Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de Salud

Maestría en Biología Experimental

Estudio de la Interacción de los cationes Na^+ y K^+ con el acarreador antiparalelo proteico electroneutro de membrana mitocondiral.

Tesis que presenta el
Biol. Exp. Juan Antonio Lugo Ríos
para obtener el grado de:

Maestro en Biología Experimental

México D.F
1995

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todos los que participaron en la en este trabajo.

A mi madre por todo el amor, apoyo y "aguante" durante los últimos 31 años.

A mi hermano donde quiera que este.

A Lorena, los motivos están de más.

Al Dr. Arturo Rojo Domínguez, que siempre ha estado apoyando este trabajo.

Esta tesis fue realizada en los laboratorios de Biofisicoquímica del depto. de Química, D.C.B.I. y Bioquímica y Biofísica, del Depto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S.

Dr. Arturo Rojo Domínguez.	**Tutor**
Dr. Edmundo Chávez Cossio.	**Asesor**
M. en B.E. Raúl Alva García.	**Asesor**

Agradecimientos

Deseo agradecer fervorosamnte a todos aquellos que apoyaron la realización esta tesis (todos los profesores de los cursos de Maestría, el area de Biofisicoquímica, M. en B.E. Raúl Alva, B.E. Miguel Velázquez, Dr. Salvador Tello, M en Q. Miguel Angel, Dra. Concepción Gutiérrez, M. en B.E. Lorena Ruiz y Lic. Jose Atenco). Sin su cooperación, no se hubiera desarrollado el trabajo u obtenido resultados algunos:

Sin embargo, debo remarcar con un poco más efusión la participación de Dr. Arturo Rojo, M. en B.E. Joaquín Herrera, Dr. Edmundo Chávez y el sr. Jorge Ramírez Salcedo, cuya providencial ayuda facilitó el de desarrollo de este trabajo.

Para todos ellos y por todo el apoyo:

Muchas gracias

La maestría en Biología Experimental esta inscrita en el padron de posgrados de Excelencia. Este trabajo fue apoyado por CONACyT mediante el convenio PFPN/66/92. Además de contar con el apyo de la beca N° 8190.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 5
- Bicapas lipídicas. 6
- Detergentes. 7
- Transporte membranal. 8

INTERACCIONES ENTRE LAS MOLÉCULAS 9
- *Fuerzas de van der Waals.* 10
- *Puentes de hidrógeno.* 10
- *Enlace iónico.* 10
- *Fuerzas hidrofóbicas.* 10

ANTECEDENTES 10

AAPEN. 10
- Estructura del AAPEN. 15
- Predicción de la estructura de las proteínas de membrana. 16
- Estructuras. 16
- Mecanisimos de transporte transmembranal. 16

CROMATOGRAFÍA. 17
- Cromatografía de exclusión. 18
  - *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).* 18
- Dicroísmo circular. 20
- Predicción de la estructura 21

OBJETIVOS 22
- Objetivo general 22
- Objetivos particulares 22

METODOLOGÍA 23

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN. 23
- Obtención de mitocondrias de hígado de rata. 23
- Solubilización de proteínas membranales. 23
- Purificación del extracto de proteínas membranales. 24
- Determinación de la proteína total en las diferentes muestras. 24
- Determinación de la masa molecular de la fracción obtenida. 25

ACTIVIDAD E INTERACCIONES. 25
- Determinación de la actividad de antiport Na^+/H^+ 25
- Sistema de proteoliposomas para determinar la actividad de antiport Na^+/H^+. 25
- Digestión con enzimas proteolíticas de la fracción con actividad de antiport. 26
- Determinación de las energías de unión. 26
- Medición de las señales de dicroísmo circular. 26
- Predicción de la topología de las regiones transmembranales. 27
- Estructura secundaria 28

RESULTADOS 30
- Aislamiento y purificación. 30
  - *Aislamiento.* 30
  - *Filtración.* 30
- Determinación de la cantidad de proteína en las diferentes muestras. 31
- Actividad y afinidad 32
  - *Afinidad.* 33
- Digestión proteolítica 34
- Dicroísmo circular 34
- Predicción de la estructura secundaria. 35

DISCUSIÓN 44
- Purificación. 44
  - *Determinación de la masa molecular.* 44
- Actividad de transporte 45
- Dicroísmo circular. 46
- Digestión enzimática 46
- Predicción de la estructura. 47

BIBLIOGRAFÍA 51

Capítulo uno

Introducción.

Un monje curioso formuló a su maestro esta pregunta, -"¿Cuál es el camino?". -"Está frente ante tus ojos", dijo el maestro. -"¿Por qué no consigo verlo". -"Porque estás pensando en ti mismo". -"¿Y tú consigues verlo?". -"En la medida en que tu visión es doble, diciendo 'yo no', 'tu si', tus ojos se nublan", dijo el maestro.

Koan Budista

Bicapas lipídicas. 6
Detergentes. 7
Transporte membranal. 8
INTERACCIONES ENTRE LAS MOLÉCULAS **9**
ANTECEDENTES **10**
AAPEN. **10**
Estructura del AAPEN 15
Predicción de la estructura de las proteínas de membrana 16
Estructuras. 16
Mecanisimos de transporte transmembranal. 16
CROMATOGRAFÍA. **17**
Cromatografía de exclusión. 18
Cromatografía liquida de alta resolución (HPLC). *18*
Dicroísmo circular 20
Predicción de la estructura 21
OBJETIVOS **21**
Objetivo general 21
Objetivos particulares 21

En 1961, Peter Mitchel propuso el modelo más aceptado hoy en día, para explicar la relación entre la cadena de electrones, el ciclo de Krebs y la producción de ATP, llamada Hipótesis Quimiosmótica con los siguientes postulados fundamentales (Alberts y cols., 1994b):

a) No existe intermediario de alta energía para conectar la oxidación de los diferentes metabolitos y la síntesis de ATP.

b) Las membranas biológicas forman una barrera impermeable a cualquier especie química cargada.

c) La oxidación de los metabolitos genera dos gradientes, uno químico y otro eléctrico, conocidos como *Potencial Electroquímico* o *Potencial de Membrana*.

d) La separación de los componentes químico y eléctrico del potencial de membrana puede llevar protones al interior de los compartimentos cruzando la membrana.

Un punto muy importante de esta teoría es la predicción de la existencia de los acarreadores específicos para metabolitos con carga, que facilitan el paso de iones a través de las diferentes membranas. Para esta transferencia de masas entre ambos compartimientos Mitchell (1961) propuso:

1. La transferencia vectorial de protones a través de una membrana lipídica se cataliza, primero, por la cadena oxidativa con distribución asimétrica de los componentes de la cadena respiratoria según la cara de la membrana, con respecto a los compartimientos aislados por la membrana y, segundo, por la ATPasa reversible, ambas en sincronía.
2. El transporte de cationes metálicos a través de la membrana se facilita por un acarreador que intercambia un protón por cada carga del catión, sin alterar el potencial eléctrico de la membrana, es decir que existe un Acarreador AntiParalelo ElectroNeutro (AAPEN o *antiporter* silencioso), que puede intercambiar metales alcalinos por H^+, p.e., el intercambiador de Na^+/H^+, aunque también existen otros cationes que puede transportar como el Li^+, Mg^{2+} y el K^+.

Estos postulados sugieren que el transporte de protones a través de una membrana biológica tiene una estequiometría 1:1 con respecto al transporte de cationes metálicos; y que la dirección del flujo se determina por el componente eléctrico del potencial membranal. Este potencial depende de la orientación geométrica de los diferentes acarreadores de protones inmersos en la membrana, que forman la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (Figura 1) (Estrada-O., 1975).

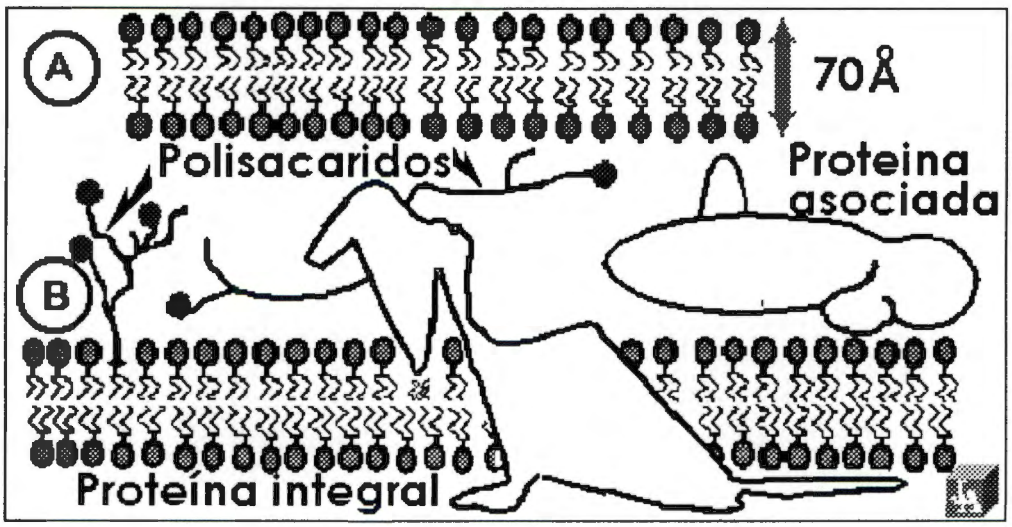


Figura 1. (A) Estructura de una bicapa lipídica que se forma espontaneamente al mezlcar moleculas apolares como los ácidos grasos en un medio polar y (B) estructura de una membrana biológica presente en cualquier célula u orgánulo. Es notoria la presencia de proteínas dentro de la matriz lipídica de las membranas biológicas.

Bicapas lipídicas.

Las bicapas lipídicas son la piedra angular de la organización molecular de los seres vivos. Su autoensamble bidimensional es esencial para la formación y conformación de las diferentes estructuras biológicas a nivel molecular. La observación de la asociación espontanea de algunos compuestos anfipáticos (p.e. ácidos grasos) en una estructura formada por una doble capa lipídica, sugiere que el fenómeno es en general un evento fisicoquímico que no está restringido a las biomoléculas orgánicas anfipáticas. Estas estructuras se pueden formar con una gran variedad de compuestos, ya sean sintéticos o naturales, con una o varias cadenas hidrocarbonadas más largas (Kunitake, 1992).

Las biomembranas son una de las unidades estructurales más importantes en la organización de las moléculas en las células. En 1964, Bangham y Horne demostraron que las estructuras de una bicapa lipídica se forman espontáneamente al dispersar en una fase acuosa de compuestos no-polares del tipo de los lípidos, estableciendo así la estructura principal de las biomembranas con estas bicapas, y de la organización biológica y molecular de cualquier ser vivo a nivel celular; esos descubrimientos condujeron a la investigación de las biomembranas y sistemas miméticos (Kunitake, 1992).

Los intentos para formar bicapas lipídicas, empiezan con diferentes compuestos anfipáticos que provienen de lípidos naturales. Hacia 1973, Gebicki y Hicks observaron la formación de agregados globulares (Ufasomas), cuando dispersaban finas películas de ácidos oléico y linoléico en agua. En 1978 Hargreaves y Deamer obtuvieron vesículas a partir de la codispersión de ácidos grasos y alcoholes pesados. Estos agregados vesiculares no eran lo suficientemente estables para proveer la evidencia definitiva de la estructura de la bicapa lipídica aislada. A partir 1976 se inicia el desarrollo de nuevos compuestos formadores de bicapas lipídicas. Se asumía que la cabeza polar de muchos de los compuestos anfipáticos se debía a los requerimientos biosintéticos y fisiológicos,

más que a la fisicoquímica de la asociación de moléculas que forman a la membrana. En la actualidad, se pueden formar diferentes sistemas de membranas artificiales, que van desde las membranas lipídicas negras hasta las vesículas y micelas; su uso depende de las necesidades de los experimentos (Kunitake, 1992).

Detergentes.

El uso de detergentes en las investigaciones bioquímicas van desde los procedimientos de simple rutina hasta las aplicaciones más especializadas, como el uso del dodecil sulfato de sodio en la electroforesis en geles de poliacrilamida o la reconstitución de proteínas membranales en medios acuosos o polares. El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los detergentes o tensoactivos puede simplificar la elección del compuesto apropiado para cada tarea propuesta.

Los detergentes son usados en diferentes tipos de electroforesis, la preparación de liposomas, la bioseparación y la cristalización de proteínas. A los detergentes también se les conoce como tensoactivos, jabones (regularmente se restringe esta denominación a las sales de ácidos grasos con metales alcalinos), o surfactantes (un anglicismo, ampliamente utilizado). Estas moléculas son anfipáticas y muestran una doble actividad de interfase en solución acuosa; esta misma actividad de superficie es la que obliga a las moléculas a migrar y formar una interfase, lo que reduce comparativamente la tensión superficial de la "mezcla" previa, simulando las condiciones de la solución acuosa. Cada una de las moléculas de cualquier tensoactivo tiene una porción hidrofóbica que es soluble en substancias orgánicas, y otra porción que entra en solución acuosa o en solventes polares. El arreglo en solución refleja la tendencia a tomar la forma energéticamente más favorecida por los sistemas de bicapas (las colas hidrofóbicas hacia la parte no-polar y los grupos hidrofílicos en la matriz acuosa).

Los detergentes muestran también una fuerte tendencia hacia la autoagregación en solución, p.e., a muy bajas concentraciones, los tensoactivos existen como monómeros, sin embargo, existe un límite a partir del cual se pueden agregar en estructuras esféricas llamadas *micelas* conocido como *concentración micelar crítica*, en donde las porciones hidrofóbicas del agregado quedan ocultas del solvente polar. Esto también es provocado por la naturaleza dual de las moléculas de detergente (Figura 2). El número de moléculas anfipáticas que se agregan para formar la micela se le conoce como *número de agregación*. Es posible formar estructuras similares a las micelas en solventes orgánicos no-polares, llamadas *micelas invertidas* (Figura 2), cuya característica principal es la presencia de las regiones hidrofóbicas hacia el solvente, mientras se protegen las cabezas hidrofílicas en el interior de la estructura esférica (Nuegebeuer, 1988).

La clasificación más común de los detergentes se basa en la carga o la naturaleza de la cabeza polar o hidrofílica, y en la flexibillidad o naturaleza química de la cola hidrofóbica. Las cabezas pueden ser *aniónicas, zwitteriónicas, no iónicas* y *catiónicas*. Las cabezas aniónicas son grupos polares cargados negativamente como, carboxilatos, sulfatos o sulfonatos y se comercializan en forma de sales de metales alcalinos. La mayoría de las zwitteriónicas son neutras; sin embargo, en algunos casos pueden presentar una fuerte polarización, según las condiciones de la solución acuosa. Las cabezas no-iónicas carecen de una carga apreciable, sus propiedades hidrofílicas se deben a grupos hidroxilo, i. e., polioxietilenos o sacáridos. Los detergentes con cabeza catiónica usualmente poseen un compuesto cuaternario de amonio, la mayoría se encuentra disponible en formas hialinas, principalmente en sales de Na^+ y K^+.

Una gran variedad de detergentes se usa en el aislamiento y el estudio de las proteínas integrales de membrana y substancias de características muy similares (p.e. de una naturaleza hidrofóbica o anfipática).

Aunque, las interacciones entre las membranas y los detergentes no han sido completamente dilucidadas, se proponen cuatro etapas básicas para aislar proteínas integrales de membrana y sus similares:
El detergente se une a la membrana y se incluye en la matriz hidrofóbica.

- La membrana se disuelve al dispersarse los fosfolípidos que le constituyen.
- Los fosfolípidos de la membrana ayudan a formar un complejo detergente-lípido-proteína.
- Los complejos detergente-lípido-proteína se solubilizan dando lugar a los complejos proteína-detergente y detergente-lípido, generando una suspensión.

Los detergentes se usan también en la reconstitución de las proteínas integrales de membrana en los sistemas de proteoliposomas (Neugebauer, 1988).

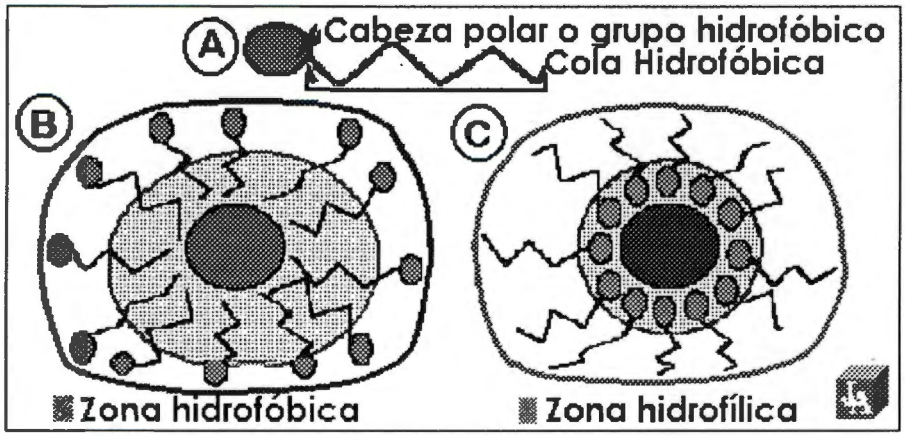


Figura 2. Estructura general de los tensoactivos (A), de una micela normal que se forma al depositar tensoactivos en un medio polar (B) y de una micela invertida, esta se forma cuando se ponene en contacto los tensoactivos con un medio apolar (C). (Modificado de Nuegebeuer, 1988)

Transporte membranal.

El transporte de membrana es la forma por la cual se mueven substancias a través de la barrera hidrofóbica que separa los compartimientos celulares y su entorno. Las membranas celulares son las encargadas de mantener el interior de la célula separado del medio externo, sustrayendo del mismo las substancias que necesitan las células, regresando al entorno los productos del metabolismo, secretando señales hacia las otras células, y recibiendo los correspondientes mensajes de las mismas, todo esto por medio de la interacción con estructuras especializadas de la membrana o receptores. Así, las proteínas de la membrana celular ayudan a conservar la matriz intracelular, de tal forma que todos los procesos celulares se pueden realizar en un medio relativamente estable y siempre en condiciones favorables. La estructura fundamental de la membrana es una bicapa fosfolipídica, compuesta principalemente por grandes moléculas lipídicas y anfipáticas, en las que el dominio hidrofóbico se alinea hasta formar una capa hidrofóbica a través de la cual es imposible pasar substancias cargadas o polares (incluyendo las substancias hidrosolubles). En esta bicapa se incluyen proteínas, lipoproteínas, y glucoproteínas, algunas de las cuales cruzan el ancho de la bicapa, usando los dominios hidrofóbicos de su estructura, a través de los cuales se pueden transportar muchas de las substancias cargadas (Alberts y cols., 1994c).

Una posible clasificación del transporte de las especies químicas cargadas es: *a favor* y *en contra* de un gradiente. El primer caso se define como el movimiento neto que se desarrolla siguiendo el flujo para igualar las

concentraciones del gradiente, esto es abatiendo el potencial de membrana. En tanto que el transporte *en contra* se define como la forma de generar o mantener el potencial en sí, por el movimiento de solutos (Alberts y cols., 1994c).

Una segunda clasificación consiste en identificar a los solutos transportados como electrolitos y no-electrolitos. La principal razón es que el transporte de los electrolitos involucra el movimiento de una carga eléctrica, además de la transferencia de la masa. La consideración de la carga indica una diferencia del potencial eléctrico a través de la membrana, que es independiente del gradiente formado por las masas de las substancias que son transferibles (Figura 3), en tanto que las substancias no-electrolíticas no intervienen en el potencial eléctrico, pues no poseen una carga eléctrica neta. Adicionalmente, es conveniente considerar otras dos características del transporte membranal: la primera es que los no-electrolitos pueden alterar de alguna forma los potenciales de membrana, en su parte química. La segunda, muchos de los no-electrolitos se pueden transportar junto a diferentes electrolitos, p.e., la glucosa aunada al Na^+ en simport (Figura 3) (Alberts y cols., 1994c).

Una tercera clasificación general, distingue entre el transporte de una sola especie y el transporte acoplado de dos o más especies, y entre el cotransporte (transporte coordinado de dos o más substancias químicas en el mismo sentido y dirección) y el contratransporte (cuando se transportan las substancias en sentido y dirección opuesta). La mayoría de los canales son sistemas pasivos utilizados para la regulación de los potenciales químicos y eléctricos en las membranas celulares, son de transporte único o uniport, al llevar una sola especie química a través de la membrana. Dentro de esta clasificación se debe cuestionar sobre la fuente de la energía que utiliza el transporte: a partir del gradiente mismo, por la hidrólisis del ATP o cualquier otra especie química con enlaces de alta energía, así como e lmecanismo disparador (Arts, 1984: Alberts y cols., 1994c).

El transporte acoplado requiere del movimiento de al menos dos diferentes moléculas o iones de un lado a otro en la membrana, es decir un cotransporte. Este desplazamiento puede ser en la misma dirección y sentido (*simport*) o en la misma dirección pero en sentidos opuestos (*antiport*) (Figura 3.) El transporte de cargas netas causa un flujo eléctrico llamado reogénico al alterar el componente eléctrico del potencial de membrana, pero algunos de los acarreadores intercambian cargas equivalentes (de diferentes iones) y no generan una corriente neta. El transporte de una carga neta generalmente es sensible a una diferencia de voltaje, propio o inducido entre los compartimientos, mientras que el intercambio electroneutro se considera independiente del voltaje (Artz, 1984).

