

Purificación de la proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG) con un método de doble cromatografía de afinidad

✉ Martha Deás Rodríguez¹, Celeste Arranz Calzado¹,
Julio César Rodríguez García¹, Miladyis García Luis²,
Roberto González Suárez¹

¹ Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana, Cuba.

² Instituto Nacional de Oncología, La Habana, Cuba

RESUMEN

La proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG) transporta en la sangre las hormonas esteroideas sexuales, dihidrotestosterona (DHT), testosterona (T) y estradiol (E) y regula el acceso a sus tejidos diana. La obtención de esta proteína con un alto grado de pureza es necesaria para el desarrollo de métodos analíticos. El principal contaminante a eliminar es la albúmina sérica humana (ASH) que se encuentra en el plasma en una concentración de 60 g/L (la SHBG de 400 mg/L), que también une hormonas esteroideas por lo que no puede ser excluida completamente con la purificación en columnas de afinidad con ligandos acoplados. En este trabajo se presentan los resultados de la purificación de SHBG a partir de plasma de embarazadas a término utilizando la cromatografía de afinidad con DHT inmovilizada como ligando, filtración por gel en Sephadex G-200 y cromatografía de afinidad acoplada a anticuerpos anti-albúmina sérica humana como forma de eliminar los contaminantes de ASH, así como la monitorización del proceso con un método analítico de alta sensibilidad y especificidad para la ASH. A diferencia de otros métodos publicados, este último paso se introdujo para eliminar los contaminantes, por lo cual se obtuvo una preparación que presentó en el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) dos bandas correspondientes al peso molecular de la SHBG (52 KDa y 48 KDa). El rendimiento final de la proteína fue de 25.8% y su actividad específica de 2116 nM de DHT unidos por mg de proteína. No se encontraron contaminantes de ASH ni en la electroforesis ni en el método analítico de ELISA de ASH empleado.

Palabras Claves: hormonas sexuales, inmunocromatografía de afinidad, albúmina humana

Biotecnología Aplicada 2004;01:16-20

ABSTRACT

Purification of sex hormone binding globulin (SHBG) with two affinity chromatography methods. The Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) transports steroids sex hormones, dihydrotestosterone (DHT), testosterone (T) and estradiol (E₂) in the blood and regulates their access to target tissues. The obtention of a preparation of high purity of this protein is necessary for the development of analytical methods. The human serum albumin (HSA) is the principal contaminant to remove because its concentration is 150 times higher than SHBG (60 g/L vs 400 mg/L) and also binds steroid sex hormones and thus, can not be completely excluded by affinity chromatography purification. In this paper, the results of SHBG purification from human serum by affinity chromatography through a matrix made by coupling [3 H]-5 α dihydrotestosterone 17 β hemisuccinate to Sepharose, Gel chromatography (Sephadex G-200) and affinity chromatography through a matrix prepared coupling human albumin antibodies to CnBr Sepharose to eliminate the HSA contaminant. The process was monitored by an analytical method with high sensitivity and specificity for HSA. The last step of immunoaffinity chromatography was introduced to eliminate the contamination with HSA. The analytical gel electrophoresis showed two bands corresponding to the molecular weight of SHBG (52 KDa and 48 KDa). The cumulative yield of protein was 25.8 % and a specific activity of 2116 nM of DHT bound per mg of protein. By analytical electrophoresis and the analytical method ELISA-HSA, employed we did not detect HSA.

Keywords: sex hormones, immunoaffinity chromatography, human albumin

Introducción

La proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG) es una glicoproteína plasmática que une específicamente a las hormonas esteroideas sexuales.

La concentración de esta proteína sérica es el factor más importante de los que regulan la proporción de hormonas esteroideas biológicamente activas en la circulación general. Los cambios en la concentración de SHBG modifican la distribución de la testosterona y el estradiol entre las distintas proteínas enlazantes de esteroides y la fracción libre presente en la sangre [1].

Los niveles de SHBG se elevan mucho en el embarazo y numerosos investigadores han utilizado la

sangre obtenida durante el parto como una fuente rica en proteína.

