

# Entrecruzamiento de proteínas en membranas plasmáticas

M.C. Humberto Montoya de Lira

## INTRODUCCION

El estudio de los fenómenos que acompañan al transporte celular de solutos, ha tenido la limitante de no contar con un modelo estructural para correlacionarlo con estudios funcionales. Esto ha sido crucial para entender los mecanismos de transporte de iones y moléculas bio-orgánicas esenciales para el metabolismo (<sup>1</sup>).

Los estudios funcionales sobre el transporte han proporcionado muchos detalles sobre las propiedades cinéticas de la difusión de solutos a través de las membranas celulares. Las constantes de velocidad de difusión, fenómenos de competencia y de inhibición, han sido caracterizados para solutos orgánicos biológicamente importantes como la glucosa y los aminoácidos, y para los iones como el Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> (<sup>1</sup>).

también se conocen algunos aspectos relacionados con la interacción de las moléculas de solutos con sus receptores putativos en la superficie de la membrana. Aún así, se desconocen casi por completo los mecanismos moleculares que conducen a la translocación de una molécula de soluto al interior de la célula (<sup>1</sup>).

Para explicar el mecanismo bioquímico del transporte de solutos, ha sido postulada la existencia de conductos formados de proteínas oligoméricas denominados canales, los cuales traspasan el espesor de la membrana plasmática, y permiten el tránsito sólo a moléculas específicas. La hipótesis del canal dicho sea de paso, también explica la regulación de la difusión, al incorporar a los canales a ciclos de apertura y cierre (<sup>2</sup>).

Los modelos experimentales empleados para la demostración de la hipótesis del canal, incluyen preparaciones de notable simplicidad biológica como la membrana de bacteria (<sup>2</sup>) y del glóbulo rojo (<sup>2</sup>) o preparaciones más complejas, como las neuronas de invertebrados (<sup>2</sup>), los epitelios del intestino y del riñón (<sup>2</sup>), y fragmentos

subcelulares purificados de estos epitelios (<sup>3</sup>). En estas regiones subcelulares se han realizado estudios funcionales representativos de la región celular correspondiente.

Por ejemplo los fragmentos celulares epiteliales extraídos del borde luminal (MBL) del túbulo de la nefrona, extruyen el ácido paramino hipúrico, mientras que los correspondientes del borde opuesto del epitelio o membranas basolaterales, capturan esta molécula (<sup>4</sup>), tal como ocurre en las células epiteliales intactas.

La identificación y análisis de oligómeros que funcionan como canales, ha sido estudiada con el auxilio de agentes bifuncionales que son moléculas pequeñas, las cuales unen covalentemente a macromoléculas vecinas. Tales agentes son denominados genéricamente entrecruzadores, como las carbodiimidias, los derivados del ácido subérico, y recientemente el glutaraldehído (<sup>5</sup>). El resultado del efecto de un entrecruzador es un complejo de peso molecular mayor el cual en turno es sometido al análisis convencional de proteínas, como la electroforesis en geles de poliacrilamida.

El análisis de complejos macromoleculares presentes en membranas celulares utilizando el glutaraldehído como agente entrecruzador, se inició recientemente con el estudio de los oligómeros involucrados en el transporte de electrones en el cloroplasto (<sup>7</sup>).

Con este antecedente decidimos emprender estudios para la identificación de complejos proteicos presentes en las MBL del túbulo contorneado proximal de la nefrona de la rata utilizando al glutaraldehído como agente entrecruzador, con el propósito de identificar oligómeros.

El presente trabajo muestra resultados sobre el estudio de a) los patrones polipeptídicos de las proteínas de la MBL caracterizados por electroforesis, b) el efecto del glutaraldehído sobre los patrones electroforéticos, y c) las características de la reacción de entrecruzamiento con el glutaraldehído.

## 2.- Material y Métodos

### 2.1 Origen del Material Biológico

Las MBL se prepararon a partir de riñones extraídos de ratas macho de la cepa Wistar con pesos aproximados de 200 g.

### 2.2 Preparación del Material Biológico

Las MBL fueron preparadas por centrifugación diferencial y precipitación con cationes divalentes de acuerdo con el método de Kinsella (<sup>4</sup>).

### 2.3 Determinación de proteína.

La masa de proteína de las preparaciones fue determinada por el método de Lowry modificado por Peterson (<sup>5</sup>).

### 2.4 Determinación de la actividad de la GGT

La actividad de la GGT fue determinada espectrofotométricamente por el método de Glossman y Neville (<sup>6</sup>).

