

# La bomba de sodio: una familia multigénica

P. Martín Vasallo \*, L. M. González Martínez \*, C. Y. Rodríguez Díaz\*, E. Gallego \*\* y J. J. García Pérez\*\*

\* Laboratorio de Biología del Desarrollo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Laguna Tenerife.

<sup>a</sup> Sección de Nefrología Hospital Ntra. Sra. de la Candelaria. Tenerife.

Cuando hablamos de una familia génica nos referimos a un determinado número de genes que codifican proteínas con la característica común de poseer homología entre elementos funcionales comunes, como por ejemplo sitios de fijación de ligandos como glucosa, ATP, fosfato inorgánico, iones o substratos en general. Si se trata de isoenzimas, la homología estructural puede ser desde el 80% hasta más del 99%. Estos discretos cambios estructurales durante la evolución han dado lugar a modificaciones funcionales muy sutiles. Esto son las isoenzimas o isoformas. Las isoformas, aun desarrollando *grasso modo* la misma función, tienen una distribución particular según los tejidos o grupos celulares, lo que contribuye a otorgar propiedades especializadas a éstos.

En esta revisión describiremos las particularidades de cada uno de los miembros de la (Na,K)-ATPasa o bomba de sodio, que ha demostrado ser una familia multigénica, integrada por, al menos, cinco genes y cuyos productos asociados como protómeros alfa-beta forman sistemas activos de transporte en la membrana plasmática. El esquema que aparece en la figura 1 sirve de guión de la vida de una proteína, desde el gen que la codifica hasta la forma madura funcionalmente activa. En el mismo esquema se indican las sondas con las que explorar cada uno de los pasos de su biología. Basados en él comentaremos los datos mas relevantes en la actualidad de la biología de la (Na, K)-ATPasa

La (Na,K)-ATPasa es un enzima de la membrana plasmática de las células de mamifero. Y allí donde se ha descrito se ha presentado siempre el cliché común de un oligómero funcionante formado por la asociación de una subunidad alfa y una subunidad beta <sup>1</sup>. La subunidad alfa, un polipéptido de unos

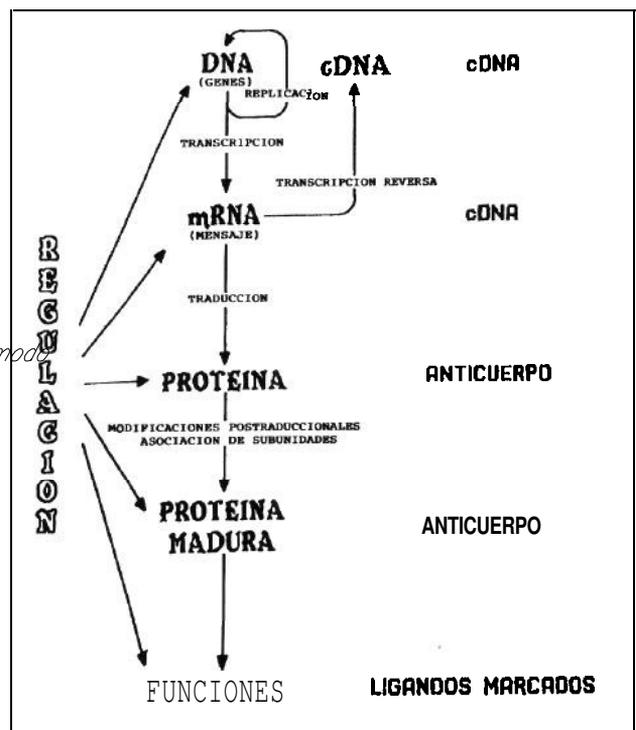


Fig. 1.—Esquema de la biogénesis de una proteína indicando las sondas que pueden ser utilizadas para el estudio de cada uno de los pasos que conducen desde el gen a la proteína funcionalmente activa.

100 kDa (fig. 2) de peso molecular, está implicada en los procesos de trasvase de iones sodio, potasio, magnesio, calcio <sup>2</sup> y protones <sup>3</sup> así como de la fijación de ATP y fosfato inorgánico. Además de las funciones implicadas en la «bomba de sodio», la subunidad alfa es el receptor de los glicósidos cardiotónicos <sup>4</sup>. La subunidad beta es un polipéptido glicosilado con un peso molecular de unos 55 kDa (fig. 2), que, aun siendo indispensable para el funcionamiento de la subunidad alfa, no parece estar implicada directamente en la actividad «bomba de so-

Correspondencia: Dr. Pablo Martín Vasallo.  
Laboratorio de Biología del Desarrollo.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
Universidad de La Laguna.  
Carretera Vieja de la Esperanza, s/n. La Laguna  
38206 Tenerife.

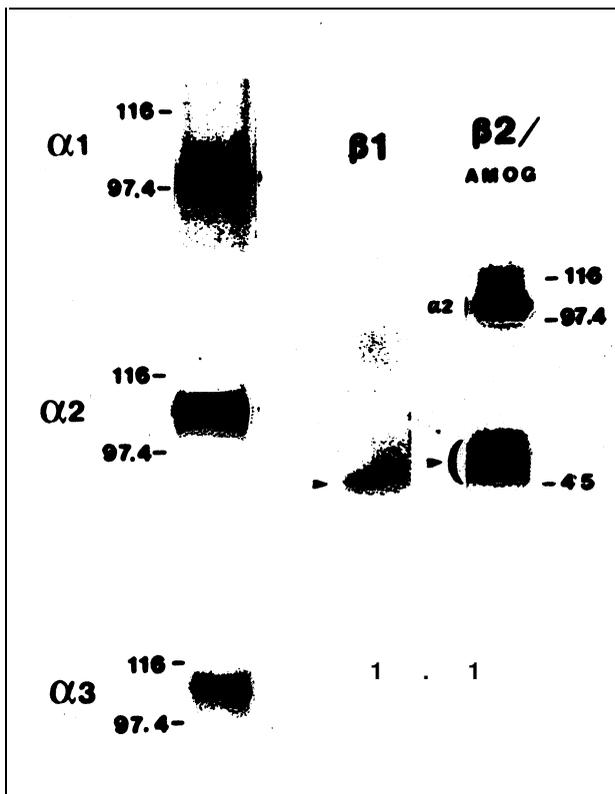


Fig. 2.- Inmunoblot que muestra los tamaños de cada una de las distintas isoformas de la (Na, K)-ATPasa. Los microsomas fueron obtenidos de epitelio ciliar de ojo y sondado con anticuerpos anti-alfa- 7 (15), anti-alfa-2 (1), anti-alfa-3 (52), anti-beta- 7 (48), anti-beta-2 (20). Estos resultados son parte de los publicados en la figura 3 de la referencia 47.

dio» como tal, pero sí con el ensamblaje del sistema en la membrana.

