



Biología Celular y Molecular.

Guía de TP Nro. 5

Actividad proteolítica celular.

Introducción

La actividad proteolítica secretada por las células es un elemento indispensable para la proliferación y migración celular. Esta actividad está dada por una batería de enzimas y zimógenos secretados por la célula hacia el espacio extracelular. Las colagenasas, metaloproteasas, elastasas y otras enzimas degradativas conforman el amplio mundo de proteasas que se encargan de degradar la matriz extracelular.

En condiciones normales la actividad proteolítica es modulada por el entorno celular e inclusive por la propia matriz extracelular. Por ejemplo, los factores de crecimiento (Growth factors) al estimular la proliferación modulan, muchas veces, la actividad proteolítica. De esta forma una célula estimulada secreta los agentes que le permiten crear las condiciones adecuadas para la progenie.

La plasmina es una importante enzima degradativa que es secretada por la célula como zimógeno, denominado

plasminógeno. El plasminógeno queda retenido en la matriz extracelular no teniendo actividad proteolítica sobre ella. La molécula que convierte al plasminógeno en plasmina se denomina Activador de Plasminógeno y es secretada por la célula en respuesta a ciertos estímulos. Existen dos tipos de activadores de plasminógeno el uPA (*urokinase plasminogen activator*) que se describió originalmente en la orina, de donde proviene su nombre y el tPA (*tissue plasminogen activator*). Estos convierten al plasminógeno en plasmina que a su vez actúa sobre la fibronectina, la laminina y colagenasas latentes que resultan así son activadas.

Las metaloproteasas (MMP, de *matrix metalloproteinase*) son una familia de proteasas que incluye más de diez componentes. Estas proteasas dependen para su accionar de la presencia de cationes bivalentes (Zn^{++}), actuando sobre una serie de sustratos según el tipo de MMP. Los distintos tipos de colágeno son los sustratos principales de estas proteasas.

Desarrollo de la práctica

En este trabajo práctico el alumno cuantificará los niveles de activadores del plasminógeno y testeará la actividad de metaloproteasas procedentes de medios condicionados y lisados celulares de cáncinomas mamarios.

Se denomina medio condicionado al medio de cultivo celular que contiene los productos secretados por un cultivo celular en un tiempo dado. Los medios condicionados son una herramienta útil para el estudio de la actividad proteolítica producida por un tipo celular.

Sobre monocapas confluentes de células se realiza un cambio de medio, con un previo lavado con buffer fosfato para retirar los restos de suero fetal bovino (SFB) que pueden interferir la actividad proteolítica, y se cultivan las células en un pequeño volumen de medio sin SFB. Luego se retira este medio y se guarda apropiadamente para medir la actividad deseada.

Obtención de medios condicionados y lisados celulares

Los alumnos recibirán medios condicionados de distintas líneas celulares sobre los cuales evaluarán la actividad proteolítica.

Caseinólisis radial.

Para cuantificar la actividad de los activadores de plasminógeno generados por el cultivo celular se procederá a realizar un ensayo de caseinólisis radial. El grupo nro. 1 realizará una caseinólisis para determinar la actividad de ambos activadores (uPA y tPA). El grupo nro. 2 realizará una caseinólisis en presencia de amiloride, un inhibidor específico del uPA, por lo que medirá actividad sólo de tPA.

Protocolo

- 1) En 3 ml de buffer (1M Tris-HCl pH 8) disolver 1g de caseína, utilizando un agitador magnético.
- 2) Agregar 12 ml de agua destilada
- 3) Agregar 60 ug de plasminógeno (para realizar la placa control este paso es obviado).
- 4) Preparar agarosa 2,5% y dejar enfriar hasta 60 °C.
- 5) Teniendo todo el material que se va a usar (pipetas, placas y solución) a una temperatura de 40-50 °C. Agregar 15 ml de agarosa, agitar brevemente el vaso de precipitado y derramar el contenido en la placa.

- 6) Dejar solidificar y realizar pozos de 5 mm de diámetro con un punch, para la siembra
- 7) Preparar una curva de concentración de urokinasa humana a partir de un stock 1000 UI/ml, haciendo 8 puntos de dilución al ½ desde 50 UI/ml.
- 7) Sembrar entre 15 ul de muestra por well. El protocolo de siembra será el siguiente:

Curva de uPA								Controles positivos
50 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
1,6 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
25 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
0,8 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
12,5 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
0,4 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
6,25 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
0,2 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
3,13 UI/ml	○	○	○	○	○	○	○	○
MEM	○							

- 8) Incubar en cámara húmeda a 37 °C
- 9) Medir los halos pasadas las 48 hs

GRUPO 2. Placa con amiloride.

Solución de amiloride:

270 mg amiloride / ml DMSO

Protocolo

Previo al momento de agregar la agarosa agregar a la solución 75 ul de la solución de amiloride.

Zimografías en gel copolimerizado

La zimografía es una técnica electroforética que permite observar actividad de proteasas. Se realiza con poliacrilamida y a diferencia de las electroforesis de proteínas más simples, la polimerización de la poliacrilamida se realiza en presencia de gelatina soluble. De esta manera el gel resultante de la polimerización contiene gelatina (colágeno desnaturalizado).