En las últimas décadas la obtención de la proteína hasta su homogeneidad se ha logrado en varios laboratorios [2, 3] utilizando diferentes métodos de purificación [4] y se ha llegado a conocer su secuencia amino-ácida [5], así como los detalles de su estructura. [6, 7]

En estos trabajos la pureza de la proteína ha sido buena pero debido al bajo rendimiento es necesario realizar múltiples procesos de purificación que agotan la columna de afinidad acoplada al ligando, por lo que

1. Rosner W. The function of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocrinol Rev* 1990; 11: 80-91.

2. Petra PH, Namkung PC, Seneor DF, McCrae DA, Rousslang KW, Teller DC, Ross JBA. Molecular characterization of the sex steroid binding protein (SBP) of plasma. Reexamination of rabbit SBP and comparison with the human, macaque and baboon proteins. *J. Steroid Biochem* 1986; 25: 191-200.

se presenta el contaminante principal que es la albúmina en concentraciones del rango de 100 µg/mL pero que interfiere para su utilización como antígeno puro para obtener anticuerpos específicos.

La importancia de esta proteína en el análisis de los aspectos relacionados con la disfunción de las hormonas esteroideas y en patologías tales como la obesidad y la diabetes mellitus [8] hacen que sea necesario contar con la proteína en su forma pura para ser utilizada como antígeno, estándar y trazador en el desarrollo de un método analítico para su determinación. En este trabajo nos hemos propuesto la purificación de la proteína a partir de sangre retroplacentaria obtenida durante el parto optimizando el método de purificación mediante la incorporación de un procedimiento inmunocromatográfico, para eliminar específicamente las trazas de ASH que quedan después de la cromatografía de afinidad en columnas con ligandos acoplados, las que en las mejores condiciones no son capaces de eliminar totalmente los contaminantes de ASH.

Materiales y métodos

I. Obtención del extracto crudo de SHBG

El suero rico en SHBG se obtuvo a partir de la sangre retroplacentaria obtenida durante el parto fisiológico.

Luego de separado el suero, los esteroides endógenos unidos a la proteína se extrajeron con carbón activado (1 mg de carbón / mL de suero). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 4 °C con rotación continua, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 40 minutos. Se midió el volumen de sobrenadante y se realizaron dos precipitaciones con NH₄SO₄ al 30 y 70% de saturación, incubando 1h y toda la noche respectivamente a 4 °C, con agitación constante. En cada caso se centrifugó a 5000 rpm durante 50 min. El precipitado se resuspendió en 10 volúmenes de Tris-0.02 mol/L, glicerol 10%, pH-7.4 (TG) y se dializó primero contra agua y después contra TG.

II. Proceso de purificación de la SHBG

II. 1. Preparación de la columna de afinidad AH sepharosa acoplada con DHT hemisuccinato

Para la preparación de la columna se utilizó AH sepharosa (Pharmacia) por medio de la carbodimida utilizando el procedimiento recomendado por los fabricantes.

La sepharosa activada se empacó en una columna de 6 x 10 cm y se equilibró con una solución tampón Tris 0.02 mol/L, N, N dimetilformamida 10% y KCL 1 mol/L (TDK), se aplicaron 250 mL del dializado previamente obtenido y se incubó durante 18 horas a 4 °C.

Luego de la incubación, el gel se lavó ampliamente con el tampón TDK hasta que la D.O_{280nm} del tampón eluido fue menor de 0.01. Se aplicaron entonces 150mL de TDK más DHT 6.3 mM y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Antes de eluir se mantuvo la columna 2 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se aplicó un flujo de 30 mL/h y se colectaron fracciones de 10 mL. Las fracciones donde eluyó la SHBG se unieron y se determinó su concentración. La pureza de la preparación a partir de este paso se siguió por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% realizada en condicio-

nes desnaturalizantes según la técnica descrita por Laemmli et al. 1970 [11]. Se utilizaron marcadores de peso molecular en un rango de 66 a 14 KDa. Esta columna se reutilizó en 3 procesos de purificación.

II. 4. Cromatografía de gel filtración en Sephadex G-200

El eluato de afinidad con actividad SHBG (20 mg) se aplicó en una columna de 1m x 2.5cm, previamente equilibrada con solución tampón Tris-HCl 0.02 mol/L, NaCl 0.15 mol/L, glicerol 10%, pH-7.4; calibrada con una mezcla de proteínas en un rango de peso molecular de 66-14 KDa.