La variación en la sensibilidad a los glicósidos cardíacos que se presenta entre los tejidos de la misma especie ya hizo sospechar la existencia de formas distintas de la misma proteína.

Para confirmarlo se purificó (Na,K)-ATPasa de distintos tejidos y se generaron anticuerpos contra ellas, observándose que los anticuerpos generados contra la (Na,K)-ATPasa de un tejido inhiben la de los otros con una menor eficacia que la del tejido que se usó como antígeno <sup>1</sup>.

La historia escrita de la Biología molecular de la bomba de sodio comienza en el verano de 1985 con la publicación en Nature de dos artículos en los que se describen clones de cDNA que contienen la pauta de lectura completa que codifica la subunidad alfa de riñón de oveja <sup>5</sup> y la de la electroplaca del pez Torpedo californica <sup>6</sup>, poco más tarde la humana <sup>7</sup>.

La subunidad catalítica de la (Na,K)-ATPasa había sido clonada. La beta de los mismos tejidos y espe-

cies animales fue clonada algunas semanas más tarde. Al año siguiente, sus homónimas humanas y las de otras especies del reino animal <sup>6-12</sup>.

Una vez secuenciados los cDNAs de cualquier proteína se deduce su secuencia peptídica, y a partir de estos datos se predicen sus estructuras secundaria y terciaria, calculando las posibilidades que tienen determinadas zonas de incluirse en la membrana. De esta forma se ha elaborado el modelo de subunidad alfa como una proteína que contiene siete segmentos de estructura en hélice alfa que constituyen los siete dominios incluidos en la membrana plasmática (HI-H7) y ocho extracelulares. El lugar de fijación de glicósidos se encuentra en el dominio extracelular situado entre los dominios HI y H2; es por ello que este dominio es el más variable entre isoformas y entre especies de distinta sensibilidad a los glicósidos. La subunidad beta se ancla a la membrana con un solo dominio y en todas las especies en que se ha descrito se han encontrado conservados tres residuos de asparragina, adonde se unen las cadenas de polisacáridos que la caracterizan. Estos datos ya fueron revisados en *Nefrología* 1:7-15, 1989 <sup>13</sup>, donde se incluye una figura con la estructura de ambas subunidades.

### La bomba de sodio se transforma en una familia multigénica

La tecnología del DNA recombinante puso en evidencia a finales de 1986 la existencia de tres cDNAs con secuencias diferentes que codifican tres subunidades alfa diferentes en la misma especie animal, la rata <sup>14</sup>. Durante los años siguientes también se han clonado los correspondientes a éstos en las distintas especies, entre ellas la humana <sup>15</sup>. En todos los casos estos cDNAs son producto de tres genes distintos, no obtenidos mediante un fenómeno de *splicing* alternativo del mismo gen. Estas tres subunidades alfa, que difieren en estructura primaria, son las denominadas isoformas alfa-1, alfa-2 y alfa-3. Los genes que las codifican presentan unos patrones de expresión diferencial que varían según los tejidos, los grupos celulares dentro del mismo tejido y según las distintas etapas del desarrollo. Las señales precisas y específicas por las que cada célula o tejido expresa una isoforma y no otra son apenas conocidas en algunos casos. Las funciones específicas de cada isoforma empiezan a conocerse ahora. Además habría que añadir, a las incógnitas anteriores, la de las posibilidades de asociación de subunidades, es decir, asociaciones alfa-1 con beta-1, 2 ó 3, alfa-2 con beta-1, 2 ó 3 y alfa-3 con beta-1, 2 ó 3.

## Los mensajes

Una vez obtenidos los cDNAs se procedió a su utilización como sondas en *northern blots* que se elaboraron a partir de RNAs obtenidos de órganos de animales (incluida la especie humana) en distintas etapas del desarrollo. De este modo es posible determinar qué tejidos expresan los genes y como se regula el nivel de expresión en los estadios de la vida. Los lavados se realizaron siempre en las condiciones más severas: alta temperatura (65 °C), baja fuerza iónica (NaCl 15 mM, sodio citrato 1,3 mM, potasio monofosfato 1,3 mM y EDTA 0,1 mM) y detergente (SDS al 0,1%) durante al menos dos horas.

Utilizando como referencias los RNA ribosómicos (rRNA) 18s (1,9 kb) y 28s (4,7 kb) se determinaron los tamaños de los mRNA de cada una de las isoformas de las dos subunidades.

La **figura 3** ilustra cómo en todos aquellos tejidos en los que se expresa el gen de la isoforma alfa-1 lo hace con una sola especie de mRNA cuyo tamaño en la especie humana es de unas 4,5 kb <sup>16</sup>. La isoforma alfa-2 presenta dos especies de mRNA, una de aproximadamente 4,3 y otra de 6,0 kb <sup>16</sup>. El gen de la isoforma alfa-3 se expresa mediante un mRNA de 4,5 kb <sup>16</sup>.

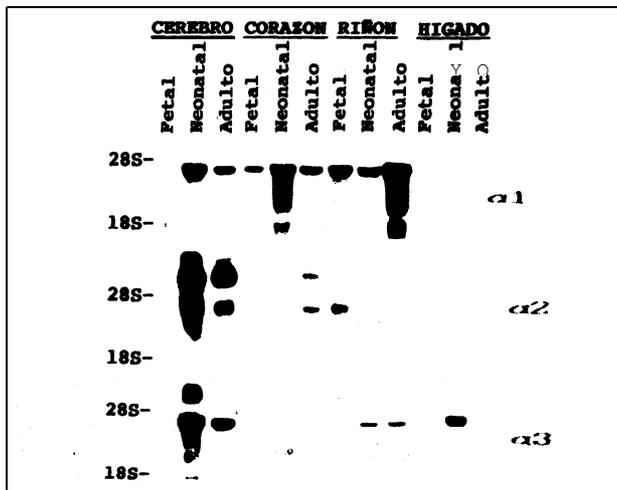


Fig. 3.-Northern blot de tejidos de rata. Se observan las distintas especies de mRNA de cada una de las isoformas de la subunidad alfa, la intensidad con que éstas se expresan en diversos tejidos y en tres etapas del desarrollo: fetal, neonatal y adulta. 28s y 18s señalan los dos tipos de RNA ribosómico que han servido como marcadores para establecer el tamaño de los transcritos.

