

CAPÍTULO I

Introducción general y objetivos

1. PROPIEDADES GENERALES DE LAS COLINESTERASAS

1.1. Introducción

Las colinesterasas (ChEs) son las enzimas responsables de la rápida eliminación del neurotransmisor acetilcolina liberado en las sinapsis colinérgicas. De esta manera colaboran en el establecimiento de un control preciso y temporal de la contracción muscular. Han transcurrido algunos años desde que Dale postulara su existencia en 1914 {Dale & Ewins 1914 333 /id} y Otto Loewi demostrara en 1920 que la acetilcolina era el probable neurotransmisor de las uniones neuromusculares en vertebrados. Posteriormente, la detección en 1938 por Mamay y Nachmansohn de altas concentraciones de acetilcolinesterasa (AChE) en dichas uniones neuromusculares y en los órganos eléctricos de Torpedo y Electrophorus {Mamay & Nachmansohn 1938 356 /id} asentó el papel de esta enzima en los mecanismos de transmisión colinérgica.

Actualmente las colinesterasas figuran entre las enzimas más rápidas que se conocen, con una velocidad de catálisis próxima al límite máximo teórico impuesto por la difusión molecular del sustrato. Muestran un gran polimorfismo molecular que engloba formas solubles y formas unidas a la membrana y a la lámina basal. La expresión de las colinesterasas in vivo y la distribución de sus formas moleculares constituyen un importante índice de desarrollo y diferenciación celular.

A pesar de que su función más conocida es la hidrólisis de acetilcolina, la presencia de AChE en contextos ajenos a las sinapsis colinérgicas y la existencia de una enzima hermana, la butirilcolinesterasa (BuChE), sugieren la implicación de las colinesterasas en otras funciones. Se han acumulado evidencias que sustentan un posible papel estructural además del catalítico para estas enzimas, como la presencia de un motivo similar al de colinesterasas en una familia de proteínas, que incluye tanto a esterasas como a moléculas de adhesión celular.

1.2. Métodos de detección de colinesterasas

En base a su alta eficiencia catalítica, se han diseñado diferentes métodos de ensayo para localizar las moléculas de AChE y BuChE en los tejidos. Estos incluyen procedimientos histoquímicos y los procedimientos que utilizan ligandos dirigidos al centro activo de la enzima.

El método colorimétrico de Ellman (1961) {Ellman, Courtney, et al. 1961 A091 /id} es el utilizado comúnmente para medir la actividad enzimática de AChE y BuChE, junto con el método radiométrico de Johnson y Russell (1975){Johnson & Russell 1975 1086 /id}. El primero utiliza derivados tioanálogos de los sustratos de estas enzimas (acetiltiocolina o butiriltiocolina), que son hidrolizados para dar el correspondiente acetato o butirato y liberar tiocolina. La tiocolina reacciona con el ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB), para dar un producto coloreado amarillo que puede ser medido en espectrofotómetro.

El ensayo radiométrico es más sensible y específico, ya que usa el sustrato natural de la enzima, acetilcolina marcada con ^{14}C o ^3H , produciendo la liberación del correspondiente acetato (o butirato) marcado, que puede ser cuantificado mediante espectroscopía de centelleo líquido.

Existen diferentes métodos para la localización histoquímica de colinesterasas en secciones de tejido o en células intactas, muchos de los cuales están basados en procedimientos desarrollados por Koelle y Friedenwald (1949) {Koelle & Friedenwald 1949 200 /id} y Karnovsky y Roots (1964) {Karnovsky & Roots 1964 1088 /id}. En estos procedimientos se emplean sustratos de tiocolina bajo condiciones en las que la tiocolina liberada reacciona con sales de metales para dar lugar a un precipitado denso visible al microscopio.

Las técnicas autorradiográficas también son de gran ayuda en la localización de las colinesterasas en los tejidos.

El uso de anticuerpos monoclonales y policlonales en ensayos inmunohistoquímicos permite localizar y comparar las diferentes formas enzimáticas en los tejidos.

El diisopropildifluorofosfato (**DFP**) es un compuesto organofosforado que reacciona covalentemente con el centro activo de AChE y BuChE, así como de cualquier serín proteasa. Este inhibidor irreversible ha sido usado para estimar, a nivel ultraestructural, el número y distribución de las moléculas de AChE en músculo {Salpeter 1967 1099 /id}{Rogers, Darzynkiewicz, et al. 1969 3838 /id}.

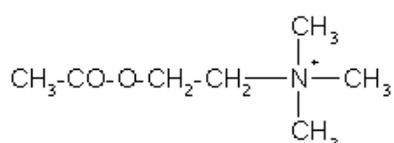
Pero además del DFP, existe un gran número de inhibidores de las colinesterasas con diferentes propiedades, que suponen una gran ayuda para estudiar la síntesis, ensamblaje y procesamiento de las moléculas de ChE en las células. Así, el DFP posee la capacidad de atravesar la membrana plasmática e inhibir totalmente la actividad AChE; en cambio el ecotiopato y el BW284c51 son incapaces de franquear la membrana. Por otra parte, mientras que el ecotiopato inhibe irreversiblemente a la AChE, el BW284c51 ejerce una inhibición reversible. Su uso por separado o combinado ha permitido analizar el comportamiento metabólico de las moléculas de AChE intra- y extracelulares {Rotundo 1987 505 /id}.

En definitiva, el conjunto de métodos disponibles para la detección de AChE ha facilitado el estudio de su estructura molecular, biología celular, interacciones y localización con gran detalle, permitiendo que la AChE se convierta en un marcador idóneo del desarrollo y diferenciación. A pesar de todo, aún quedan muchas preguntas sin contestar, en lo que atañe a su amplia distribución en los tejidos, mecanismo catalítico, polimorfismo molecular, síntesis y transporte de las diferentes moléculas a distintos compartimentos celulares. También es importante dilucidar si los cambios experimentados por las colinesterasas en ciertas patologías son causa o consecuencia de las mismas.

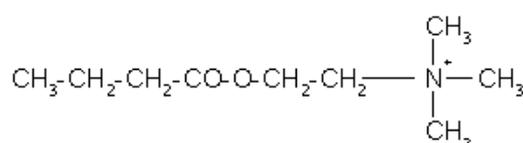
1.3. Definición y especificidad

Las colinesterasas se definen por su capacidad para hidrolizar a los ésteres de colina más rápidamente que a cualquier otro sustrato, cuando se comparan las velocidades de hidrólisis en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y fuerza iónica en preparaciones libres de otras esterasas, así como por su inhibición por el alcaloide natural fisostigmina (o eserina, un carbamato) y por organofosfatos, como el diisopropilfluorofosfato (DFP) antes mencionado.

Un organismo determinado puede contener diversas colinesterasas, que difieren a nivel genético y catalítico. En vertebrados superiores, encontramos dos colinesterasas, codificadas por dos genes distintos; la acetilcolinesterasa o acetilcolina: acetil-hidrolasa (AChE, E.C. 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa, también denominada colinesterasa, pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o colinesterasa inespecífica (BuChE, E.C. 3.1.1.8) (**Tabla I.1**). Ambas enzimas se distinguen principalmente en la especificidad por el sustrato {Silver 1974 19 *fid*}: AChE hidroliza acetilcolina mucho más rápido que cualquier otro éster de colina y es mucho menos activa sobre butirilcolina, mientras que BuChE hidroliza bien ambos sustratos, aunque generalmente es más activa sobre sustratos sintéticos, como propionilcolina y butirilcolina, que sobre la acetilcolina.



Acetilcolina



Butirilcolina

La afinidad por diferentes inhibidores también diferencia a estas enzimas: BW284c51 inhibe fuertemente a AChE, mientras que etopropazina, iso-OMPA y bambuterol son selectivos de BuChE.

La capacidad de inhibición por exceso de sustrato es una característica específica de las moléculas de AChE, que no encontramos en las moléculas de BuChE.

AChE y BuChE se diferencian también en el tamaño de la subunidad catalítica (ligeramente superior en la BuChE) y en su inmunorreactividad. En general, los anticuerpos contra AChE o BuChE no dan reacción cruzada {Brimijoin & Rakonczay 1986 36 *fid*}, salvo algunas excepciones {Dreyfus, Zevin-Sonkin, et al. 1988 G074 *fid*}.

Tabla I.1. Propiedades y nomenclatura de las colinesterasas.

	ACETILCOLINESTERASA	BUTIRILCOLINESTERASA
Nombre sistemático	Acetilcolina:acetilhidrolasa	Acilcolina:acilhidrolasa
Número de la E.C.	3.1.1.7	3.1.1.8
Sustrato óptimo	Acetilcolina	Butiril o propionilcolina
Exceso de sustrato	Inhibición	No inhibición
Butiril o benzoilcolina	No sustrato	Sustrato
D-Acetil- β -metilcolina	Sustrato	No sustrato
pH óptimo	7,5 - 8,0	8,5
Inhibición por BW284c51	Inhibición fuerte	Inhibición débil
Inhibición por etopropazina	Inhibición débil	Inhibición fuerte
Tejidos con alta actividad	Hematíes, tejido nervioso, timo, placenta	Suero sanguíneo, páncreas, hígado

1.4. Acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en vertebrados

En invertebrados existe una gran variedad en cuanto al número de genes de colinesterasa que pueden presentar, así en *Drosophila* encontramos un solo gen, mientras en *Caenorhabditis elegans* hay cuatro genes distintos. Los vertebrados poseen un solo gen de AChE, aunque en aves y mamíferos también podemos encontrar un gen para BuChE.

La dualidad AChE y BuChE, específica de vertebrados, probablemente fue originada por la duplicación de un gen de colinesterasa en un antecesor de los gnatostomados {Toutant, Massoulié, et al. 1985 D001 *fid*}. En vertebrados superiores, esta dicotomía entre AChE y BuChE es muy evidente, pero no sucede así en niveles inferiores de la escala filogenética; en los músculos de algunos peces, junto a AChE se ha detectado una actividad colinesterasa que parece asemejarse a BuChE. En *Torpedo* (un elasmobranquio), AChE y BuChE difieren menos, debido a que BuChE presenta mayor afinidad por acetilcolina que por propionil- o butirilcolina, mientras el ciclóstomo lamprea (*Petromyzon marinus*) tan solo tiene AChE.

No parece existir correlación entre la distribución de ambas enzimas en diferentes tejidos (Tabla I.1). AChE predomina en músculo y en el sistema nervioso, donde está

acompañada por bajos niveles de BuChE, especialmente en estadios tempranos del desarrollo. La expresión de BuChE es más manifiesta en otros tejidos, sobre todo en hígado, de donde posteriormente se vierte al plasma.

Hay que mencionar que, al menos en vertebrados, todos los tejidos poseen cantidades variables de AChE y BuChE, aunque la relación AChE/BuChE es diferente en función del tejido y especie animal de que se trate. Todos los fluidos biológicos excepto lágrimas, sudor y orina, también manifiestan actividades AChE y BuChE. Se ha demostrado que la detección de estas enzimas en determinados fluidos puede tener gran importancia desde el punto de vista clínico. La cuantificación de AChE en el líquido amniótico es muy útil en el diagnóstico de anomalías en el desarrollo del tubo neural en fetos {Liao, Heider, et al. 1992 K130 /id}. También un descenso en la relación de actividades AChE/BuChE en el líquido cefalorraquídeo puede reflejar un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica {Tomel 1992 1567 /id}{Tomel, Campoy, et al. 1993 N153 /id}.

Por su importancia en la transmisión colinérgica, es lógico que los tejidos neurales expresen actividad AChE, pero lo que verdaderamente sorprende es que todos los tejidos muestren actividad AChE, sean o no excitables e independientemente del estadio de desarrollo (embrionario o adulto) {Layer & Willbold 1995 1580 /id}. De hecho, se ha medido actividad AChE en hígado {Gómez 2000 3792 /id}, células de la sangre: eritrocitos {Vidal 1996 1324 /id}, linfocitos {Kawashima & Takeshi 2000 BC005 /id} y plaquetas {Martín-Valmaseda, Sánchez-Yague, et al. 1995 P133 /id}{Marcos, Sánchez-Yagüe, et al. 1998 BC003 /id}, timo {Rossi, Vicini, et al. 1991 BC063 /id}, placenta {Rama Sastry 1997 TNN010 /id} y células epiteliales normales {Taisne, Norel, et al. 1997 TNN009 /id}{Ummenhofer, Brown, et al. 1998 TNN022 /id} y tumorales {Sáez-Valero & Vidal 1996 P107 /id}. A su vez, también se ha observado una amplificación y/o expresión aberrante del gen ACHE (que codifica a la enzima AChE) en diversos tejidos neoplásicos y líneas celulares tumorales {Zakut, Even, et al. 1988 CAN023 /id}{Zakut, Ehrlich, et al. 1990 L110 /id}{Soreq & Zakut 1990 L108 /id}{Soreq & Zakut 1993 1570 /id}.

Casi todos los tejidos manifiestan actividad BuChE, excepto eritrocitos, linfocitos y placenta. Esta enzima abunda en el hígado, corazón y cerebro.

Mientras que el papel de AChE en la transmisión colinérgica es incuestionable, aún se desconoce la función principal de BuChE. Se sabe que esta enzima está involucrada en la degradación de succinilcolina, un miorelajante usado en las operaciones quirúrgicas, que de no ser eliminado puede impedir que el paciente recupere la respiración transcurrido el efecto de la anestesia. También es capaz de hidrolizar heroína {Lockridge, Mottershaw-Jackson, et al. 1980 1090 /id}{Valentino, Lockridge, et al. 1981 1101 /id} y fisostigmina {Silver 1974 19 /id}, y de activar al agente antiasmático bambuterol {Tunek, Levin, et al. 1988 3839 /id}. Lo anterior apunta a una posible participación de BuChE en procesos de detoxificación de compuestos naturales, lo que explicaría la resistencia de algunas variantes de BuChE a ciertos alcaloides (los alcaloides de solanáceas o la dibucaína). Debido al amplio rango de sustratos que posee, se ha sugerido que la BuChE soluble en el plasma de mamíferos, podría ejercer una función protectora contra la difusión de acetilcolina en la sangre, o contra compuestos tóxicos ingeridos oralmente.

A pesar de las numerosas variantes alélicas de BuChE en humanos, parece que la enzima es prescindible debido a la ausencia de consecuencias fisiológicas o patológicas en individuos deficientes o carentes de BuChE.

1.5. Estructura tridimensional y mecanismo catalítico de las colinesterasas

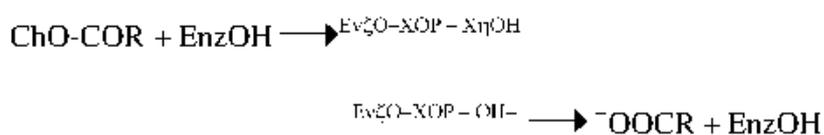
Como se ha comentado antes, la función principal de la AChE es la terminación de la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis colinérgicas, por la rápida hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. De acuerdo con esta función, la AChE posee una actividad altamente específica y una velocidad de catálisis cercana a la de las reacciones controladas por la difusión {Hasinoff 1982 345 /id}{Quinn 1987 X004 /id}. Esta elevada eficiencia catalítica es tan sólo superada por la catalasa.

Dada la amplia distribución de la AChE, tanto a nivel tisular como en la escala filogenética, y su implicación en diversas patologías, el estudio de su mecanismo catalítico es importante, no sólo a nivel teórico, sino también práctico, dado que las colinesterasas (ChEs) son diana de pesticidas y gases nerviosos {Main 1979 1093 /id}{Padilla 1995 P155 /id}.

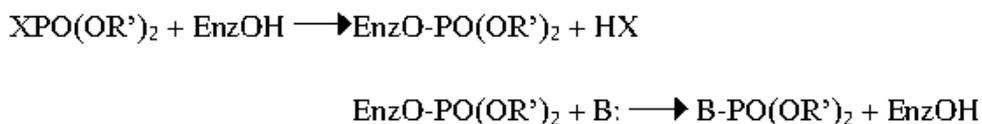
El conocimiento de su mecanismo de acción será de gran ayuda en la obtención de agentes terapéuticos y antídotos para envenenamientos con organofosforados {Li, Costa, et al. 2000 3841 *fid*}, o de plaguicidas selectivos del sistema nervioso de insectos, lo que evitaría cualquier posible alteración de la cadena trófica. También sería de gran utilidad para el diseño de nuevos inhibidores de AChE más efectivos en el tratamiento de pacientes con Alzheimer {Giacobini 1997 1661 *fid*}.

El mecanismo de hidrólisis de un sustrato acil-colina (ChO-COR) por una ChE (EnzOH), así como la base de la inhibición por organofosforados, podrían esquematizarse de la siguiente manera:

A) Catálisis:



B) Fosforilación y reactivación:



En la primera etapa, la enzima se une al sustrato, de modo que el grupo acilo queda unido de modo covalente a la serina del centro activo (Ser200 en Torpedo o Ser203, en mamíferos) {Rachinsky, Camp, et al. 1990 L106 *fid*}. Se rompe el enlace éster del sustrato, se libera la colina y se produce un intermedio acil-enzima (EnzO-COR) {Rosenberry 1975 1195 *fid*}. En la segunda etapa interviene una molécula de agua para liberar el grupo acilo y la enzima.

De acuerdo con este mecanismo, podemos inferir la base molecular de la toxicidad de los agentes organofosforados (XPO(OR')₂), que viene reflejada en el esquema B. Los organofosforados incorporan un grupo fosfato a la Ser catalítica, en lugar del resto acilo

que aporta el sustrato natural. En este caso, el enlace covalente entre el fósforo nucleofílico y la serina se hidroliza lentamente o en absoluto {Aldridge & Reiner 1972 954 /id}, siendo ésta la causa de su fuerte toxicidad. Sólo un nucleófilo muy potente (representado como B, por ejemplo, una oxima cuaternaria o un ión fluoruro) puede desplazar al organofosforado de la Ser catalítica {Schwarz, Loewenstein-Lichtenstein, et al. 1995 P063 /id}.

1.6. Estructura del centro activo

La cristalización {Sussman, Harel, et al. 1988 G110 /id} y posterior análisis estructural de la AChE de Torpedo por difracción de rayos X {Sussman, Harel, et al. 1991 M025 /id} han sido de gran ayuda para el conocimiento de la topología del sitio activo y del mecanismo de catálisis de esta enzima. También han permitido la localización de los determinantes superficiales que intervienen en la formación de oligómeros en estados normales y patológicos, en la modulación alostérica de la catálisis y en la formación de contactos entre células heterólogas.