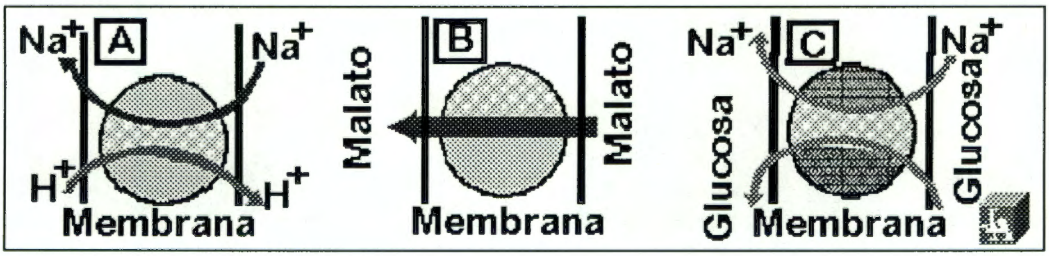


Figura 3. Esquemas de los diferentes mecanismos de transporte de cationes a través de una membrana facilitado por acarreadores antiport (A), uniport (B) y simport (C).

Interacciones entre las moléculas

Las moléculas pueden interactuar de diferentes maneras, dichas interacciones regulan su comportamiento y las posibles asociaciones que se puedan establecer entre las moléculas en solución en diferentes medios, así como en las estructuras de las macromoléculas involucradas en los distintos procesos biológicos. Al identificar estas interacciones se puede facilitar el estudio de las estructuras y las funciones celulares, y la compresión de esas funciones.

Fuerzas de van der Waals.

En distancias muy cortas, dos átomos muestran una débil interacción debida a las fluctuaciones de sus nubes electrónicas. A estas fuerzas se les llama interacciones de van der Waals. Sin embargo, esos dos átomos se repelerían entre sí, en el caso de encontrarse muy cerca el uno del otro. Estas interacciones juegan un papel muy importante limitando las posibles conformaciones de una molécula. Cada tipo de átomo posee un radio de van der Waals; cuando la distancia entre dos de ellos sea igual a la suma de los radios de van der Waals se equilibran la atracción y repulsión entre ellos. Aunque estas interacciones son débiles, son parte importante en las relaciones de dos superficies macromoleculares que entran en contacto, como el caso de las enzimas y sus substratos (Alberts y cols., 1994a).

Puentes de hidrógeno.

Cuando un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo electronegativo (como el O y el N) e interactúa con otro átomo electronegativo, se establece un puente de hidrógeno. Estas uniones son fuertes cuando los tres átomos encuentran en línea recta. Cualquier molécula capaz de formar un puente de hidrógeno entre sí, también lo puede hacer con las moléculas de agua. Cuando entran en medios acuosos, las moléculas de agua pueden competir con los átomos electronegativos por los puentes de hidrógeno que establecen, por ello, estas uniones establecidas entre las moléculas de los solutos se debilitadan en presencia de agua (Alberts y cols., 1994a).

Enlace iónico.

Las interacciones iónicas pueden ocurrir entre dos grupos fuertemente cargados o entre grupos cargados parcialmente. La fuerza de la atracción entre dos cargas δ^+ y δ^- es:

$$\textbf{fuerza} = (\delta^+ \ \delta^-) \ / \ (r^2 \in) \qquad \textbf{Ley de Coulomb.}$$

donde $\in$ es la constante dieléctrica (1 para el vacio, 80 para el agua) y r la distancia entre las cargas eléctricas. En ausencia de agua las fuerzas iónicas son muy poderosas, son las que proporcionan la resistencia de los minerales como el ágata y el mármol. En el medio acuoso, los grupos cargados son solvatados y enmascarados por las moléculas de agua, por lo tanto las uniones iónicas son débiles en solución acuosa. Las uniones iónicas se pueden debilitar más si se agrega algún compuesto cargado (otra sal en la solución), que formen capas alrededor de los iones de la carga opuesta en la solución. Una estimación cuantitativa de la pérdida de la estabilidad de una proteína en solución por sales agregadas al medio, nos puede proporcionar una estimación del número total de los enlaces iónicos involucrados. A pesar de ser debilitados en solución acuosa, los enlaces iónicos son de gran importancia en sistemas biológicos, una enzima puede unirse a un substrato cargado a través de grupos químicos cercanos al sitio activo que presenten carga eléctrica de signo opuesto (Alberts y cols., 1994a).

Fuerzas hidrofóbicas.

El agua es un medio polar, en una solución acuosa todas las moléculas de agua presenta un dipolo, en este medio las moléculas apolares son cubiertas por las moléculas de agua, para mantener el arreglo que requiera menos energía, los grupos hidrofílicos tienden a apartarse permitiendo la interacción de los grupos hidrofóbicos, tomando un arreglo en grupo, cuando este fenómeno ocurre se dice que existe efecto hidrofóbico manteniendo juntos a los grupos no-polares (Alberts y cols., 1994a).

Antecedentes.

AAPEN.

Los primeros estudios sobre AAPEN fueron realizados en los años 70 por Garlid (Martin y cols., 1984). En mitocondrias se conocen dos AAPEN Na^+/H^+: uno Na^+-específico, y otro que transporta tanto Na^+ como K^+ (Jèzek y cols., 1989; Kakar y cols., 1989). La función fisiológica asociada a estos acarreadores es mantener el volumen y pH en condiciones fisiológicas, aunque sus propiedades se han estudiado principalmente en fibroblastos y mitocondrias intactas. En la membrana interna de las mitocondrias se identificó una proteína de 82 kDa

con actividad de intercambio iónico (Martin y cols., 1984). Se han aislado varios isotipos, de diferentes fuentes biológicas como en las células del borde en cepillo de placenta de conejo e intestino humano (Yun y cols., 1993), diferentes variedades del AAPEN (nhaA y nha-B) en *Escherichia coli* (Pinner y cols., 1992, 1993), y por algunas formas de acarreadores diferentes asociadas a otros cationes como el de $2Na^+/Ca^{2+}$, que depende de H^+, además de los AAPEN para $Mg^{+2}/2H^+$ que comparten por los eritrocitos y la *Hevea brasiliensis* (Amalou y cols., 1992). También, se ha encontrado cierta homología en los dominios hidrofóbicos transmembranales, entre distintos AAPEN para diferentes cationes y de varias fuentes biológicas (Fliegel y Frölich, 1993; Reizer y cols., 1992).

El mecanismo de transporte asociado a esta proteína se conoce como **antiport** y se define como *un intercambio de diferentes especies químicas, a través de una barrera impermeable en direcciones paralelas y sentidos opuestos.* Cuando es electroneutro, se considera incapaz de alterar el potencial eléctrico de membrana. El transporte iónico regula diferentes procesos biológicos (p.e. función renal, absorción intestinal, balance de electrolitos en sangre) y es indispensable para algunas actividades metabólicas. El mecanismo de activación de la función del AAPEN se basa en el sistema de las proteínas G, donde el factor de crecimiento se une a su receptor en la membrana, el cual con ayuda de una proteína G activa la fosfolipasa C, convirtiendo el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5-trifosfato, éste induce la unión de diacilglicerol a la cinasa C, que a su vez, aumenta el pH y cuando aparece Na^+ en el otro lado de la membrana se dispara la función del AAPEN (Pouyssègur, 1985).

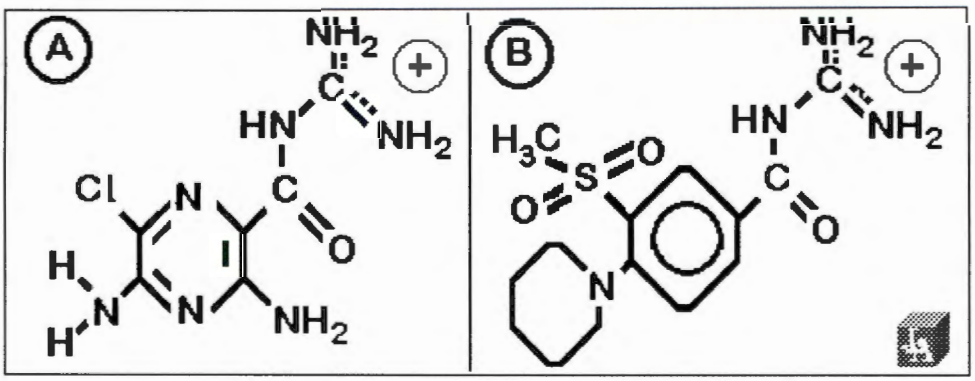


Figura 4. Estructura química del amiloruro (A) el inhibidor de transporte de cationes más utilizado y, el HOE694 (B), un derivado de uso en contra de isquemia, el cual también es capaz de inhibir el transporte catiónico (Counillon y cols., 1993).

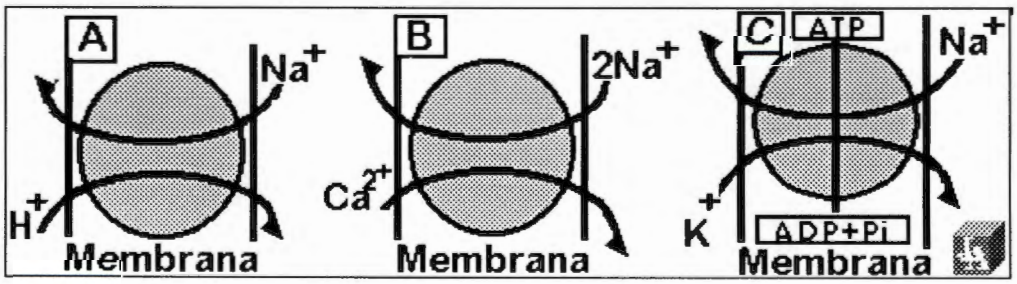


Figura 5. Esquemás del mecanismo de transporte *antiport* según los estudios realizados con acarreadores modelo y ensayos en sistemas biológicos. A) Na^+/H^+, observado para el AAPEN y que comparte con los acarreadores modelo, B) $2Na^+/Ca^{2+}$, descrito en músculo y las sinapsis neuronal y; C) Bomba de Na^+/K^+ dependiente de ATP descrita en las células del borde en cepillo del intestino.

Los AAPEN Na^+/H^+ regulan el pH interno de las células de los vertebrados, y se han encontrado en diferentes organelos y en bacterias. Este acarreador es inhibido por el amiloruro un inhibidor del transporte de cationes, derivado de la guanidina, al igual que lo hace con los acarreadores modelo como la nigericina (Figura 5). Esta inhibición parece estar regulada por competencia entre los iones

hidratados de Na^+ y los iones amiloruro, pues ocupan un espacio de dimensiones similares. Estudios posteriores han demostrado la importancia de este efecto en la administración de productos antiisquémicos,- una enfermedad cardiaca que consiste en la disminución de la irrigación en el corazón y la pérdida del "tono muscular" (Counillon y cols., 1993), donde un derivado del amiloruro, el HOE694, se emplea en esos casos (Figura 4).

Se ha demostrado que una falla en la actividad del AAPEN Na^+/H^+, o su bloqueo, puede causar la muerte de fibroblastos en cultivo (Sardet y cols., 1989). Aunque se conocen los mecanismos de regulación, negativo por amiloruro y positivo con factores de crecimiento, aún no se conoce el mecanismo físico y químico de la translocación iónica promovida por el AAPEN $Na^+/H+$, y surgen las preguntas, *¿Cómo es el sitio de reconocimiento? ¿Cuál es el sitio de unión? ¿Se mueve el AAPEN a través de la membrana?* Y si es así, *¿cómo cruza la membrana?*

Las células de los mamíferos mantienen el valor de su pH fisiológico en aproximadamente 7.2 unidades, a pesar de que una estimación química muestra un pH menor si se consideran los diferentes procesos metabólicos y termodinámicos. Si el gradiente de iones hidrógeno fuera determinado únicamente por el paso de protones, entonces el pH citoplasmático sería de 6.2 que es una unidad menor que el pH extracelular y representa un cambio en el potencial de membrana de -60 mV.

Existen varios factores que pueden contribuir a la carga de protones en los gradientes intracelular y extracelular. Esto incluye la producción de CO_2 en la célula y su subsecuente conversión en ácido carbónico, además de otras reacciones metabólicas que incrementan la concentración interna de protones, p.e. la glucólisis. Desde luego hay diferentes condiciones fisiológicas y patológicas que tienden a desplazar el balance metabólico ácido, así que se necesitan diferentes mecanismos reguladores para mantener estable el pH intracelular cuando se encaran variaciones ácido-base. También es necesario controlar el pH intracelular para sobrellevar los cambios que ocurren durante el crecimiento o el funcionamiento de la célula, como el transporte de bicarbonatos y el intercambio mismo de Na^+/H^+. Por ejemplo, los acarreadores antiparalelos proteicos electroneutros (AAPEN), sus contribuciones relativas en el control del pH y de los potenciales catiónicos, varían en los diferentes tipos de células (Hoffmann y Simonsen, 1989). El AAPEN de Na^+/H^+ es un sistema empleado universal y esencialmente por cualquier célula eucariótica para regular el pH intracelular (Grinstein y Rothstein, 1993). La actividad de intercambio Na^+/H^+ está ampliamente distribuida tanto en animales, como plantas, y en cualquier tipo celular, así como en una gran variedad de procariotas y varios orgánulos. La dirección del intercambio es exclusiva de los gradientes de iones y no requiere de energía metabólica adicional. En organismos avanzados, tales como los mamíferos, el cambio de la energía libre producida por la unión de Na^+ es suficiente para impulsar el movimiento hacia afuera de H^+, contra su mismo gradiente. Estudios mas detallados muestran que en los mamíferos, la estequiometría es de 1:1 (Seifter y Aronson, 1986) por lo cual se dice que es electroneutro, en tanto que en bacterias este intercambio puede ser electrogénico con una estequiometría 1:2 (Taglich y cols., 1993), ello que indica que ambos sistemas no se relacionan entre sí, necesariamente.

Los mejores inhibidores del AAPEN Na^+/H^+ son los compuestos derivados de la guanidina, en particular el amiloruro y sus análogos. El amiloruro inhibe el AAPEN Na^+/H^+ de mamíferos con una K_m de 1 a 100 μM, dependiendo del tipo de célula (Fliegel y Frölich, 1993). Análogos específicos también pueden inhibir la actividad Na^+/H^+ con mayor eficiencia. El AAPEN está en estado casi latente cuando el pH citoplasmático se encuentra en valores fisiológicos; su activación puede ocurrir por varios estímulos incluyendo hormonas (p.e., insulina, vasopresina), factores de crecimiento (p.e., factor de creimiento derivado de factor plaquetas, factor de crecimiento epidérmico) y otros estímulos como factores quimiotácticos y fertilización de ovocitos (Grinstein y Rothstein, 1993; Seifter y

Aronson, 1986). En los organismos evolucionados, el intercambio Na^+/H^+ completa diferentes funciones, según el tipo celular. La principal función del AAPEN Na^+/H^+ es evitar la acidificación intracelular, lo cual es evidente en células mutantes carentes del mismo (Pouyssègur y cols., 1993; Grinstein y cols., 1993). El intercambio Na^+/H^+ también participa en el control del volumen celular después de un choque osmótico (Fliegel y Frölich, 1993).

Tabla I. Los AAPEN Na+/H+ clonados, su especie, su isoforma y el tejido de aislamiento. (Modificado de Fliegel y Frölich, 1993).

Especie	Isoforma	Tejido o Fuente
Mamíferos		
Humano	NHE-1	þ
Humano	NHE-1	Riñón, Placenta, Cáncer mamario, Corazón
Hámster	NHE-1	CCL39
Cerdo	NHE-1	LLC-PK_1 (Riñón)
Conejo	NHE-1	Corazón, Vellos del intestino, Riñón
Conejo	NHE-2	Vellosidades del intestino
Conejo	NHE-3	Riñón (Corteza)
Rata	NHE-1	Corazón, Hígado.
Rata	NHE-2	Intestino, Estómago.
Rata	NHE-3	Riñón, Hígado.
Rata	NHE-4	Estómago
Otros Eucariotas		
Sapo	β–NHE	Encéfalo, Riñón
Caenorhabditis elegans	No Identificado	
Schizosaccharomyces pombe	NHE-1	
Procariotas		
Bacilus firmus	nhaC	
Enterococcus hirae	napA	
Escherichia coli	nhaA	
Escherichia coli	nhaB	

þ Clona del cDNA aislada por complementación de una línea celular deficiente en la función del AAPEN.

Los diferentes AAPEN tienen estructuras altamente relacionadas entre sí. Las distintas isoformas de AAPEN tienen una longitud de 717 a 900 aminoácidos por unidad, aunque en la membrana puedan llegar tener una masa cercana a 200 kDa debido a la formación de dímeros (Fliegel y cols., 1993). Las unidades monoméricas presentan una masa aproximada de 110 kDa probablemente por la glucosilación de las mismas, en al menos un sitio, p.e., NHE-1 posee tres sitios potenciales de glucosilación; las NHE-3 y NHE-4 tienen entre tres y cinco dependiendo de la especie fuente (Tabla II), pero sólo el primer sitio (en el residuo número 75) se encuentra glucosilado (Counillon y cols., 1994). Los perfiles de hidrofobicidad son similares en todas las isoformas y muestran dos dominios diferentes claramente delineados. Los primeros 500 a 510 residuos del dominio N-terminal, están formando las secciones hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas que se pueden asociar a un dominio transmembranal. El resto de la molécula, el dominio C-terminal, es de naturaleza polar y se tiende a asignarle un ambiente acuoso (citoplasmático); esto se demuestra por el hecho de que cualquier ensayo con anticuerpos contra el dominio C-terminal debe cruzar la membrana antes de efectuar la unión con el antígeno (Sardet y cols., 1990).

Algunos aspectos del AAPEN Na^+/H^+ se han revisados recientemente, tales como su regulación por fosforilación y la glucosilación (Counillon, 1994), enfocándose en tres áreas: 1) la homología y la diversidad entre los diferentes miembros de la familia de AAPEN Na^+/H^+, 2) la regulación de la expresión de la proteína en respuesta a estímulos externos, y 3) el papel del AAPEN Na^+/H^+ en el miocardio. Se han aislado diferentes isoformas del AAPEN Na^+/H^+, el número de las especies de las cuales se puede aislar crece contínuamente como se muestra en la Tabla I (Fliegel y Frölich, 1993). Sardet y colaboradores (1989) aislaron el

gene a partir de la síntesis de un cDNA y obtuvieron la primera clona conocida de un AAPEN Na^+/H^+ y, a través de una serie de experimentos que involucraron la reparación de líneas celulares deficientes en este AAPEN. Este cDNA codifica para la isoforma NHE-1 de AAPEN Na^+/H^+ y se han usado porciones de este $_c$DNA como base para dilucidar la secuencia de las cuatro isoformas conocidas (del NHE-1 hasta la NHE-4, vease la Tabla I). De acuerdo con los estudios realizados en las distintas isoformas, estas presentan la diferencias más evidentes en el dominio citoplasmatico y las seccionesde unión de las regiones transmembranales o RTM, realizan la misma función independientemente de su fuente biológica (Fliegel y Frölich, 1993). Sin embargo, para realizar estudios más completos sobre las características físicas de los distintos AAPEN o NHE, dependen de los avances en las investigaciónes estructurales y conformacionales de las proteínas integrales de membrana (Wilson y Dahlquist, 1984; Popot y Engelman, 1990; von Heine, 1994).

Tabla II. Sitios putativos de glucosilación en diferentes isoformas del AAPEN Na^+/H^+.

Fuente	Isoforma	Tejido	Sitios de glucosilación NX(ST)
Humano	NHE-1	P	75, 370, 410
Hamster	NHE-1	CCL39	76, 374, 414
Cerdo	NHE-1	LLC-PK	75, 370, 410
Conejo	NHE-1	Vello ileal	75, 370, 410
Rata	NHE-1	Corazón	41, 76, 374, 414
Rata	NHE-2	Intestino	235, 508, 577
Conejo	NHE-2	Vello ileal	350, 623, 685
Rata	NHE-3	Riñón	323, 588, 689, 705, 805
Conejo	NHE-3	Riñón	325, 692, 811
Rata	NHE-4	Estómago	31, 297, 342

P Clona cDNA aislada por complementación de una linea celular deficiente en la función del AAPEN.

Con base en criterios farmacológicos y cinéticos se han propuesto varias isoformas del AAPEN Na^+/H^+. El uso de inhibidores como el amiloruro y sus análogos puede ayudar a distinguir las distintas formas (o isoformas): p.e., un transportador epitelial luminal con una K_m para amiloruro cercano a 0.1 mM, y el transportador no epitelial de alta afinidad (K_m=1 a 10μM). La última isoforma se conoce ahora como la forma ubicua, o NHE-1 (por el intercambiador de Na^+/H^+ tipo I, o Na^+/H^+ exchanger I). Al parecer, es este tipo de AAPEN el que existe en la membrana plasmática de la mayoría de la células, incluyendo las células epiteliales de la membrana basolateral (Haggerty, y cols., 1988). Así pues, con ayuda de los criterios farmacológicos se ha establecido que pueden existir diferentes isoformas del AAPEN en la misma célula en diferentes porciones de la membrana celular (Haggerty y cols., 1988, Kulanthaivel y cols., 1990).