Luego de realizar la corrida electroforética de las muestras el gel se lava en una solución con Tritón X100 y se incuba en un buffer apropiado que favorece la actividad de las proteasas. El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa la gelatina habrá sido degradada. Esta degradación se revela tiñiendo el gel con colorantes que tengan afinidad por proteínas, observándose una zona blanca donde hubo degradación.

El grupo nro. 3 realizará una zimografía en gel copolimerizado con gelatina para determinar actividad de metaloproteasas. El grupo nro. 4 realizará una zimografía en gel polimerizado con caseína en presencia de plasminógeno para determinar actividad de Activadores del plásmínógeno.

Protocolo para la zimografía de metaloproteasas. Grupo 3

SOLUCIONES

SEPARATING

1,8 ml de H₂O

1,25 ml de buffer **para MMP**

(Tris 1,5 M, pH 8,8)

50 µl SDS 10%,

1,25 ml Acrilamida : bis (29:1) 30%

0,5 ml de gelatina 1% caliente

(soluble)

35 µl APS 10%

7 µl Temed - **ATENCIÓN!!** - el

agregado del Temed

comienza la reacción de

polimerización, no agregar

hasta el último momento.

STACKING

3 ml H₂O

1,25 ml buffer (Tris 0,5 M, pH 6,8)

50 µl SDS 10%

0,65 ml Acrilamida : bis (29:1) 30%

50 µl APS 10%

4 µl Temed - **ATENCION!!** - el agregado del Temed comienza la reacción de polimerización, no agregar hasta el último momento.

Protocolo para la zimografía de Activadores del plasminógeno. Grupo 4

SOLUCIONES

SEPARATING

1,8 ml de H₂O

1,25 ml de buffer **para PA**

50 µl SDS 10%,

1,25 ml Acrilamida : bis (29:1) 30%

0,6 ml de una solución compuesta por 0,5 ml caseína en agua (50 mg/0,5 ml) mas 0,1 ml PGNO, en el control negativo el PGNO es obviado.

35 µl APS 10%

7 µl Temed - **ATENCION!!** - el agregado del Temed comienza la reacción de polimerización, no agregar hasta el último momento.

STACKING

3 ml H₂O

1,25 ml buffer (Tris 0,5 M, pH
6,8)

50 µl SDS 10%

0,65 ml Acrilamida : bis (29:1)
30%

50 µl APS 10%

4 µl Temed - **ATENCIÓN!!** - el
agregado del Temed
comienza la reacción de
polimerización, no agregar
hasta el último momento.

PROCEDIMIENTO PARA ARMAR LOS GELES

- 1) Armar el Separating (3,8 ml por gel) y dejar polimerizar, con una película de agua por encima (en estufa a 37°C) usando como control de polimerización el resto de separating que quedó en el tubo.
- 2) Retirar el H₂O por inversión, secando el resto de agua que haya quedado con papel secante
- 3) Agregar el Stacking sobre el Separating hasta el borde de los vidrios.
- 4) Acto seguido, poner el peine, siempre en dirección descendente, previamente humedecido.
- 5) Dejar polimerizar a 37°C usando como control de polimerización el resto de stacking que quedó en el tubo.
- 6) Una vez el gel haya polimerizado, retirar el peine y lavar los wells con Running Buffer usando las pipetas pasteurs de punta fina (con cierta violencia para retirar el resto de agua)
- 7) Armar la cuba y llenar con Running Buffer los compartimentos.

- 8) Realizar una pre-corrída de 15 min a 100v.
- 9) Preparar las muestras para la siembra mientras se realiza la pre-corrída. El Sample Buffer es 4X (poner 3 partes de muestra y una de Sample).
- 10) Sembrar los wells (20-25ul por calle).
- 11) Correr a 80-100v hasta que el frente de corrída este en el límite inferior del gel.

Una vez terminada la corrída...

- 12) Lavar 3 veces de 15 min con Tritón 2% para retirar el resto de SDS.
- 13) Lavar 3 veces de 5 min con H₂O para retirar el Tritón.
- 14) Incubar en buffer de incubación
Para MMP: Tris 0,25 M, NaCl 1M, CaCl₂ 0,025 M a 37° C, 48 hs. En el control negativo se agrega al buffer de incubación 75 mM de EDTA.
Para PA: Tris 20 mM, EDTA 15 mM, pH 8,3 a 37° C, 48 hs.

Una vez terminada la incubación...

- 15) Teñir con Metoh/Ac. acético/H₂O+Coomasie Blue durante 20 min.
- 16) Desteñir con Ac. acético: Metoh (o Etoh 96°):H₂O(1:3:6) hasta que el stacking este transparente.

Ejercicios

Con los datos obtenidos de la medición de los halos en el ensayo de caseinólisis radial, realizar la regresión lineal de la curva control en función de la concentración de urokinasa (UI/ml). Utilizando esta curva convertir los diámetros de las muestras incógnitas en UI/ml.

Qué efecto tiene el EDTA, agregado para la incubación del gel control en la zimografía de MMP y en el gel de activadores de plasminógeno?

Responder para ambos ensayos, qué tipo de falso positivo descarta el ensayo control de cada ensayo?