La estructura terciaria de la subunidad de AChE es similar a la de otras serín-hidrolasas y coincide esencialmente con el modelo basado en los resultados de dicroísmo circular {Manavalan, Taylor, et al. 1985 1193 /id} y espectroscopía de Raman {Aslanian, Grof, et al. 1987 1180 /id}{Aslanian, Grof, et al. 1991 M042 /id}.

Estos estudios revelan que los monómeros de AChE de mamífero (AChEm) y Torpedo tienen una forma elipsoidal con dimensiones 45x60x65 Å {Sussman & Silman 1992 K175 /id}. En mamíferos, cada monómero está constituido por 12 hebras β centrales dispuestas antiparalelamente y rodeadas por 14 hélices α , el plegamiento típico de las proteínas incluidas en la familia de las α/β -hidrolasas {Bourne, Grassi, et al. 1999 1594 /id}, mientras que en Torpedo la molécula de AChE está constituida por 8-11 hebras β centrales rodeadas por hélices α {Bourne, Grassi, et al. 1999 1594 /id}{Sussman, Harel, et al. 1991 M025 /id}{Krejci, Duval, et al. 1991 M121 /id}{Ollis, Chean, et al. 1992 1431 /id}. Durante el plegamiento, el extremo N-terminal queda localizado en la parte superior y el C-terminal en la parte inferior de la estructura (**Fig. I.1**).

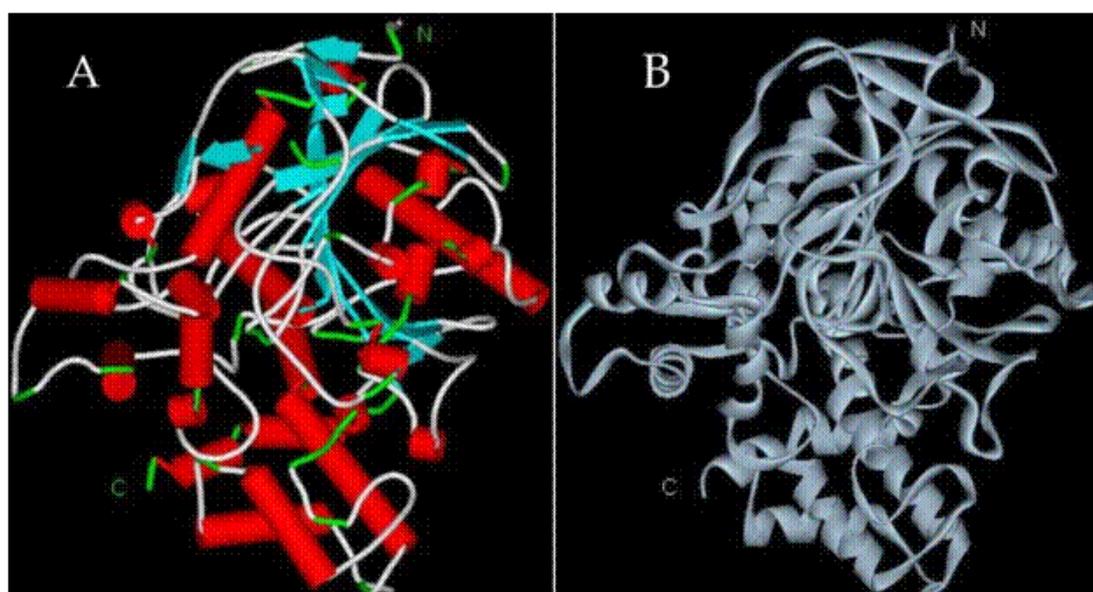


Figura 1.1. Estructura tridimensional de las colinesterasas. A pesar de la disparidad en la secuencia primaria de las proteínas de la familia de las hidrolasas, su estructura terciaria se ha conservado para acomodar espacialmente los aminoácidos que forman la triada catalítica. En (A) podemos ver la disposición de las hojas β rodeadas por las hélices α dando lugar a una estructura elipsoidal compacta (B). En ambas figuras, el extremo amino-terminal (N) queda orientado en la parte superior y el extremo carboxilo-terminal (C) en la inferior. (Estas figuras corresponden a una proteína truncada en la que no se representa el gramento C-terminal Ala544-Ala547). Basado en {Bourne, Taylor, et al. 1999 1605 /id}.

El plegamiento de las α/β -hidrolasas es compartido por enzimas hidrolíticas muy diversas que difieren en su origen filogenético y función catalítica. Sirva como ejemplo la carboxipeptidasa II de trigo (“wheat carboxypeptidase”, CPW) {Liao & Remington 1990 1433 /id} {Ollis, Chean, et al. 1992 1431 /id}. Llama la atención el hecho de que proteínas implicadas en funciones muy diferentes, como la glutactina y la neurotactina, que intervienen en procesos de interacción entre células heterólogas durante el desarrollo embrionario, también compartan cierta homología estructural con las ChEs. Esta información revela que el dominio común con estas proteínas podría ser el responsable de las acciones morfogenéticas de las ChEs {Krejci, Duval, et al. 1991 M121 /id} {Soreq & Seidman 2001 REVACHE002 /id}.

Al comparar distintos miembros de la familia, se ha observado que los aminoácidos orientados hacia la superficie de la proteína se han conservado mucho menos que los del interior, siendo los periféricos los responsables de la especificidad de sustrato para cada enzima {Cygler, Schrag, et al. 1993 1432 /id}. Los restos conservados se sitúan en posiciones internas de la proteína para asegurar su correcto plegamiento y alinear la triada catalítica. El núcleo de la estructura lo generan aminoácidos con propiedades parecidas en diversas proteínas de esta familia {Greer 1990 MT1740 /id}.

El elevado turnover catalítico de la AChE contrasta con la presencia del centro activo en el interior de una cavidad, al cual conduce un profundo y estrecho “**desfiladero catalítico**”.

Se han obtenido evidencias químicas de la presencia de serina e histidina en el centro activo que forman parte de una triada catalítica. Inicialmente, la existencia en AChE de una triada catalítica similar a la de quimotripsina y subtilisina fue objeto de controversia. Quinn y colaboradores sugirieron que, bajo condiciones fisiológicas, la AChE cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (ACh) mediante un mecanismo de protón único, descartando la funcionalidad del mecanismo de relé de cargas de la AChE {Quinn 1987 X004 /id}.

Pero estudios posteriores permitieron localizar a la Ser200 en el centro activo de la AChE de *T. californica*, y los trabajos de comparación de secuencia y mutagénesis dirigida permitieron situar espacialmente a la His 440 muy próxima a la Ser200, así como al resto Glu327, dando lugar a una formación planar semejante a la triada catalítica de quimotripsina y otras serin-proteasas (en ratón la triada catalítica está constituida por los restos **Ser203, His447 y Glu334**) (Fig. I.2).

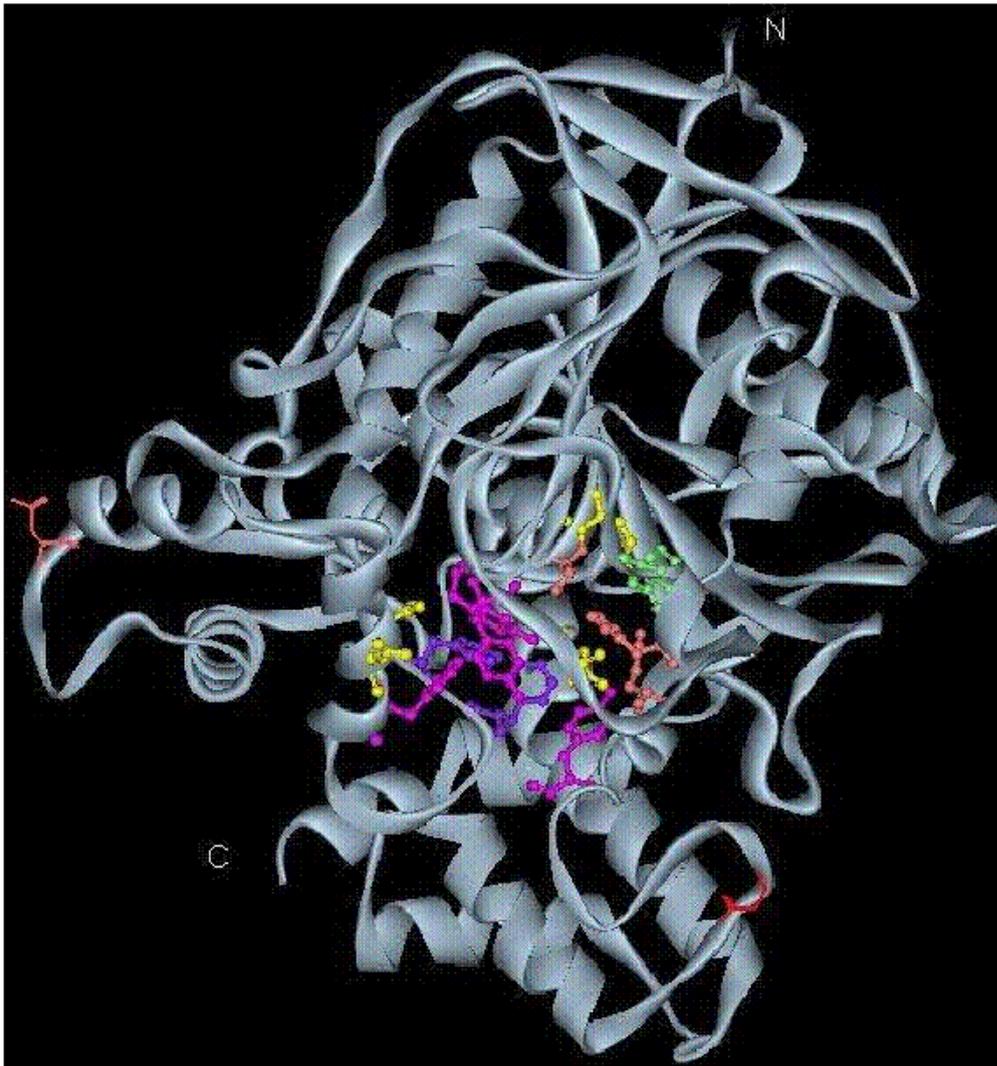
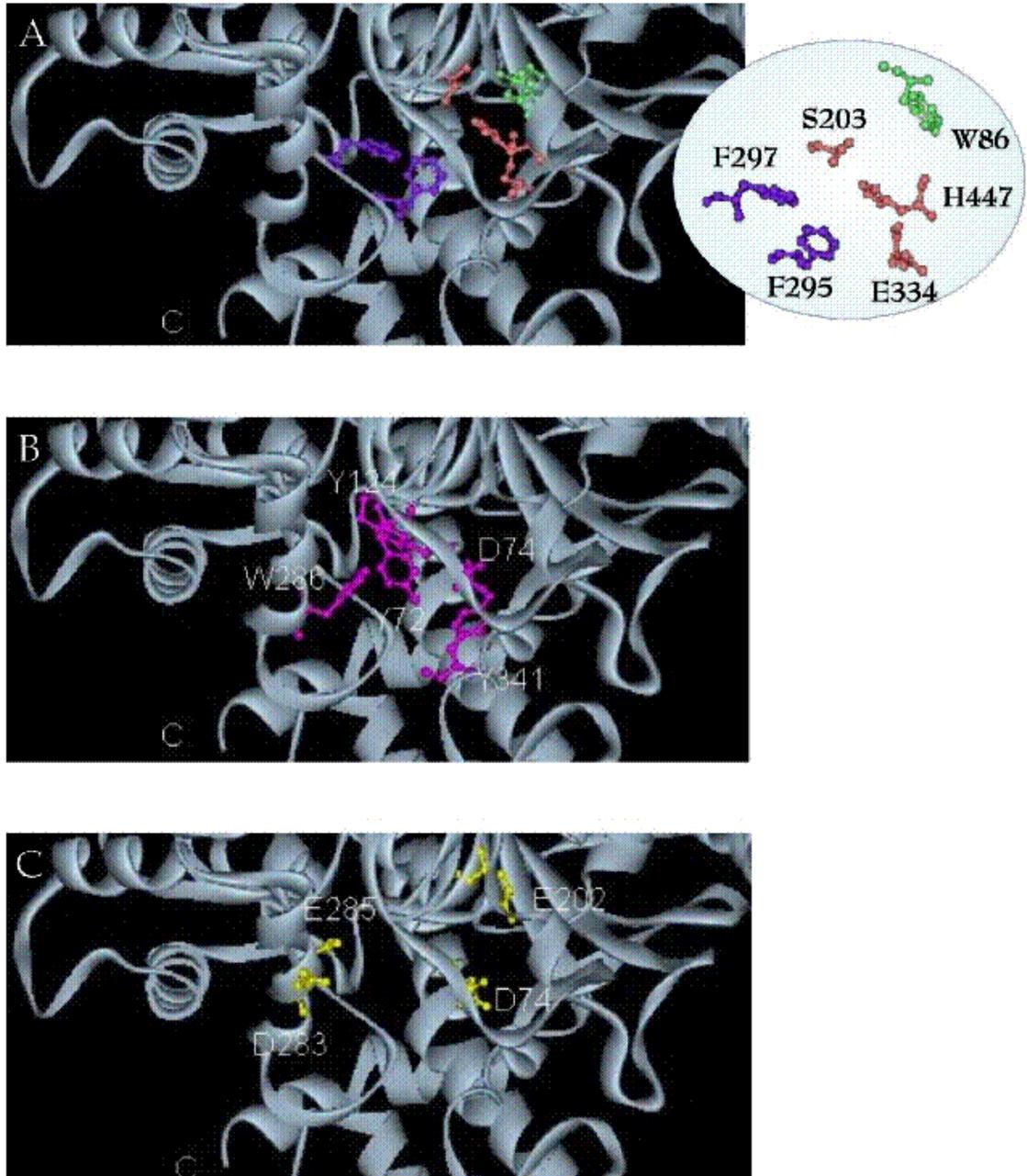


Figura I.2. Análisis de la molécula de AChE. En la figura de arriba podemos ver que los aminoácidos de la triada catalítica están situados al fondo de un estrecho pasillo denominado desfiladero catalítico. A continuación, se detallan todos los restos que tienen una función destacada en el mecanismo de hidrólisis. En (A) se muestra el centro esterásico constituido por la triada, S203-E334-H447 (en rosa), el W86 perteneciente al centro aniónico (verde) y los restos de fenilalanina, F295 y F297 (morado), que colaboran al alineamiento de la molécula de ACh para su hidrólisis. En (B) se ha ampliado el sitio aniónico periférico (PAS) y los aminoácidos que lo componen y en (C) observamos la disposición de los restos ácidos a lo largo del desfiladero. Estos aminoácidos se encargan de generar un campo electrostático que atrae a la molécula de ACh que posteriormente es guiada al centro esterásico mediante la acción de los restos aromáticos que conforman el PAS. En rojo se muestran los dos sitios de N-glicosilación, Asn265 en la izquierda y Asn350 en la derecha. Como en la figura no se incluye el segmento Ala544-Ala547, falta la cisteína implicada en la oligomerización de las moléculas de AChE. Los extremos amino y carboxilo terminales vienen indicados por las letras N y C, respectivamente. Basado en [Bourne, Taylor, et al. 1999 1605 /id].



Según el modelo clásico, el centro activo de la AChE está constituido por dos subsitios:

En el **subcentro aniónico** hay un residuo de triptófano, Trp86 (Trp84)¹, que fija el amonio cuaternario del sustrato para que quede perfectamente alineado y próximo a la serina del centro activo. Esta unión se realiza mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

El **subcentro esterásico** contiene la serina activa, responsable de la separación de colina y acetato {Wilson & Bergmann 1950 990 /id}{Hasan, Cohen, et al. 1980 1188 /id}.

La característica más destacable de la estructura de la AChE es la presencia del profundo y estrecho pasillo, de unos 20Å de longitud, que penetra en la enzima y se extiende próximo a su base.

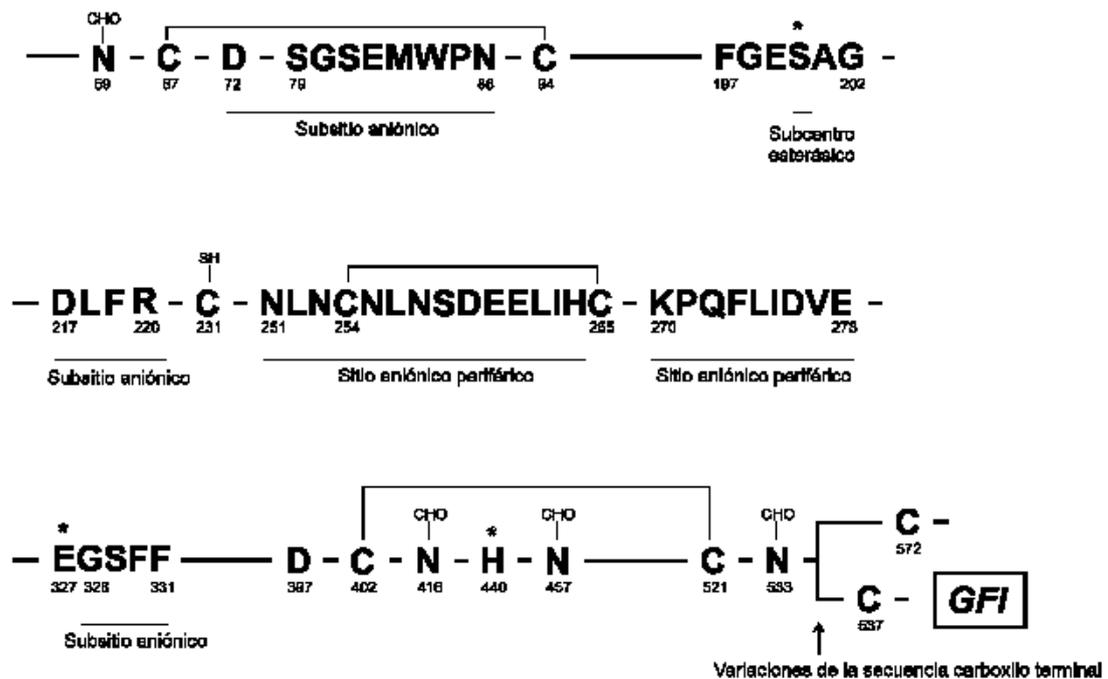
Esta cavidad ha sido denominada “desfiladero del sitio activo”, porque contiene la triada catalítica de la AChE. Excepto en *Electrophorus*, en todas las moléculas de AChE secuenciadas hasta la fecha, se ha observado que los aminoácidos próximos a la Ser catalítica están altamente conservados, en particular el hexapéptido PheGlyGluSerAlaGly (Fig. I.4). Una porción sustancial de la superficie de esta hendidura está ocupada por restos aromáticos, aproximadamente el 40% de la superficie total (14 aminoácidos en total en Torpedo). Estos restos y las secuencias flanqueantes se han conservado en la AChE de diferentes especies. Principalmente están localizados en bucles entre cadenas β y son los responsables de la especificidad de la AChE frente a diferentes ésteres de colina, así como a ciertos inhibidores selectivos, ya que por lo visto, tales restos contribuyen significativamente a la unión del ligando generando un microambiente de anillos aromáticos (la “guía aromática”). En cambio, el hueco homólogo de BuChE tan sólo encontramos 8 restos aromáticos {Harel, Sussman, et al. 1992 K309 /id}.

