

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Proteolípidos estabilizadores y receptores de membranas : su
purificación y caracterización química y funcional**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Manuel Criado Herrero

DIRECTOR:

Jaime Monreal Llop

Madrid, 2015



* 5 3 0 9 8 5 4 2 3 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TP
1980
142

X-63-044219-0

MANUEL CRIADO HERRERO

PROTEOLIPIDOS ESTABILIZADORES Y RECEPTORES DE MEMBRANAS.
SU PURIFICACION Y CARACTERIZACION QUIMICA Y FUNCIONAL.

Director: Jaime Monreal Llop
Investigador Científico del C.S.I.C. (Instituto Cajal)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica
Junio, 1980.



BIBLIOTECA

© Manuel Criado Herrero
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-37426-1980

INDICE

TITULO, 1

DEDICATORIA, 11

INDICE, 111

RESUMEN, 7

INTRODUCCION, 11

MATERIALES Y METODOS, 22

1. Material biologico, 23

2. Reactivos, 24

3. Metodos generales, 25

3.1. Determinación de proteínas, 25

3.2. Determinación de fosfato, 25

3.3. Valoración de azúcares reductores, 26

3.4. Análisis de aminoácidos, 26

3.5. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, 26

3.6. Cromatografía en capa fina de fosfolípidos, 28

4. Proteolípidos de mielina, 28

4.1. Aislamiento de mielina, 28

4.2. Microscopía electrónica de la mielina, 29

4.3. Extracción del proteolípidos de mielina, 29

4.4. Cromatografía en DEAE-celulosa del extracto de mielina, 30

IV

- 4.5. Purificación por adsorción-desadsorción, 31
 - 4.6. Mapas peptídicos del proteolípidio purificado, 31
 - 4.7. Determinación del grupo amino terminal, por medio del cloruro de dansilo, 32
 - 4.8. Experimentos de incorporación del proteolípidio purificado en vesículas de fosfatidilcolina, 33
 - 4.9. Medida de la temperatura de transición de fase de la dipalmitoilfosfatidilcolina en presencia y en ausencia de proteolípidio, 33
 - 4.10. Medida de la salida espontánea de isótopos de los liposomas conteniendo proteolípidio, 34
 - 5. Proteolípidos de la electroplaca del Torpedo, 35
 - 5.1. Aislamiento de membranas ricas en receptor de acetilcolina y extracción de las mismas con cloroformo-metanol 2:1, 35
 - 5.2. Extracción de proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, 36
 - 5.3. Cromatografía en DEAE-celulosa, 36
 - 5.4. Unión de ligandos colinérgicos, 37
 - 5.5. Marcaje con 4-(N-maleimido)fenil(³H)trimetilamonio, 39
 - 5.6. Estudios sobre grupos disulfuro y sulfhidrilo, 40
- RESULTADOS, 43
- 1. Proteolípidio de mielina, 44
 - 1.1. Aislamiento y purificación de mielina, 44
 - 1.2. Extracción del proteolípidio de mielina, 44
 - 1.3. Purificación por adsorción-desadsorción en DEAE-celulosa, 50
 - 1.4. Estudios estructurales del proteolípidio purificado, 57
 - 1.5. Incorporación del proteolípidio de mielina en liposomas, 59

- 1.6. Medida de la absorbancia a 450 nm de los liposomas con dipalmitoilfosfatidilcolina mas proteolípidos en función de la temperatura, 61
- 1.7. Captura de isótopos y velocidad de salida de los mismos a partir de liposomas con el proteolípidos incorporado, 62
2. Proteolípidos de la electroplaca de Torpedo marmorata, 64
 - 2.1. Extracción y fraccionamiento con DEAE-celulosa, 64
 - 2.2. Unión de ligandos colinérgicos, 70
 - 2.3. Marcaje con (^3H)-MPTA, 74
 - 2.4. Estudio de los grupos sulfhidrilo y disulfuro en los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, 77

DISCUSION, 83

1. Purificación del proteolípidos de mielina por cromatografía en DEAE-celulosa, 84
2. Purificación del proteolípidos de mielina por adsorción-desadsorción en DEAE-celulosa, 86
3. Determinaciones estructurales del proteolípidos purificado, 89
4. Interacciones entre el proteolípidos de mielina purificado y liposomas de fosfatidilcolina, 91
5. Cromatografía de intercambio iónico en disolventes orgánicos, 92
6. Extracción y purificación de proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, 95
7. Unión de ligandos colinérgicos, 97
8. Marcaje con (^3H)-MPTA, 102
9. Estudios sobre grupos sulfhidrilo y disulfuro, 104

CONCLUSIONES, 108
BIBLIOGRAFIA, 114
ABREVIATURAS, 125
AGRADECIMIENTOS, 126

RESUMEN

A partir de gran variedad de membranas biológicas es posible extraer con mezclas de cloroformo-metanol una determinada clase de proteínas denominadas proteolípidos. Cada vez va siendo más evidente la importancia de estas proteínas en el mantenimiento de la estructura de las membranas así como en la funcionalidad de las mismas. Sin embargo, muchas de las funciones de los proteolípidos están aún por descubrirse, debido en gran parte a su gran hidrofobicidad y concomitantemente a las fuertes interacciones que mantienen con los lípidos de la membrana. Esto dificulta grandemente su posterior estudio, ya sea en medios acuosos o en medios orgánicos.

En el presente trabajo se ha estudiado esencialmente la posible función en las membranas de dos proteolípidos: el proteolípido de la mielina y el principal componente proteolípídico de la electroplaca del pez eléctrico Torpedo marmorata. Para ello ha habido que desarrollar una metodología común de estudio debido a las similitudes químicas aunque no funcionales de ambos proteolípidos, sobre todo en lo que se refiere a un método de fraccionamiento de proteínas hidrófobas, por medio del uso de la DEAE-celulosa en medio orgánico.

El procedimiento de purificación del proteolípido de mielina, consistente en la adsorción-desadsorción por el cambiador iónico de un extracto orgánico total de mielina, permitió la obtención de una sola banda por electroforesis en SDS-poliacrilamida (20-23 KDalton) y un aminoácido N-terminal (alanina) para el material purificado. Es importante señalar que la proteína básica de la mielina, principal contaminante de las preparaciones de proteolípido y muy difícil de eliminar totalmente de las mismas, era retenida por el cambiador. En suma, con este método, más corto y menos complicado que otros descritos anteriormente, se obtuvo el proteolípido de mielina aparentemente homogéneo. Los mapas peptídicos del mismo sugerían la existencia de zonas no accesibles a los enzimas proteolíticos, debido quizás a la agregación del proteolípido, preferentemente por interacción

entre zonas hidrófobas. La incorporación del proteolípido a vesículas formadas con fosfatidilcolina no indujo cambios apreciables en las propiedades de las mismas. Dado que la permeabilidad a iones y a glucosa se mantuvo inalterada, lo que no ocurre con otras proteínas de similares características, cabe pensar que posiblemente el proteolípido cumpla un papel estabilizante en la mielina. Experimentos similares con los proteolípidos de la electroplaca del Torpedo sugirieron para estos una función muy distinta en la membrana. Por ello se trató de estudiar el papel de los mismos, sobre todo en su relación con el receptor de acetilcolina. Al mismo tiempo se determinaron algunas de sus propiedades químicas y físicas, cosa que hasta el momento no se había podido llevar a cabo.

La cromatografía de un extracto orgánico total de la electroplaca del Torpedo rindió tres fracciones bien diferenciadas por su contenido de proteína, lípido y azúcares reductores. En la fracción I (la más hidrófoba por su composición de aminoácidos y contenido lipídico) se detectó por electroforesis una sola banda de 39 KDalton de peso molecular. En las otras dos fracciones, eluidas con un gradiente del ión hidrofóbico p-toluensulfonato, había un polipéptido de 42 KDalton y otros de mayor peso molecular. En estas cadenas polipeptídicas eran más abundantes los aminoácidos polares y con carga. La caracterización funcional de las fracciones se hizo estudiando preferentemente la unión de ligandos colinérgicos a las mismas. Se comprobó que era la fracción I la que unía específicamente más (^3H)-acetilcolina, con dos componentes de alta y baja afinidad. El posible receptor contenido en esta fracción parecía ser de tipo nicotínico, según lo indicaron los experimentos de bloqueo de la unión de (^3H)-acetilcolina con determinados ligandos muscarínicos y nicotínicos. Solo el polipeptido de 39.000 Dalton se marcó con el ligando colinérgico covalente 4-(^3H -maleimido)fenil(^3H)trimetilamonio, lo que coincidía con los resultados obtenidos para el receptor de acetilcolina purificado en medios acuosos con detergentes. Con todas estas pruebas pudo afirmarse que el pro-

teolípido de la fracción I contenía el sitio de unión de ligandos colinérgicos. Se consiguió, por tanto, aislar este proteolípido receptor como una sola cadena polipeptídica por primera vez.

El estudio del contenido de grupos sulfhidrilo en los proteolípidos totales de la electroplaca reveló que un tercio de los mismos estaban en forma reducida, mientras que el resto formaba puentes disulfuro. Estos eran preferentemente intramoleculares, a excepción de una molécula de 15.000 Dalton que formaba un dímero de 30.000, posiblemente por medio de un puente disulfuro entre cadenas iguales. Por último, el polipéptido de 42.000 Dalton mostró el mas alto contenido de grupos -SH, sugiriendo su posible implicación en fenómenos de transporte o translocación de iones.

11

INTRODUCCION

Las membranas celulares desempeñan numerosas e importantes funciones en la arquitectura de los seres vivos. No solo forman la base estructural del sistema de comunicación del organismo vivo, estando implicadas en funciones tales como reconocimiento, adhesión, agregación y fusión celulares, sino que también participan en procesos aún mas fundamentales para la vida sobre la superficie del planeta: los procesos bioenergéticos. En efecto, las estructuras transductoras de energía e información están en gran parte compuestas por biomembranas, y es sabido que los enzimas, receptores y otras entidades moleculares que están implicados en dichos procesos se encuentran localizados en las membranas de las mitocondrias, cloroplastos, células fotorreceptoras, estructuras sinápticas, etc.

Si en un principio se atribuyó a la membrana citoplasmática el simple papel de barrera a la permeabilidad, posteriormente, al descubrirse su capacidad de control sobre el flujo de materiales y energía según los correspondientes gradientes termodinámicos, se llegó a la evidencia de que asumía un papel mucho mas activo en las funciones celulares.

Problema crucial en la investigación de la estructura de las membranas y de sus interrelaciones fisiológicas y bioquímicas es definir la organización de sus moléculas componentes: lípidos, proteínas e hidratos de carbono, unidos estos últimos tanto a lípidos como a proteínas. Los lípidos constituyen una barrera contra la libre entrada y salida de moléculas de la célula, y aportan un flexible y fluido soporte tridimensional en el que las reacciones químicas pueden producirse (1). Las proteínas, intercaladas en la bicapa lipídica o simplemente interactuando con dicha bicapa de forma múltiple y hasta el momento no muy bien determinada, intervienen en las reacciones químicas y contribuyen a mantener la estabilidad de toda la estructura (2). Portanto, solo un completo conocimiento y una exhaustiva caracterización química de las moléculas presentes en las membranas permitirá aclarar el mecanismo de las reacciones e interacciones que se pro-

ducen entre sus componentes, dando respuesta a muchos de los fenómenos que ocurren intra e intercelularmente.

Cualquier explicación racional de la mayoría de los procesos que precisan de sitios específicos y selectivos en la membrana necesita tener en cuenta la presencia de sus proteínas constituyentes. Puesto que las funciones de las membranas son diversas, lo lógico es esperar que la naturaleza y localización de las moléculas implicadas en estas funciones deben ser también diversas. Típicamente, una membrana celular puede poseer más de cien proteínas distintas (3). Para comprender el mecanismo de su acción se necesita mucha información sobre la estructura de los diferentes complejos proteicos. Esto no ha sido posible nada más que en pocos casos, ya que muchos de ellos están constituidos por proteínas intrínsecas (4), las cuales tienen una gran tendencia a asociarse con lípidos, siendo insolubles en medios acuosos. Su alto porcentaje de aminoácidos apolares induce a pensar que mantienen fuertes interacciones con la región hidrófoba de la bicapa lipídica (4, 5 y para una revisión ver 6). Estas fuerzas hidrofóbicas, no muy considerables si se las evalúa individualmente, adquieren una gran importancia en las membranas, ya que en estas se producen en gran número (7,8).

Gran parte de estas proteínas intrínsecas son proteolípidos con precisas y claras características de lipoproteínas de membrana, solubles en mezclas de cloroformo-metanol e insolubles en agua. Aunque el proteolípido se encontró por primera vez en la sustancia blanca del cerebro (9), luego se detectó la presencia de moléculas semejantes en otros muchos tejidos (10-18), sobre todo en las estructuras membranosas de los mismos (19-26). Hay que indicar que esta semejanza se refiere casi exclusivamente a sus propiedades de solubilidad. En efecto, el término "proteolípido" es operacional, en cuanto que se trata de proteínas solubles en cloroformo-metanol que mantienen interacciones con lípidos, ya sean covalentes (27-29), de tipo iónico (30-32) o hidrófobo (6). Sin embargo, las fun-

ciones que pueden realizar en la membrana celular son muy variadas. Precisamente el propósito del presente trabajo fue el estudio de dos proteolípidos bien diferenciados por la función aparente que realizan: el proteolípido de la mielina del Sistema Nervioso Central y el proteolípido receptor de acetilcolina. Para ello hubo que desarrollar técnicas de purificación y de posteriores estudios químicos que, dadas las similares características físico-químicas de estas moléculas, fueron muy semejantes en ambos casos. Sin embargo, a pesar de estas similitudes, se pudo comprobar que la función que realizan en la membrana parece ser bastante diferente.

En el campo de la purificación de proteínas las técnicas cromatográficas tienen gran aplicación, siendo reconocidas como procedimientos simples y rápidos, tanto a escala analítica como preparativa. Resultan especialmente adecuadas para la separación de sustancias biológicas lábiles, tales como hormonas, enzimas y receptores. En cuanto a los proteolípidos, los procedimientos cromatográficos empleados hasta ahora para fraccionarlos y purificarlos se concretan, en lo que respecta a la naturaleza de los disolventes empleados, en dos tipos: los que utilizan disolventes orgánicos y los que emplean soluciones acuosas, casi siempre con detergente. El uso de una u otra opción parte de la controversia ya clásica, de la posible desnaturalización debida a los disolventes orgánicos. Sin embargo se ha demostrado que receptores extraídos con mezclas orgánicas muestran actividad en experimentos de reconstitución con membranas artificiales (33). También en ciertos casos no hay pérdidas de actividad enzimática o estas son mínimas (34,35). Los disolventes orgánicos permiten mejores rendimientos, pues solubilizan casi exclusivamente proteolípidos, mientras que en medios acuosos con detergente la extracción no es tan selectiva y el rendimiento es menor. La ventaja de estos últimos es que la proteína se encuentra en un medio que permitirá posteriores estudios químico-estructurales, cosa prácticamente imposible de realizar por el

momento en medio orgánico, ya que en este la química de proteínas apenas si ha tenido algún desarrollo.

Como soporte o fase sólida de la cromatografía también se han utilizado diversos procedimientos, predominando siempre la filtración en geles dextranos (36-40), aunque al ser utilizados con eluyentes orgánicos no es posible descartar la intervención de otros tipos de mecanismos en el proceso de fraccionamiento, tales como adsorción, interacciones de tipo electrostático etc. Sin embargo en este caso se empleó un procedimiento cromatográfico totalmente distinto de los mencionados anteriormente : fraccionamiento de intercambio iónico por medio de la DEAE-celulosa. Se sabía que los lípidos se separaban eluyendo con distintos solventes orgánicos según su carga (41-43), y así mismo se habían separado proteínas (38). Por tanto era posible suponer que, al mismo que se separarían determinados lípidos unidos debilmente al proteolípido, se conseguiría purificar este al eluir con un gradiente de concentración de ácido. En el caso del proteolípido de mielina también se desarrolló un método de adsorción-desadsorción de la proteína al cambiador iónico que, como mas adelante se discutirá, proporcionó un mayor rendimiento que la cromatografía en columna. Este mismo sistema se probó también eluyendo con butanol-agua (44) y sustituyendo el gradiente de ácido acético por uno de hidróxido amónico, con concentraciones crecientes del mismo. De esta forma se consiguió un procedimiento de purificación del proteolípido de mielina relativamente corto y operacionalmente simple, y con pocas etapas en todo su transcurso. Esto es interesante de tener en cuenta, ya que la mayoría de los procedimientos diseñados hasta la fecha tienen el inconveniente de ser largos o complicados (45) e incluso utilizar disolventes que pueden alterar las características de la proteína (46). El polipéptido purificado, en apariencia homogéneo por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y por su aminoácido amino terminal, se incorporó en liposomas de fosfatidilcolina con el fin de estudiar sus interacciones con lípidos y su posible papel funcional, con una razonable seguridad de que el

efecto que se observaba a la molécula en cuestión y no a contaminaciones, cosa que a veces suele suceder en este tipo de experimentos. 4

A partir de datos de difracción de rayos X (47) se ha visto que no hay diferencia entre una bicapa de dimiristoilfosfatidilcolina y una del mismo lípido conteniendo el proteolípido. Estas observaciones sugieren que la proteína, a pesar de estar inmersa en la bicapa (48-51) no afecta a esta grandemente. Así, aunque la proteína interacciona con los lípidos induciendo cambios en sus propiedades físicas (47, 52-55), debe haber alguna interacción entre moléculas de proteína que provoque la formación y estabilización de las multicapas de la mielina. En suma, quizás el proteolípido pueda ejercer un papel importante en el mantenimiento de la estructura de las membranas. Los estudios de difusión de iones a través de vesículas formadas con lípidos permitieron concluir que la función del proteolípido de la mielina podría ser la estabilización de estas estructuras. Sin embargo los proteolípidos procedentes del órgano eléctrico del Torpedo, el cual es muy rico en receptor de acetilcolina, ejercían un efecto contrario. Es decir, moléculas de parecidas características químicas posiblemente tenían en la membrana una función diferente. Previamente se ha comprobado por medio de reactivos fluorescentes que pueden introducirse en la zona a hidrófoba de la bicapa lipídica (56), que el receptor de la acetilcolina mantiene importantes interacciones con aquella (57), por lo que se estudió el papel en la membrana de los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, sobre todo en su posible relación con el receptor de la acetilcolina.

Ya que el desarrollo de los diversos métodos de purificación mencionados anteriormente se llevó a cabo sobre el proteolípido de mielina no solo por su posible importancia en esta membrana, sino también porque al ser una proteína muy hidrófoba y típicamente intrínseca, todo lo hallado podría aplicarse a otras proteínas similares de membrana, tales como enzimas y receptores, los proteolípidos de Torpedo se fraccionaron y purificaron con métodos similares, procediéndose después a algunos estudios funcionales.

La teoría química de la transmisión sináptica implica que un mecanismo específico de naturaleza química amplifica considerablemente la señal eléctrica al interponerse entre los componentes pre- y postsinápticos. Tal mecanismo consistiría de: a) sustancia química (transmisor) sintetizada y almacenada en las terminaciones nerviosas y que se libera a la llegada del impulso nervioso, b) receptor específico de naturaleza proteica con el que interacciona el transmisor en la membrana postsináptica, y c) el receptor traduce la unión del transmisor induciendo cambios en la membrana, por ejemplo modificando la permeabilidad de esta a los cationes. Para poder analizar directamente la interacción primaria droga-receptor es conveniente separar este último de los sitios sensibles de la membrana celular. Pero esto es difícil de conseguir por varias razones: a) los receptores suponen un porcentaje extremadamente pequeño de la proteína total de un tejido o incluso de la membrana celular y b) tales proteínas son componentes intrínsecos de la membrana, y por estar relacionados íntimamente con los lípidos de esta son sólo separables por tratamientos drásticos con solventes orgánicos o detergentes. Su gran hidrofobicidad explica que sean solubles en disolventes orgánicos e insolubles en medios acuosos, a no ser que estos contengan detergentes. En este último caso los detergentes sustituirían la interacción lípido-proteína por un complejo detergente-proteína. Así las moléculas de receptor quedan rodeadas de moléculas de detergente, el cual las preserva, en parte, del entorno acuoso. En la separación y purificación de proteínas receptoras, y más concretamente del receptor de la acetilcolina, ha habido por tanto dos metodologías de aproximación, utilizando disolventes orgánicos (15) o detergentes no iónicos (58,59). Por razones ya expuestas anteriormente, aquí se utilizó la primera de las metodologías mencionadas, cuyas ventajas e inconvenientes se discutirán más adelante.

Diversos hechos hacen que el tejido más usado para el aislamiento de receptores colinérgicos sea la electroplaca de diversos peces eléctricos, tales como la raya marina Torpedo o el Electrophorus electricus. Este órgano eléctrico

deriva del músculo esquelético en el que la capacidad contráctil se perdió (60) pero en cambio la capacidad de generar potenciales eléctricos se desarrolló considerablemente (61). En Torpedo marmorata el número de electroplacas no supera las 400-500 y la descarga media es de 40-60 V. La bioelectrogénesis tiene lugar exclusivamente mediante potenciales sinápticos (62), lo que significa que la cara innervada no puede activarse por estimulación eléctrica directa. La innervación es mas rica en Torpedo que en *Electrophorus*, cosa importante por su relación con la cantidad de receptor a extraerse del tejido. Además, al trabajar con una población altamente densa y homogénea de sinapsis, todas idénticas, con un solo mecanismo colinérgico, se puede obtener un alto rendimiento de receptor.

La extracción con mezclas de cloroformo-metanol hace ya tiempo que se utilizó para separar los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo (63) y de *Electrophorus* (64). La posterior separación por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y elución con mezclas de cloroformo-metanol de polaridad creciente (36) proporcionó varias fracciones proteicas, una de las cuales unía drogas colinérgicas tales como acetilcolina, d-tubocurarina y α -bungarotoxina (43). Sin embargo no se hizo una caracterización molecular de el/los posible(s) componente(s) de estas fracciones. En el caso que aquí se describirá, y como ya se ha indicado anteriormente, la purificación del posible proteolípido receptor de acetilcolina se hizo mediante cromatografía en DEAE-celulosa, eluyendo con cloroformo-metanol y un gradiente de concentración del ión hidrofóbico p-toluensulfonato en los mismos disolventes. Este ión es capaz de bloquear las cargas positivas de las proteínas al mismo tiempo que, al disminuir el pH, se neutralizan las cargas negativas (66,67). De esta forma las interacciones proteína-cambiador iónico disminuyen considerablemente. Las diversas fracciones que se obtuvieron en la cromatografía se caracterizaron químicamente por su contenido en proteína, fosfolípidos y azúcares reductores, así como por su composición de aminoácidos. La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida permitió detectar diversos componentes moleculares

que posteriormente se estudiaron para tratar de dilucidar su funcionalidad.

En la caracterización del receptor de acetilcolina aislado por medio de detergentes en medio acuoso, se han seguido dos caminos generales, además de los conocidos estudios electrofisiológicos. Uno consiste en los ensayos de unión de acetilcolina (y compuestos análogos) y de α -neurotoxinas y otro en el marcaje de afinidad con ligandos colinérgicos que se unen covalentemente (para revisiones ver 58, 59, 68). El receptor purificado se encuentra en forma de dímero y monómero en el caso del *Torpedo* (pesos moleculares respectivos 250 y 500 KDalton) (69). Aunque hay dos sitios de unión de acetilcolina o α -neurotoxina por cada monómero, solamente uno de esos sitios se marca covalentemente con yoduro de 4-(N-maleimido)-benciltrimetilamonio (70). La electroforesis del receptor reducido y tratado con SDS permite observar cuatro bandas correspondientes a cadenas de pesos moleculares aproximados: 39 (α), 48 (β), 58 (γ), y 64 (δ) Kdalton (71-75). Estas cadenas son también mayoritarias en las membranas citoplasmáticas de tejido eléctrico ricas en receptor (76-79). Solo es conocida la función de una de las cadenas. La cadena α parece contener total o parcialmente el sitio de unión de acetilcolina ya que es la única que es específicamente marcada con reactivos de afinidad en *Torpedo californica* (71, 80-82), *Torpedo marmorata* (83) y *Electrophorus electricus* (80, 84, 85).

Un plan similar se siguió, por tanto, para caracterizar funcionalmente los proteolípidos extraídos de la electroplaca de *Torpedo*. Por una parte se determinó la capacidad de unión de diversas drogas colinérgicas, tanto nicotínicas como muscarínicas, de los proteolípidos purificados. Así mismo se utilizó un agente alquilante de afinidad, el cloruro de 4-(N-maleimido)feniltrimetilamonio (MPTA). Se ha demostrado que este compuesto marca específicamente la subunidad que contiene el sitio de unión de acetilcolina en el receptor aislado por medio de detergentes (80), al reaccionar con un grupo sulfhidrilo que se halla en las inmediaciones del sitio activo de unión del neurotransmisor. Aunque se ha visto

que otros reactivos tales como el fluorborato de p-(trimetilamonio)benzenodiazonio (86,87), el fluorborato de 4-azido-2-nitrobencilamonio (88,73) y el fluorborato de trimetiloxonio (89) pueden marcar las subunidades del receptor, aparentemente les falta especificidad por el sitio de unión de acetilcolina. Pues bien, después de marcar los proteolípidos con el reactivo de afinidad mencionado en primer lugar y hacer electroforesis de los mismos, el análisis de la radiactividad presente en los geles permitió deducir cuál era la cadena que en este caso era específicamente marcada.

El otro camino seguido fue el estudio del contenido de grupos sulfhidrilo y disulfuro en relación con las distintas cadenas polipeptídicas que componían el extracto proteolípido. En efecto, se ha visto recientemente que existe heterogeneidad en las formas moleculares del receptor de acetilcolina purificado en presencia de detergentes. La forma de alto peso molecular es un dímero de la forma de bajo peso molecular (90). Este dímero se forma por medio de un puente disulfuro intermolecular entre cadenas proteicas de 65 KDalton aproximadamente de peso molecular (74, 77, 91). Además, la presencia de un dímero de 130 KDalton formado por dos cadenas de 65 KDalton ha sido inequívocamente demostrada (92). Mientras que el dímero se convierte en monómero por medio de agentes reductores, tales como el 2-mercaptoetanol o el ditiotreitól (74, 77,78), agentes oxidantes convierten el monómero en dímeros, asociando preferentemente las cadenas que estaban unidas por puentes disulfuro (93). Dada la importancia funcional que puede tener la formación de estos puentes disulfuro (94), se decidió observar cuál era la influencia de diversos agentes que los modifican en el extracto proteolípido de la electroplaca de Torpedo, sobre todo en lo que se refiera a la formación de distintas especies moleculares. Además se ha sugerido recientemente que la molécula asociada al receptor y que cumpliría las funciones de "ionóforo" es rica en grupos -SH (83), por lo que también se consideró de importancia la valoración de estos grupos en las distintas fracciones obtenidas, ya que una de ellas po-

dría contener dicha cadena polipeptídica.

En resumen, con el proteolípido de mielina se ha desarrollado un método de cromatografía en disolventes orgánicos que hasta ahora no había sido suficientemente aprovechado, así como otras técnicas que, una vez puestas a punto adecuadamente, han permitido el estudio del proteolípido receptor de acetilcolina. De esta forma se ha comprobado que, si bien ambos proteolípidos tienen ciertas semejanzas químicas y probablemente físicas, su funcionalidad es bastante distinta. Los resultados obtenidos, aunque no son definitivos y necesitarán de posteriores investigaciones, abren algunos caminos por los que se podrá avanzar en el futuro.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

A) Mielina de cerebro de vaca. Los cerebros, con 400-500 g de peso medio, procedían de animales de 2-4 años que acababan de ser sacrificados. Se adquirieron en el matadero municipal de Madrid desde donde se trasladaron al laboratorio a 0°C en un recipiente aislado térmicamente.

