Con el fin de separar las proteínas presentes en el hemolizado se efectuó una cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa.

Para realizar esta cromatografía se siguió el método descrito por Popjack (7), donde se equilibró la resina con buffer de fosfatos 10 mM pH 7.4. A 20 mL de resina se adicionaron 20 mL de hemolizado, se agitó suavemente por 4 horas (agitación mecánica) a temperatura ambiente, se centrifugó 10 minutos a 2.800 xg.

Después de retirar el sobrenadante se lavó repetidas veces con el mismo tampon hasta eliminación total de hemoglobina en el sobrenadante. Se empacó en una columna de 25 cm por 2 cm y se eluyó con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min hasta que no se detectó absorbancia a 220 nm.

La elución de las proteínas retenidas se realizó adicionando un gradiente discontinuo de sulfato de amonio 10, 20 y 40 mM en buffer de fosfatos 10 mM, a una velocidad de 0.5 mL/min. Se recogieron fracciones de 3 mL y se leyeron las absorbancias a 220 nm.

Determinación de la presencia del receptor de la Favina

Para determinar la presencia del receptor se empleó la técnica descrita por Salazar y Tenorio (8) donde se mide la inhibición de la aglutinación de los eritrocitos por acción de la Favina en presencia del receptor.

La solución de la Favina se empleó en una concentración igual al doble de la de su título, se tomó un volumen y se adicionó un volumen igual de la solución que contiene el receptor, se incubó durante la noche a 4°C y luego se realizaron los ensayos de aglutinación empleando como blanco una suspensión de eritrocitos al 1% en NaCl 1% y como control positivo la suspensión de eritrocitos tratados con una solución de favina a una concentración igual al título.

La medida de la aglutinación se realizó observando al microscopio y haciendo el recuento del porcentaje de los eritrocitos no aglutinados.

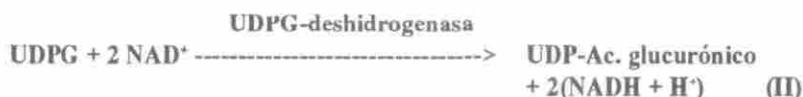
Determinación de la actividad de Galactosil transferasa

Se empleó el método de Anderson modificado por Beuther y Baluda (9) donde se hace reaccionar galactosa 1 fosfato (Gal 1-P) con exceso de Uridil difosfato glucosa (UDPG) en presencia de la enzima, según la siguiente reacción:



donde: **Glu 1-P:** Glucosa 1 fosfato
UDP-Gal: Uridil difosfato galactosa.

El UDPG que no ha sido consumido, se hace reaccionar con Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en presencia de la enzima UDPG-deshidrogenasa:



donde: **UDP-Ac. glucurónico:** Uridin difosfato Acido glucurónico

El aumento de absorbancia a 340 nm (medida de la formación de NADH + H⁺) es proporcional al UDPG residual. Todo el proceso debe realizarse a 4°C.

Una unidad de Galactosa-1-P Uridil Transferasa es la que causa el consumo de una micromol de UDPG por hora a 37°C y pH 8.7. Las Unidades se pueden expresar por gramo o por miligramo de proteína.

Acción de la Favina sobre la actividad enzimática

Con el fin de encontrar una posible interacción entre el receptor de la Favina y la actividad de la Galactosa 1-P uridil transferasa, se realizaron medidas de actividad enzimática después de haber dejado incubando previamente el receptor de la Favina, con Favina, en una mezcla equimolecular.

Electroforesis y Electrotransferencia (10, 11, 12)

Las proteínas presentes en las membranas y las proteínas de las fracciones que presentaban actividad enzimática se estudiaron por electroforesis, mientras que las proteínas totales de la membrana fueron estudiadas por electrotransferencia.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida empleando el sistema T₁₀C_{2,7}. Buffer de los tanques Tris-glicina 100 mM pH 8.3. Buffer de los geles Tris-HCl 1.5

mM pH 8.9 en presencia y ausencia de SDS. Los volúmenes de muestra aplicados fueron de 50 y 100 microlitros con concentraciones de proteína de 0.25 y 0.1 mg/mL.

Se realizaron tinciones con nitrato de plata y azul de Comassie.

Para realizar la transferencia se separaron las proteínas a estudiar en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS en las condiciones mencionadas anteriormente, para luego realizar la transferencia de las mismas del gel a nitrocelulosa en el mismo tampon, aplicando un voltaje de 200 volt para posteriormente hacer reaccionar las proteínas transferidas, con Favina, previamente marcada con isotiocianato de fluoresceína (13), incubando durante 4 horas; después de eliminar el exceso de favina, lavando tres veces con tampon fosfato isotónico-Tween 20 al 5% se observaron al U.V. las proteínas que presentaban fluorescencia, como un indicativo de la presencia del receptor de la Favina.