### 2.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Los análisis electroforéticos fueron realizados en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturizantes de acuerdo con el método clásico de Laemli.

### 2.6 Entrecruzamiento de Proteínas

El entrecruzamiento se llevó a cabo con el método de Adir y Ohad (<sup>7</sup>).

## 3.- Resultados y Discusión

El proceso de purificación de la región luminal de la nefrona fue seguido por la determinación de la actividad de la enzima GGT, la cual es característica de esta región celular, obteniéndose MBL enriquecidas entre 11 y 15 veces (datos no mostrados).

Aunque no fue determinado el grado de contaminación por otras fracciones del epitelio, la experiencia de otros autores indica que con enriquecimientos entre ocho y diez veces no hay contaminación importante por la fracción basolateral a juzgar por la baja actividad de ATP<sup>(8)</sup> sensible a ouabaina, por las imágenes características de MBL al microscopio electrónico<sup>(4)</sup> y principalmente por la especificidad en el transporte de solutos<sup>(9)</sup>.

Las preparaciones obtenidas analizadas por electroforesis revelan un patrón de 23-25 bandas con pesos moleculares entre 100 y 15 kDa. Figura 1. Muchas de estas bandas no se encuentran bien resueltas, sin embargo las más prominentes migran en la misma posición que las que aparecen en los geles de proteínas de MBL realizados por otros autores<sup>(10)</sup>. En este último trabajo se demuestra que las dos bandas más prominentes que migran en la región de alto peso molecular corresponden al transportador de fosfatos.

Las preparaciones de MBL fueron sometidas a la acción del glutaraldehído al 0.5% diluido en el medio de suspensión de las preparaciones biológicas. La reacción transcurrió durante 1, 3 y 5 min. En la figura 2 se muestra que a los 5 min. han desaparecido bandas de la región entre 65 y 30 kDa, así como una banda de 68 kDa. Es notable que prácticamente ninguna otra banda desaparece, indicando que posiblemente el entrecruzamiento fue preferencial.

Con el propósito de tener información sobre la especificidad o inespecificidad del entrecruzamiento inducido por el glutaraldehído, decidimos probar si en una mezcla de proteínas conocidas, este entrecruzador era capaz de distinguir proteínas monoméricas de oligoméricas. En la figura 3 se muestra que en las condiciones de reacción utilizadas en este estudio, el glutaraldehído entrecruzó sólo a la gliceraldehído 3 P Deshidrogenasa, la única proteína oligomérica presente en la mezcla.

Enseguida decidimos probar la especificidad del glutaraldehído en las MBL. Es conocido que, los fragmentos de membranas se encuentran vesiculadas<sup>(4)</sup>, de manera que la membrana limita un espacio interno al que sólo tienen acceso moléculas que son transportadas específicamente. Puesto que el glutaraldehído es una molécula no reconocida por estos sistemas de transporte, de manera que se esperaba que el entrecruzamiento fuera selectivo para moléculas expuestas a la superficie externa de la vesícula, y que por lo tanto no tenga efecto sobre moléculas del espesor de la membrana ni tampoco sobre las del espacio interno.

La enzima GGT es un oligómero incrustado en el espesor de la membrana<sup>(11)</sup>. Si el glutaraldehído penetra la vesícula y

la satura, debería afectar la actividad de la enzima sugiriendo que la ha entrecruzado. Se esperaría además que el efecto del entrecruzador fuese progresivo a medida que transcurre el tiempo.

Cuando la actividad de la GGT se midió en vesículas de MBL pretratadas con glutaraldehído a intervalos regulares la actividad no disminuyó en función del tiempo. Tabla 1, indicando que las moléculas de la GGT intercaladas en la membrana no fueron afectadas por el entrecruzador. La fracción que se encontró modificada puede corresponder a un porcentaje constante de vesículas rotas de MBL que se forman como resultado del tratamiento durante el fraccionamiento celular y la purificación, como ha sido demostrado por otros autores<sup>(4)</sup>.

Los resultados anteriores indican que el glutaraldehído: a) es soluble en el medio de suspensión de nuestras preparaciones de membrana, b) es específico para entrecruzar proteínas oligoméricas, c) que la reacción se completa en cinco minutos y que al parecer sólo tiene acceso a proteínas membranales expuestas a la superficie. Las condiciones de reacción se resumen en la Tabla II.