B) Organó eléctrico de Torpedo marmorata. Estos peces eléctricos de agua salada fueron capturados en el O. Atlántico. Rápidamente les fue extraído el órgano eléctrico (figura 1) que se congeló a -70°C. Así se conservó hasta su liofilización, para lo que se homogeneizó en tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 7,0 (20 % peso / volumen) con fluoruro de fenilmetil sulfonilo 10^{-4} M para inhibir la proteólisis.

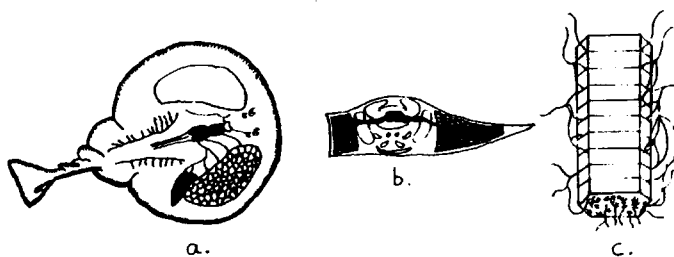


FIGURA 1: El órgano eléctrico del Torpedo. a) Vista dorsal de Torpedo marmorata en la que se destacan los dos órganos eléctricos principales, el accesorio y su inervación. Obsérvese la superficie cuadrada del órgano eléctrico. b) Corte sagital a nivel del órgano eléctrico para mostrar las columnas de electroplacas. c) Una columna muestra la inervación diferencial de las dos caras de cada electroplaca. La cara inervada (ventral) contiene el receptor nicotínico de la acetilcolina.

2. REACTIVOS.

Todos los reactivos eran de grado analítico a menos que se indique otra cosa. Las proteínas utilizadas en el patrón de movilidades electroforéticas (fosforilasa A, seroalbúmina bovina, glutámico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y mioglobina o hemoglobina, según los casos) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (USA).

La acrilamida y metilenbisacrilamida eran de Fluka AG (Suiza) o de Sigma así como N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), mientras que el persulfato amónico era de Serva (Alemania). El laurilsulfato se obtuvo de BDH Chemicals Ltd. (Inglaterra) o de Sigma.

La DEAE-celulosa procedía de Whatman Biochemical Ltd. (Inglaterra) en forma DE-32 o DE-52 microgranular. El Sephadex LH-20 era de Sigma. Las placas de celulosa sin indicador fluorescente empleadas en los mapas peptídicos así como las de sílica gel F₂₅₄ eran de Merck (Alemania). Las placas de poliamida para la determinación del grupo amino terminal eran de Pierce Chem. Co. (USA).

Los patrones de la cromatografía de lípidos eran de Sigma, a excepción de la esfingomiélin que era de Koch Light Lab. (Inglaterra). La dipalmitoilfosfatidilcolina también era de Sigma. La tripsina con inhibidor TPCK era de Worthington Biochemical Corp. (USA) y la subtilisina, tipo VIII, de Sigma.

Los ligando colinérgicos empleados fueron: acetilcolina, hexametonio, d-tubocurarina (Sigma), oxotremorina (Aldrich Chem. Corp. USA), atropina (Mann Res. Lab. USA), y α -bungarotoxina (Boehringer, Alemania).

El material radiactivo fue el siguiente:

- . Cloruro de (³H)-acetilcolina (250 mCi/mmol) de Amersham Co. (Inglaterra).
- . Acido iodo(2-³H)acético (82 mCi/mmol) de Amersham Co.
- . Cloruro de 4-(N-maleimido(fenil(³H)trimetilamonio, sintetizado y marcado por los Dres. Lunt y Harrison de la Universidad de Bath (Inglaterra) con 280.000 dpm/

nmol.

. (^3H)- α -bungarotoxina (1,7 Ci/mmol) fue un regalo del Prof. L.A. Barnard (Imperial College, Londres).

. (^{14}C)-glucosa (0,43 Ci/mmol) de Amersham.

. (^{86}Rb)-1 (0,041 Ci/g.) de CNEA (Argentina).

3. METODOS GENERALES.

3.1. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se utilizó el método de Lowry (95). Con el fin de determinar la concentración de proteína en soluciones orgánicas de proteolípidos se usó la modificación de Hess y Levin (96). En este caso la muestra se evaporó a sequedad, procediéndose después normalmente según el método de Lowry. Posteriormente, con el fin de una correcta medición espectrofotométrica, se extrajeron los lípidos con un volumen de cloroformo, quedando la solución de proteína sin la turbidez inicial debida a la existencia de los lípidos.

3.2. DETERMINACION DE FOSFATO.

La concentración de fosfato de las muestras aplicadas en las diferentes columnas, así como la de las fracciones obtenidas se midió según el método de Ames y Dubin (97). La muestra se colocó en un tubo lavado con mezcla crómica, detergente y agua varias veces, junto con 50 μL de nitrato magnésico al 50 % en etanol. Se calcinó a la llama hasta que desaparecieron los gases de color parduzco. Posteriormente se hidrolizó con 0,3 mL de HCl 1 N durante 15 min en baño de agua a ebullición. El fosfato se determinó haciéndolo reaccionar con una mezcla de ácido ascórbico y molibdato amónico (1 parte de ascórbico al 10 % en agua mas 6 partes de molibdato al 0,42 % en ácido sulfúrico 1 N) y calentando a 45°C durante 20 min. A continuación se midió espectrofotométricamente a 820 nm.

3.3. VALORACION DE AZUCARES REDUCTORES.

Se realizó según el método de la antrona (98). Cien μ L de la muestra a valorar se hicieron reaccionar con 0,5 mL de reactivo de antrona (100 mL de 5 partes de ácido sulfúrico mas 2 partes de agua y 0,2 g. de antrona). Se agitó rápidamente y se calentó en baño de agua a ebullición durante 10 min. Inmediatamente después se volvió a agitar y se leyó la absorbancia a 660 nm. Como patrón se empleó galactosa 1 mM en diversas cantidades.

3.4. ANALISIS DE AMINOACIDOS.

Una solución de la muestra a analizar se evaporó a sequedad. Cuando el residuo era muy rico en lípidos parte de los mismos se extrajeron sucesivamente con acetona y metanol. Después se suspendió en HCl 6 N y se hidrolizó a 110°C durante 24 horas en tubo cerrado a la llama en el que se había hecho el vacío. Posteriormente se siguieron los métodos convencionales, determinándose la composición de aminoácidos en analizador JEOL-JLC-5AM o en un Technicon Sequential Multisample Analyzer.

3.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA.

1. A pH básico se siguió una modificación del procedimiento de Laemmli y Favre (99) modificado a su vez por Quarles et al. (100). Las muestras con solventes orgánicos se concentraron en rotavapor y se les añadió 2,5 vol. de tampón tris-HCl 0,1 M, pH 8,8, SDS 10 %, calentando y agitando al mismo tiempo, para que el cloroformo se evaporase. Con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de SDS se diálizó frente a agua durante 48 horas y posteriormente frente a tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 7,2, urea 1,6 M, SDS 0,1 %, 2-mercaptoetanol 1 %, durante otras 24 horas.

En otros casos que ya se indicarán, la proteína se precipitó de la solución orgánica por medio de 4 vol. de eter o eter-etanol 1: 1, v/v, y así delipi-

dada se disolvió con SDS al 2 % y se dializó igual que en el caso anterior.

La electroforesis se realizó con acrilamida al 13 % preferentemente y poniendo 2 mA/gel.

11. A pH neutro se realizó según el método de Weber y Osborn (101). Se hizo el mismo tratamiento de las muestras que en el caso de la electroforesis a pH básico, siendo la concentración de acrilamida también la misma, es decir del 13 %. La corriente eléctrica se ajustó a 8 mA/gel.

Para el cálculo de pesos moleculares se utilizó un patrón de fosforilasa A, seroalbúmina bovina, glutámico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y hemoglobina o mioglobina, a pH y concentración de SDS iguales a los de las muestras. Los geles se fijaron unas 12 horas con metanol-ácido acético-agua (4:1:5) y el tinte se hizo con Azul de Coomassie al 0,25 % en esta misma mezcla durante 2 horas a 37°C. El desteñido con la misma mezcla se hizo durante 48 horas a temperatura ambiente.

Para la visualización de glucoproteínas se utilizó la tinción con fuch-sina básica (102). Los geles se dejaron unas 12 horas en un gran volumen (aproximadamente 800 mL/gel) de mezcla A: ácido acético-metanol-agua (1:4:5) con el fin de eliminar el SDS residual y fijar. Los pasos siguientes se hicieron a temperatura ambiente y en la oscuridad. Durante 6 horas los geles se trataron con periodato sódico al 2 % en mezcla A. Después se lavaron con mezcla A durante 2 días (10 cambios en total) y se pusieron en solución de fuch-sina básica, preparada según el procedimiento de Segrest y Jackson (103). En este paso se empezaron a ver bandas teñidas. Su intensidad se incrementó sumergiendo los geles en metanol al 50 %. Después de varios cambios los geles empezaron a tener una coloración púrpura uniforme. El fondo se eliminó por difusión durante 3-5 días en la mezcla A. Para que los geles adquirieran todos la misma longitud se dejaron unas 12 horas en ácido acético al 3 % en agua.

3.6. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE FOSFOLIPIDOS.

Se realizó según el método de Skipski (104) sobre placas de sílica gel F₂₅₄. El solvente para la cromatografía ascendente fue cloroformo-ácido acético-metanol-agua (50:25:8:4) (105). El revelado de las placas se llevó a cabo con vapores de yodo hasta que las manchas de fosfolípidos se hicieron bien visibles. En cada punto se aplicaron cantidades de muestra equivalentes a 40 nmoles de fosfolípido aproximadamente. De los fosfolípidos utilizados como patrones se aplicaron cantidades equivalentes a 10 nmoles de cada uno de ellos.

4. PROTEOLIPIDO DE MIELINA.

4.1. AISLAMIENTO DE MIELINA.

La mielina se extrajo a partir de sustancia blanca del centro semioval y cuerpo calloso del cerebro de vaca, y se dejó libre de tejido conectivo y sustancia gris visibles. Se empleó una modificación del procedimiento de Norton (106).

Se homogeneizaron 50 g. de sustancia blanca en 10 vol. de sacarosa 0,32 M, tris 0,1 M, PMSF 10^{-4} M (el PMSF se disolvió en la mínima cantidad de alcohol etílico y se añadió a la disolución acuosa mientras esta se agitaba vigorosamente). Se centrifugó a 5.900 g y el precipitado se lavó dos veces con la disolución mencionada anteriormente, centrifugando a la misma velocidad que antes. El precipitado resultante se suspendió en la misma solución y se aplicó en tubos que contenían 18 mL de sacarosa 0,85 M, tris 0,1 M, PMSF 10^{-4} M. El gradiente discontinuo así formado se centrifugó a 23.000 rpm en un rotor Beckman SW27 durante 30 min. Se recogió la interfase resuspendiéndola en 10 vol. de agua con PMSF 10^{-4} M. Se centrifugó a 20.000 g durante 20 min. y el precipitado se lavó con agua, recogiendo nuevamente por centrifugación a 17.000 g durante 10 min. El precipitado se resuspendió ahora en sacarosa 0,32 M, tris 0,1 M, PMSF 10^{-4} M, haciendo un gradiente discontinuo igual al ya mencionado. La centrifugación del mismo a 25.000

rpm 45 min en rotor SW 27, permitió la obtención de una interfase que se lavó tres veces con agua para eliminar la sacarosa residual. La mielina purificada se liofilizó durante 48 horas y se guardó a -20°C hasta el momento de su uso.

4.2. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LA MIELINA.

Una parte de la mielina purificada se lavó con sacarosa 0,32 M y se fijó durante 1,5 horas en glutaraldehído al 6 % en tampón cacodilato sódico 0,4 M, pH 7,4. El residuo se lavó con sacarosa al 10 % en tampón cacodilato sódico 0,1 M. Posteriormente se fijó con OsO_4 al 1 % en el tampón anterior durante 20 min. Después se deshidrató con etanol absoluto. La fijación se realizó a 0°C . Los bloques se pusieron en óxido de propileno con dos cambios sucesivos de este, durante 10 min en total, y durante 20 min en una mezcla de óxido de propileno y Epon 1:1 (107). La inclusión total se realizó con Epon al 100 % haciendo la polimerización a 60°C durante 48 horas. Se cortaron secciones con un ultramicrotomo y se tiñeron con acetato de uranilo.

4.3. EXTRACCION DEL PROTEOLIPIDO DE MIELINA.

Se obtuvo una fracción rica en proteolípido de mielina por el método de Nussbaum et al. (108). La mielina se suspendió en CM 2:1 en la proporción de 1,2 mL de disolvente por μg . de mielina liofilizada. Se homogeneizó en una Sorvall-Omnimixer a la máxima velocidad (3x1 min) y se sometió a centrifugación a 12.000 g 15 min. El sobrenadante se precipitó con 0,05 vol. de KCl 0,1 M añadido lentamente, dejando a 4°C durante 12 horas. Después de volver a centrifugar para eliminar el precipitado se lavó el sobrenadante con 0,2 vol. de agua, reconstituyendo la fase orgánica al volumen inicial con CM 2:1 y concentrando hasta 1/4 de aquel en rotavapor. El extracto se precipitó con 4 vol. de eter (con eter-etanol no precipitaba) dejando en reposo durante 2 horas a -20°C . El precipitado obtenido se disolvió en

CM 2:1 quedando a veces algo turbio.

Posteriormente, y visto el bajo rendimiento del procedimiento anterior, se optó por simplificar al máximo los pasos previos, quedando reducidos a la extracción de la mielina con CM 2:1 y a la centrifugación subsiguiente a 12.000 g 15 min, para obtener un extracto orgánico. Este extracto se aplicó a la columna o se puso directamente en contacto con el cambiador iónico para su adsorción.

4.4. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA DEL EXTRACTO DE MIELINA.

Para una columna de 18 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro se pesaron 20 g. de DEAE-celulosa, que se suspendieron en 15 vol. de HCl 0,5 N y se dejaron en ligera agitación durante 30 min. Esta suspensión se filtró a través de un embudo Buchner y bomba de agua, y se lavó con agua destilada hasta que el filtrado salía a un pH aproximado de 6. A continuación se volvió a suspender el cambiador en 15 vol. de NaOH 0,5 N siguiéndose el mismo procedimiento que antes. Posteriormente se lavó con metanol y CM 1:1. En este mismo solvente se suspendió el cambiador y se añadió a la columna después de desairear. Para conseguir un empaquetamiento mas compacto se aplicó en el extremo superior presión con gas N₂. El lecho se lavó con CM 1:1 y después de poner unos granos de arena lavada para que la resina no flotase, se lavó con CM 2:1, quedando la columna lista para su uso.

La fracción rica en proteolípido de mielina, en cantidad equivalente a 20 mg. de proteína en 10 mL de CM 2:1 se aplicó a la columna. Se eluyó con CM 2:1 en primer lugar y luego con un gradiente de ácido acético desde 0,1 a 2 N, finalizando con ácido acético 5 N. El flujo, que resultó ser difícil de regular, fue de 18 mL/hora aproximadamente, recogiendo una fracción cada 10 min. Para seguir el curso de la elución se midió absorbancia a 280 nm en todas las fracciones.

4.5. PURIFICACION POR ADSORCION-DESADSORCION.

En este caso se suspendieron 300 mg. de mielina liofilizada en CM 2:1 y el residuo insoluble se separó por centrifugación a 12.000 g 20 min. El sobrenadante se puso directamente en contacto con el cambiador (preparado igual que en el caso de la cromatografía en columna) y se tuvo agitando lentamente a 4°C para que se produjera la adsorción. Después se separó el cambiador por filtración, sin dejar que se secase por completo y se volvió a suspender en CM 2:1 con el fin de comenzar la desadsorción. Este mismo procedimiento se continuó repitiendo, utilizándose iguales cantidades (100 mL) de ácido acético 1, 2 y 5 N en CM 2:1, y recogién- dose las distintas fracciones de elución. En otros experimentos se varió el tiempo que el cambiador estaba en contacto con el eluyente. También se modificó el eluyente, siendo en un caso butanol-agua 17:3 y en otro hidróxido amónico en CM 2:1 en concen- traciones de 0,1, 0,5 y 1,3 N. Mas adelante se discutirán los resultados obtenidos al introducir estas variaciones y cuál resultó ser la mas eficaz.

4.6. MAPAS PEPTIDICOS DEL PROTEOLIPIDO PURIFICADO.

Las fracciones obtenidas con CM 2:1 - ácido acético 2 y 5 N, que fueron las que menos fosfolípidos contenían, se liofilizaron añadiéndoles 10 veces su vo- lumen de benceno. Este material fue el que se empleó en los siguientes estudios.

Unos 5 mg. de proteolípido purificado liofilizado se suspendieron en 10 mL de tampón acetato amónico 0,1 M, ácido deoxicólico 0,5 % (109), ajustando el pH a 8,4 con hidróxido amónico (el ácido deoxicólico se obtuvo disolviendo 1 g. de deoxicolato sódico en 25 mL de agua y precipitándolo con 25 mL de ácido acético glacial a 0°C durante 1 hora. El precipitado obtenido se filtró, se lavó con agua varias veces y se liofilizó). A continuación se sonicó durante 1 min y la suspensión se dividió en dos partes iguales. A una se le añadieron 0,2 mL de tripsina (1 mg/ mL) y a la otra 0,2 mL de subtilisina (1 mg/mL) transcurriendo la incubación a 37°C

durante 18 horas. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g 30 min y los sobrenadantes se precipitaron con 2 mL de ácido acético glacial, durante 1 hora a 4°C. Las suspensiones resultantes se filtraron y los filtrados se liofilizaron. Los péptidos liofilizados se disolvieron en 50 µL de ácido acético glacial al 30 % y se aplicaron 20 µL en una placa de celulosa (10x10 cm). En primer lugar se realizó la cromatografía ascendente en n-butanol-piridina-ácido acético-agua (24,4:37,8:7,6:30). Se dejó evaporar el solvente de la placa y se acabó de secar con un secador antes de realizar la electroforesis a 450 V, 8 mA durante 40 min (tampón de electroforesis: piridina-ácido acético-agua 1:10:89, pH 3,5). La tinción se hizo con ninhidrina al 0,1 % secando después a 70°C.

4.7. DETERMINACION DEL GRUPO AMINO TERMINAL, POR MEDIO DEL CLORURO DE DANSILO (110).

Se suspendieron 4 mg. de proteolípido liofilizado en 8 mL de bicarbonato sódico 0,1 M, pH 8,5 y en 8 mL de cloruro de dansilo disuelto en acetona (4 mg/mL). Después de la incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 90 min, se centrifugó a 3.000 g 15 min. El precipitado se lavó tres veces con acetona al 50 %, volviéndose a centrifugar en cada ocasión como anteriormente. El precipitado se secó en un desecador a vacío con ácido sulfúrico y después se hidrolizó con 2,5 mL de HCl 6 N durante 4 horas a 110°C, en tubo cerrado a la llama. Se evaporó el HCl y el residuo se lavó repetidas veces con agua, para eliminar los restos de ácido. Se evaporó en un desecador a vacío con NaOH y el residuo se disolvió con acetato de etilo y se aplicó en una placa de poliamida. De los aminoácidos dansilados se aplicaron 0,01 mL de una mezcla de todos ellos (0,1 mg/mL). Los solventes empleados para las cromatografías fueron: I. Acido fórmico al 1,5 % en agua. II. Benceno-ácido acético glacial 9:1. III. Acetato de etilo-metanol-ácido acético 90,8:4,6:4,5.

4.8. EXPERIMENTOS DE INCORPORACION DEL PROTEOLIPIDO PURIFICADO EN VESICULAS DE FOSFATIDILCOLINA.

En estos experimentos se utilizó preferentemente la fracción proteolípídica obtenida al eluir con CM 2:1 - ácido acético 1M que se concentró hasta aproximadamente 1/3 de su volumen inicial. Después de dializar durante 24 horas contra 4 x 250 mL de CM 2:1, el contenido de fosfato había bajado a 0,08 μ moles /mg de proteína (comparar con la tabla 4). En cada experimento de incorporación la cantidad de fosfolípido endógeno fue del 1,28 % del lípido total de los liposomas.

A una solución conteniendo la fosfatidilcolina se le añadió en cada caso la fracción proteolípídica correspondiente y la mezcla se evaporó con H_2 y aplicando vacío. El residuo se suspendió en 2 mL de tris-HCl 20 mM, pH 7,4 y se agitó en un Supermixer (Labline Instruments) hasta que la suspensión presentaba un aspecto uniforme y no quedaban residuos en las paredes del tubo. La suspensión se centrifugó a 100,000 g 60 min y se midió proteína y fosfato en el precipitado y en el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces y se volvió a centrifugar. El tiempo que pasó entre los dos lavados se hizo variar entre 1 y 18 horas, con el fin de asegurarse de la real incorporación de la proteína en las vesículas.

4.9. MEDIDA DE LA TEMPERATURA DE TRANSICION DE FASE DE LA DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE PROTEOLIPIDO.

Se midió la absorbancia a 450 nm de una muestra de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPL) con o sin proteolípido en función de la temperatura, según el método de Hill(111). Para ello se evaporó con H_2 una solución orgánica conteniendo DPL con o sin proteína (razón proteína-lípido 0,1-0,3, peso/peso). Se añadieron 2 mL de tris-HCl 20 mM, KCl 80 mM pH 7,4, precalentado a 50°C y se formaron los liposomas como en el apartado anterior. La suspensión se dejó en reposo 30-60 min y se centrifugó a 100,000 g 60 min. El precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón y se

midió la absorbancia a 450 nm, subiendo la temperatura paulatinamente desde 4° hasta 50°C. Por este método la temperatura de transición de fase de la DPL fue de $42,1 \pm 0,5$ °C. Esto se repitió dos veces y cada vez se hizo por triplicado.

4.10. MEDIDA DE LA SALIDA ESPONTANEA DE ISOTOPOS DE LOS LIPOSOMAS CONTENIENDO PROTEOLIPIDO.

Una solución orgánica similar a la de los dos apartados anteriores (razón proteolípido-lípido 0,1-0,3) se evaporó a sequedad. El residuo se resuspendió en 4 mL de tris-HCl 20 mM, pH 7,3, KCl 80 mM o glucosa 20 mM que contenían respectivamente 40 μ Ci de 86 Rb o 20 μ Ci de 14 C-glucosa y los liposomas se formaron por agitación. Las muestras se sonicaron bajo atmósfera de N_2 durante 60 min a 4°C en un sonicador Kerry Pulsatron 55 (potencia media 50 w frecuencia 50 kHz) y se dejaron equilibrar durante 12 horas a 4°C. Los liposomas, conteniendo los correspondientes isótopos, se aislaron por filtración en gel sobre una columna de Sephadex G-50 (2x 18 cm) previamente equilibrada con el mismo tampón de preparación de las vesículas, saliendo en el volumen de exclusión de la misma. Se distribuyeron en bolsas de diálisis alícuotas de 1 mL de los liposomas y una vez cerradas se dializaron en tubos que contenían 10 mL de tampón. Se fueron tomando muestras del líquido de diálisis a diferentes intervalos de tiempo, midiéndose en las mismas la radiactividad liberada. Estos experimentos se realizaron a 22°C, y al terminar, cada bolsa de diálisis se abrió centrifugándose su contenido a 100.000 g 1 hora. En el precipitado y en el sobrenadante se midió proteína y fosfato, teniéndose así un control adicional de la incorporación del proteolípido en las vesículas.

El volumen de la solución isotópica y el porcentaje de isótopo atrapado por μ mol de lípido utilizado se midió según (112). Los datos se representaron como el logaritmo del porcentaje de cuentas retenidas en los liposomas en función del tiempo (113).

5. PROTEOLIPIDOS DE LA ELECTROPLACA DEL TORPEDO.

5.1. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS RICAS EN RECEPTOR DE ACETILCOLINA Y EXTRACCION DE LAS MISMAS CON CLOROFORMO-METANOL 2:1.

Se hizo una modificación del método de Cohen et al (114). El órgano eléctrico de Torpedo marmorata, que se había mantenido congelado a -70°C , se suspendió en fosfato sódico 0,01 M, EDTA 0,001 M, PMSF 10^{-4}M en la proporción de 1 g. de tejido por mL. Se homogeneizó en una Sorvall Omnimixer (2 x 1 min) a la máxima velocidad, y se centrifugó a 7.000 g 10 min. El sobrenadante se guardó, y el precipitado se volvió a homogeneizar en las mismas condiciones que antes. Nuevamente se centrifugó, reuniéndose el sobrenadante con el anterior y centrifugándolos a 20.000 g 1 hora. El precipitado resultante se suspendió en sacarosa 0,32 M y se homogeneizó primeramente con un homogeneizador de teflón y después se sonicó con un Branson LS 75 durante 3 x 15 s. A continuación se aplicó esta suspensión en tubos de rotor Beckman SW 25 que contenían un gradiente de sacarosa con las siguientes concentraciones: 1,5-1,4-1,3-1,2-1,1-1,0-0,8M (3,5 mL de cada disolución). El material de las fracciones recoñidas entre 1,0 y 1,4 M es el que unía α -bungarotoxina con mayor actividad específica, y fue el utilizado para la extracción con CM 2:1. Para ello se lavó en primer lugar con agua para eliminar la sacarosa residual, y posteriormente se resuspendió en agua y se liofilizó.

Las membranas liofilizadas se suspendieron en CM 2:1 en la proporción de 1 mL de CM 2:1 por 40 mg de liofilizado y se sonicaron durante 2 x 1 min, quedando así partículas de un tamaño uniforme. Se dejó en agitación unas 16 horas a 4°C y posteriormente se centrifugó a 80.000 g 50 min. El sobrenadante se concentró hasta 1/2 de su volumen inicial y se precipitó con 4 vol. de eter a -20°C (con eter-etanol no se consiguió precipitación). A las 2 horas se volvió a centrifugar y el precipitado se disolvió en 0,5 mL de SDS 2,5 %, Na_2CO_3 1 %, calentando a 70°C

5 min para favorecer la disolución. Después de dializar durante 18 horas, tanto este precipitado disuelto, como membranas ricas en receptor disueltas con SDS al 2,5 % frente al tampón de diálisis previo a la electroforesis, se aplicaron ambas muestras en geles de SDS-poliacrilamida con el fin de compararlas con los proteolípidos de la electroplaca total.

5.2. EXTRACCION DE PROTEOLIPIDOS DE LA ELECTROPLACA DE TORPEDO.

El tejido liofilizado perteneciente a la electroplaca total de Torpedo se extrajo con CM 2:1 en la proporción de 20 mL de disolvente por mg. de material liofilizado. Para ello se homogeneizó durante 4 x 30 s. con un Polytron, dejando intervalos de 30 s. entre cada periodo de homogeneización. Después se dejó a 4°C con ligera agitación durante 10 horas. El extracto se filtró posteriormente y se concentró en rotavapor hasta aproximadamente 1/4 del volumen inicial.