II. 5. Cromatografía de afinidad, sepharosa 4B acoplada con anticuerpos anti-ASH

La sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno se hidrató con agua y HCl 0.1 mol/L. El anticuerpo anti-ASH purificado por el método establecido en nuestro laboratorio [12], se acopló al gel por agitación constante (rotación) durante toda la noche a 4 °C, se decantó el sobrenadante y al gel se le adicionó igual volumen de una solución glicina 0.2 mol/L pH-8, se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, y se lavó varias veces con tampón acetato 0.1 mol/L pH-4 y 0.1 mol/L de carbonato de sodio pH-8.3. La matriz acoplada al ligando fue empacada en una columna de 10 x 10 cm y conservada a 4 °C hasta el momento de su uso.

EL eluato producto de G-200 fue concentrado 20 veces hasta 10 mL (10 mg) y se dializó contra tampón Tris 0.05 mol/L, NaCl 0.5 mol/L y se aplicó a la sepharosa activada con anti-ASH, a un flujo de 5 mL/h. La fracción no unida se eluyó con el tampón de equilibrio hasta una densidad óptica cercana a cero y la fracción unida a la columna fue despegada con tampón glicina 0.1 mol/L pH-2.5. Ambos eluatos fueron concentrados y se les realizaron los ensayos de control del proceso.

Al finalizar el proceso de purificación se determinó el rendimiento y la actividad de la proteína obtenida.

Métodos analíticos

La concentración de proteínas de la muestra se determinó por el método de Lowry [9]. La actividad específica SHBG se midió por su capacidad de unión a dihidrotestosterona (DHT³), en presencia o ausencia de DHT no marcada aplicando el procedimiento de Scatchard [10].

La concentración de ASH se determinó por Elisa [11] con un método desarrollado en este laboratorio que tiene una especificidad de 100% para la ASH y un límite de detección de 0.1 µg/mL.

Resultados

El precipitado obtenido a partir de 1000 mL del suero fraccionado con sulfato de amonio entre un 30% y un 70% fue resuspendido en 450 mL de tampón TG y se obtuvieron 600 mg de proteína y una capacidad de unión a la DHT tritizada de un 60%. Este volumen se aplicó en dos partes iguales a la columna de afinidad acoplada a DHT, con una capacidad de unión para la SHBG del 80%.

La figura 1A ilustra el perfil de elusión de la muestra, al remover todas las proteínas unidas inespecíficamente al gel, después de un lavado extenso con tampón TDK,

3. Deás M, Arranz C, González RM. Aislamiento y purificación de la proteína transportadora de esteroides sexuales y su utilización en la obtención de anticuerpos. *Rev Cubana Endocrinol* 1997;7:92-96.

4. Petra PH. The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function. *J Steroid Biochem Mol* 1991; 40: 735-753.

5. Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex steroid binding proteins. *Endocrinol Rev* 1990; 11: 65-79.

6. Bocchinfuso WP, Hammond GL. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap steroids and Ca²⁺-stabilize dimer formation. *Biochemistry* 1994; 33:622-629.

7. Grenot C, De Montard A, Blachère T, Rolland de Ranel M, Mappus E, Cuilleron CY. Characterization of Met¹³⁹ at the photo labeled amino acid residue in the steroid-binding site of sex hormone binding globulin using D³ derivatives of either testosterone or estradiol as unsubstituted photo affinity labeling reagents. *Biochemistry* 1992; 31: 7609-7621.

8. Pasquali R, Casimirri F, de lasio R, Mesini P, Boschi S, Chiierici R, Flaminia R, Biscotti M, Vicennati V. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight obese men. *J. Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 654-658.

9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

10. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N.Y. Acad. Sci* 1949; 51:660-672.

11. García G, Arranz MC, González RM. Validación de un Micro Elisa para la cuantificación de Albúmina Humana en orina. *Rev Cub End* 1990; 1:32-39.

12. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227: 680-685.

hasta obtener densidades ópticas igual a cero. La SHBG unida a la columna se eluyó con TDK más 6.3 mm/L de DHT. En las fracciones 15-62 la DO del eluato es muy pequeña por lo que se presenta en otra escala, sin embargo presentaron una actividad de unión a DHT tritiada del 48%, estas fracciones se unieron y se concentraron hasta un volumen final de 10 mL con una concentración total de proteínas de 20 mg para su posterior aplicación a la columna de Sephadex G-200.

