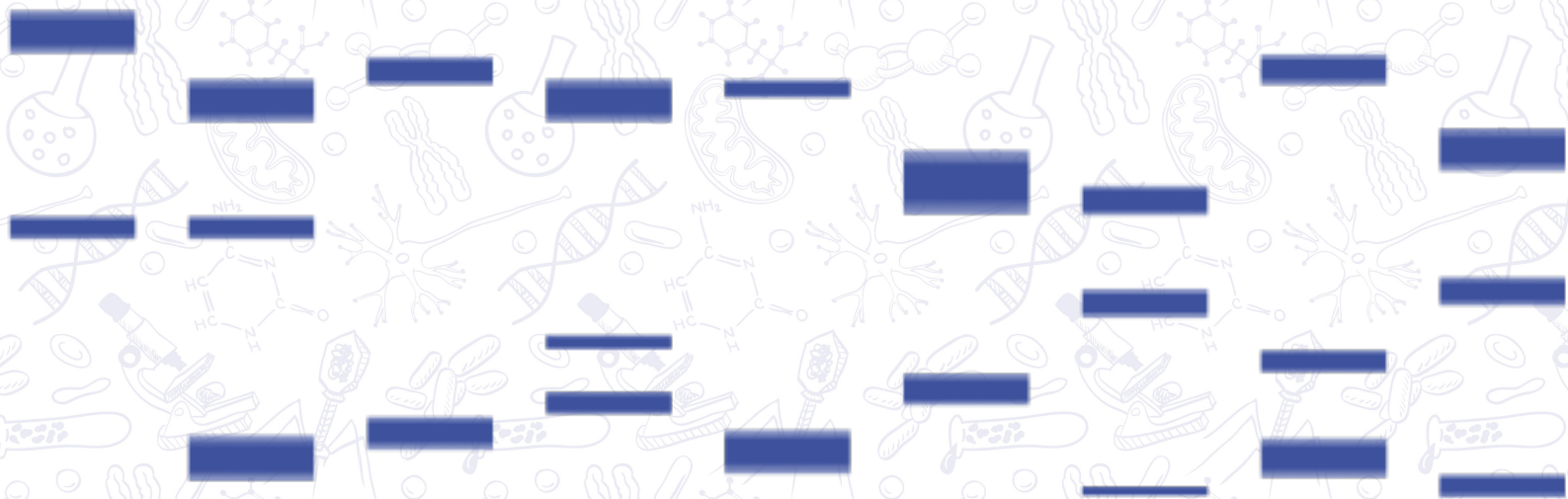




Análisis de la Evolución mediante Herramientas Moleculares: Electroforesis de Proteínas





MAPA CONCEPTUAL

- Interdependencia de organismos
- Perfiles proteicos y relaciones evolutivas
- Proteómica comparada
- Marcadores moleculares como herramienta para explorar la diversidad biológica

Ciencias Ambientales

Investigación Científica

- Planeamiento de hipótesis
- Uso de controles experimentales
- Creación de curvas estándar y cladogramas
- Interpretación de resultados experimentales

PRÁCTICA VIRTUAL

Explorando las evidencias moleculares de la evolución

Biología Molecular

- Estructura y función de las proteínas
- Técnicas de extracción de proteínas
- Electroforesis en gel de acrilamida.

- Estructura y función de la musculatura
- Estrategias adaptativas a determinados ambientes

Estructuras y Funciones

Genética

- Dogma central de la Biología: **ADN > ARN > Proteínas > Caracteres**
- Sistemas de clasificación moleculares vs morfológicos
- Modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales
- Análisis filogenéticos de secuencias

- Relaciones filogenéticas
- Evolución biológica
- Biodiversidad y selección natural

Biología Evolutiva



ÍNDICE

- Introducción
- Preparación de las muestras
- Electroforesis en gel de las proteínas
- Tinción de los geles de acrilamida
- Comparación de los perfiles proteicos
- Construcción de cladogramas en base a datos moleculares
- Caso práctico

- **Introducción**
- Preparación de las muestras
- Electroforesis en gel de las proteínas
- Tinción de los geles de acrilamida
- Comparación de los perfiles proteicos
- Construcción de cladogramas en base a datos moleculares
- Caso práctico



INTRODUCCIÓN

¿Por qué utilizar la electroforesis de proteínas para analizar la evolución?

- Los caracteres / rasgos de los organismos son el resultado de:
 - la **estructura**
 - la **función**
- Las proteínas son las biomoléculas responsables de la estructura y la función.
- El ADN codifica para proteínas, que dan lugar a esos caracteres / rasgos.

Dogma Central de la Biología Molecular

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO

INTRODUCCIÓN

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO

El ADN posee la información necesaria para transmitir los caracteres de una especie de generación en generación y conseguir su supervivencia. Por lo tanto, **la molécula de ADN constituye la base química de la herencia.**

En el paso de la información desde el ADN a las proteínas están involucrados dos importantes procesos metabólicos:

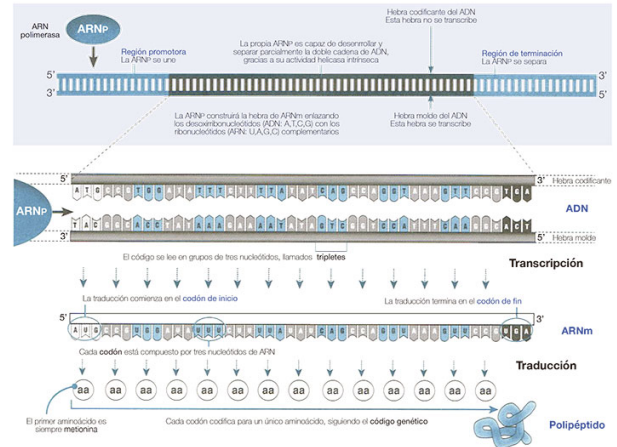
- **transcripción**
- **traducción**

El ADN es el molde mediante el cual la información genética necesaria para la síntesis de proteínas se transcribe al **ARNm**. Una vez formado, el ARNm sale del núcleo y se dirige a los ribosomas, donde tendrá lugar la **síntesis proteica**.

Expresión Génica

La **expresión génica** es el proceso que permite obtener proteínas a partir de genes. Los genes son secuencias de nucleótidos de ADN que codifican la información necesaria para la síntesis de proteínas. Esta síntesis tiene lugar en dos pasos: transcripción y traducción. La **transcripción** tiene lugar en el núcleo y en ella una de las dos hebras que conforman la doble cadena de ADN sirve de molde para que una secuencia concreta se copie a una molécula de ARN de cadena sencilla.

Posteriormente, este ARN sale fuera del núcleo y lleva el mensaje –la secuencia de nucleótidos– hasta los ribosomas, de ahí el nombre de ARN mensajero (ARNm). La **traducción** es un proceso citoplasmático en el que la molécula de ARNm se descodifica para generar una cadena específica de aminoácidos, llamada polipéptido (la proteína). La correspondencia existente entre nucleótidos (ARNm) y aminoácidos (proteína) es lo que se denomina **código genético**.



Un gen está delimitado por una **región promotora** (antes del gen) y una **región de terminación** (después del gen). Estas regiones contienen secuencias específicas de nucleótidos que marcan a las ARN polimerasas (ARNp) dónde deben iniciar y terminar la transcripción, respectivamente.

Los nucleótidos del ADN se leen de tres en tres (**tripletes**) y en el ARNm se denominan **codones**. Estos codones del ARNm son los que codifican tanto para el inicio y el fin de la traducción, como para cada uno de los aminoácidos (aa) que componen finalmente la proteína.

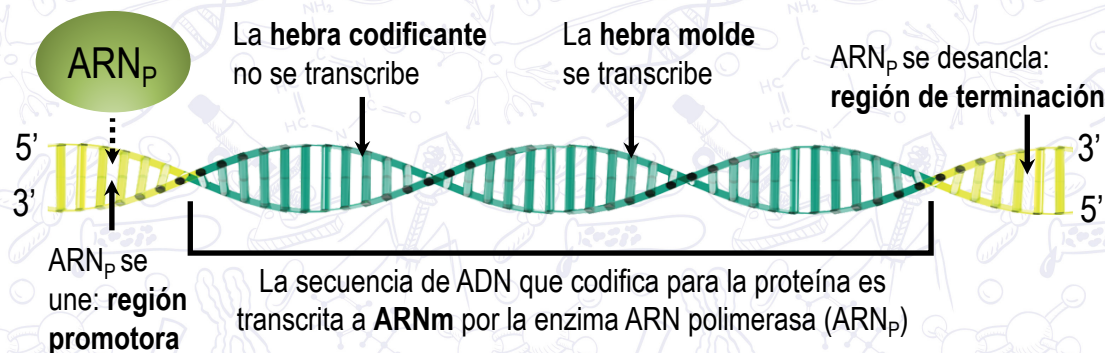
1. ¿Qué es un gen?
2. ¿Qué papel juegan las regiones promotoras y terminales de los genes?
3. ¿Qué se entiende por "expresión génica" y qué procesos involucra?
4. ¿Cómo se llaman los grupos de tres bases consecutivas del ADN? ¿Y los del ARN mensajero?
5. Las dos hebras de ADN se orientan en sentidos opuestos. ¿Qué implicaciones tiene esta característica en la expresión génica?

INTRODUCCIÓN

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO

La **transcripción** consiste en la **síntesis de una molécula de ARN mensajero (ARNm)** a partir de la información genética (secuencia de nucleótidos) contenida en un segmento de ADN. Se trata de un proceso selectivo.

La célula controla y restringe la expresión de la información genética a la formación de los productos génicos necesarios en cada momento, en un proceso altamente **regulado por secuencias específicas** que marcan el inicio y el fin de los segmentos que deben ser transcritos.



Transcripción

La transcripción es el primer paso de la expresión génica, en el que un segmento de ADN es transcrito a ARNm. En células eucariotas tiene lugar en el núcleo. La enzima que se encarga de controlar la transcripción es la **ARN polimerasa**, la cual deshace la hélice de ADN y sintetiza una cadena simple de ARNm usando como molde la hebra de ADN con dirección 5'→3'. La enzima reconoce las secuencias de inicio y de parada codificadas en el ADN y transcribe el contenido entre esas regiones. Es habitual encontrar varias moléculas de ARN polimerasa transcribiendo el mismo gen simultáneamente, lo que permite obtener niveles elevados del ARNm correspondiente.

En eucariotas, el **ARNm** primario obtenido sufre diversas modificaciones post-transcripcionales que dan lugar a un **ARNm** maduro. Por un lado, mediante el mecanismo de **splicing** (corte y empalme), las regiones no codificantes (**intrones**) se eliminan del ARNm primario y se unen entre sí las regiones que sí codifican (**exones**), dando lugar a una secuencia lineal continua que se traducirá posteriormente en una proteína. Además, para llegar a obtener un ARNm maduro, al ARNm primario se le añade una **caperuza (CAP)** en el extremo 5' y una **cola poli-A** en el extremo 3'. Estas modificaciones protegen y estabilizan el ARNm, a la vez que permiten su reconocimiento por el ribosoma.