La **figura 4** muestra cómo el gen de la isoforma beta-1, dependiendo del tejido y de la etapa del desarrollo, se expresa mediante varias especies de mRNA cuyo tamaño oscila entre 1,9 y 3,0 kb, en tanto que el de la beta-2 sólo presenta un mRNA de 3,4 kb <sup>17</sup>.

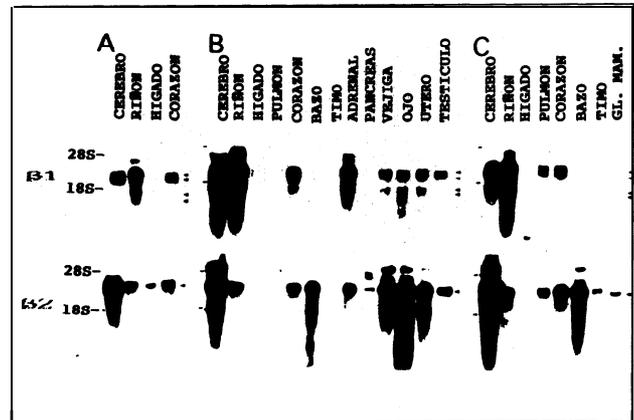


Fig. 4.-Northern blot de tejidos de rata. Se observan las distintas especies de mRNA de las dos isoformas conocidas de la subunidad beta de la (Na, K)-ATPasa, la intensidad con que éstas se expresan en diversos tejidos y en tres etapas del desarrollo: neonatal (2 días) (panel A), joven (2 semanas) (panel B) y adulta (2 meses) (panel C). 28s y 18s señalan los dos tipos de RNA ribosómico que han servido como marcadores para establecer el tamaño de los transcritos.

## Expresión diferencial de los isoenzimas

En las figuras 3, 4 y 5 se pueden observar los niveles de expresión en distintos tejidos y períodos del desarrollo de cada uno de los miembros de la familia génica que nos ocupa. Comentaremos algunos tejidos en particular <sup>16,17</sup>.

## Cerebro

Los RNA mensajeros de las tres isoformas de la subunidad alfa se expresan en el cerebro de los vertebrados adultos. Mediante el uso de anticuerpos monoespecíficos se han localizado las proteínas y se han establecido los patrones de distribución en los distintos órganos, grupos celulares y regiones subcelulares del sistema nervioso. Sus detalles están fuera del ánimo de esta revisión. Es interesante conocer que la alfa-1 de cerebro es inmunológicamente indistinguible de la de riñón y la alfa-2 de cerebro idéntica a la de músculo esquelético; sin embargo la alfa-3 hasta el momento sólo se ha encontrado en cerebro. Los cambios en la expresión de las subunidades alfa durante el desarrollo embrionario han sido bien estudiados en la rata: el embrión expresa solamente hasta el 13-14 día la isoforma alfa-1, según los márgenes de resolución actual. El próximo gen en expresarse es el de la alfa-2, hacia el día 18, y su gradiente de incremento en la expresión está claramente relacionado con el proceso de mielinización. La alfa-3 aparece por la misma fecha y su máxima proporción con respecto a las otras dos se alcanza hacia el 21 día fetal.

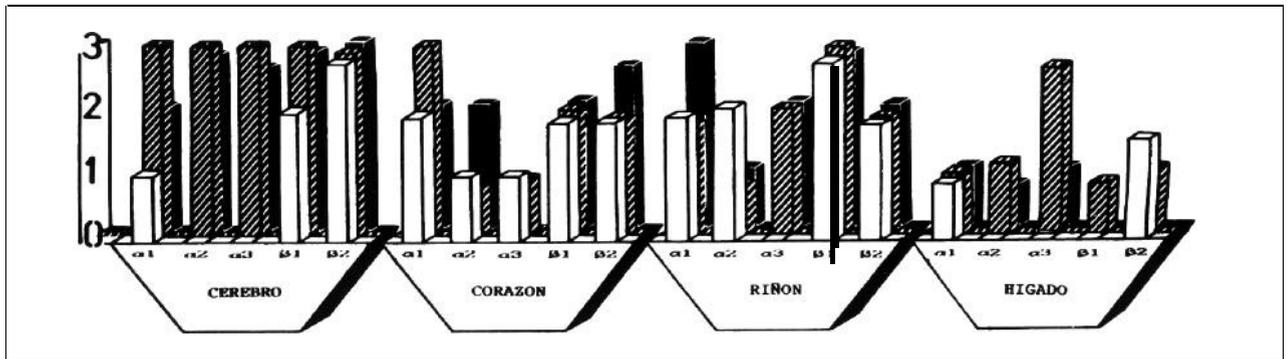


Fig. 5.—Diagrama de barras representando los niveles de expresión de las isoformas de las dos subunidades de la bomba de sodio en cerebro, corazón, riñón e hígado en tres periodos del desarrollo: feto, neonato y adulto. Las barras blancas corresponden al periodo fetal, las rayadas corresponden al neonatal y las negras al adulto.

### Corazón

El primer indicio de la existencia de dos formas distintas de (Na,K)-ATPasa en el corazón llegó con el conocimiento de las respuestas inotrópicas bifásicas a los efectos de los digitálicos. Confirmando estos datos, los análisis de expresión génica mediante *northern blots* indican que en el corazón adulto existen dos isoformas: la alfa-1 y la alfa-2, es decir, la forma más insensible a los glicósidos y la identificada como el receptor de las drogas digitálicas. En el corazón de feto de rata se encuentran las tres isoformas; la expresión de la alfa-3 decrece después del nacimiento hasta desaparecer por completo en el adulto.