RESULTADOS Y DISCUSION

Después de comprobar por las técnicas antes descritas la presencia de galactosil uridil transferasa y de receptor de la favina en los hemolizados de los eritrocitos, se procedió a su aislamiento para lo cual se empleó el intercambio iónico sobre DEAE-celulosa. El perfil cromatográfico obtenido se observa en la gráfica No. 1.

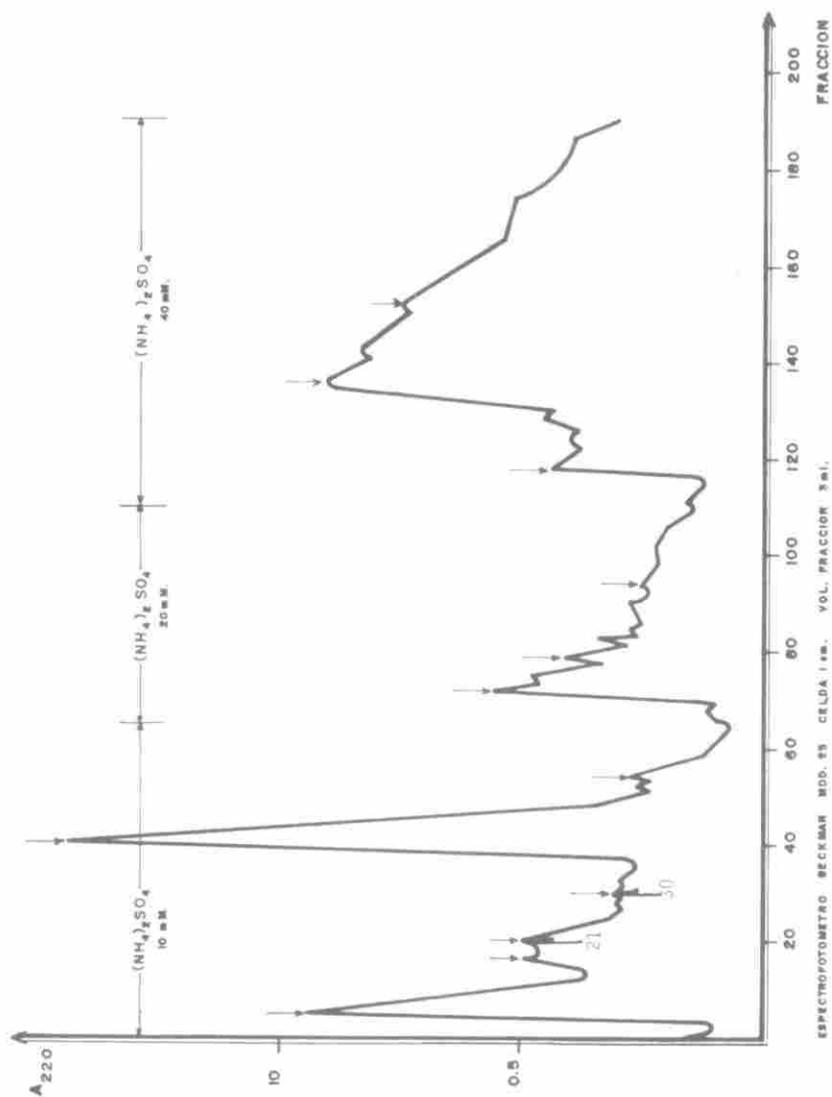
Al determinar la actividad de GUT en las fracciones, se observa una gran inestabilidad, ya que se requiere realizar su determinación inmediatamente se obtienen y se pierde a medida que transcurre el tiempo; a las 24 horas ya desaparece totalmente aun cuando las muestras permanezcan refrigeradas y es debido posiblemente a que algunos componentes de membranas necesarios para mantener la estructura activa se pierden al realizar la cromatografía o también puede estar relacionada con la presencia de proteasas en el hemolizado.

Esto impide que se puedan someter a ultrafiltración o liofilización a fin de lograr una mayor concentración.

Teniendo en cuenta que no existe una separación total y que el perfil obtenido es una sumatoria (en cada punto) de las contribuciones de absorbancia de los diferentes picos que confluyen, se elaboró una descomposición teórica de la curva en picos y se seleccionó, para determinar la actividad de GUT, las fracciones de cada uno de éstos que correspondiera al de máxima concentración, son las que aparecen señalados en la gráfica con flecha.

La medida de actividad de GUT en el hemolizado (987×10^{-5} U/mg proteína) comparadas con las obtenidas en las fracciones 21 (2,77 U/mg proteína) y en la fracción 30 (5.78 U/mg proteína) muestran el grado de purificación que se llevó a cabo durante el proceso.