El desfiladero tiene pocos restos ácidos, entre los que se encuentran Asp283 (Asp276) y Glu285 (Glu278) en la parte superior, formando parte de un sitio periférico;

¹ Para designar los aminoácidos se muestra su posición en la secuencia de la AChE de ratón, y entre paréntesis se especifica el aminoácido homólogo y el número que ocupa en la AChE de Torpedo.

Asp74 (Asp72) en medio, formando parte del subsitio aniónico; y Glu202 (Glu199) en la parte más interna, en el subcentro esterásico (**Fig. I.2**).

De esta forma, desde la boca del desfiladero se extiende un poderoso campo electrostático, que posiblemente proporciona la fuerza conductora para atraer a la ACh que más tarde se trasloca al centro activo con ayuda de los grupos aromáticos.



Ala	Arg	Asn	Asp	Asx	Cys	Glu	Gln	Glx	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
A	R	N	D	B	C	E	Q	Z	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V

Figura I.3. Localización de los elementos estructurales que constituyen los sitios de unión y de catálisis en el transcrito primario de la AChE de Torpedo. Se han señalado con un asterisco los tres aminoácidos de la triada catalítica; además aparecen subrayados los restos que de alguna manera participan en el mecanismo catalítico de la enzima. CHO marca los sitios potenciales de N-glicosilación. Se incluyen las abreviaturas de los aminoácidos. (Según [Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id]).

Diversos estudios han sugerido que en la interacción enzima-ligando, el grupo amonio cuaternario de la ACh hace contacto directo con el anillo indol del Trp86 (Trp84) de la AChE. Este resto se ha conservado en todas las ChEs, y forma parte del sitio de unión a la colina o subsitio aniónico, donde estabiliza un intermedio tetraédrico gracias a la interacción favorable entre sus electrones π y el amonio de la colina {Shafferman, Kronman, et al. 1992 K340 /id}. Por su parte, los restos de fenilalanina Phe295 (288) y Phe297 (290), que forman parte del subsitio esterásico, orientan sus cadenas laterales hacia el centro activo, delimitando el “hueco de acomodo del resto acilo” en torno a la Ser203 (Ser200). De este modo, la Ser203 queda perfectamente alineada para el ataque nucleofílico al carbonilo de la ACh. Para ello, es necesario que el grupo imidazol de la His447 (His440) exalte el carácter nucleofílico del hidroxilo de la Ser catalítica, proceso favorecido por el efecto polarizante del anión carboxilato del Glu 334 (Glu327), unido por puente de hidrógeno a la His 440. La desacilación de la enzima probablemente tiene lugar por inversión de las etapas anteriores.

El dominio catalítico está constituido por una serie de subdominios de los extremos N-terminal y C-terminal, que sin llegar a solaparse, mantienen un estrecho contacto entre sí. Esta interacción es notable en el sitio periférico, donde mutaciones de los restos de esta región comprometen la estabilidad y flexibilidad enzimática, sugiriendo que tanto la actividad catalítica de AChE como su especificidad por el sustrato vienen determinadas por movimientos dinámicos de la estructura proteica, y no por una adaptación fija entre el centro activo y sus ligandos, según la hipótesis de “llave y cerradura” {Morel, Bon, et al. 1999 1620 /id}.

Estos datos concuerdan con las propuestas teóricas basadas en la dinámica proteica, que sugieren la existencia de una ruta alternativa, denominada “puerta trasera” (del inglés, “back door”), mediante la cual la colina abandonaría el centro activo, evitando cualquier problema de tráfico con la entrada de sustratos a lo largo del desfiladero catalítico {Gilson, Straatsma, et al. 1994 1430 /id}{Kronman, Ordentlich, et al. 1994 O132 /id}. Pese a que hay detractores de esta propuesta, que se basan en los resultados de mutagénesis dirigida {Kronman, Ordentlich, et al. 1994 O132 /id}, lo cierto es que los ensayos de inhibición realizados con anticuerpos monoclonales sustentan esta hipótesis {Simon, Le Goff, et al. 1999 1616 /id}.

Se ha propuesto la existencia en AChE de otras regiones, los sitios aniónicos periféricos (PAS), de los que carece la BuChE. Se localizan en la superficie de la proteína, cerca de la entrada del desfiladero catalítico, y engloban diferentes sitios de unión para activadores e inhibidores alostéricos {Boume, Taylor, et al. 2003 3844 /id}. Todavía no se ha aclarado el mecanismo molecular por el cual este PAS se acopla con el centro activo para modular la catálisis. Colabora en la unión de sustratos cargados positivamente, y su posterior orientación hacia el centro activo, mediante la formación de dipolos electrostáticos entre restos de la proteína cargados negativamente y el sustrato catiónico. Parece que estos sitios periféricos pueden estar involucrados en el fenómeno de inhibición por exceso de sustrato. Los estudios llevados a cabo con la AChE humana han permitido poner de manifiesto los restos que conforman el PAS: el Trp286 (Trp279), la Tyr72 (Tyr70) y la Tyr124 (Tyr121). Tales aminoácidos son de gran importancia en la fijación de ligandos al sitio aniónico periférico. Se cree que existe cierta comunicación entre el sitio aniónico periférico y el centro activo de la AChE; numerosas pruebas apoyan que en la conexión participa el Asp74 (Asp72), dado que interviene en procesos que ocurren en ambos sitios de la molécula. Es posible que el Asp74, cercano a la superficie de la hendidura catalítica, informe al centro activo de la ocupación del sitio periférico a través del resto Tyr331 (Tyr334), al que se liga por puente de hidrógeno, y que sea este último el que transmita la información al aminoácido Tyr337 (Phe330). La Tyr337 se localiza en el subsitio hidrofóbico del centro activo y su rotación, impulsada por el movimiento de Tyr431, impide el acceso de otros ligandos al sitio activo {Ordentlich, Barak, et al. 1993 N077 /id}{Shafferman, Kronman, et al. 1992 K340 /id}{Barak, Kronman, et al. 1994 O009 /id}. Por otro lado, los datos disponibles indican que los aminoácidos Trp286 (Trp279), del sitio aniónico periférico, y Trp86 (Trp84), del centro activo, se comunican entre sí. Se piensa que el intercambio de información entre esos dos restos de triptófano cambia la orientación de Trp86 (Trp84), lo que dificulta la estabilización de los complejos enzima-sustrato. No obstante, todavía no se ha podido demostrar que Trp286 (Trp279) esté realmente implicado en la inhibición por exceso de sustrato característica de la AChE.

Así mismo, la capacidad del PAS para ligar cationes podría explicar la relativa independencia de la hidrólisis de ACh respecto a la fuerza iónica del medio, a través de variaciones en K_{cat} y K_m que podrían ser importantes para la función fisiológica de la enzima en las sinapsis {Berman & Nowak 1992 1192 /id}. También se ha propuesto que

estos sitios pueden participar en las asociaciones proteicas heterólogas que ocurren en los procesos de sinaptogénesis o neurodegeneración, debido a su capacidad para unir ligandos. La capacidad de unir ligandos al PAS, que sólo encontramos en AChE, se revela de gran utilidad para diseñar nuevos compuestos capaces de inhibir a AChE en mayor o menor medida {Lewis, Green, et al. 2002 3845 /id}

Como la BuChE posee el mismo número de aminoácidos que la AChE de Torpedo, con la que comparte gran proporción de restos conservados, se ha podido obtener el modelo tridimensional de BuChE sustituyendo los aminoácidos diferentes en la estructura de AChE {Harel, Sussman, et al. 1992 K309 /id}. Estos cambios se manifiestan como pequeñas reorganizaciones en la estructura. Aun así, el modelo resultante contiene una triada catalítica idéntica a la de AChE, pero difiere en el menor número de aminoácidos aromáticos en las paredes del desfiladero catalítico (8 en lugar de 14). Estas diferencias en la composición y formación del hueco podrían explicar la mayor capacidad de BuChE, respecto a AChE, para alojar sustratos artificiales voluminosos y de diferente naturaleza {Masson, Froment, et al. 1998 1589 /id}. A pesar de que aún no se ha podido comprobar la existencia del PAS en la BuChE, todo parece indicar que comparte con la AChE el mismo mecanismo de catálisis.

La disponibilidad de los ADN clonados de ACHE y BUCHE, así como los datos obtenidos por difracción de rayos X, han sido la base para los experimentos de mutagénesis dirigida que han aportado gran información acerca del mecanismo catalítico y especificidad de las ChEs. Así, se han podido determinar los aminoácidos más importantes para la catálisis o para el plegamiento de las ChEs {Soreq, Ehrlich, et al. 1992 1564 /id}{Taylor & Radic 1994 0016 /id}{Schwarz, Glick, et al. 1995 P074 /id}. La sustitución de los tres restos de la triada catalítica (Ser200, His440 y Glu327) por Ala origina una proteína plegada correctamente pero inactiva {Shafferman, Kronman, et al. 1992 K340 /id}. Por otro lado, la mutación de ciertos aminoácidos altamente conservados, como Asp397 de Torpedo, puede conducir de manera indirecta a la inactivación enzimática, no porque participen directamente en el mecanismo catalítico, sino porque intervienen en la formación de puentes salinos esenciales para el correcto plegamiento {Sussman, Harel, et al. 1991 M025 /id}.

Estos ensayos también han permitido poner de manifiesto la base de la especificidad de las colinesterasas. La sustitución de Phe280 y Phe290 en la AChE de Torpedo (que conforman el “hueco de acomodo del acilo”) por Leu280 y Val290, sus equivalentes en la BuChE humana, proporciona un doble mutante que comparte diversas características con la BuChE {Harel, Sussman, et al. 1992 K309 /id}{Vellom, Radic, et al. 1993 N009 /id}{Radic, Pickering, et al. 1993 3847 /id}, como la capacidad de hidrolizar la butirilcolina a velocidad similar a la acetilcolina, la sensibilidad al iso-OMPA (inhibidor específico de BuChE) o la disminución en el grado de inhibición por exceso de sustrato. Estos resultados hacen pensar que el gran tamaño de las cadenas laterales de estos restos (Phe280 y Phe290) es responsable de que ligandos de gran tamaño, como son la butirilcolina y el iso-OMPA, no puedan acceder al “hueco del acilo” de la AChE, y por consiguiente determine la especificidad enzimática.

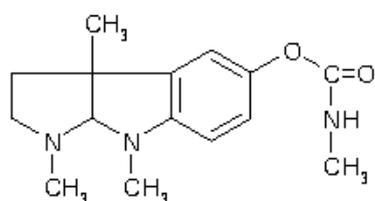
1.7. Inhibición de las colinesterasas

El uso de diversos inhibidores ha sido de gran ayuda para conocer la estructura del centro activo de las ChEs. El subsitio aniónico fue descubierto gracias a los carbamatos fisostigmina y prostigmina, inhibidores competitivos de AChE {Wilson & Bergmann 1950 990 /id}. Aunque difieren en su estructura (fisostigmina es una amina terciaria mientras que la prostigmina posee un grupo amonio cuaternario, **Fig. I.4**), ambos impiden la unión de ACh en el rango de pH en el que los carbamatos poseen carga positiva. Este subsitio aniónico es también el blanco de otros inhibidores reversibles de AChE, tales como el edrofonio y la tacrina.

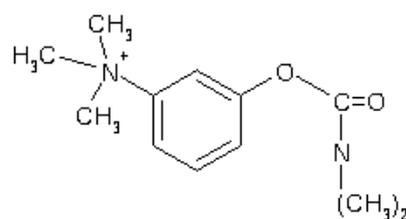
En cambio, los inhibidores irreversibles se unen al centro activo de la AChE, reaccionan con la Ser catalítica y se comportan como verdaderos sustratos de la enzima. Dentro de este grupo destacan los agentes organofosforados, como el diisopropilfluorofosfato (DFP) y el ecotiopato, y los organosulfatos, como la dimetoxona.

La existencia de los sitios aniónicos periféricos se puso de manifiesto al comprobar que la unión de la AChE con el inhibidor reversible propidio no impedía la unión simultánea de otros inhibidores al sitio catalítico, lo que llevó a pensar que quizás este sitio periférico podría estar relacionado con el fenómeno de inhibición alostérica que manifiesta la AChE.

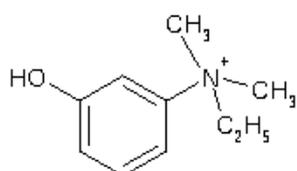
A su vez, existen inhibidores bis-amonio cuaternarios, que poseen la capacidad de unirse a los dos centros aniónicos, el periférico y el principal, siempre y cuando los grupos amonio disten entre sí al menos 14Å. Este es el caso del decametonio y el BW284c51, que se erigen como potentes inhibidores específicos de la AChE.



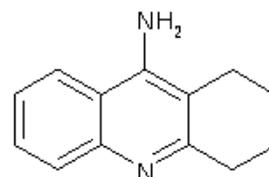
Fisostigmina



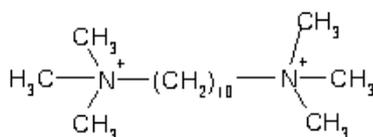
Prostigmina



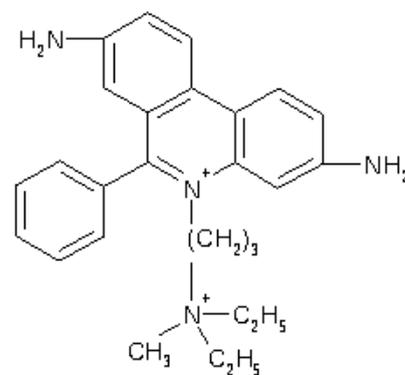
Edrofonio



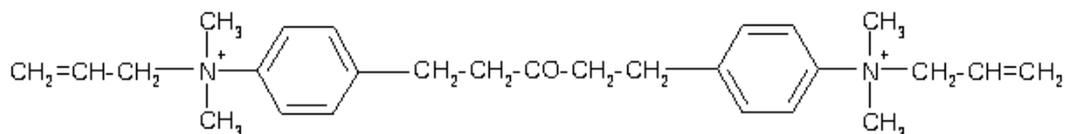
Tacrina



Decametonio



Propidio



BW284C51

Figura I.4. Inhibidores de AChE. El efecto inhibitor de la fisostigmina, la prostigmina, el edrofonio y la tacrina sobre la AChE reside en su capacidad de unión al sitio aniónico del centro activo. El propidio, en cambio, interacciona con el centro aniónico periférico. Los compuestos bis-cuaternarios decametonio y BW284c51 pueden fijarse a ambos centros aniónicos.

2. GENÉTICA DE LAS COLINESTERASAS

El número de genes que codifican a las colinesterasas varía en función del organismo. Mientras que *Drosophila* posee un único gen para AChE, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* encontramos tres genes para AChE, denominados ace-1, ace-2 y ace-3, que codifican moléculas activas que difieren en ciertas propiedades, como la Km y su sensibilidad a eserina.

En vertebrados, el gen de la subunidad catalítica de AChE fue clonado en primer lugar en los órganos eléctricos de Torpedo {Schumacher, Camp, et al. 1986 140 /id}{Sikorav, Krejci, et al. 1987 F073 /id}, donde se vió la existencia de un único gen, como posteriormente se demostró en ratón {Rachinsky, Camp, et al. 1990 L106 /id}{Li, Camp, et al. 1991 M037 /id}. En pollo, se hallaron dos tipos de subunidades que diferían en su tamaño (100 kDa y 110 kDa) que no eran sino los productos de variantes alélicas de un solo gen.

Las subunidades catalíticas de AChE y BuChE están codificadas por dos genes distintos en vertebrados, ACHE y BUCHE {Soreq & Zakut 1993 1570 /id}{Taylor & Radic 1994 O016 /id}. Ambos genes muestran una organización de exones e intrones similar, aunque difieren en la composición de nucleótidos. Así, mientras que ACHE es rico en pares guanina-citosina (G+C, estas bases suponen el 67,3% de las terceras bases de los codones en las secuencias codificantes de ratón), BUCHE lo es en pares adenina-timina (A+T, su contenido en G+C es sólo un 30% de las terceras bases en conejo y un 34% en humano) {Chatonnet & Lockridge 1989 L105 /id} {Chatonnet, Lorca, et al. 1991 M114 /id}. Probablemente, estos genes se originaron por duplicación de un gen ancestral ocurrida antes de la evolución de los primeros vertebrados {Soreq & Zakut 1990 146 /id}{Taylor 1991 M023 /id}, a la que posteriormente siguió un proceso de divergencia, de acuerdo con la expresión específica del tejido o del estadio de desarrollo. Esta divergencia se tradujo en cambios en la composición de bases, acordes con las regiones genómicas en las que están incluidos los genes ACHE y BUCHE {Chatonnet, Lorca, et al. 1991 M114 /id}. La identificación de estos dos genes distintos en todos los vertebrados estudiados sugiere que ambos productos proteicos son necesarios para su supervivencia y que, previsiblemente, desarrollan funciones distintas.