### Riñón

Los estudios de fijación de ouabaína, cinética enzimática y análisis inmunológicos en las distintas regiones renales han proporcionado unos mapas claros de distribución de actividades de (Na,K)-ATPasa a lo largo de la nefrona; sin embargo, aún faltan estudios de identificación de isoformas en grupos celulares determinados y su correlación con el tipo de función realizada por éstas, así como de las posibles regulaciones a que pudiera estar sometida cada isoforma en particular. Como puede verse en las figuras 3 y 5, las isoformas alfa-1 y alfa-2 se expresan en el riñón del feto; rápidamente después del nacimiento se expresan las tres isoformas para permanecer de la misma forma durante toda la vida del adulto normal.

### Hígado

En el hígado del neonato y en el del adulto se expresan las tres isoformas de la subunidad alfa; no así en el del feto, que sólo se expresa la alfa-1. Sin embargo, existe una gran discrepancia respecto a los tipos de células en particular.

### Isoformas de la subunidad beta, su estructura y expresión diferencial

En 1986 se publican la secuencia del cDNA que codifica la llamada subunidad beta de la (Na,K)-ATPasa, su estructura primaria y su expresión diferencial en tejidos de rata y en líneas celulares derivadas del sistema nervioso central de la misma especie<sup>8,11</sup>. El análisis de los transcritos muestra distintos niveles de expresión en todos los tejidos estudiados, exceptuando el hígado, que al parecer carece de subunidad beta, extremo éste confirmado por los experimentos inmunohistoquímicos del grupo de Leffert<sup>18</sup>. Sin embargo, la bomba de sodio para funcionar necesita la subunidad beta en relación equimolecular con la subunidad alfa, y en el hígado se encuentran niveles intermedios de la isoforma alfa-1. Así pues, debería existir otra proteína congénere de la subunidad beta y con una función similar en lo que su colaboración en el sistema de transporte se refiere.

Usando como sonda el cDNA de la subunidad beta-1 de rata, en condiciones de baja astringencia, Martín Vasallo y cols. llevan a cabo el muestreo de una genoteca complementaria de hígado de feto humano y de cerebro de rata, aislándose clones que codifican una isoforma de la subunidad beta de la (Na,K)-ATPasa<sup>17</sup>.

La comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de los cDNAs humano y de rata con todas las secuencias almacenadas en el banco de datos de la National Biomedical Research Foundation mostró sólo similitud con las secuencias conocidas de la subunidad beta de la (Na,K)-ATPasa de las distintas especies animales. Por ello al polipéptido producto de este cDNA se le denominó beta-2 y los previamente caracterizados beta-1.

Esta isoforma beta-2 está constituida por 290 aminoácidos, 13 menos que la beta-1; posee también un solo dominio intramembrana y presenta siete puntos de glicosilación<sup>17</sup>.

El análisis de la expresión de los mRNAs de la subunidad beta se llevó a cabo con sondas específicas para las subunidades beta-1 y beta-2, hibridando secuencialmente blots que contenían RNA de tejidos de rata en tres estadios del desarrollo: dos días, dos semanas y ratas adultas (fig. 4). En la rata neonata (2 días), los transcritos de beta-2 son más abundantes en cerebro, mientras que la beta-1 es más abundante en riñón. En el hígado del neonato sólo se encuentran transcritos de beta-2; la beta-1 no se expresa. A las dos semanas la beta-1 sigue siendo la forma preponderante en riñón y la beta-2 en cerebro con niveles moderados de beta-1 que también se expresa dentro del mismo rango en corazón y glándulas suprarrenales y en el hígado en bajos niveles. En los tejidos del adulto, la beta-2 continúa siendo la forma predominantemente cerebral y la beta-1 predominantemente renal; las relaciones de los niveles en otros órganos están sujetas a variaciones no muy llamativas, a excepción del hígado, en el que no se aprecia expresión ni de beta-1 ni de beta-2. Estos patrones de expresión tan distintos entre isoformas sugieren que las diferentes formas de la subunidad beta pueden desempeñar roles especializados en los diferentes tejidos.

Aún no se ha encontrado una isoforma beta en el hígado adulto. Se han llevado a cabo varios sondeos y por distintos métodos, todos ellos sin éxito. Se ha descrito una subunidad beta-3 en *Xenopus*<sup>19</sup>; se trata de un péptido estructuralmente similar a los anteriores, pero con una secuencia primaria lo suficientemente distinta para confirmar que no se trata de ninguno de los conocidos; por ello sus autores la han denominado beta-3; sin embargo, no se ha encontrado su correspondiente en mamífero, a quien realmente debería denominarse beta-3.

### **La isoforma beta-2 es una molécula de adhesión (AMOG)**

La proteína de adhesión denominada AMOG (adhesion molecule on glia) se identificó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que bloqueaba la adhesión celular de astrocitos en cultivo. Dicha molécula es mediadora de la adhesión neuroglial en cultivo y en cortes de cerebelo y juega un papel trascendental durante el desarrollo de las conexiones astrocito-neurona<sup>20</sup>. El mismo anticuerpo fue usado para purificar la proteína por cromatografía de afinidad. A esta proteína de 46.000 daltones en geles de SDS se asocia otra proteína, en cantidades variables de 100.000 da; ambas proteínas coemigran con (Na,K)-ATPasa purificada de cerebro de rata. El análisis de péptidos tripticos identificó a la proteína como la isoforma beta-2 de la (Na, K)-ATPasa y tras clonar la proteína AMOG se demostró que ésta era la isoforma-2 de la subuni-

dad beta del mismo sistema<sup>21</sup>. El anticuerpo monoclonal que bloquea la adhesión célula-célula también estimula un 30% la captación de <sup>86</sup>Rb, un 30% de astrocitos en cultivo. El mecanismo por el cual un anticuerpo que bloquea la subunidad beta de la (Na,K)-ATPasa estimula la actividad de la bomba es todavía desconocido, pero, al menos, demuestra que este anticuerpo interacciona con la (Na,K)-ATPasa activa<sup>21</sup>. En definitiva, parece ser que la beta-2 juega un papel doble: como una subunidad de la (Na,K)-ATPasa, asociada a la alfa-2, y como un componente de la interacción célula-célula<sup>20</sup>. La secuencia de la beta-2 no es homóloga a la de otras proteínas de adhesión conocidas, aunque la aislada de ratón tiene el epítipo carbohidrato L3, común con otras proteínas de adhesión. De la proteína que actúa como receptor de beta-2/AMOG aún no se conoce nada.