Los entrecruzadores del tipo de las carbodiimidas y los derivados del ácido subérfico requieren de ser solubilizados en sustancias que tienen efectos caotrópicos sobre membranas, por lo que los resultados siempre tienen la duda de un efecto inespecífico dado por tales sustancias. Por otra parte, el tiempo de reacción de los entrecruzadores mencionados, se completa en 40 min. por lo que los hace prácticamente inutilizables en fenómenos de transporte. Los eventos de difusión en los sistemas de vesículas se saturan en un lapso de 10 min.<sup>(1)</sup>, por lo tanto las propiedades del glutaraldehído encontradas en este trabajo, lo hacen un buen candidato para estudios sobre la organización estructural de las proteínas en estas membranas, resultados que ulteriormente pudieran tener importancia en estudios de transporte a través de membranas.

El trabajo se realizó con los recursos obtenidos del donativo destinado al proyecto PIBB-88-1 de la UAA. El autor agradece las sugerencias metodológicas de los M en C Fernando Jaramillo y Humberto Cuéllar, del Centro Básico.

## REFERENCIAS

- 1.- F. Morell. Hormonal Control of Renal Epithelial Transport. *Physiological Review*. 66:1 (1986).
- 2.- F. Lodish, J. Darnell y D. Baltimore. *Molecular Cell Biology. Transport Across Cell Membranes*. Cap. 14 pág. 536. Sci. Am. Books. (1990).
- 3.- Berner W. y Kinne R. Transport of p-aminohippuric acid by plasma membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *European J. Physiology* 361:269 (1976).
- 4.- Kinsella J.L., Holohan P.D., Pessach N.I. y Ross C.R. Isolation of Luminal anti Luminal Membranes of Dog Kidney Cortex. *B.B. Acta*. 552:468 (1979).
- 5.- Peterson G.L. A Simplification of the protein Assay of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Anal Biochem* 83:346 (1977).
- 6.- H. Glossman y D.M. Neville. Gama Glutamyl Transferase in Kidney Brush Border Membranes. *Febs Lett* 19:340 (1972).
- 7.- Adir N. y Ohad I. Structural Properties of the D<sub>1</sub> and Surrounding Photosystem II Polypeptides as Revealed by Their Interaction with Crosslinking Reagents. *J. Biol Chem* 263:283 (1988).
- 8.- Cuéllar Pedroza H. Comunicación personal (1991).
- 9.- Aronson P.S. y Sacktor B. The Na<sup>+</sup> Transport of D-Glucose in Renal Brush Border Membranes. *J. Biol. Chem.* 250:6032 (1975).
- 10.- Beliveau R. Fortier R. Vachon V. Effect of Magnesium on ATP Labelling by Kidney Brush Border Membrane. *Int. J. Biochemistry*. 20:375 (1988).
- 11.- Al-Mahrouq H. y Kempson S.A. Photoaffinity Labeling of Brush Border Membrane Proteins With Bind Phosphonoformic Acid. *J. Biol. Chem.* 266:1422 (1991).
- 12.- Tate S.S. y Khadse, U. Renal Gama Glutamyl Transferase: Influence of Glycosylation on the Electrophoretic Behavior and molecular Weight of their Subunits. *B B Res Commun* 141:1189 (1986).

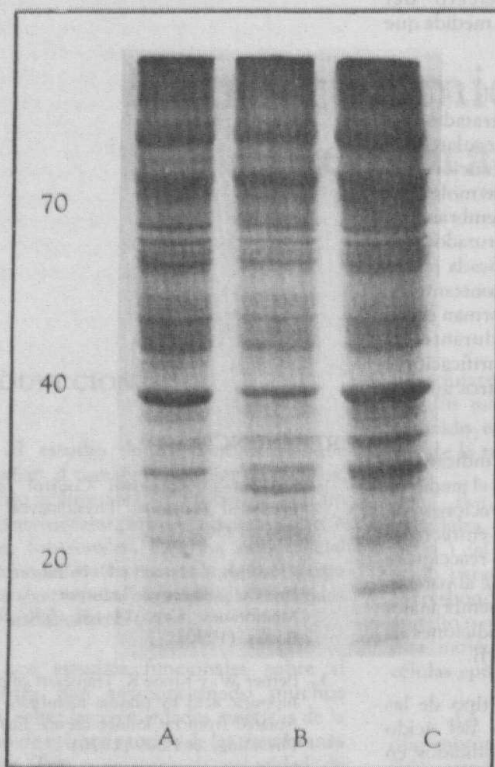


Fig. 1 Patrones electroforéticos de proteínas de MBL en geles de poliacrilamida-SDS. A, B, C: muestras procedentes de tres animales diferentes.