En humanos, el único gen de la subunidad catalítica de AChE está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en la posición 7q22. En ratón, es el cromosoma 5 el que contiene al gen de AChE. Análisis de fragmentos de restricción, así como de las secuencias de unión entre exones e intrones, a partir de librerías de ADN humanas y de ratón, han revelado que la disposición estructural del gen de AChE en ratón es muy similar al humano.

El gen ACHE humano tiene un tamaño de 7 Kb y está constituido por 6 exones y 4 intrones (Fig. I.5). El exón 1 no se traduce pero alberga dos orígenes de transcripción, siendo el que está aguas abajo, el de uso más frecuente y el único empleado en las células hematopoyéticas. Por su parte, los exones 2, 3 y 4 aportan la mayor parte de la secuencia codificadora invariable (4,5-4,7 Kb), proporcionando la información necesaria para la síntesis de una proteína catalíticamente activa. En cambio, en Torpedo son dos los exones que generan el dominio catalítico.

Las longitudes de los intrones del gen de AChE en humano y ratón son más cortas que las de Torpedo, lo que explica la mayor longitud de la secuencia genómica en este último, 25Kb.

Por otro lado, en humanos hay dos cromosomas con el gen BUCHE, aunque en realidad tan sólo uno de ellos, el cromosoma 3 (3q26), posee el gen que codifica la subunidad catalítica de BuChE (gen CHE1). Aún se desconoce el significado biológico del gen localizado en el cromosoma 16.

El gen de BuChE, de mayor tamaño que el de AChE (73 Kb), está constituido por 4 exones: el primero tiene dos sitios potenciales de inicio de la transcripción y no se traduce; el segundo exón contiene el 83% de la secuencia codificadora, incluyendo el extremo N-terminal, el centro activo y probablemente un tercer sitio de inicio de la transcripción; el tercer exón es de pequeño tamaño y finalmente, el cuarto exón codifica el extremo C-terminal.

A diferencia de AChE, existen un gran número de variantes alélicas de la BuChE humana, que difieren en su actividad, estabilidad o producción enzimática.

Al comparar las secuencias de BuChE de diversas especies, se pone de manifiesto una gran homología entre esas enzimas acorde con la filogenia establecida. Además, la posición de los intrones en las secuencias de AChE de Torpedo, y AChE y BuChE de vertebrados, se encuentra muy conservada.

2.1. Elementos de control

Una vez establecida la existencia de un único gen para AChE en vertebrados, es de suponer la existencia de diferentes elementos reguladores de su expresión, específicos de tejidos o tipos celulares y que sean los responsables, en parte, de la diversidad de formas moleculares. El promotor de ACHE incluye una región de 600pb esencial para la expresión del gen en tejidos sanos y que posee secuencias consenso para la unión de factores de transcripción {Ben Aziz-Aloya, Seidman, et al. 1993 1459 /id}{Getman, Mutero, et al. 1995 4079 /id}. Muchas de estas secuencias corresponden a genes que se expresan específicamente en aquellos tejidos o tipos celulares donde abunda la AChE. Este promotor incluye, entre otros, motivos consenso para el factor asociado a la leucemia AML1/Runx1 {Perry, Sklan, et al. 2002 CAN057 /id} y para c-fos, un factor de transcripción conocido por regular la expresión del gen ACHE bajo condiciones de estrés {Kaufer, Friedman, et al. 1998 MT1739 /id}. 17 Kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de ACHE existe un dominio de potenciamiento distal que incluye sitios de unión a factores osteogénicos, tales como el 17β -estradiol y la 1,25-dihidroxitamina D₃, dos sitios adyacentes de unión a HNF3 β , un elemento de respuesta a corticoides, y sitios de unión para NF- κ B, c-fos y C/EBP {Shapira, Tur-Kaspa, et al. 2000 4080 /id}. A su vez, el control transcripcional de la producción de AChE depende de un potenciador interno, situado en el primer intrón, que contiene sitios consenso de unión para AP2, SP1, NF- κ B y GATA1 {Chan, Boudreau-Lariviere, et al. 1999 4081 /id}. Todas estas áreas en el locus ACHE están consideradas como controladores potenciales de la expresión del gen ACHE en tumores cerebrales.

También se encuentran secuencias asociadas con la expresión génica específica del músculo (factor MyoD) y los motivos Zeste, GAGA y USF conocidos como sitios de reconocimiento para genes inducidos durante el desarrollo embrionario {Aziz-Aloya, Sternfeld, et al. 1993 4085 /id}.

Diversos factores de transcripción hematopoyéticos tienen sitios de unión en el promotor de AChE, tales como STAT5. Se sabe que STAT5 junto con el receptor de glucocorticoides participa en la modulación de la inducción transcripcional {Pfitzner, Jahne, et al. 1998 4086 /id}{Batshake, Nilsson, et al. 1999 4087 /id}{Fuller & Zhang 2001 4088 /id}{Chida, Wakao, et al. 1998 4089 /id}. En la **Figura I.5** se muestran los sitios de unión para los factores de transcripción hematopoyéticos en el potenciador distal, en el promotor proximal y en el dominio potenciador del intrón-1 de AChE. Estos incluyen motivos altamente conservados de actuación cis de AP1, NF- κ B, HNF3, Stat5, LMO2, SP1 y GATA3, así como los elementos palindrómicos de respuesta a glucocorticoides (GRE).

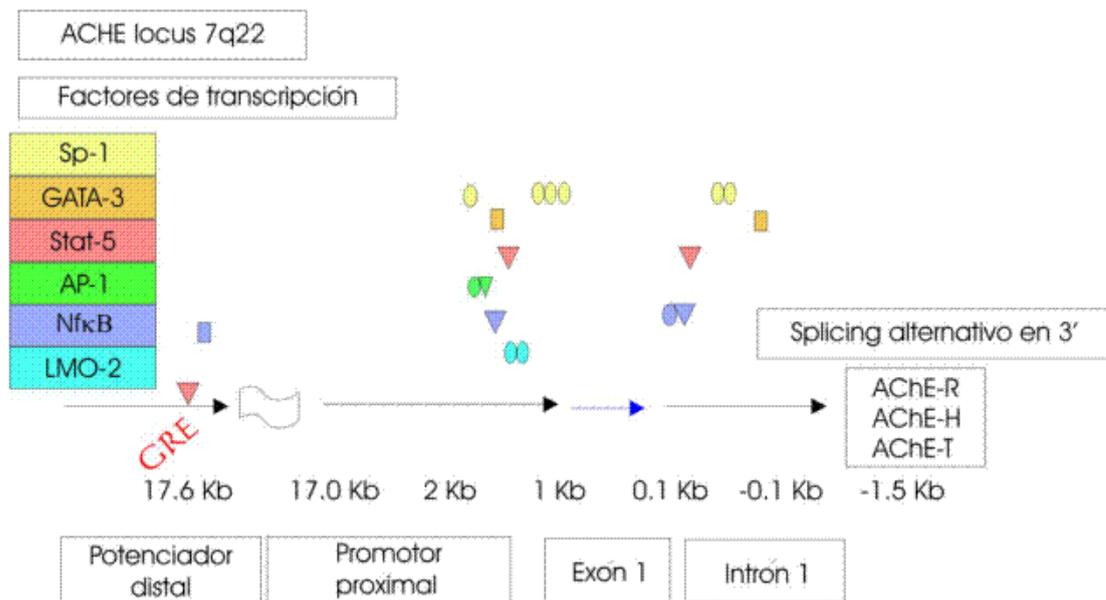


Figura I.5. Sitios de unión para factores de transcripción hematopoyéticamente activos en el locus de AChE. En la figura se muestran los motivos de unión de factores de transcripción hematopoyéticos y relacionados con el estrés, localizados en las distintas áreas del gen de AChE (Tomado de Soreq, 2002).

Aun así, se ha propuesto la presencia de elementos de control adicionales en el gen {Schwarz, Glick, et al. 1995 P074 /id}. La expresión coordinada de los genes que codifican al receptor nicotínico (AChR) y a la AChE en las sinapsis colinérgicas {Kristt & Kasper 1983 1461 /id} refleja un control preciso de la expresión de diversos genes implicados en la síntesis de las proteínas que participan en la sinapsis.

2.2. Ensamblado Alternativo de Exones

La eliminación de secuencias no codificantes del transcrito primario (intrones) y el posterior reacoplamiento de las secuencias adyacentes (exones) representa otro nivel de control de la expresión de la AChE en los tejidos.

El origen del polimorfismo de la AChE en mamíferos y *Torpedo* reside en el ensamblado alternativo de los ARNm que da lugar a los ARNm maduros en los que el exón E4 se une bien al E5, al E6 o al pseudointrón I4. Aunque los conocimientos sobre el procesamiento en la región 5' aún son escasos, parece que los cambios sólo afectan a la eficiencia de la traducción {Sikorav, Krejci, et al. 1987 F073 /id}.

El procesamiento postranscripcional del ARNm de la AChE es específico del tipo celular y está regulado por el nivel de desarrollo del tejido. Los procesos de corte y ensamblado alternativo de los ARNm para dar transcritos maduros, junto con diversos procesos postraduccionales como pueden ser la distinta glicosilación de las subunidades, procesos de oligomerización o la adición de subunidades estructurales, son responsables, en gran medida, de la amplia diversidad de formas moleculares de las ChEs y además determinan la localización subcelular de las moléculas y, por consiguiente, su función.

Así, en mamíferos y *Torpedo* se han hallado tres transcritos diferentes originados por la reorganización de los exones del gen ACHE, denominados transcritos T, H y R. En los tres casos, el polipéptido codificado consta de unos 540 aminoácidos, altamente homólogos en todas las ChEs de invertebrados y vertebrados.

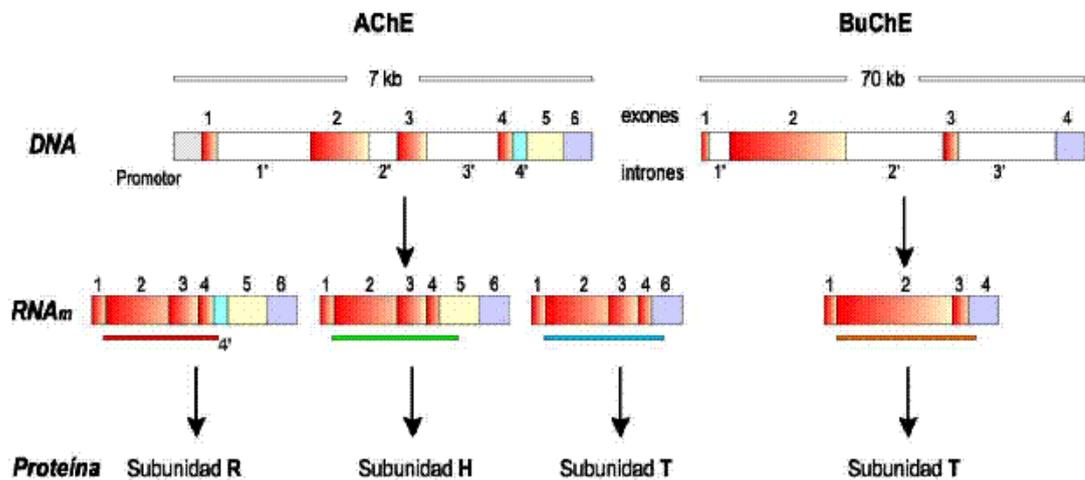


Figura I.6. Estructura de los genes de AChE y BuChE de mamíferos. El esquema muestra las diferentes subunidades de AChE que resultan del ensamblado alternativo del transcrito primario. Los exones comunes se han coloreado de naranja y los intrones de blanco, a excepción del pseudointrón I4. Se muestran con diferentes colores los exones que codifican la región polipeptídica C-terminal variable de las colinesterasas.

El **transcrito T** (del inglés, “tailed”) lleva los exones (E1)²-E2-E3-E4-E6. Al eliminar el intrón I4 y el exón E5, en el extremo C-terminal aparece una región de 40 aminoácidos (41 en BuChE) denominada **péptido T** o **WAT** (del inglés “tryptophan amphiphilic tetramerization domain”), que posee una cisteína (en la posición -4 en vertebrados) y series de restos aromáticos conservados. Este péptido proporciona propiedades hidrofóbicas a la proteína, así como la capacidad para formar asociaciones cuaternarias. El péptido T C-terminal parece estar implicado exclusivamente en el proceso de tetramerización, mientras que en la dimerización interviene una zona común para las subunidades H y T (ver apartado I.3.3).

Las subunidades AChE-T producen monómeros anfífilicos (G_1^A), dímeros anfífilicos (G_2^A), tetrámeros anfífilicos (G_4^A), tetrámeros no anfífilicos (G_4^{NA}) y una especie intracelular no anfífilica (de 13,5 S, probablemente un hexámero) { Bon & Massoulié 1997 EST097 /id}. También generan las asociaciones heteroméricas de tetrámeros con la

² Se indica entre paréntesis los exones no traducidos.

subunidad colagénica Q (**ColQ**) (moléculas collagen-tailed) o con una subunidad de anclaje a la membrana rico en prolina (**PRiMA**) (moléculas ancladas a la membrana) (ver apartados **I.3.1** y **I.3.2.3.C** respectivamente). Las subunidades catalíticas de tipo T de AChE existen en todos los vertebrados, mientras que las subunidades de BuChE son siempre de tipo T. Principalmente se encuentran en cerebro y músculo de mamífero.

Cuando la reorganización del pre-ARNm da lugar a la siguiente combinación: (E1)-E2-E3-E4-E5-(E6), nos encontramos ante el **transcrito H** (“hydrophobic”), que da lugar a las subunidades H, caracterizadas por tener en la región C-terminal o péptido H (de 31 aminoácidos en humanos), uno o dos restos de cisteína que pueden establecer enlaces disulfuro intercatenarios. Este péptido H contiene además un sitio de corte denominado ω que pasa a ser el resto C-terminal de la proteína madura y está localizado aguas arriba de una secuencia hidrofóbica. La falta de homología entre los péptidos H de la AChE de *Drosophila*, Torpedo y mamíferos, indica que admite ciertas variaciones siempre y cuando el péptido H contenga tres elementos indispensables: un resto de Cys, un sitio de corte ω y una secuencia hidrofóbica.

Las subunidades codificadas por estos transcritos H son principalmente dímeros anfífilicos, denominados tipo I, que se anclan a la superficie celular por medio de un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI). En mamíferos, el exón E6 no se traduce debido a la presencia de un codón de terminación en E5.

La subunidad H se expresa en diversos tejidos de Torpedo (músculos, órgano eléctrico); además de en mamíferos, fundamentalmente en las células hematopoyéticas, donde puede participar en la eliminación de cualquier resto de acetilcolina presente en la corriente sanguínea. Los transcritos H, así como la AChE con anclaje de GPI, no se han detectado en peces teleósteos, reptiles o aves.

Finalmente, encontramos el tercer tipo de transcrito, que tiene la particularidad de mantener la secuencia intrónica que sigue al último exón que codifica el dominio catalítico, E4. De modo que la organización del ARNm (maduro) es la siguiente: (E1)-E2-E3-E4-I4-(E5)-(E6). Estos **transcritos R** (“readthrough”) se han identificado en tejidos embrionarios, en cultivos celulares {Legay, Bon, et al. 1993 776 /id} {Li, Camp, et al. 1991 M037 /id} y se encuentran en células eritroides de ratón, pero no en las humanas

{Li, Camp, et al. 1993 N155 *fid*}. Normalmente no se expresan en el cerebro de los ratones adultos, pero pueden ser inducidos mediante estrés.

En este caso, el péptido C-terminal denominado péptido R o **ARP**, consta de 30 aminoácidos (26 en ratón) y carece del residuo de cisteína implicado en la dimerización o interacción con cualquier subunidad estructural y/o catalítica. También carece de secuencias hidrofóbicas, por lo que es de esperar que las subunidades R sean monómeros solubles. A pesar de todo, aún no se ha conseguido identificar la proteína producto de este transcrito R *in vivo* y cabe la posibilidad de que sus funciones disten de ser las clásicas funciones colinérgicas o bien, de que se trate de una proteína defectuosa {Grisaru, Deutsch, et al. 2001 BC058 *fid*}.

Bajo condiciones de lesión o tras la exposición a agentes anticolinesterásicos se ha observado sobreexpresión del transcrito R en cerebro de ratón. De hecho, los estudios del grupo de Hermona Soreq atribuyen a la AChE-R, y más concretamente al péptido ARP, el papel de mantener la homeostasis hematopoyética tras un fenómeno de agresión y sugieren el posible uso clínico del péptido ARP para el mantenimiento y expansión *ex vivo* de las células progenitoras. {Grisaru, Deutsch, et al. 2001 BC058 *fid*}{Deutsch, Pick, et al. 2002 4091 *fid*}.

Recientemente se ha descrito que la forma R de AChE está implicada en la adquisición de memoria de larga duración en neuronas del hipocampo tras un período agudo de agresión {Nijholt, Farchi, et al. 2003 4095 *fid*}. Al parecer, la AChE-R interacciona con la proteína RACK1 intraneuronalmente y a través de ésta, con la proteína quinasa C β II (PKC β II), involucrada en el acondicionamiento al miedo. En ratones normales sometidos a un estrés medio se ha apreciado un incremento en los niveles de AChE-R y PKC β II. Los datos recogidos apuntan a que la AChE-R podría ejercer cierto papel regulador sobre el funcionamiento de la PKC β II neuronal {Birikh, Sklan, et al. 2003 4107 *fid*}.