### **Estudios de la estructura génica y asignación cromosómica**

Para aislar el gen de cualquier proteína se muestra una genoteca genómica utilizando como sonda el cDNA correspondiente (fig. 1) o un oligonucleótido sintético con la misma estructura que parte del extremo 5'-UT de este cDNA. Se secuencia y la comparación de la secuencia del gen con la de su cDNA correspondiente nos revelará los intrones y exones que lo componen, así como, en el caso de familias de proteínas, si proceden de varios genes, como es el caso de la (Na,K)-ATPasa o del splicing alternativo de intrones o determinadas secuencias intermedias de un solo gen, como en el caso de los más de noventa isoenzimas que forman la familia de las miisinas. Junto con las denominadas secuencias consenso que son comunes en la regulación de la expresión de muchos genes, tales como cajas TATA y CAAT y potenciales sitios de fijación para hormonas y factores implicados en los mecanismos de transcripción, deben delimitarse secuencias como la del promotor 0 promotores y otros elementos responsables de la especificidad de expresión tisular.

Este tipo de investigación constituye uno de los campos más atractivos de la Biología molecular actual, y así resulta apasionante la elección de un tipo de células o líneas celulares que expresen un determinado gen y otro tipo que lo reprima para, utilizando un gen «reporter», como el de la cloramfenicol acetil transferasa (CAT) o el de la luciferasa, establecer las razones de un grupo de células para decidirse por expresar o reprimir la expresión de un determinado gen.

De los genes de la (Na,K)-ATPasa quizá el mejor estudiado sea el de la alfa-2 humana, y solamente, por motivos de extensión, nos limitaremos a describir

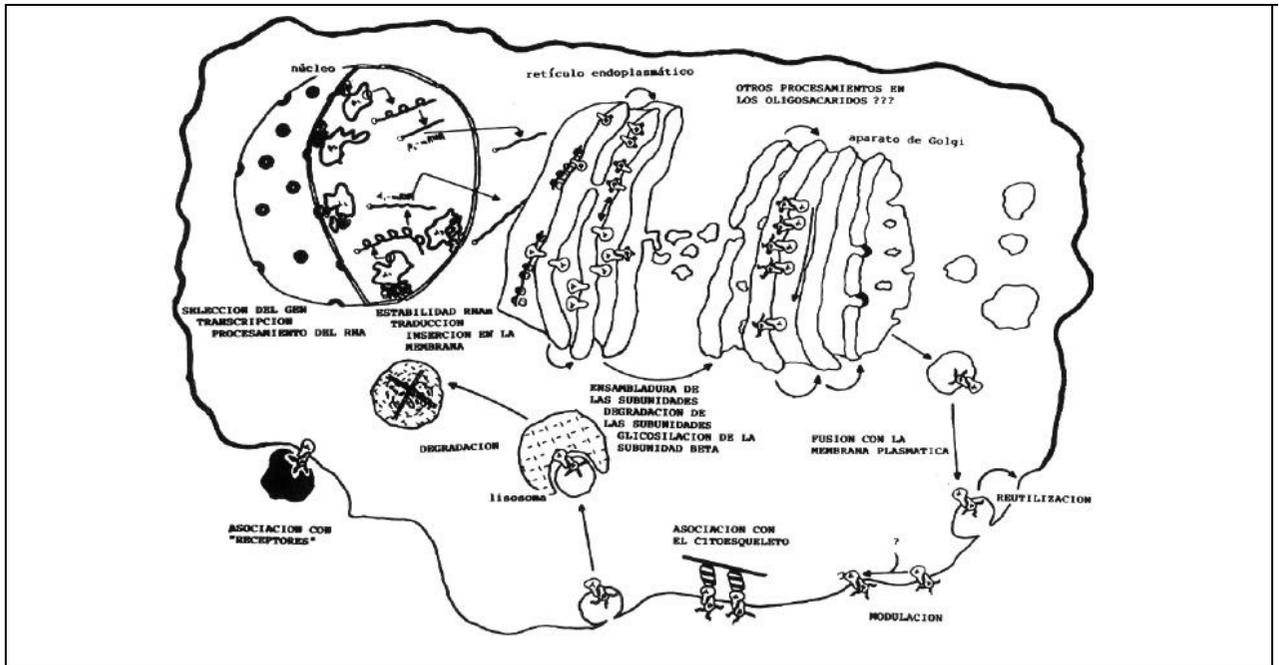


Fig. 6.-Diagrama de una célula representando las distintas etapas de la biología de la (Na,K)-ATPasa

éste. El gen que codifica la alfa-2 humana (ATPIA2) tiene un tamaño de 25 kilobases y está constituido por 23 exones. Ya se han descrito su promotor y determinadas secuencias fijadoras de glucocorticoides y hormonas tiroideas, así como de los factores AP-1, AP-2 y NF-1 y un lugar de reconocimiento de Sp-1. El sitio de comienzo de la transcripción en cerebro, músculo esquelético y corazón humanos se encuentra entre las bases -104 y -99 relativas al codón de comienzo de la traducción<sup>22,24</sup>. También se han descrito fragmentos de restricción polimórfica que serán útiles para estudiar patologías hereditarias<sup>22</sup>.

Haciendo células somáticas híbridas hamster-humanas y hamster-ratón y utilizando como sondas los cDNAs de las isoformas de hombre y de ratón se ha determinado la asignación de genes a cromosomas de estas especies. El gen de la alfa-1 se encuentra en el cromosoma 1 en el hombre y en el 3 del ratón; los de la alfa-2 y beta-1, en el cromosoma 1 del hombre y en el 1 del ratón; el gen de la alfa-3, en el 19 del hombre y en el 3 del ratón; el gen de la beta-2 se encuentra en el cromosoma 11 en el ratón. Aún se desconoce qué cromosoma humano lo contiene<sup>25,27</sup>.