GRAFICA 1.
 PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA SOBRE DEAE - CELULOSA
 ELUYENTE BUFFER DE FOSFATO 10 mM, pH 7.5



Este resultado coincide con lo reportado por Popjak (7) quien al trabajar con el mismo sistema y empleando para la elución un gradiente continuo de fuerza iónica, detectó actividad enzimática en concentraciones de 10mM a 25mM de sulfato de amonio.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 1.

A las otras fracciones señaladas con flechas no se les detectó actividad enzimática.

Dado que la actividad como receptor de favina es más estable, se reunieron las fracciones correspondientes a cada uno de los picos teóricos en que se descompuso la curva y se concentraron por ultrafiltración a través de Amicon PM 10 para determinar su capacidad inhibidora de la aglutinación con favina de acuerdo a la metodología previamente descrita. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Estos resultados indican que la actividad de galactosil transferasa y de receptor de favina se encuentran en las mismas fracciones proteicas.

Los grupos IV (fracciones 19-23) y V (fracciones 28-36) que contienen tanto el receptor de la favina como la galactosil uridil transferasa se sometieron a electroforesis en las condiciones previamente descritas. En presencia de SDS el grupo No. IV presenta seis bandas claramente diferenciadas con pesos moleculares comprendidos entre 23.000 y 71.000 daltons.

Al realizar la electroforesis a las proteínas del grupo V (28-76) donde se encuentra la fracción 30 con actividad enzimática de GUT, se observa tanto en ausencia como en presencia de SDS, una sola banda de proteína con un peso molecular de 58000 y un alto grado de pureza en las condiciones de trabajo empleadas (gráfica 2).

La electrotransferencia realizada sobre las proteínas de la membrana, empleada para observar la posible interacción de algunas de ellas con la favina marcada con isotiocianato de fluoresceína se realizó sobre nitrocelulosa.

Se obtuvo como resultado la interacción de la favina con varias proteínas de membrana de pesos moleculares: 75000, 71000, 67000, 58000, 56000 y 38000

Tabla 1. Actividad Enzimática en Cromatografía de Intercambio Iónico

Muestras	* Conc. Proteína mg/mL	Unidades de Actividad por mg de proteína
frac. 21	0.06	2.77
frac. 30	0.035	5.78

* medida a 220 nm.

Tabla 2. Fracciones Recogidas a Partir de la Cromatografía de Intercambio Iónico para determinar Presencia del Receptor de la Favina.

No.	Fracciones	*Concentración proteína mg/mL	Presencia del Receptor
I	4-8	0.42	(-)
II	9-14	0.22	(-)
III	15-18	0.24	(-)
IV	19-23	0.25	(+)
V	28-36	0.22	(+)
VI	37-49	0.75	(-)
VII	50-65	0.21	(-)
VIII	66-76	0.37	(-)
IX	77-84	0.25	(-)
X	116-126	0.30	(-)
XI	132-140	0.82	(-)
XII	142-154	0.93	(-)

* Método absorbancia a 220 nm.

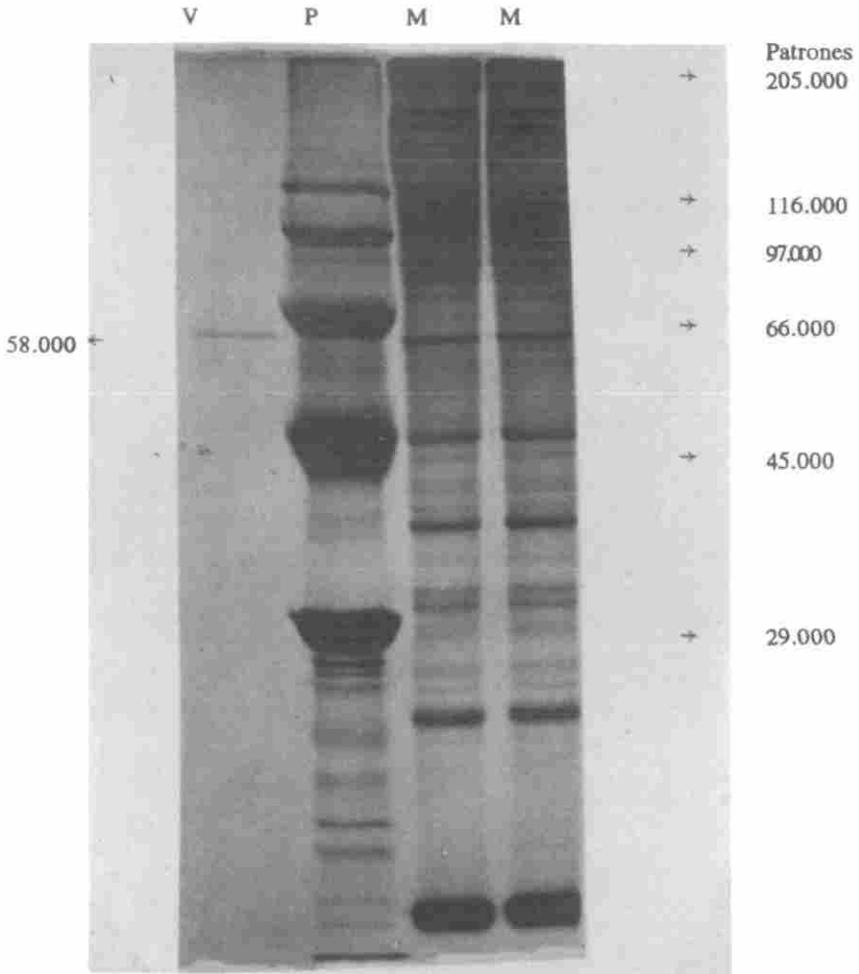
daltons, lo que indica que en la membrana del eritrocito humano existe más de un receptor de la favina.