A partir de estudios farmacológicos y cinéticos del intercambio Na^+/H^+ en diferentes fuentes, se ha determinado la distribución de las isoformas. En mamíferos, el AAPEN NHE-1 se encuentra en todos los tejidos examinados, y presenta cierta homología de secuencia con el intercambiador Cl^-/HCO_2^- (Evans, 1984). Los AAPEN NHE-2 y NHE-3 han sido detectados en los tejidos epiteliales de riñón e intestino. El NHE-4 se encuentra en el estómago, que además contiene grandes cantidades de mRNA para NHE-1 y NHE-3. Las formas epiteliales, NHE-2 y NHE-3, se han localizado en la membrana apical y están involucradas en el transporte de Na^+ y Cl^- en solución; el NHE-2 se expresa en las células polarizadas, como transportador funcional en la membrana apical. El NHE-1 se encuentra en la membrana basolateral, así como en la membrana plasmática de las células no polares (Fliegel y Frölich, 1993).

Existe evidencia de una posible edición diferencial de los mensajeros de los distintos AAPEN, relacionada con la presencia de de otras posibles isoformas, los análisis de *Nothern blot* muestran un mensaje de NHE-1 más pequeño que en cualquer tejido (Orlowski y cols., 1992), mientras que Dyck y cols. (1992), encontraron un RNA_m de 3.8 kb en el miocardio de corazones isquémicos que hibridiza contra una sonda preparada para un RNA_m de 5kb corazones normales, en conejo de 7 días, existe evidencia de que la producción del RNA_m de 3.8 kb se incrementa durante al isquemia. Finalmente, existe evidencia de un intercambio Na^+/H^+, resistente a la inhibición por amiloruro, que se asocia a los AAPEN como una característica representativa de su esencia (Poronnik y cols., 1993).

Estructura del AAPEN.

Los métodos para la predición de la estructura secundaria de las proteínas integrales de la membrana y las conclusiones derivadas de ellos, muestran algunos puntos de discusión por las diferencias que existen al signar la prioridad sobre las características que se analizan, los medios (de hidrofobicidad de las secuencias, por mutagénesis dirigidas, ensayos bioquímicos e inmunológicos, sencillos o comparados, además de las simulaciones, estimaciones y otros análisis por computadora) yen especial en las formas de interpretar los resultados que se obtienen. La mayoría de los métodos de predicción y estimación de la estructura se basan en la hidrofobicidad de los aminoácidos de la secuencia. Aunque existe un concenso sobre las principales características a estudiar En general, la estructura de la mayoría las proteínas transmembranales o integrales es poco conocida, excepto por algunos casos particulares cuyas estructuras se han estudiado por la mayoria de las técnicas disponibles. Los AAPEN son proteínas integrales de la membrana que la cruzan en varias ocasiones (Fliegel y Frölich, 1993).

En los estudios estructurales, sólo hay algo más difícil que el establecer la estructura final de las proteínas integrales de membrana, y es encontrar la forma en la cual logran el plegamiento adecuado. Sin embargo, un examen de las pocas estructuras conocidas y algunos datos experimentales sugieren que cada una de las hélices α hidrofóbicas transmembranales se comportan como unidades de acoplamiento independientes, donde las cargas de las secciones polares influyen para inclusión de las RTM en la membrana, ello induce a pensar que este tipo de proteínas requieren de un estudio más detallado. Este es el caso del centro de reacción fotosintética (RFS) y de la bacteriorodopsina (BR), que junto con las porinas son las únicas proteínas de membrana con estudios estructurales con todas las técnicas disponibles, además son estables al ser aisladas en sistemas modelo lipídicos. En ambos casos, las hélices α o las estructuras β, se predicen por un análisis de hidrofobicidad y localización de las cargas eléctricas. Estas proteínas son la medida y el patrón para los diferentes ensayos con otras proteínas anfipáticas. El aislamiento y reconstitución de las proteínas anfipáticas, puede ocurrir por la formación de una estructura esférica alrededor del polipéptido mediante un proceso de conformación en dos etapas, en el cual la estructura final se forma por la asociación de hélices aisladas preformadas, con un mínimo de ajustes (Popot y Engelman, 1990; Hucho y cols., 1994).

La evidencia experimental directa sobre el plegamiento de las proteínas integrales en dos etapas proviene de los estudios de renaturalización de la BR. En particular, se ha mostrado experimentalmente que las cadenas desnaturalizadas pueden regenerar las estructuras helicoidales cuando se insertan, en sistemas lipídicos, p.e. en vesículas. Esta estructura regenerada es espectroscópicamente indistinguible de la BR en forma nativa (Popot y Engelman, 1990; Hucho y cols., 1994). Podemos suponer que la conformación en dos etapas no está restringida a transportadores de protones o electrones. El receptor formador de canales mejor conocido, el receptor nicotínico-acetilcolina (nAChr, por sus siglas en inglés), forma un gran canal específico para

cationes a través de la membrana plasmática de los nervios en los músculos. Datos recientes sugieren que sus regiones transmembranales están compuestas exclusivamente de hélices hidrofóbicas (von Heijne, 1994; Popot y Engelman, 1990).

Los análisis de hidrofobicidad apoyan las estimaciones sobre las estructuras secundarias. Sin embargo, los exámenes de los segmentos hidrofóbicos en diferentes proteínas solubles e integrales, indican la necesidad de mayores pruebas para decidir si un segmento es o no transmembranal. La asimetría del proceso de inserción en la membrana, durante la biosíntesis sugiere que la unidad a considerar en los cálculos termodinámicos de inserción podrían ser pares de segmentos (rizos, hojas), más fácilmente que las hélices individuales. Las evidencias apuntan principalmente (p.e. el RFS y la BR) hacia las hélices α hidrofóbicas como los principales componentes en la construcción de las proteínas membranales, empero, un punto importante son los estudios de las porinas (proteínas que forman canales para el paso de solutos) y del nAChr, la evidencia cristalográfica y espectroscópica está en contra de las hélices α y en favor de las hojas β (von Heijne, 1994; Popot y Engelman, 1990).

Predicción de la estructura de las proteínas de membrana.

Estructuras.

Las proteínas persentan diferentes clases estructuras: la estructura primaria corresponde a la secuencia de residuos en una cadena polipeptídica. La estructura secundaria son los arreglos espaciales (helicoidales, giros, láminas y estructuras aleatorias) que toman diferentes regiones de la cadena, al interactuar con el medio. La estructura terciaria consiste en el arreglo de las diferentes secciones de la cadena para establecer la forma final de la molécula.

El grupo de proteínas de membrana es muy diverso y juega un papel preponderante en la regulación de la actividad y las funciones celulares. La diversidad de las proteínas residentes en la matriz lipídica de las membrana es inmensa, desde la función como receptores hasta el papel de enzimas activas. Uno de los primeros intentos para predecir la estructura secundaria los realizaron Kyte y Doolittle (1982) con su programa llamado SOAP. Con él fue posible desplegar las características de hidropatía de una proteína, usándose para determinar las regiones con mayor probabilidad de estar embebidas en el ambiente no-polar de las membranas. Kyte y Doolittle evitaron asociar estas regiones hidrofóbicas con algún tipo de estructura secundaria en particular, p.e., hélice-α, hoja-β o rizo. Desafortunadamente, en la literatura se ha aceptado que estos segmentos representan a las hélices-α. Es posible que estos sí representen secciones helicoidales, y probablemente con gran frecuencia son hélices, pero el método de Kyte y Doolittle, no permite verificar si un segmento transmembranal es helicoidal, es necesario utilizar otras técnicas para resolver los arreglos de la estructura secundaria. Debe recordarse que las hojas-β pueden ser altamente hidrofóbicas, o anfipáticas e incluso cruzar la membrana, como el caso de la porina de *E. coli* en la cual se encuentran formando un canal transmembranal dependiente de voltaje. Es frecuente que se enuncie que la aplicación de los métodos predictivos derivados de los datos obtenidos a partir de proteínas globulares, son incapaces de generar predicciones probables de las estructuras de las proteínas embebidas en la membrana. Actualmente, se usan programas con algoritmos basados en las características físicas de los 20 aminoácidos naturales para determinar la posible estructura de las regiones transmembranales (Fasman, 1990).

Mecanisimos de transporte transmembranal.

El ejemplo del mecanismo de transferencia de protones a través de la interfase membrana-solución, se puede dar por medio de un ácido débil, como FCCP (carbonilcianida *p*-triflourometoxifenilhidrazona), CCCP (carbonilcianida *m*-clorofenilhidrazona) o S13 (5-cloro-3-terbutil-2'-cloro-4'-nitrosalicianida), quienes pueden funcionar como acarreadores

de protones o protonóforos, pues las formas aniónica A^- y neutra HA se adsorben en la matriz de la interfase membrana-solución, mediante interacciones hidrofóbicas y son capaces de permear al interior de la membrana.

Existen dos razones para interesarse en el mecanismo molecular por el cual se transportan los protones a través de las membranas biológicas. Primero, hay cierta controversia sobre el mecanismo de transducción energética de la mitocondria, los cloroplastos y las bacterias. La teoría quimiosmótica postula que la oxidación está sincronizada a la fosforilación oxidativa de la membrana por la diferencia en el potencial electroquímico de protones entre los dos compartimientos que separa, denotado por $\Delta_{\mu H}+$. Se debe considerar entonces, que los protonóforos son capaces de interrumpir la sincronía entre la oxidación y la fosforilación al reducir la magnitud de $\Delta_{\mu H}+$.

En la ilustración de la Figura 6, se muestra la manera en que el S13, un ácido débil, realiza su función de protonóforo. El mayor supuesto del modelo es que el anión es la única especie cargada que se mueve a través de la membrana; las tasas de transporte del anión dependiente del voltaje y se denotan por k'_A y k''_A, las constantes de velocidad de translocación. En la misma figura, el anión adsorto en la interfase se combina con los protones de la fase acuosa con una constante de reacción k_R: la molécula HA se adsorbe disociada hacia la interfase con una tasa constante k_D. La constante de asociación en el equilibrio es $K = k_R/k_D$ y el -log (K) es el pK del S13 en la superficie de la membrana. En las figuras 7b y 7c, las moléculas del amortiguador y el agua donan protones al anión adsorto. La difusión de la forma neutra, HA, a través de la membrana se asume que sea independiente de la diferencia de potencial entre las dos caras. La tasa de translocación de esta especie es constante y se representa por k_{HA}. Es fácil demostrar que el número total de moléculas del acarreador adsorto en la membrana, N_0 no cambia significativamente durante los experimentos cinéticos.

$$N_0 = 2N_A + 2N_{HA}$$

donde N_A y N_{HA} son las concentraciones en superficie de A^- y HA adsortos en una interfase, los coeficientes 2 expresan las concentraciones que se tienen en ambas caras de la membrana (Kasianowicz y cols., 1984).

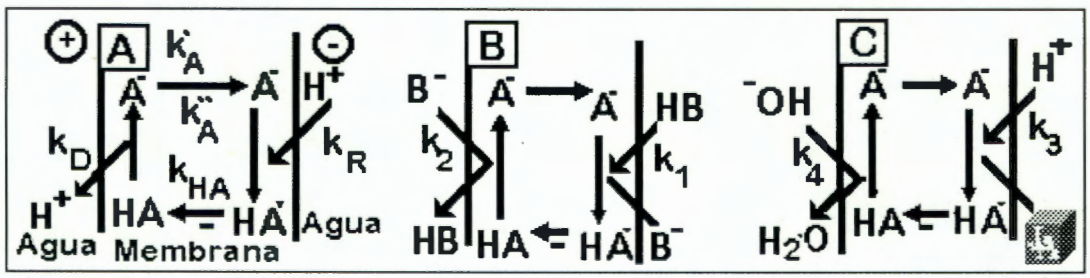


Figura 6. El mecanismo para el transporte de protones a través de una membrana lipídica por acarreadores modelo, Los signos positivo y negativo encerrados en un círculo representan la diferencia de potencial. Las constantes k'_A y k''_A expresan las velocidades de translocación de iones, la cual depende del voltaje (adaptado de Kasianowicz y cols., 1984).

Cromatografía.

La resolución cromatográfica de macromoléculas biológicas es un proceso mediado por las interacciones de superficie entre la muestra y el material empacado, excepto en el caso de la de exclusión por tamaño, donde la separación cromatográfica se basa en la interacción de los solutos con la fase estacionaria. La caracterización estructural nos dice que las moléculas biológicas difieren físicamente en su tamaño, su forma, sus cargas eléctricas, su hidrofobicidad y su arreglo de grupos funcionales en la estructura tridimensional. Luego no es de sorprender que la mayoría de las separaciones cromatográficas se basan en: la forma y el tamaño

(exclusión por tamaño), por discriminación de la carga eléctrica (de intercambio iónico), hidrofobicidad superficial (de interacciones hidrofóbicas), de hidrofobicidad en general (de fase inversa), por las histidinas disponibles (de afinidad a metales inmovilizados), y por distribución de aminoácidos específicos en la superficie de la proteína (de bioafinidad); estas técnicas y sus usos tienden a incrementarse (Barth y Boyes, 1992; Christian, 1981).

Cromatografía de exclusión.

Las separaciones cromatográficas por exclusión se basan principalmente en filtración en gel, como ya se describió. Las moléculas más pequeñas permean completamente las partículas del material empacado en la columna al igual que a la fase móvil, ocupando todos los espacios dentro y entre esas partículas. Por tal razón esta muestra eluye de la columna en el volumen total de permeado (V_t). En contraste, las especies macromoleculares que son demasiado grandes para penetrar en la matriz porosa de una columna, son excluidas del volumen de líquido interno y son eluídas en el volumen vacío (V_0). Sustrayendo el volumen vacío del volumen total se obtiene el volumen interno (V_i). Todas las especies macromoleculares que interactúan con el material empacado se eluirán entre estos extremos, el V_0 y el V_t. Por lo tanto se puede obtener el volumen de elución (V_e) de una especie en particular por medio de la siguiente ecuación:

$$V_e = V_0 + K_S V_i$$

donde Ks es el coeficiente de distribución y exclusión por forma, y tiene valores entre cero (para las especies macromoleculares excluidas) y uno (para las especies moleculares que permean totalmente el material empacado en la columna). Las fracciones en los valores de Ks representan el acceso parcial del volumen líquido con la matriz porosa. Para una K_s entre los valores de 0.15 y 0.9, existe una relación lineal entre la K_s y el logaritmo del peso molecular, cuando existe una distribución homogénea en el diámetro de los poros del empacado. El mecanismo preciso es la discriminación con base en la forma, o más preciso, con base en el radio de giro, no en el peso molecular de las especies, -p.e., si consideramos al fibrinógeno, éste eluye en un Ve menor que otra proteína globular del mismo peso molecular debido a que tiene un radio de giro mayor (Barth y Boyes, 1992; Christian, 1981).

En la cromatografía de exclusión pueden existir interacciones entre los solutos y la superficie del empacado, en particular cuando la columna presenta carga o interacciones hidrofóbicas. Algunas proteínas se pueden adsorber, aunque en forma débil, en la matriz de la columna por medio de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, presentando un menor peso molecular al verdadero. Por el contrario, los solutos con la misma carga de la columna pueden ser repelidos de la matriz porosa aparentando un mayor tamaño que su peso molecular (Barth y Boyes, 1992; Christian, 1981). La resolución en cromatografía de exclusión está determinada por tres características del material adsorbente: la distribución homogénea y el tamaño del poro, el volumen del poro y el tamaño de la partícula. Un tamaño pequeño de poro nos da una gran resolución entre dos solutos según su tamaño molecular (Chicz y Regnier, 1990; Barth y Boyes, 1992; Christian, 1981).

La filtración en gel se estableció como técnica de laboratorio con la aparición del Sephadex en 1959; desde entonces su uso se ha incrementado, tanto en el aislamiento y la preparación de diferentes muestras en de los laboratorios como en la producción de químicos a nivel industrial. (Barth y Boyes, 1992; Christian, 1981).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Una de las técnicas de mayor utilidad en la purificación de biomoléculas es la cromatografía de alta resolución. En resumen, no es una técnica nueva, sino un avance en las teorías operativas y la fabricación de los sistemas cromatográficos. Su aplicación a la separación de macromoléculas biológicas difiere de las cromatografías en gel en tres

puntos: (1) el sorbente posee una fuerza mecánica mayor. (2) El tamaño de las partículas del empacado es de 5 a 10 veces más pequeño que en la columna tradicional, para mejorar la cinética de adsorción-desorción y disminuir el ensanchamiento de las bandas. (3) La forma de las partículas es más regular, pues entre más homogéneas sean las partículas mejor será la resolución. (4) Las columnas se operan a una velocidad de la fase móvil de 10 a 20 veces mayor. El mecanismo es muy simple, se fuerza el paso del eluyente a una velocidad alta, controlada por medio de unas bombas de alta presión; el eluído de la columna se monitorea por medio de un sensor espectroscópico de alta sensibilidad. Los sistemas de bombeo son una parte muy importante en cualquier cromatógrafo y se deben considerar las siguientes características: (A) Los componentes del sistema de bombeo deben resistir químicamente a los diferentes solventes usados en los ensayos. (B) El porcentaje de variación en el sistema de bombeo debe ser menor al 1.0% para asegurar la reproducibilidad y precisión. (C) La presión de bombeo debe alcanzar al menos 30 atm, pero se recomiendan alrededor de 400 atm, cuando se usan columnas de micropartículas o fases móviles viscosas. (D) La entrada de la fase móvil debe ser carente de cualquier pulsación o cavitación que limite la línea base en el detector lo cual aumenta el ruido y daña las columnas. (E) Cuando se usan mezclas de solventes, éstas deben llegar de manera homogénea a cualquier tasa de flujo. (F) Es necesario que cuando se requiera usar gradientes, éstos se puedan reproducir, incluso a una velocidad de 10 veces el flujo deseado. Es indispensable que los solventes usados en HPLC no corroan los componentes del sistema de bombeo, la columna o los sistemas de detección. También es importante la pureza de los solventes; evitando la presencia en el solvente de especies que absorban en la región UV, ya que esto acarrea problemas de detección. Todos los solventes (incluyendo el agua desionizada, bidestilada o tridestilada), amortiguadores y los aditivos, se deben purificar al grado de HPLC y filtrarse justo antes de utilizarse (Chicz y Regnier, 1990).

Cualquier sistema de bombeo puede causar una cavitación o una pulsación, induciendo una discontinuidad en el flujo, por lo cual se han desarrollado dos tipos de mecanismos para compensar la cavitación. El primero de ellos, se basa en la incorporación de un tubo flexible dentro de un compartimento lleno con un líquido compresible y bien sellado. El segundo, se basa también en el uso de un tubo flexible de 1 a 3 m flanqueado por acero inoxidable, que se expande con cada pulsación. Una de las mayores desventajas del segundo sistema es la gran cantidad de volumen muerto y la posibilidad de que ocurra una ruptura debido a la continua tensión en el tubo. La compensación electrónica empieza a aparecer, además de las cámaras especiales capaces de mejorar el flujo continuo en los cromatógrafos (Chicz y Regnier, 1990).

La mayoría de los aparatos de HPLC, usados en la separación de proteínas pueden generar gradientes, mezclando dos o más solventes. Para ello existen sistemas de mezclado que controlan la formación del gradiente, con dos sistemas disponibles: dinámicos y estáticos. Las mezcladoras dinámicas usan un agitador magnético dentro de una cámara de mezcla, siendo uno de los sistemas más versátiles, aunque con algunas desventajas como, el aumento de 1 a 3 ml en el volumen muerto en el sistema de bombeo. Los sistemas estáticos consisten de una cámara llena con un material inerte y operan igual que una columna cromatográfica sencilla, con un gran ensanchamiento de bandas, sus principales ventajas son el mínimo aumento en el volumen de los sistemas de bombeo, pero no puede mezclar bien las soluciones muy viscosas (Chicz y Regnier, 1990).

Los detectores de absorbencia ultravioleta-visible son los más usados en los equipos de HPLC en la separación de proteínas, por su sensibilidad, confiabilidad, amplio intervalo lineal, y la identificación sin

daño de las muestras procesadas. Los detectores de longitud de onda variable, permiten que el operador selecione la mejores condiciones de detección basados en la absorción máxima en determinada longitud de onda, entre los 300 y 200 nm para las proteínas; permiten además, la cuantificación del producto purificado si se conoce el coeficiente de extinción de la substancia buscada en la muestra (Chicz y Regnier, 1990).

Dicroísmo circular.

La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot y Fresnel (Neumann y Snatzke, 1990). Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactua de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfasamiento y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes cirularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse (Figura 7).

La rotación del plano y la diferente absorción de los componetes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación.