La figura 6 ofrece una panorámica de la biogénesis de la (Na,K)-ATPasa en una célula modelo. En el núcleo y secundario a los efectos de una serie de factores tiene lugar la regulación de la expresión génica, seleccionándose unos u otros o todos los genes de las isoformas, en función del tejido o del período de

desarrollo, colaborando esto a conferir las características especiales de la célula en ambos casos. Los transcritos primarios, mRNA, se procesan, se eliminan los intrones y una vez en forma madura se transportan al citoplasma. Allí, poniendo en marcha la maquinaria de la traducción, se sintetizan los péptidos correspondientes; durante el proceso de traducción, ambas se van incluyendo en la membrana del retículo endoplásmico.

Sólo se ha demostrado existencia de señal SRP en el caso de la subunidad beta<sup>28</sup>. Experimentos elegantes de Noguchy y Kawamura<sup>29</sup> han demostrado que una de las funciones de la subunidad beta es servir como péptido señal para la inserción de la subunidad alfa en la membrana, y experimentos del laboratorio de K. Geering<sup>30</sup> en oocitos de *Xenopus* inyectados con cDNA de subunidades alfa y beta han puesto de manifiesto cómo las dos subunidades son interdependientes para su inserción: la alfa depende de la beta y viceversa. Durante el proceso de traducción el péptido de la subunidad beta se glicosila en forma no definitiva y ambos péptidos, un alfa y un beta, se asocian<sup>31</sup>. Asociados en este protómero alfa-beta se trasladan al aparato de Golgi, donde se procesan los oligosacáridos unidos a los residuos asparagina de la subunidad beta (postraduccional) y alcanzan su forma madura. La subunidad alfa pierde cinco aminoácidos del N-término. A continuación se desprenden vesículas que contienen formas maduras

y se integran en la membrana plasmática. Todo este proceso dura entre 10 horas y dos o tres días, dependiendo de qué célula se trate y de las necesidades de ese momento <sup>31</sup>. Diversas hormonas modulan esta velocidad de biosíntesis; las más importantes de las estudiadas hasta ahora parecen ser las tiroideas <sup>32,41</sup> la aldosterona <sup>35</sup>, los glucocorticoides <sup>34,36</sup> insulina <sup>37,38</sup> y catecolaminas <sup>39</sup> todas ellas, por supuesto, sólo en sus tejidos diana.

### Interacciones de la (Na,K)-ATPasa con el citoesqueleto

Hemos visto la variabilidad de la expresión de los genes de la (Na,K)-ATPasa en función del tipo de tejido, la asociación entre isoformas y su migración hasta la membrana plasmática. Sin embargo, en varios órganos y tejidos del organismo la expresión funcional de la (Na,K)-ATPasa no es suficiente para el desarrollo de la función celular normal. Este es el caso de las células polarizadas, donde la (Na,K)-ATPasa debe estar localizada en un dominio específico de la membrana plasmática<sup>40</sup>. Tal es el caso de los túbulos renales, donde una monocapa celular separa la luz tubular del flujo sanguíneo, y su función primordial es regular el transporte vectorial de agua y solutos entre ambos sistemas. El paso paracelular de estos iones y solutos está cortado por los sistemas de unión intercelular colocados entre los dominios apicales y basolaterales de la membrana plasmática. En el túbulo contorneado proximal, los canales de sodio y los sistemas de cotransporte están localizados en la membrana apical para captar rápidamente el sodio. Una vez dentro el sodio es bombeado a la sangre por la bomba de sodio de la membrana basolateral. La incorrecta localización de la (Na,K)-ATPasa en la membrana apical provoca patologías renales del tipo de la enfermedad poliquística <sup>41</sup> o daños isquémicos <sup>42</sup>.

La mayor parte de los estudios de distribución polar de (Na,K)-ATPasa se han llevado a cabo utilizando como modelo células epiteliales MDCK (Madin-Darby canine kidney) <sup>43</sup> y las hipótesis que han sido propuestas se pueden resumir en tres: a) la bomba se liga a un componente del citoesqueleto que la retiene en un dominio específico; b) las uniones tipo tight actúan como barreras en la bicapa lipídica para la difusión de las proteínas en los diferentes dominios; c) las proteínas recién sintetizadas hacen blanco en zonas específicas. Las proteínas del citoesqueleto que más han sido relacionadas con la distribución y posterior función de la (Na,K)-ATPasa han sido: ankirina y fodrina <sup>44,45</sup> formando además del tetrámero 2 (fodrina-ankirina) el complejo fodrina-ankirina-(Na,K)-ATPasa; y ovomorulina y fodrina, formando complejos ovomorulina-fodrina (Na,K)-ATPasa <sup>44,45</sup>. En

células eritroides se han descrito asociaciones con la espectrina <sup>45</sup>.

En epitelios de estructura celular más compleja, como es la bicapa que forma el epitelio ciliar del ojo, los estudios inmunohistoquímicos y los de expresión diferencial por zonas han revelado un gradiente de expresión de isoformas a lo largo de las distintas partes (pars plana, pars plicata y ora serrata) y asociaciones entre isoformas de las 2 subunidades, que está relacionado con la función específica de cada célula dentro de un órgano tan pequeño como puede ser el proceso ciliar del ojo, y con la misión común de secretar el humor acuoso <sup>15,46,48</sup>.

Aunque, como comentamos anteriormente, hay un mapa de actividades enzimáticas de (Na,K)-ATPasa a lo largo de la nefrona <sup>49</sup>, desafortunadamente aún no existen estudios de este mismo tipo a lo largo de las distintas partes de la nefrona que pudieran contribuir a conocer los pormenores de las funciones absortivo-secretoras del riñón y las implicaciones del mismo con algunas patologías.

### Patología molecular en la hipertensión arterial

La patología en la que más se ha estudiado la bomba de sodio en todos y cada uno de los pasos que se señalan en la [figura 1](#) de esta revisión es la hipertensión arterial esencial.