El ARN mensajero (ARNm) contiene una copia de la información genética necesaria para fabricar una proteína. De un único gen en la molécula de ADN, pueden crearse muchas copias de ARNm. En células eucariotas, el ARNm sintetizado viaja hasta el citoplasma abandonando el núcleo por alguno de los numerosos poros nucleares que se encuentran en su membrana.

En células procariotas (bacterias) no hay núcleo y la transcripción tiene lugar directamente en el citoplasma, junto con la traducción, por lo que la síntesis de proteínas puede ser extremadamente rápida.

La hebra molde del ADN guarda la información que se transcribe a ARNm. También se la conoce como hebra o secuencia antisentido.

La hebra codificante del ADN no se transcribe y contiene la misma secuencia de nucleótidos que el ARNm, excepto que en el ARNm la timina (T) del ADN es sustituida por uracilo (U). También se la conoce como hebra o secuencia sentido.

Se cierra la burbuja de transcripción.

El ARNm sale del núcleo a través de poros en la membrana nuclear, alcanzando así el citoplasma.

La cadena simple de ARNm que se sintetiza es complementaria a la hebra molde del ADN y, por tanto, tiene el mismo mensaje que la hebra codificante.

La membrana nuclear consiste de dos capas (interna y externa) que delimitan y protegen el núcleo de las células eucariotas. Esta estructura tiene muchos pequeños orificios llamados **poros** nucleares, que permiten la entrada y salida de moléculas hacia y desde el núcleo.

Una vez en el citoplasma, el ARNm alcanza al ribosoma para comenzar con el siguiente paso en el proceso de síntesis de proteínas: la **traducción**.

Núcleo

Citoplasma

ARNm

1. Explique el papel del ARN mensajero (ARNm) en la síntesis de proteínas.
2. ¿Qué son la hebra molde y la hebra codificante del ADN? ¿Cuál se transcribe?
3. ¿Qué bases empareja la enzima ARN polimerasa entre las moléculas de ADN y ARNm?
4. ¿Qué modificaciones sufre un ARNm primario para llegar a ser un ARNm maduro, capaz de dar lugar a una proteína?

© Grupo de Innovación sobre la Docencia en Diversidad Biológica
BIOINNOVA :: www.innovabiologia.com

X3

INTRODUCCIÓN

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO

La **síntesis de proteínas** se realiza utilizando secuencias específicas de tres bases del ARNm llamadas **codones**. Cada aminoácido está codificado por un triplete, siguiendo las reglas del **código genético**.

El código es **universal** (para todas las especies) y **redundante** (un aminoácido puede estar codificado por varios codones), pero no ambiguo (un codón codifica uno y sólo un aminoácido).



Traducción

La traducción es el **segundo paso** de la expresión génica y en eucariotas ocurre en el **citoplasma**, donde los ribosomas (libres o asociados al retículo endoplásmico rugoso) leen el código del ARNm y lo descodifican para sintetizar proteínas. Varios ribosomas pueden trabajar simultáneamente sobre una misma molécula de ARNm.

Los ribosomas son complejos macromoleculares compuestos por dos subunidades (mayor y menor), ambas formadas por secuencias de **ARN ribosómico (ARNr)** y proteínas. Estas subunidades se unen en presencia de cadenas de ARNm y llevan a cabo la síntesis de proteínas con la ayuda del **ARN de transferencia (ARNt)**.

Las moléculas de ARNt se trasladan hasta el ribosoma llevadas por aminoácidos que se irán añadiendo a la cadena polipeptídica en construcción.

La enzima aminoacil-ARNt sintetasa une la molécula de ARNt a su aminoácido específico.

El anticodón se corresponde con una secuencia de tres bases complementarias al codón en la molécula de ARNm.

Los ribosomas tienen sitios de unión específicos que atraen a moléculas de ARNt cargadas con aminoácidos. El ARNt es una molécula pequeña (80 nucleótidos) que presenta dos regiones pequeñas, una con un triplete de nucleótidos y otra con un aminoácido. El triplete que presenta un ARNt es complementario al codón que codifica en el ARNm para un aminoácido concreto. Así, existe una molécula de ARNt distinta para cada uno de los diferentes anticodones posibles y, debido a la degeneración del código genético, podríamos encontrar hasta seis ARNt distintos cargando con el mismo aminoácido.

Esta molécula de ARNt ha entregado su aminoácido y se separa del ribosoma.

Activación del ARNt con el aminoácido lista.

Hace falta energía para activar las moléculas de ARNt, para unir esas moléculas a la secuencia de ARNm y para elongar la cadena del péptido.

Cadena polipeptídica en un estado temprano de síntesis. Se ha unido la subunidad menor del ribosoma para facilitar la visión.

Cadena polipeptídica en estado avanzado de síntesis. Una vez finalizado el proceso, se obtiene la proteína.

Varios ribosomas pueden trabajar simultáneamente sobre una misma molécula de ARNm, lo que aumenta la tasa de síntesis proteica.

Los ribosomas se desplazan a lo largo de la molécula de ARNm en este sentido (5' → 3').

ARNt descargado

ARNm

5' 3'

1. Explique qué es un ribosoma, cómo se asocia con el ARNt y qué papel juegan ambas moléculas en la síntesis de proteínas.
2. ¿Cuántos tipos de ARNt existen? ¿Por qué se pueden encontrar varios ARNt distintos para un mismo aminoácido?

© Grupo de Innovación sobre la Docencia en Diversidad Biológica
BIOINNOVA :: www.innovabiologia.com

Consultar la ficha sobre traducción en **BIOINNOVA**

INTRODUCCIÓN

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO

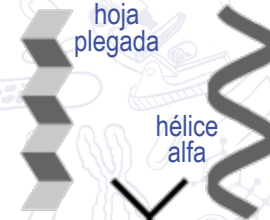
El **dogma central** ilustra cómo la información codificada en el **ADN** se transcribe en un **ARNm** que, a su vez, se traduce en una **proteína**, en una serie de procesos complejos que implican aminoácidos, ribosomas, enzimas, etc.

Sin embargo, los **nuevos descubrimientos** sobre funciones alternativas del ARN, los genes que codifican para múltiples formas de proteínas y los cambios diferenciales que sufren las proteínas después de su síntesis, que condicionan su función en las células, están cambiando el paradigma.

El escenario no es tan simple; en esencia, el dogma central sigue vigente, pero disciplinas como la **genómica** y la **proteómica** revelan una complejidad inimaginable hace pocos años.



Estructura primaria
Secuencia de una cadena de aminoácidos



Estructura secundaria
Los aminoácidos en la secuencia primaria interactúan mediante enlaces de hidrógeno



Estructura terciaria
Debida a interacciones entre hélices alfa y hojas plegadas

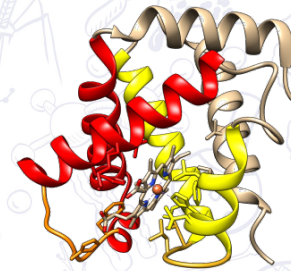


Estructura cuaternaria
Formada por más de una cadena de aminoácidos

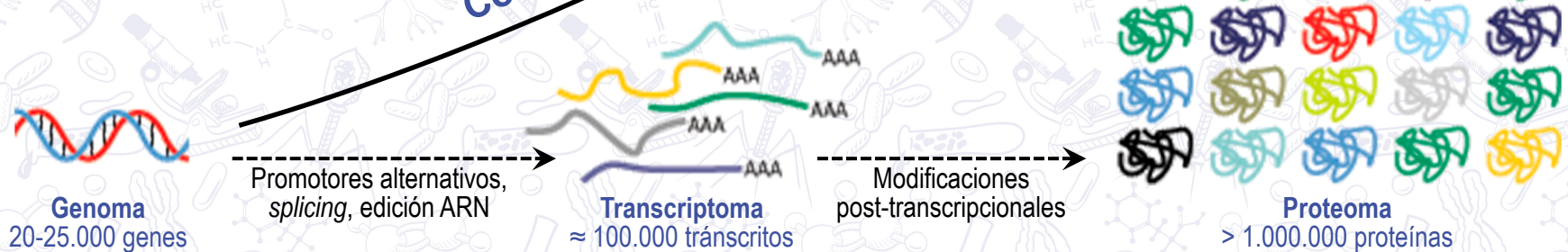
Proteína

INTRODUCCIÓN

El **proteoma** es la dotación completa de proteínas producidas por un organismo o sistema celular bajo las distintas condiciones ambientales y en función de la etapa de desarrollo (o del ciclo celular) en que se encuentre específicamente.



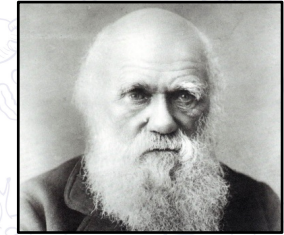
Proteómica es el estudio a gran escala de esas proteínas, en particular de su estructura y función. Su abordaje es mucho más complejo que la genómica, dado que, por ejemplo en humanos, se estima que a partir de los 25.000–30.000 genes que codifican proteínas en el genoma, podrían generarse un número de proteínas diferentes que oscilaría entre 500.000–1.000.000.





INTRODUCCIÓN

Charles Darwin



Cuando hablamos de **evolución**, pensamos en Charles Darwin y su teoría de la **selección natural**. Entre sus observaciones señaló que todas las especies del planeta producen mayor descendencia en cada generación de lo que la propia naturaleza puede soportar, y que la presión de dicho exceso de población conlleva **variaciones** en las especies.

Incluso dentro de una misma especie, en cada individuo se producen de manera diferente cambios graduales a través del tiempo. Así, el **ambiente** selecciona aquellos organismos que presentan unas **características fenotípicas** más adecuadas para sobrevivir y reproducirse.

Estas características están determinadas por un componente genético en el que los genes de los individuos se **heredan** de sus progenitores. Las variaciones en estos genes pueden dar lugar a:

- diferentes funciones
- rasgos nuevos
- efectos positivos, negativos o neutros

Estas **presiones** ejercidas por los procesos de selección natural hacen que, aunque el **dogma central de la biología molecular** siga siendo válido, las investigaciones sobre **genómica** y **proteómica** revelen una mayor **complejidad** de la esperada en el tránsito desde la secuencia de **ADN** a un **fenotipo** concreto.



INTRODUCCIÓN

¿Por qué utilizar la electroforesis de proteínas para analizar la evolución?

- Cambios en el ADN (genes) dan lugar a proteínas con:
 - diferentes **funciones**
 - nuevos **rasgos y caracteres**
 - efectos positivos, negativos o neutros
- La **diversidad genética** proporciona una fuente de variabilidad para la selección natural (= **evolución**).

Dogma Central de la Biología Molecular

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO



INTRODUCCIÓN

¿Las evidencias moleculares soportan la teoría evolutiva?