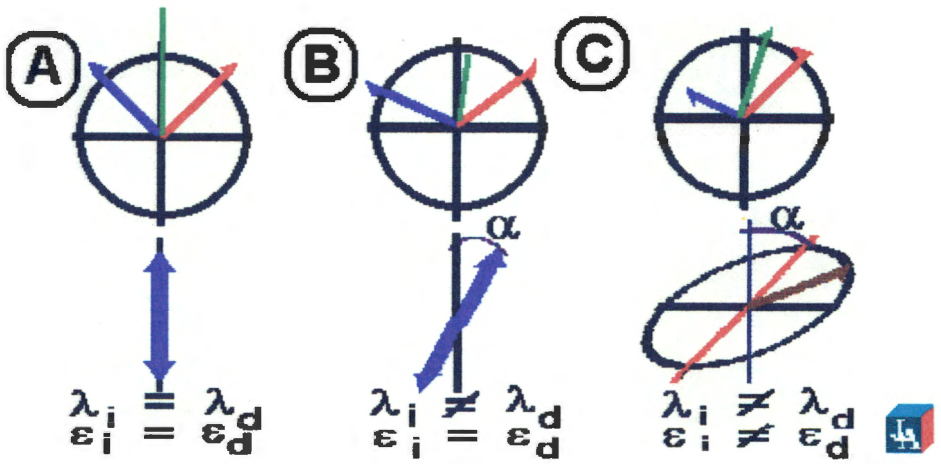


Figura 7. Esquema de los componentes de un haz de luz plano-polarizado. (A) Se representan los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. (B) Esos mismos vectores después de interactuar con los solutos de la muestra, fuera de fase. (C) Los mismos vectores cuando son absortos en forma diferencial.

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden

interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α, hojas β, giros y otros tipos estructurales).

Para realizar este análisis Hennessey y Johnson utilizaron, como base de datos, los espectros de un conjunto de proteínas cuya estructura tridimensional está bien determinada. A partir de estos espectros, se demostró que basta la combinación lineal de 5 espectros base, para describir a cada uno de los 16 espectros experimentales. Además, se determinó que a cada uno de los 5 espectros base puede asignarsele un contenido de estructura secundaria. El análisis del espectro de dicroísmo circular de una proteína cualquiera consiste en encontrar la combinación lineal de los 5 espectros base que logra reproducir el perfil de la mejor manera posible del espectro experimental. Una vez logrado esto, y considerando que las señales son aditivas, se suma el producto del contenido de cada estructura secundaria de los espectos base por su coeficiente en la combinación lineal. Los resultados de esta adición representan la estimación experimental de los porcentajes de los residuos en cada una de las estructuras secundarias de la conformación de la proteína problema.

La principal fuente de error del método descrito se puede hallar en la base de datos, la cual debe ser representativa de la proteína a analizar y en que las señales obtenidas no son necesariamente aditivas. Por ejemplo, dos hélices de 6 residuos muestran un espectro diferente al de una hélice de 12 residuos, aun cuando en ambos casos el número de aminoácidos es el mismo. También la orientación relativa de las diferentes estructuras puede modificar las señales, así como la presencia de otros grupos cromóforos, tales como, los enlaces disulfuro, o los grupos aromáticos (Figura 7).

Predicción de la estructura

Uno de los métodos más novedosos para la predicción por computadora de la estructura secundaria es el sistema PHD (la abreviatura en inglés de *Predition of HeilDelberg*) en red neuronal, con un alineamiento múltiple de secuencias, almacenadas en los archivos de HSSP (la abreviatura de *Homology derived Secondary Structure Prediction*) llevada a cabo por el programa MaxHom. Para predecir la structura secundaria del AAPEN, se utilizó el algoritmo PHD, propuesto por Rust y Sander (1994).

Este método utiliza una red neuronal, esto es un paquete de software que es capaz de establecer un procesamiento en paralelo, se basa en un conjunto de subrutinas y programas que se ejecutan de manera individual en paralelo y diferentes niveles, con diferentes vías de comunicación entre ellas. El sistema depende de un conjunto de 250 secuencias de proteínas (alrededor de 55,000 residuos) cuya estructura es conocida. La precisión puede alcanzar el 95 % para establecer cada aminoácido del conjunto en la conformación más probable (helicoidal, extendida, giro o irregular). La metodología incluye una búsqueda de secuencias, con diferentes grados de homología, su alineamiento múltiple de secuencias, y el análisis de la variabilidad en cada una de las posiciones de la secuencia. El archivo de salida incluye la predicción de cada residuo en la secuencia y correlacionar con algunas de las cuatro conformaciones mencionadas, la accesibilidad al solvente predicha para cada aminoácido, y la confiabilidad de ambas predicciones (Rost y Sanders, 1994).

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la función del AAPEN Na^+/H^+ en un sistema modelo para estimar algunas características del sitio de unión a cationes del acarreador.

Objetivos particulares

I. Aislar y purificar el acarreador M^+/H^+ de la membrana mitocondrial para reconstituir su actividad ionoforética en sistemas modelo.

II. Ensayar la unión de los cationes Na^+ y K^+ al acarreador obtenido.

III. Estudiar los cambios debidos a la interacción de los cationes Na^+ y K^+ con el AAPEN Na^+/H^+, empleando espectroscopía ultravioleta y visible de dicroísmo circular, para contribuir a la interpretación molecular del mecanismo ionoforético del acarreador.

Capítulo dos

Metodología

Chiyono había estudiado el zen durante muchos años, bajo la dirección del maestro Bukko, de Engaku. Sin embargo, no conseguía practicar satisfactoriamente la meditación. Una noche, traía agua en un viejo cubo de madera, ceñido con tallos de bambú, cuando estos se rompen, y el fondo de cubo se desprende. En ese instante, ella quedó liberada, y dijo: "Ya no hay agua en el cubo, ya no hay luna en el agua".

Koan budista.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN.....23
OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA. 23
SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS MEMBRANALES. 23
PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS MEMBRANALES.....24
DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL EN LAS DIFERENTES MUESTRAS.....24
DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA FRACCIÓN OBTENIDA.....25
ACTIVIDAD E INTERACCIONES. 25
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ANTIPORT Na^+/H^+. 25
SISTEMA DE PROTEOLIPOSOMAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE ANTIPORT Na^+/H^+. 25
DIGESTIÓN CON ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE LA FRACCIÓN CON ACTIVIDAD DE ANTIPORT. 26
DETERMINACIÓN DE LAS ENERGÍAS DE UNIÓN.....26
MEDICIÓN DE LAS SEÑALES DE DICROÍSMO CIRCULAR.....27
PREDICCIÓN DE LA TOPOLOGÍA DE LAS REGIONES TRANSMEMBRANALES. 27
ESTRUCTURA SECUNDARIA. 28

Aislamiento y purificación.

Obtención de mitocondrias de hígado de rata.

Como fuente de la muestra, se usaron ratas blancas, machos, cepa Wistar, con un peso de ≈ 200 gr. Los animales fueron desnucados con el método de Lardy y cols. (1967), y a continuación se extrajeron los hígados cuidando que no presentaran fracturas, ni alguna otra lesión. Los hígados se despositaron en sacarosa 0.08 M/TEA 0.005M/0.001 M, se homogenizaron y se les centrifugó a 500 x*g* por 5 minutos, recuperando el sobrenadante. Se retiró la capa de grasa en la superficie y se volvió a centrifugar ahora a 2,500 x*g* por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en una solución de sacarosa 0.08 M/manitol 0.25 M/EDTA 0.01 M con ayuda de un pincel. Esta suspensión fue recentrifugada a 2,500 x*g* por 15 minutos, descartando el sobrenadante y finalmente resuspendiendo la pastilla en 1 ml de Sacarosa 0.25M. Posteriormente la muestra se diluyó hasta alcanzar una concentración de 0.5 mg ml^{-1}, según se determinó por el método de Biuret.

Solubilización de proteínas membranales.

Se obtuvieron partículas submitocondriales por sonicación, según lo proponen Jêzek y cols. (1990) a partir de las mitocondrias de hígado de rata, aisladas por centrifugación. Las muestras fueron diluidas a 50 mg de proteína ml^{-1} en el amortiguador de aislamiento A (30 mM TEA/SO_4: 1 mM TEA/EDTA: 10 mM TEA/HEPES, ajustado a pH 7.2), y posteriormente fueron congeladas. Esta solución madre fue diluida a 9.5 mg ml^{-1} con el amortiguador A adicionado con Tritón X-100 (3.3 mg de proteína ml^{-1}) y cardiolipina de corazón de res, Sigma Chemical, tipo II

(2.8 mg de proteína ml^{-1}). La suspensión fue agitada por 20 minutos a 0 °C, posteriormente se colocó en una solución hipotónica y se agitó vigorosamente para desgarrar la membrana y aumentar la eficiencia del tratamiento con el detergente. El extracto de proteína fue separado del material no solubilizado por centrifugación a 130,000 x*g* por 35 minutos. En experimentos posteriores, se usó el amortiguador A complementado con N-octilglucósido en lugar de Triton-X100, y se utilizaron las mismas concentraciones y siguiendo los mismos pasos del procedimiento señalado, además se prefiltró con una columna de filtración de gel de 30 cm x 2.52 cm empacada con Sephadex G-25 antes de pasarle por la filtración en cromatografía de alta resolución. En esta muestra se realizaron los ensayos en proteoliposomas.

Purificación del extracto de proteínas membranales.

El sobrenadante obtenido de la centrifugación se concentró en una liofilizadora marca Heto; fue filtrado por una membrana de 0.22 µm y purificado a través de un gel Sephadex G-100 superfino de Pharmacia en una columna LKB de 60.0 x 2.0 cm eluyendo "a gravedad", se colectaron fracciones de 3 ml por un periodo de 14 hrs. En cada una de las fracciones obtenidas se ensayó la actividad de antiport, a fin de determinar la presencia del acarreador. La fracción con actividad de antiport, se procesó a través de un cromatógrafo de HPLC WATERS 480 con un detector Waters 600 de absorción en ultravioleta controlado por una computadora *Nec* 286 a 12 MHz y leyendo a 280 nm. La columna de filtración en gel empleada fue tipo TSK SW-2000 de 30.0 x 0.5 cm, con eluciones de 30 minutos y un flujo de 1.0 ml min^{-1}, con el amortiguador A, adicionado con Tritón X-100 a una concentración de 0.2 mg ml^{-1}, y recromatografiando hasta obtener una fracción homogénea. Para los ensayos con N-octilglucósido, el sobrenadante obtenido de la centrifugación se prefiltró en una columna de filtración en gel 30.0 x 2.0 cm empacada con Sehpadex G50. El paso por Sephadex G100 superfino fue omitido, sin que se alteraran los resultados o la eficiencia. Posteriormente se utilizó un cromatógrafo Varian 9012 junto con un detector Varian 9025, controlados por una computadora Compaq *Prolinea* 486 DX2 50 MHz, detectando por absorción de radiación en la región del ultravioleta a 280 nm, usando la columna descrita anteriormente (TSK SW-2000, 30.0x0.5 cm) en las mismas condiciones de ensayo (30 minutos, pH 7.2 amortiguador A con N-octilglucósido 0.15 mg ml^{-1} y flujo de 1.0 ml min^{-1}).

Determinación de la proteína total en las diferentes muestras.

Para conocer la cantidad de proteína en cada una de la muestras trabajadas y en las fracciones purificadas, se realizaron los siguientes ensayos: Las primeras muestras se procesaron por el método de Biuret; se toma una muestra de 0.02 ml y se le agregan 0.2 ml 1.28 ml de agua y 1.5 ml del rectivo de Biuret (0.15 % de $CuSO_4$,/0.6 % de tartrato de Na y K al 3.0% en KOH), determinado posteriormente la absorbencia a 540 nm contra un blanco de las mismas concetraciones pero sin proteína. Por la baja sensibilidad de la técnica de Biuret y las concentraciones de proteína obtenida, se cambió el procedimiento para determinar la concentración de proteína, primero usando la absorbencia a 280 nm (A_{280}), suponiendo que los valores de DO son los miligramos de proteína en solución. Usando una segunda aproximación se hace uso del cociente A_{280}/A_{260}, multiplicando la A_{280} con el factor correspondiente al cociente obtenido, en la tabla que presenta Chayquin (1987). Esta técnica también permite determinar la concetración de ácidos nucleicos presentes en la muestra. Finalmente, se calculó el coeficiente de extinción teórico a partir de la composición de aminoácidos siguiendo el método propuesto por Gill y von Hippel (1989). Se usó la ley de

Lambert y Beer para convertir la A_{280} en concentración de proteína, donde las cantidades de los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptofano son determinantes para calcular un coeficiente de extinción molar teórico.

Determinación de la masa molecular de la fracción obtenida.

Por las características anfipáticas e hidrofóbicas de la proteína y sus interacciones con la fase estacionaria dentro de la columna que se utilizó, la masa molecular se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.0% en presencia de SDS (PAGE-SDS), en un sistema PhastSystem de Pharmacia-LKB, con límites de sensibilidad entre 20 y 30 ng de proteína por banda, con un aplicador de seis carriles. Las condiciones para la determinación fueron: 250V, 10 Amp, 15 °C, aplicadas durante una hora, de acuerdo con la técnica de separación núm. 111 del manual de procedimientos de este equipo. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, según la técnica de revelado núm. 200 para teñido rápido según el manual de procedimientos del sistema de PhastSystem. Con esta técnica electroforética se determinó la pureza de la muestra y los resultados de la digestión enzimática.

Actividad e interacciones.

Determinación de la actividad de antiport Na^+/H^+.

Una muestra de la suspensión de proteínas, fue diluida a 8 mg ml^{-1} en una solución de asolecitna de soya (Sigma Chemical, tipo II) previamente filtrada en alúmina. La pureza se verificó por medio de una cromatografía en capa fina. La muestra se suspendió al 2.5% en una solución saturada de colesterol en éter etílico y asolecitina de soya, tomando 1.5 µl de la dilución y se depositaron en la comunicación de un sistema de tres fases (dos cámaras/una membrana lipídica artificial), la cual fue cargada en dos formas diferentes: 1) Se depositó una solución del amortiguador de aislamiento a pH 7.2 en ambas cámaras, y se colocan en la cámara A los electrodos de Na^+-selectivo de Orión, catión-selectivo de Beckman y los de referencia, mientras que en la cámara B se colocó el electrodo de pH. Los diferentes electrodos fueron conectados a dos potenciómetros Beckman 4500 y Orión R95. A continuación se colocó la muestra del AAPEN en la comunicación de ambas, los electrodos catión-selectivos se calibraron a cero y se les verificó la respuesta de Nernst. En el caso del electrodo de pH, éste fue calibrado en el intervalo de 7 a 4 unidades con soluciones de referencia, manteniendo una temperatura de 20 °C. 2) La única diferencia con el procedimiento anterior es que el sistema se cargó con agua desionizada a un pH ≈ 5.30 en ambas cámaras. En ambos procesos la actividad se disparó con un pulso de 15 µl de una solución de NaCl 0.7 M (Figura 8).

Sistema de proteoliposomas para determinar la actividad de antiport Na^+/H^+.

Para determinar la activiad antiport en la muestra tratada con N-octilglucósido ya purificada por HPLC, se diluiyó a 8 mg ml^{-1} en la misma solución de asolecitina de soya enriquecida y colesterol (Sigma Chemical, tipo II) a una concentración de 10 mg ml^{-1}, previamente prefiltrada en alúmina y sonicada por dos minutos en un sonicador Sonnifier modelo 25, en baño de hielo. A la dilución señalada se obtiene el mejor rendimiento en la incorporación de la muestra. Después se agregó piranina 0.002M (un indicador fluorescente de pH) y se resonificó hasta clarificar. Se refiltró en una columna 30.0 x 2.0 cm de Sephadex G 25 equilibrada con una solución amortiguadora de KOH 0.002M, HEPES 0.02M a pH 7.0. Las fracciones obtenidas se colectaron y reunieron diluyéndolas cinco veces y centrifugándolas después a 100,000 x*g* durante 30 minutos. La pastilla se resuspendió en

0.2 ml del amortiguador de equlibrio. La actividad se determinó por medio de flourescencia a 460 nm de exitación, utilizando pulsos de las soluciones de NaCl (4.0 M) y KCl (4.0 M). Para establecer claramente la característica de antiport se trató con amiloruro, y analizando cualitativa y cuantitativamente el grado de inhibición.

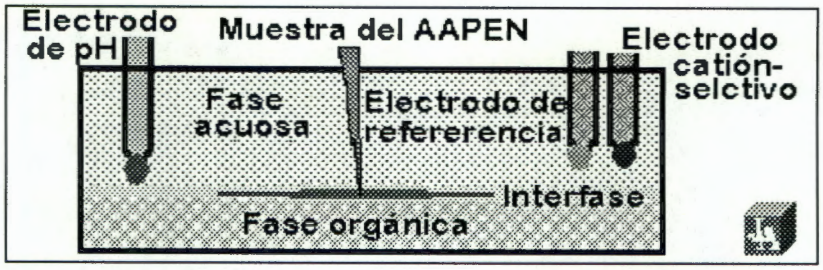


Figura 8. Esquema del sistema de dos fases, para la determinar de las tasa de unión del AAPEN a cationes.

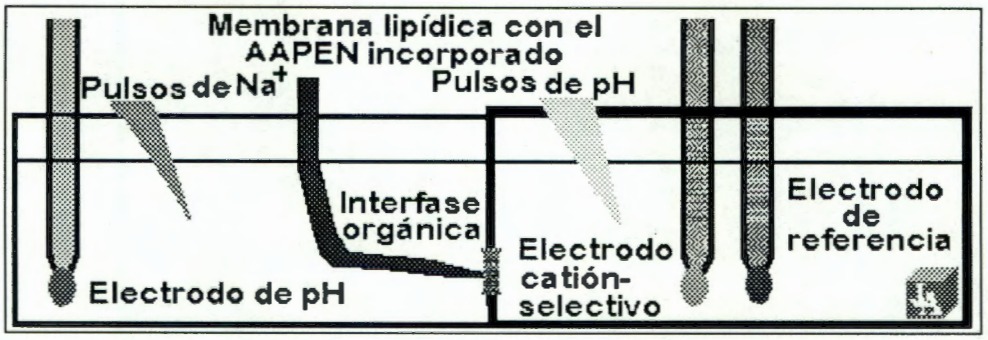


Figura 9. Esquema del sistema de tres fases, para la determinación de la actividad de transporte iónico.

Digestión con enzimas proteolíticas de la fracción con actividad de antiport.

La digestión de la fracción con la actividad de antiport se realizó con dos enzimas proteolíticas: la quimotripsina y la papaína, cada una en un ensayo por separado. La concentración molar ensayada de las enzimas proteolíticas se estableció con una relación veinte veces mayor que la concetración del AAPEN. La mezcla de proteínas se incubó a 25 °C durante 15 min y a continuación se enfrió a -4 °C para disminuir al máximo la actividad enzimática. Posteriormente, los productos de sendas digestiones se usaron para ensayar los experimentos de transporte y asociación, además se determinó el resultado de las digestiones por medio de una electroforesis en gel de acrilamida al 20% con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

Determinación de las energías de unión.

Se depositan 8 mg de la muestra homogénea de proteínas en la interfase de un sistema de doble fase H_2O/cloroformo, extendiendo la misma en toda la superficie. La titulación se realiza con pulsos de una solución 0.001 M para cada uno de los cationes seleccionados, registrando los cambios por medio de dos electrodos, uno Na^+-selectivo de Orión y otro Catión-selectivo de Beckman, además de los electrodos de calomel como referencia, y en la cámara B el electrodo de pH. Los electrodos fueron conectados a dos potenciómetros Beckman 4500 y Orión respectivamente (Figura 8).

Medición de las señales de dicroísmo circular.

Una muestra de la proteína concentrada en una liofilizadora HETO, se dializó contra H_2O desionizada y se diluyó hasta a una concentración de 170 μM con el amortiguador de aislamiento A, diluido 1:15, y

ajustando el valor de pH a 7.2. El espectropolarímetro JASCO J500A fue calibrado primero en la región de 180 a 250 nm para establecer los efectos sobre la estructura secundaria de la proteína, y posteriormente en la region de 250 a 350 nm para conocer el estado de la estructura terciaria. La línea base se determinó utilizando el mismo amortiguador como sistema basal. Las determinaciones realizadas se hicieron para las siguientes especies: AAPEN libre de catiónes, AAPEN-Na^+ y AAPEN-K^+, los cuales se prepararon mediante la saturación del AAPEN con una solución del catión correspondiente, a una concentración molar final del metal de un orden de magnitud superior a la del AAPEN, en una celda de 0.5 mm de recorrido óptico para la región de 180 a 250 nm y de 1 cm para la región de 250 a 350 nm. Los espectros se obtuvieron en la región del ultravioleta lejano, de 190 a 250 nm, donde se puede estudiar la estructura secundaria y por lo tanto, se pueden determinar los efectos de la asociación de cationes sobre dicha estructura de la proteína (Newmann y Snatzke, 1990). Posteriormente se estimaron los porcentajes de hélice α y estructura β que constituyen la estructura del AAPEN, usando una base de datos y una minicomputadora HP-3000 (Hennessey y Johnson, 1981).

Los experimentos de DC en la región del utltravioleta cercano se llevaron a cabo con el mismo sistema, en un intervalo de 250 a 320 nm, para determinar los efectos de los cationes sobre la estructura terciaria de la proteína. La calibración y los barridos se realizaron en el intervalo de 250 a 320 nm, con las mismas soluciones, pero con una concentración de proteína 100 veces mayor ($\approx$ 2.0 mg de proteína).

Predicción de la topología de las regiones transmembranales.