De la patología molecular de esta enfermedad caben destacarse dos contribuciones recientes <sup>50,51</sup>. En la primera se señala una modulación diferente en la expresión isoforma-específica de la subunidad alfa de la (Na,K)-ATPasa en aorta, corazón y músculo esquelético de ratas hipertensas en relación a la de ratas que no lo son <sup>50</sup>. El artículo <sup>51</sup> describe por vez primera una mutación puntual del gen de alfa-1 <sup>51</sup> en ratas modelo para el estudio de algunas hipertensiones. En ratas Dahl resistentes a la sal, la glutamina 276 de la isoforma alfa-1 es sustituida por leucina en las ratas sensibles a la sal, todo ello consecutivo a la mutación de la timina1079 por adenina <sup>51</sup>. Este hecho se hace más interesante al comprobar que esta sustitución se realiza en el dominio que parece estar implicado en el manejo del sodio por la (Na,K)-ATPasa.

### Agradecimientos

Los autores de este trabajo reciben financiación para el estudio de la regulación de la expresión de las isoformas de la (Na,K)-ATPasa del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Sanidad y Consumo, proyecto 90/0046, y de la Consejería de

Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias, proyecto 92/08.03.90. L. M. G. M. es becario del Programa de Formación de Personal en Investigación del FIS.

## Bibliografía

- Sweadner KJ: Isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochimica Biophysica Acta* 988:185-220, 1989.
- Martin Vasallo P y Post RL: Calcium ion as a probe of the monovalent cation center of sodium-potassium ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 261:1 6957-16962, 1986.
- Post RL, Seiler SM y Martin Vasallo P: Action of hydrogen ions on sodium adenosine triphosphatase labelled with fluorescein. *En Perspectives of Biological Energy Transduction*. Academia Press. Eds. Mukoha Y, Fleischer S y Nakao M. 273-283, 1987.
- Anner BM: The receptor function of Na,K-activated adenosine triphosphatase system. *Journal of Biochemistry* 227:1-11, 1985.
- Shull GE, Schwartz A y Lingrel JB: Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na,K)-ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* 316:691-695, 1985.
- Kawakami K, Noguchi S, Noda M, Takahashi H, Ohta T, Kawamura M, Nojima H, Inayama S, Hayashida H, Miyata H, y Numa S: Primary structure of the alpha subunit of Torpedo californica (Na,K)-ATPase deduced from cDNA sequence. *Nature* 316:733-736, 1985.
- Kawakami K, Oht T, Nojima H y Nagano K: Primary structure of the alpha subunit of human (Na,K)-ATPase. *Journal of Biochemistry* 100:389-397, 1986.
- Shull GE, Lane LK y Lingrel JB: Amino-acid sequence of the beta subunit of the Na,K-ATPase deduced from cDNA. *Nature* 321 : 429-431, 1986.
- Brown TA, Horowitz B, Miller RP, McDonough AA y Farley RF: Molecular cloning and sequence analysis of the (Na,K)-ATPase beta-subunit from dog kidney. *Biochemistry Biophysica Acta* 912:244-253, 1987.
- Kawakami K, Nojima H, Ohta T y Nagano K: Molecular cloning and sequence analysis of human Na,K-ATPase. *Nucleic-Acids Research* 147:2833-2844, 1986 .
- Mercer RW, Schneider JW, Savitz A, Emanuel JR, Benz EJ y Levenson R: Rat brain Na,K-ATPase beta chain gene; primary structure, tissue-specific expression, and amplification in ouabain-resistant H6La C+ cells. *Molecular Cellular Biology* 6:3884-3890, 1986.
- Ovchinnikov YA, Modyanov NN, Aldanova NA, Monastyrskaya GS y Sverdlov ED: Pig kidney (Na,K)-ATPase. Primary structure and spatial organization. *FEBS Lett* 201 :237-245, 1986.
- Martin Vasallo P: Biología molecular, biogenesis y regulación de la bomba de sodio. *Nefrología* 7:7-15, 1989.
- Shull GE, Gree J y Lingrel JB: Molecular cloning of three distinct forms of the Na,K-ATPase alpha subunit from the rat brain. *Biochemistry* 25:8125-8132, 1986.
- Martin Vasallo P, Ghosh S y Coca-Prados M: Expression of Na,K-ATPase alpha subunit isoforms in the human ciliary body and cultures ciliary epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 141:243-252, 1989b.
- Emanuel JR, Garetz S, Stone L y Levenson R: Differential expression of Na,K-ATPase alpha and beta-subunit mRNAs in rat tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9030-9034, 1987.
- Martin Vasallo P, Dackowski W, Emanuel JR y Levenson R: Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit: primary structure and tissue, specific expression. *Journal of Biological Chemistry* 264:4613-4618.
- Schenk DB, Hubert JJ y Leffert HL: Use of monoclonal antibody to quantify Na,K-ATPase activity and sites in normal and regenerating rat liver. *Journal Biology Chemistry* 259:14941 - 14951, 1984.
- Good PJ, Richter K y Dawid IB: A nervous system-specific isotope of the beta subunit of Na,K-ATPase expressed during early development of *Xenopus laevis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 87:9088-9092, 1990, 1989a.
- Gloor S, Antonicek H, Sweadner KJ, Pagliusi S, Frank R, Moos M y Schachner M: The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *Journal of Cell Biology* 110:165-174, 1990.
- Antonicek H, Persohn HE y Schachner M: Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *Journal of Cell Biology* 104:1587-1595, 1987.
- Shull MM, Pugh DG y Lingrel JB: Characterization of the human Na,K-ATPase alpha-2 gene and identification of intragenic restriction fragment length polymorphisms. *The Journal of Biological Chemistry* 264:17532-17543, 1989.
- Pathak BG, Pugh DG y Lingrel JB: Characterization of the 5-flanking region of the human and rat Na,K-ATPase alpha-3 gene. *Genomics* 8:641-647, 1990.
- Lingrel JB, Orłowski J, Price EM, y Pathak BG: Regulation of the alpha-subunit genes of the Na,K-ATPase and Determinants of cardiac glycoside sensitivity. *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. JH Kaplan y P De Weer, editors. The Rockefeller University Press, New York, 1-16, 1991.
- Kent RB, Fallows DA, Geissler E, Glaser T, Emanuel JR, Lalley PA, Levenson R y Housman : Genes encoding the alpha and beta subunit of Na,K-ATPase are located on three different chromosomes in the mouse. *Proc Natl Academy Sciences USA* 84:5369-5373, 1987 .
- Yang-Feng TL, Schneider JW, Lindgren V, Shull MM, Benz EJ, Lingrel JB y Francke U: Chromosomal localization of human Na,K-ATPase alpha and beta-subunit genes. *Genomics* 2:128-138, 1988.
- Malo D, Schurr E, Levenson R y Gros P: Assignment of Na-K-ATPase beta-2 subunit gene (atpb-2) to mouse chromosome 11. *Genomics* 6:697-699, 1990 .
- Geering K: Biosynthesis, membrane insertion and maturation of Na,K-ATPase. *En Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 268B. The Na,K-Pump. Part B: Cellular Aspects. JC Skou, JG Norby, AB Maunsbach y M Esmann, editors. Alan R. Liss, Inc., New York, 19-33, 1988.
- Kawamura M y Noguchi S: Possible role of the beta-subunit in the expression of the sodium pump. *En The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. JH Kaplan y P De Weer, editors. The Rockefeller University Press, New York, 45-61, 1991.
- Geering R: Posttranslational modifications and intracellular transport of sodium pumps: importance of subunit assembly. *En The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. JH Kaplan y P De Weer, editors. The Rockefeller University Press, New York. 31-43, 1991.
- Fambrough DM, Wolitzky BA, Taormino JP, Tamkun MM, Takeyasu K, Somerville D, Renaud KJ, Lemas MV, Lebovitz RM, Kone BC y cols.: A cell biologist's perspective on sites of Na,K-ATPase regulation. *En The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. JH Kaplan y P De Weer, editors. The Rockefeller University Press, New York, 17-30, 1991.
- Horowitz B, Quintero M y McDonough AA: Thyroid hormone regulates mRNA levels of Na,K-ATPase alpha-1, alpha-2, and beta subunits in a tissue specific manner. *Journal Cell Biology* 107:126a.
- Chaudhury S, Ismail-Beigi F, Gick GG, Levenson R y Edelman IS: Effect of thyroid hormone on the abundance of Na,K-ade-