En algunos experimentos se utilizaron los proteolípidos precipitados y parcialmente delipidados. En ese caso el extracto orgánico concentrado se dejó a -20°C y a esta misma temperatura se trató con 4 vol. de eter-etanol 1:1. Después de unas 2 horas a -20°C el precipitado resultante se separó por centrifugación a 60.000 g 40 min y se resuspendió en la correspondiente solución acuosa para posteriores estudios. La resuspensión y/o posterior disolución con SDS de los proteolípidos precipitados se hacía más difícil si el precipitado se dejaba secar, por lo que una vez decantado el sobrenadante orgánico se añadía rápidamente la disolución acuosa.

5.3. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.

Para la preparación del cambiador, que en este caso era DEAE-celulosa DE-52, se siguió una modificación del método empleado por Rouser et al (43). La resina se suspendió en 15 vol. de HCl 0,5 N dejándose 15 min con lenta agitación.

Después de filtrar en un Buchner y lavar con agua repetidamente, se resuspendió en 15 vol. de NaOH 0,5 N dejándose el mismo tiempo que antes. Una vez filtrada se lavó con agua y después con 5 vol de metanol y 5 vol. de ácido acético, dejándose en este mismo solvente unas 12 horas. Con el cambiador en su forma acetato se montó una columna de 20 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro. Para que el empaquetamiento fuera uniforme se aplicó una corriente de H_2 a presión por la parte superior y simultáneamente se fue lavando con 6 vol. de metanol, 5 vol. de CM 1:1 y 3 vol. de CM 2:1. La columna, con un flujo de 0,5 mL/min aproximadamente, quedó lista para usarse.

El extracto proteolípídico concentrado se aplicó a la columna en cantidad equivalente a 3,5 mg de proteína (1,75 mg/mL) y la elución se realizó con 5 vol. de CM 2:1 y 9 vol. de CM 2:1 - p-toluensulfonato sódico, en un gradiente de concentración de este último entre 1 y 100 mM. Se recogieron fracciones de 1,8 mL en las que se determinó contenido de proteína (96,95), fosfato lipídico (97) y azúcares reductores (98).

5.4. UNIÓN DE LIGANDOS COLINÉRGICOS.

Tanto en el extracto total de electroplaca de Torpedo como en las fracciones obtenidas en la cromatografía de DEAE-celulosa se ensayó la unión específica de varios ligandos colinérgicos. Principalmente se estudió la unión de (3H)-acetilcolina y (3H)- α -bungarotoxina. Para ello las fracciones se agruparon según los máximos de proteína obtenidos y se concentraron hasta que contenían 0,2 mg de proteína/mL de solvente orgánico. Se tomaron alícuotas de 0,5 mL y se incubaron con (3H)-acetilcolina $10^{-6}M$ durante 20 min a 25°C. Para separar la radiactividad libre de la unida se aplicaron a continuación a columnas de Sephadex LH-20 de 15 cm de longitud y 0,75 cm de diámetro. Estas columnas se prepararon y eluyeron de la siguiente forma: se lavó el Sephadex LH-20 repetidas veces en un Buchner

con agua bidestilada y acetona. Después se dejó secar a 37°C 12 horas. Posteriormente se equilibró durante 4 horas con CM 1:1 y en este mismo solvente se montaron las columnas, lavándose las mismas a continuación con 2 vol. de CM 4:1, CM 15:1 y cloroformo. Después de 2 horas en este disolvente la columna estaba lista para ser usada. Una vez aplicada la muestra se realizó su elución con 15 mL de cloroformo, y 10 mL de CM 15:1, CM 4:1 y CM 2:1. En las fracciones recogidas (2mL) se midió absorbancia a 280 nm y en los máximos se determinó el contenido de proteína y radiactividad. La unión no específica se evaluó preincubando muestras paralelas con d-tubocurarina 71,5 μ M, durante 20 min a 25°C.

En la fracción I de la cromatografía de DEAE-celulosa, que fue la que presentó la máxima unión de (3 H)-acetilcolina, se ensayó también la inhibición producida al preincubar a 25°C 20 min con los siguientes agentes colinérgicos: atropina (10 μ M), hexametonio (500 μ M), oxotremorina (20 μ M), acetilcolina (400 μ M) y α -bungarotoxina (2,3 μ M). Este último ligando se incubó durante 1 hora.

Así mismo en el primer pico se estudiaron diversas características de la unión de (3 H)-acetilcolina al receptor, tales como la(s) constante(s) de disociación y el número máximo de sitios de unión. Para ello muestras conteniendo 100 μ g de proteína/0,5 mL se preincubaron con o sin d-tubocurarina 71,5 μ M a 25°C 20 min y después con (3 H)-acetilcolina en concentraciones comprendidas entre 1 nM y 5 μ M durante 20 min a 25°C. Posteriormente se utilizaron las columnas de Sephadex LH-20 como en casos anteriores.

La unión de (3 H)- α -bungarotoxina se estudió incubando esta droga en concentraciones de 1 μ M durante una hora a 25°C con un extracto orgánico de las mismas características que los anteriores. La unión específica se determinó restando de la unión total de (3 H)- α -bungarotoxina lo que se unió a un extracto preincubado con d-tubocurarina 40 μ M (unión no específica).

Paralelamente a estos estudios se aplicaron en las columnas de Sephadex

LH-20 muestras que sólo contenían droga libre, ya fuera (^3H)-acetilcolina o (^3H)- α -bungarotoxina, para controlar la radiactividad no retenida que no iba unida a proteína.

5.5. MARCAJE CON 4-(N-MALEIMIDO)FENIL(^3H)TRIMETILAMONIO. (MPTA).

Se hizo esencialmente según el método de Karlin y Cowburn (65). Un precipitado de proteolípidos obtenidos a partir de 1 g. de órgano eléctrico liofilizado se suspendió en 8 mL de tampón tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 0,1 M, EDTA 10 mM, ditioneitol 1 mM (añadido este justamente antes de usarse). Se incubó a temperatura ambiente 20 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 8 mL de tampón fosfato sódico 0,5 M, pH 6,7. Después de centrifugar a 60.000 g 40 min se resuspendió el precipitado en 12 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM y se incubó con (^3H)-MPTA (42 nmoles equivalentes a $1,2 \cdot 10^6$ dpm) durante 10 min. La reacción se detuvo con 10 μL de 2-mercaptoetanol y el precipitado se recuperó por centrifugación igual que anteriormente. Se lavó dos veces con el mismo tampón empleado en el marcaje, centrifugándose en las mismas condiciones anteriores.

Adicionalmente se llevaron a cabo dos controles. Para ambos se siguió el procedimiento anterior, pero en uno de ellos no se realizó la reducción con DTT, mientras que en el otro la modificación consistió en una preincubación durante 1 hora con α -bungarotoxina, antes del marcaje con (^3H)-MPTA. Los proteolípidos marcados se disolvieron completamente en 2,5 mL de CH 2:1 - p-toluensulfonato sódico 10 mM (sin la presencia del pTS apenas había disolución) sonicando durante 5 min en un sonicador con baño de agua. Esta disolución se aplicó en una columna de DEAE-celulosa preparada según ya se explicó con anterioridad y adicionalmente lavada con tres volúmenes de CH 2:1 - pTS 10 mM. Con esta misma mezcla se eluyó (3 vol.) y posteriormente con 4 vol. de CH 2:1-pTS 50 mM. En las fracciones resul-

tantes se midió proteína y radiactividad. Las que presentaron máximo contenido de proteína se transfirieron a una solución acuosa que contenía SDS al 10 % (ver apartado 3.5.1 de esta sección) y se sometieron a electroforesis por los procedimientos ya descritos. Una vez teñidos y desteñidos los correspondientes geles, se cortaron en fragmentos transversales de 5 mm y se colocaron los mismos en viales. Después de añadir 0,7 mL de H_2O_2 se calentaron a $110^\circ C$ durante 1 hora. Después se añadieron 16 mL de metilcelosolve al 20 % en hidrófluor (1 g. de PPO + 1 L de tolueno + 666 mL de metilcelosolve) dejándose en reposo unas 12 horas para que la acrilamida precipitase, y procediendo después a su conteo.

5.6. ESTUDIOS SOBRE GRUPOS DISULFURO Y SULFHIDRILLO.

Estos experimentos se hicieron con los proteolípidos precipitados de la misma forma que en los casos anteriores.

Por una parte se determinó el número de grupos -SS- y -SH en el extracto total precipitado, por medio de ácido iodo(3H)acético. Para ello se hizo lo siguiente: los proteolípidos precipitados a partir de un extracto de 0,6 g. de órgano eléctrico liofilizado se dividieron en tres partes iguales A, B y C. A continuación se añadió a cada una 1 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaN_3 3 mM. Además A contenía N-etilmaleimida 10 mM para bloquear los -SH libres. Se incubaron a $4^\circ C$ durante 30 min. Después de centrifugar a 80.000 g 10 min los precipitados se resuspendieron en 0,5 mL de tampón tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM y se añadieron 0,5 mL de tampón tris-HCl 20 mM, pH 8,2, NaCl 150 mM EDTA 1 mM, NaN_3 3 mM. A las partes A y B se añadió también ditioneitol 20 mM y se incubaron a $30^\circ C$ durante 30 min, con lo que se rompieron los grupos -SS-. Posteriormente las tres muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con 120 μM ácido iodo(3H)acético, de tal forma que en A se marcaron mayoritariamente los grupos -SS-, en B los grupos -SS- y -SH y en C únicamente los -SH libres. Por

Último los precipitados se lavaron dos veces con tampón tris-HCl 20 mM, pH 8,2, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM para eliminar la radiactividad residual no unida y se suspendieron en el mismo tampón con el fin de determinar su contenido de proteína y radiactividad.

Se observó que en el primer paso, al tratar los precipitados con NaCl 50 mM a pH 7, disminuía la cantidad de los mismos, quedando proteína solubilizada. Ya que era un hecho llamativo el que proteínas solubilizadas con CM 2:1 y luego precipitadas se solubilizaran sin ayuda de detergente, se investigó la identidad molecular de esta(s) proteínas. Para ello se siguió con esta disolución el mismo procedimiento que con los precipitados, corriéndose después una electroforesis de las muestras tratadas según las condiciones A, B y C mencionadas arriba.

Interesaba también evaluar el contenido de grupos -SH en las distintas fracciones de la cromatografía de DEAE-celulosa, así como de cada proteína presente en las mismas. Para ello se hizo lo siguiente: un precipitado de proteolípidos totales procedente de 2,3 g. de órgano eléctrico liofilizado se suspendió en 6 mL de tampón tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól 5 mM, incubándose a temperatura ambiente 30 min. A continuación se añadió ácido(3H)acético hasta una concentración 15 μ M y se incubó durante unas tres horas. Después el precipitado se lavó con el mismo tampón sin DTT y se disolvió en 8 mL de CM 2:1-pTS 10 mM. Esta disolución se aplicó en una columna de DEAE-celulosa procediéndose exactamente igual que en el caso de los proteolípidos marcados con MP7A. Las fracciones con máximo contenido de proteína y radiactividad se transfirieron a una solución acuosa con SDS al 10 % y se hizo electroforesis a pH básico. En cada gel se contó la radiactividad como ya se ha descrito.

También se determinó espectrofotométricamente (115) la concentración de grupos -SH en las fracciones de la columna de DEAE-celulosa. Para ello los precipitados obtenidos con eter-etanol se disolvieron con tris-HCl 100 mM pH 6, EDTA 5 mM,

SDS 2,5 %, en una concentración de 0,3 mg proteína / mL. A 0,5 mL de esta disolución se añadieron 50 μ L de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) 10 mM en Tris-HCl 100 mM pH 8. Se midió la absorbancia a 412 nm contra un blanco hasta que la densidad óptica no siguió subiendo. La concentración de grupos -SH se calculó usando un coeficiente de extinción de $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (116).

43

RESULTADOS

1. PROTEOLIPIDO DE MIELINA.

1.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE MIELINA.

El procedimiento descrito para la purificación de mielina rindió 2 g. de mielina liofilizada a partir de aproximadamente 50 g. de sustancia blanca de cerebro de vaca. El grado de pureza de la membrana se comprobó por microscopía electrónica y por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.

En la microfotografía de la figura 2 puede observarse que la mielina purificada está libre de membranas citoplasmáticas de células nerviosas. Algunos fragmentos presentes proceden de roturas de la mielina durante el proceso de purificación.

Cada paso de la purificación se siguió también por análisis en geles de SDS-poliacrilamida, observándose el aumento de intensidad de las bandas que se ha descrito en la literatura que componen esta membrana (117), lo que confirmó su pureza. A efectos analíticos, este método, por su sencillez y fácil realización, parece más conveniente que el seguimiento de la purificación por medio de marcadores enzimáticos (106), algunos de los cuales se ha comprobado que no son muy convenientes para este fin. (118), por las posibles contaminaciones procedentes de otras membranas.

1.2. EXTRACCION DEL PROTEOLIPIDO DE MIELINA.

La extracción del proteolípido se basa en la solubilización del mismo junto con otras proteínas en CM 2:1. Luego siguen una serie de procesos para eliminar total o parcialmente esas otras proteínas, en especial la proteína básica de la mielina.

A partir de 300 mg de mielina liofilizada, homogeneizada en CM 2:1 (después de diversas pruebas la proporción óptima de CM 2:1 respecto a la canti-



FIGURA 2: Micrografía electrónica de la mielina purificada. Se observa que está libre de elementos citoplasmáticos. Los fragmentos sueltos, que podría parecer que pertenecen a membranas citoplasmáticas, proceden, al parecer, de membranas mielínicas rotas durante el proceso de purificación.

dad de mielina a solubilizar fue de 1,2 mL/mg de mielina liofilizada) se obtuvieron 32 mg de proteolípido parcialmente purificado. En la precipitación con KCl y posteriores lavados con agua se comprobó que, aunque se eliminaba la proteí-

na básica, también se perdía proteolípido en la interfase agua-disolvente orgánico, quedando además el extracto resultante bastante impurificado aun con proteína básica (figura 5, gel a). Ante esto se optó por la eliminación de estos pasos, habida cuenta además, de que el cambiador iónico empleado posteriormente retenía en su totalidad la proteína básica.

Así pues, para la cromatografía en DEAE-celulosa se partió del extracto de mielina total, aplicándose una cantidad del mismo equivalente a 20 mg de proteína. La elución de la columna proporcionó un pico de absorción a 280 nm que contenía en su segunda parte un máximo de fosfato y azúcares reductores (figura 3).

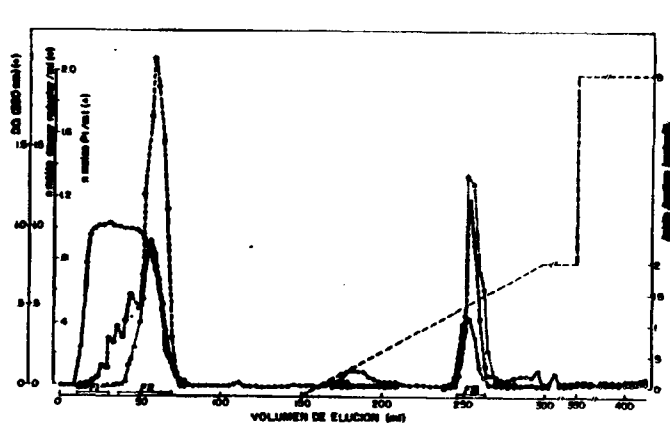


FIGURA 3: Fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa del proteolípido de mielina. Se aplicaron 20 mg de proteína (2 mg/mL) en una columna (2,5x18 cm) de DEAE-celulosa. Se eluyó con CM 2:1 y un gradiente de ácido acético en estos disolventes. Velocidad de flujo 18 mL/hora aproximadamente. Se obtuvieron dos máximos (FI-FII, FIII) de absorbancia a 280 nm, el primero eluyendo con CM 2:1 y el segundo con el gradiente de ácido acético.

Fue por esto por lo que se dividió este pico en dos fracciones F I y F II, siendo esta última la que tenía el máximo de azúcar y de fosfato mencionado. La elución con el gradiente de ácido acético 0,1-2 N proporcionó otro pico con alto contenido también de fosfato y azúcares, que se denominó fracción F III. El análisis de aminoácidos de la muestra aplicada en la columna y de las fracciones obtenidas en la elución se esquematiza en la tabla 2. En ella se puede observar que el ex-

TABLA 1: Composición de aminoácidos del extracto rico en proteolípido de mielina aplicado en la columna de DEAE-celulosa y de las fracciones obtenidas en la elución de la misma.^a

	Extracto rico en proteolípido	Fracción F II	Fracción F III
Lisina	6,72	3,60	7,46
Histidina	5,22	2,30	6,37
Arginina	9,31	2,70	9,88
Acido aspártico	6,21	5,11	7,17
Treonina	5,40	7,60	6,83
Serina	11,56	7,68	7,67
Acido glutámico	5,09	7,35	7,35
Prolina	9,40	2,52	1,50
Glicocola	13,18	13,00	14,89
Alanina	7,64	10,87	12,15
1/2 Cistina	1,03	0,00	0,00
Valina	1,85	7,78	1,10
Metionina	1,40	1,01	1,20
Isoleucina	0,90	5,61	3,47
Leucina	5,52	10,50	4,92
Tirosina	2,33	3,69	1,23
Fenilalanina	6,78	8,70	6,70

^aValores expresados en moles/100 moles. Los resultados son media de dos experimentos en los que cada determinación se hizo por duplicado. No se observaron desviaciones mayores de aproximadamente un 7 %.

tracto de partida tenía una gran proporción de proteína básica, según se deduce de la comparación con la composición de aminoácidos de aquella (119). Esto también confirma que la precipitación con KCl no es muy efectiva para eliminar la proteína básica y en cambio tiene el inconveniente de reducir la cantidad de

proteolípido obtenido. En cuanto a las distintas fracciones puede afirmarse que F I no contenía proteína, por lo que la absorción a 280 nm quizás se deba a algún lípido eluido. La segunda F II, era similar en su composición al proteolípido de mielina purificado por algunos autores (45), mientras que F III, aunque con un alto porcentaje de arginina, glicocola y alanina, difería en su composición tanto del proteolípido como de la proteína básica de la mielina.

La identificación de fosfolípidos en el extracto aplicado a la columna y en las fracciones obtenidas de la misma se hizo mediante cromatografía en capa fina. En la figura 4 puede observarse que el extracto procedente de la mielina contenía esencialmente fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), cerebrósidos (CB) y algo de esfingomielina (EM). La fracción F I

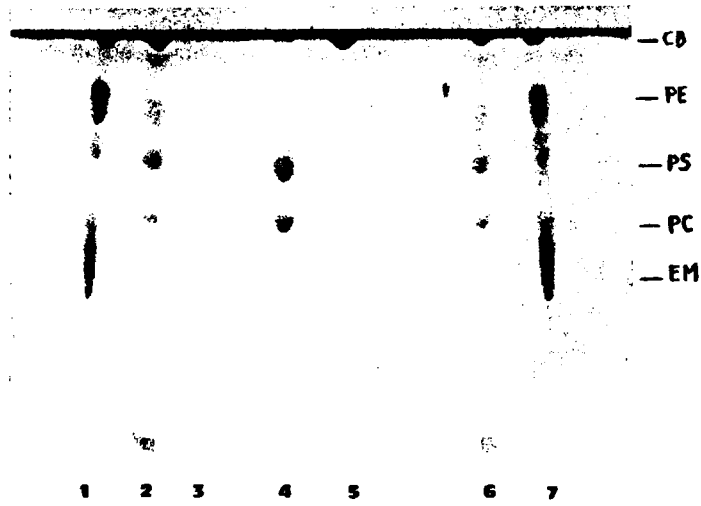


FIGURA 4: Cromatografía en capa fina del extracto rico en proteolípido de mielina aplicado en la columna de DEAE-celulosa y de las fracciones resultantes. Puntos 1 y 7: patrón conteniendo por orden descendente CB (mas lípidos neutros, etc.), PE, PS, PC y EM, 10 nmoles de cada uno. Puntos 2 y 6: extracto total conteniendo CB, PE, PS, PC y algo de EM. Punto 3: fracción F I conteniendo CB (mas lípidos neutros etc.). Punto 4: fracción F II con CB, PS y PC. Punto 5: Fracción F III con CB. En cada punto se aplicó el equivalente de 40-50 nmoles P_f .

sólo contenía CB y/o algún otro lípido sin identificar que se desplazaba con el frente del cromatograma. La presencia de fosfato en esta fracción no se pudo detectar (tabla 2). La fracción FII contenía preferentemente PC, PS y algo de CB, lo cual coincide con los datos cuantitativos de la tabla 2. Por último FIII tenía un alto contenido, al parecer, de CB.

TABLA 2: Contenido de proteína, fosfato y azúcares reductores del extracto rico en proteolípido de mielina aplicado en la columna de DEAE-celulosa y de las fracciones obtenidas en su elución.

	Extracto proteolípido	FI	FII	FIII	%retenido en columna
Proteína (mgr.)	20,00 (100%)	-	0,45 (2,3) ^a	0,52 (2,6)	95,10
Fosfato _i (µmoles)	31,00 (100%)	-	0,43 (1,4)	10,7 (34,6)	64,00
Azúcar reductor (µmoles)	108,00 (100%)	5,28 (4,88)	48,14 (44,4)	12,40 (11,4)	39,50

^aEntre paréntesis se indican los porcentajes que representa cada fracción con respecto al total aplicado a la columna.

De la muestra de partida aplicada a la columna y de las fracciones que contenían proteína, es decir FII y FIII, se hizo electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida a pH básico. El resultado puede apreciarse en la figura 5. Como ya se indicó al hablar de la composición de aminoácidos, el extracto de partida contenía mayoritariamente la proteína básica y siguiéndole en importancia el proteolípido. Había además otras bandas, algunas de las cuales podrían deberse a agregados del propio proteolípido. En FII y FIII sólo se pudo apreciar la presencia de una banda que posiblemente, y por comparación con el gel de la muestra aplicada a la columna, pertenecía al proteolípido. En el caso de FIII podría haber contaminación con la proteína básica, dado que además la composición de aminoácidos de esta fracción no se asemeja ni a la del proteolípido ni a la de la proteína básica, aunque su porcentaje de aminoácidos hidrófobos es alto. Esta contaminación es me-

nos probable que ocurriera en FII ya que aquí sí que coincide su composición con la del proteolípido de mielina hallada por otros autores (45).

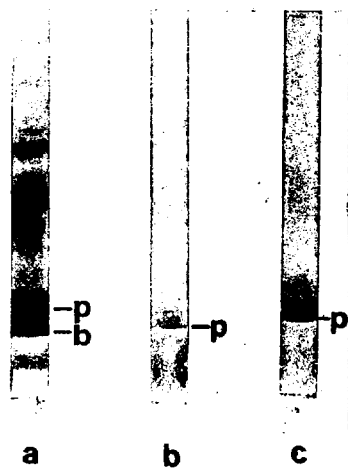


FIGURA 5: Electroforesis a pH básico del extracto rico en proteolípido de mielina aplicado en la columna de DEAE-celulosa y de las fracciones resultantes. a: muestra aplicada en la columna. b: fracción FII. c: fracción FIII. Se indica la localización de la proteína básica b, y del proteolípido p (tinción difusa). Geles con SDS al 0,1% y poliacrilamida al 13 %.

1.3. PURIFICACION POR ADSORCION-DESADSORCION EN DEAE-CELULOSA.

El rendimiento de la cromatografía en columna fue francamente bajo (tabla 2), aunque la separación del proteolípido era bastante buena. Debido a esto se intentó la purificación por medio de la adsorción del extracto orgánico de mielina en DEAE-celulosa y desadsorción posterior eluyendo con CM 2:1 y diversas concentraciones de ácido acético. De esta forma se consiguió duplicar el rendimiento.

En primer lugar se consideró el tiempo que el cambiador estaba en contacto con el disolvente en cada etapa de la elución. Así se hicieron diversas pruebas

en las que el tiempo de agitación con cada mezcla eluyente variaba desde 4 a 24 horas. Se observó que a medida que el tiempo aumentaba también lo hacía el rendimiento de proteína eluída (tabla 3). Aproximadamente un 76,5 % de la proteína que se ponía en contacto con el cambiador era adsorbida por este a las 4 horas de lenta agitación a 4°C. A tiempos mayores la cantidad de proteína se mantiene prácticamente invariable. En cuanto a la proteína eluída se alcanza un tiempo límite de

TABLA 3: Variación del rendimiento de la purificación por adsorción-desadsorción en DEAE-celulosa del proteolípido de mielina a medida que el tiempo de elución se modificó.^a

Eluyente	4 horas	8 horas	24 horas
CM 2:1	2,14	2,21	2,28
CM 2:1-ácido acético 1N	2,58	7,06	16,05
CM 2:1-ácido acético 2N	2,96	4,94	13,31
CM 2:1-ácido acético 5N	3,35	7,46	21,03
Rendimiento total	11,03	21,67	53,37

^aCada cifra representa el rendimiento expresado como % de proteína eluída respecto a la proteína adsorbida por la DEAE-celulosa.

24 horas de elución aproximadamente, mas allá del cual no se consigue mejorar el rendimiento. En el cambiador queda retenido un 47 % de la proteína, pero la pureza de la fracción obtenida disminuye. En efecto, si con 4 horas de elución se eluye solo el proteolípido, la elución durante 8 y 24 horas provoca la aparición de bandas de menor peso molecular. Se pensó que la larga permanencia de la proteína junto al ácido sería la causante de proteólisis y por consiguiente de la aparición de dichas bandas. Pero esta hipótesis se descartó, pues además de que todas las operaciones se hicieron a 4°C, el contenido de aminoácidos básicos se elevó en la proteína eluída a medida que aumentaba el tiempo, lo que sugería que las bandas aparecidas perte-

nección a la proteína básica, que se conseguía eluir a tiempos mayores que el proteolípido. Con el fin de evitar esta contaminación se optó, por tanto, por realizar la elución solo durante 4 horas. Los resultados, en lo que se refiere a la cantidad de proteína y azúcares reductores, así como fosfato lipídico en la elución durante 4 horas se especifican en la tabla 4. Todos los resultados que se describirán a partir de ahora se referirán al material obtenido eluyendo durante 4 horas.

TABLA 4: Contenido de proteína, fosfato y azúcares reductores de las fracciones obtenidas en el experimento de adsorción-desadsorción en DEAE-celulosa del proteolípido de mielina.^a

	Proteína (mg)	Fosfato (μ mol/mg prot.)	Azúcar reductor (μ mol/mg prot.)
Extracto de mielina en CM 2:1	71,46	1,55	5,44
Fracción no adsorbida	16,77	1,32	4,66
Fracción adsorbida	54,69	1,62	5,68
Fracción eluida con CM 2:1	1,17	4,77	13,37
Idem con ácido acético 1N	1,41	7,07	16,98
Idem con ácido acético 2N	1,62	2,15	14,11
Idem con ácido acético 5N	1,83	1,56	14,43
Fracción retenida en la resina ^b	48,66	1,37	4,56

^aEl tiempo de elución de cada fracción fue de 4 horas. ^bValores hallados por diferencia entre el material aplicado a la columna y el eluido de la misma. Los resultados son media de 3 experimentos con una desviación menor en todos los casos del 9 %.