El análisis de este material por electroforesis (PAGE-SDS) [12], reveló la presencia de un contaminante principal en la región de peso molecular (PM) de 66 Ka y en menor proporción otras proteínas por debajo de la banda que corresponde a la SHBG. El estudio analítico de esta fracción por un método inmunoenzimático específico para la albúmina sérica humana [11] (ELISA de ASH), mostró una concentración de 200 mg/mL para esta proteína, lo que corrobora su presencia como principal contaminante en el resultado electroforético. Como se muestra en la Fig. 2A, carril 3.

En la figura 1B se observan los resultados del fraccionamiento en Sephadex G-200 encontrando dos picos de proteínas. Se encontró la mayor actividad de SHBG en el segundo pico de proteína eluída, sin embargo, se encontró también una menor actividad en el primer pico.

La figura 2B muestra el patrón electroforético de la SHBG purificada en Sephadex G-200 donde se observa que después de este paso de purificación persiste el contaminante de 66 K correspondiente a la albúmina humana, cuya concentración por ELISA fue de 100 µg/mL.

De acuerdo a los resultados previamente discutidos se determinó utilizar una columna de afinidad específica para eliminar el contaminante de albúmina sérica.

La sepharosa acoplada al anticuerpo se calibró previamente con albúmina humana y su capacidad de unión fue de 1.8 mg de ASH/mL de gel. En la figura 3 se muestra el perfil de elusión obtenido luego de aplicada la muestra (10 mL). La SHBG libre de ASH se localiza en las fracciones 1-7 correspondiente a lo que no se

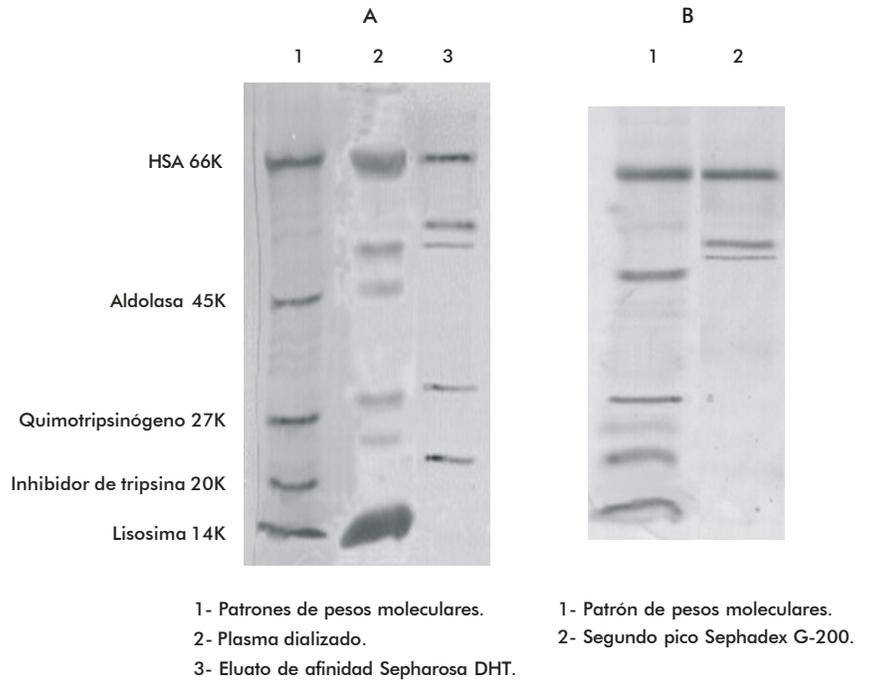
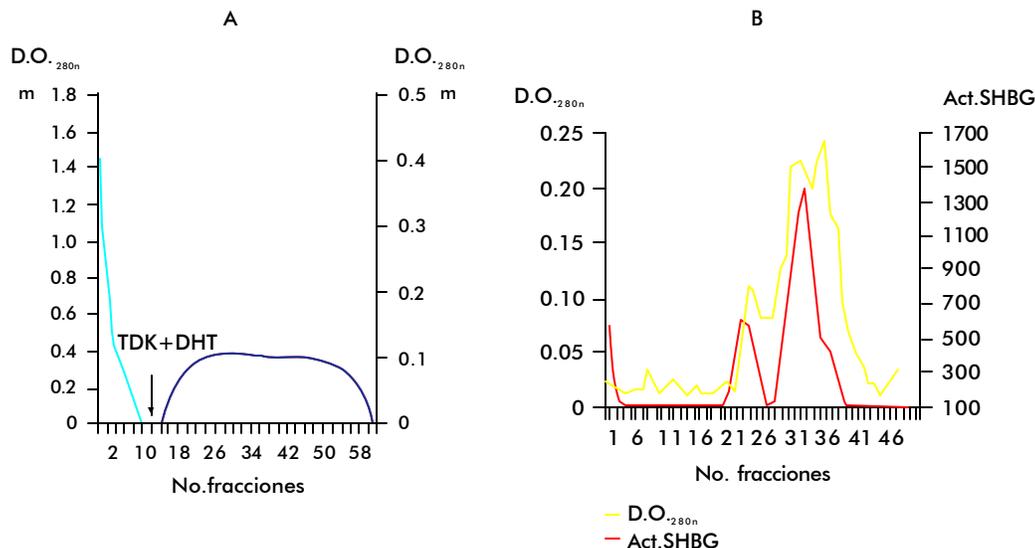