- Esta práctica permite a los estudiantes explorar la **evolución a nivel molecular**, en del contexto que establece el dogma central de la biología molecular:

ADN → ARN → PROTEÍNAS → CARACTERES / RASGOS = FENOTIPO

- Los cambios en las proteínas pueden reflejar cambios en el **acervo genético**.
- Existen proteínas cuya estructura y función se ha mantenido estable (conservado) en todos los organismos a lo largo de la evolución. Suele tratarse de proteínas esenciales para la vida de los individuos.
- El músculo estriado o esquelético está compuesto principalmente de **actina** y **miosina**, aunque comprende otras proteínas menos abundantes. Ambas proteínas se encuentran **muy conservadas** y son esenciales para la locomoción y la supervivencia en todos los organismos.
- Otras proteínas musculares, sin embargo, muestran bastante variación, incluso entre especies estrechamente relacionadas.



INTRODUCCIÓN

Proteínas musculares

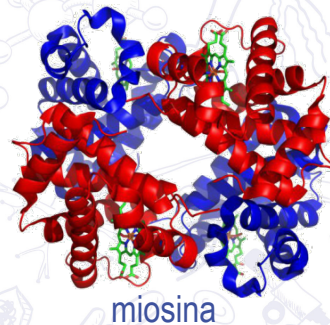
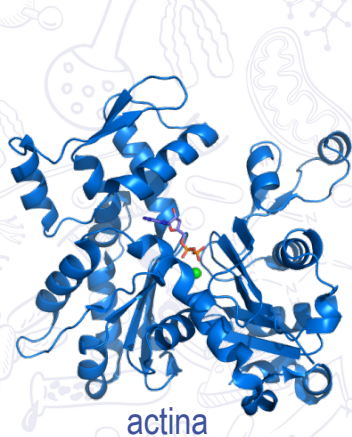
- Las proteínas musculares son imprescindibles para nuestros movimientos diarios más familiares, como respirar o caminar, y para el propio crecimiento del organismo. Son muy variadas y realizan una gran variedad de funciones, entre las que se encuentran la **estructural** y **contráctil**, gracias a las interacciones que se producen en las fibras musculares.
- Cada fibra muscular contiene varios cientos o millares de **miofibrillas**. Cada miofibrilla consiste en una serie lineal de unidades contráctiles, denominadas **sarcómeros**.
- Los **filamentos de actina** se encuentran alineados con los **filamentos de miosina**, de manera paralela y parcialmente solapados. La contracción del músculo consiste en el **acortamiento del sarcómero** debido al deslizamiento de los miofilamentos finos de actina sobre los miofilamentos gruesos de miosina, todo esto regulado por la intervención nerviosa y la participación del calcio y ATP.
- La contracción combinada de múltiples sarcómeros a lo largo de una fibra muscular produce la contracción de todo el músculo.

INTRODUCCIÓN

Proteínas musculares

Actina

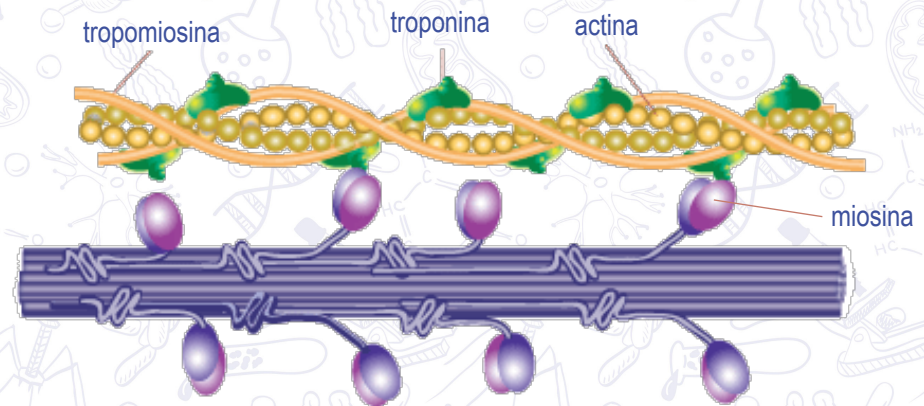
- 5% del total proteico
- 20% de la masa muscular en vertebrados
- 375 aminoácidos = 42 kD
- forma filamentos



Miosina

- tetrámero
- dos subunidades pesadas (220 kD)
- dos subunidades ligeras (15-25 kD)
- hidroliza ATP deslizándose a lo largo del filamento de actina

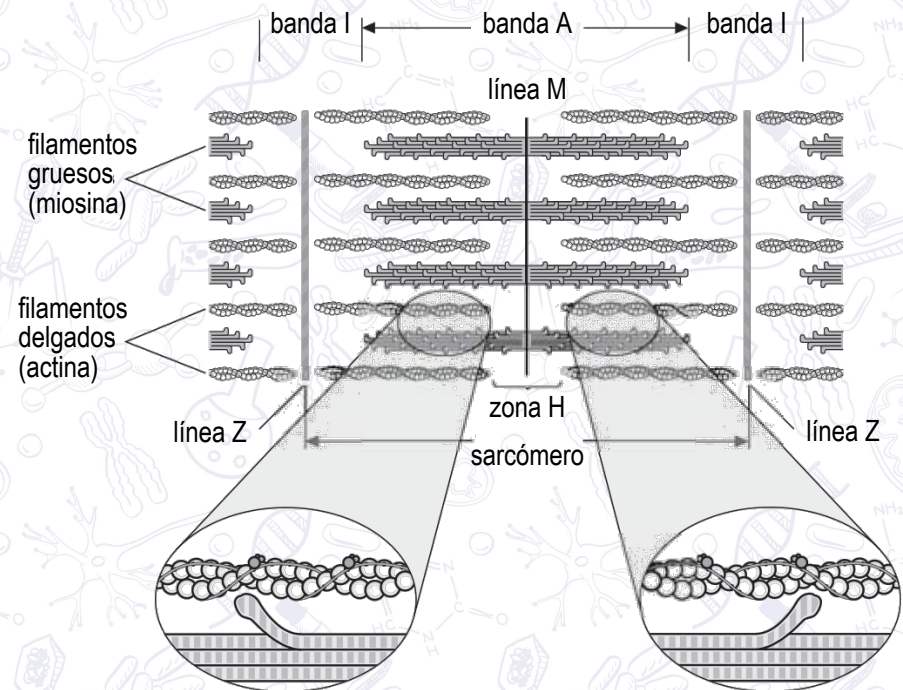
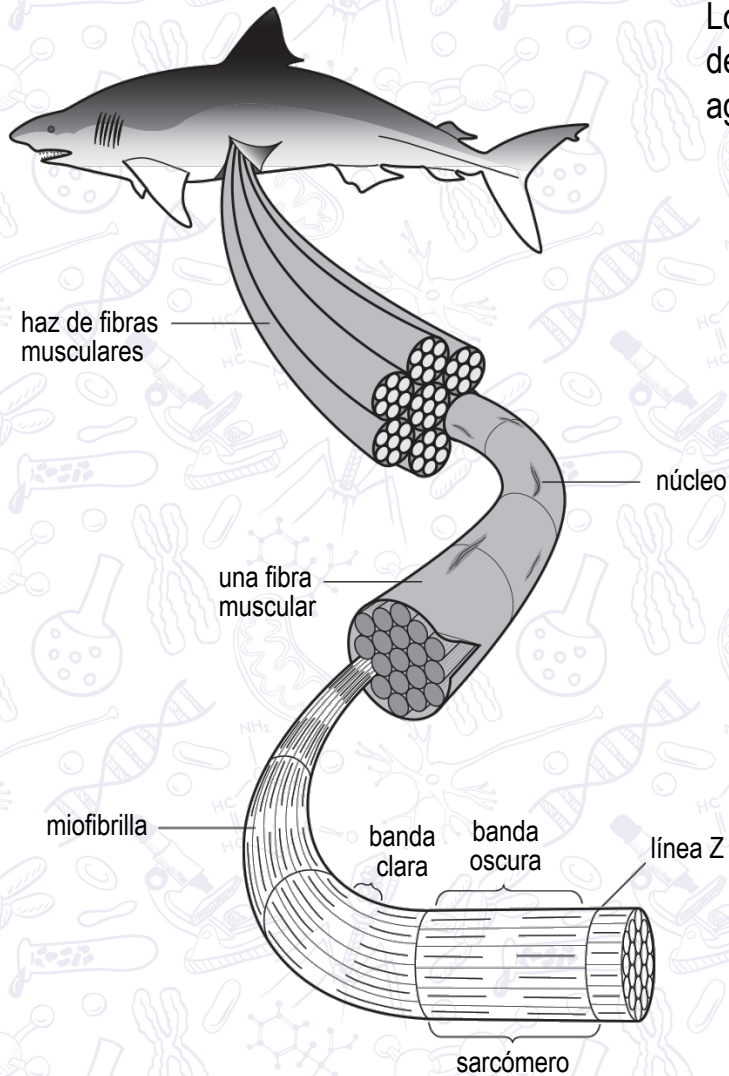
Filamento de actina



Filamento de miosina

INTRODUCCIÓN

Vista telescópica de la estructura del **músculo esquelético**. Los filamentos gruesos de **miosina** y los filamentos delgados de **actina** se estructuran formando las **miofibrillas**, que se agrupan juntas para dar lugar a las **fibras musculares**.



Los elementos contráctiles básicos de las células musculares son las **miofibrillas**, que se agrupan en fibras y consisten en una sucesión lineal de unidades contráctiles llamadas **sarcómeros**.

INTRODUCCIÓN

El músculo contiene proteínas de muchos tamaños

Proteína	kD	Función
Titina	3000	Conecta la línea Z con la línea M en el sarcómero
Distrofina	400	Ancla proteínas musculares citoplasmáticas a la membrana celular
Filamina	270	Entrecruza filamentos de actina y ancla proteínas de membrana al citoesqueleto
Miosina (cadena pesada)	210	Participa en la contracción muscular, la división celular y el transporte de vesículas
Espectrina	265	Ancla los filamentos de actina a proteínas de la membrana plasmática
Nebulina	107	Regula el ensamblaje de los filamentos de actina
α -actinina	100	Se une a la actina y participa en la construcción de la red de microfilamentos
Gelosina	90	Se une a la actina y regula el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos
Fimbrina	68	Se une a la actina e interviene en la formación de retículas de microfilamentos
Actina	42	Forma filamentos del citoesqueleto, con funciones vitales para la célula
Tropomiosina	35	Forma parte de los filamentos de actina y regula su función
Miosina (cadena ligera)	15-25	Participa en la contracción muscular, la división celular y el transporte de vesículas
Troponina (T.I.C.)	30, 19, 17	Se ancla a la tropomiosina y permite la contracción muscular
Timosina	5	Secuestra monómeros de actina



INTRODUCCIÓN

¿Las evidencias moleculares soportan la teoría evolutiva?