Dado que el contenido de fosfato (debido en su mayor parte probablemente a la presencia de fosfolípidos), era alto, sobresaliendo la fracción eluida con CM 2:1-ácido acético 1 N, se hizo cromatografía en capa fina para identificar los lípidos que se eluyen junto con el proteolípido, y que mantienen probablemente con estas interacciones de tipo no covalente. En la figura 6 pueden observarse los resul-

tados obtenidos. En el extracto de mielina se encontró EM, PC, PS, PE, CB y otro lípido sin identificar (LD) situado entre PC y PS. En la fracción no adsorbida por el cambiador y en la obtenida eluyendo con CM 2:1 se encontraron todos los fosfolípidos mencionados anteriormente, a excepción de PS, mientras que en las obtenidas

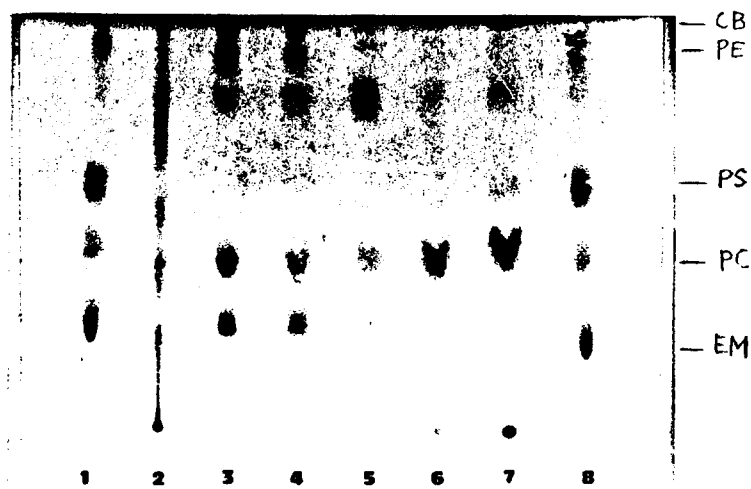


FIGURA 6: Cromatografía en capa fina del extracto total de mielina adsorbido por la DEAE-celulosa y de las fracciones resultantes en su elución. Puntos 1 y 8: patrón lipídico conteniendo por orden descendente CB, PE, PS, PC y EM (10 nmoles de cada uno). Punto 2: extracto total con CB, lípido sin identificar, PE, PS, PC y EM. Punto 3: fracción no adsorbida por el cambiador. Punto 4: fracción eluida CM2:1. Puntos 5, 6 y 7: fracciones obtenidas eluyendo respectivamente con ácido acético 1, 2 y 5 N en CM 2:1. Contienen mayoritariamente PC. Se aplicó en cada punto el equivalente de 40-50 nmoles de P_i . Revelado con vapores de yodo.

eluyendo con ácido acético se detectó la presencia de PC, LD y muy poco apreciablemente EM, CB y PE. A medida que la concentración de ácido se incrementó, la mancha perteneciente a PC se hizo mas visible, sucediendo lo contrario con LD.

La electroforesis en geles de SDS-pollacrilamida se hizo a pH básico y a

pH neutro, calculándose posteriormente el peso molecular del proteolípido por medio de un patrón de proteínas de peso molecular conocido.

La electroforesis a pH neutro (figura 7) permitió observar que el extracto orgánico de mielina presentaba varias bandas predominantes, cuyos pesos moleculares eran 16.000, 17.500, 20.000, 24.000 y 102.000 Dalton, sobresaliendo las de 20.000 y 24.000. Las fracciones obtenidas de la resina eluyendo con ácido acético

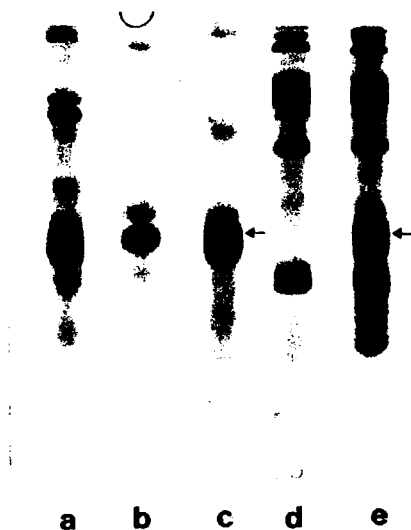


FIGURA 7: Electroforesis a pH neutro de la mielina solubilizada en SDS y en CM 2:1 y de la fracción obtenida al eluir con CM 2:1-ácido acético 2N a: mielina solubilizada en SDS al 2,5 %. b: mielina solubilizada con CM 2:1. c: fracción obtenida al eluir la DEAE-celulosa con CM 2:1- ácido acético, con la banda mayoritaria de proteolípido (señalada con una flecha). d: patrón de proteínas con fosforilasa A, seroalbúmina bovina, glutámico deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y mioglobina. e: es la suma de c y d para hallar el peso molecular de la banda señalada con una flecha. Geles con SDS al 0,1 % y poliacrilamida al 13 %. Tinción con azul de Coomassie.

1, 2 y 5 H tenían una banda de peso molecular 20.000 y algunas otras de mayor peso molecular, presumiblemente pertenecientes a agregados de la anterior, ya que no estaban presentes en el extracto inicial de mielina. Similares resultados, en cuanto al contenido de cada fracción, se obtuvieron con la electroforesis a pH básico (figura 8). El extracto orgánico de mielina contenía preferentemente bandas de bajo peso molecular, sobresaliendo la del proteolípido. En las fracciones de elución de la resina sólo se obtuvo una banda, correspondiente al proteolípido, y cuyo peso molecular se calculó en 23.000 Dalton. Por tanto había una ligera discrepancia en cuan-

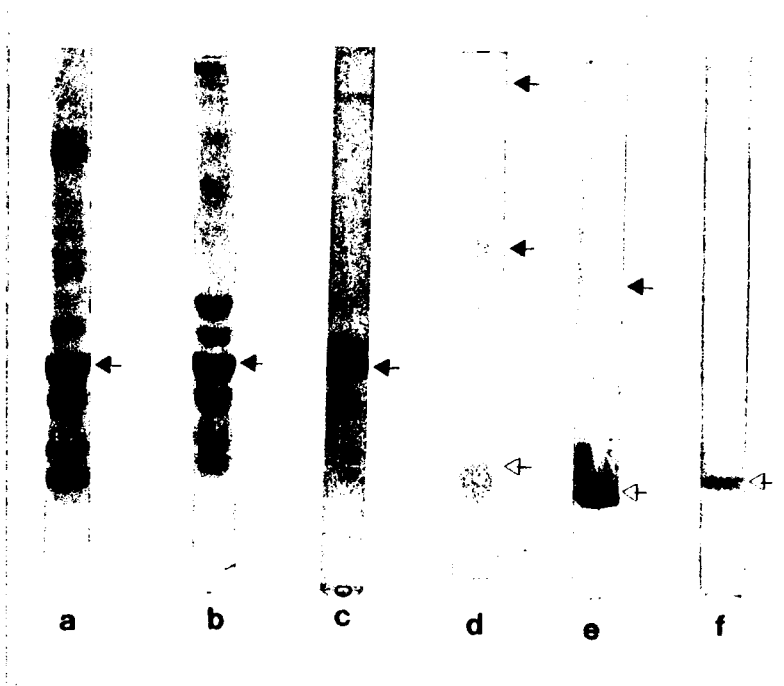


FIGURA 8: Electroforesis a pH básico de la mielina solubilizada con SDS y CM 2:1 y de la fracción obtenida al eluir con CM 2:1-ácido acético 2N la DEAE-celulosa. a y d: mielina solubilizada con SDS al 2,5 %. b y e: mielina solubilizada con CM 2:1. c y f: fracción obtenida al eluir con CM 2:1-ácido acético 2 N la DEAE-celulosa. En geles a, b y c (tinción con Azul de Coomassie) se indica con una flecha la banda correspondiente al proteolípidio. En geles d, e y f (tinción con fuchsina básica) se indican con flecha negra las glucoproteínas teñidas y con flecha blanca la zona lipídica teñida (posiblemente glucolípidos). Geles con SDS 0,1% y poliacrilamida 13 %.

to a los valores calculados para los pesos moleculares a uno u otro pH. Los geles de la electroforesis a pH básico también se tiñeron con fuchsina (figura 8). En la mielina solubilizada totalmente con SDS se detectó la presencia de algunas glucoproteínas de alto peso molecular. En el extracto orgánico de esta misma membrana estas bandas habían desaparecido, a excepción de la de menor movilidad que permanecía. Por fin, en las fracciones eluidas con ácido acético no se detec-

tó la presencia de ninguna glucoproteína, aunque había una zona fuertemente teñida que por su movilidad pertenecía a los lípidos eluidos al mismo tiempo que la proteína.

El análisis de aminoácidos de la proteína eluida del cambiador, y que como se acaba de decir solo representaba una banda en geles de SDS-poliacrilamida, se presenta en la tabla 5. Se pudo apreciar, en general, una composición similar

TABLA 5: Análisis de aminoácidos del extracto de mielina en CM 2:1 adsorbido por la DEAE-celulosa y de las fracciones obtenidas al eluir esta con CM 2:1 y ácido acético 1, 2 y 5 N.^a

	A ^b	B ^c	C ^d	D ^e	E ^f
Lisina	5,79	3,75	4,32	4,78	4,96
Histidina	3,60	2,21	2,59	3,39	3,75
Arginina	4,17	2,82	2,86	3,35	5,29
Acido aspártico	5,13	5,05	4,63	4,83	5,62
Treonina	6,70	7,81	7,89	5,26	5,94
Serina	10,18	9,27	5,13	5,38	10,03
Acido glutámico	7,06	7,38	6,08	6,50	6,58
Prolina	4,27	1,21	3,56	3,79	5,01
Glicocola	12,54	12,09	10,33	13,13	13,53
Alanina	10,98	10,72	14,04	11,44	12,40
1/2 Cistina	0,40	-	-	-	-
Valina	5,03	7,82	8,86	5,64	4,27
Metionina	0,06	0,21	0,90	0,57	0,72
Isoleucina	4,05	6,20	5,72	5,22	3,96
Leucina	9,90	10,35	11,88	14,24	9,26
Tirosina	3,19	3,52	2,47	2,88	2,32
Fenilalanina	6,94	9,57	8,81	9,60	6,34

^aValores expresados en moles / 100 moles. Los resultados son media de dos experimentos y cada determinación hecha por duplicado. La desviación osciló entre un 3 y un 8 % aproximadamente. ^bExtracto de mielina en CM 2:1. ^cFracción eluida con CM 2:1. ^dIdem con CM 2:1-ácido acético 1 N. ^eIdem con CM 2:1-ácido acético 2 N. ^fIdem con CM 2:1-ácido acético 5 N.

en todas las fracciones, si bien había un ligero aumento en los aminoácidos básicos a medida que aumentaba la concentración de ácido. Esto indicaría que si la concentración de ácido sube, se consigue eluir algo de proteína básica que contamina la fracción proteolipídica.

Aparte de la variación en el tiempo también se introdujeron modificaciones en el eluyente.

En primer lugar se procedió a la elución, una vez adsorbida la proteína por la DEAE-celulosa, con butanol-agua 17:3 durante 24 horas, comprobándose que prácticamente no se conseguía eluir proteína.

Otra modificación consistió en la elución con CM 2:1-hidróxido amónico en concentraciones sucesivas de este último de 0,1, 0,5 y 1,3 M. Se pudo observar (tabla 6) que el rendimiento era menor que en el caso de la elución con ácido acético. En total era del 2,6 % para la elución durante 24 horas, frente al 53 % conseguido con la elución de ácido acético durante ese mismo tiempo.

TABLA 6: Contenido de proteína y fosfato de las fracciones obtenidas en el experimento de adsorción-desadsorción en DEAE-celulosa del extracto de mielina en CM 2:1. Elución con CM 2:1-hidróxido amónico.

	Proteína (mg)	Fosfato _i (μmoles/mg prot.)
Extracto de mielina en CM 2:1 adsorbido por la DEAE-celulosa	40,64	1,55
Fracción eluida con CM 2:1-hidróxido amónico 0,1 M	0,18	7,78
Idem con hidróxido amónico 0,5 M	0,41	1,46
Idem con hidróxido amónico 1,3 M	0,22	6,54

1.4. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DEL PROTEOLÍPIDO PURIFICADO.

Como ya se indicó al principio, se hicieron ciertos estudios estructurales del proteolípido purificado con DEAE-celulosa. El primero de ellos fue la obtención de los mapas peptídicos con tripsina y subtilisina (figura 9). La distribución de los péptidos era distinta en cada digerido, como era de esperar, pero lo

mas llamativo fue la presencia de manchas de gran tamaño intensamente teñidas, y que tanto en el mapa tróptico como en el obtenido con subtilisina estaban localizadas en la misma zona. Se trata de péptidos que tanto en la cromatografía como en la electroforesis demuestran poseer la menor movilidad. Mas adelante se discuten las posibles causas de este comportamiento.

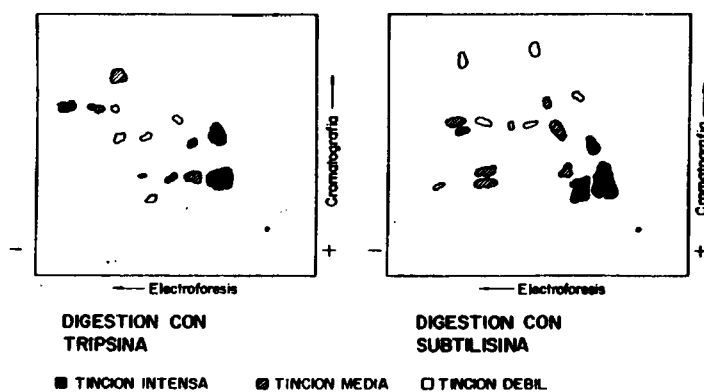


FIGURA 9: Mapas peptídicos del proteolípido purificado. El digerido de tripsina o subtilisina se disolvió en ácido acético al 30 % y se aplicó en una placa (10x10 cm) de celulosa. La cromatografía ascendente se realizó en n-butanol-piridina-ácido acético-agua (24,4:57,8:7,6:30) y la electroforesis a 450 V, 8 mA durante 40 min (tampón de electroforesis piridina-ácido acético-agua 1:10:89).

En cuanto a la determinación del grupo amino terminal dió como resultado alanina. Esto es una prueba de que la banda obtenida en la electroforesis se compone de sólo una cadena polipeptídica. Como se puede apreciar en la figura 10, se detectaron manchas muy débiles correspondientes a metionina, fenilalanina, tirosina, ácido glutámico, ácido aspártico y serina. Podrían proceder de ligerísimas contaminaciones de péptidos u otras proteínas de bajo peso molecular, ape-

nas detectables por electroforesis pero si por este método, cuya gran sensibilidad es bien conocida.

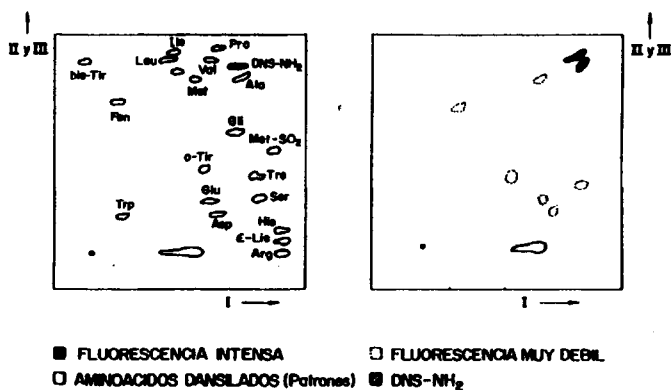


FIGURA 10: Determinación del aminoácido N-terminal por el método del cloruro de dansilo. En la cromatografía bidimensional se emplearon los disolventes que se indican: I. Acido fórmico al 1,5 % en agua. II. Benceno-ácido acético glacial (9:1). III. Acetato de etilo-metanol-ácido acético (90,8:4,6:4,5). Se obtuvo una mancha muy visible correspondiente a alanina y otras apenas perceptibles.

1.5. INCORPORACION DEL PROTEOLIPIDO DE MIELINA EN LIPOSOMAS.

La asociación del proteolípido de mielina y de la fosfatidilcolina se estudió por un método de centrifugación descrito en Métodos. En la tabla 7 puede observarse que la cantidad de proteína que coprecipitó con las vesículas fue función del cociente inicial proteína:lipido y prácticamente no disminuyó por posteriores lavados con tampón. Estos datos contrastan con los obtenidos con una mezcla de lípidos y albúmina bovina en las mismas proporciones que las de la tabla 7. En efecto, se encontró más del 55 % de la proteína inicialmente añadida, en el sobrenadante después del primer lavado y casi un 95 % después del segundo lavado.

TABLA 7: Incorporación del proteolípido de mielina en liposomas de fosfatidilcolina.

Experimento	Mezcla inicial (μg)	μg de proteína o lípido después de					
		Centrifugación		Primer lavado		Segundo lavado	
		Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante
1.PC	2800	2700	200	2700	-	2400	-
Proteína	600 (0,21) ^a	377 (0,14)	-	280 (0,10)	-	200 (0,08)	92
2.PC	3200	1800	-		n.d. ^b		n.d.
Proteína	1200 (0,38)	1100 (0,62)	-		n.d.		n.d.
3.PC	4930	4500	500	4230	200	4020	-
Proteína	1200 (0,24)	1200 (0,27)	-	1100 (0,26)	95	860 (0,21)	210
4.PC	480	450	-		n.d.		n.d.
Proteína	360 (0,75)	150 (0,33)	170		n.d.		n.d.
5.DPL	5000	4300	500		n.d.		n.d.
Proteína	1300 (0,26)	850 (0,18)	375		n.d.		n.d.

^aEntre paréntesis se indica el cociente proteína:lípido. ^bn.d. no determinado. ^cEl tampón de formación de los liposomas contenía en este caso NaCl 1 M para investigar el posible papel de las interacciones iónicas.

Puede observarse también que el proteolípido se asoció con la DPL por debajo de la temperatura crítica de transición de fase (tabla 7, exp. 5)

1.6. MEDIDA DE LA ABSORBANCIA A 450 nm DE LOS LIPOSOMAS CON DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA MAS PROTEOLIPIDO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA.

De los datos del apartado anterior pudo concluirse que un gran porcentaje del proteolípido se incorporaba en las vesículas de PC. Fue de interés, por tanto, examinar las consecuencias funcionales de tal incorporación. Para ello se hicieron los experimentos que se describen en este apartado y en el siguiente.

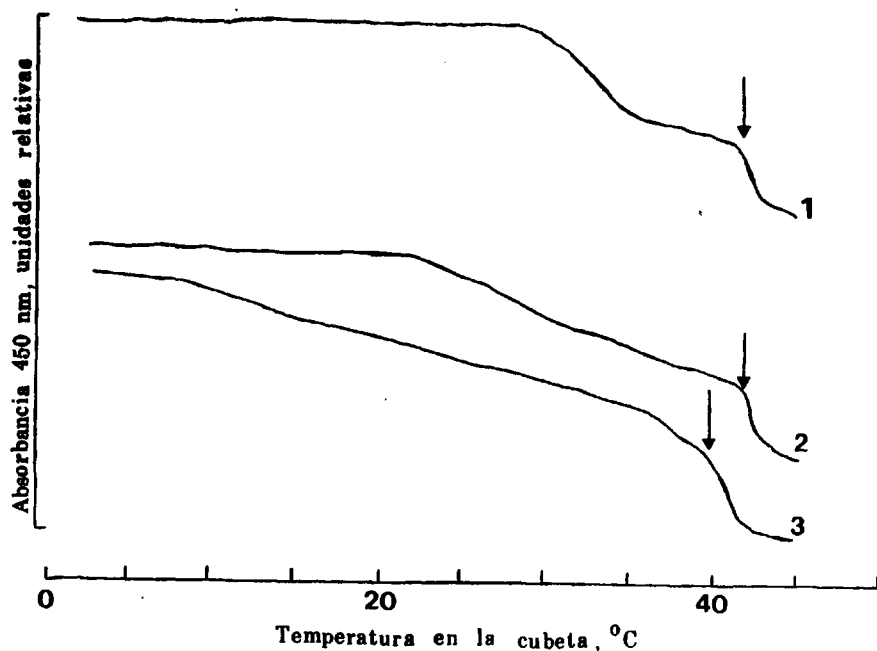


FIGURA 11: Efecto de la temperatura sobre la absorbancia a 450 nm de una suspensión de liposomas con o sin proteolípido. 1: liposomas de DPL. 2: liposomas de DPL mas proteolípido de mielina (la temperatura de transición de fase del fosfolípido no se vió afectada). 3: liposomas de DPL mas proteolípidos de Torpedo (la temperatura de transición de fase se desplazó a valores mas bajos).

La absorbancia de una dispersión de lípido puro varió con la temperatura (figura 11, 1), observándose dos descensos marcados a 32° y a 42°C. El primero se cree que se produce por la agregación de liposomas o por fenómenos de hidratación (120,121). El segundo refleja la temperatura de transición de fase del fosfolípido, como resultado de un índice de refracción mas bajo al incrementarse el volumen de la bicapa lipídica y debido al mayor movimiento rotacional de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Pues bien, al incorporarse el proteolípido de mielina purificado (figura 11, 2) la primera transición fue prácticamente eliminada y la segunda no pareció sufrir variaciones. Esto sugiere que el efecto del proteolípido sobre los lípidos de las vesículas no es muy marcado, y en todo caso no es detectable por este método. Sin embargo, los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo tienen un efecto mas marcado sobre la bicapa y desplazan la temperatura de transición de fase apreciablemente lo que indica que posiblemente mantienen otro tipo de interacciones con los lípidos.

1.7. CAPTURA DE ISÓTOPOS Y VELOCIDAD DE SALIDA DE LOS MISMOS A PARTIR DE LIPOSOMAS CON EL PROTEOLÍPIDO INCORPORADO.

En la tabla 8 puede observarse que el volumen de captura de los liposomas con proteolípido era significativamente mas bajo que el de liposomas con sólo

TABLA 8: Captura de isótopos por liposomas de fosfatidilcolina con o sin proteolípido de mielina incorporado.^a

Isótopo	Liposoma	μL solución/ μmoles lípido
⁸⁶ Rb	PC	1,20
	PC+proteolípido	0,12
¹⁴ C-glucosa	PC	1,02
	PC+proteolípido	0,55

^aValores resultado de 5 experimentos con una desviación no mayor del 20 %.

La incorporación del proteolípidos en las vesículas de fosfatidilcolina no tuvo ningún efecto sobre la velocidad de salida de ^{86}Rb (figura 12) y ^{14}C -glucosa (no se presentan datos por ser similares a los del Rb) de las mismas.

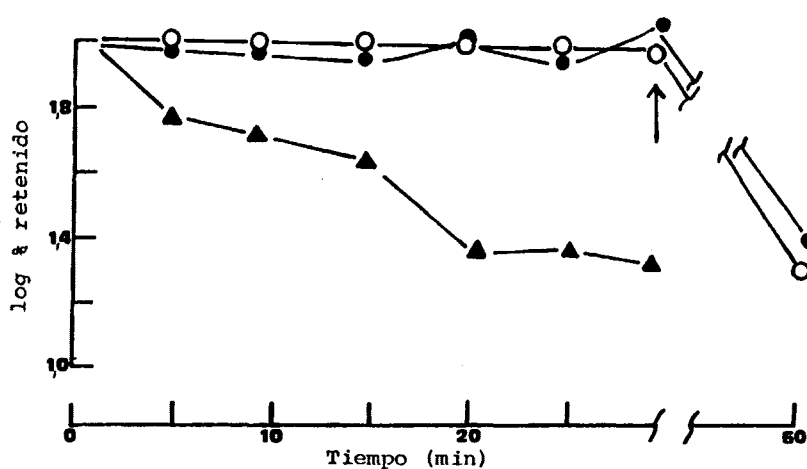


FIGURA 12: Esquema de la salida de ^{86}Rb de liposomas de fosfatidilcolina con o sin proteolípidos. La razón proteína:lipido fue de 0,20. (O) liposomas de fosfatidilcolina pura, (●) liposomas conteniendo además proteolípidos de mielina, (▲) liposomas conteniendo fosfatidilcolina, proteolípidos de mielina y proteolípidos de la electroplaca de Torpedo (razón proteína:lipido 0,22) La flecha indica la adición de cloroformo (concentración final 30 mM) al líquido de diálisis (detalles experimentales en Métodos) con consiguiente aumento en la permeabilidad de los liposomas.

Tanto uno como otro isótopo salían a la misma velocidad de liposomas con el proteolípidos incorporado y de aquellos formados con sólo PC. Sin embargo ambas especies eran sensibles a la acción del cloroformo. Como es sabido, este compuesto orgánico afecta a los lípidos de la bicapa induciendo una gran fluidez en la misma, lo que se traduce en un aumento en la salida de isótopos. De esta forma se tiene un control de que los liposomas formados son "normales". Por otra parte se sabía que los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo inducían un

umento en la fluidez de la bicapa (122). Por tanto se mezclaron estos con el proteolípido de la mielina y se observó que se incrementaba la velocidad de salida de ^{86}Rb , sugiriendo que, aparentemente, los liposomas eran sensibles al efecto de otros proteolípidos pero no al de la mielina.

2. PROTEOLÍPIDOS DE LA ELECTROPLACA DEL TORPEDO MARMORATA.

2.1. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO CON DEAE-CELULOSA.

Para la extracción de los proteolípidos con CM 2:1 lo más correcto hubiera sido emplear membranas plasmáticas, pero se optó por el uso del órgano eléctrico total, dado que el rendimiento era mayor. Esto se hizo una vez que se comprobó que las proteínas que se extraían de la membrana coincidían (en lo que a los polipéptidos de interés se refiere) con las obtenidas a partir de la electroplaca completa, como puede observarse en la figura 13. En la membrana, además de otros polipéptidos están presentes los de 39, 50, 58 y 63 KDalton que pertenecen al receptor de acetilcolina purificado por medio de detergentes. En los proteolípidos, tanto de la membrana citoplasmática como del órgano eléctrico total, la banda mayoritaria es la de 39 KDalton, aunque también se encuentran otras presentes.

Al extraer con CM 2:1 1 g. de órgano eléctrico de Torpedo liofilizado, equivalente a 11 g. de tejido fresco, se obtuvieron 5 mg. de proteína. El fraccionamiento de este extracto sobre una columna de DEAE-celulosa permitió la obtención de tres fracciones proteicas (figura 14). La fracción I, que contenía el 13% de la proteína aplicada y la mayor parte de los lípidos, se obtuvo al eluir con CM 2:1. Las fracciones II y III se eluyeron con CM 2:1 y un gradiente de p-toluen-sulfonato. La fracción II representó el 33 % de la proteína aplicada, siendo bajo su contenido de fosfato, mientras que la fracción III contenía el 46,8 % de la proteína y una cantidad de fosfato aún inferior a la de la fracción II. El rendi-

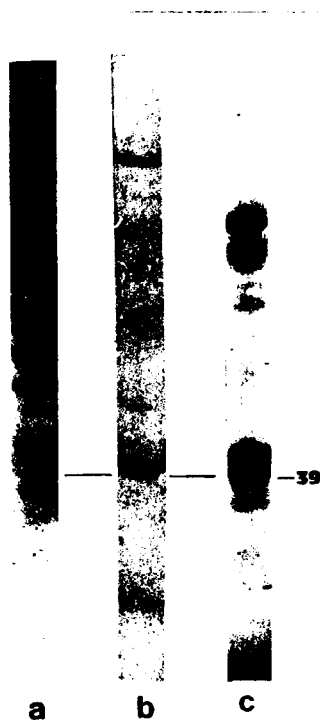
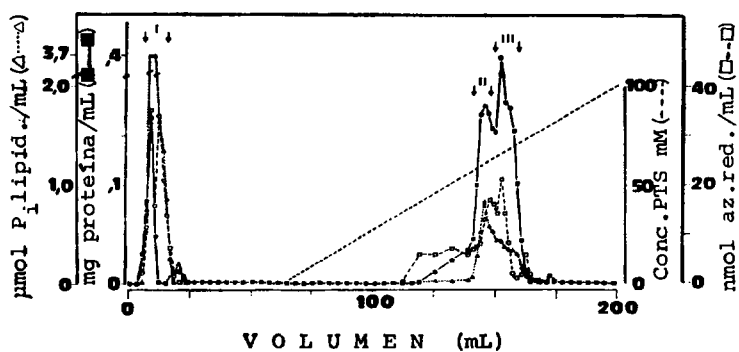


FIGURA 13 (izquierda): Comparación electroforética de las proteínas de las membranas ricas en receptor y de los proteolípidos extraídos de estas y de la Electrolplaca total de Torpedo. a, proteínas totales de membranas ricas en receptor de acetilcolina. b, proteolípidos extraídos de las anteriores membranas. c, proteolípidos de la electrolplaca total. Se indica el peso molecular en KDalton. Gels a pH básico con SDS al 0,1 % y poliacrilamida al 13 %.