Por otro lado, en el suero de ratas y pacientes afectados de myasthenia gravis se ha detectado acumulación de la variante R de AChE. El uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra esta variante de AChE y el consiguiente descenso de los niveles de proteína produjeron cierta mejora en las anomalías electromiográficas generadas por la

patología, demostrando la participación de la AChE-R en el curso de la enfermedad {Brenner, Hamra-Amitay, et al. 2003 4106 /id}

Se ha identificado un cuarto tipo de ARNm de AChE en algunas serpientes de la familia Elapidae, tales como *Bungarus* y *Naja*. Estos transcritos, denominados **transcritos S**, producen monómeros solubles que se secretan por las glándulas venenosas. Aunque la AChE es abundante en el veneno de esas serpientes, no parece contribuir a su toxicidad. La clonación del ADNc de la AChE del veneno de *Bungarus fasciatus* ha revelado ciertas diferencias en la composición del péptido C-terminal respecto a otras subunidades. Este péptido, codificado por un nuevo exón alternativo, denominado S (“soluble” o “snake”) está localizado aguas abajo del exón E6 {Cousin & Bon 1999 4121 /id}. En estas serpientes, los transcritos S se generan en las glándulas venenosas por mecanismos de splicing (corte y empalme) alternativo, mientras que los ARNm T abundan en músculo e hígado. En músculo también se encuentran transcritos S en niveles comparables a los de los transcritos T, por lo que es posible que estas formas solubles de AChE participen en la hidrólisis de ACh en los músculos (**Tabla I.2**). No hay evidencias de la presencia del exón E5 entre el último exón catalítico y el exón E6 {Cousin, Bon, et al. 1998 MT1738 /id}; de hecho, en ningún tejido de serpiente se han encontrado formas de AChE ligadas al glicosilfosfatidilinositol.

Como resultado del procesamiento postranscripcional se obtiene un péptido muy corto, de tan sólo 15 aminoácidos y muy básico, el péptido S, cuyos últimos 8 restos se eliminan en la proteína madura. Este proceso no afecta a la actividad enzimática y tiene lugar antes de la secreción de la enzima.

Los análisis de la secuencia de la AChE-S revelan dos importantes diferencias en la región del sitio periférico respecto a la enzima de *Torpedo* y de mamíferos, la sustitución del residuo Tyr70 por Met70 y la aparición de Lys en la posición 258, donde debería haber un resto ácido (Asp o Glu). Parece que estos dos restos están implicados en las propiedades del sitio periférico de la AChE de *Bungarus*, según se ha podido constatar por mutagénesis dirigida {Cousin & Bon 1999 4121 /id}.

Una característica de estas moléculas de AChE es su diferente comportamiento o sensibilidad a la fasciculina, una toxina de las mambas, por lo que son una fuente ideal para el estudio del mecanismo de inhibición del sitio periférico de AChE.

La presencia de moléculas de AChE-S en los venenos de serpientes nos induce a pensar que la existencia del exón S fue concebida para la expresión de AChE en contextos diferentes de las sinapsis, lo que apoyaría la existencia de las funciones no colinérgicas de la AChE {Cousin & Bon 1997 4124 /id}.

El procesamiento postraducciona l y el destino subcelular de las moléculas de AChE vienen determinados por los dominios C-terminales; así en cada tejido o tipo celular, los diferentes tipos de subunidades se expresan de manera específica. También es sabido que la distribución de las especies de AChE varía con el desarrollo y la diferenciación. Así por ejemplo, en tejidos adultos de mamífero, AChE-H es expresada principalmente en células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y en alguna ocasión en plaquetas), mientras que AChE-T aparece en músculo y en los tejidos nerviosos central y periférico {Toutant & Massoulié 1988 11 /id}{Legay, Bon, et al. 1993 N015 /id}{Legay, Bon, et al. 1993 776 /id}. Sin embargo, según el organismo, podemos observar diferencias en la expresión tisular de AChE. Por ello, aparecen subunidades AChE-H en el sistema nervioso de *Drosophila* y en el músculo de *Torpedo*, y subunidades T en los tejidos correspondientes de mamíferos (Tabla I.2).

Si comparamos las secuencias de los genes ACHE y BUCHE, la elevada homología entre ellas sugiere que ambas enzimas desarrollan las mismas funciones fisiológicas. No obstante, ACHE presenta un dominio atenuador rico en G+C, característico de los genes que se replican y transcriben en etapas tempranas del ciclo celular. En cambio, BUCHE es rico en pares A+T, una característica de los genes con elevada actividad durante la división celular {Soreq, Ben-Aziz, et al. 1990 157 /id}

La información disponible acerca del procesamiento del pre-ARNm de BuChE es escasa. Hasta el momento se descarta la posibilidad de que se formen varios transcritos por ensamblado alternativo, por lo que se acepta que sólo hay subunidades T, que por autoasociación generan las diferentes formas moleculares de BuChE. A su vez, proteínas

específicas en cada tejido intervienen en la asociación de las subunidades {Soreq, Seidman, et al. 1989 H87 /id}.

En humanos se han identificado varias formas alélicas naturales del gen de la BuChE causadas por mutaciones puntuales {La Du 1989 H83 /id}{Lockridge 1990 L089 /id}{Schwarz, Loewenstein-Lichtenstein, et al. 1995 P063 /id}. Estas variantes difieren en producción de enzima, estabilidad y actividad enzimática.

Distribución en los tejidos	
R	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de transcritos R en: - Órgano eléctrico de Torpedo - Músculo embrionario de pollo • Aumento de expresión por estrés en cerebro de ratón
H	<ul style="list-style-type: none"> • Tejido nervioso de insectos • Tejidos muscular, nervioso y órgano eléctrico de Torpedo
T	<ul style="list-style-type: none"> • Tejidos nervioso y muscular de vertebrados
S	<ul style="list-style-type: none"> • Glándulas de veneno y otros tejidos de serpiente

Tabla I.2. Subunidades de AChE: distribución en los tejidos. Los dominios C-terminales de las subunidades (R, H, T y S) determinan el procesamiento postraducciona l y el destino de las moléculas enzimáticas.

3. FORMAS MOLECULARES DE AChE Y BuChE

La extraordinaria diversidad que presentan las moléculas de las ChEs deriva de cambios a nivel genético, post-transcripcional y post-traducciona, y determina su función tanto en las sinapsis colinérgicas como en contextos no sinápticos.

Las colinesterasas pueden encontrarse como monómeros u oligómeros de subunidades catalíticas glicoproteicas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 70 y 80kDa, aunque hay excepciones, ya que en AChE de pollo encontramos valores más altos (100-110kDa). Algunas formas moleculares también pueden contener subunidades de anclaje no catalíticas: subunidades colagénicas Q o subunidades hidrofóbicas PRiMA.

De acuerdo con la definición de la IUPAC-IUB (1971), cada clase de molécula de AChE y BuChE se entiende como forma molecular, ya que se trata de proteínas que derivan de asociaciones cuaternarias de subunidades que expresan la misma actividad enzimática, y cuyas moléculas no se interconvierten de manera espontánea {Massoulié & Bon 1982 C057 /id}. En cambio, el término “isoenzima” se reserva para aquellas proteínas oligoméricas cuyas subunidades están codificadas por genes distintos y, por tanto, tienen diferente secuencia polipeptídica.

A la hora de clasificar las diversas formas moleculares hay que usar un criterio basado en sus propiedades intrínsecas. Independientemente de su origen genético, las moléculas de AChE y BuChE pueden clasificarse como formas globulares y asimétricas, en función de su estructura cuaternaria y sus propiedades hidrodinámicas. De acuerdo con la nomenclatura de la Dra. Bon, las formas globulares están constituidas por monómeros (G_1)³, dímeros (G_2) y tetrámeros (G_4) de subunidades catalíticas que poseen tamaños parecidos en todos los tejidos. Por otro lado, las formas asimétricas son heterooligómeros compuestos por uno (A_4), dos (A_8) o tres tetrámeros (A_{12}) unidos covalentemente a una estructura similar al colágeno {Bon, Vigny, et al. 1979 1112 /id}{Bon 1982 68 /id}{Toutant & Massoulié 1987 F052 /id}.

³ El subíndice señala el número de subunidades catalíticas en cada forma molecular.

Las formas globulares y asimétricas se diferencian por su solubilidad en tampones de baja y alta fuerza iónica. Las formas globulares son solubles en medios de baja fuerza iónica, mientras que las formas asimétricas necesitan mayores concentraciones de sal, ya que en caso contrario tienden a agregarse con diversos proteoglicanos, produciendo grandes complejos insolubles {Bon & Massoulié 1978 220 /id}.

En la **Figura I.7** podemos observar las formas moleculares más representativas de AChE, mientras que la **Tabla I.3** resume las propiedades de las distintas formas G y A de AChE, cuyas características estructurales son mejor conocidas.

Las subunidades se clasifican como T, H, R o S de acuerdo con la naturaleza del péptido C-terminal, que resulta del procesamiento alternativo del transcrito primario. Aunque este dominio no es esencial para la actividad catalítica, decide la organización estructural de los oligómeros y por consiguiente, su localización final.

En vertebrados la heterogeneidad estructural es parecida entre las moléculas de AChE y BuChE. En los tejidos y especies estudiados, a cada forma molecular de AChE le corresponde otra de BuChE {Massoulié & Bon 1982 C057 /id}{Silman & Futerman 1987 F053 /id}{Chatonnet & Lockridge 1989 L105 /id}{Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}. El coeficiente de sedimentación de la molécula de AChE es ligeramente menor que el de BuChE, aunque lo más importante es que apenas hay diferencias entre el coeficiente de sedimentación de formas de AChE (o de BuChE) de distintos tejidos e incluso de organismos diferentes.

A pesar del éxito de la clasificación de las formas de AChE y BuChE propuesta por la Dra. Bon, hemos de señalar que hay moléculas que no encajan en este modelo general. Por ejemplo, en el plasma humano podemos encontrar monómeros de BuChE unidos covalentemente a la albúmina{Masson 1989 H040 /id}, cuando el componente mayoritario es un tetrámero globular de BuChE {Lockridge, Eckerson, et al. 1979 B080 /id}. También en *Torpedo* sp. se ha detectado la presencia de una subunidad estructural no catalítica de 100 kDa que se añade o sustituye a alguna subunidad catalítica de 68 kDa en las formas asimétricas {Lee & Taylor 1982 98 /id}{Lee, Heinemann, et al. 1982 110 /id}.

De cualquier forma, la validez de este criterio de clasificación basado en el estado de agregación molecular queda reforzada al comprobar que la organización cuaternaria de las

subunidades es la responsable última de la localización celular. El polimorfismo de las ChEs facilitaría su transporte, localización y asociación estable en su sitio funcional. No parece que la organización estructural represente una ventaja cinética, puesto que la actividad hidrolítica de los centros activos es independiente del número y organización de las subunidades, hecho que se ve reforzado por la falta de cooperatividad de las subunidades en los oligómeros {Vigny, Bon, et al. 1978 B008 /id}{Viratelle & Bernhard 1980 B037 /id}.

En una misma especie animal es fácil que la distribución de formas moleculares difiera de un tejido a otro. De hecho, cada tejido tiene una composición particular de moléculas de AChE y/o BuChE, debido quizá a requerimientos funcionales específicos. Es de destacar que ciertas patologías pueden alterar el espectro de componentes moleculares, lo que tiene interés desde el punto de vista clínico y diagnóstico. Así ocurre en las distrofias musculares, como desde hace varios años viene constatando el grupo del Dr. Vidal {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1994 O003 /id}{Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1997 S001 /id}, en la enfermedad de Alzheimer {Sáez-Valero, Sbema, et al. 1997 1553 /id}{Sáez-Valero, Sbema, et al. 1999 MT1669 /id} y en la de Hirschsprung {Caussé, Vaysse, et al. 1987 TNN019 /id}.

	Secuencia peptídica de la región C-terminal	Forma molecular
Subunidad R	AChE <i>Torpedo</i> GNVFAFHMQKVRTPAKTYHFGVIVAHLLLLSLPTASD VPRLASSKWWAHSDDLCS-RRCWESWGRIL	- Monómero soluble (G ₁ ^H)
	AChE rata GRRGVGKQGMHKAARVGRTERKGGKHRM	
	AChE ratón GRRMEWGEQGMHKAARVGRGERWGAKHRV	
	AChE humana GMQGPAGSGWEEGSGSPPGVTPLFSP	
Subunidad H	AChE <i>Drosophila</i> GTDGCDSSASISPRLOLLGIAALIYICAAALRTKRVF	- Precusores intracelulares (G ₂ ^A) anfílicos - Dímeros anclados por GPI, expuestos en la superficie de la célula (G ₂ ^A tipo I) - Dímeros solubles, excretados sin el extremo C-terminal
	AChE <i>Torpedo</i> ADGCELSSTSSSKGIFYVLSILYLFY	
	AChE rata ATEVPCTCPSPAHGAAPRPGPALSLSLLFFLLHS GLRWL	
Subunidad T	ACE-1 <i>C. elegans</i> ADVDPYLWIKQQMDKWQNEYITDWQYHFEQYKR YQTYRQSDSETCGG	- Monómeros, dímeros y tetrameros anfílicos (G ₁ ^A , G ₂ ^A , G ₄ ^A , tipo II) - Formas no anfílicas truncadas (G ₁ ^{NA}) - Tetrameros no anfílicos (G ₄ ^{NA}) - Asociaciones heteroméricas con subunidades de anclaje: - Colagénica, Q (formas asimétricas con tallo colagénico: A ₄ , A ₈ y A ₁₂) - Anclaje hidrofóbico (P) de 20 kDa (G ₄ ^A)
	AChE <i>Torpedo</i> ETIDEAERQWKTEFHRWSSYMMHWKNQFDQY---- --SRHENCDEL	
	AChE <i>Electrophorus</i> ---SKQERCNTL	
	AChE <i>Bungarus</i> DNIEEAERQWKLEFHLW-SAYMMHWKSNQFDHY---- --NKQDRCSL	
	AChE codorniz GPTEDAERWRLEFHRWSSYMGRWRTQFEHY---- --SRQQPCATL	
	AChE rata DTLDEAERQWRAEFHRWSSYMWHWKNQFDHY---- --SKQDRCSL	
	BuChE humana GNIDEAEWVWKAGFHRWNNYMMDWKNQFNDYT- ----SKKESCVGL	
Subunidad S	AChE <i>Bungarus</i> VDPPRADRRRRSARA	- Monómero soluble (G ₁ ^H)

Tabla 1.3. Subunidades de ChEs: dominios C-terminales que las definen. Las regiones subrayadas se cortan en la proteína madura; el último resto de la subunidad se indica en relieve. La región C-terminal hidrofóbica está sombreada en verde. Los aminoácidos aromáticos conservados en los péptidos T aparecen sombreados en azul. En los péptidos H y T se señalan las cisteínas que pueden formar enlaces intercatenarios (C) (Massoulié, Anselmet, et al. 1998 1615 *Id*).

- 1.3. Formas Moleculares de AChE y BuChE -

3.1. Formas asimétricas o con tallo de colágeno

3.1.1. Estructura cuaternaria

La característica estructural de las formas asimétricas de AChE y BuChE es la presencia de un tallo similar al colágeno, formado por la asociación en triple hélice de tres subunidades colagénicas (Q). Cada una de ellas, puede estar unida a un tetrámero de subunidades catalíticas tipo T, y por consiguiente, se denominan formas moleculares A₄, A₈, y A₁₂, en función de que posean uno, dos o tres tetrámeros. En la **Figura I.8.** podemos apreciar la estructura cuaternaria de la forma A₁₂ de la AChE de *Electrophorus* y *Torpedo*, respectivamente.

De acuerdo con los análisis bioquímicos, en los tetrámeros unidos al tallo de colágeno dos de las subunidades catalíticas se unen entre sí por enlace disulfuro, y las otras dos subunidades se asocian al tallo también por puentes disulfuro {Rosenberry & Richardson 1977 150 *fid*}. Estudios recientes han demostrado que las cisteínas no son imprescindibles para la unión de las subunidades catalíticas al tallo colagénico.

Estas formas asimétricas se caracterizan por agregar reversiblemente en medios de baja concentración iónica, poseen un gran radio de Stokes (>8 nm) y son sensibles a la colagenasa. La digestión completa con colagenasa libera los tetrámeros, efecto también producido por otras proteasas. En condiciones de digestión parcial, por ejemplo, a 20-25°C, la colagenasa libera tan sólo la parte distal del tallo, dando lugar a un incremento del coeficiente de sedimentación como consecuencia de la disminución del coeficiente de fricción de la molécula asimétrica (por ejemplo, de 16-17S a 20S para la AChE A₁₂ de *Electrophorus* y *Torpedo*) y un descenso del radio de Stokes (**Fig. I.8**).

Todos los vertebrados poseen formas asimétricas, incluidos los *Agnatha*, por ejemplo en la lamprea, *Petromyzon marinus*. No parecen estar presentes en invertebrados, por lo que estas formas debieron aparecer en algún estadio temprano de la evolución de los vertebrados, cuando aún existía un único gen de colinesterasa.