- Los perfiles de proteínas reflejan las **adaptaciones** fisiológicas a diferentes ambientes, pero se originan como **mutaciones** aleatorias del ADN.
- Tales acontecimientos de mutación, si son favorables, **prevalecen** en el tiempo, dando lugar a procesos de **selección** y contribuyendo a la **evolución** de las especies con nuevas funciones especializadas.

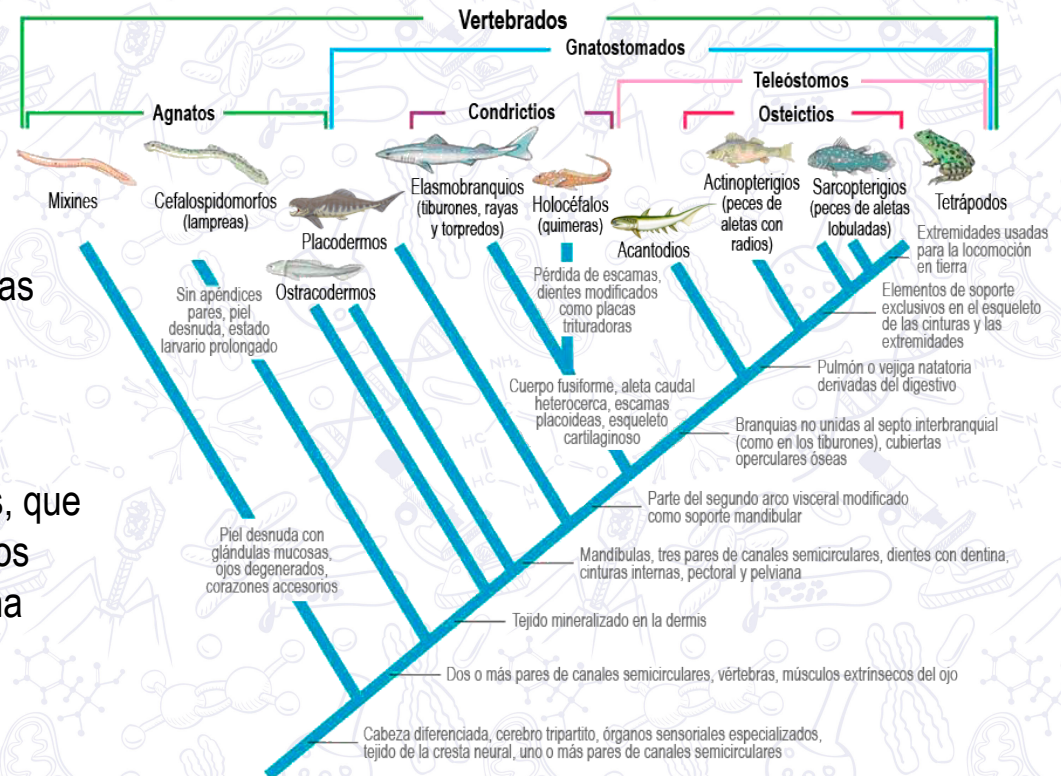
mutación > variación > especialización > especiación = **evolución**

En esta práctica, los estudiantes generarán **resultados moleculares** a partir de muestras de diferentes especies de peces, con el objetivo de determinar las **relaciones filogenéticas** que existen entre ellas y cómo se distribuyen en un **cladograma** que refleje la línea evolutiva que tomaron en el árbol de la vida.

INTRODUCCIÓN

¿Las evidencias moleculares soportan la teoría evolutiva?

- Un **cladograma** es un diagrama ramificado usado en la **cladística**, que esquematiza la **filogenia** (o historia evolutiva) más probable de un grupo de **taxones** terminales (los nodos terminales del cladograma).
- El cladograma une taxones con su **ascendencia común**, deducida a partir de **sinapomorfías** o caracteres derivados compartidos.
- Cladística**: rama de la Biología que define las relaciones evolutivas entre los organismos basándose en similitudes derivadas.
- Taxón**: grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción si es una especie, y un tipo.



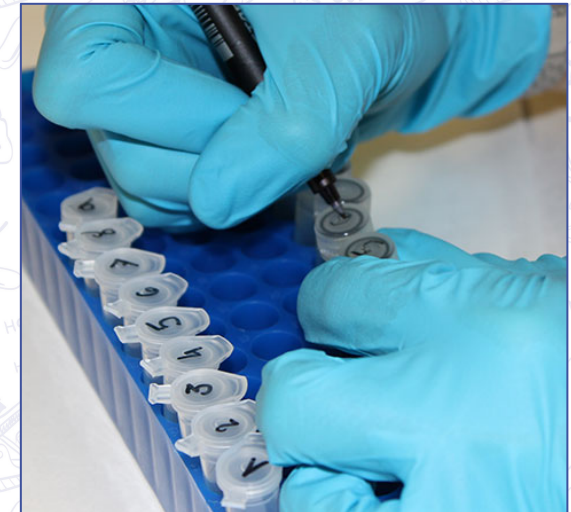
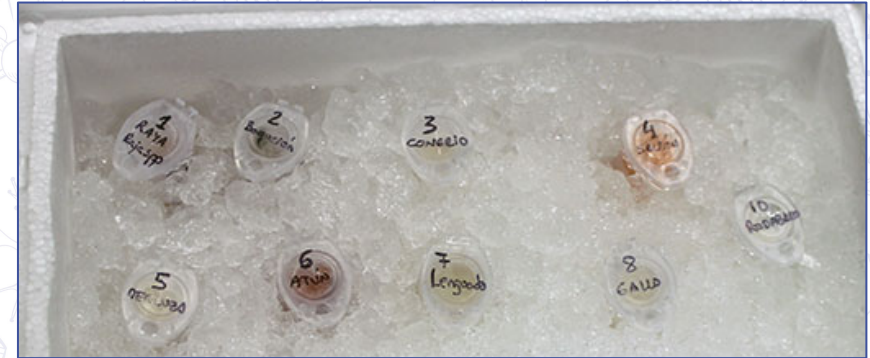


- **Introducción**
- **Preparación de las muestras**
- **Electroforesis en gel de las proteínas**
- **Tinción de los geles de acrilamida**
- **Comparación de los perfiles proteicos**
- **Construcción de cladogramas en base a datos moleculares**
- **Caso práctico**

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de peces se mantienen congeladas a -80°C hasta su uso, para preservar su integridad.

En el momento de su uso, se descongelan en hielo y se mantienen a 4°C , mientras se prepara el material necesario para la práctica.



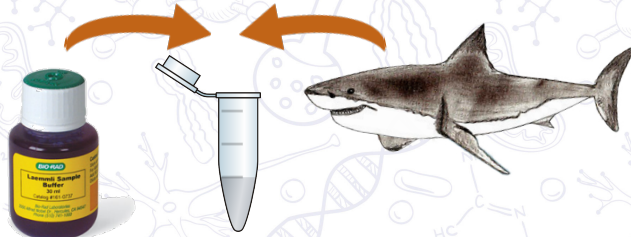
Para la manipulación de líquidos se emplean micropipetas de distintos volúmenes y puntas con filtro esterilizadas.

Se rotulan los tubos necesarios para las muestras a analizar.

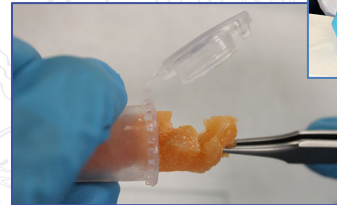
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Extraer las proteínas musculares de las muestras de peces

Añadir la muestra
de músculo y el
tampón Laemmli
al tubo



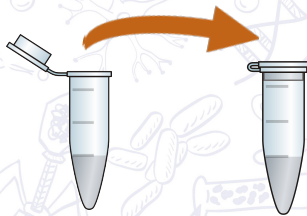
Golpear el tubo
suavemente para
agitar la muestra



Cada muestra se
trocea hasta
obtener el
tamaño deseado.



Incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente



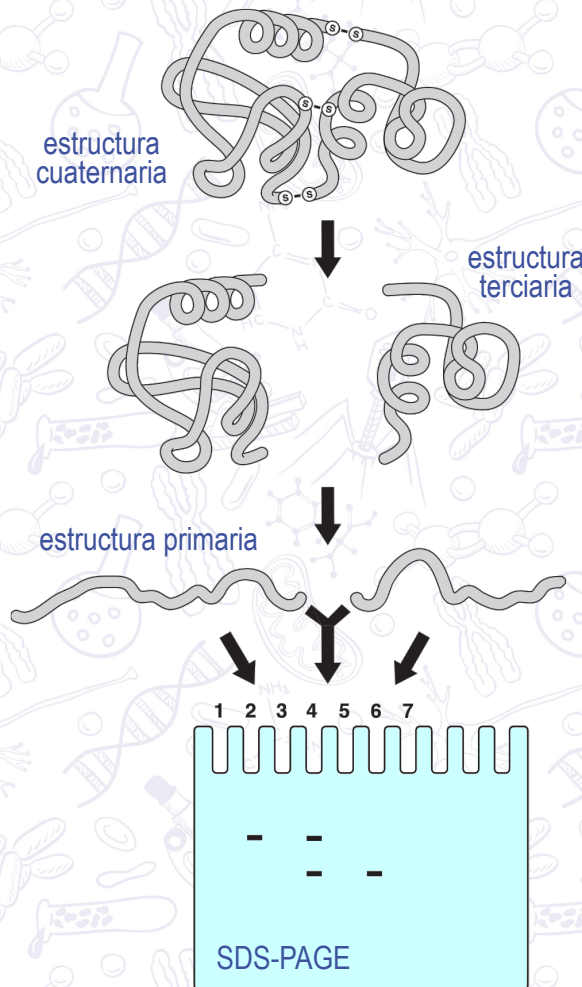
Recuperar el extracto de
proteínas (fase líquida) y
transferirlo a otro tubo



Calentar las muestras a 95 °C durante 5 minutos

Durante la incubación, las proteínas se transfieren
del tejido al tampón, por lo que recuperamos éste
en tubos limpios y deseamos los restos de tejido.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS



Para poder determinar eficazmente los pesos moleculares de las proteínas presentes en las muestras de estudio, resulta imprescindible **desnaturalizar** sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias.

Sólo cuando se cuenta con las proteínas en su **estructura primaria** (cadena lineal de aminoácidos) es posible precisar su tamaño por técnicas electroforéticas.

El tampón **Laemmli**, en el que hemos incubado nuestras muestras, lleva a cabo esta desnaturalización, dado que entre sus componentes cuenta con:

- **2-mercaptoetanol** → destruye puentes disulfuro
- **SDS** (dodecilsulfato sódico) → disocia las proteínas en sus péptidos individuales con la ayuda de calor



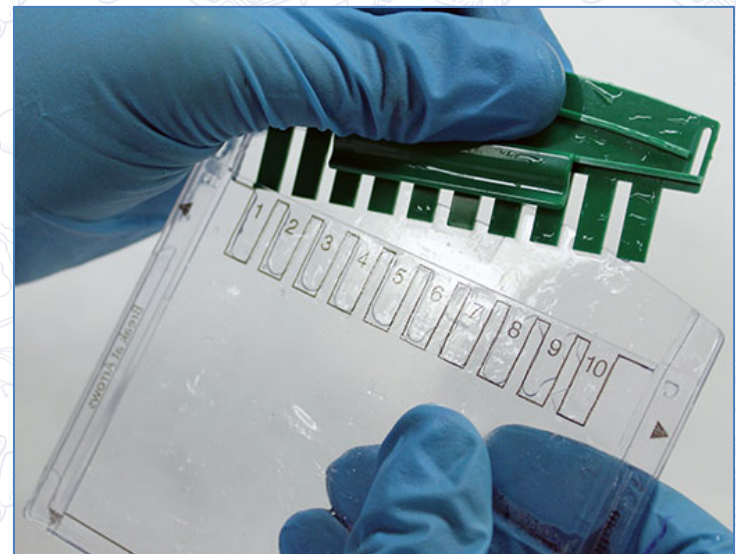
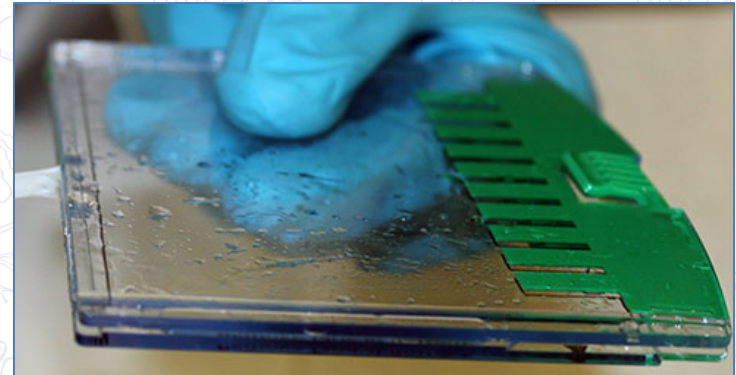
- **Introducción**
- Preparación de las muestras
- **Electroforesis en gel de las proteínas**
- Tinción de los geles de acrilamida
- Comparación de los perfiles proteicos
- Construcción de cladogramas en base a datos moleculares
- **Caso práctico**

ELECTROFORESIS EN GEL

Uno de los métodos de **electroforesis** más comúnmente aplicado para la **separación de proteínas** es el que emplea geles de **poliacrilamida** (PAGE = *polyacrylamide gel electrophoresis*) en presencia del **detergente** aniónico dodecilsulfato sódico (SDS).

Esta técnica es conocida como **SDS-PAGE**. Para ello se prepara un gel en placa vertical.

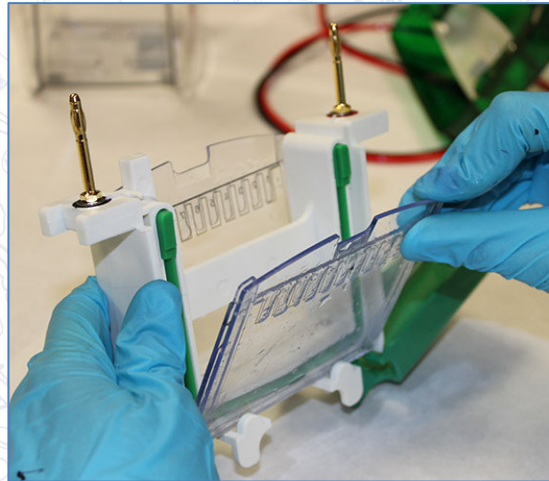
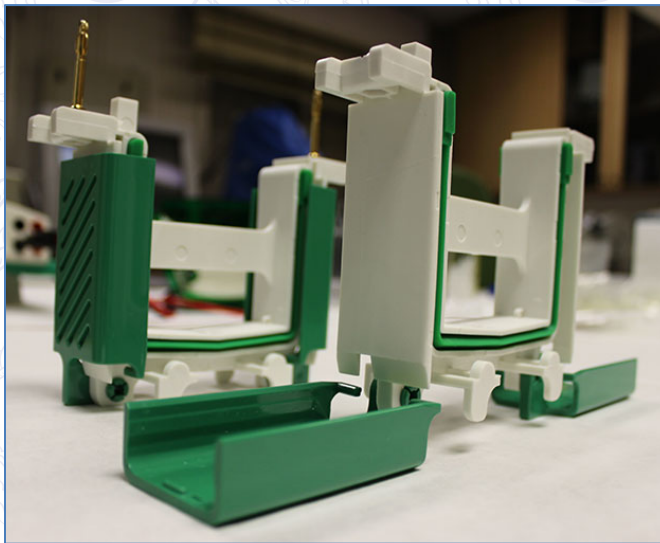
Las separaciones electroforéticas generalmente se realizan sobre matrices que sirven de **tamices moleculares** que potencian la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros se desplazan fácilmente a través de la matriz, mientras que las de mayor tamaño quedan retenidas y las intermedias se desplazan con distinto grado de dificultad **dependiendo de su tamaño**.



Para esta práctica se adquirieron geles de acrilamida ya preparados, listos para cargar las muestras.

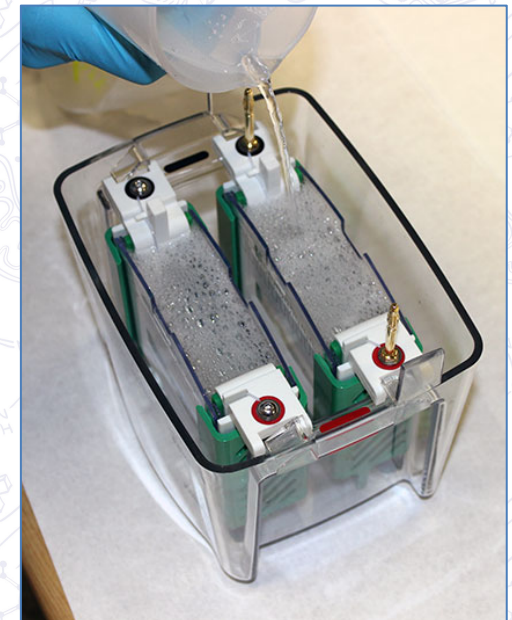
ELECTROFORESIS EN GEL

Los geles se montan verticalmente en las estructuras de la cubeta de electroforesis.

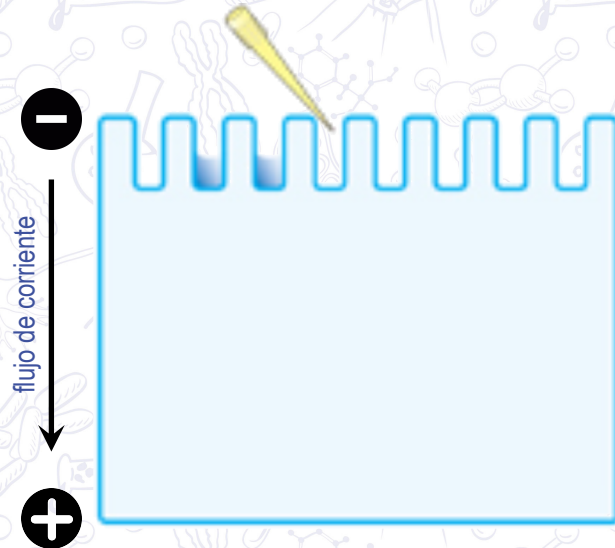


Una vez montados todos los geles en la cubeta, se rellena con el **tampón de electroforesis TGS**.

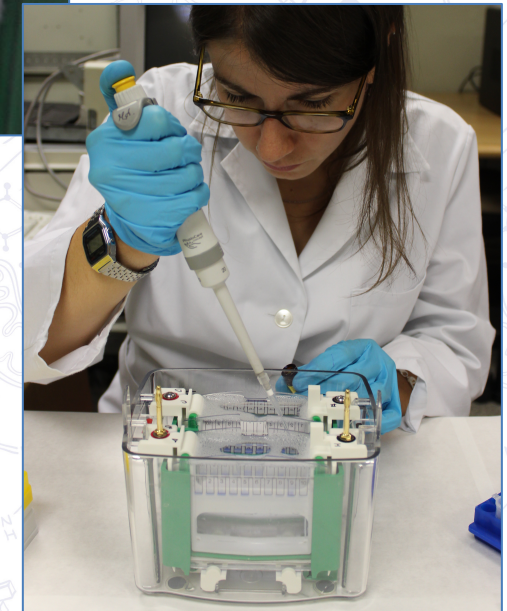
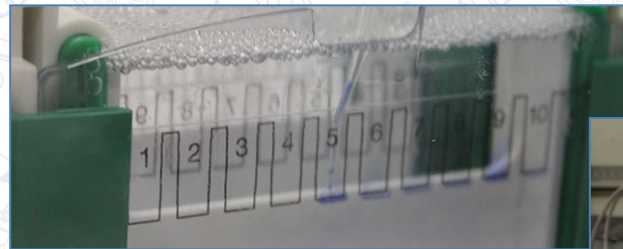
El TGS ayuda a mantener las **proteínas desnaturalizadas**, dado que en su composición contiene el detergente SDS, además de tris y glicina.



ELECTROFORESIS EN GEL



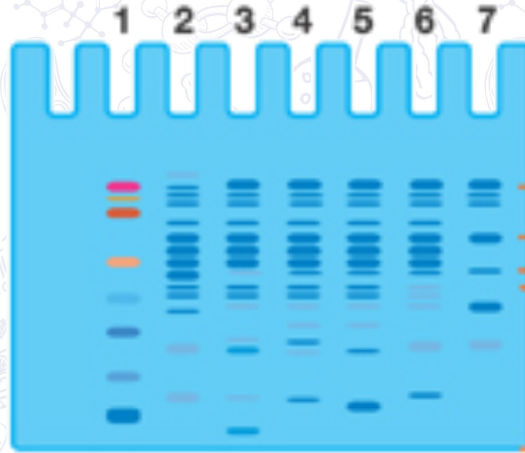
Las proteínas extraídas de nuestras muestras de peces se cargan en los pocillos del gel, junto con un marcador de peso molecular y los estándares de las proteínas a analizar.



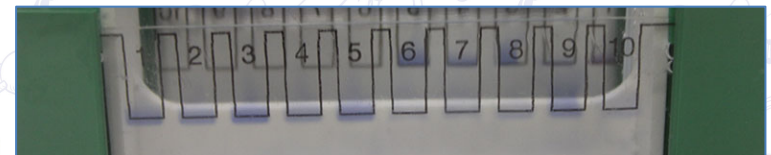
La electroforesis permite separar las proteínas gracias a su movilidad en un campo eléctrico y en función de su tamaño.

Carriles:

1. Marcador de peso molecular
- 2-6. Muestras de proteínas a estudiar
7. Estándares de actina y miosina



miosina (cadena pesada)
actina
tropomiosina
miosina (cadena ligera)



ELECTROFORESIS EN GEL

SDS-PAGE

compartimento superior
con tampón de
electroforesis y el cátodo

pocillos donde se aplican las muestras

bandas en
las que se
separan los
componentes

colorante
indicador
del frente
de avance

compartimento inferior
con tampón de
electroforesis y el ánodo

Las muestras migran desde
el cátodo hacia el ánodo.

cátodo



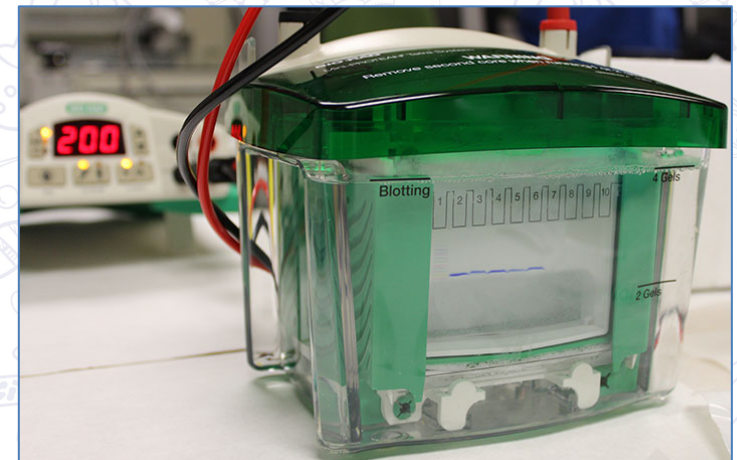
gel entre
placas de
vidrio



ánodo

Es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

La electroforesis se lleva a cabo durante 30 minutos a 200 voltios.



A – en la parte superior del gel se quedan las proteínas más grandes
B – hacia la parte inferior del gel migran las proteínas más pequeñas

Durante la electroforesis sólo es visible en el gel el frente de avance. Para poder ver las distintas bandas de las proteínas, será necesario teñir el gel una vez acabe este paso.

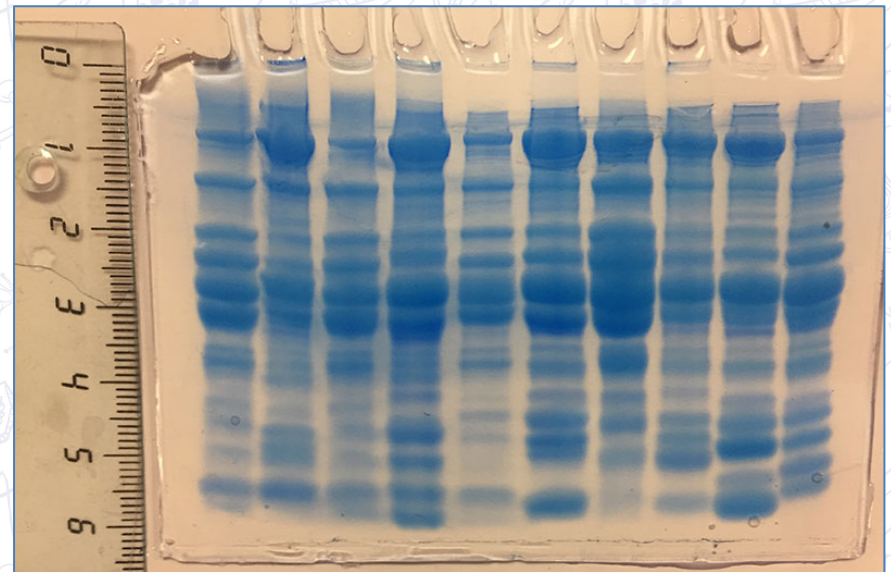
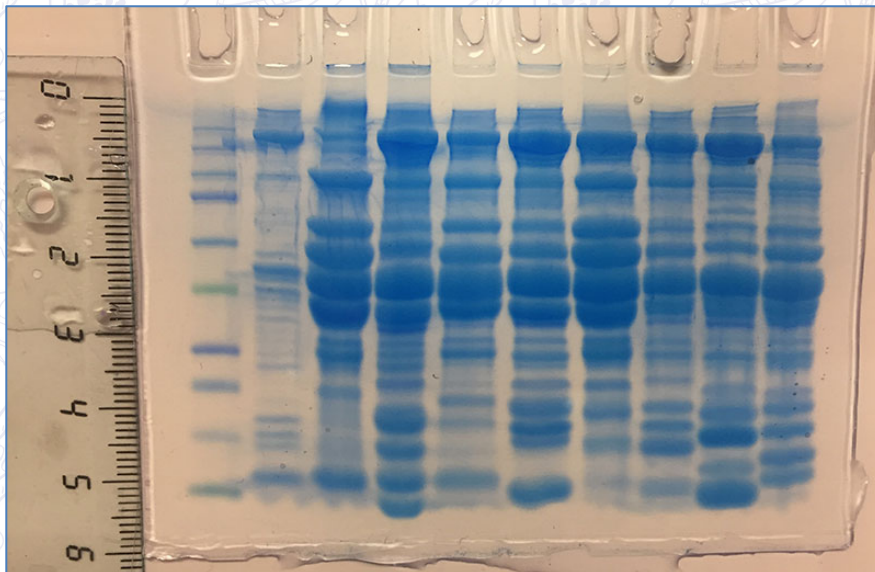
- **Introducción**
- Preparación de las muestras
- **Electroforesis en gel de las proteínas**
- **Tinción de los geles de acrilamida**
- Comparación de los perfiles proteicos
- Construcción de cladogramas en base a datos moleculares
- **Caso práctico**

TINCIÓN DE GELES

Las proteínas no son visibles, únicamente las utilizadas como estándar, ya que se encuentran unidas covalentemente con diferentes colorantes.

En la presente práctica lo alumnos usarán para la visualización de las proteínas el colorante **azul de Coomassie** que se une de forma no covalente a los residuos de lisina de las proteínas.

Tras la tinción, es necesario **desteñir** los geles con agua destilada durante toda la noche, para eliminar el exceso de color inespecífico y dejar ver las bandas de las proteínas bien definidas.



Patrón de bandas en los geles, tras su tinción con azul de Coomassie y ser desteñidos posteriormente.



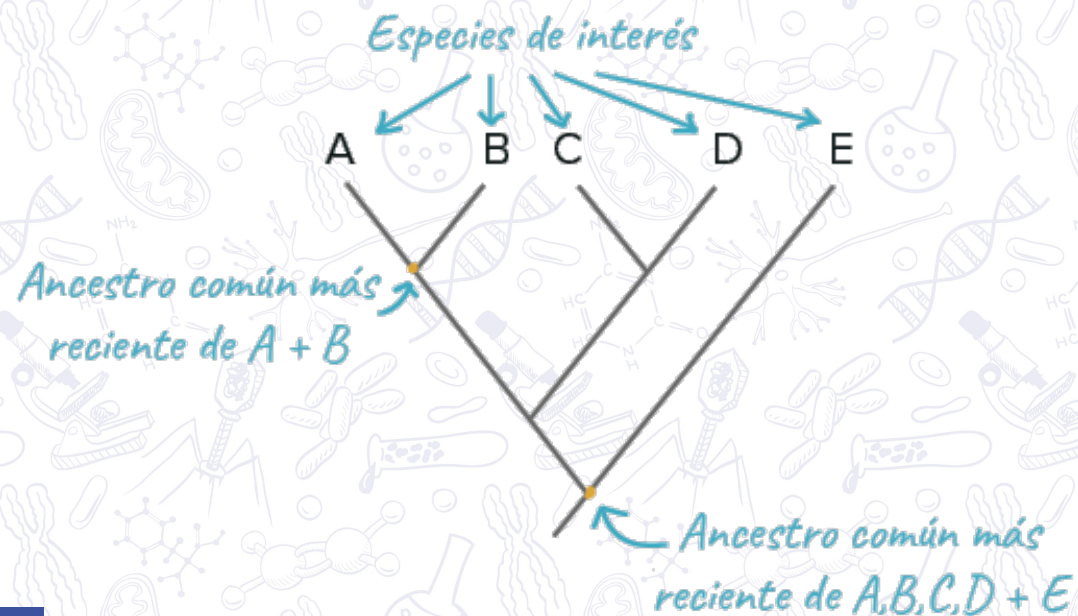
- **Introducción**
- **Preparación de las muestras**
- **Electroforesis en gel de las proteínas**
- **Tinción de los geles de acrilamida**
- **Comparación de los perfiles proteicos**
- **Construcción de cladogramas en base a datos moleculares**
- **Caso práctico**

COMPARACIÓN DE PERFILES PROTEICOS

Para hacer inferencias sobre las relaciones evolutivas entre muestras de las diferentes especies de peces, **se analizan y comparan los patrones de bandas** de proteínas de los diferentes peces en el gel.

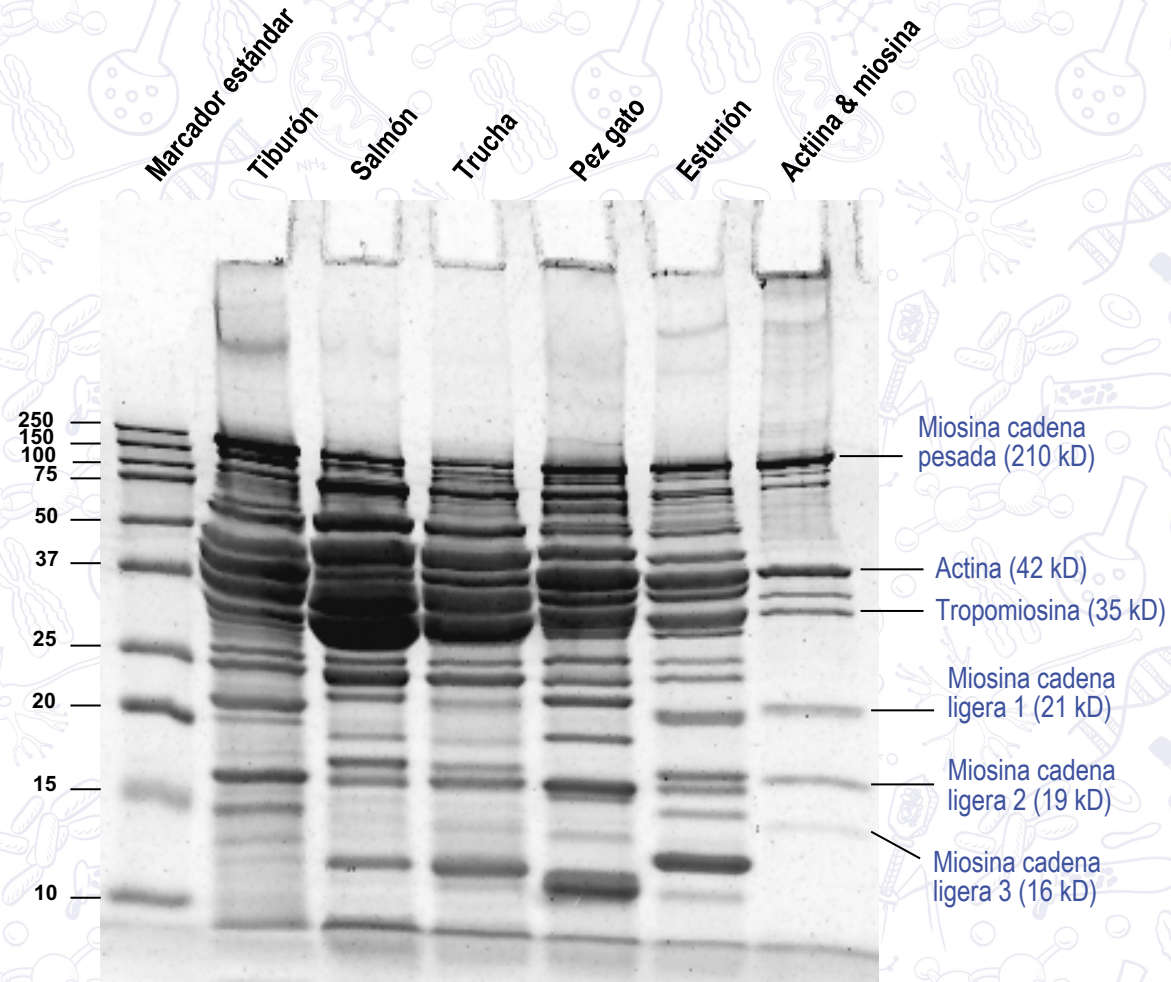
Cada banda de proteínas que comparten dos especies se considera una característica compartida. Se puede construir un **árbol filogenético**, o **cladograma**, sobre la base de bandas de proteínas que las distintas especies de peces tienen en común.