La predicción por PHD (*Prediction of HeilDelberg*), versión 1.0 1993, utiliza una base de datos HSSP con 40292 secuencias almacenadas (Rost y Sander, 1993a), a través de la red INTERNET con una computadora SiliconGraphics Índigo 2. Este sistema utiliza una red neuronal usando para comparar y análizar de manera simultánea diferentes secuencias y estructuras, con diversos grados de homología, almacenadas en su base de datos, encontrando las distintas secciones homólogas y estableciendo los posibles acomodos de las regiones en el espacio y sus estructuras más estables, así como el grado de homología que presenta con otras proteínas similares. Esto último, nos provee del concepto de coeficiente de variación, un indicador con el cual se determina la tasa de cambio , observada en las posiciones de cada uno de los residuos en la secuencia. En este indicador se consideran los siguientes puntos: la conservación de residuo en las cadena analizadas, las diferencias entre el residuo original y el residuo sustituyente. La red es capaz de predecir dos estados helicoidales de las regiones transmembranales y restar dos unidades de análisis de salida. Esta predicción es asignada de acuerdo al valor de la unidad de salida en forma descendente. Con base en los valores de las unidades de salida se establece el coeficiente de variación que es una forma de estimar los cambios que aparecen en las diferentes posiciones de los residuos, de acuerdo con los resultados del análisis de alineamiento múltiple de las secuencias. Los valores se "castigan" según sean el número de cambios, las características de aminoácido cambiado (de polar a no-polar, de neutro a polar o no-polar, de neutro a cargado, de positivo a negativo y viceversa en cualquiera de estos casos). El mínimo valor es cero y representa una variación nula respecto a las secuencias de la diferentes cadenas polipeptídicas seleccionadas, en mayor valor posible es de 99 y representa una cambio total del residuo en la secuencia (Rost y Sanders, 1993b).

El parámetro más usado para estimar el acomodo de los segmentos transmembranales de las proteínas en el interior de una membrana, es determinar las cargas eléctricas que presenta las secciones polares que

unen a los segmentos transmembranales. El costo energético para hacer cruzar una carga eléctrica a través de una bicapa lipídica es muy alto como para permitir el paso de una gran cantidad de estas en un segmento polar, al tomar su arreglo una proteína anfipática en la membrana. Si hay pocas cargas eléctricas presentes, es posible considerar que esta sección atraviesa la membrana y se localiza en el exterior de la célula. Por el contrario, cuando una sección posee una gran cantidad de cargas (más de 3 grupos cargados eléctricamente) inducen a pensar que esta sección permanece en el compartimento interno o matriz intracelular (von Heijne, 1994).

La predicción del estado conformacional de cada residuo en una secuencia es calculada de la siguiente manera: para cada residuo se realiza una evaluación de cada uno de cuatro estados conformacionales con una ecuación (esos cuatro estados son: hélice α, hoja β extendida, giro β y un estado aleatorio-indefinido) validos para este método. La ecuación a resolver considera la influencia de 8 residuos antes y después de cada aminoácido estudiado. Para cada estado conformacional se da una constante decisiva (c.d.), la cual se sustrae del resultado de la ecuación. Esta constante es un parámetro ajustable escogido con la intención de obtener la predicción óptima. Una vez que las cuatro ecuaciones se han calculado, el estado de conformación para el residuo estudiado, se selecciona de acuerdo con el valor más alto obtenido. La calificación dada a cada uno de los segmentos transmembranales (transmembranales, globulares, de superficie, etc) se basa en la comparación del análisis de las características de los residuos de los segmentos predichos en la proteína estudiada con un algoritmo usado para determinar la estructura secundaria en proteínas solubles en agua, así que es posible que los resultados del ensayo establezcan como globulares a alguna región de la secuencia, aún cuando sea establecida como transmembranal por otros sistemas de análisis. Todos los estudios fueron realizados en una computadora ACER 486 DX a 33 Mhz.

Estructura secundaria.

La predición de los tipos de estructura secundaria (hélice α, estructura en β y cadena aleatoria) se llevó a cabo por medio del programa HELIXMEM de PCGENE y por el método en red neuronal (PHD), utilizando la secuencia ya reportada (Pouyssègur y cols., 1989; Figura 14). El PCGENE-HELIXMEM sigue esta serie de pasos:

[1] **Predicción de los segmentos transmembranales**. Una ventana de 21 residuos se mantiene a lo largo de la secuencia de la proteína, generando una serie sucesiva de segmentos 21 residuos cuya hidrofobicidad <H> es calculada de una tabla, la cual asigna un valor de hidrofobicidad a cada tipo de aminoácido. Para determinar cuales de los segmentos corresponden a hélices α transmembranales, se implementan los siguientes pasos:

a) se eliminan todos los segmentos cuya carga hidrofóbica <H> sea menor a 0.42.

b) se seleciona al 'candidato' a partir de los segmentos restantes, considerando siempre el valor <H> más alto presente y se descalifica a cualquier segmento con más de un residuo en común con el candidato.

c) se repite el paso anterior hasta que todos los segmentos restantes hayan sido escogidos o descartados.

Todos los candidatos serán descartados a menos que:

a) haya al menos un candidato con una <H> mayor o igual que 0.68 o

b) haya dos candidatos, los cuales al sumar sendas <H> el resultado sea igual o mayor que 1.1.

Si cualquiera de estos dos casos ocurre, todos los segmentos candidato se les considera posibles segmentos transmembranales.

[2] **Caracterización de los segmentos transmembranales predichos, asociados a hélices.** Para producir una clasificación, este método usa un gráfico del momento hidrofóbico. Este procedimiento se le aplica a las hélices predichas de la siguiente manera:

a) El análisis comienza con una ventana de 11 residuos a través de la secuencia heliciodal, Entonces se genera un juego de ventanas sucesivas con los valores de <H> y un valor del momento hidrofóbico <æH>, donde ***æh*** se define de esta forma: el valor del momento hidrofóbico de una hélice α idealizada de N residuos, en la cual las cadenas laterales se proyectan perpendicularmente partiendo del eje de la hélice a intervalos regulares.

b) La ventana con el mayor valor de <æH> se seleciona y sus valores de <H> y <æH> son colocados en la gráfica del momento hidrofóbico. Hay tres regiones principales para los tipos de interacciones de las proteínas con la membrana: globular, de superficie y transmembranal. La mayoría de los segmentos transmembranales helicoidales predichos se encuentran en la matriz de la membrana con algunas hélices ocasionales en la superficie. Las regiones transmebranales se subdividen en dos clases: multiméricas y monoméricas.

También se utilizó la red neuronal PHD versón 1.0 1993, y una estación de trabajo Sillicon-Graphics Índigo 2. La red predice tres tipos de estructura secundaria usando números reales a partir de las unidades de salida. La predicción es obtenida por el alineamiento múltiple de las secuencia, seleccionando a partir de la asignación de la máxima unidad correspondiente. Sin embargo estos números contiene información adicional, p.e., la diferencia entre la máxima unidad de salida y el subsecuente valor es usado para calcular el índice de confiabilidad (Rost y Sanders, 1994).

Capítulo tres

Resultados

Hyakujo decidió designar un monje para abrir un nuevo monasterio. Anunció a sus discípulos que elegiría a quien respondiese más sagazmente una pregunta. Luego de colocar un vaso con agua sobre el piso, inquirió: "¿Quién puede decir qué es sin llamarlo por su nombre?". El monje principal dijo: "Nadie puede llamarlo una sandalia". Isan, el monje cocinero, volcó el vaso con su pie, y se fue. Hyakujo sonrió y dijo: "El monje principal perdió". E Isan se convirtió en el director del nuevo monasterio.

Koan Budista.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN.....30
Aislamiento......30
Filtración......30
DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA EN LAS DIFERENTES MUESTRAS.....31
ACTIVIDAD Y AFINIDAD.....32
Afinidad......33
DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA.....34
DICROÍSMO CIRCULAR.....34
PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA.....35

Aislamiento y purificación.

Aislamiento.

Se aisló una muestra proteica a partir del tratamiento de la membrana de mitocondrias de hígado con Tritón X-100 y el choque hipotónico. De ésta se produjo una suspensión con cierta turbidez. Después de haber ultracentrifugado se obtuvo un sobrenadante de color áureo, nítido, brillante y de apariencia oleosa. Este último fue congelado y guardado, posteriormente liofilizado.

Durante los ensayos de espectroscopía de flourescencia, se encontró una interferencia, una actividad de transporte no asociada al AAPEN, inespecífica y no inhibible por amiloruro, que fue atribuida a la presencia de Tritón X-100. Debido a que el Tritón X-100 puede generar peróxidos y alterar los sistemas miméticos de las membranas, se decidió cambiar el tensoactivo Tritón X-100 por N-octilglucósido, que ofrece mejores carcterísticas para conservar las fracciones en las condiciones más adecuadas para almacenamiento y para facilitar la reconstitución de las muestras seleccionadas, en los sistemas modelo ensayados, además de no presentar ninguna clase de artificio que afectase las determinaciones (Neubgebauer, 1988). Este cambio de detergente permitió continuar, sin hacer cambios importantes durante el proceso de aislamiento, excepto el que se indica más adelante. Se obtuvieron un total de 11 ml de la muestra base o solución madre de una suspensión de mitocondrias a una concentración de 50 mg de proteína ml^{-1}, tras lo cual se procesó por lotes a fin de facilitar el manejo y obtener la fracción homogénea requerida.

Filtración.

En los ensayos con Tritón X-100, una vez que se fraccionó la muestra por cromatografía de la filtración en gel, se encontró una fracción de actividad significativa, y que corresponde al hombro izquierdo del pico principal (Figura 10), se inició aproximadamente desde los 72 ml hasta los 132 ml de elución. También, se encontró una fracción que presentó turbidez, lo que impidió hacer una determinación inmediata

de la cantidad de proteína presente en forma imediata, posteriormente se trató de establecer alguna actividad de transporte, sin que pudieran encontrarse valores significativos. Después de congelar y descongelar por dos ocasiones, los solutos de la fracción referida comenzaron a precipitarse.

Cuando se cambió de tensocativo, los resultados de la dispersión, la ultracentrifugación, la liofilización y la filtración no variaron de manera significativa. En este caso se omitió el paso por Sephadex G-100 superfino.

Durante la cromatografía de alta resolución (HPLC) en el cromatógrafo Waters 600, se observó un pico principal y tres picos de una intensidad mucho menor, el pico principal eluyó a un volumen diferente, sin coincidir con el esperado de acuerdo con la masa molecular calculada a partir de la secuencia del AAPEN. Sin embargo, se hizo una determinación de la masa molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción del pico y que presentara la actividad de transporte, encontrándose una sola banda alrededor de los 95 kDa (Figura 11-A).

Posteriormente se obtuvieron las fracciones de la muestra tratada con el N-octilglucósido en lugar del Tritón X-100, también filtradas por HPLC, pero con el cromatógrafo Varian 9012 en substitución del cromatógrafo Waters 600. El perfil de elución en los ensayos de Tritón X-100 con en el Waters 600 y del N-octilglucósido con el Varian 9012 fue similar, pues la variación más significativa fue un leve desplazamiento del pico principal en su volumen o tiempo para elución, sin que se afectara de manera importante el perfil del cromatograma.

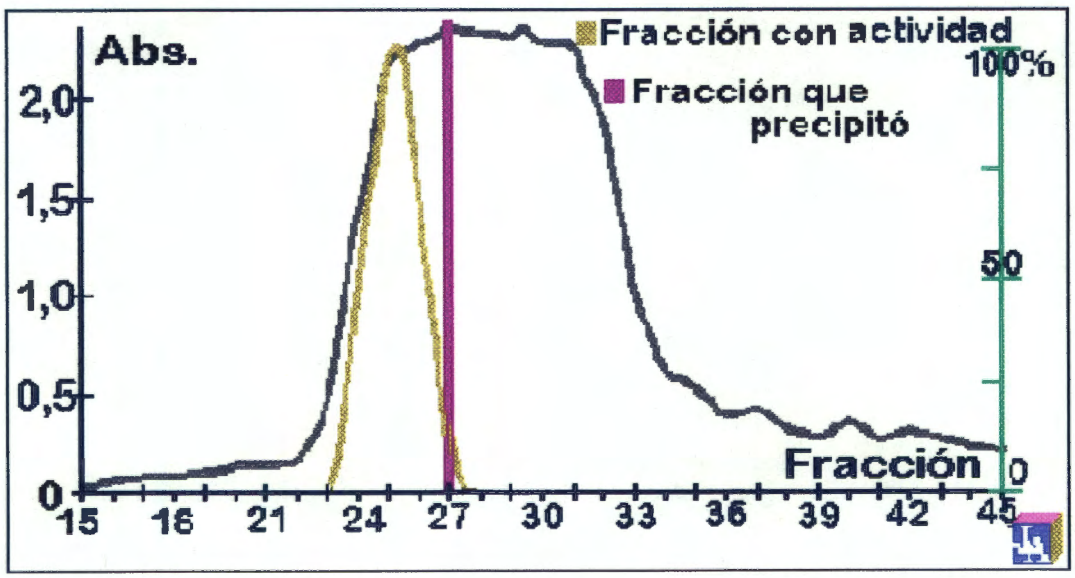


Figura 10. Sección del cromatograma de la filtración en Sephadex G-100 superfino con actvidad de transporte antiport. La linea roja indica la zona con actvidad de transporte.

Determinación de la cantidad de proteína en las diferentes muestras.

En las primeras etapas del aislamiento, la concetración total de proteínas se determinó por el método de Biuret, obteniéndose un valor de 96 mg de proteína ml^{-1} en 9 ml totales de la suspensión enriquecida de mitocondrias. En los ensayos posteriores se encontró que las cantidades manejadas estaban por abajo de la sensibilidad de este método. Entonces, para conocer la cantidad de proteína en cada una de la fracciones obtenidas se utilizaron: el coeficiente de extinción molar teórico anunado a la absorbencia a 280 nm; y el cociente de absorbencia A_{280}/A_{260}. La muestra se diluyó a una concentración de 10.3 mg de proteína ml^{-1} para realizar la filtración por Sephadex G-100 superfino, cuyas fracciones fueron concentradas a un volumen total de 18 ml una concentración de 8.4 mg

de proteína ml^{-1} para llevar a cabo la fltracción por HPLC del cual se volvió a concentrar hasta un volumen total de 10.3 ml y una concentración de 2.8 mg de proteína ml^{-1}, en los ensayos con Tritón X-100.

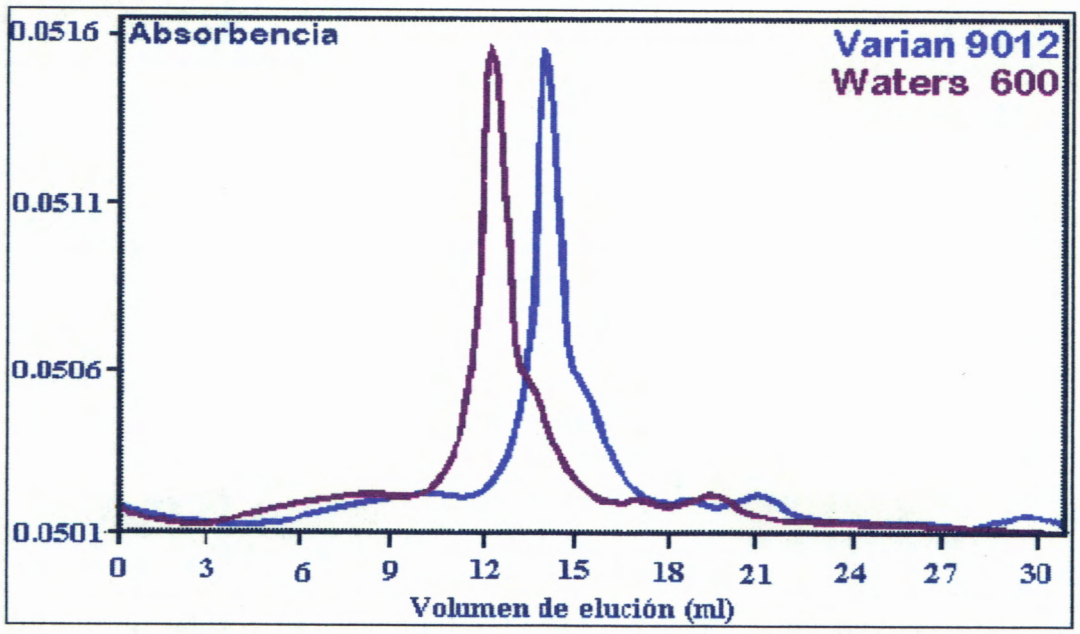


Figura 11. Cromatograma del filtrado por HPLC. (Azul) El cromatógrafo Waters 600 de Millipore y Tritón X-100. (Magenta) El Cromatógrafo de Varian 9012, y N-octilglucósido. Se observar el mismo perfil de elución en ambos cromatogramas.

En el caso de la purificación con N-octilglucósido como el tensoactivo, se obtuvo una concentración de proteína de 10.8 mg de proteína ml^{-1} en 8 ml para la salida de la filtración en G25, y de 2.64 mg de proteína ml^{-1} en 2.9 ml para las fracciones del HPLC con actividad de antiport.

Actividad y afinidad.

En cada etapa de la purificación fue determinada la actividad de transporte, como indicador de la presencia de la fracción con la proteína buscada. Para tal efecto se diseñaron dos sistemas potenciométricos de medición. Las tasas de unión y la actividad de antiport se determinaron en forma potenciométrica, primero en un sistema de dos fases **(lipofílico/hidrofílico)** con éter como la fase lipofílica contra dos medios acuosos diferentes **(amortiguador de aislamiento y agua desionizada)**, con el fin de conocer las posibles tasas de unión de cationes, indicando la presencia de la proteína, a lo largo del proceso de aislamiento y purificación del AAPEN; este sistema mimetiza la interfase membrana-agua.

El segundo sistema es de tres fases y se basa en la presencia de dos compartimientos aislados casi por completo, excepto por una pequeña comunicación donde se coloca una barrera semipermeable como un membrana, que en cierta medida mimetiza la compartamentalización dentro de la célula. Sin embargo, para la obtención de señales significativas de la actividad de transporte, fue necesario establecer las condiciones adecuadas para la determinación y cuantificación de dichas actividades, de ello se derivó en una solución saturada de colesterol en lugar de la concentración recomendada de 2.3 mg ml^{-1} y el mantener una temperatura ambiente por debajo 20 °C en los sistemas modelo; todo con el fin de mantener la membrana lipídica estable. Además se incrementó en un orden de magnitud en la concetración de las soluciones correspondientes de los diferentes cloruros de Na^+ y K^+, a partir de las cuales se tomaron los pulsos para disparar la actividad de transporte.

La distribución de los electrodos de pH, catión selectivo y de referencia en las cámaras fue ensayada en vairas disposiciones, finalmente el electrodo de pH se acomodó en la cámara a donde se inyectan los pulsos y los otros dos electrodos se colocan en la otra cámara.

Se ensayaron varios modelos para la determinación, primero con proteoliposomas - los proteoliposomas son de gran utilidad al permitir ensayos espectroscópicos que poseen mayor sensibilidad, y facilitando la reconstitución en condiciones más naturales; pero sin lograr datos concluyentes, posteriormente los sistemas modelo de dos y tres fases, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III. En forma posterior se retomaron las técnicas con proteoliposomas, de acuerdo con las recomendadciones del Sr. Jorge Ramírez Salcedo del Instituto de Fisiología Celular, se revisó la técnica de aislamiento utilizando las nuevas muestras y fraccionando por HPLC directamente, -previa prefiltración en Sephadex G-25, la mayoría de estos ensayos fueron realizados por actividad de transporte y la inhibición del mismo.

Afinidad.

Conforme se avanzó en los procesos de aislamiento y purificación, se encontró que la afinidad específica para Na^+ en las diferentes muestras aumentaba (iniciando en el aislamiento de mitocondrias y llegando hasta la filtración en gel) como se aprecia por el aumento en la pendiente de las curvas de la Figura 14. Sin embargo, después del último paso de purificación, la filtración por HPLC, se observó una pérdida de la actividad específica, que puede ser atribuible a los pasos de purificación, las condiciones de los ensayos y las interacciones del AAPEN con el medio y el material de la columna y sobre todo a la eliminación de una parte del tensoactivo durante los ensayos de HPLC.

Los ensayos de unión y transporte se complementaron con el ensayo de otros dos cationes: Li^+ y Rb^+. La mayor afinidad presentada por el AAPEN fue hacia el Na^+ seguido del Li^+, del Rb^+ y por último el H^+, estos dos últimos con los valores más bajos del conjunto. El K^+ no demostró interacción alguna con el AAPEN dentro de los límites de sensibilidad establecidos en las determinaciones potenciométricas. Asímismo, no se encontró interferencia alguna o desplazamiento de Na^+ por cualesquiera de los cationes K^+ o H^+.

Tabla III. Valores del log Ks (Constante de estabilidad) y DG° para los complejos AAPEN/catión metálico.