FIGURA 14 (abajo): Cromatografía en DEACelulosa de los proteolípidos de la electrolplaca de Torpedo. La elución se inició con CH₂:1 y se continuó con un gradiente de p-toluenosulfonato sódico entre 0,1 y 100 mM. El pH del eluyente varió aproximadamente entre 6,6 y 2,5. Se aplicó a la columna el equivalente de 5,1 mg de proteína. En cada tubo (1,8 mL) se determinó contenido de proteína, fosfato y azúcares reductores. Se indican entre flechas los volúmenes de elución de las fracciones I, II y III.



miento total de proteína fue casi del 100 %. En las tres fracciones había azúcares reductores en baja proporción, aunque la fracción I era más abundante en los mismos, probablemente porque iban unidos a lípidos, formando glucolípidos. La tabla 9 presenta, en valores absolutos, el contenido de proteína, fosfato y azúcares reductores del extracto orgánico aplicado a la columna y de las fracciones obtenidas de la misma.

TABLA 9: Contenido de proteína, fosfato y azúcares reductores del extracto orgánico de electroplaca de Torpedo y de las fracciones de la cromatografía de DEAE-celulosa.

	Proteína (mg)	Fosfato (μ moles)	Azúcares red. (nmoles)
Extracto Inicial ^a	5,10	33,1	542
Fracción I	0,65	23,8	238
Fracción II	1,65	4,5	146
Fracción III	2,43	3,9	111

^a Los valores corresponden al extracto de 1 g. de tejido liofilizado, que fue el material aplicado a la columna. Así mismo, los valores de las fracciones I, II y III proceden del fraccionamiento de esa misma cantidad de material.

Con el fin de identificar los fosfolípidos presentes en las fracciones, se hizo una cromatografía en capa fina (figura 15). Se pueden apreciar tanto diferencias cualitativas como cuantitativas en la distribución de los fosfolípidos en las tres fracciones. En la fracción I hay principalmente lisofosfatidilcolina, EM y PC, mientras que en las fracciones II y III las principales manchas corresponden a PE y PS+PI. Por este método no se pueden separar PS y PI. Las diversas fracciones proteolípídicas aparentemente carecen de lípidos neutros, cerebrósidos etc. que migran en el frente del cromatograma.

El análisis de aminoácidos de las fracciones (tabla 10) también puso de

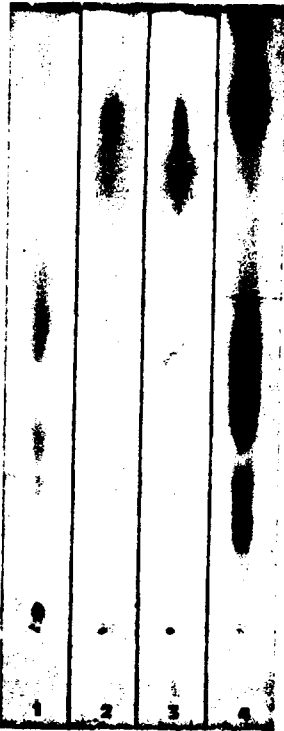


FIGURA 15: Cromatografía en capa fina de los lípidos presentes en las fracciones separadas por DEAE-celulosa. Se aplicaron 40 nmoles de P_i en los puntos señalados 1 (fracción I), 2 (fracción II) y 3 (fracción III). En el punto 4 se aplicó un patrón lipídico con teniendo lisolecitina, esfingomielin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cerebrósidos. Revelado con vapores de iodo.

manifiesto diferencias entre las mismas. Antes del análisis se precipitó la proteína casi en su totalidad con eter-etanol, con lo que se consiguió eliminar una gran cantidad de lípidos. Este paso resultó esencial para eliminar muchas interferencias debidas a los lípidos. La fracción I contenía el mayor porcentaje de aminoácidos hidrófobos, mientras que en las otras dos este porcentaje disminuía sensiblemente. Por el contrario los aminoácidos con carga, sobre todo los básicos, aumentaron en las dos últimas fracciones. Estos resultados sugerían que la(s) proteína(s) de la fracción I eran mas hidrófobas y por tanto no interaccionaban apenas con el cambiador iónico. Por el contrario, las proteínas de las fracciones II y III, al poseer un mayor número de aminoácidos cargados se unían fuertemente

a la DEAE-celulosa, siendo retenidas por esta.

TABLA 10: Composición de aminoácidos de las diversas fracciones separadas por medio de cromatografía en DEAE-celulosa a partir del extracto orgánico de la electroplaca de Torpedo.^a

	Fracción I	Fracción II	Fracción III
Acido aspártico	6,10	7,98	7,82
Treonina	4,91	3,98	4,66
Serina	7,23	7,00	8,10
Acido glutámico	7,72	11,42	9,61
Prolina	5,44	5,54	4,29
Glicocola	9,79	9,88	9,55
Alanina	12,57	10,37	8,87
Valina	5,60	5,99	4,87
Metionina	0,39	0,67	-
Isoleucina	6,69	6,20	6,02
Leucina	11,02	10,55	10,63
Tirosina	4,69	3,62	2,90
Fenilalanina	7,50	5,39	5,54
Histidina	1,37	0,97	2,90
Lisina	4,79	5,43	11,16
Arginina	4,21	5,00	3,06
Aminoácidos ácidos	13,82	19,40	17,43
Aminoácidos básicos	10,37	11,40	17,12
Aminoácidos polares sin carga ^b	27,76	27,07	26,60
Aminoácidos hidrófobos	48,01	42,12	38,83

^a Valores expresados en moles de cada aminoácido por 100 moles del total, procedentes de dos experimentos en los que no se observó una desviación mayor de un 6 %.

^b Aminoácidos polares sin carga se consideran: treonina, serina, prolina, glicocola y metionina. Cistina y triptófano no se determinaron.

La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida a pH básico del extracto aplicado a la columna mostró la presencia de dos bandas de peso molecular 39 y 42 KDalton y dos dobletes de 62 y 69 (figura 16). A veces se observó además, una banda de bajo peso molecular. En la fracción I se observó la presencia de una sola banda de 39 KDalton y en la fracción II estaba mayoritariamente la de 42 aunque se podían distinguir polipéptidos de mayor peso molecular, como ocurría en el extrac-

to inicial. En la fracción III el patrón electroforético fue el mismo que en la fracción II, pero con mayor proporción de los polipéptidos de mayor peso molecular. La tinción con fucsina permitió la visualización de algunas bandas en las

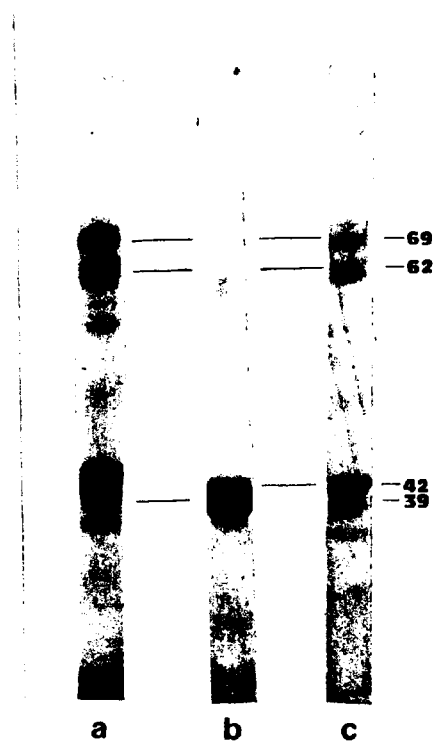


FIGURA 16: Electroforesis de los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo. a, extracto orgánico total de la electroplaca, b y c, fracciones I y II respectivamente de la cromatografía en DEAE-celulosa. En cada caso la proteína se delipidó por precipitación con eter-etanol. Se indican las bandas en común con sus pesos moleculares en KDalton. Geles a pH básico con SDS al 0,1 % y poli-acrilamida al 13 %.

tres fracciones, lo que sugería la presencia de glucoproteínas. No obstante, el contenido de azúcares era bajo, ya que hubo que aplicar unos 300 µg de proteína para poder observarlas, y aún así los resultados no fueron muy satisfactorios.

Hay que indicar que tanto en el extracto inicial como en las fracciones, la movilidad de las proteínas se modificaba si se delipidaban precipitándolas con eter-etanol. El peso molecular calculado con esta nueva movilidad disminuía en un

10 % aproximadamente. Al mismo tiempo la nitidez y definición de cada banda aumentó al eliminar los lípidos, por lo que en general se empleó este método de delipidar las proteínas antes de su electroforesis.

2.2. UNIÓN DE LIGANDOS COLINÉRGICOS.

La unión de (^3H)-acetilcolina se estudió tanto en el extracto aplicado a la columna de DEAE-celulosa como en las tres fracciones obtenidas de la misma. Antes de esto las fracciones II y III se dializaron frente a CM 2:1 durante 18 horas para eliminar el p-toluensulfonato, aunque se comprobó que este compuesto no interfería en la unión de (^3H)-acetilcolina.

Como ya se indicó, una vez realizada la incubación con el ligando radiactivo, se separó el unido del libre por medio de pequeñas columnas de Sephadex LH-20. En experimentos control en ausencia de proteína, se observó que un 25 % de la radiactividad salía principalmente al final de la elución con CM 2:1 mientras que el resto quedaba retenido en la columna. En presencia de proteína en todos los casos se obtuvieron dos picos, el primero de ellos al eluir con cloroformo y el segundo al eluir con CM 4:1. Sin embargo, mientras que en el caso del extracto total y de la fracción I el primer pico no mostró inhibición de la unión de (^3H)-acetilcolina, y el segundo sí, en las fracciones II y III ocurría lo contrario, y era el segundo pico el que no se inhibía. Este desigual comportamiento sólo podría explicarse por el distinto contenido proteico de las fracciones.

En la tabla II puede observarse la cantidad de (^3H)-acetilcolina que se unía específicamente a cada fracción, así como la inhibición producida en dicha unión por la preincubación con acetilcolina fría. Esta inhibición fue similar para las tres fracciones estudiadas, pero difería bastante en el caso del extracto inicial. De los resultados obtenidos puede deducirse que la fracción I contiene mayoritariamente la proteína receptora de acetilcolina, y se produce una purificación

de casi cuatro veces con respecto al extracto inicial. Las fracciones II y III estaban ambas por debajo del valor obtenido para el extracto inicial.

TABLA 11: Unión específica de (^3H)-acetilcolina a los proteolípidos de la electropilaca de Torpedo separados por DEAE-celulosa.^a

Fracción	(^3H)acetilcolina (nmoles/mg proteína)	% Inhibición
Extracto total	1,96	48,0
I	7,10	83,7
II	1,62	72,5
III	1,23	84,3

^aEstos resultados son la media de dos experimentos y la variación en todos los casos fue menor del 5 %.

Una vez que se comprobó que la fracción I era la que contenía el receptor en su estado más purificado, se hicieron diversos estudios con ella. En primer lugar se estudió la inhibición producida por diversos agentes colinérgicos, tanto muscarínicos como nicotínicos, en la unión de (^3H)-acetilcolina. En la tabla 12 puede observarse el resultado de este experimento. La máxima inhibición fue producida por α -bungarotoxina, seguida a poca distancia por la acetilcolina. Los ligandos muscarínicos atropina y oxotremorina solo bloquearon el 30 y el 24 % de la unión respectivamente, lo que sugiere que el receptor purificado es de naturaleza nicotínica.

Hay que indicar dos hechos llamativos con respecto al esquema de elución de las columnas de Sephadex LH-20. Como ya se indicó, el primer pico obtenido con estas columnas no presentó unión específica de (^3H)-acetilcolina. Pero además ocurrió que la cantidad de radiactividad presente era mayor en presencia del ligando utilizado como bloqueante (cualquiera que fuera este) que en su ausencia. Mas adelante se discutirán las posibles causas de este hecho. Por otra parte, al poner

TABLA 12: Bloqueo de la unión de (^3H)-acetilcolina por parte de varios agentes colinérgicos al receptor purificado.^a

Ligando	Concentración (μM)	% Inhibición
α -bungarotoxina	2,3	85,2
acetilcolina	400,0	83,7
d-tubocurarina	71,5	64,6
hexametonio	500,0	51,0
atropina	10,0	30,8
oxotremorina	20,0	24,4

^aLa concentración de (^3H)-acetilcolina en todos los casos fue de 1 μM .

α -bungarotoxina como inhibidor, las características de la elución también se modificaron, resultando ser el primer pico y no el segundo el que mostraba unión específica de (^3H)-acetilcolina. Esto también se repitió al estudiar la unión de (^3H)- α -bungarotoxina. En este caso resultó que se unían 5,2 nmoles de toxina/mg de proteína (tabla 13) pero considerando el primer pico, en el que había un 81,8% de unión específica, ya que en el segundo se unían 1,5 nmoles pero de forma no específica, pues no era bloqueable por d-tubocurarina. Tanto en el extracto inicial como en las fracciones II y III la unión de (^3H)- α -bungarotoxina fue considerablemente menor que en la fracción I. Hay que indicar que de una columna corrida con sólo (^3H)- α -bungarotoxina no se eluyó prácticamente radiactividad, sólo al final de la elución, donde no salía la proteína, subió algo la radiactividad, pero puede decirse que la casi totalidad quedó retenida en la columna.

La unión de (^3H)-acetilcolina al receptor purificado de la fracción I se midió en un rango de concentraciones entre 1 nM y 5 μM . Se puede observar en la representación de Scatchard (figura 17) la presencia de dos distintas afinidades

TABLA 13: Unión de (^3H)- α -bungarotoxina a los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo separados por DEAE-celulosa.^a

Fracción	(^3H)- α -bungarotoxina (nmoles/mg prot)
Extracto total	$1,62 \pm 0,12$
Fracción I	$5,20 \pm 0,33$
Fracción II	$1,47 \pm 0,13$
Fracción III	$1,15 \pm 0,10$

^aEl % de especificidad en la unión de (^3H)- α -bungarotoxina fue en todos los casos de aproximadamente un 80 %. Los resultados son la media de dos experimentos.

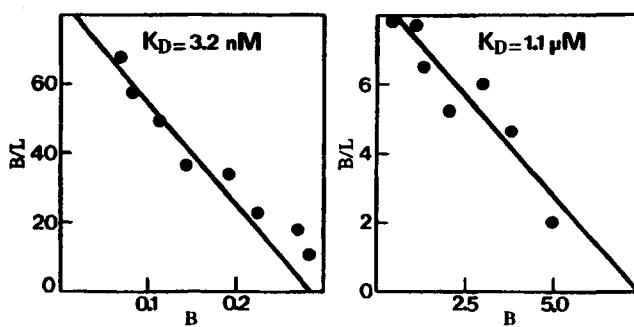


FIGURA 17: Representación de Scatchard de la unión de (^3H)-acetilcolina al proteolípidos de la fracción I. Se representan los sitios de alta ($K_D = 3,2 \text{ nM}$) y baja ($K_D = 1,1 \mu\text{M}$) afinidades. En abscisas (B) se indica la concentración de ligando unido en pmoles/mg de proteína. L es la concentración μmolar de (^3H)-acetilcolina presente en la incubación.

que posiblemente representen dos distintos sitios. El análisis de estos resultados dió un componente de alta afinidad con constante de disociación (K_d) de 3 nM y una concentración máxima (B_{max}) de $0,142 \text{ nmoles}$ de (^3H)-acetilcolina/mg de proteína, y un componente de baja afinidad con K_d $1,1 \mu\text{M}$ y B_{max} $7,5 \text{ nmoles/mg}$ protef-

na. Sumados ambos componentes, el número máximo de sitios de unión resultó ser de 7,642 nmoles/mg de proteína.

2.3. MARCAJE CON (^3H)-MPTA.

El marcaje de afinidad con (^3H)-MPTA se llevó a cabo en una suspensión acuosa de proteolípidos precipitados con eter-etanol del extracto orgánico total.

En primer lugar hay que indicar que si la reducción previa con ditioneitol se suprime, el marcaje se reduce en un 60 %. Y si antes de marcar con el ligando de afinidad se bloquea el sitio de unión incubando con α -bungarotoxina, el marcaje específico se reduce en un 72 %. El bloqueo, que debería ser total, sólo es parcial, debido quizás a un cambio de conformación sufrido por el proteolípido al ser precipitado, alterándose parcialmente el sitio de unión.

Una vez realizado el marcaje se redisolviéron los proteolípidos y se aplicaron en la columna de DEAE-celulosa. Hubo que redissolver el precipitado de proteolípidos con la ayuda del p-toluensulfonato sódico, pues con sólo CM 2:1 no se disolvía. También por esto, en lugar de usar en la segunda parte de la elución un gradiente de pTS, sólo se utilizó pTS 50 mM. Se puede observar que en la fracción I (figura 18), coincidiendo con el máximo de proteína hay un máximo de radiactividad. En las otras dos fracciones la radiactividad fue mucho menor (tabla 14).

En una columna con sólo (^3H)-MPTA, la radiactividad eluyó al principio, lo que hizo pensar si esa máxima actividad detectada en la fracción I no se debería a ligando libre, no unido. Ya que el precipitado se lavó repetidas veces antes de disolverse en CM 2:1 - pTS 10 mM para eliminar la radiactividad no unida, esta posibilidad solo sería cierta en el caso de que el (^3H)-MPTA que estaba unido se disociara de la proteína. Esto sería difícil que sucediera, dado que en este caso la unión ligando-receptor es covalente. Posteriormente esto se corroboró al transferir cada fracción a una solución acuosa con detergente para su posterior electro-

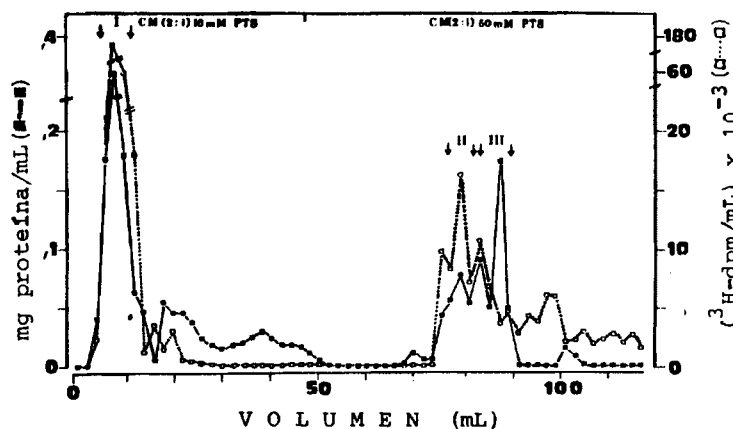


FIGURA 18: Cromatografía en DEAE-celulosa de los proteolípidos de la electroplaca de *Torpedo* marcados con (^3H) -MPTA. El extracto orgánico de 1 g. de tejido liofilizado se precipitó con éter-etanol y se marcó con un total de $1,2 \times 10^6$ dpm de (^3H) -MPTA. Después del marcaje el proteolípido se redisolvió en CM 2:1 - 10 mM pTS y la solución, conteniendo 956.000 dpm se aplicó a la columna. La elución se hizo con la mezcla anterior seguida de CM 2:1-50 mM pTS. Se obtuvieron tres fracciones que se indican entre flechas.

TABLA 14: Marcaje de afinidad con (^3H) -MPTA de los proteolípidos precipitados y delipidados después de su fraccionamiento con DEAE-celulosa.

Fracción	(^3H) -MPTA (nmoles/mg proteína)
I	$2,83 \pm 0,21$
II	$0,63 \pm 0,12$
III	$0,77 \pm 0,14$

^a Los resultados son la media de dos experimentos.

forensis. Antes de realizar esta cada muestra se dializó extensivamente y no obstante el 97 % de la radiactividad aún estaba presente.

Una vez hecha la electroforesis se pudo analizar qué banda era marcada

específicamente por el (^3H)-MPTA. En la figura 19 se puede ver la absorbancia a 550 nm de los geles correspondientes al extracto inicial (A), y a las fracciones I (B) y II (C). La separación entre las bandas de 39 y 42 KDalton es apreciable en A, estando también diferenciadas las proteínas de mayor peso molecular. En la

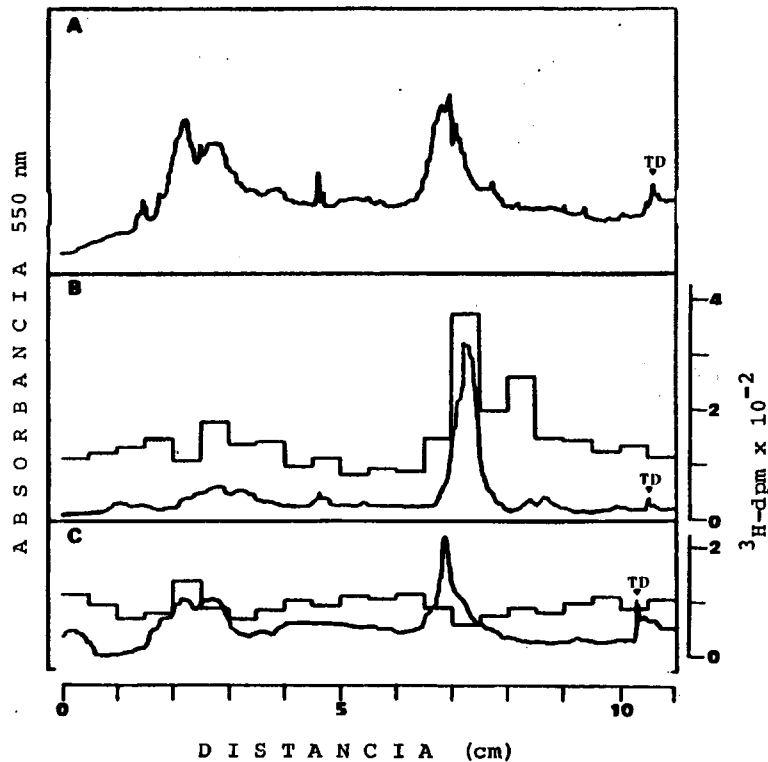


FIGURA 19: Absorbancia a 550 nm de los geles de proteolípidos de la electroplaca de Torpedo marcados con (^3H)-MPTA. A, extracto orgánico total. B, fracción I. C, fracción II. El gel se cortó en porciones de 5 mm y se midió la radiactividad como se indica en Métodos. Se pudo observar que en B la radiactividad máxima coincidía con la banda de 39 KDalton, mientras que en C no había un marcaje destacable de la banda de 42 KDalton ni de las de mayor peso molecular. T.D. migración del azul de bromofenol.

fracción I hay un máximo de absorbancia que corresponde a la banda de 39.000 Dalton. En esta misma banda se da el máximo contenido de radiactividad. En la fracción II el máximo pico de absorbancia corresponde a la banda de 42.000 Dalton aunque hay otros con mayor peso molecular. La radiactividad en este caso es similar a lo largo de todo el gel, sin incrementarse en la zona de las bandas. La fracción III no se presenta ya que resultó ser muy similar a la anterior.

La especificidad del marcaje con (^3H) -MPTA de la banda de 39.000 Dalton se puso de manifiesto al preincubar con α -bungarotoxina. Después se siguió un procedimiento idéntico al caso en que no se preincubó. Así el marcaje de la banda de 39.000 disminuyó en un 80 % aproximadamente y sólo se observó una ligera subida en la radiactividad al final del gel. En las fracciones II y III se mantuvo la tónica anterior y las principales bandas solo se marcaron de forma no significativa.

2.4. ESTUDIO DE LOS GRUPOS SULFHIDRIL Y DISULFURO EN LOS PROTEOLÍPIDOS DE LA ELECTROPLACA DE TORPEDO.

En los proteolípidos precipitados del extracto orgánico total pudo calcularse el contenido de grupos -SS- y -SH a partir del ácido iodo(^3H)acético unido covalentemente a los mismos. Al tratar con ditioneitol se redujeron las uniones -SS- y se valoró el contenido total de grupos -SH (tabla 15). Si al tratamiento con ditioneitol le precedía el tratamiento con N-etilmaleimida, se bloqueaban los -SH libres y solo eran marcados los grupos -SS- después de su reducción. De esta forma

TABLA 15: Contenido de grupos -SH y -SS- de los proteolípidos totales de la electroplaca del Torpedo. Valoración con ácido iodo(^3H)acético.^a

Tratamiento	Valoración de	nmoles -SH/mg proteína
Ditioneitol	-SH + -SS-	30,3 ± 1,1
N-etilmaleimida+Ditioneitol	-SS-	20,6 ± 0,3
Nada	-SH	10,9 ± 0,2

^aResultados son la media de dos experimentos.

se comprobó que el 68 % del total de grupos -SH estaba formando puentes -SS-. Por el contrario, sin tratar con N-etilmaleimida ni con ditiotreitól sólo se marcaban los -SH libres. Como puede observarse la suma de los dos últimos valores coincide prácticamente con el valor de grupos -SH en total (tabla 15).

Ya se dijo que, al resuspender los proteolípidos precipitados en el tampón empleado en el tratamiento con N-etilmaleimida, se observó cómo parte de los mismos se solubilizaban (independientemente de que contuviera o no N-etilmaleimida). Con el fin de identificar qué cadenas polipeptídicas se solubilizaban, se hicieron geles de SDS-poliacrilamida. Estas muestras se trataron también con N-etilmaleimida y ditiotreitól tratando de observar la posible influencia de los grupos -SH en su estructura. En la figura 20 puede observarse la absorbancia a 550 nm de cada gel, así como las condiciones de tratamiento de cada muestra aplicada a los mismos. El tratamiento con N-etilmaleimida y ditiotreitól (gel A), con el que se bloquearon los grupos -SH libres y se redujeron los -SS-, respectivamente, dió como resultado que se detectaran las bandas a (15.000 Dalton), c (58.000) y d (64.000), siendo mayoritaria la primera. El esquema electroforético fue bastante similar si se prescindía del tratamiento con N-etilmaleimida (gel B) y, aunque las bandas de mayor peso molecular se hicieron algo más visibles, cabe pensar que no había agregación inespecífica de moléculas al oxidarse grupos -SH para dar -SS-. Cuando no hubo tratamiento con ditiotreitól (geles C y D), manteniéndose intactos los grupos -SS-, ocurrieron dos hechos simultáneos: desaparecieron las bandas c y d y apareció la banda b (30.000 Dalton) mientras que la a se hizo menos visible que en los casos anteriores. Hay que indicar que también apareció una banda (gel D) de menor importancia y cuyo peso molecular era de 45.000 Dalton.

En suma, parece que es clara la influencia de los grupos -SS- y -SH en el mantenimiento de determinadas interacciones intermoleculares entre los proteolípidos precipitados y posteriormente solubilizados en medio acuoso. Mas adelante se discutirán las posibles relaciones entre las diversas moléculas detectadas.