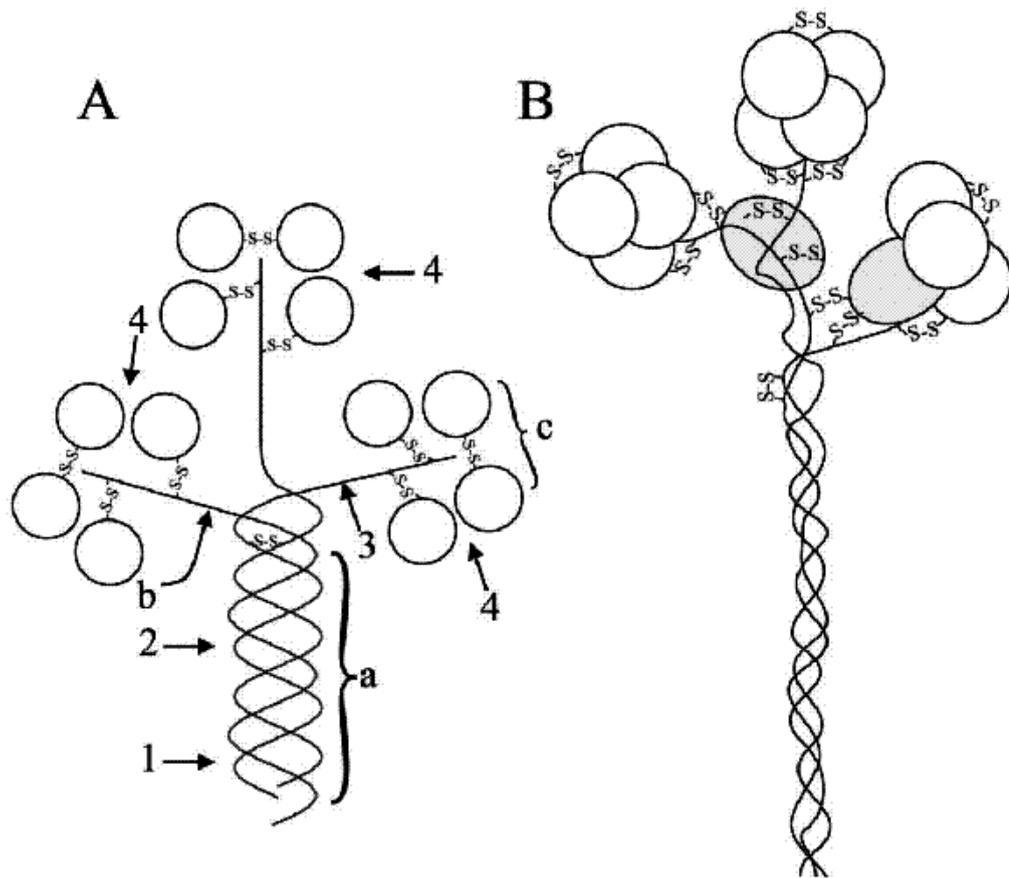


Figura 1.8. Estructura de la forma A₁₂ de AChE. (A) La molécula del órgano eléctrico de *Electrophorus electricus* posee un tallo de naturaleza colagénica constituido por tres polipéptidos en el que se aprecian: a) un dominio de triple hélice, b) una región no colagénica que corresponde a la zona de unión de cada polipéptido con un tetrámero de subunidades catalíticas (c). La estructura de la molécula es sensible al tratamiento con enzimas y detergentes; las flechas 1 y 2 marcan el sitio de ruptura del tallo por colagenasa a 20°C y 37°C, respectivamente; la tripsina rompe la molécula en la posición 3 liberando tetrámeros. La desnaturalización con SDS, sin reducción previa, permite separar los dímeros periféricos de la estructura central, que contiene el tallo y los dímeros internos (4). (B) En *Torpedo sp.*, la molécula A₁₂ de AChE, además de las subunidades catalíticas, contiene un número variable de subunidades de 100 kDa de función desconocida (coloreadas en gris). Tales subunidades se unen por puentes disulfuro a las subunidades colagénicas en sustitución, o además de las subunidades catalíticas. Tomado de {Rosenberry, Barnett, et al. 1980 353 /id}.

La expresión de las formas asimétricas es específica de los tejidos musculares y nerviosos. Las formas asimétricas de BuChE son menos abundantes que las de AChE, pero se han observado en músculo de rata y pollo. El músculo esquelético, sobre todo su placa motora, es rico en formas asimétricas de AChE {Bon, Vigny, et al. 1979 1112 /id}{Fernández, Duell, et al. 1979 1215 /id}{Fernández, Duell, et al. 1979 265 /id}. En mamíferos y aves, las formas A de AChE se localizan en músculo esquelético y cardíaco, nervio vago y ganglio periférico cervical superior {Gisiger, Vigny, et al. 1978 B045 /id}{Skau & Brimijoin 1980 1214 /id}.

El hallazgo en el músculo de pollos recién nacidos de formas asimétricas híbridas, en las que subunidades de AChE y BuChE están unidas a un mismo tallo colagénico, enfatiza la similitud entre AChE y BuChE {Tsim, Randall, et al. 1988 EST095 /id}{Tsim, Randall, et al. 1988 1060 /id}. Estas moléculas híbridas desaparecen en el pollo normal adulto {Tsim, Randall, et al. 1988 EST084 /id}, aunque permanecen en el músculo distrófico, posiblemente como restos de una organización molecular primitiva.

3.1.2. La subunidad colagénica Q

ColQ es la subunidad específica de colágeno, que forma el tallo de colágeno en las moléculas asimétricas de AChE y BuChE {Feng, Krejci, et al. 1999 ACHE002 /id}. La subunidad ColQ ha sido clonada en Torpedo y más tarde en mamíferos {Krejci, Coussen, et al. 1991 M058 /id}{Krejci, Thomine, et al. 1997 1608 /id}.

La estructura primaria de ColQ comprende: (1) un péptido señal; (2) un dominio N-terminal (Q_N), (3) un dominio central colagénico y (4) una región C-terminal.

En 1988 el Dr. Massoulié demostró que en mamíferos sólo hay un gen ColQ y que la proteína resultante se encarga de formar la triple hélice del tallo colagénico de las formas asimétricas de AChE y BuChE. El dominio N-terminal, Q_N , es un péptido de 17 aminoácidos con dos cisteínas contiguas y una pequeña región de anclaje rica en prolinas o PRAD (del inglés “proline-rich attachment domain”). El PRAD es esencial para la tetramerización de las subunidades AChE-T, por la interacción con un dominio rico en triptófanos (W) del extremo C-terminal de la subunidad AChE-T, también denominado WAT. Los estudios de delección y mutagénesis dirigida han demostrado que la asociación de las subunidades Q_N con los tetrámeros de AChE-T sólo depende del PRAD.

El dominio colagénico tiene la repetición característica de glicinas cada tres restos y la región C-terminal, Q_C , es rica en cisteínas. Experimentos de delección han demostrado que la parte distal del dominio C-terminal (Q_C), es indispensable para el ensamblaje de las hélices de colágeno y la producción de formas asimétricas, mientras que la parte proximal de dicho dominio es esencial para la trimerización {Massoulié 2002 1374 *íid*}. Los subdominios ricos en cisteínas y prolinas están altamente conservados entre los vertebrados. La eliminación de cualquiera de ellos impide la asociación de las tres hélices colagénicas. Ohno y col. han identificado en pacientes con síndrome miasténico congénito una mutación en una posición equivalente al nucleótido 1133 de la subunidad colagénica de Torpedo, cuyo resultado es la falta de formas asimétricas {Ohno, Brengman, et al. 1998 MT1862 *íid*}.

Las pruebas de mutagénesis han revelado que, pese a la importancia de los enlaces disulfuro, éstos no son imprescindibles para la asociación de las subunidades catalíticas con el tallo, sino que más bien el elemento crítico del PRAD es el número de prolinas sucesivas {Bon, Coussen, et al. 1997 EST096 *íid*}. Sin embargo, se considera que tras la asociación inicial de los tetrámeros al PRAD de la subunidad colagénica, la unión se fortalece y estabiliza por el establecimiento de enlaces disulfuro en los que intervienen las cisteínas adyacentes del PRAD y la cisteína C-terminal del péptido T. Esto explica que en las formas asimétricas de los tejidos, los tetrámeros están unidos al tallo por puentes disulfuro. Los cuatro péptidos T interactúan del mismo modo con el PRAD {Bon, Coussen, et al. 1997 EST096 *íid*} {Simon, Krejci, et al. 1998 4180 *íid*}. Los ensayos *in vitro* han revelado que el péptido T, muy conservado a lo largo de la evolución, es totalmente imprescindible para la interacción de AChE-T o BuChE-T con el PRAD. Tal es así, que si se incorpora este péptido T a otras proteínas (fosfatasa alcalina) se obtienen quimeras capaces de ligarse al PRAD {Simon, Krejci, et al. 1998 4180 *íid*}.

1993 EST093 /id}, aunque no está muy claro si la cisteína del péptido T interviene en tal función. Parece que la que la asociación de PRAD-tetrámeros estabiliza las subunidades catalíticas e impide su degradación, cosa que sugiere el incremento de actividad AChE en las pruebas de coexpresión de subunidades AChE-T y PRAD. Puede que dicha asociación enmascare una señal de degradación en el péptido T {Legay, Mankal, et al. 1999 1614 /id}. De hecho, se ha observado que las mutaciones en los dominios de AChE que intervienen en la oligomerización, como son las hélices que conforman el FHB (del inglés “four helix bundle”, racimo de cuatro hélices) y que permiten la exposición del péptido T, favorecen la degradación de la enzima {Morel, Leroy, et al. 2001 1339 /id}. Recientemente se ha visto que el péptido T induce procesos de degradación y por consiguiente, reduce notablemente la secreción de moléculas que tienen alterada su capacidad de oligomerización. Por lo tanto, puede decirse que el péptido T representa un nuevo punto de control en la liberación de AChE. Este péptido T forma una hélice α anfifílica que contiene una serie de restos aromáticos conservados. La sustitución gradual de tales restos suprime la degradación e incrementa la secreción de las subunidades de AChE. La coexpresión de estos mutantes con una proteína conjugada con el péptido PRAD permite el ensamblaje y secreción parcial de los mutantes defectuosos. De este modo, el enmascaramiento de las cadenas aromáticas laterales por un proceso de hetero-oligomerización rescata a la enzima de la degradación. La degradación tiene lugar en el retículo endoplásmico a través de la ruta ERAD (del inglés “endoplasmic-reticulum-associated degradation”), ya que es sensible a inhibidores del proteasoma pero no se detiene por brefeldina A. A su vez, parece existir cierta cooperatividad entre el dominio catalítico glicosilado y el péptido T no glicosilado, ya que el uso de kifunensina, un inhibidor de la manosidasa I del retículo endoplásmico, reduce la degradación. En consecuencia, este sistema se perfila como el modelo idóneo para estudiar los mecanismos que determinan la degradación de las proteínas multidominio correctamente plegadas {Belbeoch, Massoulie, et al. 2003 4134 /id}.

Se ha comprobado que un fragmento de 14 restos (586-599) del péptido T de la AChE humana exhibe cierta homología con el péptido β -amiloide ($A\beta$) de la enfermedad de Alzheimer; bajo condiciones fisiológicas el péptido puede autoensamblarse espontáneamente y generar las clásicas fibrillas amiloides {Greenfield & Vaux 2002 4161 /id}. Se ha observado que la estructura en α -hélice del péptido T completo (40 restos), que

interviene en las interacciones homoméricas hidrofóbicas necesarias para ensamblar subunidades de AChE, previene el desarrollo de una conformación amiloidea en hojas β , mucho más favorecida en el fragmento de 14 restos {Cottingham, Voskuil, et al. 2003 4148 /id}.

3.1.3. Interacciones iónicas y anclaje de las formas asimétricas.

A bajas concentraciones iónicas, las formas asimétricas pueden interactuar con componentes polianiónicos, como los glicosaminoglucanos {Bon, Cartaud, et al. 1978 401 /id}. Estas interacciones son responsables de su anclaje a las matrices celulares, e.g. la lámina basal neuromuscular {Peng, Xie, et al. 1999 1637 /id}, lo que explicaría la necesidad de tampones con alta concentración de sal para conseguir solubilizarlas. Posteriormente pueden darse otras interacciones entre las que se incluyen asociaciones covalentes con otros componentes de la lámina basal, posiblemente a través de la acción de transglutaminasas {Emmerling, Johnson, et al. 1981 4181 /id} o lisil-hidrolasas. Las formas globulares también pueden asociarse a la lámina basal de esta manera, pero con menos fuerza que las asimétricas.

La triple hélice de colágeno contiene dos dominios HBD (del inglés “heparin binding domains”) con aminoácidos básicos que son sitios de unión a heparina {Deprez & Inestrosa 1995 P154 /id}{Deprez, Doss-Pepe, et al. 2000 4205 /id}{Deprez, Inestrosa, et al. 2003 4190 /id}. A pesar de la distribución similar de sus cargas positivas, los dos sitios difieren en su afinidad por la heparina. La diferencia no está únicamente en el número o naturaleza de los restos básicos en cada sitio, sino más bien, en cambios estructurales locales de la triple hélice que pueden estar determinados incluso por regiones distantes de ColQ {Deprez, Inestrosa, et al. 2003 4190 /id}. En las uniones neuromusculares, estas regiones de unión a heparina podrían estar implicadas en interacciones específicas con distintos elementos de la lámina basal, permitiendo la orientación específica de las moléculas asimétricas de AChE {Deprez & Inestrosa 1995 P154 /id}{Deprez, Doss-Pepe, et al. 2000 4205 /id}{Deprez, Inestrosa, et al. 2003 4190 /id}.

La liberación de las formas A por heparina, dermatán sulfato y condroitín sulfato, así como por heparinasas y condroitinasas, sugiere un papel específico de los proteoglicanos,

heparán-sulfato y glicosaminoglicanos del grupo condroitín/dermatán sulfato en el anclaje de las formas asimétricas a la lámina basal.

El Dr. Ramírez y colaboradores mostraron que una fracción de las formas asimétricas del músculo podían ser solubilizadas con alta sal (A^I), mientras que la otra fracción (A^{II}) requería la adición de un quelante de Ca^{2+} , el EDTA {Gómez-Barriocanal, Barat, et al. 1981 C103 /id}{Ramírez, Gómez-Barriocanal, et al. 1984 C030 /id}. Las moléculas de AChE que constituyen estas dos fracciones parecen ser intrínsecamente idénticas, pero están implicadas en diferentes interacciones con la matriz extracelular, por medio de puentes salinos (A^I) o de Ca^{2+} (A^{II}). Ambas fracciones se solubilizan bien con heparina {Barat, Escudero, et al. 1986 208 /id}. La integración de las formas asimétricas en la estructura de la matriz extracelular parece estabilizarse progresivamente de formas A^I a formas A^{II} {Busquets, Pérez-Tur, et al. 1991 M9 /id} {Barat, Gómez-Barriocanal, et al. 1984 97 /id}{Fadic' & Inestrosa 1989 273 /id}.

En los tejidos muscular y nervioso, el tratamiento con detergentes permite liberar una cantidad limitada de moléculas asimétricas, las que se mantienen en las membranas extrasinápticas interna y externa fuertemente unidas a fosfolípidos {Nicolet, García, et al. 1987 448 /id}{García, Verdière-Sahuqué, et al. 1988 G079 /id} {Verdière-Sahuqué, García, et al. 1991 M012 /id}. La capacidad de unión con lípidos es una excepción a las características interacciones iónicas de las formas asimétricas.

En las membranas neuronales de ganglio cervical superior de rata, las moléculas asimétricas se liberan con tampones de alta fuerza iónica, aunque hay una fracción cuya solubilización requiere detergentes. La fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) es capaz de solubilizar parte de las formas A_{12} susceptibles de ser extraídas con detergente. Esto sugiere que el fosfatidilinositol puede estar implicado en la asociación de algunas formas asimétricas con las membranas {Verdière-Sahuqué, García, et al. 1991 M012 /id}, de modo que según el modelo propuesto, dos subunidades de los tetrámeros intervienen en la asociación con la membrana a través de un glicolípido. De acuerdo con esta suposición, tendríamos que considerar la existencia de dos tipos de subunidades asimétricas, las que poseen el fosfolípido y las que no lo contienen {Inestrosa, Roberts, et al. 1987 218 /id}{Inestrosa y col., 1987}.

3.2. Formas globulares de las colinesterasas

Dentro de este grupo se encuadran todas aquellas formas que carecen del tallo colagénico. Las formas globulares son más abundantes y están más ampliamente distribuidas que las formas asimétricas, especialmente en vertebrados {Silman & Futerman 1987 F053 /id}.

Las formas globulares constituyen un grupo heterogéneo en el que, según sus propiedades hidrodinámicas, en particular el coeficiente de sedimentación, encontramos monómeros, G_1 (entre 4 y 5S), dímeros, G_2 (6-7S) y tetrámeros, G_4 (9-11S).

A su vez, estas formas pueden contener sólo subunidades catalíticas o catalíticas y subunidades estructurales, como sucede con los tetrámeros de AChE 10S ligados a la membrana del sistema nervioso central (SNC) de mamífero a través de la subunidad PRiMA de 20 kDa {Inestrosa, Roberts, et al. 1987 218 /id}{Boschetti & Brodbeck 1996 P079 /id}{Boschetti y col., 1996}, los complejos (8S) de dímeros de AChE y una proteína del órgano eléctrico de Torpedo {Bon & Massoulié 1980 354 /id} o como ya vimos, con los monómeros de BuChE de plasma humano asociados covalentemente a la albúmina {Masson 1991 1556 /id}.

3.2.1. Formas globulares anfifílicas y no anfifílicas.

Las formas globulares de AChE esencialmente pueden dividirse entre las que requieren detergente para su solubilización y las que son solubles en tampones de baja fuerza iónica, en ausencia de detergente. Denominamos a la primera clase formas anfifílicas (G^A), y a la segunda, formas no anfifílicas (G^{NA}).

El término anfifilicidad alude a la capacidad de interactuar con micelas de detergente, bajo condiciones no desnaturizantes. Por consiguiente, pueden formar complejos con micelas de diversos detergentes (ver Fig. I.8). Las formas anfifílicas poseen un dominio hidrofóbico que puede anclarlas a las membranas, que falta en las formas no anfifílicas.

La formación de complejos enzima-detergente se manifiesta por los cambios en el coeficiente de sedimentación de la proteína, según sean las propiedades micelares del

detergente {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1996 P100 /id}. Esta propiedad exclusiva permite diferenciarlas de las formas no anfífilas. También se han observado cambios en el radio de Stokes y en la migración electroforética bajo condiciones no desnaturizantes {García-Ayllón, Gómez, et al. 1999 1587 /id}. En base a estos datos, con el uso de varios detergentes podemos conocer el comportamiento hidrodinámico de una determinada forma molecular de AChE o BuChE. Los detergentes más utilizados en estos trabajos de caracterización son el Triton X-100 y el Brij 96. La migración de las formas anfífilas en un gradiente de densidad de sacarosa se retrasa por la presencia de Triton en el medio, pero aún más por la de Brij 96 (que forma micelas de menor tamaño que el Triton) {Grassi, Vigny, et al. 1982 360 /id}{Toutant, Massoulié, et al. 1985 D001 /id}{Massoulié, Toutant, et al. 1988 1168 /id}{Bon, Toutant, et al. 1988 G001 /id}{Cánovas-Muñoz, Campoy, et al. 1990 L078 /id}{Sáez-Valero, Tomel, et al. 1993 N057 /id}{García-Ayllón, Gómez, et al. 1999 1587 /id}.

Como el tamaño del dominio o componente hidrofóbico de las formas anfífilas es bastante inferior al de la enzima, las moléculas de AChE y BuChE son consideradas ectoenzimas. Por digestión proteolítica limitada es posible eliminar estos dominios hidrofóbicos, permitiendo la liberación de moléculas catalíticamente activas, cuyo tamaño no se ve muy alterado, pero que ahora son incapaces de asociarse con liposomas y detergentes {Moya-Quiles, Villalba-Sánchez, et al. 1992 K059 /id}. Esto ocurre tanto para los dímeros {Bon & Massoulié 1980 354 /id}{Stieger, Brodbeck, et al. 1984 212 /id}{Kim & Rosenberry 1985 1446 /id}{Sáez-Valero, Poza-Cisneros, et al. 1996 CAN041 /id} como para los tetrámeros {Vigny, Bon, et al. 1979 151 /id}{Gennari & Brodbeck 1985 M178 /id}.