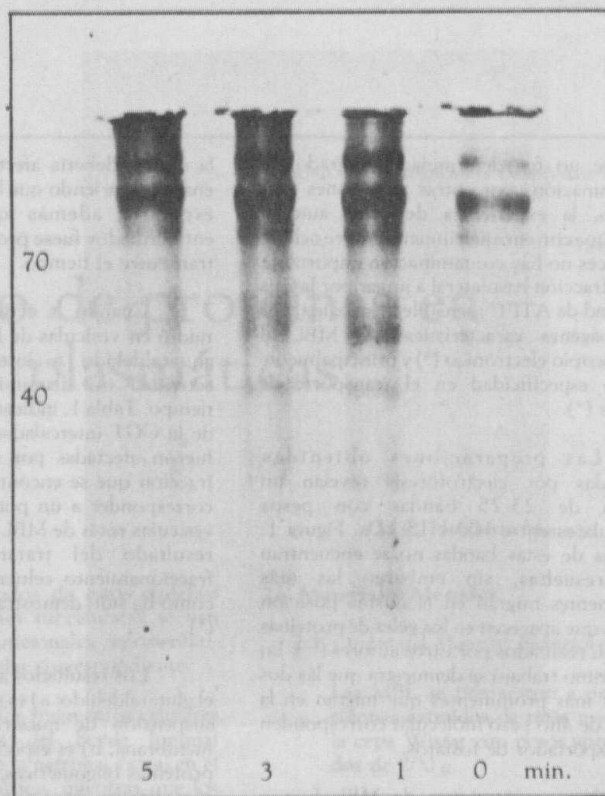


Fig. 2 Tiempos de reacción del glutaraldehído con proteínas de MBL.

TABLA I

EFFECTO DEL GLUTARALDEHIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA g-GT DE MEMBRANAS LUMINALES \* DEL TUBULO PROXIMAL

T/min	Control	Glut. 50µg	% de Inhib.
	Ab 410 nm		
1	0.310 ± 0.03	0.259 ± 0.02	16.7
3	0.293 ± 0.02	0.235 ± 0.02	19.8
5	0.293 ± 0.03	0.245 ± 0.03	18.1
7	0.365 ± 0.03	0.300 ± 0.03	17.8

\* 100µg proteínas de membranas purificadas  
Cada experiencia es por quintuplicado

TABLA II

CONDICIONES DE REACION DEL GLUTARALDEHIDO

Glutaraldehído 0.5%	10µl
Medio B	15µl
Membranas luminales 5µg de proteína l-1	20µl
Temperatura	0-4°C
Tiempo	1, 3 y 5 min.
Término	3 min. a 94°C

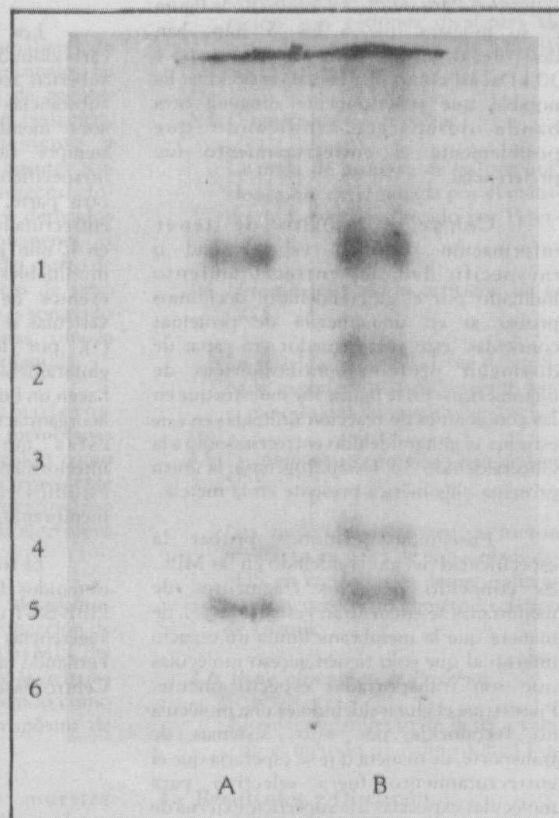


Fig. 3 Efecto del glutaraldehído sobre la Gliceraldehído 3-P Dhasa, una proteína Oligomérica (3), en una mezcla con albúmina (1), ovoalbúmina (2), Anhidrasa carbónica (4) tripsinógeno (5) y el Inhibidor de tripsinógeno (6). A —sin y B— con: glutaraldehído. □