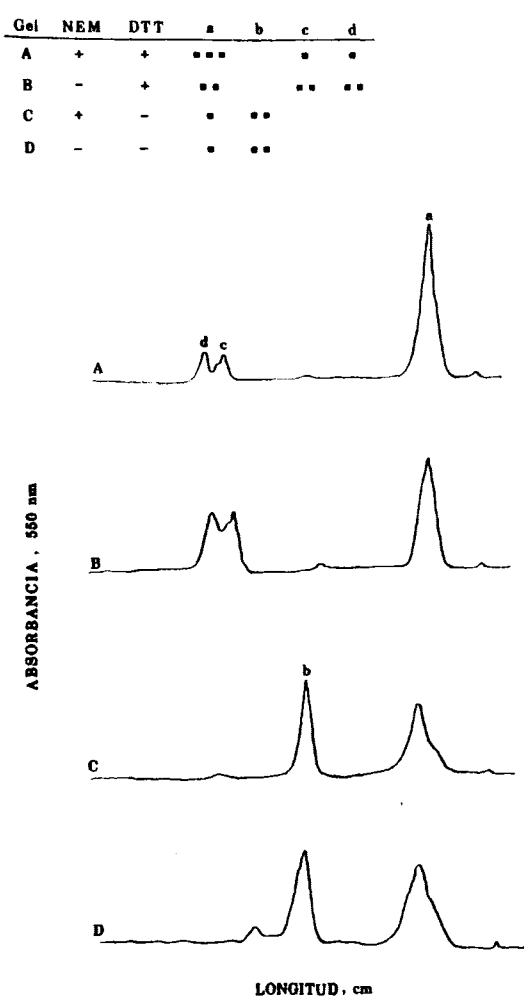


FIGURA 20: Influencia de reactivos reductores y alquilantes de grupos -SH sobre los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo. Los proteolípidos precipitados se disolvieron en parte con NaCl 150 mM. Esta disolución se trató con N-etilmaleimida y/o ditionitrosol según se indica en la parte superior. Las bandas detectadas y su importancia relativa se indican mediante cuadrados. La absorbancia a 550 nm indica la composición según el tratamiento. Todos los geles contenían la misma cantidad de proteína.

La distribución de los grupos -SH en las distintas fracciones proteolípídicas de la columna de DEAE-celulosa se estudió mediante el marcaje con ácido iodo(^3H)acético y también espectrofotométricamente.

En la figura 21 se presenta el esquema cromatográfico obtenido después de la unión de ácido iodo(^3H)acético al extracto proteolípídico total, según se describe en Métodos. La proteína se eluyó en tres fracciones de manera similar al caso del extracto no tratado (figura 14) o al del marcado con (^3H)-MPTA (figura 18). Coln-

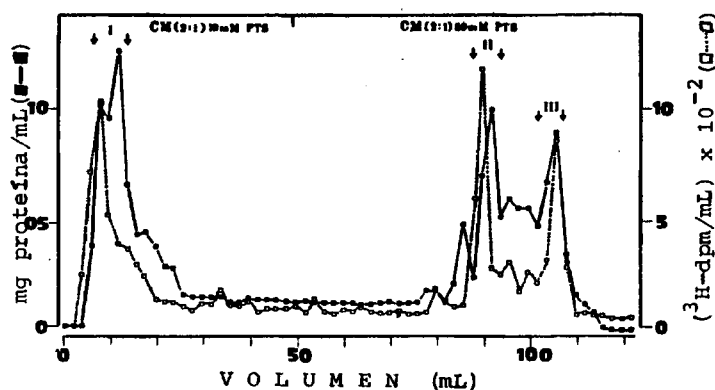


FIGURA 21: Cromatografía en DEAE-celulosa de los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo marcados con ácido iodo(^3H)acético. Después de precipitar los proteolípidos y hacer el marcaje según se indica en métodos, el precipitado se redisolvió en CM 2:1-PTS 10 mM, y se aplicó en la columna de DEAE-celulosa para su fraccionamiento. La elución se hizo con la mezcla anterior seguida de CM 2:1 -PTS 50 mM. Se obtuvieron tres fracciones que se indican entre flechas.

ciendo con los tres picos de proteína había también el correspondiente incremento de radiactividad, ligeramente más alto en la fracción II. En efecto, en la tabla 16 puede observarse que esta fracción tiene una actividad específica más alta que las otras dos.

TABLA 16: Marcaje con ácido iodo(^3H)acético y contenido de grupos -SH en los proteolípidos de la electropilaca de Torpedo fraccionados por DEAE-celulosa.

Fracción	Ac. Iodo(^3H)acético ^a (dpm/mg proteína)	nmoles -SH/mg proteína ^b
I	10.771	23,7
II	16.994	36,7
III	9.489	16,0

^aValores obtenidos de la fracción de cada máximo de los indicados en la figura 19, que daba la mayor radiactividad específica. ^bDeterminación espectrofotométrica hecha por triplicado con una variación menor del 12 %.

De forma similar al caso del marcaje con (^3H)-MPTA, pudo verse aquí cuál era la banda que se marcaba más, y que presumiblemente contendría el mayor número de grupos -SH. En la figura 22 se puede observar que el máximo marcaje estaba localizado en la banda de 42.000 Dalton de la fracción II. No obstante, como es lógico, el resto de las bandas también se marcó, pero no de forma tan ostensible.

Los resultados mencionados anteriormente, que demostraron un contenido de grupos -SH libres más alto en la fracción II, se confirmaron con los obtenidos espectrofotométricamente por el método de Habeeb. En la tabla 16 puede observarse que en las fracciones I y III el contenido de grupos -SH es menor, sobre todo la fracción III. Dado que esta sólo se diferencia electroforéticamente de la fracción II en una menor proporción de la banda de 42.000 Dalton, cabe pensar que esta banda la que provocó esta diferencia en el contenido de grupos -SH.

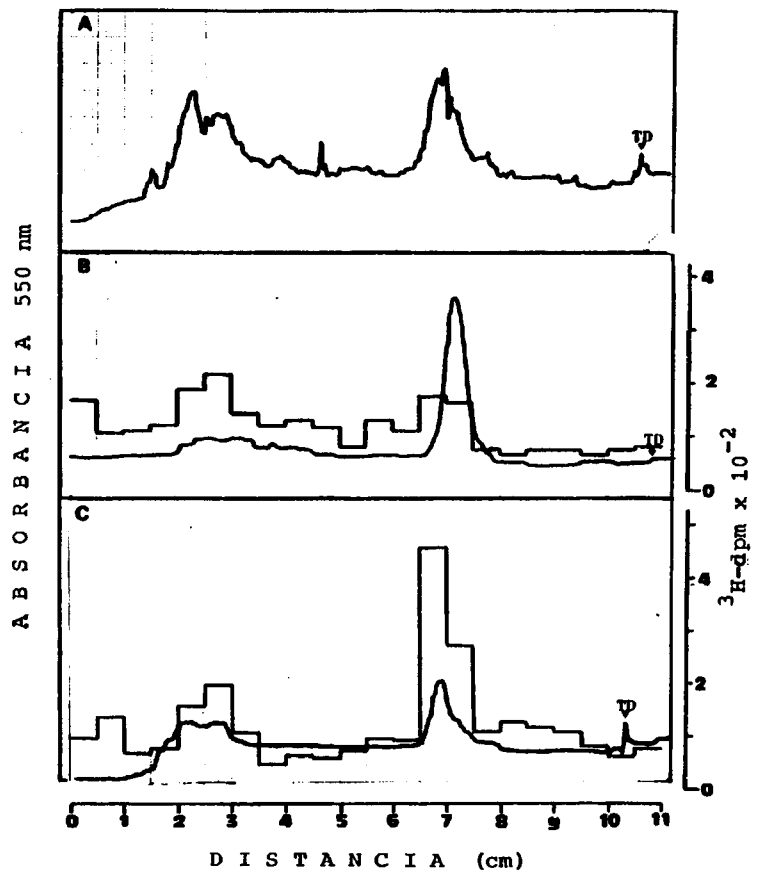


FIGURA 22: Absorbancia a 550 nm de los geles de proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, marcados con ácido iodo(^3H)acético. A, extracto orgánico total. B, fracción I. C, fracción II. El gel se cortó en porciones de 5 mm y se midió radiactividad como se indica en métodos. En C la radiactividad máxima coincidía con la banda de 42 KDalton, y el resto de las bandas, tanto en C como en B, se marcan, pero no tan apreciablemente. T.D. migración del azul de bromofenol.

13

DISCUSSION

Una adecuada comprensión de los fenómenos que ocurren en las membranas biológicas exige el completo conocimiento y caracterización de las moléculas implicadas en dichos procesos. En lo que se refiere a las proteínas intrínsecas(123), la solubilización y purificación resultan particularmente difíciles debido a su acusada hidrofobicidad. Esto provoca la formación de complejos lipoproteicos y hace muy problemática la aplicación de la química de proteínas, normalmente desarrollada en medios acuosos.

Tratando de encontrar diversos procedimientos de purificación, principalmente de tipo cromatográfico, para el proteolípido de la mielina del Sistema Nervioso Central, se ha llegado a la purificación del mismo mediante la utilización de disolventes orgánicos con un cambiador iónico: la DEAE-celulosa. Esto no solo se ha llevado a cabo por la propia importancia de esta proteína en la membrana miélinica, sino también porque al tratarse de una típica proteína intrínseca de membrana (10,124), todos los procedimientos desarrollados en este caso podrían aplicarse a otras proteínas similares, cuya dificultad de estudio es por todos bien conocida.

1. PURIFICACION DEL PROTEOLIPIDO DE MIELINA POR CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA.

En la extracción del proteolípido a partir de la mielina se siguieron métodos convencionales. Dichos métodos no permitían la total eliminación de la proteína básica de la mielina y adicionalmente reducían considerablemente el rendimiento de proteolípido a lo largo del proceso de purificación. Ante esto se optó por suprimir los pasos intermedios y aplicar directamente en la columna de DEAE-celulosa el extracto de mielina en CM 2:1.

La cromatografía de este extracto rindió, como ya se ha indicado, tres fracciones bien diferenciadas. Pero lo llamativo de esto fue la obtención de resultados totalmente distintos de los del fraccionamiento del proteolípido de sustancia

blanca de cerebro de vaca (125). En aquella ocasión se obtuvieron tres fracciones cuyo esquema electroforético era bastante similar: dos bandas de pesos moleculares 54 y 58 KDalton que no estaban en el extracto inicial, y que presumiblemente serían agregados de cadenas polipeptídicas de menor peso molecular. En el proteolípido de mielina, sin embargo, la primera fracción no contenía proteína y las otras dos presentaron movilidads altas en geles de SDS-poliacrilamida (figura 5). Dichas fracciones tenían además una composición de aminoácidos cualitativamente similar a la del proteolípido purificado por otros (45), si bien había, en lo que se refiere sobre todo a la fracción III, algunas discrepancias cuantitativas. Otra de las diferencias llamativas con respecto al fraccionamiento del proteolípido de sustancia blanca se refiere al rendimiento, 80 % aproximadamente de la proteína de partida, siendo, sin embargo, en el proteolípido de mielina muy bajo, apenas un 5 %. Una posible explicación de estos resultados discordantes podría ser la proporción de lípidos de las muestras aplicadas. Aunque más adelante se discutirá el posible mecanismo de interacción entre las distintas moléculas y el cambiador iónico en medios orgánicos, cabría pensar que, al menos en parte, el fraccionamiento se realiza en orden a los lípidos que asociados al proteolípido forman con este diversos complejos. Así, en el caso del proteolípido de sustancia blanca, al producirse una continua delipidación se van formando agregados de forma progresiva, pudiéndose eluir estos con los solventes empleados. Esto está de acuerdo con los datos que se conocen a cerca de que la eliminación de fosfolípidos ácidos (fosfatidilserina y fosfoinosítidos) y cerebrósidos provoca la agregación del proteolípido (126). Sin embargo, la delipidación del proteolípido de mielina fue, por razones que se desconocen, más rápida, como se comprobó al obtenerse al principio una fracción exclusivamente compuesta de lípidos. La agregación simultánea de la proteína no se produjo y entonces quedó retenida en la columna, con lo que el rendimiento se redujo considerablemente. De cualquier forma la conclu-

sión mas importante es que se aplicó en la columna un extracto con bastante proporción de proteína básica, y las fracciones obtenidas mostraron una clara composición proteolípídica (tabla 1). En suma, la proteína básica, difícil de separar del proteolípido por los métodos convencionales, quedaba por completo retenida en la columna. El único problema a solucionar fue, por tanto, aumentar el rendimiento de proteolípido obtenido. Con este fin se abordaron los experimentos de adsorción-desadsorción en DEAE-celulosa.

2. PURIFICACION DEL PROTEOLIPIDO DE MIELINA POR ADSORCION-DESADSORCION EN DEAE-CELULOSA.

Estos experimentos permitieron, en efecto, aumentar apreciablemente el rendimiento. Al estar el eluyente mucho mas tiempo en contacto con el cambiador, la elución fue mucho mas eficaz. Ahora bien, debido precisamente a esto, a partir de un cierto tiempo (mas de 4 horas), se elufa el proteolípido con alguna contaminación, probablemente proteína básica. Ya se indicó en los resultados que esta contaminación no se debía seguramente a proteólisis del proteolípido, dadas las condiciones en que se realizó la elución y habiéndose comprobado por análisis de aminoácidos que se debía a la presencia de la proteína básica. Hubo, por tanto, que encontrar el tiempo óptimo de elución, en el transcurso del cual se obtenía el máximo rendimiento de proteolípido sin contaminación alguna. Este resultó ser de 4 horas. Para tiempos mayores se empezaron a detectar ligeras contaminaciones. Así pues, se eluyó con CM 2:1 y concentraciones crecientes de ácido acético durante periodos de 4 horas. La cantidad de proteína obtenida en las eluciones fue creciendo al aumentar la concentración de ácido, llegando a obtenerse la máxima cantidad con ácido acético 5 N. Sin embargo no ocurría lo mismo con la proporción de fósforo de las fracciones, ya que la máxima se dió en la fracción obtenida eluyendo con ácido acético 1N, para descender a continuación hasta la mínima propor-

ción, que se dió en la fracción eluida con ácido acético 5 N. Según los cálculos (tabla 4), la proteína retenida en la columna quedó aún con menos proporción de fosfato. Esto confirma la hipótesis de que al principio del fraccionamiento del proteolípido de mielina, ya sea en columna o por adsorción-desadsorción, hay una rápida delipidación, lo que provoca una asociación mas fuerte entre la proteína y el cambiador. Por esto es necesaria una mayor concentración de ácido para poder eluir la proteína, obteniéndose mas delipidada que en las primeras fracciones y prácticamente sin formar agregados.

Hasta ahora ha sido difícil evaluar la homogeneidad de las preparaciones de proteolípido debido principalmente a las interacciones lípido-proteína y a la tendencia a formar agregados. Así se observan varias bandas en las preparaciones de proteolípido de sustancia blanca (127) lo que ha sido interpretado por algunos como heterogeneidad (128,129). Estas bandas múltiples se observan ya sea el proteolípido procedente de sustancia blanca o de la mielina. Una banda mayoritaria con un peso molecular oscilando entre 23 y 30 KDalton ha sido observada frecuentemente acompañada de otras de mayor y menor peso molecular, sobre todo de la denominada DM-20, que tiene un peso molecular de 20.000 y una composición de aminoácidos similar a la del proteolípido de mielina. En este caso, aunque el contenido de fosfato y también el de azúcar sean distintos en las fracciones obtenidas, la proteína parece ser la misma, pues por electroforesis sólo se aprecia la misma banda en todas ellas. La composición de aminoácidos (tabla 5) salvo ligeras diferencias también lo confirma. El peso molecular calculado para esta banda resultó ser de 20.000 Dalton aproximadamente y de 23.000 a pH neutro y básico respectivamente, lo que indujo a pensar en si realmente la proteína purificada era el proteolípido o la ya mencionada DM-20 (129). Sin embargo hay que indicar que en algunas proteínas de membrana similares al proteolípido, el peso molecular hallado por electroforesis o por filtración en geles dextranos discrepa del hallado por otros

sistemas tales como centrifugación analítica o composición de aminoácidos en los que no influye la conformación que la proteína adopte (130). Habida cuenta, además, de la tendencia de las proteínas de membrana a formar complejos anormales con el SDS, lo que puede influir en la determinación del peso molecular (131), se puede concluir que este resultado de 20.000 Dalton no es suficiente para juzgar si se trata o no de la DM-20. Esto se podrá abordar, quizás, en posteriores estudios estructurales. Por otra parte se confirmaron estudios de otros autores de que distintos sistemas electroforéticos pueden conducir a distintos resultados en lo que al cálculo de pesos moleculares se refiere (132). En efecto, el peso molecular calculado a pH básico era aproximadamente un 15 % más alto que el hallado a pH neutro, estando más cerca del calculado para el proteolípido de mielina por otros autores (45). Por tanto no es fácil decidir con certeza, como se acaba de indicar, si el proteolípido purificado coincide o no con la proteína DM-20. Adicionalmente hay que indicar que no se ha observado reacción cruzada inmunológica entre el proteolípido y la DM-20 (133). Esto puede interpretarse como la evidencia de que se trata de dos proteínas diferentes o de la misma que ha perdido un segmento antigénico. No obstante no puede concluirse nada con certeza ya que la inclusión de detergente en estos sistemas podría dar lugar a diferencias estructurales entre ambas proteínas. Quizás la diferencia podría consistir también en la cantidad de ácidos grasos unidos covalentemente lo que alteraría la hidrofobicidad y por tanto la cantidad de SDS unido, originando las distintas moviidades en los geles de SDS-poliacrilamida.

La tinción de los geles con fuchsina mostró la no existencia de glucoproteínas en la zona en que se tiñe el proteolípido (figura 8). Esto confirma los resultados de Poduslo et al (134) de que el proteolípido es distinguible de las glucoproteínas presentes en la mielina.

La cromatografía en DEAE-celulosa de ciertas proteínas intrínsecas de

membrana mediante la elución con CM 2:1 y un gradiente de acetato amónico se ha mostrado francamente eficaz (135,136). En el caso del proteolípido de mielina se intentó el experimento de adsorción-desadsorción eluyendo con CM 2:1 y concentraciones crecientes de hidróxido amónico. El rendimiento fue mucho mas bajo (tabla 6) que el obtenido eluyendo con ácido acético, debido probablemente a que la proteína está tan fuertemente unida al cambiador que para separarla de este hacen falta medios muy enérgicos. Por la misma razón, mezclas de butanol-agua en la elución, que en otros casos resultaron útiles (38,44), no dieron buenos resultados aplicadas en el fraccionamiento del proteolípido de mielina.

3. DETERMINACIONES ESTRUCTURALES DEL PROTEOLIPIDO PURIFICADO.

El proteolípido de mielina purificado por DEAE-celulosa dió, como ya se ha indicado, una sola banda en electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. La posible homogeneidad de esta banda se comprobó por medio de la determinación del grupo amino terminal. En efecto, solo se observó una mancha mayoritaria correspondiente al aminoácido dansilado alanina. Se detectaron manchas muy débiles que procederían de ligerísimas contaminaciones, y que si en la electroforesis no se pusieron de manifiesto, aquí sí se aprecian gracias a la gran sensibilidad del método empleado.

Como aminoácido amino terminal del proteolípido se ha citado a la glicocola (108, 137, 138), lo cual no coincide con el resultado presentado aquí. Sin embargo hay que indicar que la glicocola suele darse frecuentemente en estas determinaciones como un artefacto procedente de otras fuentes que no son la proteína a investigar. No obstante, el que se haya obtenido por diversos métodos aporta bastante certeza al resultado. Según esto podría ocurrir que la hipótesis de que la proteína purificada es la DM-20 y no el proteolípido fuera cierta, aunque hasta el momento el aminoácido amino terminal de la DM-20 no está determinado. Sin

embargo esta discusión quedaría a la espera de la confirmación o no de resultados que proponen una identidad, al menos parcial, del proteolípido de mielina con la proteína DM-20, como ya se ha comentado.

En cuanto a los mapas peptídicos, lo más llamativo fue la existencia de péptidos de apreciable tamaño que poseían poca movilidad, tanto en la electroforesis como en la cromatografía. El destacado tamaño de las manchas podría deberse, o bien a una heterogeneidad de cadenas polipeptídicas en el digerido, o a que la proteína de partida es digerida sólo parcialmente por los enzimas, debido probablemente a impedimentos estéricos. La primera posibilidad se puede eliminar fácilmente, ya que no solo aparecía una sola banda en los geles de SDS-poliacrilamida como ya se indicó anteriormente, sino que también resultó un solo grupo amino terminal, y por tanto la casi completa seguridad de que se trata de una sola cadena polipeptídica. Sin embargo la segunda opción es mucho más probable. En primer lugar porque el material utilizado contenía lípidos que podrían formar complejos con el proteolípido. De esta forma ciertos grupos susceptibles de ser afectados por la acción enzimática podrían quedar protegidos de la misma. En segundo lugar porque al no poder utilizar agentes desnaturizantes, tales como urea, 2-mercaptoetanol, SDS (109) etc., debido a que los enzimas encargados de realizar la digestión quedarían inhibidos, el complejo lípido-proteína es poco accesible, al menos en parte, a esos enzimas. Cabría preguntarse qué parte de la molécula es la que preferentemente resiste el ataque enzimático. Posiblemente pueda tratarse de la zona que, en contacto con la parte hidrófoba de la bicapa lipídica, mantiene interacciones con los lípidos o con otras cadenas polipeptídicas del medio circundante, debido también a su hidrofobicidad (139). Esta hipótesis está soportada en parte porque los péptidos más visibles, y que son también los menos móviles tanto en la electroforesis como en la cromatografía, deben ser los menos polares. Por otra parte los péptidos de menor tamaño deben pertenecer a las zonas hidrófilas de

la proteína, que al no estar protegidas por los lípidos, son digeridas sin mayores dificultades. Recientemente se han obtenido resultados similares que indican la posibilidad incluso de que parte de estos péptidos hidrófobos solo parcialmente digeridos no sean ni siquiera solubilizados, y por tanto queden sin detectar (140), con lo que se hace cada vez más evidente la necesidad de desarrollar nuevas técnicas (141).

4. INTERACCIONES ENTRE EL PROTEOLÍPIDO DE MIELINA PURIFICADO Y LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA.

Para el estudio de las interacciones entre los proteolípidos y los lípidos de la membrana, y de la posible función de estas lipoproteínas, es conveniente utilizar un sistema modelo no muy complicado y convenientemente bien caracterizado. Este modelo puede ser el liposoma (142) ya que en el mismo es posible incorporar la molécula cuya función pretende dilucidarse, si esta cumple una serie de propiedades físico-químicas. Este fue el caso del proteolípido de la mielina. Dada su naturaleza altamente hidrófoba pudo incorporarse en un buen porcentaje en las bicapas de fosfolípido (tabla 7). La asociación entre el proteolípido y los lípidos no se destruyó con los lavados con tampón, lo que contrasta con los resultados obtenidos para la mezcla de lípidos mas albúmina bovina. Esto parece indicar que la asociación en ambos casos es muy distinta, como cabría esperar de las características de cada proteína.

Si bien la temperatura de transición de fase de gel a líquido cristalino de la dipalmitoilfosfatidilcolina no sufrió una variación detectable por este método, es importante señalar que la pretransición térmica se amortiguó apreciablemente. Esta pretransición, que además de otras causas ya comentadas (120,121), se cree que se debe al paso desde estructura lamelar rígida a estructura lamelar flexible, se ha visto que se elimina al añadir apoproteína del proteolípido de mielina a bica-

pas de dimiristoilfosfatidilcolina (47). Esto sugiere que el efecto del proteolípido en las bicapas de dipalmitoilfosfatidilcolina es similar, induciendo cierta desorganización en el empaquetamiento de las cabezas polares de los lípidos. Un efecto similar se ha visto que tiene el colesterol (144).

En ciertos casos se ha visto que la incorporación de proteolípidos en liposomas induce un aumento de la fluidez de la bicapa (122). Se ha demostrado también que proteínas que penetran en la bicapa o que deforman el empaquetamiento de las cadenas de ácidos grasos en la misma pueden inducir un incremento en la permeabilidad de estas estructuras lipídicas (145). Sin embargo no fue este el caso del proteolípido purificado de mielina. La incorporación del mismo no indujo ningún incremento en la velocidad de salida de isótopos atrapados en el interior de los liposomas (figura 12). No obstante estos liposomas sí eran sensibles a la acción fluidificante del cloroformo (figura 12, flecha) e incluso se hicieron más permeables cuando les fueron incorporados los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo. Todo esto indicó que el proteolípido de mielina, a diferencia de otras sustancias, no perturbaba la bicapa lipídica hasta el grado de aumentar su permeabilidad sensiblemente.

Aunque serían necesarios otros estudios, fuera de las posibilidades de este trabajo, los resultados obtenidos sugieren un papel estabilizador, o al menos no desestabilizante para el proteolípido de la mielina. Esto no descarta la posibilidad de otras funciones más localizadas que no pudieron detectarse por los métodos aquí empleados. En cualquier caso resulta atrayente la hipótesis de que en el mantenimiento de la estructura de la mielina un papel primordial es jugado por esta proteína, que tan distinto comportamiento tiene con respecto a otros proteolípidos.

5. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DISOLVENTES ORGANICOS.

Es conveniente, antes de seguir discutiendo los resultados de la purifi-

cación por cromatografía de los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, hablar del posible mecanismo por el que actúa el cambiador iónico en presencia de disolventes orgánicos.

El agua, debido a su alta constante dieléctrica, es un excelente disolvente para la mayoría de los ácidos, bases y sales orgánicas e inorgánicas, y por definición, electrolitos fuertes son aquellos que se disocian total o casi totalmente al disolverlos en agua. Por esto el desarrollo de las resinas de intercambio iónico se ha llevado a cabo comunmente en sistemas acuosos, donde su estabilidad y velocidad de intercambio son elevadas. En disolventes orgánicos los electrolitos se disocian en menor proporción que en agua, debido a que la constante dieléctrica es mas baja. Como consecuencia de esto el intercambio iónico es acompañado de una pronunciada adsorción electrofónica.

Uno de los factores a tener en cuenta es el equilibrado del cambiador. En disolventes polares no acuosos es completamente similar al de medios acuosos. En este caso hay que tener en cuenta la tendencia de los iones a la solvatación, las diferencias de presión osmótica originadas y la repulsión electrostática entre cargas fijas. Y así, cuanto menos polar es el disolvente, menor es la solvatación de los iones. También ocurre que al ser la constante dieléctrica menor, las interacciones electrostáticas entre iones de carga opuesta son mas fuertes, con lo que estan favorecidas la formación y asociación de pares de iones de carga opuesta (146). Es lógico, por tanto, que en el caso descrito aquí la resina se hinchara menos, pues además de que el metanol tiene una constante dieléctrica ($\epsilon = 32$) menor que la del agua ($\epsilon = 81$) (147), la presencia de cloroformo aún produciría menor hinchado. Es sabido que en disolventes no polares, tales como benceno y queroseno, la mayoría de las resinas practicamente no se hinchan(148).

Hay que tener en cuenta aquí que se empleó una mezcla de disolventes (cloroformo-metanol). En este caso la resina absorbe el componente por el que tie-

ne mayor afinidad. Esta afinidad se debe a interacciones electrostáticas entre los iones o grupo polar de la resina y las moléculas de disolvente polar. También intervienen interacciones de London que generalmente son mucho más débiles (149). Por esto la resina prefiere el componente más polar, que en este caso sería el metanol (150). En realidad la resina actuaría como un transportador de la fase metanólica mientras que el soluto, lípidos y proteolípidos en este caso, se distribuye entre esta fase y la fase líquida externa que preferentemente sería clorofórmica. De aquí que la proteína retenida en el cambiador fuera la que más grupos cargados presentara, pues tendería, una vez alcanzado el equilibrio de adsorción, a ocupar la fase más polar, es decir la metanólica, mientras que las moléculas más hidrófobas, principalmente lípidos y determinados complejos lipoproteicos quedan en la fase menos polar, y por consiguiente son los primeros en ser eluidos. Y efectivamente, los resultados obtenidos parecen confirmar todo lo dicho: en general la primera fracción es exclusivamente lipídica (caso del proteolípido de mielina) o contiene proteína con gran proporción de lípidos (caso de los proteolípidos del Torpedo). Por el contrario, las proteínas eluidas posteriormente tienen más aminoácidos polares y con carga, e interaccionan con lípidos acídicos y polares (PS, PI, PE).

Habría que considerar precisamente ahora cómo se realiza la elución. En esta intervendrían dos mecanismos relacionados con el uso del ión hidrofóbico p-toluensulfonato. Cabe pensar que en un primer paso inicial el ión desplaza a los grupos cargados de la proteína en su interacción con la resina. Aquí la forma iónica de esta tiene poco efecto, ya que la afinidad de grupos tales como el de la DEAE-celulosa por los disolventes orgánicos es relativamente fuerte. Además, el total de los sustituyentes garantiza una distancia mínima considerable entre el centro de la carga fija y el ión que se intercambia, con lo que se favorece la disociación, incluso en disolventes de relativamente baja constante dieléctrica. Esta disociación

también es favorecida por las interacciones de London de los constituyentes orgánicos de la matriz del cambiador con el p-toluensulfonato. El segundo paso, que en realidad es simultáneo al primero, es la interacción de iones p-toluensulfonato con los grupos cargados de la proteína. En efecto, este ión se ha demostrado que puede interactuar con proteínas solubles en medios acuosos, y más concretamente con los grupos cargados positivamente. Su carácter de ácido moderadamente fuerte hace que al mismo tiempo queden neutralizados los grupos carboxilo de las proteínas, al disminuir el pH por debajo de sus puntos isoeléctricos. El resultado es una molécula sin carga y con una superficie más hidrófoba, que es capaz de distribuirse preferentemente en la fase orgánica de un sistema bifásico agua-disolvente orgánico (66) a pesar de su carácter hidrófilo inicial. En el caso concreto que aquí se discute, estas moléculas hidrofóbicas no tendrían inconveniente en abandonar la fase metanólica en que se encuentran y pasar a la clorofórmica, menos polar, para ser eluidas.

En resumen, aunque en presencia de disolventes orgánicos la capacidad operativa del cambiador puede ser más baja que la teórica, al haber zonas no accesibles a los iones en solución dado que no hay un hinchado total, la capacidad de adsorción es mucho más alta que en sistemas acuosos (151) y la resina puede separar adecuadamente distintos componentes.

6. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEOLÍPIDOS DE LA ELECTROPLACA DE TORPEDO.

En principio se realizó la extracción de proteolípidos a partir de membranas ricas en receptor de acetilcolina, pero el rendimiento fue muy bajo. Como quiera que la extracción con CM 2:1 de la electroplaca total rendía mayoritariamente la banda de 39.000 Dalton de peso molecular, al igual que ocurría con la extracción de la membrana purificada (figura 13), se decidió a partir de entonces trabajar directamente con la electroplaca total, sin posteriores fraccionamientos.

De esta forma el rendimiento se aumentó considerablemente.

Como ya se ha dicho, el extracto orgánico del órgano eléctrico de Torpedo se aplicó en una columna de DEAE-celulosa para su fraccionamiento. La fracción I, que no es retenida por el cambiador, es la que tenía mayor proporción de aminoácidos hidrófobos (tabla 10) y de fosfolípidos. Por el contrario, las fracciones II y III que fueron retenidas por la columna, resultaron más abundantes en aminoácidos cargados, y su contenido lipídico fue bastante más bajo. En estas fracciones hubo también un predominio de PE y fosfolípidos acídicos (figura 150). Estas diferencias en hidrofobicidad, aminoácidos cargados y composición lipídica explicarían el diferente comportamiento cromatográfico de las proteínas que componen el extracto, como ya se discutió en el apartado anterior. También en este se explicó el posible mecanismo de elución basado en un gradiente de p-toluensulfonato. Hasta ahora los métodos utilizados para la cromatografía de intercambio iónico en solventes orgánicos se basaban en la elución con un gradiente de acetato amónico (35, 38, 135, 136) o con n-butanol-ácido fórmico (152). El método aquí utilizado se diferencia de los mencionados porque combina la presencia de un ión que sustituye en la resina a los grupos cargados de la proteína al mismo tiempo que interactúa con esta, facilitando la elución.

El uso de la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida permitió identificar el contenido de las fracciones obtenidas, en lo que se refiere a su composición polipeptídica. La banda mejor caracterizada fue la de 39 KDalton, prácticamente la única que compone la fracción I (figura 16). Otro polipéptido que es también mayoritario en el extracto inicial, y cuyo peso molecular es de 42 KDalton, se encuentra localizado preferentemente en las fracciones II y III. Las bandas de peso molecular más alto también se encuentran en estas fracciones, sobre todo en la fracción III. Estas proteínas serían las menos hidrófobas, ya que son las que más se retienen en la columna. Este hecho se confirmó más tarde al comprobar su

solubilidad en solventes acuosos después de haber sido precipitadas con eter-etanol del extracto orgánico total.

Es digno de mención el que constatemente se encontrara un incremento en la movilidad de las proteínas después de delipidar por precipitación con eter-etanol. Por otra parte, si no se eliminaban los lípidos la resolución era notablemente peor, aunque se detectaban las mismas bandas que en los proteolípidos delipidados. Al producirse la precipitación debe haber un cambio de conformación que provoque esta diferencia. También podría ser debido al diferente contenido lipídico y/o a una diferente unión de SDS (131, 153-155). Una combinación de las causas citadas quizás provocaría este comportamiento anómalo.

7. UNION DE LIGANDO COLINERGICOS.

Tratando de identificar como posibles receptores de la acetilcolina los proteolípidos aislados y purificados de la electroplaca de Torpedo, se hicieron diversos estudios sobre la unión de varios agentes colinérgicos.

Sin embargo, antes de entrar a discutir los resultados obtenidos, habría que hacer determinadas consideraciones. En primer lugar es necesario establecer la validez de los estudios de unión de ligandos en un medio orgánico.

Los receptores de membrana, como proteínas intrínsecas que son, mantienen dos dominios de interacción mas o menos bien diferenciados. Se da una interacción por fuerzas hidrófobas, producida meramente por la exclusión de toda molécula polar, y una interacción con el medio acuoso exterior e interior de la célula, y en que lógicamente deben predominar las interacciones de tipo iónico. ¿En cuál de dichos dominios se produce la formación del complejo ligando-receptor? Es lógico e inmediato que la interacción inicial ocurra en la zona que podríamos llamar hidrófila, puesto que el neurotransmisor proviene del exterior celular. Pero si esto ocurre en un primer paso, no significa que posteriormente no entren en juego otro

tipo de fuerzas, ya que el sitio activo (operacionalmente definido como la verdadera zona de interacción que provoca un determinado efecto, traducido en una translocación de iones a través de la membrana) podría situarse a un nivel más "profundo" de la molécula, donde las interacciones hidrófobas podrían tener un importante papel. De aquí que, aunque sean las interacciones de tipo polar las principales a tener en cuenta, podría ocurrir que no fueran las únicas para el mantenimiento (a un nivel operacional) del complejo ligando-receptor. Desgraciadamente, al producirse estos procesos a enormes velocidades, no se han podido discriminar con suficiente exactitud; no obstante son grandes los esfuerzos que se realizan en tal sentido (156). Al menos, si no hay pruebas directas de lo que se acaba de decir, si hay pruebas indirectas de que las interacciones del receptor con ciertos lípidos (157, 190, 191) y más concretamente con una cierta zona o halo muy cercano al receptor pueden ser importantes (158,159) en su funcionalidad. Si como en este caso concreto, la proteína está en un medio orgánico, mucho menos polar que el acuoso, es lógico que algunas de estas interacciones tengan aún más importancia para el mantenimiento del complejo ligando-receptor. Además, las interacciones proteína-lípido están bastante más preservadas que cuando la proteína está disuelta en un medio acuoso con detergente. Y de hecho son claras las diferencias de comportamiento del receptor en su ambiente propio de la membrana y fuera del mismo, cuando el detergente sustituye a los lípidos en la estabilización de la molécula proteica en un medio que no es el suyo propio (160).

Tal y como ya se discutió al hablar de la cromatografía de intercambio iónico en medios orgánicos, la interacción ión-ión y otras interacciones entre especies polares poseen más energía cuanto menor es la polaridad del medio. En efecto, en un medio acuoso una proteína globular tiene un gran número de cargas negativas y positivas situadas en la interfase que contacta con la adyacente capa de agua. Esta capa de hidratación representa agua estructurada e inmovilizada por puentes de

hidrógeno a los grupos polares de la proteína. La presencia de un disolvente no polar, por ejemplo un hidrocarburo, produce un efecto de ordenamiento, incrementándose las fuerzas por puentes de hidrógeno. En este caso las dos superficies hidrofóbicas evitan la capa de agua, creándose áreas hidrofóbicas que fortalecen las ya de por sí poderosas interacciones polares. Esta combinación de áreas polares y apolares proporcionaría una fuerza de conducción considerable para la unión del ligando (161).

Hay que indicar que, si bien las fuerzas hidrofobas son fundamentalmente importantes en la asociación de moléculas alifáticas o aromáticas con proteínas, resultando esenciales en las interacciones ligando-receptor, también pueden dar lugar a un aumento de las interacciones inespecíficas. Por ello son de enorme importancia las pruebas de control que garantizan la especificidad de la unión que se está estudiando.

En resumen, los estudios realizados en medios orgánicos por sí solos no darían una completa idea sobre el proceso de unión específica del ligando al receptor, lo mismo que ocurre con los estudios realizados en medios acuosos. Son aspectos parciales de un mismo proceso y cuya complementación parece evidente.

Otra de las consideraciones que habría que hacer es si realmente estas proteínas aisladas por medio de disolventes orgánicos son receptores colinérgicos farmacológicos. A pesar de que se han conseguido extraer en forma activa de muchos y variados tejidos tales como tejido cerebral (162), tejido eléctrico de *Electrophorus* y *Torpedo* (63, 163), músculo de diafragma (164,165), músculo intestinal bovino (166), insectos (167, 168) y músculo sóleo y gastrocnemio de rata (169), se ha puesto en duda que el receptor aislado en soluciones acuosas con detergente coincide con el proteolípido receptor (170). Las diferencias observadas se basaban sobre todo, en la falta de reacción inmunológica entre los receptores aislados por ambos métodos. Sin embargo, como ha sido señalado por Taylor (14), el

método usado por estos autores, y que incluye la precipitación del proteolípido con eter, no es el mas conveniente, porque este podría no ser eluido de las columnas de Sephadex LH-20 usadas para su fraccionamiento. De esta forma el material eluido no reaccionaría con suero anti-receptor ya que no contendría realmente el proteolípido receptor. Alguna consideración adicional se hará después de comentar los resultados de unión de ligandos colinérgicos.

La unión de (^3H)-acetilcolina se examinó en un extracto total de órgano eléctrico y en las fracciones obtenidas en la cromatografía de DEAE-celulosa. La máxima unión se produjo en la fracción I, mientras que las fracciones II y III presentaron menor actividad específica que incluso el extracto inicial. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este extracto inicial la inhibición producida por acetilcolina fría fue bastante inferior a la obtenida en las fracciones. Considerando los valores obtenidos habría una purificación del receptor de unas cuatro veces en la fracción I respecto al extracto inicial. Se han reportado valores muy similares para el receptor purificado por cromatografía de afinidad (171); mientras que hay diferencias en relación con el proteolípido aislado de músculo (14).

Otra de las diferencias observadas entre las diferentes fracciones fue su elución en las columnas de Sephadex LH-20, con las que se separó el ligando unido del libre. Si en el caso de la fracción I y del extracto inicial era el segundo pico el que contenía la máxima actividad específica, en las fracciones esto sucedía sólo con el primer pico. Estas diferencias podrían explicarse por el diferente contenido proteico y lipídico. Las fracciones II y III estaban mucho mas delipidadas que la fracción I, y es sabido que los lípidos juegan un papel importante en el fraccionamiento con Sephadex LH-20, ya que además de la mera filtración en gel hay que tener en cuenta fenómenos tales como la adsorción.

El receptor purificado de la fracción I parecería tener naturaleza nicotínica, ya que la máxima inhibición de la unión de (^3H)-acetilcolina fue conse-

guida con ligandos como la α -bungarotoxina, acetilcolina y d-tubocurarina. Por el contrario, la inhibición producida por ligandos de naturaleza muscarínica, tales como atropina y oxotremorina fue mucho mas baja. Hay que indicar que en presencia de un ligando, ya fuera nicotínico o muscarínico, ocurrió que se obtenía una gran cantidad de radiactividad en el primer pico. Esta radiactividad es claro que no iba unida específicamente al receptor, puesto que en ausencia del ligando era mucho menor. Una posibilidad es que se tratara de (^3H)-acetilcolina libre que en este caso no quedaba retenida en la columna. Entonces el ligando, en mucha mayor cantidad que la droga radiactiva, desplazaría a esta del gel dextrano, provocando su elución al principio de la cromatografía. Otra posibilidad es que la presencia de ligando en las concentraciones utilizadas provocara la agregación del proteolípido receptor haciéndole eluir en el primer pico. Se indicó hace tiempo (172) que después de la adición de sulfato de atropina al receptor colinérgico de corteza cerebral, se producía un gran incremento en la dispersión de Rayleigh. Este efecto, que no era específico, pues podía ser producido también por eserina, amfetamina, dibenzilamina y estricnina (todas ellas aminas bivalentes) se explicó como un incremento en el tamaño de las partículas, al unirse simultáneamente dos moléculas de proteína (173). Un efecto similar se observó cuando la interacción proteína-ligando se estudió por polarización de fluorescencia (174), por lo que en este caso podría ocurrir algo similar. Sin embargo, aunque ocurrió con sulfato de atropina, también se produjo en menor proporción con el resto de los ligandos examinados, a excepción de la α -bungarotoxina. Precisamente con esta neurotoxina se observó la máxima inhibición de la unión de (^3H)-acetilcolina, pero el pico que tenía la droga unida específicamente era el primero y no el segundo. Esto se confirmó mas tarde al estudiar la unión de (^3H)- α -bungarotoxina. En este caso el ligando radiactivo se eluyó unido específicamente al primer pico, y la toxina no unida quedó retenida en su totalidad en la columna. Es obvio que la unión

de una molécula del tamaño de la α -bungarotoxina (peso molecular aproximado 8.000 Dalton) a la molécula receptora modificó las interacciones de esta con el gel dextrano, por lo que el esquema de elución quedó así mismo modificado. En cualquier caso se observó la unión específica de 5,2 nmoles de toxina por mg. de proteína, que se inhibía en un 81,3 % al preincubar con d-tubocurarina.

De todo lo dicho hasta ahora se puede concluir que la fracción I aislada por cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto proteolípido de la electroplaca de Torpedo tiene las características de un receptor colinérgico de naturaleza nicotínica. Este tendría posiblemente dos sitios de unión (figura 17), uno de alta y otro de baja afinidad. El primer componente sería de muy alta afinidad (K_d 3 nM, B_{max} 0,142 nmoles / mg proteína) si se compara con otros valores obtenidos tanto en el receptor aislado por medio de detergentes (171, 175, 176) como en solventes orgánicos (64), pero en estos casos el proceso de purificación fue muy distinto del que aquí se ha utilizado. Además en el caso del proteolípido no se habían ensayado hasta ahora concentraciones tan bajas de (3H)-acetilcolina, con lo que el hallazgo de un sitio de alta afinidad era más difícil. El componente de baja afinidad presentó similares constantes que las reportadas en anteriores estudios.

8. MARCAJE CON (3H)-MPTA.

Karlin estudió el efecto de una serie de derivados de la maleimida sobre la electroplaca aislada (177). Uno de ellos, el yoduro de 4-(N-maleimida)-feniltrimetilamonio tenía una considerable afinidad por el sitio activo del receptor. Debido a esto, el receptor reducido era alquilado a una velocidad 4700 veces mayor que la N-etilmaleimida. Se estimó que el grupo disulfuro que se reduce y alquila está a 10-12 Å del sitio aniónico del receptor que une el grupo amonio cuaternario. Presumiblemente es este el grupo -SH que, en su estado oxidado, es el responsable de la unión cooperativa de acetilcolina, ya que reactivos que lo reducen disminu-

yen la afinidad y eliminan la sigmoicidad de la curva (178).

Posteriormente se observó que el MPTA, dado que se une covalentemente al sitio activo del receptor con bastante especificidad, podía considerarse como un marcador específico de la cadena polipeptídica que contiene el sitio de unión de acetilcolina. Y en efecto, resultó que una molécula de peso molecular 40 KDalton se marcaba específicamente con (³H)-MPTA (80, 83, 179).

En el caso que aquí se discute se llevó a cabo el marcaje con (³H)-MPTA de los proteolípidos precipitados con eter-etanol. Después de ser separados por DEAE-celulosa se observó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida que la banda mayoritariamente marcada era la única presente en la fracción I (figura 19), lo que confirmó los resultados anteriores de que era aquí donde se localizaba el sitio de unión de acetilcolina. El peso molecular de dicha banda ya se indicó que era de 39 KDalton, aunque disminuía al delipidarse. Este marcaje se podía inhibir en parte, al ser ocupado el sitio activo por la α -bungarotoxina. Sin embargo, al marcar con (³H)-MPTA los proteolípidos precipitados previamente incubados con la toxina, la inhibición no era total. No obstante se hizo electroforesis de los mismos para ver si la banda de 39.000 se seguía marcando a pesar del bloqueo de la α -bungarotoxina y se observó que en este caso no había mas radiactividad en la banda que en el resto del gel. Sólo se detectó una subida de radiactividad en el final del gel, debido a que posiblemente el (³H)-MPTA reaccionó con ciertos lípidos residuales.

Si no había reducción previa con ditiotreitol el marcaje disminuía considerablemente, pero no en su totalidad. Tanto en este caso como en el anterior, el que no se de una inhibición total del marcaje podría deberse a que, al producirse la precipitación, el proteolípido receptor cambia su conformación y se pierde algo de especificidad, marcándose otros sitios que enmascararían el marcaje del sitio activo. Este mismo efecto sería producido por la presencia de otras moléculas proteolípídicas que no contienen el sitio de unión de acetilcolina.

Hay que indicar, antes de terminar esta discusión, que si bien hay bastantes hechos que demuestran que esta molécula aislada en la fracción I puede ser considerada receptor colinérgico, hay una discrepancia al compararla con el receptor aislado por medio de detergentes: su composición de aminoácidos. Mientras que el porcentaje de aminoácidos hidrófobos de la fracción I es mayor que el del receptor purificado por afinidad cromatográfica (78, 171, 180, 181) este parece contener una mayor proporción de aminoácidos acídicos. Ante esto se podría pensar que quizás en esta molécula proteolipídica falte una porción, que sería la mas hidrófila, y que se escinde del resto a lo largo del proceso de purificación. Otra explicación a cerca de las pruebas inmunológicas anteriormente citadas (170) podría ser que este fragmento hidrófilo fuera el responsable principal de la reacción inmunológica, y al escindir se provoca que esta no se produzca de forma apreciable. Mas recientemente este problema fue reexaminado usando un método que incluye radioinmunoensayo, y experimentos preliminares presentaron una falta de reactividad cruzada entre los receptores aislados por ambos métodos (183). Quizás resulte mas util la comparación inmunológica de las dos proteínas después de su separación por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, ya que en este caso los dos polipéptidos estarían desnaturalizados de forma similar.

9. ESTUDIOS SOBRE GRUPOS SULFHIDRILLO Y DISULFURO.

Está bien establecido que los grupos sulfhidrilo son importantes en la excitabilidad de la electroplaca *in vivo* (178). También se ha observado (184) que el proteolípido colinérgico de *Electrophorus* incorporado en membranas artificiales se hace insensible a la acetilcolina cuando todos los grupos -SH se bloquean con N-etilmaleimida. Suarez-Isla y Hucho (92) han considerado la importancia de la reactividad de los grupos -SH como indicador de cambios conformacionales en el receptor. Y así, bajo la acción de ligandos colinérgicos se reduce el número de grupos -SH en

la membrana de la electroplaca de Torpedo. Por todos estos hechos y algunos más (185) citados anteriormente, se creyó de interés realizar algunos estudios sobre el contenido de grupos -SH y -SS- en los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo.

El marcaje de los proteolípidos totales con ácido iodo(³H)acético mostró que solo 1/3 del total de grupos -SH estaba en estado reducido (tabla 15). El resto estaba formando puentes -SS-, la mayoría de ellos intermoleculares, puesto que el esquema electroforético no variaba apreciablemente en presencia o ausencia de ditiotreitol. Sin embargo donde sí se observó fue en la fracción de proteolípidos solubilizados en medio acuoso sin detergente. Así por ejemplo es claro que la banda b (figura 20), de peso molecular 30 KDalton, es un dímero de la banda a, cuyo peso molecular es 15 KDalton. En la formación de este dímero intervienen los grupos -SS-, ya que al reducir los mismos el dímero desaparece, y aumenta la banda a. Habría un equilibrio en el que la formación del dímero estaría favorecida. La existencia de una banda de menor importancia, de 45 Kdalton de peso molecular, indicaría la presencia de un trímero, pero su formación puede que sea simplemente por asociación de grupos -SH libres, y no específica, ya que solo se observó en ausencia de N-etilmaleimida, es decir, cuando los grupos -SH estaban sin bloquear. La formación de las bandas c y d no es tan fácil de explicar. Se observan al romper los grupos -SS-, pero no parecen proceder de otras de mayor peso molecular, ya que no se detectaron cadenas polipeptídicas mayores. Se ha visto que a partir de dos cadenas ó del receptor de acetilcolina se formaba un dímero de peso molecular 130.000 Dalton (78, 91, 93). Sin embargo, en el caso de los proteolípidos no fue posible detectar esta molécula de mayor peso molecular, cuando desaparecían las bandas de 64.000 y 58.000 Dalton. La única posibilidad para explicar la aparición de estas bandas es que procedan de las de menor peso molecular y se formen por agregación de carácter hidrófobo. Al romperse los grupos -SS- que mantienen la con-

formación de las bandas a y b habría cambios conformacionales en que las interacciones hidrófobas quedarían favorecidas. En cuanto a la función de estas moléculas nada es posible decir por el momento. Sin embargo es llamativo el hecho de que se solubilizan con CM 2:1 y posteriormente sean solubles en medios acuosos, lo que hace pensar que por una parte mantienen interacciones con los lípidos de la bicapa (y por eso son extraídas como proteolípidos) y por otra tienen la capacidad de adoptar una conformación cuya superficie externa es hidrófila y similar a la de las proteínas globulares comunes.

Sobel et al. (83) encontraron un polipéptido de 43 KDalton que se marcaba muy apreciablemente con ácido iodo(^{14}C)acético. Basándose en esta y otras propiedades sugirieron que podría actuar como ionóforo en la membrana de la electroplaca. Mas tarde se vió que la unión covalente de un derivado de la procaína, un anestésico local, se producía preferentemente en este polipéptido (186). Sin embargo, fragmentos subsinápticos purificados y extraídos con NaOH no contenían dicho polipéptido, aún cuando las membranas postsinápticas tratadas con álcali estaban funcionalmente intactas, ya que la cinética de unión de (^3H)-acetilcolina no se alteró, así como la salida de ión Na^+ estimulada por carbamilcolina (187). En el caso de los proteolípidos, el marcaje con ácido iodo(^3H)acético fue mas alto en la fracción II (46 %) que en la I (29 %) y en la III (25 %). En la fracción II predominaba el polipéptido de 42 KDalton, y por electroforesis se demostró que el mayor pico de radiactividad coincidía con esta banda. Otra similitud con la banda de 43 KDalton de Sobel et al. (83) es la composición de aminoácidos. Aunque la fracción II es mas hidrófoba, no hay que olvidar que se encuentran otras proteínas además de la que tiene 42.000 de peso molecular. Por tanto, y a pesar de las discrepancias y polémica existentes, es posible que la función de este proteolípido ^(188,189) fuera la de canal iónico, aunque esto necesitaría posteriores estudios con marcadores específicos del ionóforo, cuyo uso cada vez es mas corriente (192-200).

Chang y Bock (74) observaron una alta concentración de grupos -SH en el

receptor colinérgico aislado por cromatografía de afinidad de la electroplaca de Torpedo extraída con detergentes. En presencia de 1 mM Ca^{2+} , tratamiento que, al parecer, incrementa la actividad de los grupos -SH, se encontraron 34 nmoles de grupos -SH/mg proteína. En la fracción II de la cromatografía de DEAE-celulosa el contenido fue de 36,7 nmoles / mg de proteína, es decir, más alto que el encontrado por los mencionados autores. Sin embargo, en la fracción I, la cual contiene el sitio de unión de ligandos colinérgicos, el contenido de grupos -SH fue definitivamente más bajo. Por los resultados obtenidos es claro que los polipéptidos que componen las fracciones I y II juegan diferentes funciones en la membrana. Algunas de ellas han sido aquí puestas de manifiesto, sobre todo en lo que se refiere al receptor de acetilcolina, mientras que otras es indudable que necesitarán una posterior investigación.

108

CONCLUSIONES

Los estudios aquí presentados perseguían diversos objetivos:

- 1) El desarrollo de técnicas de estudio de los proteolípidos. La ausencia de dichas técnicas, debido a las particulares características de estas moléculas, no ha permitido hasta el momento un completo conocimiento de cómo funcionan las mismas en las membranas celulares.
- 2) El estudio de dos proteolípidos de membranas mielínica y no mielínica, para mostrar que, si bien puede haber relaciones entre ellos en lo que a propiedades físico-químicas se refiere, las funciones que pueden desempeñar son muy diversas. Al mismo tiempo, y como es lógico, se han intentado determinar ciertas características químicas y funcionales que hasta el momento no se habían evaluado satisfactoriamente.

Por ello se puede concluir:

1. La purificación de la mielina fue seguida por microscopía electrónica y por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, comprobándose que el material utilizado era suficientemente puro para los posteriores trabajos.

2. Se desarrolló un método de purificación del proteolípido de mielina sencillo y rápido. La cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto proteolípídico total de la mielina permitió:

A) Evitar tratamientos previos de la mielina con el fin de purificar el proteolípido.

B) Retención en la columna de la proteína básica, principal y constante contaminante de las preparaciones de proteolípido.

C) Obtención de una fracción de proteolípido purificado (según análisis de aminoácidos y geles de SDS-poliacrilamida).

3. El uso de un procedimiento de adsorción-desadsorción del extracto total a la resina permitió aumentar el rendimiento de proteolípido purificado, conservándose las ventajas del fraccionamiento por columna.

4. Por un método nuevo se consiguió la transferencia del proteolípido purificado desde el disolvente orgánico a un medio acuoso con detergente. De este forma pudo aplicarse la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida con la seguridad de que todos los componentes proteolipídicos serían analizados.