3.2.2. Formas globulares con subunidades AChE H: moléculas anfífilas tipo I.

Se conocen dos tipos de dímeros anfífilos de AChE (tipo I y II), cada uno generado por un ARNm maduro distinto. Los dímeros tipo I poseen subunidades H, que llevan un péptido C-terminal con una o dos cisteínas y una señal para incorporar un resto de etanolamina-glican-fosfatidilinositol, que se une por enlace amida al extremo carboxilo de la subunidad catalítica {Bon, Toutant, et al. 1988 G002 /id}. Por tanto, se denominan “ancladas por glicosilfosfatidilinositol (GPI)” (ver Fig. I.10). Este fosfolípido confiere propiedades anfífilas a las moléculas y las capacita para ligarse a las membranas.

Las moléculas con GPI unido se identificaron por primera vez en 1970, cuando al añadir la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol de *Staphylococcus aureus*, en ausencia de detergente, se observó la solubilización de AChE de los eritrocitos de ciertos vertebrados {Silman & Futerman 1987 F053 /id}. Estas moléculas se hallan en la superficie de las células sanguíneas de vertebrados, así como en músculo de *Xenopus* {Inestrosa, Fuentes, et al. 1988 G077 /id}, y órgano eléctrico de *Torpedo* {Futerman, Low, et al. 1983 370 /id}. También en riñón, hígado y timo de rata {Futerman, Low, et al. 1983 370 /id}, eritrocito {Low & Finean 1977 227 /id}{Roberts & Rosenberry 1985 329 /id}{Gómez, Nieto-Cerón, et al. 2003 BC068 /id} y músculo de ratón {García, Verdière-Sahuqué, et al. 1988 G062 /id}. En células tumorales humanas también se han encontrado dímeros tipo I {Sáez-Valero & Vidal 1995 P009 /id}{Sáez-Valero & Vidal 1996 P107 /id}{Sáez-Valero, Poza-Cisneros, et al. 1996 CAN041 /id} y monómeros en larvas de *Drosophila* {Toutant, Arpagaus, et al. 1988 G045 /id}. No se han observado moléculas de BuChE ancladas mediante GPI, a excepción de un “intermedio” de colinesterasa en músculo de platija {Stieger, Gentinetta, et al. 1989 H045 /id}.

Por tratamientos proteolíticos, se ha podido conocer la estructura y composición del resto GPI de AChE G_2^A de *Torpedo marmorata* tras su marcaje con trifluoro-fenil-diazirina {Stieger, Brodbeck, et al. 1984 212 /id}. La fracción no peptídica contiene etanolamina, un glicano de 6-8 monosacáridos de composición variable {Ferguson 1992 K067 /id}{Hooper 1997 S097 /id} y fosfatidilinositol, cuyos restos de ácidos grasos saturados e insaturados quedan embutidos en la membrana.

En la subunidad de AChE-H, la señal de incorporación del resto GPI reside en una secuencia peptídica consenso de corte y adición, localizada 10-12 restos antes del extremo C-terminal hidrofóbico. En el RE una transamidasa corta la secuencia e incorpora el glicolípido. El aminoácido que recibe el anclaje de GPI se denomina resto ω {Massoulié, Anselmet, et al. 1998 1615 /id}. Este resto, como los contiguos, $\omega+1$ y $\omega+2$, poseen una cadena lateral corta {Kodukula, Gerber, et al. 1993 4210 /id}{Piccolo, Azan, et al. 1994 O029 /id}. Los ensayos realizados en base a esta secuencia han revelado la influencia de los restos adyacentes a ω sobre la reacción de la transamidasa, en particular, el aminoácido $\omega-1$.

este dominio les permita interactuar con matrices hidrofóbicas {García-Ayllón, Gómez, et al. 1999 1587 /id}.

La importancia fisiológica de las moléculas con GPI radica en que son las únicas o las más abundantes en el sistema nervioso de *Drosophila*. Son las únicas observadas en el músculo estriado de *Torpedo* {Massoulié, Anselmet, et al. 1998 1615 /id} y su expresión en células hematopoyéticas de mamíferos se correlaciona con la diferenciación {Lapidot-Lifson, Prody, et al. 1989 144 /id}{Patinkin, Seidman, et al. 1990 L203 /id}, aunque se desconoce su significado biológico en la membrana de las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos y plaquetas) {Richier, Arpagaus, et al. 1992 K284 /id}{Martín-Valmaseda, Sánchez-Yague, et al. 1995 P133 /id}{Marcos, Sánchez-Yague, et al. 1998 BC003 /id}, especialmente cuando su actividad varía mucho entre distintas especies animales e incluso está ausente en las células sanguíneas de reptiles y aves.

La estructura del resto glicosilfosfatidilinositol depende de la maquinaria biosintética de la célula, por lo que su composición varía en las formas G_2 ligadas a la membrana plasmática de varios tipos celulares o en las mismas células procedentes de diferentes mamíferos. En un mismo tejido, también pueden coexistir varios tipos de dímeros de AChE que difieren en la fracción glucídica y/o lipídica. Por ejemplo, el anillo de inositol está unido a un dominio hidrofóbico, que en humanos, *Drosophila* y vaca, es un alquilglicerol, y en *Torpedo* un diacilglicerol. Se puede eliminar este dominio hidrofóbico fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) y con fosfolipasa D (PLD) de suero, generando derivados no anfifílicos.

La acilación del anillo de inositol {Li, Camp, et al. 1993 N155 /id} confiere resistencia a la fosfolipasa C, ya que no se puede formar el intermedio cíclico de fosfato, por lo que es necesario un tratamiento previo con hidroxilamina alcalina, para eliminar el grupo acilo. Este es el caso de la AChE de eritrocito humano, donde un hidroxilo del inositol queda esterificado con ácido palmítico {Roberts, Myher, et al. 1988 G137 /id}.

La adición del grupo GPI es un proceso muy rápido que ocurre tras la biosíntesis de la molécula de AChE. La acilación el anillo de inositol parece depender del equipo enzimático de la célula {Toutant, Richards, et al. 1990 BC051 /id}, y no de secuencias contiguas al péptido que rápidamente se elimina para incorporar el glicofosfolípido. Como

se demuestra por la sensibilidad diferencial a PIPLC de las moléculas de AChE de linfocitos (sensibles) y eritrocitos (resistentes) de ratones y conejos {Richier, Arpagaus, et al. 1992 K284 /id}.

Un posible significado biológico de la presencia de este anclaje de GPI podría ser el establecimiento de un control selectivo en la liberación y actividad de AChE, que puede tener lugar a varios niveles. Un punto de control vendría establecido por la acción de fosfolipasas endógenas {Low, Ferguson, et al. 1986 NT356 /id}, en respuesta a determinados estímulos. Así, por ejemplo, en el núcleo caudal y la sustancia nigra se produce la liberación de AChE en respuesta a una estimulación eléctrica o a iones K^+ {Greenfield, Cheramy, et al. 1980 4211 /id}, y también se ha observado que la estimulación de las células cromafines adrenales conlleva la liberación de AChE junto a noradrenalina {Mizobe, Iwamoto, et al. 1984 1225 /id}. A su vez, la actuación de la fosfolipasa endógena generaría diacilglicerol o alquilacilglicerol, dos segundos mensajeros activadores de la proteína quinasa C {Varela-Nieto, León, et al. 1996 S060 /id} {Brodbeck 1998 4212 /id}. Por otro lado, ciertos datos afirman que para la biosíntesis del precursor del glicofosfolípido de anclaje es necesaria la acilación del glicosilfosfatidilinositol. Así se establece un nuevo punto de control de la actividad enzimática de AChE, ya que la desacilación del glicofosfoinositol o de un precursor inmediato es un paso crítico para que la AChE se libere con la fosfolipasa {Li, Camp, et al. 1993 N155 /id}.

A. Procesamiento de las subunidades AChE-H

Aunque los péptidos C-terminales de las subunidades H de AChE de Torpedo y mamífero carecen de homología en su secuencia, comparten dos características funcionales: (1) la presencia de uno o dos restos de cisteína cerca del dominio catalítico, que permite la formación de dímeros por enlace disulfuro intercatenario, y (2) la existencia de una región hidrofóbica en el extremo C-terminal del péptido H, precedida por una señal de corte (8-10 restos) donde puede incorporarse un residuo de GPI {Massoulie 2002 4137 /id}.

Los procesos post-traduccionales de glicosilación tienen lugar en el retículo endoplásmico, de manera inmediata a la síntesis de la cadena polipeptídica {Ferguson, Duszenko, et al. 1986 1151 /id}. Un complejo transamidasa interacciona con la proteína recién sintetizada, eliminando la porción de la cadena polipeptídica que precede a la región

hidrofóbica y añadiendo un anclaje de GPI preformado al nuevo residuo C-terminal, denominado ω . Diferentes estudios han revelado la influencia de los restos próximos a ω y su importante papel en el establecimiento de ciertas restricciones en la unión del grupo GPI {Coussen, Ayon, et al. 2001 4141 /id}.

También se ha observado la secreción de niveles variables de precursores de AChE-H no procesados, que pueden contribuir en parte a la producción de AChE extracelular que, por ejemplo, encontramos en el plasma sanguíneo {Massoulié 2002 1374 /id}.

3.2.3. Formas globulares derivadas de las subunidades AChE-T

Las subunidades T de AChE y BuChE de vertebrados tienen la capacidad de asociarse para generar un gran espectro de formas moleculares. Las subunidades AChE-T producen homo-oligómeros anfífilicos y no anfífilicos, como podemos observar en la **Figura I.7** {Massoulié 2002 1374 /id} así como tetrámeros no anfífilicos asociados a ColQ o a PRiMA. Como ya hemos comentado en el **apartado I.3.1.**, el péptido T se caracteriza por tener series de siete restos aromáticos altamente conservados en vertebrados {Arpagaus, Fedon, et al. 1994 0007 /id}. Se ha propuesto que la interacción de las moléculas anfífilicas con micelas de detergente pudiera ser debida a una conformación en hélice α del péptido T, en la cual todas las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos estarían agrupadas en un bolsillo hidrofóbico {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}. También se postula que la hélice α podría plegarse sobre sí misma en una estructura de horquilla; de esta forma, una parte al menos del péptido T anfífilico quedaría expuesto en las formas anfífilicas, pero no en las no anfífilicas {Giles 1997 S076 /id}.

El péptido T de las subunidades AChE-T y BuChE-T de vertebrados está constituido por 40 y 41 restos respectivamente {Massoulié 2002 4137 /id}. En ambos casos, hay un resto de cisteína en la posición -4 del extremo C-terminal, que permite la formación de enlaces disulfuro intercatenarios.

Las subunidades T generan las especies G_1^A , G_2^A , G_4^A y probablemente, un hexámero de 13,5 S, además de los tetrámeros asociados con ColQ y PRiMA {Massoulié 2002 1374 /id}.

A. Dímeros y monómeros anfífilicos tipo II

Las subunidades AChE-T y BuChE-T producen monómeros y dímeros anfífilicos en proporciones variables, según la especie animal y tejido considerados.

Los dímeros de tipo II difieren de los de tipo I en su resistencia a las fosfolipasas; son solubles y no se agregan en ausencia de detergentes. La resistencia a las fosfolipasas C y D no excluye la presencia de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), aunque las marcadas diferencias entre sus propiedades hidrofóbicas y las que poseen las moléculas tipo I, sugieren que su dominio hidrofóbico, lejos de ser un glicolípido, reside en el péptido C-terminal expuesto (T_C) {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}.

Dentro de este grupo encontramos dímeros y monómeros que comparten propiedades similares. Los dímeros son abundantes en músculo de rata y pollo, mientras que los monómeros se encuentran en cerebro de rata y en cultivos de células T₂₈, de neuroblastoma de ratón. En Torpedo encontramos los dos tipos de dímeros, I y II {Duval, Massoulié, et al. 1992 K186 /id}. Los monómeros y dímeros anfífilicos tipo II también abundan en músculo de conejo {Moya-Quiles, Villalba-Sánchez, et al. 1992 K059 /id}.

Se ha caracterizado una forma anfífilica de BuChE en las células de la mucosa de intestino de rata, que por sus propiedades anfífilicas, puede incluirse dentro de este grupo {Sine, Ferrand, et al. 1991 TNN020 /id}. El plasma de ratón contiene predominantemente formas G_4^H de BuChE, pero también podemos encontrar pequeñas cantidades de moléculas G_2^A y G_1^A {García-Ayllón, Gómez, et al. 1999 1587 /id}.

B. Otras formas globulares homoméricas

Mediante experimentos de transfección en células COS de ADNc para las subunidades de AChE-T, se ha observado la producción de tetrámeros y oligómeros más pesados {Bon & Massoulié 1997 EST097 /id}. Las células COS, además de expresar las formas G_1^A , G_2^A y G_4^{NA} , producen tetrámeros anfífilicos (G_4^A) y un componente no anfífilico de 13,5 S que corresponde a un hexámero globular. La diferencia entre los dos tetrámeros, supuesto que sólo posean subunidades T, puede deberse a una diferente organización de sus péptidos T, como ya se había comentado previamente, de manera que en los tetrámeros anfífilicos al menos una porción de la región hidrofóbica del péptido T

quedaría expuesta, mientras que en los tetrámeros no anfifílicos dicha región quedaría oculta al medio.

También se ha detectado el componente de 13,5 S en oocitos de *Xenopus* que sobreexpresan subunidades AChE-T. Este componente, que se corresponde con un hexámero anfifílico, es secretado al medio a diferencia de las demás moléculas en las que el péptido T expuesto podría actuar como una señal de retención. Este hexámero también se ha identificado en cultivos primarios de células neurales de ratón. Es una estructura muy inestable, fácilmente dissociable en tetrámeros, dímeros y monómeros, incluso a temperatura ambiente {Massoulié, Toutant, et al. 1988 1168 /id}.

C. Tetrámeros con tallo hidrofóbico.

Es la forma de AChE predominante en el sistema nervioso de mamíferos y sus subunidades catalíticas están codificadas por el transcrito T.

Este tipo de tetrámeros son hetero-oligómeros cuyo dominio hidrofóbico está formado por una subunidad de 20kDa {Gennari, Brunner, et al. 1987 F028 /id}. La subunidad se encuentra asociada mediante enlaces disulfuro a las cisteínas de uno de los dímeros que constituyen los tetrámeros {Roberts, Doctor, et al. 1991 M019 /id}. Esta proteína, denominada PRiMA (del inglés, "proline-rich membrane anchor") y previamente "subunidad P", parece ser el modo de anclaje de AChE a las membranas celulares del sistema nervioso, de forma análoga a como la subunidad ColQ de las formas asimétricas se fija a la lámina basal de las uniones neuromusculares {Perrier, Massoulié, et al. 2002 1338 /id}.

PRiMA es una proteína integral de membrana de tipo I, con un dominio extracelular, una única región transmembrana y un dominio citoplásmico. La presencia de un péptido señal y un dominio hidrofóbico en su secuencia sugieren que el extremo N-terminal tiene una localización extracelular y el C-terminal intracelular.

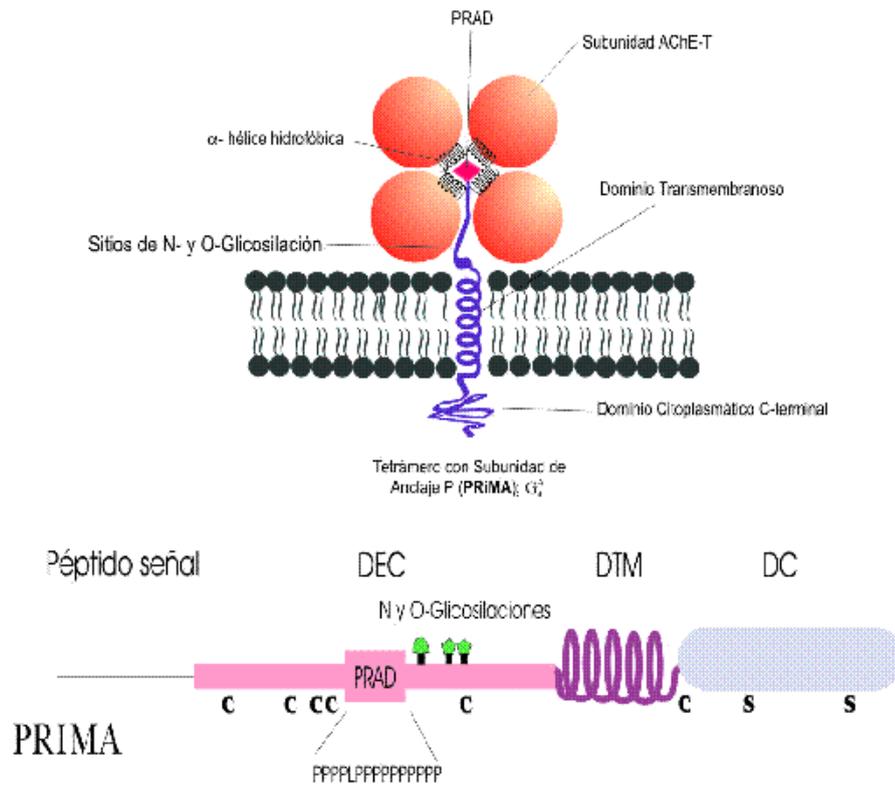


Fig. 1.11 Representación esquemática de la subunidad PRiMA. Podemos observar el péptido señal N-terminal, seguido de un dominio extracelular (DEC) que contiene 5 cisteínas, una secuencia rica en prolina (PRAD) y sitios potenciales de N- y O-glicosilación. A continuación se presenta el dominio transmembrana (DTM) y la región citoplásmica (DC) con las serinas susceptibles de fosforilación (Tomado de [Perrier, Massoulié, et al. 2002 1338 /id]).