Complejo de AAPEN	Log Ks	ΔG° (kcal mol^{-1})
Sodio (Na^+)	3.96 ± 0.30	-5,405
Litio (Li^+)	3.71 ± 0.28	-5,133
Rubidio (Rb^+)	3.10 ± 0.31	-3,951
Hidrógeno (H^+)	3.19 ± 0.38	-4,205

La titulación se realizó en un sistema de dos fases $H_2O/CHCl_3$, depositando el AAPEN en una suspensión saturada de Asolecitina-Colesterol/$CHCl_3$ saturada, en la interfase (Lugo-R. y cols., 1994)

Los reportes previos de Kakar y cols. (1989) apoyan las observaciones de interacción y transporte del AAPEN con otros cationes como Li^+ y Rb^+. Los resultados muestran que el Li^+ actúa de manera similar al Na^+ aunque con un mayor ΔG° que el Na^+ (Tabla III), en cambio el Rb^+ mostró una actividad de gran similitud al H^+, todo está de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde se explica que en la actividad de transporte antiport el Na^+ puede sustituirse por Li^+ con una pérdida mínima de la eficiencia del sistema y de la incapacidad del mismo sistema para discernir entre Rb^+ y H^+ (Kakar y cols., 1989; Fliegel y Frölich, 1993). Los resultados con K^+ no se muestran en la tabla y la gráfica, debido a la imposibilidad para determinar alguna actividad de transporte o de complejación en cualquiera de los ensayos realizados con este catión en el

sistema elegido (Kakar y cols., 1989; Fliegel y Frölich, 1993). Un hecho remarcable fue la dependencia del transportador a la presencia de H, para iniciar los ensayos de actividad en los sistemas de tres fases.

Los valores estimados para la K_S o constante de estabilidad y su logaritmo permitieron determinar las constantes de estabilidad que confirman las observaciones obtenidas. Estos valores de K_S se obtuvieron mediante la interpretación de la gráfica del pNa (potencial del catión sodio en la solución) al alcanzar el máximo de asociación AAPEN-catión.

Digestión proteolítica

La digestión del AAPEN con enzimas proteolíticas se realizó con papaína y quimotripsina, con el objeto de determinar si existen algunos segmentos del AAPEN que mantengan la actividad de transporte de cationes. Después de la digestión se hicieron ensayos de transporte con una mezcla de los productos de la digestión, sin que mostraran algún indicio de transporte catiónico o interacción con los cationes en las mediciones potenciométricas. Posteriormente, los productos de la digestión de estas enzimas fueron determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), obteniéndose seis bandas en el caso de la papaína y ocho bandas en el caso de la quimotripsina (Figura 12). Cuando se ensayó la actividad de transporte al combinar entre sí las fracciones que resultaron de la digestión por enzimas proteolíticas no se encontró evidencia alguna de intercambio catiónico.

Figura 12. El gel de la electroforesis con la muestra homogénea del AAPEN a partir de la filtración por HPLC (carriles 1 y 4) y las digestiones con papaína (carriles 2 y 5) y quimiotripsina (carriles 3 y 6).

Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular del AAPEN se muestran en la Figura 13a. Antes de obtener dichos espectros se determinó, por medio de espectroscopía de absorción en la región del ultravioleta lejano, que el mejor ambiente de lectura sería el amortiguador de aislamiento A sin aditivo alguno, por ser el de menor interferencia en las señales obtenidas entre los 250 y los 190 nm. En esa figura se presentan los espectros de los ensayos del AAPEN, tanto en ausencia como en presencia de Na^+ o K^+, con una concentración de proteína de 0.158 mg ml^{-1}, sin que se presenten cambios significativos en las señales debidas a la presencia

de iones metálicos. Las señales del AAPEN libre y del AAPEN-Na^+ fueron las que tuvieron la menor cantidad de ruido, incluso a las menores longitudes de onda. En cambio los ensayos con K^+ presentaron las resoluciones más bajas en el intervalo de 198 a 190 nm, al grado de impedir lecturas de las señales en ese intervalo. Los contenidos de estructuras secundarias que componen la proteína según el análisis de los espectros por dicroísmo circular por el método de Hennesey y Johnson (1981), se muestran en la tabla J.

El método de Hennessey y Johnson fue programado en FORTRAN en una computadora HP-3000 a partir de los vectores característicos propuestos por sus autores. Con este programa fue posible determinar los valores de la primera columna de la Tabla V. Los experimentos se realizaron a longitudes de onda entre 190 nm y 250 nm para el UV lejano y entre 250 y 350 para UV cercano. Este método determina la mejor combinación de estructuras secundarias (hélice α, estructura en β y cadena aleatoria) cuya suma de porcentajes sea 100 % y que permita la mejor recontrucción del espectro experimental.

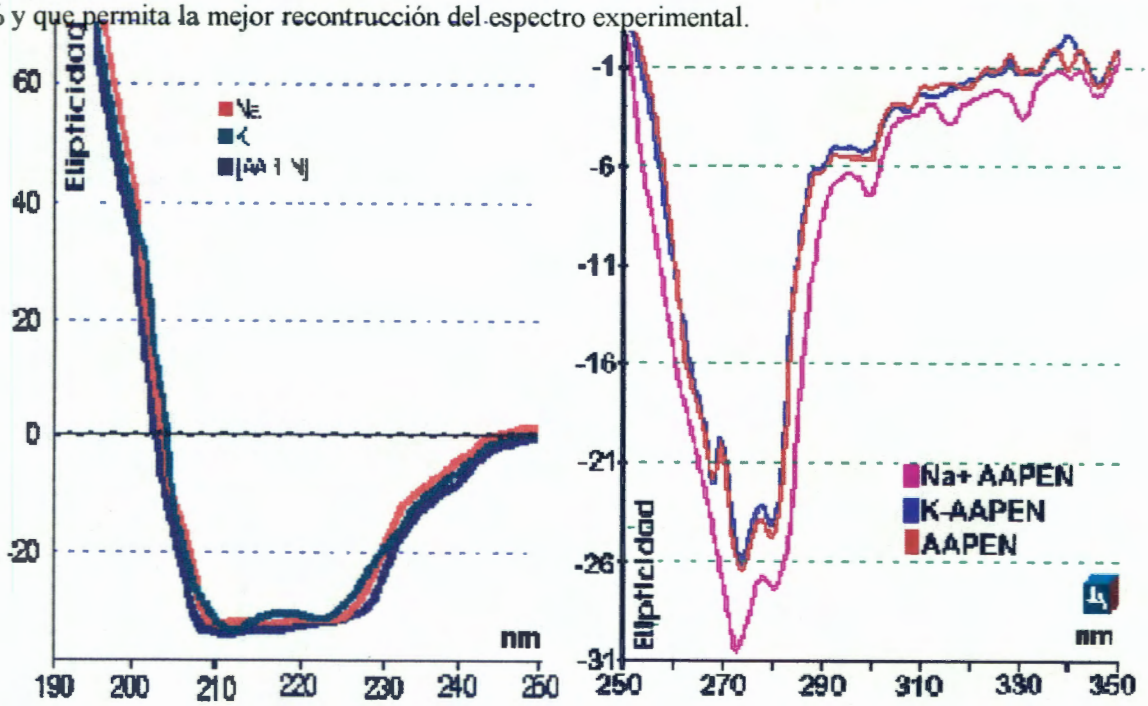


Figura 13. Los espectros de dicroísmo circular: a) En el UV lejano se puede ver que no hay diferencias significativas entre ellos (más detalles en la discusión). b) En el UV cercano se observa una diferencia entre los perfiles del AAPEN asociado a Na^+ contra el AAPEN solo y asociado con K^+.

Los ensayos de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano (> de 250 nm), mostraron una diferencia en la intensidad entre los espectros del AAPEN libre contra el complejo formado por AAPEN- Na^+ (Figura 13b).

Predicción de la estructura secundaria.

Estimados los contenidos de estructura secundaria por el análisis de los espectros de dicroísmo circular, para las predicciones de la estructura secundaria del AAPEN se utilizó la secuencia reportada por Sardet y cols., (1989) y Orlowsky y cols., (1992). Después se estimaron los porcentajes de hélice **a** y estructuras **b** de las estructuras del AAPEN por los sistemas de análisis de las secuencias que constituyen los segmentos transmembranales (el PCGENE-Helixmem en una Acer 433DX). En forma posterior, se procedió a examinar la secuencia proteica con los otros métodos de predicción, en la red neuronal PHD ya descrita. Los resultados de los análisis se muestran en las figuras 16 y 17.

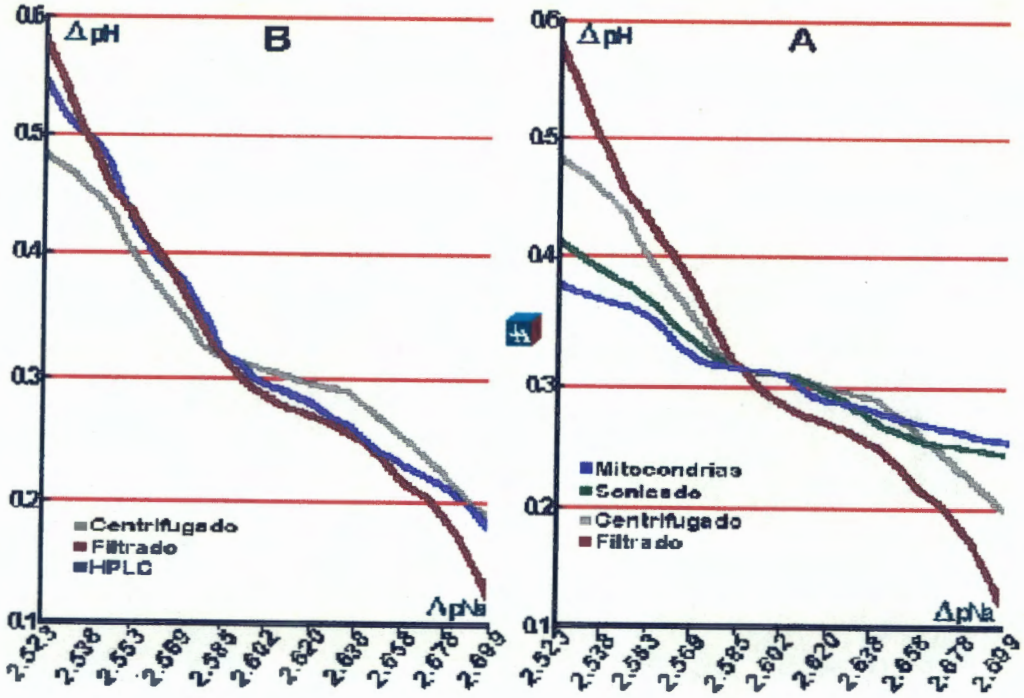


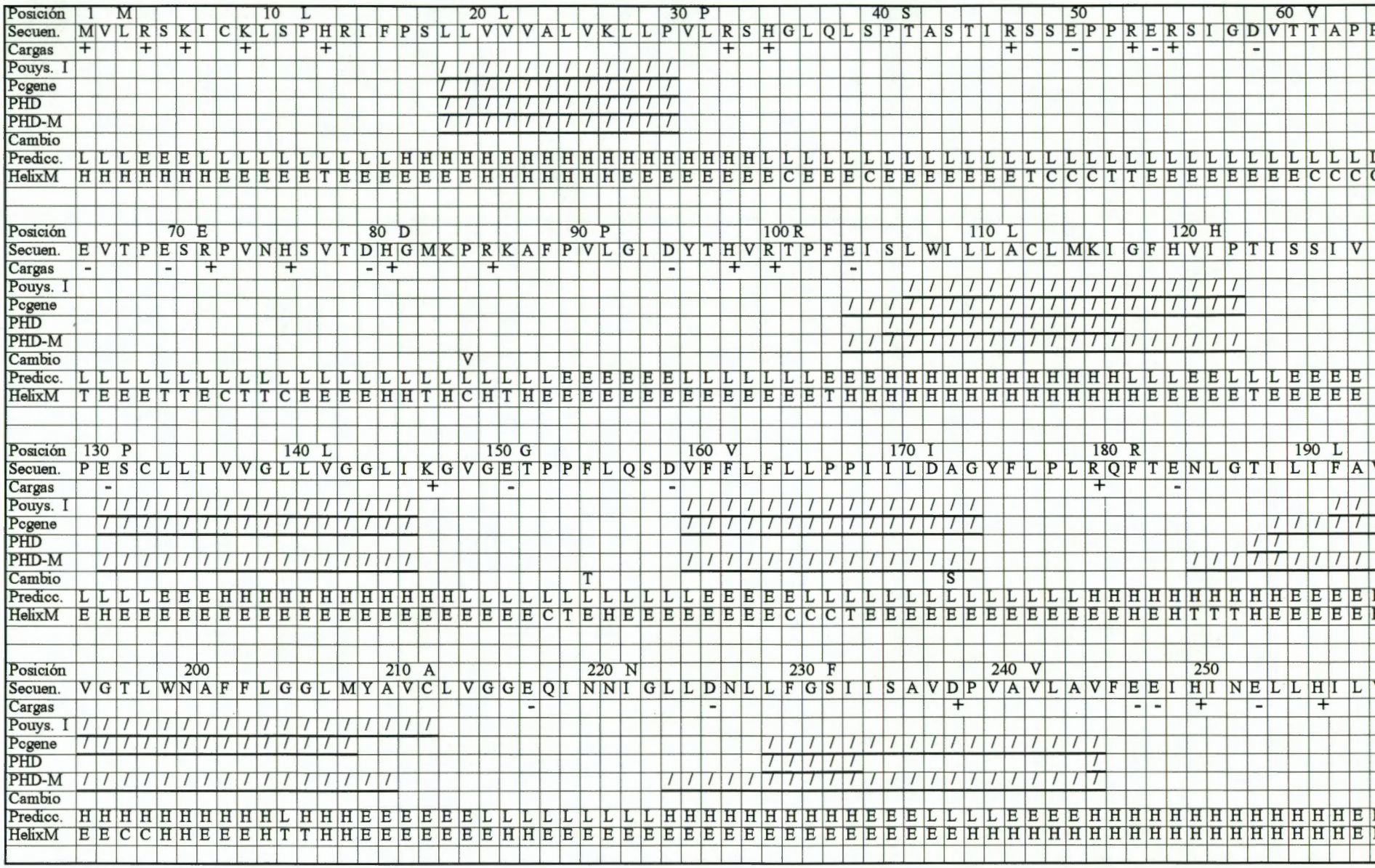
Figura 14. Gráfica de los incrementos del ΔpNa vs. ΔpH, como índice de la actividad, según se avanza en los proceso de purificación de la muestra proteica. La actividad específica corresponde a la pendiente de cada curva, partiendo desde mitocondrias hasta el ultracentrifugado (A). Del filtrado hasta el ultrafiltrado por HPLC (B).

Se puede observar en la Figura 15 la secuencia de los residuos del dominio transmembranal del AAPEN (los primeros 500 aminoácidos), así como las diferentes predicciones realizadas, alineando los segmentos transmembranales resultantes de cada una. Además también se incluyen los cambios en la secuencia a partir del análisis del alineamiento múltiple de secuencias homólogas, el tipo probable o estado de la estructura secundaria de estos segmentos y las cargas eléctricas de los residuos de las secciones polares. Esto se complementa con el esquema de la Figura 19, donde se muestra el arreglo espacial/geométrico de los segmentos en la membrana proporcionado según las predicciones, la porción de las cadenas laterales en las secuencias con las cargas eléctricas y con la Figura 19, que nos muestra la gráfica de los coeficientes de variación suavizada. De acuerdo con el método empleado se obtuvieron 13 segmentos transmembranales por el método HELIXMEM, 10 por la red neuronal en un análisis múltiple, y 12 por la red neural aunando ahora las caracteristcas fisicoquímicas de los residuos. También, se obtuvo el tipo de estructura secundaria putativo por residuo para cada uno de los segmentos transmembranales y las secciones polares. Aunque la mayoría de los segmentos se predicen como hélices α, también existen dos segmentos (el número 8 y el numero 11 de acuerdo al grupo de trabajo) cuyo tipo de estructura secundaria podría ser hoja β. El segmento 8, junto con el 9, son los de mayor longitud y presentan dos tipos de estructura secundaria estructura β y hélice α, en ese orden, el segmento 11 se predice como estructura β preferentemente. En la misma Figura 15 también se muestran 12 secciones polares de unión de segmentos transmembranales, su longitud, secuencia y los tipos de estructura secundaria que presentan. La primera, segunda y décima secciones son las más grandes y las de mayor número de cargas, en particular la segunda sección, la cual posee también el único sitio de glucosilación *in vivo* y el sitio de corte para separar el péptido señal. El resto de los segmentos parecen poseer longitudes que van desde los 5 hasta 15 residuos. En cuanto a las cargas

eléctricas las cantidades totales van de 2 a 7, siendo predominantes las cargas positivas. Los coeficientes de variación de las secciones de unión son los mayores excepto por la sección __ se presentan en la figura 17.

Las gráficas de hidropatía de la región N-terminal en las diferentes isoformas mantienen un patrón muy similar, prácticamente idéntico. Las predicciones con base en los perfiles de hidrofobicidad pueden sugerir que la RTM está constituida de seis a doce segmentos transmembranales, cada uno con una gran hidrofobicidad, - estos estudios se basan en las similitudes de las secuencias de los distintos AAPEN. En la parte hidrofílica los perfiles de hidrofobicidad varían notablemente, lo cual sugiere que esta parte es la que confiere las características específicas y de identidad para cada isoforma del AAPEN (Fliegel y Frölich, 1993).

Como se ve en la Figura 15, sólo el primer segmento es idéntico en las predicciones consideradas y en la primera sección polar se encuentra el sitio de corte y el único sitio de glucosilación utilizado in vivo. A partir del segundo segmento, se observa una diferencia de la longitud y la presencia de los segmentos predichos. La simbología de la figura es la siguiente: **Posición**- la posición de los residuos en la secuencia, **Secuenc.**-la secuenca de aminoácidos del AAPEN, **Cargas**- las cargas eléctricas de los residuos, **Pouys. I**- la predicción de los segmentos transmembranales segun Pouysègur y cols., 1989, **Pcgene**- la predicción que resulta de los análisis por el método del HELIXMEM de PCGENE, **PDH**- la predicción de los segmentos transmembranales por la red neuronal de Heildelberg, según el análisis de alineamiento múltiple, **PHD-M**- la predicción por la red neuronal de los segmentos transmembranales, según las características hidrofóbicas, **Predicc**.- la predicción del tipo o estado de estructura secundaria para cada uno de los residuos de las regiones transmembranales, **GGBS**.- predicción de la estructura secundaria para cada uno de los residuos de la secuencia, y **Cambio**.- son los cambios en la secuencia de acuerdo con las diferentes isoformas que analizó el PHD. Ademas, un análisis del coeficiente de variación de los diferentes segmentos transmembranales nos dio un perfil donde se observan las zonas de gran variabilidad en las regiones polares que unen los segmentos transmembranales y con un coeficiente de variabilidad mucho menor en las regiones anfipáticas o transmembranales, todo esto se muesta en la Figura 17, que es una gráfica de los coeficientes de variabilidad del dominio transmembranal contra el número de aminoácidos. La rgión citoplasmática se incluye en la Figura 18, debido a que no todos los sistemas de análisis de secuencia la reconocían y estimaron igual que las regiones transmembranales (por esto se le dio preferencia a las regiones de caracteríticas hidrofóbicas) y los resultados de las predicciones se presentan en la Figura 18. También se presenta una lista de la inserciones que presentan las diferentes secuencias de los otros AAPEN, que se utilizaron en los análisis de alineamiento múltiple de secuencias (Tabla IV). En la Tabla V se presentan en forma sucinta los porcentajes obtenidos de los diferentes tipos de estructura secundaria, por cada uno de los métodos utilizados.


Posición
Secuen.
Cargas
Pouys. I
Pcgene
PHD
PHD-M
Cambio
Predicc.
HelixM

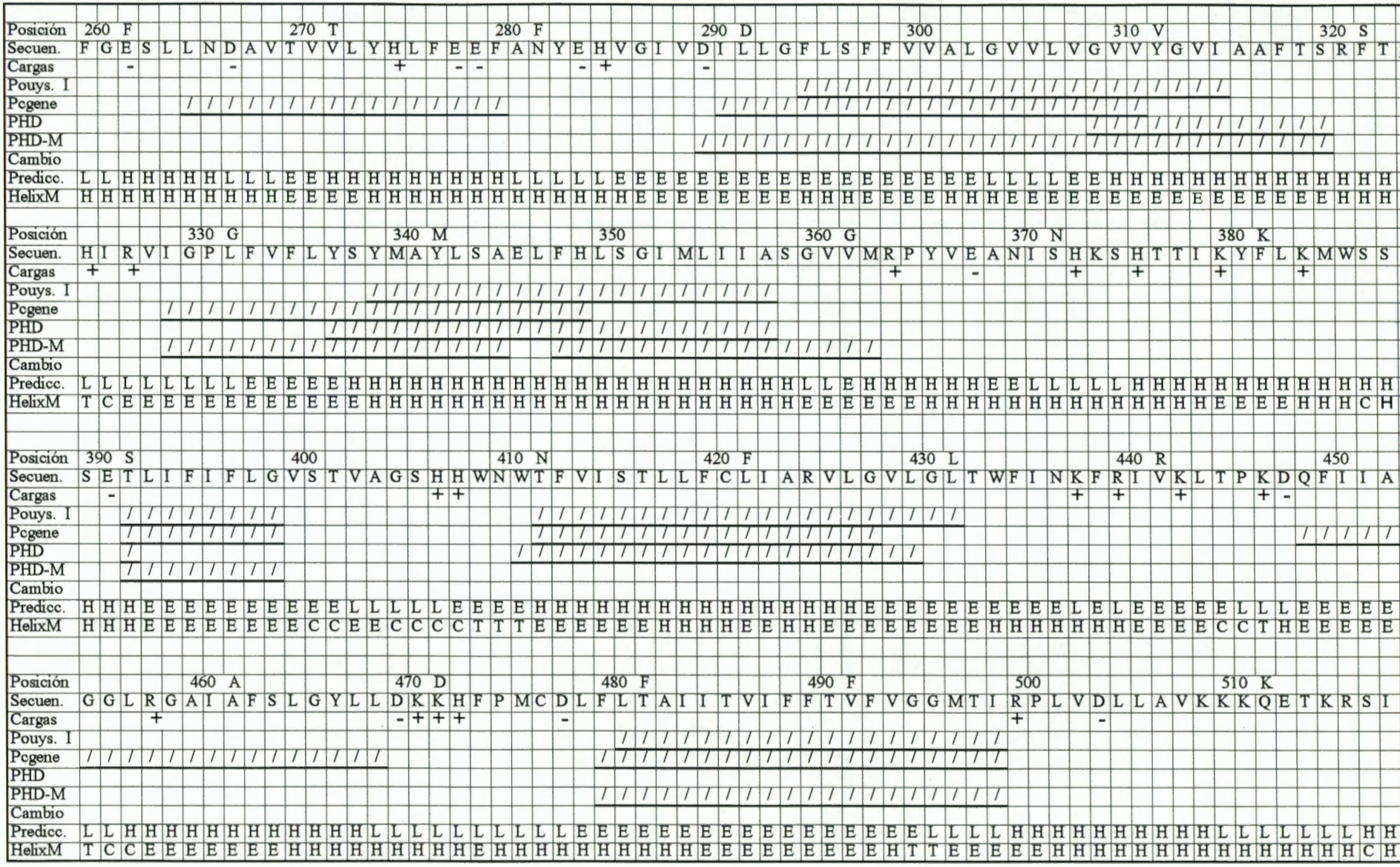


Figura 15. Secuencia de los aminoácidos del AAPEN. Se observan los segmentos transmembranales putativos, según la fuente de la predicción, así como, las cargas de los segmentos polares. Es impotante notar, que sólo se representa la región anfipática de la secuencia del AAPEN, la cual abarca los primeros 500 residuos.