5. Por electroforesis, tanto a pH neutro como básico, se observó una sola banda en la fracción de proteolípido purificado, sugiriendo la existencia de una sola cadena polipeptídica cuyo peso molecular se calculó entre 20-23 KDalton, según el sistema utilizado.

6. El análisis de aminoácidos dió resultados similares a los obtenidos para el proteolípido purificado por métodos más laboriosos, lo que indicaría que se trata de la misma molécula.

7. Para el proteolípido purificado sólo se encontró un aminoácido N-terminal: alanina. Sería otra prueba a favor de la existencia de una sola cadena polipeptídica.

8. Los mapas peptídicos sugerían la presencia de zonas poco accesibles a la acción proteolítica. Quizás se deba a la formación de complejos lípido-proteína y/o proteína-proteína con lo que quedan protegidas ciertas zonas del proteolípido. Esto habla en favor de la estabilidad del proteolípido en la membrana

9. La incorporación del proteolípido purificado a líposomas de fosfatidilcolina

puso mas en evidencia su naturaleza de protefna intrínseca de membrana ya sugerida por algunos de los resultados anteriores. En efecto, un buen porcentaje de protefna pasaba a mantener interacciones de apreciable magnitud y principalmente de tipo hidrófobo, con los lípidos de las vesículas.

10. A diferencia de lo que sucede con otras protefnas intrínsecas, tales como los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo, la incorporación del proteolípidos de la mielina no indujo cambios apreciables en las propiedades de las bicapas de fosfolípidos. Si bien sería posible que el empaquetamiento de las cabezas polares de los fosfolípidos sufriera ligeras modificaciones, la fluidez de la bicapa, medida por la permeabilidad a pequeñas moléculas, no pareció alterarse.

En suma, es muy posible que el proteolípidos se halle implicado en el mantenimiento de la estructura multilamelar de la mielina como un componente esencialmente estructural estabilizante.

Los estudios posteriores tuvieron por objeto caracterizar química y funcionalmente los proteolípidos de Torpedo, que incorporados en vesículas de fosfatidilcolina se comportaron de forma muy distinta que el proteolípidos de mielina.

11. Los proteolípidos de la electroplaca de Torpedo se fraccionaron por cromatografía en DEAE-celulosa utilizando en su elución el ión hidrofóbico p-toluensulfonato. Este nuevo método permitió la obtención de tres fracciones que se caracterizaron.

12. Por el contenido de fosfolípidos y por su composición de aminoácidos que la fracción I sería la mas hidrófoba. Las fracciones II y III tenían un



taje mayor de aminoácidos con carga; por esto interaccionaron mas fuerte con la DEAE-celulosa y fueron eluidos con el gradiente de p-toluensulfonato.

13. Aunque los proteolípidos de la electroplaca se habían estudiado anteriormente, nunca se había averiguado su composición polipeptídica. Por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida se observó que la fracción I poseía mayoritariamente una banda de 39.000 Dalton. En las fracciones II y III predominaba un polipéptido de 42.000 Dalton y otros de mayor peso molecular.

14. Las tres fracciones se diferenciaron también por su capacidad de unión de ligandos colinérgicos. La máxima unión de (³H)-acetilcolina y (³H)- α -bungarotoxina se produjo en la fracción I. Las fracciones II y III unían estos ligandos en mucha menor proporción.

15. El sitio de unión de (³H)-acetilcolina de la fracción I se bloqueó preferentemente con ligandos nicotínicos mas que muscarínicos lo que sugería que el posible receptor de la fracción I era de naturaleza nicotínica. Este tenía dos componentes de unión , una de muy alta afinidad y otra de menor afinidad.

16. El reactivo de afinidad cloruro de 4-(N-maleimido)fenil(³H)trimetilamonio se ha visto que se une a un grupo muy cercano al sitio de unión de (³H)-acetilcolina. Solo el proteolípido de 39.000 Dalton de la fracción I se marcó específicamente con este reactivo, confirmando que era esta cadena polipeptídica la que contenía el sitio de unión de (³H)-acetilcolina. Así pues, podría afirmarse que este proteolípido de la electroplaca está implicado en el complejo receptor de acetilcolina.

17. En los proteolípidos totales el número de grupos -SH libres era aproximadamente la mitad del de grupos -SH formando puentes disulfuro. Estos últimos eran

mayoritariamente intramoleculares, a excepción de los de un proteolípidos de peso molecular 15.000 Dalton, posteriormente soluble soluble en soluciones acuosas de moderada fuerza iónica. En este caso la asociación de dos moléculas de 15.000 Dalton daba lugar específicamente a la formación de una de 30.000 Dalton.

18. El marcaje con ácido iodo(³H)acético puso en evidencia que el polipéptido de 42.000 Dalton tenía un contenido alto de grupos -SH. Aunque la función de este proteolípidos no fue aclarada, es posible que esté implicado en funciones de transporte a través de la membrana.

En resumen, de los objetivos enumerados al principio se ha conseguido:

- A) Desarrollar una metodología que podrá ser útil para el estudio de otros proteolípidos.
- B) Discernir, al menos parcialmente, la función de dos proteolípidos de membranas mielínica y no mielínica, poniendo en evidencia que:
- C) A pesar de posibles semejanzas químico-estructurales, este tipo de proteínas puede ejercer funciones muy distintas y variadas en las membranas.

114

BIBLIOGRAFIA

1. Fourcans, B. y Jain, M.K. (1974) *Adv. Lip. Res.* 12, 147.
2. Singer, S.J. (1971) En "Membrane Structure and Function" (Ed. L.I.Rothfield) Ac. Press, New York.
3. Guidotti, G. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41, 731.
4. Lenard, J., y Singer, S.J. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1828.
5. Wallach, D.F.H., y Zahler, P.H. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1552.
6. Gennis, R.B., y Jonas, A. (1977) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 195.
7. Tanford, C. (1973) En "The Hydrophobic Effect" J. Wiley and son, New York.
8. Tanford, C. (1978) *Science* 200, 1012.
9. Folch, J., y Lees, M. (1951) *J.Biol. Chem.* 191, 807.
10. Folch, J., y Stoffyn, P.J. (1972) *Ann. New York Acad. Sci.* 195, 86.
11. Ishitani, O. (1977) *Experientia* 33, 932.
12. De Robertis, E., Fiszer, S., Pasquini, J.M., y Soto, E.F. (1969) *J.Neurobiol.* 1, 41.
13. Fiszer, S., y De Robertis, E. (1976) *J.Neurochem.* 9, 153.
14. Taylor, R.F. (1978) *J.Neurochem.* 31, 1199.
15. De Robertis, E. (1975) En "Synaptic Receptors" (Ed. W.F.Bousquet) Dekker, New York.
16. Kadembach, B., y Hadvary, P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32, 343.
17. Burke, J.P., y Beattie, D.S. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 349.
18. Kuzela, S., Kolarov, J., y Krempasky, V. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 9.
19. Autilio, L.A., Norton, W.T., y Terry, R.D. (1964) *J.Neurochem.* 11, 17.
20. Lees, M.B. (1966) *J.Neurochem.* 13, 1407.
21. Bretscher, M.S. (1971) *J.Mol. Biol.* 59, 531.
22. Mueller, T.J., y Morrison, M. (1974) *J.Biol. Chem.* 249, 7567.
23. Redman, C.H. (1972) *Biochim.Biophys. Acta.* 282, 123.

24. Cattel, K.J., Knight, I.G., Lindop, C.R., y Beechey, R.B. (1970) *Biochem. J.* 117, 1011.
25. Patel, L., y Kaback, H.R. (1976) *Biochemistry* 15, 2741.
26. Guerin, M., y Napias, C. (1978) *Biochemistry* 17, 2510.
27. Stoffyn, P., y Folch J. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 157.
28. Gagnon, J., Finch, P.R., Wood, D.D., y Moscarello, M.A. (1971) *Biochemistry* 10, 4756.
29. Mc Lennan, D.H., Yip, C.C., Iles, G.H., y Seeman, P. (1973) *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 469.
30. Demel, R.A., London, Y., Geurts van Kessel, W.S.M., Vossenberg, F.G.A., y Van Deenen, L.L.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 311, 507.
31. London, Y., Demel, R.A., Geurts van Kessel, W.S.M., Vossenberg, F.G.A., y Van Deenen, L.L.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 311, 520.
32. Demel, R.A., London, Y., Vossenberg, F.G.A., Zahler, P., y Van Deenen, L.L.M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 332, 69.
33. Schlieper, P.M., y De Robertis, E. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 886.
34. Kurihara, T., Nishizawa, Y., y Takahashi, Y. (1977) *Biochem. J.* 16, 135.
35. Altendorf, K., Lukas, M., Kohl, B., Muller, C.R., y Sanderman, H. (1977) *J. Supramol. Struct.* 6, 229.
36. Soto, E.F., Pasquini, J.M., y La Torre, J.L. (1969) *J.Chromatog.* 41, 400.
37. Mokrasch, L.C. (1967) *Life Sci.* 6, 1905.
38. Sanderman, H., y Strominger, J.L. (1972) *J.Biol. Chem.* 247, 5123.
39. Curtis, P.J. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 194, 513.
40. Monreal J. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 427, 15.
41. Hill, E.E., Husband, S.D.R., y Lands W.E.M. (1968) *J.Biol. Chem.* 243, 4440.
42. Prottey, C., y Ballow, C.E. (1968) *J.Biol. Chem.* 243, 6196.

43. Rouser, G., Kritchewsky, G., Yamamoto, A., Simon, G., Galli, C., y Bauman, A.J. (1969) *Met. Enzymol.* 14, 272.
44. Scandella, C.J., y Kornberg, A. (1971) *Biochemistry* 10, 4447.
45. Agrawal, H.C., Hartman, B.R., Shearer, W.T., y Margolis, F.L. (1977) *J. Neurochem.* 28, 495.
46. Wood, D.D., Gagnon, J., Finch, P.R., y Moscarello, M.A. (1971) *Amer. Soc. Neurochem. Transactions* 2, 1, 117.
47. Curatolo, W.J., Sakura, J.D., Small, D.M., y Shipley, G.G. (1977) *Biochemistry* 16, 2313.
48. Papahadjopoulos, D., Vall, W.J., y Moscarello, M.A. (1975) *J. Membrane Biol* 22, 143.
49. Pinto da Silva, P., y Miller, R.G. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4046.
50. Feinstein, M.B., y Felsenfeld, H. (1975) *Biochemistry* 14, 3049.
51. Cockle, S.A., Epand, R.M., y Moscarello, M.A. (1978) *Biochemistry* 17, 630.
52. Curatolo, W., Verma, S.P., Sakura, J.D., Small, D.M., Shipley, G.G., and Wallach D.F.H. (1978) *Biochemistry* 17, 1802.
53. Lippert, J.L., y Peticolos, W.L. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1572.
54. Verma, S.P., y Wallach, D.F.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 426, 616.
55. Spiker, R.C., y Levin, I.W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388, 361.
56. Sator, V., Thomas, J.K., Raftery, M., y Martínez-Carrión, M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 250.
57. Sator, V., González-Ros, J.M., Calvo-Fernández, P., y Martínez-Carrión, M. (1979) *Biochemistry* 18, 1200.
58. Karlin, A. (1977) En "Pathogenesis of the Human Muscular Dystrophies (Ed. Rowland, L.P.) 73, Excerpta Medica, Amsterdam.
59. Heidmann, T., y Changeux, J.P. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47, 317.
60. Biederman W. (1898) *Electrophysiology* Vol. 2 (trans. Welby F.A.) McMillan, Londres.

61. Keynes, R.D., y Martins-Ferreira, P. (1953) *J.Physiol.* 119, 315.
62. Bennet, M.V.L., Wierzel, M., y Grundfest, H. (1961) *J. Gen. Physiol.* 44, 757.
63. La Torre, J.L., Lunt, G.S., De Robertis, E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 65, 716.
64. De Robertis, E., Lunt, G.S., y La Torre, J.L. (1971) *Mol. Pharmacol.* 7, 97.
65. Fiszler de Plazas, S., y De Robertis, E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 266, 246.
66. Mustacich, R.V., y Weber, G. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 779.
67. Criado, M., Aguilar, J.S., y De Robertis, E. (1980) *Anal. Biochem.* (en prensa)
68. Blanchard, S.G., Quast, U., Reed, K., Lee, T., Schimerlik, M.I., Vandien, R., Claudio, T., Stracher, C.D., Moore, H.H., y Raftery, M. (1979) *Biochemistry* 18, 1884.
69. Reynolds, J.A., y Karlin, A. (1978) *Biochemistry* 17, 2035.
70. Damle, V.L., y Karlin, A. (1978) *Biochemistry* 17, 2039.
71. Weill, C.L., McNamee, M.G., y Karlin, A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 997.
72. Raftery, M., Vandien, R.L., Reed, K.L., y Lee, T. (1975) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40, 193.
73. Hucho, F., Layer, P., Kiefer, H.R., y Bandini, G. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2624.
74. Chang, H.W., y Bock, E. (1977) *Biochemistry* 16, 4513.
75. Lindstrom, J., Einason, B., y Merlie, J. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 769.
76. Reed, K., Vandien, R., Bode, J., Duguid, K., y Raftery, M. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 138.
77. Hamilton, S.L., McLaughlin, M., y Karlin, A. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 692.
78. Sobel, A., Weber, M., y Changeux, J.P. (1977) *Eur. J. Biochem.* 80, 215.

79. Hucho, F., Bandini, G., y Suarez-Isla, B.A. (1978) *Eur. J. Biochem.* 83, 335.
80. Karlin, A., Weill, C.L., McNamee, M.G., y Valderrama, R. (1975) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40, 203.
81. Moore, H.H., y Raftery, M. (1979) *Biochemistry* 18, 1862.
82. Weiland, G., Frisman, D., y Taylor, P. (1979) *Mol. Pharmacol.* 15, 213.
83. Sobel, A., Heidmann, T., Hofler, J., y Changeux, J.P. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 510.
84. Reiter, M.J., Cowburn, D.A., Prives, J.M., y Karlin, A. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1168.
85. Karlin, A., y Cowburn, D. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3636.
86. Changeux, J.P., Podleski, T.R., y Wofay, L. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 2063.
87. Mautner, H.G., y Bartels, S.E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 74.
88. Ruoho, A.E., Kiefer, H., Roeder, P., y Singer, S.J. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2567.
89. Chao, Y., Vandlen, R.L., Raftery, M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 300.
90. Martínez-Carrión, M., Sator, V., y Raftery, M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 129.
91. Witzeman, V., y Raftery, M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1025.
92. Suarez-Isla, B.A., y Hucho, F. (1977) *FEBS Lett.* 75, 65.
93. Hamilton, S.L., McLaughlin, M., y Karlin, A. (1979) *Biochemistry* 18, 155.
94. Schiebler, W., Lauffer, L., y Hucho, F. (1977) *FEBS Lett.* 81, 39.
95. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
96. Hess, H.H., y Levin, E. (1965) *J. Neurochem.* 12, 205.
97. Ames, B.N., y Dubin, D.T. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 770.

98. Trevelian, W.T., y Harrison, J.S. (1952) *Biochem. J.* 50, 298.
99. Laemli, U.K., y Favre, M. (1973) *J.Mol. Biol.* 80, 575.
100. Quarles, R.H., Everly, J.R., y Brady, R.D. (1973) *J. Neurochem.* 21, 1177.
101. Weber, K., y Osborn, M. (1969) *J.Biol. Chem.* 244, 4406.
102. Zanetta, P. J., Morgan, J.C., y Gombos, G. (1975) *Brain Res.* 83, 337.
103. Segrest, J.P., y Jackson, R.L. (1972) *Met. Enzymol.* 28, 54.
104. Skipski, V.P., Peterson, R.F., y Barclay, M. (1964) *Biochem. J.* 90, 374.
105. 'Thin layer chromatography' (Ed. E. Stahl) *Acad. Press, New York* (1965)
106. Norton, W.T., y Poduslo, S. (1973) *J. Neurochem.* 21, 749.
107. Luft, J.H. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409.
108. Nussbaum, J.L., Rouayrenc, J.F., Jolles, J., Jolles, P., y Mandel, P. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 1240.
109. Lees, M.B., y Chan, D.S. (1975) *J. Neurochem.* 25, 595.
110. Gray, W.R. (1970) *Met. Enzymol.* 11, 139.
111. Hill, M.W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 356, 117.
112. Johnson, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 307, 27.
113. Nicholls, P., y Miller, N. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 356, 184.
114. Cohen, J.B., Weber, M., Huchet, M., y Changeux, J.P. (1972) *FEBS Lett.* 26, 43.
115. Habeeb, A.F.S.A. (1972) *Met. Enzymol.* 25, 457.
116. Ellman, G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70.
117. Fujimoto, K., Roots, B.J., Burton, R.H., y Agrawal, H.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 426, 659.
118. Shapira, R., Mobley, W.C., Thiele, S.B., Willelmi, M.R., Wallace, A., y Kibler, R.F. (1978) *J. Neurochem.* 30, 735.
119. Eng, L.F., Chao, C., Gerstl, B., Pratt, B., y Tavaststjerna, M.G. (1968) *Biochemistry* 7, 4455.
120. Abramson, M.B. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 225, 167.

121. Yi, P.N., y McDonald, R.C. (1973) *Chem. Phys. Lipids* 11, 114.
122. Ochoa, E.L.M., De Carlin, M.C.L., y Pecci Saavedra, J. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 144.
123. Singer, S.J., y Nicholson, G.L. (1972) *Science* 175, 720.
124. Montal, M. (1976) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 119.
125. Criado, M. (1977) *Tesis de Licenciatura, Universidad de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas.*
126. Nicot, C., Nguyen Le T., Lepetre, M., y Aifsen, A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 322, 109.
127. Chan D.S., y Lees, M.B. (1971) *Biochemistry* 13, 2704.
128. Boggs, J., y Moscarello, M.A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 1.
129. Agrawal, H.C., Burton, R.M., Fishman, M.A., Mitchell, R.F. y Prenskey, A.L. (1972) *J. Neurochem.* 19, 2083.
130. Bridgen, J., y Walker, I.D. (1976) *Biochemistry* 15, 792.
131. Banker, G.A., y Lotman, C.W. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5856.
132. Guengerich, J.P. (1978) *J. Biol. Chem.* 262, 7931.
133. Lees, M.B., Sakura, J.D., Sapirstein, V.S., y Curatolo, W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.*
134. Poduslo, J.F., Everly, J.L., y Quarles, R.H. (1977) *J. Neurochem.* 28, 977.
135. Fillingame, R.H. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 6630.
136. Altendorf, K. (1977) *FEBS Lett.* 73, 271.
137. Wiggins, R.C., Del Valle, U., Joffe S. (1974) *J. Neurochem.* 22, 337.
138. Jolles, J., Schoentgen, F., Jolles, P., Vacher, M., Nicot, C., y Aifsen, A. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 619.
139. Wood, J.G., Dawson, R.M.C., y Hauser, H. (1974) *J. Neurochem.* 22, 637.
140. Chan, D.S., y Lees, M.B. (1978) *J. Neurochem.* 30, 983.
141. Lees, M.B., y Macklin, W.B. (1979) 7th Meeting of the International Society for Neurochemistry. Jerusalem. Abstracts, 447.

142. Bangham, A.D., Standish, M.M., y Watkins J.C. (1965) *J. Mol Biol.* 13, 238.
143. Janiak, H.J., Small, D.M., y Shipley, G.G. (1976) *Biochemistry* 15, 4575.
144. Yeagle, P.L., Hutton, W.C., Huang, c., y Martin, R.B. (1977) *Biochemistry* 16, 4344.
145. Kimmelberg, H.K., y Papahadjopoulos, D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 233, 805.
146. Helffrich, F. (1962) En "Ion Exchange" Mc Graw Hill Inc. New York.
147. Gable, R.W., y Strobel, H.A. (1956) *J. Phys. Chem.* 60, 513.
148. Westernak, T. (1960) *Acta Chem. Scand.* 14, 1857.
149. Reichember, D., y Wall, W.F. (1956) *J. Chem. Soc.* 3364.
150. Davies, C.W., y Owen, B.D.R. (1956) *J. Chem. Soc.* 1676.
151. Katzin, L.I., y Gebert, E. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 801.
152. Sigrist-Nelson, K., y Azzf, A. (1979) *Biochem. J.* 177, 687.
153. Tom, S.J., Gogel, G.E., y Loach, P.A. (1977) *Biochemistry* 16, 877.
154. Cohen, N.S., Lee, S., y Brodie, A.F. (1978) *J. Supramol. Struct.* 8, 111.
155. Tanford, C., y Reynolds, J.A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 133.
156. Barrantes, F.J. (1979) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8, 287.
157. Chang, H.W., y Bock, E. (1979) *Biochemistry* 18, 172.
158. Marsh, D., y Barrantes, F.J. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4329.
159. Axelrod, D., Wight, A., Webb, W., y Horwitz, A. (1978) *Biochemistry* 17, 3604.
160. Witzeman, V., y Raftery, M. (1978) *Biochemistry* 17, 3598.
161. Triggle, D.J. (1971) "Neurotransmitter Receptor Interactions" Acad. Press New York.
162. De Robertis, E., Fiszer, S., y Soto, E.F. (1967) *Science* 158, 928.
163. Fiszer de Plazas, S., y De Robertis, E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 274, 258.
164. Lunt, G.S., Stefani, E., y De Robertis, E. (1971) *J. Neurochem.* 18, 1545.

165. Barrantes, F.J., Arbillia, S., Llorente de Carlin, M.C., y De Robertis, E. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 194.
166. Ochoa, E.L.M., y De Robertis, E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 295, 528.
167. Cattell, K.J., y Donnellan, J.F. (1972) *Biochem. J.* 128, 187.
168. Donnellan, J.F., Jewers, P.J., y Cattell, K.J. (1975) *J. Neurochem.* 25, 623.
169. Llorente de Carlin, M.C., y De Robertis, E. (1976) *Life Sci.* 19, 903.
170. Barrantes, F.J., Changeux, J.P., Lunt, G.G., y Sobel, A. (1975) *Nature* 256, 325.
171. Eldefrawi, M.E., y Eldefrawi, A.T. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 362.
172. De Robertis, E., González-Rodríguez, J.L., y Teller, D.N. (1969) *FEBS Lett.* 4, 4.
173. Vasquez, C., Barrantes, F.J., La Torre, J.L., y De Robertis, E. (1970) *J. Mol. Biol.* 52, 221.
174. González-Rodríguez, J.L., y De Robertis, E. (1970) *Mol. Pharmacol.* 6, 122.
175. Fu, J.L., Donner, D.B., Moore, D.E., y Hess, G.P. (1977) *Biochemistry* 16, 678.
176. Bulger, J.E., Fu, J.L., Hendy, E.F., Silberstein, R.L., y Hess, G.P. (1977) *Biochemistry* 16, 684.
177. Karlin, A. (1969) *J. Gen. Physiol.* 54, 245.
178. Karlin, A., y Bartels, E. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 126, 525.
179. Karlin, A., y Cowburn, D. (1974) En "Neurochemistry of Cholinergic Receptors" (Ed. E. De Robertis y J. Schacht) Raven Press, New York.
180. Vandlen, R.L., Wu, W.C.S., Eisenach, J.C., y Raftery, M. (1979) *Biochemistry* 18, 1845.
181. Linstrom, J., Merlie, J., y Jogeeswaran G. (1979) *Biochemistry* 18, 4465.
182. Barkas, T., Harrison, R., Lunt, G.G., y Watson, C.M.J. (1978) *Biochem. Soc. Trans.* 6, 636.

183. Barkas, T., De Robertis, E., Harrison, R., y Lunt, G.G. (1980) En prensa.
184. Reader, T.A., y De Robertis, E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 352, 192.
185. Moore, H.H., y Raftery, M. (1979) *Biochemistry* 18, 1907.
186. Blanchard, S.G., y Raftery, M. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 681.
187. Neubig, R.R., Krodal, E.K., Boyd, M.D., y Cohen, J.B. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 690.
188. Sobel, A., Heidmann, T., y Changeux, J.P. (1979) *FEBS Lett.* 105, 181.
189. Blanchard, S.G., y Raftery, M. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 958.
190. Andreasen, T.J., y McNamee, M.B. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 958.
191. Andreasen, T.J., Doerge, D.R., y McNamee, M.G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 468.
192. Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Albuquerque, E.X., Oliveira, A.C., Mansour, N., Adler, M., Daly, J.W., Brown, G.B., Burgermeister, W., Witkop, B. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 2172.
193. Albuquerque, E.X., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Mansour, N., y Tsal, M. (1978) *Science* 199, 788.
194. Albuquerque, E.X., y Bage, P.W. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1596.
195. Eldefrawi, M.E., Eldefrawi, A.T., Mansour, N.A., Daly, J.W., Witkop, B., y Albuquerque, E.X. (1978) *Biochemistry* 17, 5474.
196. Elliot, J., Dunn, S.M.J., Blanchard, S.G., y Raftery, M. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2576.
197. Tsal, N., Oliveira, A.C., Albuquerque, E.X., Eldefrawi, M.E., y Eldefrawi, A.T. (1979) *Mol. Pharmacol.* 16, 382.
198. Sator, V., Raftery, M., Thomas, J.K., y Martínez-Carrión, M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 250.
199. Krodal, E.K., Beckman, R.A., y Cohen, J.B. (1979) *Molec. Pharmacol.* 15, 294.
200. Elliot, J., y Raftery, M. (1979) *Biochemistry* 18, 1868.

ABREVIACIONES

DEAE-celulosa, dietilaminoetilcelulosa
SDS, dodecilsulfato sódico
NPTA, 4-(N-maleimido)feniltrimetilamonio
PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DPL, dipalmitoilfosfatidilcolina
CH, cloroformo-metanol
pTS, p-toluensulfonato sódico
PP0, 2,5-difeniloxazol
PC, fosfatidilcolina
PS, fosfatidilserina
PE, fosfatidiletanolamina
PI, fosfatidilinositol
CB, cerebrósidos
EM, esfingomiélinea
P_i, fosfato inorgánico
K_d, constante de disociación
B_{max}, número máximo de sitios de unión
DTT, ditiotreitól
NEM, N-etilmaleimida

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a cuantas personas y entidades han contribuido de algún modo al logro de este trabajo, y de un modo especial a:

.El Dr. Jaime Monreal Llop, Investigador Científico, Jefe de la Unidad de Neurobioquímica del Instituto Cajal del C.S.I.C. y director de esta Tesis por sus enseñanzas e inapreciables consejos, así como por su permanente apoyo y orientación durante el transcurso de las investigaciones realizadas.

.El Profesor D. Angel Martín Municio, catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, por haber aceptado ser ponente de esta tesis, así como por sus valiosas sugerencias durante la preparación de la misma.

.Los Institutos Santiago Ramón y Cajal del C.S.I.C. de Madrid y de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, en las personas de sus directores, Profesores A. Carrato y E. De Robertis, respectivamente, por las facilidades y apoyo recibidos.

.El Prof. E. De Robertis y el Dr. E. L. M. Ochoa por su inapreciable ayuda y colaboración en los experimentos de receptores y de incorporación de proteotípidos en líposomas, respectivamente.

.Mi amigo y compañero J. S. Aguilar, por su constante y desinteresada colaboración.

.F. Carrasco y M. Levi de Stein por su ayuda técnica.

.El C.S.I.C. español y el C.O.N.I.C.E.T. argentino por la ayuda económica prestada por medio de una beca de intercambio.