Figura 2. A se muestra el patrón electroforético del producto de afinidad Sepharosa- DHT. En la figura 2B se muestra el patrón electroforético en PAGE-SDS de la SHBG purificada en Sephadex G-200.

pegó a la matriz y las fracciones 15-23 representa la ASH que se eluyó con el tampón glicina 0.1 mol/L cuya determinación analítica por Elisa fue de 16 mg/mL. El análisis de las fracciones correspondientes a la SHBG, mostró una actividad de unión a DHT tritiada de un 50%. La determinación de la concentración de albúmina estaba por debajo del rango detectable (<1mg/mL).

El análisis del producto final de la purificación se realizó por un sistema electroforético de mayor resolución (PAGE-Fast-System), para delimitar las dos bandas que corresponden a la SHBG. Como vemos en



En la fig. 1A se muestra el perfil de elusión de la columna de cromatografía de afinidad (Sepharosa-DHT). En la fig. 1B se muestra el perfil de elusión del fraccionamiento de la SHBG cruda en Sephadex G-200.

la figura 4 (carril 3), aparecen dos bandas entre 53 y 45KDa que se corresponden con los pesos moleculares (52KDa y 48KDa) de las dos bandas de SHBG descritas en la literatura [13]. El análisis de la muestra que fue eluída de la matriz anti-ASH con la glicina, mostró una banda en la zona de 67 KDa, que se observa en el carril 2 de la electroforesis y corrobora lo encontrado en la determinación analítica de la muestra.

La cantidad total de SHBG obtenida fue de 5 mg y el por ciento de rendimiento evaluado por la capacidad de unión a DHT, por mg de proteína, fue del 25.8% con respecto a la actividad inicial. No se detectó ASH con el método analítico empleado.

En la Tabla 1 se muestra el rendimiento por etapas y la actividad específica de todo el proceso de purificación. La cantidad de SHBG obtenida, con un rendimiento final de 25.8% se determinó por la actividad SHBG y no por la concentración de proteínas totales teniendo en cuenta que esta proteína es un componente minoritario en las proteínas del suero.

Discusión

En el proceso de purificación de la SHBG, la cromatografía de afinidad en columna de fase sólida acoplada a DHT es el paso fundamental [3] (Petra et al. 1975) ya que por este método solamente se unen a esta fase aquellas moléculas que reconocen al ligando. En nuestro trabajo, con este paso, se eliminaron la mayor parte de los contaminantes aún a costa de la pérdida de un 50% de la SHBG original. Se mantuvo un contaminante de albúmina sérica humana. Esto se explica por las altas concentraciones de esta proteína en plasma (60 g/L), 150 veces mayor que la concentración de SHBG encontrada en el plasma de embarazada (400 mg/L). A su vez, la albúmina humana es capaz de unir esteroides aunque con menor afinidad, lo que explica su competencia, debido a su alta concentración, con la SHBG en su unión al esteroide [14].

La cromatografía en Sephadex G-200 no fue útil para eliminar completamente el contaminante principal pero sí para las proteínas de bajo peso molecular. Esto podría explicarse por la cercanía de los pesos moleculares de la ASH (67 KDa) y la cadena mayor de la SHBG (53 KDa) [15].

La introducción de una columna de sepharosa acoplada a anticuerpos anti-ASH (específica para el contaminante) resultó satisfactoria para la obtención de una proteína homogénea y con una adecuada actividad biológica así como un buen rendimiento. Este procedimiento resulta novedoso en el proceder de la obtención de esta proteína ya que se utiliza una técnica inmunoespecífica que permite que la SHBG se obtenga sin la aplicación de un método cruento que pueda dañar la estructura de la proteína en cuestión, utilizando una tecnología previamente estandarizada en nuestro laboratorio [16]. En contraste, otros métodos han sido empleados como pasos finales en el proceso de purificación: electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida; electroenfoque preparativo [17], y phenyl sepharosa entre otros [18] pero en estos primeros trabajos el rendimiento de la proteína fue bajo, en el orden del 5%, según los propios autores debido a la inestabilidad de la proteína en el proceso de purificación. Estudios posteriores de estos mismos investigadores [2, 3], comprobaron que los

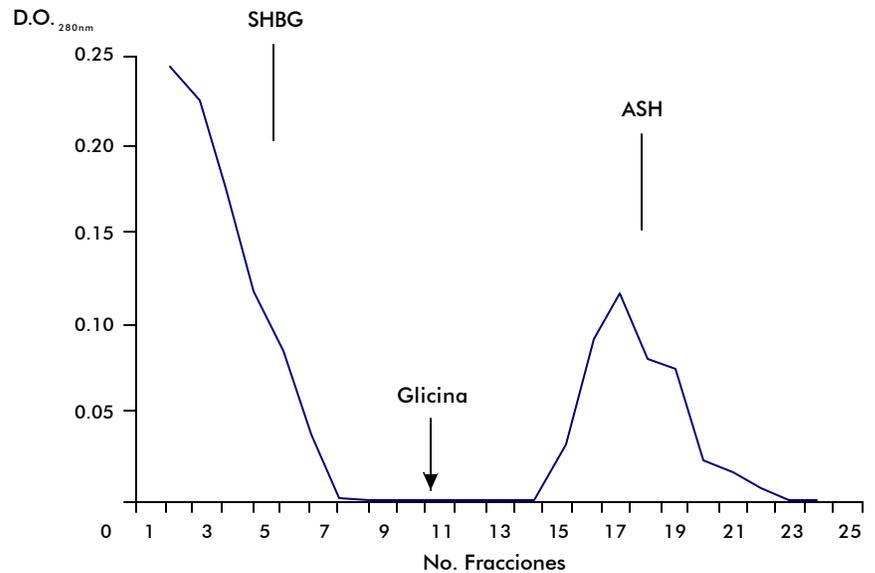


Figura.3. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad sepharosa 4B-Anti ASH.

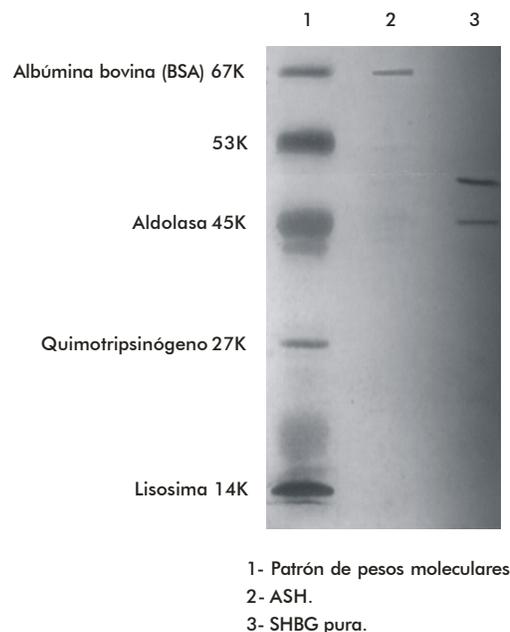


Figura 4. Patrón electroforético en Fast-System de la SHBG purificada.

agentes estabilizantes de la proteína son el glicerol y la DHT, los cuales fueron utilizados por nosotros en todo el proceso. La incorporación de un paso cromatográfico adicional afecta el rendimiento del proceso de purificación, pero en nuestro caso esto no se tuvo en cuenta debido a que nuestra prioridad era la obtención de una preparación de alta pureza y el material de partida es abundante.

Contar en nuestro laboratorio con la proteína pura, nos permite desarrollar la metodología diagnóstica necesaria para abordar el estudio de los procesos fisiológicos y patológicos en el campo de la reproducción humana como la menopausia y el ovario

13- Casali E, Petra PH, Ross JBA. Fluorescence investigation of the sex steroid binding protein of rabbit serum: Steroid binding and subunit dissociation. *Biochemistry* 1990; 29:9334-9343.

14. Joseph DR. Structure, function and regulation of androgen-binding protein/sex hormone binding. *Vitamin Horm* 1994; 49:197-280.

15. Rosner W, Toppel S, Smith RN. Testosterone estradiol-binding globulin of human plasma: denaturation and protection. *Biochem Biophys Acta* 1974; 351: 92-98

Tabla I. Análisis del rendimiento por etapas del proceso de purificación.

	A	B			
	mg de proteínas totales	nm de DHT unidos	% de recuperación por etapas	Actividad específica B/A	Rendimiento total (%)
Precipitado con SO ₄ NH ₄	600	40980	100	44.9	100
Cromatografía de afinidad	20	18640	45.4	932	45.4
Sephadex G-200	10	12800	68.6	1280	31.2
Afinidad	5	10583	82.6	2116	25.8
Con anti-ASH					

poliúístico [19, 21], así como en los trastornos ligados al metabolismo como son la obesidad troncular y la diabetes mellitus tipo II [22, 23], como también en el embarazo y la diabetes mellitus [24, 25]. Todo esto nos permite abordar investigaciones en un campo de mucha actualidad en cuyas entidades la SHBG tiene un valor de seguimiento en estas enfermedades.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del Dr. Fernando Larrea Gallo, director del Departamento de Biología de la

Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, en México DF y secretario ejecutivo del Programa Latinoamericano de capacitación e investigación en reproducción humana (PLACIRH), tanto por su apoyo en las ideas como en la aprobación del financiamiento del protocolo de investigación relacionado con este tema. Agradecemos además, la colaboración de la Lic. Patricia Llárez Fernández quien en los momentos de la realización del trabajo participó activamente como parte de su tesis de grado de la Facultad de Biología.

16. Arranz MC, González RM, Deás M. Radioinmunoensayo de Albúmina Humana en orina. *Rev Cub Invest Biom.* 1986; 5: 397-402

17. Mickelson KE, Petra PH. Purification of the sex hormone steroid binding protein from human serum. *Biochemistry* 1975; 14: 957-63.

18. Ferlund P, Laurell CB. A simple two-step procedure for the simultaneous isolation of corticosteroid binding globulin and sex hormone binding globulin from human serum by chromatography on cortisol-sepharose and phenyl-sepharose. *J Steroid Biochem* 1981; 14: 545-52.

19. Insler V, Shoham Z, Barash A, Koistinen R, Seppala M, Hen M, Lunenfeld B, Zadick Z. Polycystic ovaries in non obese and obese patients, possible pathophysiological mechanism based on new interpretation of facts and findings. *Human Reprod* 1993; 8: 379-84.

20. Cibula D, Skrha J, Hill M, Fanta M, Haakova L, Vrbilkova J, Zivny J Prediction of insulin sensitivity in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Dec; 87(12): 5821-5.

21. Ducluzeau PH, Cousin P, Malvoisin E, Bornet H, Vidal H, Laville M, Pugeat M. Glucose-to-insulin ratio rather than sex hormone-binding globulin and adiponectin levels is the best predictor of insulin resistance in nonobese women with poly-cystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(8):3626-31.

22. Haffner SM. Sex Hormone-binding protein, hyperinsulinemia, insulin resistance and no insulin-dependent diabetes. *Horm Res* ,1996; 45:233-7.

23. Abate N, Haffner SM, Garg A, Peshock RM, Grundy SM. Sex steroid hormones, upper body obesity, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Oct; 87(10): 4522-7.

24. Queipo G, Deás M, Arranz C, Cariño C, González R, Larrea F. Sex Hormone-binding globulin stimulates chorionic gonadotrophin secretion from human cytotrophoblasts in culture. *Human Reproduction*, 1998;13: 1368-73.

25. Thadhani R, Wolf M, Hsu-Blatman K, Sandler L, Nathan D, Ecker JL. First-trimester sex hormone binding globulin and subsequent gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Jul; 189(1): 171-6.

Aprobado en enero de 2004.