El **análisis cladístico** supone que cuando dos organismos comparten una característica común, también comparten un **antepasado común** con esa misma característica.



COMPARACIÓN DE PERFILES PROTEICOS

En el caso de las proteínas musculares analizadas en este estudio los patrones son los siguientes:

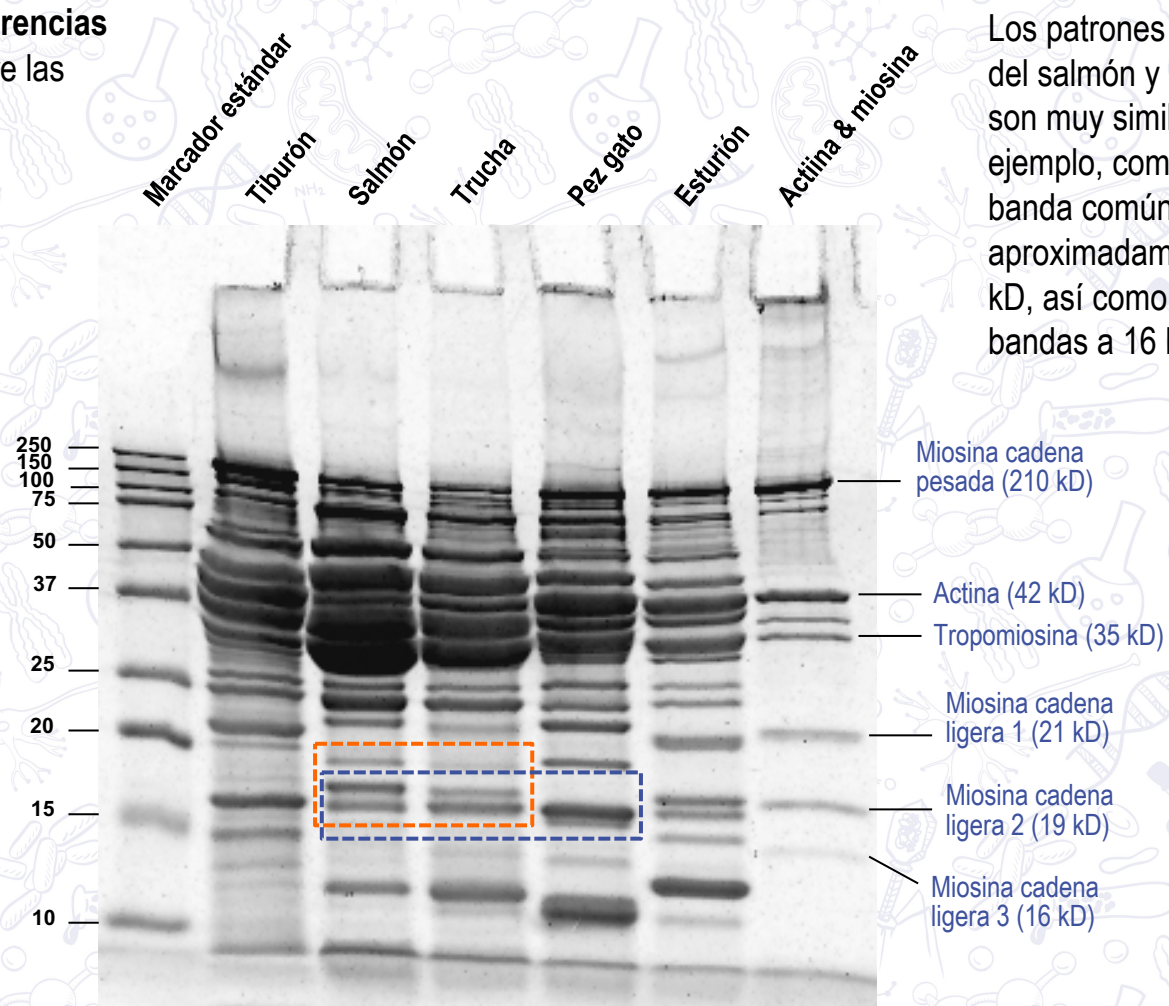


COMPARACIÓN DE PERFILES PROTEICOS

Se observan **similitudes y diferencias** en los perfiles de proteínas entre las especies estudiadas.

La comparación del salmón o la trucha con el pez gato revela diferencias significativas en sus patrones. Sólo una de las bandas de aproximadamente 16 kD encontradas en los primeros está presente en el pez gato.

Bandas del marcador de proteínas con tamaños entre ~30 y 10 kD



Los patrones de bandas del salmón y la trucha son muy similares. Por ejemplo, comparten una banda común a aproximadamente 18 kD, así como un par de bandas a 16 kD.

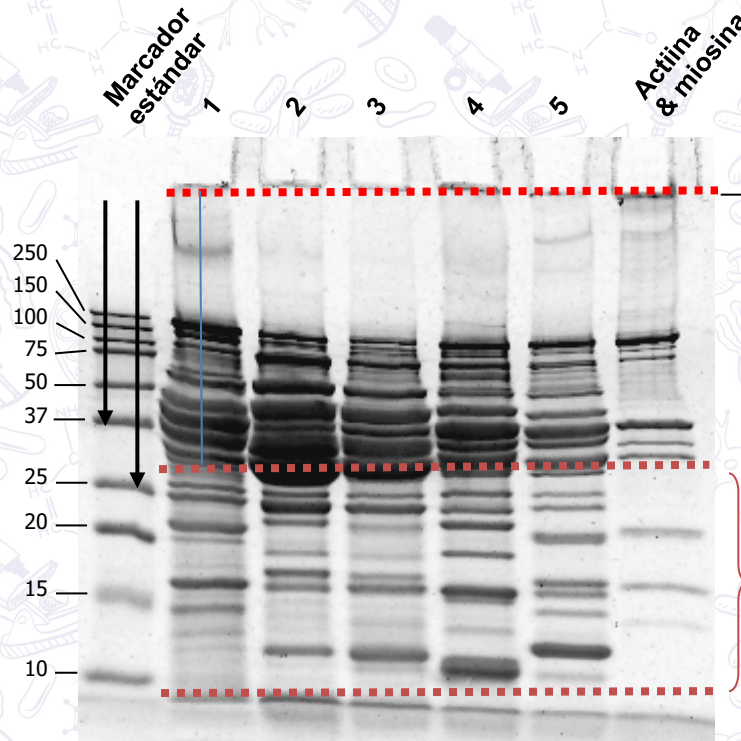
COMPARACIÓN DE PERFILES PROTEICOS

Un gel de poliacrilamida al 15% está diseñado para separar proteínas pequeñas (menores de 40 kD).

Para la construcción del **cladograma**, el análisis de gel se ha centrado en este rango de tamaños (entre las líneas punteadas naranjas).

Nota: Si se ha corria un gel con un porcentaje diferente de acrilamida o un gel de agarosa, debe analizar la región del gel que ofrece la mejor separación de las proteínas (bandas).

Bandas del marcador de proteínas con tamaños entre ~30 y 10 kD

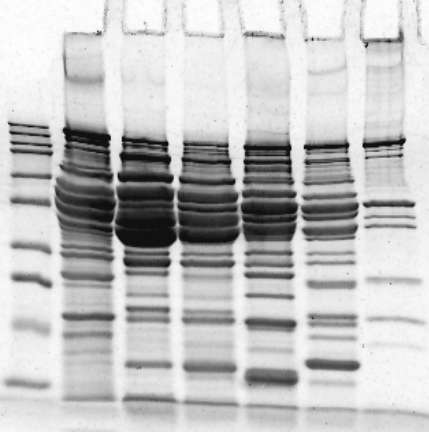


Distancia (mm) desde la base del pocillo a la banda de proteína.

Bandas correspondientes a proteínas de peces entre ~ 30 y 10 kD.

COMPARACIÓN DE PERFILES PROTEICOS

Cada especie de pez presenta un perfil distinto de proteínas.