Figura 16. Secuencia de los residuos y predicción de las estructuras secundaria que se estiman para la región citoplasmática del AAPEN según la predicciónes efectuadas.

En la Figura 16 se muestra la predicción de la estructura secundaria para los residuos que corresponden a la región citoplasmática. En esta gráfica podemos observar que no existe un comportamiento definido en los arreglos estructurales de los diferentes residuos o características determinates de las diferentes estructuras.

Tabla IV. Posición y alineamiento de las inserciones al comparar las diferentes secuencias del análisis múltiple por PHD.

Alineación	3	3	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8
Posición inicial	67	85	148	282	155	282	405	155	282	408	173	278
Posición final	69	89	117	252	108	236	361	106	234	359	56	161
Secuencia	pLHh	pVr	gTh	kMHKf	fTl	tLGg	pLi	fTl	tLGg	pVi	sSg	kFa
Longitud	2	1	1	3	1	2	1	1	2	1	1	1

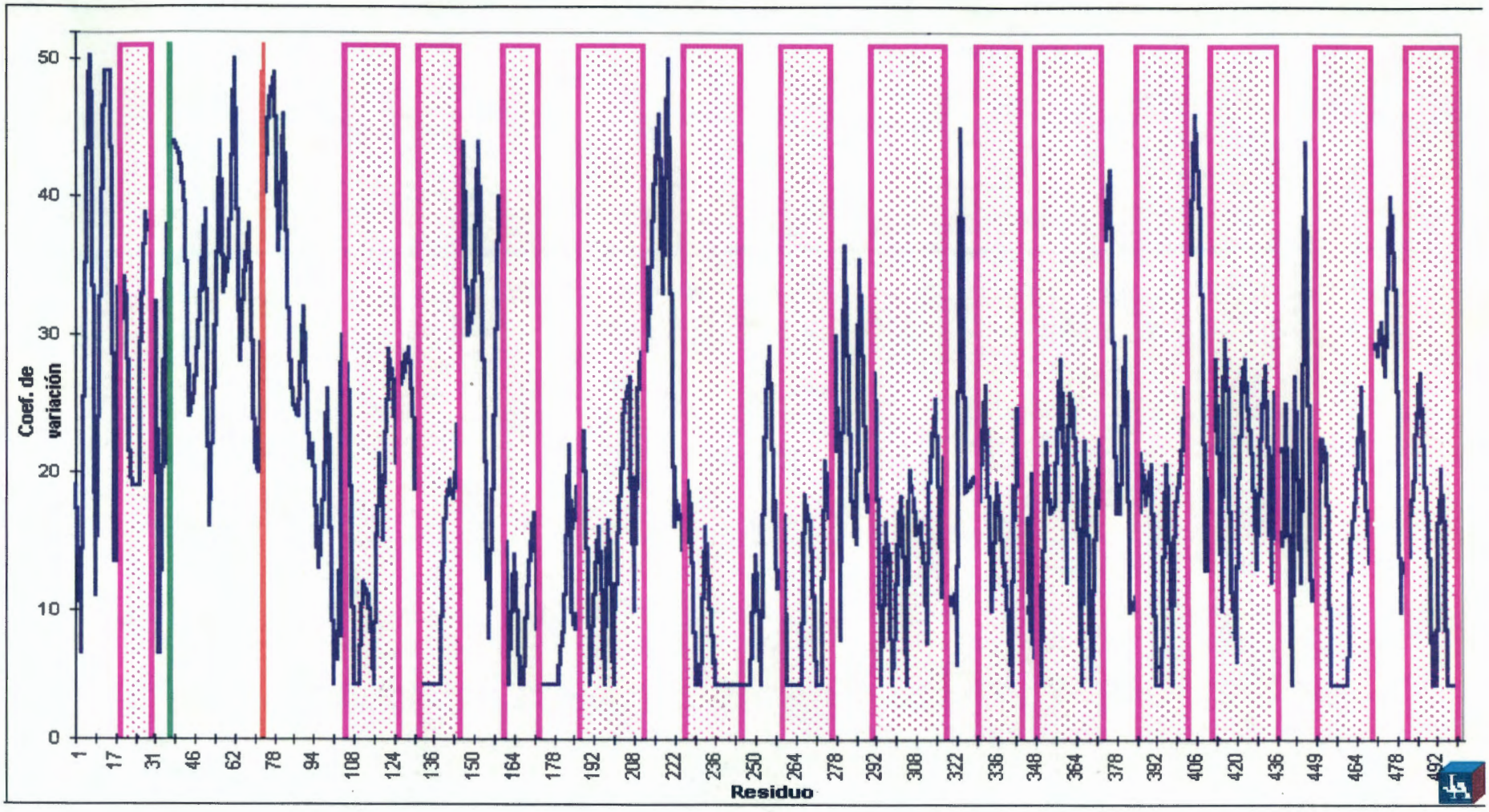


Figura 17. Gráfica del Coeficiente de Variación por residuo de aminoácido en la región transmembranal del AAPEN. Marcado con el color rojo, aparece el sitio de corte conservado ampliamente en los diferentes AAPEN reportados. Además se marca el único sitio de glucosilación *in vivo* de la proteína.

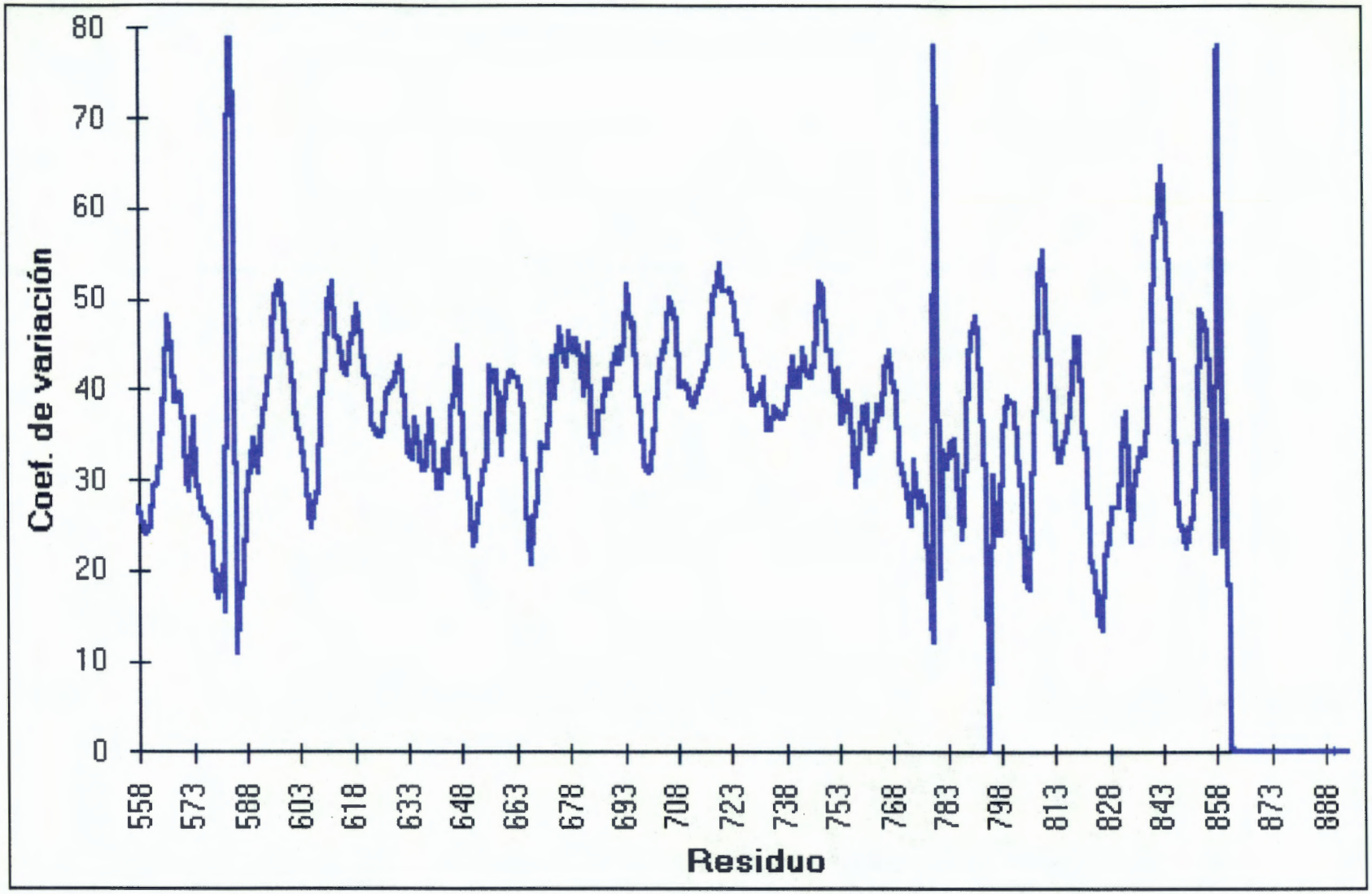


Figura 18. Gráfica del Coeficiente de Variación por residuo de aminoácido en la región citoplasmática del AAPEN. Partiendo del residuo 500 hasta finalizar la secuencia, eta región mantiene una variabilidad constante en los diferentes AAPEN reportados.

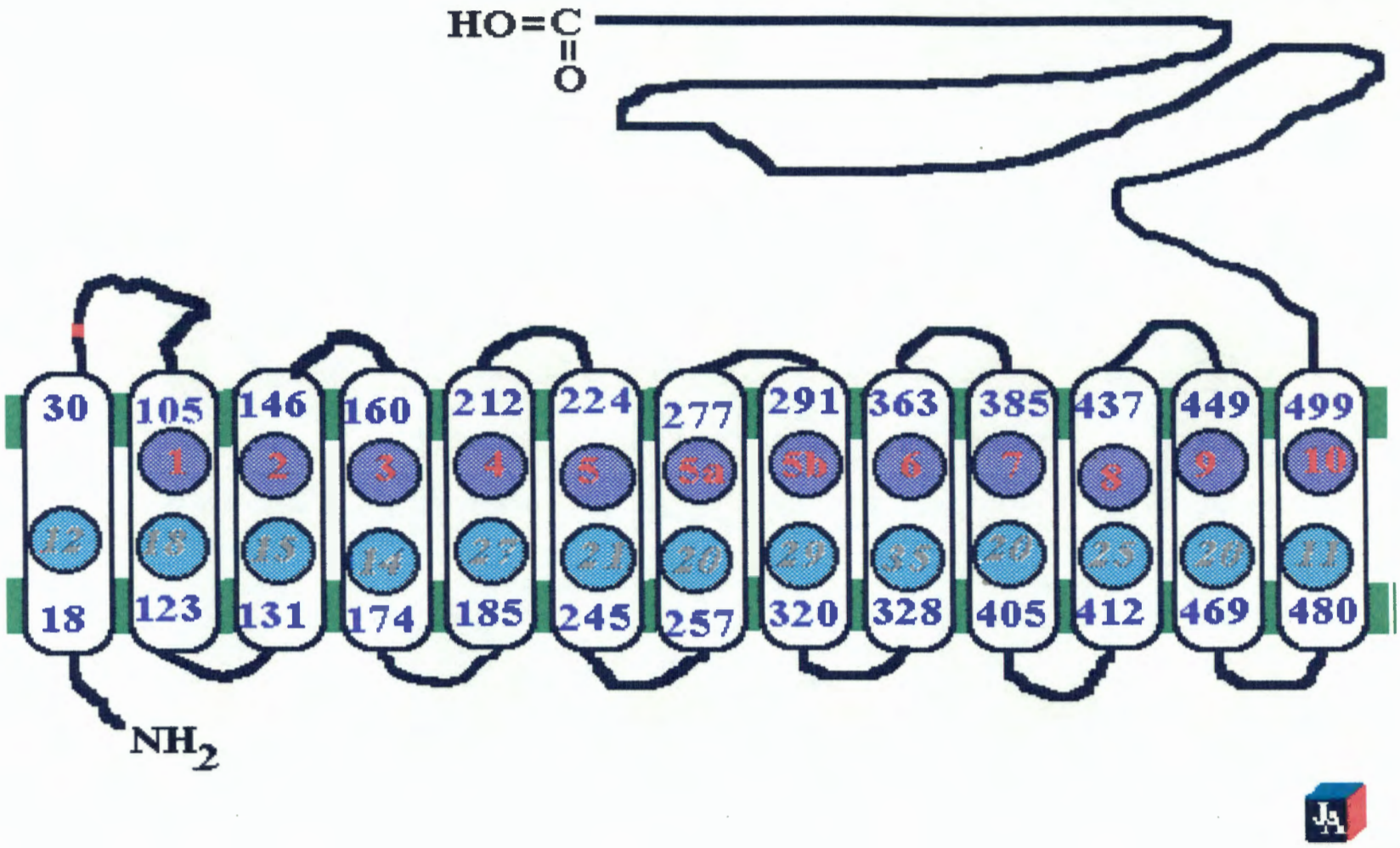


Figura 19. Esquema del arreglo estructural que se estiman para el AAPEN en membrana según los datos obtenidos a partir de las diferentes predicciones de la estructura. Los circulos superiores con numeración clara representa el número del segmento. Los círculos claros con numeración en negro la longitud de los residuos. Los números azules los residuos de inicio y término para cada segmento. Los círculos claros con números rojos representan las cargas en cada región polar.

Capítulo cuatro

Discusión

Shuzan puso a la vista su cayado y dijo: "Si llamas a esto un cayado corto, te opones a su realidad. Si no lo llamas un cayado corto, ignoras los hechos. Entonces, ¿cómo tendrás que llamarlo?. Después, dijo a sus discípulos: "¡Este cayado mío se ha transformado en un dragón y se ha tragado el universo! Oh, ¿dónde están los ríos y las montañas y la magna tierra?".

Koan Budista

PURIFICACIÓN **44**

Determinación de la masa molecular. *44*

ACTIVIDAD DE TRANSPORTE **45**

DICROÍSMO CIRCULAR 46

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA 46

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA **50**

Purificación.

Los ensayos en las dos primeras etapas de aislamiento (obtención de mitocondrias y solubilización de las proteínas de membrana) demostraron la existencia de la actividad de antiport Na^+/H^+ esperada. Durante la filtración en gel, se obtuvo un pico principal amplio y bien definido con su máximo a los 27 ml de elución, en esta fracción se encontró la actividad de transporte, la cual presentó un $\Delta pH = 0.0506$. Los eluídos obtenidos por filtración en gel, estaban muy diluidos, por lo cual se debieron concentrar. Este paso no afectó de manera detectable a las fracciones con actividad de antiport colectadas. Los picos restantes no presentaron alguna actividad de antiport o de asociación a los cationes. Una de las últimas fracciones del pico mencionado, la muestra con turbidez, precipitó la mayor parte de la proteína después de congelar y descongelar dos semanas después, quedando fuera de la sensibilidad de las técnicas empleadas para determinar la concentración de proteína soluble. Incluso cuando esta muestra se concentró, la cantidad de proteína continuó por debajo del límite de detección, por lo que la cantidad disponible quedó en incógnita, lo que impidió que se le realizararan los ensayos de actividad de antiport, su inhibición por amiloruro y las determinaciones de asociación a cationes. La precipitación se puede deber a la pérdida del tensoactivo al ser filtrado en Sephadex G-100. Debido a este fenómeno, en los ensayos con N-octilglucósido se suprimió la filtración por Sephadex G-100, pero se prefiltró con Sephadex G-25 antes de pasar a los ensayos por HPLC. Posteriormente, cuando se compararon los ensayos realizados con el Tritón X-100 y los experimentos con N-octilglucósido, las diferencias más evidentes fueron los desplazamientos de aproximadamente 1 minuto en el pico principal, menor interferencia del tensoactivo en la determinación de la actividad y la facilidad de la muestra para incorporarse a proteoliposomas. Este desplazamiento también se puede atribuir al cambio de cromatógrafo del Waters 600 al Varian 9050, aunque no afectó de manera importante los resultados.

Determinación de la masa molecular.

Los ensayos de ultrafiltración por HPLC, demostraron la existencia de dos picos, uno principal que apareció a entre los 7 y 8 ml de elución, y que alcanzó su absorbancia máxima alrededor de los 13 minutos, el cual presenta la actividad de antiport y otro menor que aparece a los 26 ml sin actividad de transporte.

Empero, no fue posible determinar la masa molecular por esta técnica debido a que el AAPEN interactúa con el material empacado en la columna utilizada (Chicz y Reigner, 1990), incrementando así el tiempo de retención. Esta interacción favoreció la decisión de hacer una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de lauril sulfato de sodio (PAGE-SDS), tiñiendo con azul de Coomasie. Estas electroforesis confirmaron la existencia de una sola banda con una masa molecular estimada cercana a 95 kDa, la masa molecular calculada en base a la secuencia, es de 99,493 Da, mientras que Martin y cols., (1984) le atribuyen un peso moleular alrededor de 82 kDa, por ello se considera que la masa estimada es razonable.

Actividad de transporte.

La primer determinación de la actividad del AAPEN, se obtuvo a partir de la suspensión enriquecida de mitocondrias de hígado de rata. Los ensayos muestran una actividad baja aunque identificable y se puede atribuir al intercambio antiparalelo de cationes facilitado por el AAPEN, pues se carece de cualquier forma de energía adicional a la de los gradientes de pH y pNa, que permita a los otros sistemas participar (p.e. la ATPasa, canales dependientes de voltaje). En las siguientes etapas de aislamiento y purificación, se puede apreciar un aumento de la actividad específica. Existe aumento de la afinidad de la muestra por el catión, evidente debido a un incremento en la pendiente de las gráficas de ΔpNa vs. ΔpH conforme se avanza en el aislamiento y la purificación, siempre relacionado a 1 $\mu g\ ml^{-1}$ de la proteína (vease la Figura 14). Este incremento, observado a través de las etapas de purificación se interpreta como un aumento en la pureza del AAPEN en las fracciones proteicas ensayadas. Está reportada la incapacidad para detectar los efectos debidos al K^+ de algunas de las distintas variedades de AAPEN, presentes en la mitocondria de hígado de rata (Jêzec y cols., 1990; Kakar y cols., 1989), lo que da una clave sobre variedad ensayada; sólo la NHE-1 no transporta H^+ contra K^+, es específico para el transporte de Na^+ y su vectorialidad (la dirección y el sentido para cada especie química transportada) se mantiene (Fliegel y Frölich, 1993). Pero en condiciones *in vitro*, también es capaz de interactuar con Li^+ y transportarlo, aunque con una eficiencia menor al Na^+.

Los valores del ΔG° demuestran la gran afinidad del AAPEN por el Na^+, por encima de cualesquiera de los otros cationes. El siguiente en la serie es el Li^+ con valores un poco menores para el el ΔG°. En el caso del H^+ y el Rb^+ se obtuvieron determinaciones muy similares entre sí (Tabla III), estos cationes presentaron los valores más bajos de los ensayos, estos resultados apoyados en los reportes de Fliegel y Frölich (1992), de Jêzec y cols. (1990), y de Kakar y cols. (1989), nos indica que el AAPEN de membrana mitocondrial es incapaz de discernir entre los iones H^+ y Rb^+ en sistemas modelo. Esto está reforzado por los valores de log K_S obtenidos para los diferentes cationes ensayados.