- nosina triphosphatase alpha-subunit messenger ribonucleic acid. *Molecular Endocrinology* 1:83-89, 1987.
34. Orłowski J, y Lingrel JB: Thyroide and glucocorticoid hormones regulate the expression of multiple Na,K-ATPase genes in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 265:3462-3470, 1990.
  35. Barlet-Bas C, Khadouri C, Marsy S y Doucet A: Sodium-independent in vitro induction of Na,K-ATPase by aldosterone in renal target cells: Permissive effect of triiodothyronine. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1707-1711, 1988.
  36. Rayson BM y Edelman IS: Glucocorticoid stimulation of Na,K-ATPase in superfused distal segments of kidney tubules in vitro. *American Journal of Physiology* 243:F463-F730, 1982.
  37. Lytton J, Lin JC y Guidotti G: Identification of two molecular forms of Na,K-ATPase in rat adipocytes. Relation of insulin stimulation of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 260:1177-1184, 1985.
  38. Brodsky JL: Insulin activation of human Na,K-ATPase is mediated by alpha-2 form of enzyme. *American Journal of Physiology* 258:C812-C817, 1990b.
  39. Swann AC y Steketee JD: Subacute noradrenergic agonist infusions in vivo increase Na,K-ATPase and ouabain binding in rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* 52:1598-1604, 1989.
  40. Rodríguez-Boulán E y Nelson WJ: Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 254:718-725, 1989.
  41. Wilson PD y Hreniuk D: Altered polarity of Na,K-ATPase in epithelia with a genetic defect and abnormal basement membrane. *Journal of Cell Biology* 105:176a. (Abstr.), 1987.
  42. Molitoris BA, Chan LK, Shapiro JI, Conger JD y Falk SA: Loss of epithelial polarity: a novel hypothesis for reduced proximal tubule Na transport following ischemic injury. *Journal of Membrane Biology* 107:119-127, 1989.
  43. Caplan MJ, Palade GE y Jamieson JD: Newly synthesized Na,K-ATPase alpha-subunit has no cytosolic intermediate in MDCK cells. *The Journal of Biological Chemistry* 261:2860-2865, 1986.
  44. Marchesi VT: Stabilizing infrastructure of cell membranes. *Annual Review of Cell Biology* 1:531-562, 1985.
  45. Nelson WJ, Hammerton RW y McNeill H: Role of the Membrane-cytoskeleton in the spatial organization of the Na,K-ATPase in polarized epithelial cells. En *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. JH Kaplan y P De Weer, editors. The Rockefeller University Press, New York, 77-87, 1991.
  46. Ghosh S, Freitag AC, Martín Vasallo P y Coca-Prados M: Cellular distribution and differential gene expression of the three alpha subunit isoforms of the Na,K-ATPase in the ocular ciliary epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 265:29352940, 1990.
  47. Coca-Prados M, Martín Vasallo P, Hernando N y Ghosh S: Cellular distribution and differential expression of the Na,K-ATPase alpha isoforms (alpha-1, alpha-2, alpha-3), beta-1, and beta-2/AMOG genes in the ocular ciliary epithelium. En *The Sodium Pump: Recent Developments*. Editores: JH Kaplan y P De Weer. The Rockefeller University Press, New York, 157-163, 1991.
  48. Ghosh S, Hernando N, Martín-Alonso JM, Martín-Vasallo P y Coca Prados M: Expression of multiple Na,K-ATPase genes reveals a gradient of isoforms along the nonpigmented ciliary epithelium. Functional implications in aqueous humor secretion. *The Journal of Cellular Physiology* 149:184-194, 1991.
  49. Katz AI: Distribution and function of classes of ATPases along the nephron. *Kidney Int* 29:21-31, 1986.
  50. Herrera VLM, Chobanian AV y Ruiz-Opazo N: Isoform-specific modulation of Na,K-ATPase alpha-subunit gene expression in Hypertension. *Science* 241:221-223, 1988.
  51. Herrera VLM y Ruiz-Opazo N: Alteration of alpha-1 Na,K-ATPase 86Rb+ influx by a single amino acid substitution. *Science* 249:1023-1026, 1990.
  52. Levenson R, Emanuel JR, Martín Vasallo P y Shyjan AW: The Na,K-ATPase gene family: structure, function, and tissue-specific expression. En *Regulation of Potassium Transport Across Biological Membranes*. Editores: Reuss L, Russel JM y Szabo G. Univ. of Texas Press, 1:39-162, 1989.