	Tiburón	Salmón	Trucha	Pez gato	Esturión
PROTEÍNAS TOTALES	7	9	10	8	11
Distancias migradas (mm)	25	26	26	26	26
	26.5	27.5	27.5	27.5	27.5
	29	29	29	29	30
	36	32	29.5	32	30.5
	36.5	34.5	32	36.5	33
	39	36.5	34.5	38	35.5
	44	37.5	36.5	38.5	37
		40.5	37.5	41	39
		42	40.5		39.5
			42		42
					44

COMPARACIÓN DE PERFILES PROTEICOS

Distancia migración (mm)	Tamaño (kD)	Tiburón	Salmón	Trucha	Pez gato	Esturión
25	32.5	X				
26	31.5		X	X	X	X
26.5	31.0	X				
27.5	30.0		X	X	X	X
28.5	29.1					
29	28.6	X	X	X	X	
30	27.6			X		X
30.5	27.1					X
32	25.6		X	X	X	
33	24.7					X
34.5	23.2		X	X		
35.5	22.2					X
36	21.7	X				
36.5	21.2	X	X	X	X	
37	20.7					X
37.5	20.2		X	X		
38	19.7				X	
38.5	19.3				X	
39	18.8	X				X
39.5	18.3					X
40.5	17.3		X	X		
41	16.8				X	
41.5	16.3					
42	15.8		X	X		X
43	14.8					
44	13.9	X				X
Totales		7	9	10	8	11

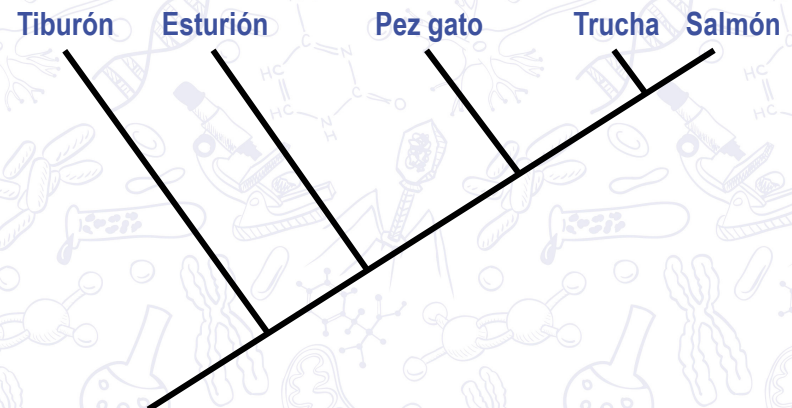
- **Introducción**
- **Preparación de las muestras**
- **Electroforesis en gel de las proteínas**
- **Tinción de los geles de acrilamida**
- **Comparación de los perfiles proteicos**
- **Construcción de cladogramas en base a datos moleculares**
- **Caso práctico**

CONSTRUCCIÓN DE CLADOGRAMAS

Para construir un cladograma es preciso conocer el número de **bandas** que **comparten** las distintas especies entre sí.

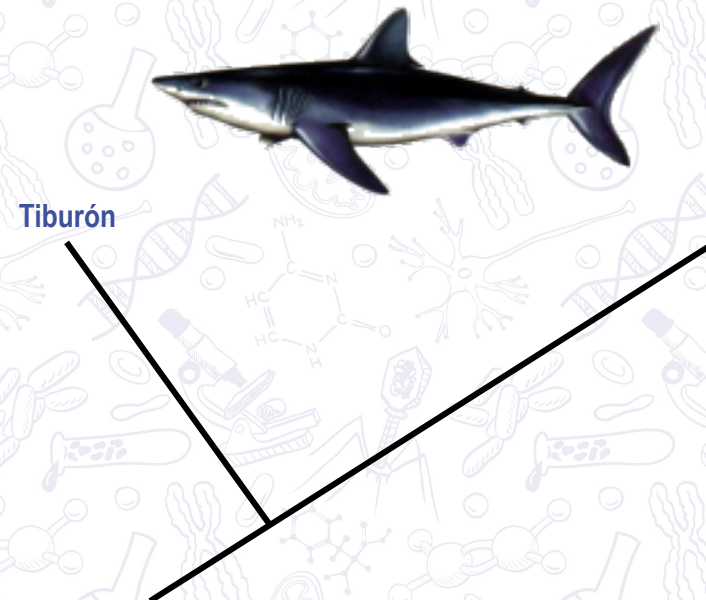
	Tiburón	Salmón	Trucha	Pez gato	Esturión
Tiburón	7	2	2	2	2
Salmón		9	9	5	3
Trucha			10	5	4
Pez gato				8	2
Esturión					11

En base a esta información se puede deducir la **historia evolutiva** de las especies empleadas en este estudio.



CONSTRUCCIÓN DE CLADOGRAMAS

- Dibuja una línea diagonal que será el “tronco” del cladograma.
- Identifica el pez que posee el **menor número de bandas compartidas** con las otras especies del estudio. En este caso es el tiburón que sólo comparte 2 bandas (proteínas).
- Dibuja una línea perpendicular al tronco, cerca de la base y pon el nombre de esa especie al final de la rama.
- Este organismo es el **grupo externo** debido a que presenta menos proteínas en común con el resto de las formas estudiadas.
- El punto donde corta la rama y el tronco es el **nodo**, y representa el **antecesor común** de todos los organismos de este estudio.



CONSTRUCCIÓN DE CLADOGRAMAS

- Identifica las dos especies que tienen el **mayor número de proteínas en común**. En este estudio son el salmón y la trucha, que comparten 7.
- Dibuja una nueva rama perpendicular al tronco, cerca del extremo superior del tronco.
- El nodo que se forma representa el antecesor común del salmón y la trucha, que presentaba hipotéticamente todas estas proteínas.



Tiburón

Trucha

Salmón



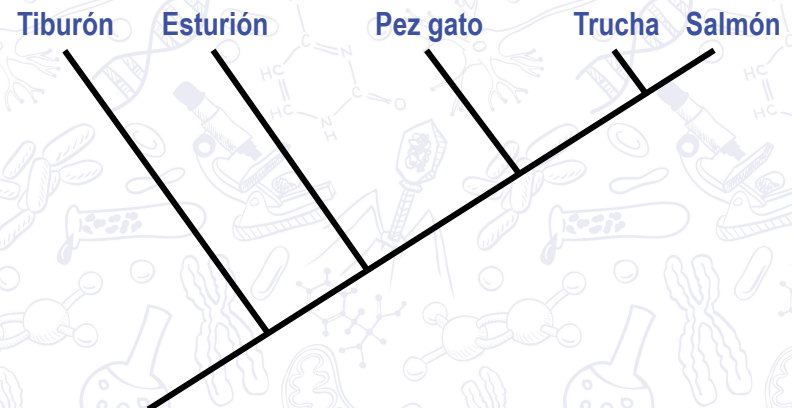
CONSTRUCCIÓN DE CLADOGRAMAS

- Encuentra el pez con el siguiente mayor número de bandas compartidas. En este caso es el pez gato, que comparte 5 con el salmón y la trucha.
- Dibuja una nueva rama por debajo del nodo que comparten la trucha y el salmón.
- Este nuevo nodo representa el antecesor común del salmón, trucha y pez gato, que presentaría estas cinco proteínas.



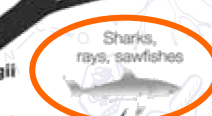
CONSTRUCCIÓN DE CLADOGRAMAS

- El esturión es el último pez que añadir al cladograma.
- Se trata de una especie problemática a la hora de situarlo, ya que comparte más bandas con salmón y trucha que con el pez gato.
- Sin embargo, comparativamente es el pez gato el que comparte mayor número de proteínas con el salmón y la trucha (5).
- Esto hace que la rama del esturión esté por debajo de la del pez gato.
- Este nuevo nodo representa el antecesor común de todos los peces representados en el cladograma, excepto el tiburón, y compartiría con ellos 2 proteínas.



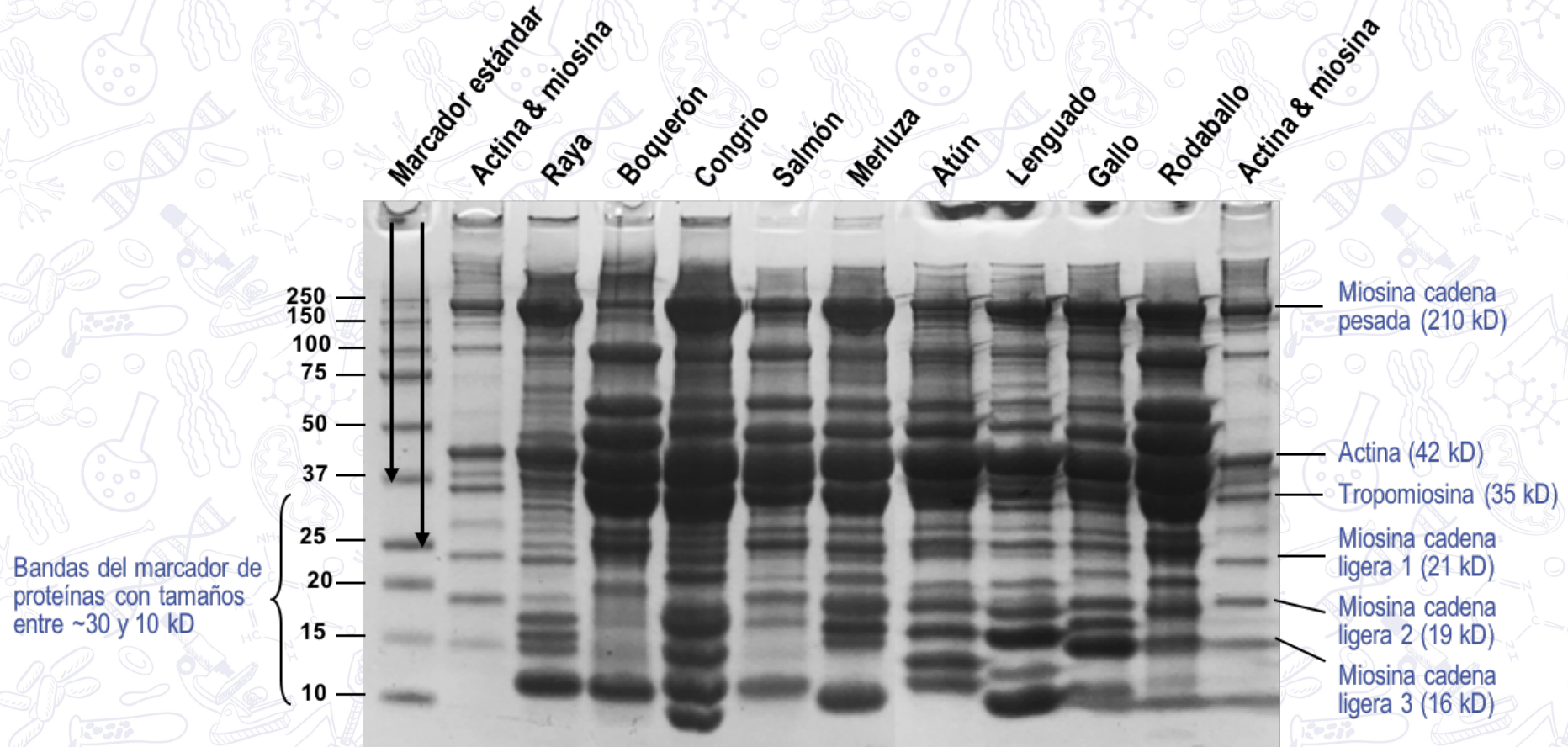
Filogenia clásica vs filogenia molecular

Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los eucariotas.



- **Introducción**
- **Preparación de las muestras**
- **Electroforesis en gel de las proteínas**
- **Tinción de los geles de acrilamida**
- **Comparación de los perfiles proteicos**
- **Construcción de cladogramas en base a datos moleculares**
- **Caso práctico**

CASO PRÁCTICO



CASO PRÁCTICO