Los experimentos con proteoliposomas se realizaron para determinar la especificidad del AAPEN y su inhibición por medio de amiloruro. En estos ensayos se detectó una actividad de transporte de cationes, la cual se asoció con el pico principal del fraccionado por HPLC. Sin embargo, cuando se llevaron a cabo los experimentos de inhibición por amiloruro usando espectroscopía mostraron una actividad continua de intercambio catión/H^+ sin especificidad para Na^+ o K^+, que no se inhibía por el amiloruro, y sólo detectable por espectroscopía de flourescencia. Esta actividad se puede considerar como un artificio atribuible al Tritón X-100, cuando actúa sobre las membranas artificiales, a su capacidad de formar micelas aún a concetraciones muy bajas, como lo muestra el hecho de que en el sistema de tres fases se necesite saturar de colesterol a la solución de asolecitina-etiléter, antes de poder formar una membrana realtivamente estable y

resistente. Empero, esta actividad no se logró determinar en forma significativa en ninguno de los experimentos cuando se utilizaron los sitemas de dos y tres fases, con las otras fracciones obtenidas, ya por filtración en gel o por HPLC, demostrando la posibilidad de otro factor que tuviera injerencia sobre el transporte; por lo tanto se cambió de tensoactivo, estableciendo un nuevo parámetro para verificar los resultados obtenidos.

Se sugirió utilizar al N-octilglucósido como tensoactivo en los procesos de aislamiento. Este detergente es de una naturaleza menos agresiva para los ensayos en sistemas modelo. El procedimiento de aislamiento y purificación se mantuvo sin cambios, a excepción de eliminar el paso por filtración en gel en Sephadex G-100 y hacer un prefiltrado en Sephadex G-25. Los resultados así obtenidos fueron muy similares, además, en los pasos siguientes se determinó la presencia de esa actividad inespecífica de intercambio M^+/H^+, pero ahora con una proporción del del 45 % o menor sobre total de intercambio Na^+/H^+, al inhibir el intercambio con amiloruro. Estos ensayos por inhibición mostraron dos características deseables en cualquier AAPEN: la presencia de una actividad de transporte antiport específica y la capacidad del amiloruro o sus derivados para inhibir dicha actividad. En este caso, los experimentos con Triton X-100 ya descritos sólo presentan una inhibición del 14 % por amiloruro, en cambio los ensayos con N-octilglucósido muestran una inhibición entre el 55 y el 60 %, sólo en el caso del Na^+.

Dicroísmo circular.

Los análisis de dicroísmo circular a $\lambda < 250$ nm no mostraron diferencia significativa entre los diferentes espectros (AAPEN; AAPEN-Na^+; AAPEN-K^+), lo que sugiere que las interacciones de los cationes con el AAPEN, no inducen modificaciones en la estructura secundaria del transportador, en los residuos que interactúan con los cationes. Estos resultados pueden explicarse si se considera que la estructura proteica del AAPEN impide distinguir pequeñas modificaciones, al ocultar los cambios de los grupos cromóforos involucrados en la unión. También se debe considerar que las señales de los residuos de aminoácidos en una estructura secundaria son mayores entre más alejados se encuentren de los extremos de éstas; considerando que las hélices transmembranales tienen una gran longitud, los cambios en las señales de dicroísmo circular inducidas por la unión de cationes pueden estar fuera de la sensibilidad del espectropolarímetro. Los espectros resultantes de los ensayos por dicroísmo circular a $\lambda < 250$ nm mostraron que el AAPEN presenta una estructura de hélice α y hojas β combinadas. Del análisis de los espectros se estimaron los contenidos de estructura secundaria mostrados en la Tabla V, estos valores son similares a los obtenidos por los métodos de predicción Helixmem y PHD. Por otra parte, los experimentos en la región del ultravioleta cercano (de 350 a 250 nm), permitieron determinar cierta evidencia de la interacción entre el AAPEN con el Na^+ y en mucho menor grado con el K^+, debido a los cambios en las interacciones de los diferentes segmentos transmembranales consigo y con los cationes ensayados, al modificarse los máximos de las señales correspondientes la estructura terciaria con un incremento del 15 %, para el Na^+ y de un 0.36 % para el K^+ (Figura 13).

Digestión enzimática.

Se realizaron dos digestiones del AAPEN con enzimas proteolíticas. Los productoas de la digestión con papaína mostraron una actividad de transporte prácticamente nula, por lo que no fue posible establecer diferencias entre la presencia y la ausencia de los diferentes cationes. En los productos de la digestión con

quimotripsina no se observó actividad alguna de transporte iónico con los cationes ensayados. Con base en esto podemos decir que de los fragmentos obtenidos a partir de la muestra purificada y homogénea del AAPEN es imposible reconstituir la actividad de transporte iónico con los cationes ensayados.

Tabla V. Porcentajes de los componentes estructurales del AAPEN.

	DC	PCGENE	PHD
Hélice α	39.7	43.1	35.2
Hoja-β	20.6	21.8	14.1
Cadena aleatoria	38.7	*ND*	50.7
Rizo	*ND*	34.4	*ND*

ND: No fue determinado por el sistema de estudio.

Predicción de la estructura.

En la estimación del número de segmentos transmembranales, la principal diferencia se encontró entre el modelo predicho por Pouyssègur y cols. (1989) y el obtenido por medio del programa PCGENE, nuestra predicción mostró tres fragmentos más. (Figura 15). Este hecho y la publicación posterior de una corrección el año pasado de los resultados de Pouyssègur y cols. (1994), apoyan la interpretación que se propone del trabajo. Lamentablemente no se pudo realizar una comparación entre los límites de los segmentos transmembranales en las tres predicciones, porque la corrección de Pouyssègur no los establece. Los análisis de PHD nos permiteron presentar una predicción del grupo que interactúa con los cationes, este es el residuo 367. Esto se explica porque la gran masa de estructura proteica del AAPEN impide distinguir las modificaciones, al amortiguar los posibles cambios estructurales, evitando que lleguen hasta los grupos cromóforos o apagando las señales que se originen por la interacción de los diferentes cationes y el AAPEN.

De acuerdo con la posición en la secuencia de los residuos con carga eléctrica, se determinaron las posibles zonas de unión a los cationes. El primero de estos se encuentra justo en la interfase membrana-citoplasma, formado por el ayuntamiento de los residuos 290 y 448 que se encuentran en las seciones polares citoplasmáticas que unen a los segmentos transmembranales y sirven de sitio de reconocimiento para el Na^+. El segundo sitio se encuentra en el residuo 267 de la sección interior del segmento **5a**, el cual junto con el **5**, se estiman como superficiales por el Helixmem. Se propone que estos segmentos (**5** y **5a**) estén resguardados por las otras regiones transmembranales y sean los que permitan la función del intercambio entre los compartimentos creados por la separación de la membrana mitocondrial. El tercer sitio putativo de asociación a cationes esta en el segmento **6**, este segmento está compuesto por el mayor número de residuos y contiene el único residuo cargado negativamente cuyo coeficiente de variación de cero y está a la mitad de la longitud de esa RTM.

Aunado a lo anterior, la predicción a partir de Helixmem presentó las características de los segmentos enlistados en la Tabla VI; las características de la estructura de los segmentos predichos por medio del PHD están en la Figura 15. Es común asociar un solo tipo de estructura secundaria para los segmentos transmembranales de las proteínas integrales, en ambos casos se puede observar que los segmentos transmembranales no siempre parecen ser helicoidales; pueden ser predichos como giros o estructuras β. Existe la posibilidad de que el transportador presente un arreglo de estructuras secundarias mixtas, ya que algunos de los segmentos transmembranales del AAPEN se les asocia con estructuras β, más

especificamente, el segmento **8** en la predicción por GGBS y el **10** de acuerdo con los resultados de GGBS y PHD pueden ser estructuras del tipo β y es concordante con la forma de los espectros del AAPEN obtenidos por dicroísmo circular; esto se puede apoyar con Fasman, Baldwin y Neuwmann y Snatzke, 1990 y lo expuesto por Hucho, Görne-T y Strecker (1994), donde muestra un canal de nACh con 6 segmentos transmembranales y cuyo principal segmento el M3 o MA es una estructura β, empero se debe considerar la carencia de información acerca de proteínas integrales del tipo α + β, como base antes de hacer un pronunciamento. Sin embargo, la predicción con mayor certeza es la obtenida por PHD con una certeza del 94 %, a partir de la cual se propone el diagrama del arreglo de la estructura del AAPEN en la membrana. Este arreglo se muestra en las figuras 15 y 19, podemos observar las diferentes secciones transmembranales y polares del AAPEN, de acuerdo con las cargas de las secciones polares y las características de cada uno de los segmentos transmembranales predichos.

En su mayor parte las predicciones de los segmentos transmembranales son consistentes, sin embargo hay discrepancia en cuanto a la estructura secundaria que adoptan los diferentes residuos. Todas las predicciones efectuadas sobre el tipo de estructura secundaria en los segmentos transmembranales se mantienen constantes para las secciones centrales, pero en los extremos de cada uno de estos segmentos se presentan diferencias acerca del tipo de estructura secundaria predicha, excepto en los segmentos transmembranales **2** y **5**; éstos presentan diferencias notables acerca de los tipos de estructuras secundarias posibles que se predicen. Las longitudes de los segmentos transmembranales puede variar según el método empleado. Esto se debe a que los algoritmos y los análisis de los resultados que se utilizan son diferentes, en particular el caso del PHD, éste posee dos niveles de análisis y un procedimiento final de filtrado, con una gran cantidad de algoritmos intercomunicados, los que se ajustan para acercar los resultados obtenidos a partir de proteínas modelo, p.e., como la bacteriorodopsina, a los datos disponibles, mediante una enorme serie de programas y a través de innumerables iteraciones. Además, los grados de aproximación en los ensayos varían en función del tamaño del algoritmo empleado por cada método, las fases de análisis, la evolución (aprendizaje en los sistemas de red neuronal) de los métodos y del número de iteraciones que realice en cada ensayo, siendo esto otro factor que contribuye a las diferencias que presentan los resultados de los métodos empleados.

En la gráfica de los coeficientes de variación, se presentan los resultados de la comparación de las secuencias de 7 diferentes AAPEN con la secuencia analizada y establece un patrón de la conservación entre las secuencias de las diferentes isoformas del AAPEN (Figura 14). Se puede observar una serie alternada en las que las regiones más conservadas son las que corresponden a los segmentos transmembranales y los valores máximos de variabilidad en las secuencias se encuentran por lo general en las zonas que unen los segmentos transmembranales, muy próximos y anteriores al inicio de cada uno de estos segmentos. Sin embargo, existen dos secciones que comunican a las regiones transmembranales que conservan su secuencia constante. La primera de estas regiones se localiza entre los residuos 175 al 185, mientras la segunda la comprenden los residuos del 246 al 256. Estas regiones puede estar relacionadas con la capacidad de reconocimiento de los cationes. En la Figura 16 vemos la gráfica ajustada de los coeficientes de variación contra la posición de los residuos; también se observan en la misma, la marca correspondiente al único sitio de corte que separa al péptido señal y el sitio estimado para la glucosilación.

En cuanto a la región citoplasmática podemos inferir que existe una variación promedio a los largo de la secuencia, lo cual se refuerza con los últimos artículos de Fliegel y Fröhlich (1993) y Pouyssègur y cols. (1994), en los cuales se menciona que las regiones más conservadas son parte del dominio transmembranal, en tanto que la porción citoplasmática presenta una tasa de variación mayor la cual se mantiene constante y sólo descenciende en los últimos residuos (a partir del número 830). Además de lo anterior, se observa que no hay un patrón definido en la tendencia de la gráfica de variación en la región citoplasmática, excepto por la tasa de cambio mayor alrededor del residuo 580. En la región citoplasmática los resultados de los ensayos de predicción de la estructura secundaria son constantes entre los diferentes métodos empleados.

Tabla VI. Características de los segmentos transmembranales obtenidas por medio del método HELIXMEM del programa PCGENE y la secuencia de aminoácidos del AAPEN según Pouyssègur y cols., 1989.

Segmento	I	II	III	IV	V
Tipo	Superficial	Superficial	Globular	Multimérica transmembranal	Superficial

Segmento	VII	VII	VIII	IX
Tipo	Superficial	Globular	Multimérica transmembranal	Multimérica transmembranal

Segmento	X	XI	XII	XIII
Tipo	Multimérica transmembranal	Superficial	Globular	Multimérica transmembranal

CONCLUSIONES

1. A partir de las mitocondrias de hígado de rata se aisló un acarreador de Na^+ contra H^+ de naturaleza específica, con una masa molecular aproximada de 90 kDa, que puede considerarse al NHE-1 reportado por Pouyssègur y cols. (1989).
2. Los primeros 50 aminoácidos contienen el péptido señal, pues posee una secuencia consenso en todos los métodos de análisis, además de que alrededor del residuo 35 se encuentra la secuencia específica para la proteasa del péptido señal.
3. La metodología que se empleó para aislar una muestra con la actividad deseada es adecuada, sin embargo se puede mejorar y aumentar el rendimiento de los ensayos de aislamiento.
4. La digestión de la muestra aislada por enzimas proteolíticas provocó la desaparición de la actividad de transporte, sin que la mezcla de las fracciones correspondientes pudiera restablecerla.
5. Las regiones transmembranales muestran el mayor grado de conservación en las diferentes isoformas, a diferencia de las regiones polares y el dominio citoplasmático de acuerdo con las tendencias mostradas en la gráfica de los coeficiente de variación.
6. El AAPEN posee dos dominios estructurales. El primero esta formado por los primeros 500 aminoácidos, se consideran 12 hélices transmembranales y el segundo es citoplasmático de 494 residuos
7. En la región citoplasmática la estructura secundaria se mantiene relativamente constante, en particular en los últimos 100 residuos.
8. Los sitios de reconocimiento a cationes pueden ser los formados por los residuos 159, 290 y 448 para el Na+ en la región citoplasmática y por las secciones de unión de los segmentos transmembranales de la región matricial para el H^+.

9. El segmento 5a presenta una gran cantidad de cargas que pueden ser protegidas por los demás segmentos transmembranales del ambiente hidrofóbico de la membrana.
10. La unión de cationes no altera sensiblemente la estructura nativa de la proteína, pero si modifica el entorno de algún o algunos de los grupos cromóforos aromáticos próximos a los sitios de captura.
11. De acuerdo con los ensayos de la actividad de transporte antiparalelo de cationes, el AAPEN aislado y purificado es específico para el sistema Na^+/H^+.

Bibliografía

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson (*1994a*) **Molecular Biology of the Cell,** *3rd. Edition,* **Garland Press**, pp. 92-93.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson (*1994b*) **Molecular Biology of the Cell,** *3rd. Edition,* **Garland Press**, pp. 667-716.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson (*1994c*) **Molecular Biology of the Cell,** *3rd. Edition,* **Garland Press**, pp. 477-505.

Amalou, Z., R. Gibart, C. Brugidu, P. Touslot y J. d'Auzac (*1992*) **Plant Physiol**. *100*, 255-260.

Art S., E. (*1984*) **Tesis de Maestría *en Biología Experimental*, UAM-Iztapalapa DCBS**. 12-35.

Barth, H.G. y B.E. Boyes, (*1992*) **Anal. Chem.** *64*, 426R-442R.

Baldwin, R.L. en **Proteins: Form and Function,** *Elsevier Trends Journals,* Cambrige (*1990*) 125-132.

Benz, R. y S. Mc. Laughlin (*1983*) **Biophys. J.** *41*, 381-398.

Counillon, L., Wscholz, H.J. Lang, y J. Pouyssègur (*1993*) **Mol. Pharmacol.** *44*, 1041-1045.

Chicz, R.M. y F.E. Regnier (*1990*) **Methods in Enzymology,** *182*, 393-421.

Christian, G.D. (*1981*) **Química Analítica,** Ed. *LIMUSA*, 141-195.

Dyck, J.R.B., G.D. Lopaschuk y L. Fliegel (*1992*) **FEBS Lett.,** *310*, 255-259.

Estrada-O., S. (*1975*) **PAABS Revista,** *4*, 407-414.

Evans, D.H. (*1984*) **J. Exp. Biol.** *113,* 465-469.

Fasman, G.D. en **Proteins: Form and Function,** *Elsevier Trends Journals,* Cambrige (*1990*) 135-138.

Fliegel, L., R.S. Haworth y J.R.B. Dyck (*1993*) **Biochem. J.** *289*, 101-107.

Fliegel, L. y O. Frölich (*1993*) **Biochem. J.**, *293*, 273-285.

Grinstein, S. y A. Rohtstein (*1986*) **J. Membr. Biol.**, *90*, 1-12.

Grinstein, S., M. Woodsidw, T.K. Waddell, G.P. Downey, J. Orlowsky, J. Pouyssègur, D.C.P. Wong y J.K. Foskett (*1993*) **EMBO J.**, *12* **(13)**, 5209-5218.

Haggerty, J.G., N. Agarwal, R.F. Reilli, E.A. Alderberg y C.W. Slayman (*1988*) **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, *85* 6797-6801.

Hennessey, J. P. y C. Johnson Jr. (*1981*) **Biochemistry**, *20*, 1085-1094.

Hoffmann, E. y L.O. Simonsen (*1989*) **Physiol. Rev.**, *69*, 315-382.

Hucho, F., U. Görne-Tschelnokow y A. Strecker (*1994*) **Trends.Bichem.Sci.**, *19*, 383-387.

Jêzek , P., F. Mahdi y K.D. Garlid (*1990*) **J. Biol. Chem.**, *265*, 10522-10526

Kakar, S.S., F. Mahdi y K.D. Garlid (*1989*) **J. Biol. Chem**., *264*, 5846-5851.

Kasianowswicz, J., R. Benz y S. Mc. Laughlin (*1984*) **J. Membr. Biol.**, *82*, 179-190.

Kasianowswicz, J., R. Benz y S. Mc. Laughlin (*1987*) **J. Membr. Biol.**, *95*, 73-89.

Kite, J. y R.M. Doolittle (*1982*) **J. Mol. Biol.,** *157*, 105-132.

Kulanthaivel, P., F.H. Liebach, V.B. Mahesh , E.J. Cragoe jr., y V. Granapathy (*1990*) **J. Biol. Chem.,** *265*, 833-837.

Kunitake, T. (*1992*) **Angew. Chem. Int. ed. Engl.,** *31*, 709-736

Martin, W.H., A.D. Beavis, K.D. y Garlid (*1984*) **J. Biol. Chem.,** *259*, 2062-2065.

Michel, H. (*1983*) **Trends Biochem. Sci.**, *8*, 56-59.

Mitchell, P. (*1961*) **Nature.,** *191*, 144-148.

Neubgebauer, J. (*1988*) **A guide to the propieties and uses of detergents. Biology and Biochemistry**., *1st. edition*, **Calbiochem Co.** pp. 4-14.

Neuwmann, N. y G Snatzke, en **Proteins: Form and Function,** *Elsevier Trends Journals*, Cambrige (*1990*)107-115.

Orlowski,J., R.A. Kandasamy y G.E. Schull (*1992*) **J.Biol. Chem.,** *267*, 9331-9339.

Pinner, E., E. Padan y S. Schuldiner (*1992*) **J. Biol. Chem.,** 267, 11064-11068.

Pinner, E., Y. Kotler, E. Padan y S. Schldiner (*1993*) **J. Biol. Chem.,** 268, 1729-1734.

Popot, J-L y D.M. Engelman, en **Proteins: Form and Function,** *Elsevier Trends Journals*, Cambrige (*1990*) 147-151.

Poronnik, P., J.A. Young y D.I. Cook (*1993*) **FEBS Lett.**, *315*, 307-312.

Pouyssêgur, J., C. Saredt, A. Franchi, G. L'Allemain y S.Paris (*1984*), **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, *81*, 4833-4837.

Pouyssêgur, J. (*1985*) **Trends.Bichem.Sci.,** *16*, 453-455.

Rost, B. y C. Sander, (*1993a*) **J. Mol. Biol.**, *232*, 584-599.

Rost, B. y C. Sander (*1993b*) **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, *90*, 7558-7562.

Rost, B. y C. Sander (*1994*) **Proteins.**, *19*, 55-72.

Seifter, J.L. y P.S. Aronson (*1986*) **J. Clin. Invest.**, *78*, 859-864.

Sardet, C., A. Franchi y J. Pouysègur (*1989*) **Cell.**, *56*, 271-280.

Sardet, C., L. Counillon, A. Franchi y J. Pouyssègur (*1990*) **Science.**, *247*, 723-726.

Taglich, D., E. Pada y S. Schuldiner (*1993*) **J. Biol. Chem.**, *268*, 5382-5357.

von Heijne, G. (*1994*) **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, *23*, 167-192..

Wilson, M.L. y F.W. Dalquist (*1985*) **Biochem.,** *24*, 1920-1928.

Yun, C.H.C., S. Gurubhagavatula, S:A. Levine, J.L.M. Montgomery, S.R. Brant M.E.Cohen, E.J. Cragoe jr, J. Pouyssègur Ch.-Ming Tse y M. Donowitz (*1993*) **J. Biol. Chem.,** *268*, 206-211.

El jurado designado por el Departamentode Ciencias de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metripolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó el persente trabajo de tesis el día 24 de julio de 1995.

Dr. Arturo Rojo Domínguez.
Tutor.

Dr. Edmundo Chávez Cossío.
Asesor

M. en B.E. Raúl Alva García.
Asesor: