

Biología molecular, biogénesis y regulación de la bomba de sodio

P. Martín Vasallo *

Department of Cell Biology. Yale University Medical School.

El gran desarrollo que ha experimentado la biología molecular durante la última década ha hecho posible el entendimiento de la expresión y regulación génicas y de la función celular hasta un nivel molecular que previamente estaba vedado a nuestras posibilidades. Los dos tipos de tecnologías más importantes han sido los conocidos genéricamente como DNA recombinante y genética celular somática; ambos están siendo aplicados extensivamente tanto en células procarióticas como eucarióticas, incluidas las humanas. Mediante procedimientos de DNA recombinante se ha conseguido la clonación de DNAs encargados de codificar una determinada proteína. Mediante técnicas de genética celular somática, la pieza de genoma disecada ha sido transfectada a otras células distintas, las cuales han sido sometidas a selección darwiniana para en las supervivientes estudiar las funciones desconocidas y sus mecanismos de regulación.

Al estudiar un determinado gen o grupo de genes las preguntas que se han planteado han sido: a) ¿qué gen contiene la información para el mensaje de esta proteína, cuál es su estructura y cuál es la secuencia de la proteína que codifica?; b) ¿tiene isoformas?; c) ¿en qué cromosoma está localizado?; d) ¿qué tejidos lo expresan y cuáles lo tienen reprimido?; e) ¿cómo se lleva a cabo su traducción y cuáles son sus modificaciones postraduccionales?; f) ¿cómo se regula su expresión?

Uno de los sistemas genéticos cuyo estudio se ha visto beneficiado por el uso de dichas tecnologías ha sido la (Na, K)-ATPasa, también conocida como bomba de sodio-potasio o bomba de sodio. En el presente trabajo se revisa la biogénesis y regulación de dicho sistema de transporte, así como sus homologías funcionales y estructurales con otros mecanismos de transporte iónico junto con los que pudo evolucionar de un antepasado molecular común.

Información general sobre la bomba de sodio

La (Na, K)-ATPasa es una enzima que se encuentra en la membrana plasmática de las células animales; intercambia tres iones sodio intracelulares por dos iones potasio extracelulares a expensas de la energía obtenida de la hidrólisis del ATP; de esta forma genera gradientes de concentración. Por medio de este sistema la célula mantiene la estabilidad osmótica y un medio interno rico en potasio óptimo para la función de varias enzimas. Está implicada en las labores de excreción y reabsorción en epitelios especializados, como los túbulos renales¹ y el epitelio ciliar del ojo², en el proceso de regeneración ósea³ y en la generación de potenciales eléctricos usados en la conducción del impulso nervioso y en la contracción muscular. Esta diferencia de potencial provee de energía a los sistemas de co y contratransporte implicados en la captación de glucosa, protones y calcio, entre otros. Para generar estos gradientes de concentración, la bomba de sodio trabaja mediante un ciclo de fosforilación-defosforilación en el cual la enzima alterna entre dos estados conformacionales diferentes. En presencia de sodio el enzima E se estabiliza en la llamada forma E1, que acepta un grupo fosfato del complejo Mg-ATP, y en presencia de potasio en la conformación E2, que puede ser fosforilada por fosfato inorgánico. Así pues, el equilibrio entre las formas E1 y E2 depende de las concentraciones de sodio y potasio.

Los tejidos más ricos en bomba de sodio son aquellos con una actividad alta de transporte de sodio y potasio. Entre los tejidos de mamífero, el más usado es la médula roja exterior del riñón. El procedimiento común para obtener (Na, K)-ATPasa es el denominado de Jørgensen y la preparación de enzima así obtenida muestra dos bandas en gel de poliacrilamida-SDS, conocidas como alfa y beta, subunidades de 100 kDa y 55 kDa, respectivamente. Todos los llamados ligandos fisiológicos, sodio, potasio, magnesio y ATP, interaccionan con la subunidad alfa. Entre las drogas que han sido usadas para investigar en el sistema, los esteroides cardiactivos constituyen el grupo más importante, y de ellos el más ampliamente usado es la ouabaína, el único que cristaliza, hidrosoluble y fácil de purificar. La ouabaína se fija a la

* Profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna. Islas Canarias.

Correspondencia: Dr. Pablo M. Vasallo.
Department of Cell Biology.
Yale University School of Medicine.
333 Cedar Street, P.O. Box 3333
New Haven, Conn. 06510. USA.

subunidad alfa e inhibe la actividad enzimática y el transporte catiónico mediado por la bomba de sodio. Como veremos más tarde, su importancia también ha sido crucial en los estudios de la biología celular y molecular de este sistema de transporte.

La relación entre el número de copias de subunidades alfa y subunidades beta presentes en la membrana plasmática es de 1:1; asociándose una alfa con una beta, también se han sugerido asociaciones secundarias de este protómero, como tetrámeros o alfa-beta diprotómeros. Otra cuestión relacionada es cuántas unidades estructuralmente asociadas se necesitan para formar una bomba de sodio funcionante; a esto se ha propuesto denominarlo «interacción» y aún necesita una respuesta definitiva.

Las subunidades alfa y beta: sus estructuras e isoformas

La subunidad alfa. La secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa se ha deducido a partir de sus cDNAs, obtenidos mediante screening de librerías en fagos lambda gt11 de riñones de oveja⁴ y de cerdo⁵, de la placa eléctrica del *Torpedo californica*⁶, de células HeLa⁷ y de cerebro de rata⁸. El rastro de la librería de cerebro de rata mostró la existencia de tres isoformas denominadas alfa, alfa (+) y alfa III. La existencia de estas tres isoformas fue reportada simultáneamente por dos grupos distintos^{8,9}, apareciendo con nomenclatura distinta: a la isoforma alfa también se la denomina alfa-1 y es resistente a la ouabaína; la alfa (+) es también conocida como alfa-3 y es sensible a la ouabaína; el sinónimo de la isoforma alfa-III

es alfa-2, de la que no se conoce ninguna propiedad bioquímica específica. La tabla I muestra algunas características moleculares de las tres isoformas y en su leyenda algunas características importantes de sus homologías. Usando programas de computador basados en el procedimiento de Kyte y Doolittle¹⁰ se han obtenido los patrones de hidropatía-hidrofobicidad, se han deducido sus estructuras secundarias y las posibles regiones incluidas dentro de la membrana. Las regiones hidrofóbicas, incluidas en la membrana, presentan un mayor grado de homología que las hidrofílicas, donde se hallan los sitios de fijación de los ligandos. Un modelo se muestra en la figura 1.

La subunidad beta. También han sido aislados clones de DNA complementario que codifican las subunidades beta de riñón de oveja¹¹, perro¹², cerdo⁵, células HeLa¹³, cerebro de rata¹⁴, pollo y de la placa eléctrica del *Torpedo californica*¹⁵. A diferencia de la subunidad alfa, no se conoce ninguna función en la que esté implicada esta subunidad. Todas las subunidades clonadas poseen una sola región hidrofóbica que se encuentra incluida en la membrana y tres dominios de N-glicosilación situados extracelularmente ligados a residuos de asparagina¹⁶. Algunas de sus características moleculares y un modelo se representan en la tabla I.

Las isoformas. La existencia de formas moleculares distintas de la (Na, K)-ATPasa se había sospechado basándose en las diferentes sensibilidades a la ouabaína mostrada en distintos tejidos y en distintas especies animales. En 1856, Vulpian descubrió que los sapos eran muy poco sensibles a los efectos tóxicos de los digitálicos, y en 1965, Repke mostró que los

Tabla I. Algunas características moleculares de las subunidades clonadas. Asn-N.º: indica el número de residuo de asparagina al que se encuentran ligados los polisacáridos de la subunidad beta. El número de aminoácidos que constituyen las distintas subunidades beta varía entre 302 y 303 en los mamíferos y aves y 305 en la de *Torpedo californica*. Las homologías a nivel de secuencia de nucleótidos entre la misma isoforma en las distintas especies varía entre el 80 y el 90 %; estos porcentajes son más altos al nivel de secuencia de aminoácidos. La homología, como en la mayor parte de las proteínas, es siempre mayor entre la misma isoforma en las distintas especies animales que entre las distintas isoformas de la misma especie.

Especie	Subunidad alfa		Subunidad beta	
	N.º de residuos	Peso molecular (Dalton)	Peso molecular (Dalton)	Asn-N.º
Oveja	1.016	112.177	34.937	157, 192, 264
Cerdo	1.016	112.235	34.958	157, 192, 264
Humana	1.023	112.894	35.061	158, 193, 265
Torpedo	1.022	112.424	34.671	114, 159, 194, 267
Rata alfa-1	1.018	112.575		
Rata alfa-2	1.015	111.736	34.639	159, 194, 268
Rata alfa-3	1.013	111.727		
Perro			35.027	157, 192, 264
Pollo				159, 194, 266

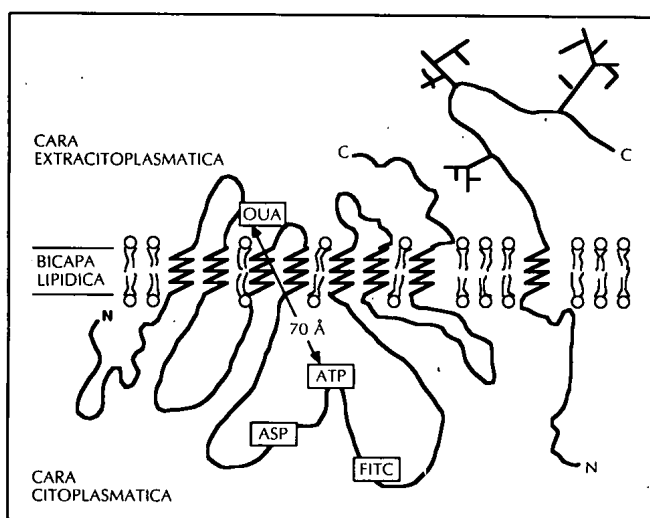


Fig. 1.—Modelos propuestos para las subunidades alfa y beta de la (Na, K)-ATPasa, basados en las secuencias deducidas de sus DNAs complementarios. El polipéptido alfa presenta siete dominios incluidos en la bicapa lipídica, posiblemente formando estructuras alfa-hélice. ASP indica el residuo aspártico aceptor de fosfato ATP. FITC y OUA (ouabaína) indican los lugares de fijación de tales compuestos. La subunidad beta presenta un solo dominio de membrana y tres residuos polisacáridos en la región extracelular de la proteína, unidos mediante enlaces N-glicosídicos a tres residuos de asparagina.

tejidos del sapo son unas cuatrocientas veces y la rata unas treinta veces menos sensibles que los del gato, por ejemplo. También se sabía que la enzima de corazón de embrión de rata es sensible a la ouabaína y después no lo es en el estado adulto, lo cual da una pista para sospechar la existencia de dos genes con patrones de expresión distinta según el período del desarrollo. Posteriormente se vio que dos células nerviosas, el astrocito y la neurona, reaccionan de diversa forma al ser expuestas a los efectos de la ouabaína: el astrocito incrementa su volumen y la neurona no. Y desde el punto de vista cinético, la enzima obtenida de cerebro muestra dos sitios de fijación con dos diferentes afinidades. Finalmente, Sweadner¹⁷ separó en gel de poliácridamida dos formas moleculares de la subunidad alfa con diferente movilidad electroforética presentes en el cerebro de varias especies animales. La afinidad por los glicósidos cardíacos de las isoformas hizo que a la más sensible se la denominara alfa (+), presente en el axolema de los nervios mielinizados con peso molecular de 94 kDa, y a la de menor sensibilidad se la llamó alfa, de 92 kDa, presente en astrocitos. La alfa, también denominada alfa-1, es similar a la que se encuentra en el riñón; por ello se la denomina isoforma «kidney like».

Fambrough y Bayne¹⁸ separaron una inmunoglobulina segregada por el hibridoma 24 que reconoce como antígeno a la subunidad beta de la (Na, K)-ATPasa de neurona, músculo y túbulo renal de pollo.

Por técnicas inmunohistoquímicas se vio que la distribución del antígeno seguía la membrana basolateral de los túbulos renales y la de la glándula salada de la gaviota, habiendo un igual número de sitios de fijación de anticuerpo que de ouabaína tritiada. En contraste, los fibroblastos, células de Schwann y células endocapilares tienen más sitios de fijación de ouabaína que de anticuerpo, mostrando que hay, al menos, dos ATPasas antigénicamente distintas. Sweadner y Gilkeson¹⁹ han obtenido anticuerpos específicos inmunizando conejos con enzima de axolema de cerebro de rata y de riñón de perro; estos anticuerpos reaccionan específicamente con las isoformas alfa y alfa (+) en «western blots» y presentan reactividad cruzada entre las dos isoformas en vaca, oveja, cobaya, perro, hombre, conejo y rana. Otro anticuerpo importante en la comprensión de la biología de la bomba de sodio ha sido el denominado 9-5A por el grupo de Leffert²⁰, que observa un predominio en el número de bombas en la cara canalicular de los hepatocitos respecto a las caras sinusoidal y lateral, así como variaciones en la relación entre actividad enzimática y número de bombas en la fase pre-replicativa tardía de la regeneración hepática.

El uso de los anticuerpos ha sido crucial para la selección de los clones positivos durante los screening de las librerías de cDNA.

Tras haber sido demostrada la existencia de tres isoformas distintas de la subunidad alfa se han construido sondas específicas para cada isoforma, mostrando que en el ratón se encuentran localizadas en tres cromosomas distintos²¹ y, por consiguiente, son productos de tres genes distintos y no fruto de un «splicing» alternativo. Los «northern blots» preparados con RNA de diversos tejidos de rata⁹ han indicado que los patrones de expresión presentan una especificidad de tejido; así, la isoforma alfa-1 se expresa en todos los tejidos estudiados y la alfa-2 se expresa en cerebro y corazón fetal. El gen de la alfa-3 transcribe dos mRNAs de tamaños diferentes; uno de ellos se expresa sólo en corazón, cerebro y músculo esquelético; el otro se expresa ampliamente en todos los tejidos estudiados. Los distintos patrones de expresión de las isoformas indican que el mismo sistema pudiera tener funciones especializadas en los distintos tejidos o que las distintas isoformas están sometidas a sistemas de regulación funcional diversa.

Usando como sonda el cDNA que codifica la subunidad beta de rata para el estudio de su expresión en diversos tejidos del mismo animal se ha encontrado hibridación con el RNA obtenido de corazón, testículos, pulmón, riñón, cerebro y vejiga urinaria, pero no se detectó en hígado¹⁴; sin embargo, la relación entre la cantidad de péptido alfa y péptido beta es 1:1; si esta relación es mayor cuando comparamos los niveles de mRNA respectivos puede ser un indicativo de la existencia de una isoforma distinta de la sub-

unidad beta, pero por el momento los resultados de esta búsqueda son negativos.

La bomba de sodio como receptor de glicósidos cardiotónicos

La sensibilidad de la ouabaína. El efecto terapéutico de las plantas digitálicas ha sido conocido durante siglos; actualmente se sabe que es debido a su efecto inotrópico. Schatzmann y Skou demostraron que los esteroides cardiactivos inhiben el intercambio de potasio y la actividad (Na, K)-ATPasa²². La ouabaína forma un complejo inhibido que aún mantiene su capacidad para ser fosforilado por fosfato inorgánico y estabilizarse en la conformación E2, como lo hace en presencia de iones potasio²³. Así pues, a la ouabaína se la puede considerar como un competidor funcional del potasio. Se fija a una porción hidrofílica extracelular de la subunidad alfa y, aunque no se conoce el lugar exacto, se conoce la distancia en relación al lugar de fijación de ATP²⁴, y la región más plausible pudiera ser la situada entre los dominios H1-H2 y H3-H4⁸, basándose en las diferentes afinidades por la ouabaína y la diversidad en la secuencia de aminoácidos entre las isoformas alfa-1 y alfa-3.

El porqué las células animales tienen receptores a sustancias vegetales no se conoce. ¿Qué tienen ambas en común? Posiblemente nada. Esta misma pregunta se planteó para los receptores opiáceos y la respuesta fueron las endorfinas, opiáceos endógenos. Probablemente también haya glicósidos endógenos para regular el sistema, pero la respuesta a esta cuestión está fuera del ánimo de esta revisión.

La resistencia a la ouabaína. El hecho de que haya tejidos y especies animales con diversas afinidades por los glicósidos hizo pensar en variedades intrínsecas de la estructura primaria de la proteína o bien la existencia de un modulador intrínseco.

Para estudiar las características genéticas y moleculares de esta diversidad de afinidades, el grupo de Levenson²⁵ transfectó cromosomas de células NIH-3T3 (una línea fibroblástica murina resistente a la ouabaína) detenidas en metafase a la línea CV-1 (de riñón de mono, sensible a la ouabaína). Las células así transformadas adquirieron el fenotipo de resistencia a la ouabaína. La selección se llevó a cabo mediante crecimiento en un medio rico en ouabaína. Los clones celulares que sobrevivieron se aislaron y caracterizaron, observándose que mantuvieron el fenotipo estable durante varias generaciones aun en ausencia de ouabaína, sugiriendo esto una expresión de la isoforma resistente, la alfa-1, cuya presencia determina la diversidad de sensibilidades entre las distintas especies animales. Para comprobar este hecho, el clon de cDNA que contenía la información genética de la alfa-1 se insertó en un vector de expresi-

ón y se transfectó a células CV-1, sometiéndolas a selección por ouabaína²⁶. Un «northern blot» con RNA de las células transfectadas mostró la presencia de mRNA específico de alfa-1 al ser sondeado con el correspondiente cDNA, confirmando este hecho la hipótesis anterior.

Biogénesis de la (Na, K)-ATPasa

Biosíntesis de los polipéptidos alfa y beta. Los modelos celulares elegidos para llevar a cabo este tipo de estudios han sido: células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)^{27, 28}, neuronas sensoriales de pollo^{16, 18} y larvas en desarrollo de camarón^{29, 30}. Para estos estudios se han utilizado anticuerpos específicos, técnicas fluorográficas y experimentos de pulso-caza en los que se alimentaba las células con metionina marcada con azufre-35. La síntesis de ambos polipéptidos tiene lugar en los polisomas fijados a la membrana, insertándose contraduccionalmente en la membrana del retículo endoplásmico; la velocidad de síntesis es similar en ambas, variando entre tres y cuarenta horas, dependiendo del tipo de célula. El precursor de la subunidad alfa posee cinco aminoácidos más que son cortados antes de llegar a la forma madura. Cuando los experimentos de seguimiento de la síntesis se llevan a cabo en células tratadas con tunicamicina (inhibidor específico de la N-glicosilación), la subunidad alfa no muestra diferencias en el peso molecular, pero el de la beta es un 30 % más bajo (32 kDa). La endoglicosidasa-H rompe los enlaces entre el primero y segundo residuos aminoglicosídicos; cuando se hace una digestión por ella del polipéptido beta, el análisis posterior del polipéptido demuestra tres residuos de manosa, indicando tres puntos diferentes de glicosilación, que, como se vio antes, parten de tres residuos de asparagina situados en la porción extracelular. El tránsito a través de las distintas organelas intracelulares hasta alcanzar su posición en la membrana plasmática no se ve afectado por las modificaciones en la glicosilación. El viaje a través de las organelas de las proteínas que se anclan en membranas puede ser inhibido por monensina. El uso combinado de este compuesto con los dos anteriores ha ayudado a descifrar cómo la subunidad beta, tras ser glicosilada contraduccionalmente (paso inhibible por tunicamicina) por residuos de manosa, es desglicosilada poco más tarde para, cuando alcanza el aparato de Golgi, ser glicosilada de nuevo en forma diferente (paso inhibible por monensina) antes de alcanzar su posición definitiva en la membrana plasmática. También parece que en determinados tipos de células la inserción del polipéptido alfa en el retículo endoplásmico se ve condicionada por la presencia previa de la subunidad beta, es decir, que ésta le serviría de señal para su inserción³¹.

Ensamblaje de subunidades, transporte e integración en la membrana plasmática. Tamkun y Fambrough²⁹, usando un anticuerpo monoclonal contra la subunidad beta, han demostrado que ambas subunidades coprecipitan incluso a períodos tan breves como de quince minutos, sugiriendo que ambas subunidades se ensamblan inmediatamente después de sus síntesis. El resultado es el mismo en presencia de tunicamicina, lo cual indica que los residuos glicosídicos no son necesarios para la asociación de subunidades o el transporte intracelular. La velocidad de tránsito desde el aparato de Golgi y la membrana plasmática parece estar más relacionada con el tipo de célula que con las características de una proteína en particular; por ejemplo, en las neuronas sensoriales de pollo suele ser de unos cuarenta y cinco minutos hasta la membrana del soma y de tan sólo diez para llegar al cono de crecimiento, quizá debido a un transporte previo intraneurítico. Esto está en desacuerdo con la teoría de Small y cols.³², que postulan que las proteínas se insertan primero en la membrana plasmática del soma y después difunden lateralmente hasta alcanzar sus posiciones definitivas. El porcentaje de (Na, K)-ATPasa libre en el citoplasma es de un 30 % en neurona sensorial de pollo, del 60 % en miotúbulo de pollo³³ y de un 50 % en células HeLa³⁴. Nada se sabe de su precisa localización ni de cuál puede ser su posible papel mientras está en tránsito hacia la membrana o cómo, en el caso de las células polarizadas, se dirige siempre a una cara o región específica de la membrana de plasmática.

Degradación. La degradación se realiza mediante internalización de piezas de membranas según un proceso de primer orden y que necesita energía. Los trozos de membrana son transportados a los lisosomas, donde son digeridos. Mediante este sistema la célula elimina de la membrana las bombas de estructura incompleta o defectuosa. Dependiendo de la complejidad de la célula, el proceso dura entre diez horas y tres o cuatro días.

Regulación

La regulación de los estados dinámicos de la (Na, K)-ATPasa cuando se encuentra incluida en la membrana plasmática es uno de los campos más excitantes y en controversia en nuestros días. Se consideran dos formas de regulación: primera, enzimática, de la eficacia catalítica del sistema, y segunda, genética, mediante mecanismos de «up y down-regulation» de su expresión génica. Los estudios han sido conducidos por dos caminos: variaciones en las concentraciones extracelulares de potasio e influencias hormonales.

Las células en fase estacionaria expuestas «in vitro» a medios de cultivo con concentraciones de po-

tasio por debajo de los límites normales responden de forma rápida con un incremento de la eficacia catalítica de la enzima que inmediatamente rebaja las concentraciones intracelulares de sodio y potasio para poco después llevarlas a sus límites normales³⁵. Cuando esto sucede en células en fases activas de crecimiento responden con una forma típica de «up-regulation» con una estimulación en la expresión del gen aumentando la cantidad de proteína funcionando³⁶.

La regulación hormonal de la bomba de sodio se lleva a cabo principalmente por la aldosterona y las hormonas tiroideas. Los sistemas usualmente empleados para comprobar los efectos de la aldosterona son la vejiga del sapo y células ventriculares de corazón de pollo; en ambos incrementa el número de bombas en la membrana³⁷ de dos formas distintas: primera, aumentando la concentración intracelular de sodio, y segunda, favoreciendo la expresión del gen de (Na, K)-ATPasa mediante un incremento de la síntesis de mRNA específico. Las hormonas tiroideas estimulan la actividad (Na, K)-ATPasa³⁷ y regulan los distintos grados de expresión durante la diferenciación celular y el desarrollo y maduración tisulares³⁸. Las muestras para estos estudios se recogen de animales de experimentación normales o hipotiroideos y de sus crías a distintos estadios de desarrollo, comprobando las variaciones en la sensibilidad a las hormonas y sus efectos.

También se ha demostrado un efecto activador de la insulina sobre la bomba de sodio y que tiene especificidad tisular³⁹; el efecto es patente en adipocito y célula muscular, pero ausente en hígado. Teniendo en cuenta la distribución tisular de las isoformas, se ha sugerido que la alfa-3 es la forma regulada por esta hormona. Bajo los efectos de la insulina, la célula incrementa la captación de potasio como resultado de un aumento de la afinidad de la enzima por el sodio. Para observar estos efectos la célula debe estar intacta; cuando se obtienen trozos de membrana de células tratadas con insulina no se observan modificaciones de la actividad (Na, K)-ATPasa.

El diacilglicerol y los forbolésteres, que disparan los mecanismos dependientes de la protein-kinasa C, también poseen un efecto estimulador del sistema, de forma y efectos todavía no bien caracterizados⁴⁰.

Homología con otras ATPasas

Tan pronto como se conoce la estructura primaria de una proteína se compara con otras en busca de homología que pudieran indicar su descendencia de un antepasado común, ya sea de forma convergente o divergente. En el caso de la (Na, K)-ATPasa es razonable buscar homología entre la subunidad alfa y otras ATPasas encargadas de otros sistemas de trans-

porte catiónico a través de la formación de un fosfointermediario; tal es el caso de la Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico⁴¹, la (H, K)-ATPasa de las células parietales gástricas⁴², la ATPasa de la membrana plasmática de levadura²⁷, la Kdp-ATPasa de *Escherichia coli*⁴³ y otras ATPasas encargadas de mantener los gradientes catiónicos y protónicos en diversos organismos que posteriormente veremos. Las llamadas H-ATPasas de la mitocondria y de los cloroplastos son realmente ATP sintasas, que funcionan a la inversa y que no recuerdan a las enzimas anteriormente citadas ni en estructura ni en función.

La Ca-ATPasa de la membrana del retículo sarcoplásmico usa la energía liberada del ATP para extraer del citoplasma del miocito dos iones calcio durante la relajación muscular. Está formada por un solo polipéptido de 997 aminoácidos y 110 kDa de peso molecular⁴¹, embebida de forma asimétrica en la membrana del retículo sarcoplásmico. La enzima de músculo estriado de conejo ha sido clonada, su estructura primaria deducida y demostradas dos isoformas, producto de dos genes independientes que se expresan de forma específica en el músculo de contracción lenta o en el de contracción rápida; un defecto genético en la expresión del gen que codifica la Ca-ATPasa del músculo de contracción rápida parece ser el responsable de la miopatía conocida como enfermedad de Brody.

La (H, K)-ATPasa del sistema túbulo-vesicular de la célula parietal gástrica es un polipéptido de 1.033 aminoácidos con un peso molecular de 114 kD⁴² y es la encargada de acumular dos iones potasio electroneutralmente en el citoplasma en intercambio por dos protones segregados a expensas de la energía de la hidrólisis de una molécula de ATP.

El procarionte *E. coli* posee una membrana citoplasmática interna y otra externa, separadas por un peptidoglicano y el llamado espacio periplásmico. La acumulación de potasio dentro del citoplasma se lleva a cabo por dos sistemas diferentes, situados ambos en la membrana interna: la Trk y la Kdp-ATPasa. En condiciones normales el sistema Trk es suficiente para mantener el medio adecuado y el Kdp está reprimido. Pero cuando el Trk es incapaz de mantener la concentración de potasio adecuada, como sucede durante el crecimiento o cuando el potasio en el entorno es bajo, la Kdp-ATPasa se expresa intensamente. La Kdp consiste en tres péptidos codificados por tres genes diferentes, el llamado operón KdpABC. La proteína producto del gen KdpB también ha sido clonada⁴³, su estructura primaria deducida y posee una secuencia fosforilable, de 90 kDa de peso molecular. Similar a ésta y con idéntica función es la K-ATPasa que se encuentra en la única membrana plasmática del *Streptococcus faecalis*⁴⁴.

Las membranas plasmáticas de las células de las plantas y de los hongos poseen una ATPasa que

transporta protones hacia el exterior, alcalinizando el medio interior, medio requerido para llevar a cabo el crecimiento, generando a la vez gradientes, que a través de los adecuados sistemas de cotransporte son utilizados para la captación de nutrientes. La H-ATPasa de levadura ha sido clonada²⁷ y está constituida por un polipéptido de 918 aminoácidos, de 99,5 kDa de peso molecular. Asimismo, la H-ATPasa de *Neurospora crassa* consta de 920 aminoácidos y tiene un peso molecular de 100 kDa; su secuencia también ha sido deducida del cDNA^{45, 46}.

El polipéptido alfa de la (Na, K)-ATPasa y los descritos anteriormente pueden ser divididos en tres regiones: la N-terminal, el dominio de transducción de energía y la C-terminal. La hipótesis del disparo para la inserción de una proteína en la membrana requiere la existencia de un N-término hidrofóbico de al menos 20 aminoácidos. En todas estas proteínas dicho extremo es altamente hidrofílico, lo cual va en contra de tal posibilidad. Los porcentajes de homología encontrados entre los distintos segmentos N-terminales de las ATPasas son bajos. El C-término parece ser la región fijadora de cationes a transportar; por ello en esta zona es donde se encuentran las mayores diferencias entre las ATPasas. Los mayores grados de homología se encuentran entre las regiones denominadas de transducción de energía. Esta región incluye: a) el residuo aspartato aceptor del fosfato; b) el sitio de fijación de FITC (fluorescein isotiocianato)²⁴; c) sitio de fijación de ouabaína y sus derivados fotoactivos, y d) sitio de fijación de nucleótidos (ATP).

Desde hace tiempo se sabía que el residuo aspartato aceptor del fosfato era común a todas estas ATPasas. Ocupa una posición que varía del 369 en las enzimas de oveja y cerdo a 376 en el de *Torpedo californica*; en esta región todas las (Na, K)-ATPasas tienen una total homología durante una secuencia próxima a 100 aminoácidos. En las isoformas alfa-1, alfa-2 y alfa-3 de rata ocupa las posiciones 371, 366 y 369, respectivamente. La secuencia próxima al grupo aceptor fosfato —Asp-Lys-Thr-Gly-Thr— es común a todas las ATPasas. El sitio de fijación del FITC, una lisina, ocupa, por ejemplo, la posición 501 en la (Na, K)-ATPasa de oveja y es el quinto de una secuencia de dieciséis común a todas ellas. En esta región se encuentra el sitio de fijación de los nucleótidos²⁴; aún no se conoce cuál es el aminoácido o aminoácidos directamente implicados. El segmento comprendido entre los aminoácidos 191 y 198 de la Ca-ATPasa de músculo de contracción rápida se ha sintetizado y caracterizado como un posible sitio de fijación de calcio⁴⁷. Como la (Na, K)-ATPasa puede fijar calcio en el lugar de fijación de los cationes monovalentes⁴⁸, cuando buscamos por homología de ese segmento en la secuencia deducida el resultado fue negativo.

Estos datos, junto con los obtenidos mediante proteólisis y marcaje covalente de ligandos sintéticos, hacen sospechar que hubo una ATPasa antepasado común de todas ellas, que posiblemente fuera una bomba de protones y que posteriormente evolucionó hacia el transporte de sodio, potasio y calcio.

Perspectivas

La biología molecular, la inmunología y los estudios genéticos nos han dado evidencias de la existencia de tres isoformas de la bomba de sodio y nos han ayudado a comprender su biogénesis y expresión. Pero de ello han surgido nuevas preguntas: ¿Para qué quiere la célula tener tres isoformas distintas que desarrollan la misma función? ¿Cuáles son sus diferencias funcionales? ¿Es un solo tipo de subunidad beta la que se combina con las distintas alfas? ¿O ¿existen otras isoformas hasta ahora no descubiertas? ¿Por qué en el caso de las células polarizadas, como las de los túbulos renales, epitelio ciliar, etc., siempre emigra para colocarse en la misma cara y no a otra diferente?

Las anteriores cuestiones se están abordando mediante la formación de anticuerpos contra péptidos sintéticos construidos exactos a dominios específicos. Mutaciones puntuales, cambiando de aminoácido en aminoácido y construcción de quimeras entre los diferentes DNAs (parte de un gen y parte de otro) y observando diferencias funcionales. Expresar ambas subunidades en organismos que no expresan la bomba de sodio, como las levaduras, esto podría aumentar nuestro conocimiento acerca de la asociación de subunidades y dar ideas acerca de un posible papel de la subunidad beta. La (Na, K)-ATPasa es sólo un ejemplo de las posibilidades de estas técnicas en el conocimiento de la fisiología molecular de los distintos sistemas de los organismos vivos, así como su utilidad para sentar las bases moleculares de una gran variedad de desórdenes genéticos y que, tarde o temprano, conducirá a un mecanismo de terapia de genes.

Bibliografía

- Katz AI: Distribution and function of classes of ATPases along the nephron. *Kidney Int* 29:21-31, 1986.
- Baron R, Neff CR, Boisvert A y Caplan M: Evidence for a high and specific concentration of Na, K-ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. *Cell* 46:311-320, 1986.
- Coca-Prados M y López-Briones LG: Evidence that the alpha and the alpha (+) isoforms of the catalytic subunit of (Na, K)-ATPase reside in distinct ciliary epithelial cells of the mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 155:460-466, 1987.
- 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.
- Ovchinnikov YA, Modyanov NN, Bruode NE, Petrukhin KE, Grishin AV, Arzamanova NM, Aldanova NA, Monastyrskaya GS y Sverdlov ED: Pig kidney (Na, K)-ATPase. Primary structure and spatial organization. *FEBS Lett* 201:237-245, 1986.
- 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, Ohta T, Nojima H y Nagano K: Primary structure of the alpha subunit of human (Na, K)-ATPase. *J Biochem* 100:389-397, 1986.
- Shull GE, Greeb 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.
- Herrera VL, Emanuel JR, Ruiz-Opazo N, Levenson R y Nadal-Guindard B: Three differentially expressed Na, K-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications. *J Cell Biol* 105:1855-1865, 1987.
- Kyte J y Doolittle RF: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132, 1982.
- 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. *Biochem Biophys 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, Scheneider JW, Savitz A, Emanuel JR, Benz tJ y Levenson R: Rat brain Na, K-ATPase beta chain gene: primary structure, tissue-specific expression, and amplification in ouabain-resistant HeLa C+ cells. *Mol Cell Biol* 6:3884-3890, 1986.
- Norgaard A, Kjeldsen K y Clausen T: Potassium depletion decreases the number of 3H-ouabain binding sites and the active Na-K transport in skeletal muscle. *Nature* 293:739-741, 1981.
- Tamkun MM y Fambrough DM: The Na, K-ATPase of chick sensory neurons. Studies of biosynthesis and intracellular transport. *J Biol Chem* 261:1009-1019, 1986.
- Sweadner K: Two molecular forms of Na, K-ATPase in brain. Separation and difference in affinity for strophanthidin. *J Biol Chem* 254:6060-6067, 1979.
- Fambrough DM y Bayne E: Multiple forms of (Na, K)-ATPase in the chicken. Selective detection of the major nerve, skeletal muscle, and kidney form by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 258:3926-3935, 1983.
- Sweadner K y Gilkeson RC: Two isozyme of the Na, K-ATPase have distinct antigenic determinants. *J Biol Chem* 260:9016-9022, 1985.
- Schenk DB, Hubert J y Leffert HL: Use of a monoclonal antibody to quantify Na, K-ATPase activity and sites in normal and regenerating rat liver. *J Biol Chem* 259:14941-14951, 1984.
- Kent RB, Fallows DA, Geissler E, Glaser T, Emanuel JR, Lally PA, Levenson R y Housman D: Genes encoding the alpha and beta subunit of Na, K-ATPase are located on three different chromosomes in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5369-5373, 1987.
- Glynn IM: The Na-K transporting adenosine triphosphatase. En *The enzymes of Biological Membranes*. Editor Martonosi AN. Plenum Press. New York, 2.ª edición, 35-114, 1985.
- Charnock JS y Post RL: Evidence of the mechanism of ouabain inhibition of cation activated adenosin triphosphatase. *Nature* 199:910-911, 1963.
- Carilli CT, Farley RA, Perlman DM y Cantley LC: The active

- site structure of the Na and K stimulated ATPase. Location of a specific fluorescein isothiocyanate reactive site. *J Biol Chem* 257:5601-5606, 1982.
25. Fallows DM, Kent RB, Nelson DL, Emanuel JR, Levenson R y Housman DH: Chromosome mediated transfer of the murine Na, K-ATPase confers ouabain resistance. *Mol Cell Biol* 7:2985-2987, 1987.
 26. Kent RB, Emanuel JR, Neriah YB, Levenson R y Housman DH: Ouabain resistance conferred by expression of cDNA for murine Na, K-ATPase alpha subunit. *Science* 237:901-903, 1987.
 27. Serrano R, Kielland-Brand C y Fink GR: Yeast plasma membrane ATPase is essential in growth and has homology with (Na, K)-, K- and Ca-ATPases. *Nature* 319:689-693, 1986.
 28. Sherman J, Morimoto T y Sabatini DD: Biosynthesis of the Na, K-ATPase in MDCK cells. *Curr Top Membr Transport* 19:753-764, 1983.
 29. Fisher JA, Baxter-Lowe LA y Hokin LE: Site of synthesis of the alpha and beta subunits of the Na, K-ATPase in brine shrimp nauplii. *J Biol Chem* 261:515-519, 1984.
 30. Nabi N, Sherman J, Sabatini DD y Morimoto T: Biosynthesis of rat brain Na, K-ATPase. *J Cell Biol* 97:117a, 1983.
 31. Kawakami K y Nagano K: The transmembrane segment of the human Na, K-ATPase beta-subunit acts as the membrane incorporation signal. *J Biochem* 103:54-60, 1988.
 32. Small RK, Blank M, Ghez R y Pfenninger KH: Components of the plasma membrane of growing axons. II. Diffusion of membrane protein complexes. *J Cell Biol* 98:1434-1443, 1984.
 33. Wolitzki B y Fambrough DM: Regulation of the Na, K-ATPase in cultured chick skeletal muscle. Modulation of expression by the demand for ion transport. *J Biol Chem* 261:9990-9999, 1986.
 34. Cook JS: *Regulation and development of membrane transport processes*. Editor Graves JS, John Wiley and Sons. New York, pp. 4-19, 1985.
 35. Pressley TA, Haber RS, Loeb JN, Edelman IS e Ismail-Beigi F: Stimulation of Na, K-ATPase and active transport by low external K in a rat liver cell line. *J Gen Physiol* 87:591-606, 1986.
 36. Pressley TA y Edelman IS: Reduced ouabain inhibition of the Na, K-activated ATPase in cultured cells recipients of the ouabain resistance gene. *J Biol Chem* 261:9779-9786, 1986.
 37. Kim D y Smith TW: Effects of thyroid hormone on sodium potassium sites, sodium content, and contractile responses to cardiac glycosides in cultured chick ventricular cells. *J Clin Invest* 74:1481-1488, 1984.
 38. Lin MH y Akera T: Increased Na, K-ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatment. *J Biol Chem* 253:723-726, 1978.
 39. Lytton J; Lin JC y Guidotti G: Identification of two molecular forms of Na, K-ATPase in rat adipocytes. *Relation to Insulin Stimulation of the Enzyme* 260:1177-1184, 1985.
 40. Vara F, Schneyder JA y Rozengurt E: Ionic responses rapidly elicited by activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2384-2388, 1985.
 41. MacLennan DH, Brandl CJ, Korczack B y Green NM: Amino acid sequence of the Ca-Mg dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316:696-700, 1985.
 42. Shull MM y Lingrel JB: Molecular cloning of the rat stomach (H, K)-ATPase. *J Biol Chem* 261:16788-16791, 1986.
 43. Hesse JE, Wiczorek L, Altendorf K, Reicin AS, Dorus E y Epstein W: Sequence homology between two membrane transport ATPase, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4746-4750, 1984.
 44. Hugentobler G, Heid I y Solioz M: Purification of the putative K-ATPase from *Streptococcus faecalis*. *J Biol Chem* 258:7611-7617, 1983.
 45. Addison R: Primary structure of the *Neurospora* plasma membrane H-ATPase deduced from the gene sequence. Homology to Na/K-, Ca-, and K-ATPases. *J Biol Chem* 261:14896-14901, 1986.
 46. Hager KM, Mandala SM, Davenport JW, Speicher DW, Benz EJ y Slayman CW: Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7693-7697, 1986.
 47. Gangola P y Shamoo AE: Synthesis and characterization of a peptide segment of (Ca, Mg)-ATPase. A candidate for calcium transport site. *J Biol Chem* 261:8601-8603, 1986.
 48. Martín-Vasallo P y Post RL: Calcium ion as a probe of the monovalent cation center of sodium, potassium ATPase. *J Biol Chem* 261:16957-16962, 1986.