Según Sharon (14) y White (15) la banda 3 proteína que puede ser dimérica, trimérica o tetramérica, cuenta con un peso molecular del agregado de 90000 a 100000 daltons después de realizar la electroforesis en presencia de SDS, donde sus subunidades pueden tener pesos que oscilan entre 45000 y 50000 daltons si es dimérica, 30000 si es trimérica y 22500 a 2500 si es tetramérica y es la responsable de la interacción de varias lectinas con eritrocitos.

Teniendo en cuenta que la electroforesis para la electrotransferencia se realizó en presencia de SDS, es posible que algunas de las bandas que presentan reactividad sean subunidades de proteínas poliméricas como la banda 3. De estas bandas cabe señalar la banda de 58000 daltons que también se encuentra presente en la fracción 30 donde también se halló actividad de GUT.

Cuando se realizaron determinaciones de actividad de GUT en hemolizado de eritrocitos en presencia de favina, no se encontró interferencia de esta última, lo cual sugiere que si el receptor de favina y la enzima son la misma proteína, no comparten los mismos sitios activos.

En conclusión se pudo establecer que si bien no se puede descartar que las actividades de receptor de la favina y de GUT pueden ser realizadas por la misma proteína, no es posible hacer un diagnóstico precoz de neonatos para detectar problemas de galactosemia, utilizando la aglutinación de eritrocitos con favina.



Gráfica 2.

Electroferesis en gel de poliacrilamida $T_{10}C_{2,7}$ con SDS de las proteínas de membrana y la fracción V de cromatografía de intercambio Iónico sobre DEAE-Celulosa. Tinción con Nitrato de plata.

M. Membranas 2 mg/mL 20 μ l.

P. Patrón de pesos moleculares 10 μ l.

V. 75 μ l.

BIBLIOGRAFIA

1. Lis, H. y Sharon, N., *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 35-67
2. Lasky, L. *Science*. **1992**, 258, 964-969.
3. Podolsky, D.; Weisner, M.; LaMont, J. e Isselbacher K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1974**, 71, 904-908.
4. Goldstein, I; Poretz, R. *The Lectins*. Editado por Liener, Y.; Sharon, N. y Goldstein, I. Academic Press INC, **1986**.
5. Kador, P.; Akagi, Y. ; Kinoshita, J. *Metabolism*. **1986**, 35, 15-17.
6. Anzola, D. *Efecto de hidrólisis parciales sobre la actividad fitohemaglutinante de la favina*. Tesis. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, **1983**.
7. Popjack, G.; Dale, G. *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 1057.
8. Salazar, M y Tenorio, L. *Ensayos de extracción, purificación y caracterización del receptor de Favina en la membrana del eritrocito*. Tesis. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, **1978**.
9. Beuther y Baluda. *Boletín Técnico de Sigma 600. uv.* **1979**.
10. Merril, C.; Dunau, M.; Goldman, D. *Anal. Biochem.* **1981**, 110, 201-207.
11. Dznadu, J.; Deh, M.; Barrat, D.; Wise, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1984**, 81, 1733.
12. Gershom, J. M. *TIBS*, **1985**, 103-106.
13. Navarro, Y. *Estudio de la eventual interacción Rhizobium-lectina de Vicia faba*. Tesis de posgrado. Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, **1982**.
14. Sharon, F.; Chicken, C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, 814, 125-134.
15. White, J. *Science*, **1992**, 258, 917-924.