La organización primaria de PRiMA sugiere que el segmento hidrofóbico que abarca los restos 92 al 113, es el encargado de establecer la unión a la membrana. Aunque el extremo C-terminal de este dominio contiene un sitio potencial de acilación, Cys 114 (C114), se ha comprobado que los ácidos grasos no son esenciales en el anclaje, ya que su eliminación con hidroxilamina o la sustitución de cisteína 114 por alanina (C114A) no suprime el carácter anfifílico de la proteína.

El dominio extracelular de PRiMA posee un motivo rico en prolina (posiciones 56-70) similar al PRAD en ColQ, que consiste en dos conjuntos de cuatro y diez prolina, seguidas de dos restos de leucina. Al igual que PRAD, es capaz de organizar tetrameros de AChE, pero con la salvedad de que se asocia con cuatro extremos C-terminales de

AChE-T (WAT). Aunque la unión de AChE con PRiMA no requiere enlaces disulfuro, el dominio N-terminal de PRiMA tiene cuatro cisteínas aguas arriba de PRAD, que pueden formar enlaces disulfuro con la cisteína C-terminal de AChE-T, del mismo modo que las dos cisteínas de ColQ se unen a un dímero de AChE.

En la búsqueda de la identidad de la proteína de anclaje de la AChE a la membrana celular, inicialmente se localizó una proteína con gran homología secuencial a PRiMA, denominada mCutA (del inglés, “mammalian copper tolerance A”). Esta proteína coprecipita con la AChE de cerebro bovino, aunque se descartó como responsable del anclaje de AChE ya que es incapaz de formar enlaces disulfuro con la AChE. Pero ensayos de transfección con oligonucleótidos antisentido contra mCutA han revelado su posible participación en la organización de los tetrámeros de AChE y BuChE y transporte de estas enzimas a la superficie celular. La acción de esta proteína es aún desconocida, ya que actualmente sigue sin establecerse ningún tipo de interacción directa entre mCutA y PRiMA o AChE {Perrier, Massoulié, et al. 2002 1338 /id}.

Al igual que la subunidad Q, PRiMA también puede asociarse a subunidades de BuChE. El uso de anticuerpos anti-PRiMA ha permitido observar que esta proteína de anclaje forma parte de los tetrámeros de AChE y BuChE en las membranas de órganos de ratón, incluyendo cerebro, músculo y corazón {Perrier, Massoulié, et al. 2002 1338 /id}.

En cerebro de mamíferos, además de los tetrámeros anfífilicos de AChE (G_4^A), encontramos tetrámeros hidrofílicos (G_4^H) que suponen el 20% de los tetrámeros. Estos últimos se extraen del órgano con medios de alta fuerza iónica sin detergente {Liao, Boschetti, et al. 1994 O064 /id}. En cerebro humano, la actividad extraíble con medios de alta concentración de sales alcanza un 20% de la actividad total {Sáez-Valero, Tornel, et al. 1993 N057 /id}. En líquido cefalorraquídeo aparece, además, un segundo tipo de molécula tetramérica hidrofílica, que es considerada como un componente de secreción, ya que se libera desde el sistema nervioso central {Tornel, Campoy, et al. 1993 N153 /id} {Dally & Greenfield 1994 NC013 /id}.

Una gran proporción de la actividad BuChE en el SNC de ave {Treskatis, Ebert, et al. 1992 K050 /id}, de ratón {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1996 P100 /id} y de humano {Sáez-Valero, Tornel, et al. 1993 N057 /id} corresponde a moléculas G_4^A ligadas

a la membrana, por lo que requieren detergentes (Triton X-100) o proteasas para su extracción. Estas moléculas son resistentes a PIPLC {Treskatis, Ebert, et al. 1992 K050 /id}.

En vertebrados, las formas heteroméricas con subunidades estructurales Q y PRiMA pueden ser las más importantes desde el punto de vista funcional, tanto para AChE, como para BuChE. La caracterización molecular de Q y PRiMA abre nuevos horizontes para detectar estas subunidades como elementos de anclaje, en otras proteínas distintas de las colinesterasas, pudiendo conocer sus posibles acciones en sí mismas, especialmente en lo que se refiere a la unión neuromuscular {Massoulié 2002 1374 /id}.

Anclaje y localización de las colinesterasas mediante PRiMA

PRiMA organiza los tetrámeros en una estructura casi-planar, al igual que sucede con los tetrámeros con tallo de colágeno, de modo que dos centros catalíticos se orientan hacia un lado del plano y los otros dos hacia el lado opuesto. Debido a la corta secuencia entre el PRAD y el dominio transmembrana, es de suponer que el tetrámero planar tiene una orientación paralela a la superficie de la membrana. Esta posición podría variar por la presencia de glicanos N- y O-ligados entre el dominio de unión a AChE y la región transmembrana de PRiMA. La acilación con ácidos grasos y la O-glicosilación de PRiMA podrían dirigir al heterooligómero hacia microambientes específicos de membrana.

Por otro lado, la localización de los complejos ChE-PRiMA, también puede depender de las interacciones de AChE o BuChE con componentes extracelulares, ya que las colinesterasas pertenecen a una superfamilia de α/β hidrolasas que incluye algunas proteínas de adhesión, tales como la neuroliquina y la neurotactina, y poseen un motivo en mano EF de unión a Ca^{2+} . Además, la región citoplásmica de PRiMA posee una agrupación de restos básicos próxima a la membrana, que también podría interactuar con componentes intracelulares, pudiendo ser regulada mediante fosforilación de serinas específicas (Ser131 o Ser142).

3.3. Oligomerización de las subunidades AChE-H y AChE-T.

La estructura tridimensional de los dímeros de subunidades de AChE-H muestra que las hélices $\alpha^3_{7,8}$ y α_{10} de cada subunidad contactan entre sí para dar lugar a una zona de contacto denominada haz de cuatro hélices o **FHB** (del inglés, “four helix bundle”).

Para la formación de los enlaces disulfuro en los dímeros de AChE-H, interviene una cisteína que está próxima al final del dominio catalítico. En cambio, en los dímeros de subunidades AChE-T, las cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro se localizan cerca del extremo C-terminal del péptido T. En los procesos de dimerización, la presencia de esta cisteína es esencial, y de hecho, si en las subunidades de AChE-H o AChE-T se sustituye por serina, se previene la dimerización.

Al introducir mutaciones en la superficie de las hélices $\alpha^3_{7,8}$ y α_{10} de la AChE de rata, en las que se sustituye un resto aromático (Phe527) por Glu o Leu, una alanina (Ala370) por un residuo voluminoso (Asn o Gln) o simplemente introduciendo un sitio potencial de N-glicosilación (Ala370Asn/Val372Thr), se observa una reducción de la dimerización de las subunidades AChE-H y AChE-T, demostrando así que los dos tipos de subunidades utilizan el mismo dominio de interacción, el dominio FHB (en morado) (ver Fig. I.12) {Morel, Leroy, et al. 2001 1339 *id*}.

Mutaciones del FHB comprometen la formación de los tetrámeros anfífilicos (G_4^A) y de las especies de 13,5 S, aunque las enzimas mutadas son capaces de seguir formando tetrámeros no anfífilicos (G_4^{NA}), a excepción del mutante glicosilado. Basándonos en estos resultados podemos inferir diferencias en las interacciones cuaternarias de los tetrámeros G_4^A y G_4^{NA} .

La coexpresión del fragmento terminal de ColQ, Q_N , con subunidades AChE-T portadoras de mutaciones puntuales en el dominio FHB, aún induce la tetramerización de las mismas, salvo cuando este dominio lleva N-glicanos. Parece que la cadena glicídica impide el correcto plegamiento de las subunidades de AChE-T, aun cuando el péptido T aislado es suficiente para unirse al PRAD {Simon, Krejci, et al. 1998 4180 *id*}. En consecuencia, se deduce que el ensamblaje de los oligómeros de AChE requiere la cooperación, o al menos compatibilidad, entre los dominios catalíticos y los WAT. Los

agregados de los tetrámeros no anfífilicos con el péptido Q_N se degradan, lo que sugiere que la exposición del péptido T actúa como señal de degradación {Massoulié 2002 1374 /id}. De hecho se ha podido comprobar la implicación del péptido T en la degradación de las subunidades activas no ensambladas a través de la ruta del ERAD (degradación asociada al retículo endoplásmico) {Belbeoch, Massoulie, et al. 2003 4134 /id}.

En los tetrámeros, la interfase dímero-dímero se extiende en una dirección perpendicular al plano constituido por los dos haces de cuatro hélices. Existe un pequeño bucle, denominado Ω constituido por los aminoácidos Cys257-Cys272 (en amarillo), que está muy conservado en las moléculas de AChE junto con las hélices α adyacentes. Este bucle sobresale de la superficie de cada subunidad y se asocia con el sitio aniónico periférico de la subunidad adyacente, ocluyendo estéricamente la entrada al desfiladero. También existe un bucle Ω de mayor tamaño, constituido por los restos Cys69-Cys96 (en rosa) situado sobre la entrada al desfiladero.

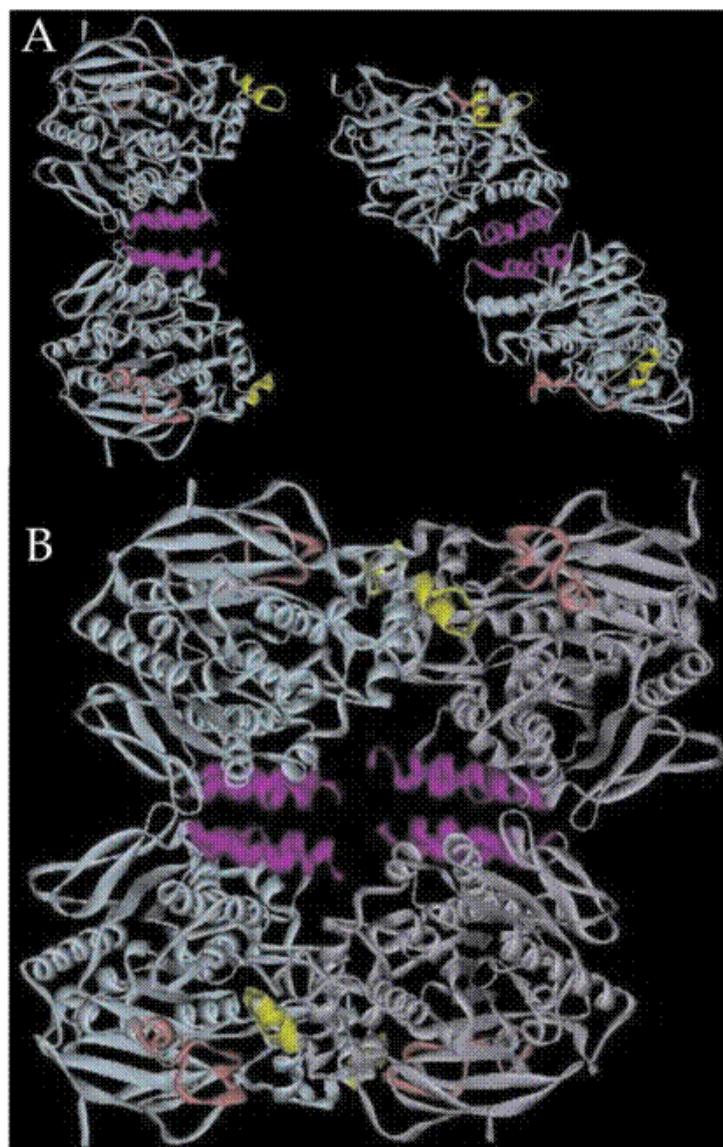


Figura 1.12. Asociación de las subunidades AChE-H y AChE-T. En la figura podemos observar la asociación de las hélices $\alpha_{7,8}$ y α_{10} (en morado) en la formación del FHB de dímeros y tetrámeros, así como la interacción de los bucles Ω de cisteínas (amarillo) que interactúan con el sitio aniónico periférico (PAS) de la subunidad adyacente.

4. SÍNTESIS, ENSAMBLAJE Y PROCESAMIENTO DE LAS MOLÉCULAS DE COLINESTERASA

Las moléculas de AChE son glicoproteínas que al parecer sólo poseen oligosacáridos unidos a Asn; los oligoglicanos suponen un 10-15% del peso de la subunidad {Bon, Huet, et al. 1976 A034 /id}{Rotundo 1984 C029 /id}.

Al igual que el resto de glicoproteínas, las moléculas de AChE se sintetizan en ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso (RER). El proceso se podría esquematizar de la siguiente forma: las moléculas de AChE recién sintetizadas incorporan el oligoglicano base y permanecen retenidas en el lumen del RER donde se ensamblan rápidamente {Rotundo 1984 C026 /id}. Posteriormente, pasan al aparato de Golgi, donde se modifican los oligosacáridos; se eliminan algunos restos de manosa y se adicionan N-acetilglucosamina y galactosa. Según la especie animal, también pueden incorporar ácido siálico. Finalmente, sólo aquellas moléculas que han completado con éxito el procesamiento de sus cadenas carbohidrato dando oligosacáridos complejos, completan su tránsito y marchan como moléculas de secreción, o permanecen asociadas a la superficie celular {Rotundo 1984 C026 /id}.

La glicosilación puede ser útil como marcador de la progresión de las ChEs a través de los diferentes compartimentos subcelulares, puesto que se conocen los mecanismos por los que los glicanos se modifican en el aparato de Golgi. De hecho, mediante el uso de lectinas que permiten analizar el grado de glicosilación, Rotundo fue capaz de demostrar que el ensamblaje de las formas con tallo de colágeno tiene lugar en las cisternas del Golgi trans {Rotundo 1984 C026 /id}.

En 1976, Walker y Wilson, a la vista de la aparición de nuevas moléculas de AChE activas tras la inhibición de la síntesis proteica con cicloheximida, propusieron la existencia de un paso de activación posterior a la síntesis de AChE. Este mecanismo de activación parece ser independiente de la biosíntesis enzimática {Rotundo 1987 505 /id}. En ensayos de inhibición irreversible con organofosforados, en ausencia de síntesis proteica, también se puede detectar actividad AChE, lo que reafirma la existencia de un depósito de subunidades inactivas, que se transformarán en activas en función de las necesidades fisiológicas {Tavitian, Hässig, et al. 1991 1559 /id}.

Este conjunto de moléculas inactivas puede suponer aproximadamente el 40-80% del contenido intracelular de enzima recién sintetizada, del que sólo una pequeña fracción se activan y transforman en oligoméros, siendo el resto de moléculas inactivas degradadas intracelularmente {Rotundo 1987 505 /id}, probablemente mediante la ruta del ERAD en la que ya vimos la participación del péptido T (ver apartado **I.3.1.1**).

También en la línea celular T₂₈ de neuroblastoma de ratón, por experimentos de marcaje radiactivo y análisis de sedimentación, se ha podido detectar la presencia de un depósito de enzima inactiva. Estos estudios permiten hacer un seguimiento del metabolismo celular. Las células T₂₈ contienen esencialmente formas G₁, en su mayoría intracelulares, y formas G₄, principalmente están expuestas en la superficie celular {Lazar & Vigny 1980 B048 /id}. La síntesis de formas G₁ transcurre en pocas horas mientras que la aparición de los tetrámeros requiere varios días. La actividad catalítica aparece 30 min después de que la síntesis de la cadena polipeptídica se haya completado, indicando la existencia de un precursor inactivo. El periodo de latencia puede deberse al tiempo invertido en conseguir el plegamiento correcto y establecer los enlaces disulfuro esenciales para que la forma enzimática exprese actividad catalítica.

Esta fracción inactiva, compuesta de moléculas G₁ y G₄, es más abundante en los tejidos embrionarios que en los adultos. Es metabólicamente estable {Chatel, Grassi, et al. 1993 K417 /id}{Chatel, Eichler, et al. 1994 O066 /id} y resistente a endoglicosidasa H, por lo que parece residir en el retículo endoplásmico. Se desconoce su significado biológico, aunque hay que destacar que un gran número de esterasas, incluidas las enzimas de la familia de las colinesterasas, residen en el retículo endoplásmico.

Aparentemente, no existen diferencias entre las moléculas activas e inactivas, lo que apunta a que la maduración del centro catalítico implica ciertos cambios conformacionales en la molécula de AChE en un estadio temprano de su biogénesis {Rotundo 1987 505 /id}. Este paso de maduración podría ser análogo al observado durante el procesamiento de las subunidades del receptor de ACh {Merlie & Sebbane 1981 4228 /id}{Merlie & Lindstrom 1983 4222 /id}.

Probablemente, en el plegamiento del polipéptido hasta la forma activa intervengan proteínas de choque térmico, como la chaperona BiP/GRP78 {Eichler, Toker, et al. 1991

1463 /id}. La **Figura I.13** expone algunos de los procesos implicados en la biosíntesis, ensamblado y transporte de la AChE.

A partir del estudio de la estructura cuaternaria de las diferentes formas de ChEs se ha propuesto una secuencia lógica de ensamblado, que partiría de los dímeros y su posterior asociación para dar tetrámeros, que en última instancia se acoplarían a subunidades estructurales para generar formas asimétricas o con tallo hidrofóbico. Sin embargo, la secuencia de acontecimientos in vivo no sigue un esquema tan sencillo puesto que ha de considerarse la acción de factores extracelulares y de otros elementos propios de cada tejido.

Las formas enzimáticas con tallo de colágeno parecen ser las únicas que se ensamblan tardíamente, durante la ruta de maduración a través del aparato de Golgi y transporte de las moléculas recién sintetizadas hacia la membrana plasmática {Rotundo 1984 C026 /id}{Inestrosa 1984 536 /id}. Se ha puesto de manifiesto que el tallo de colágeno se añade a los tetrámeros transcurridos 90 min después de la síntesis y ensamblaje de las moléculas globulares {Rotundo 1984 C026 /id}.

Como hemos mencionado antes, las moléculas de AChE son glicoproteínas en las que los carbohidratos constituyen el 10-15% de su masa molecular {Niday, Wang, et al. 1977 376 /id}{Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}. La proporción aumenta en las moléculas de BuChE, alcanzando el 25% de su masa {Weitnauer, Ebert, et al. 1999 1592 /id}.

Se han encontrado diferencias en la composición oligosacáridica en moléculas de ChE homólogas en un mismo tejido de animales diferentes {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id} o entre distintos tejidos o fluidos de un mismo animal {Tomel, Sáez-Valero, et al. 1992 K165 /id}{Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1997 S001 /id}.

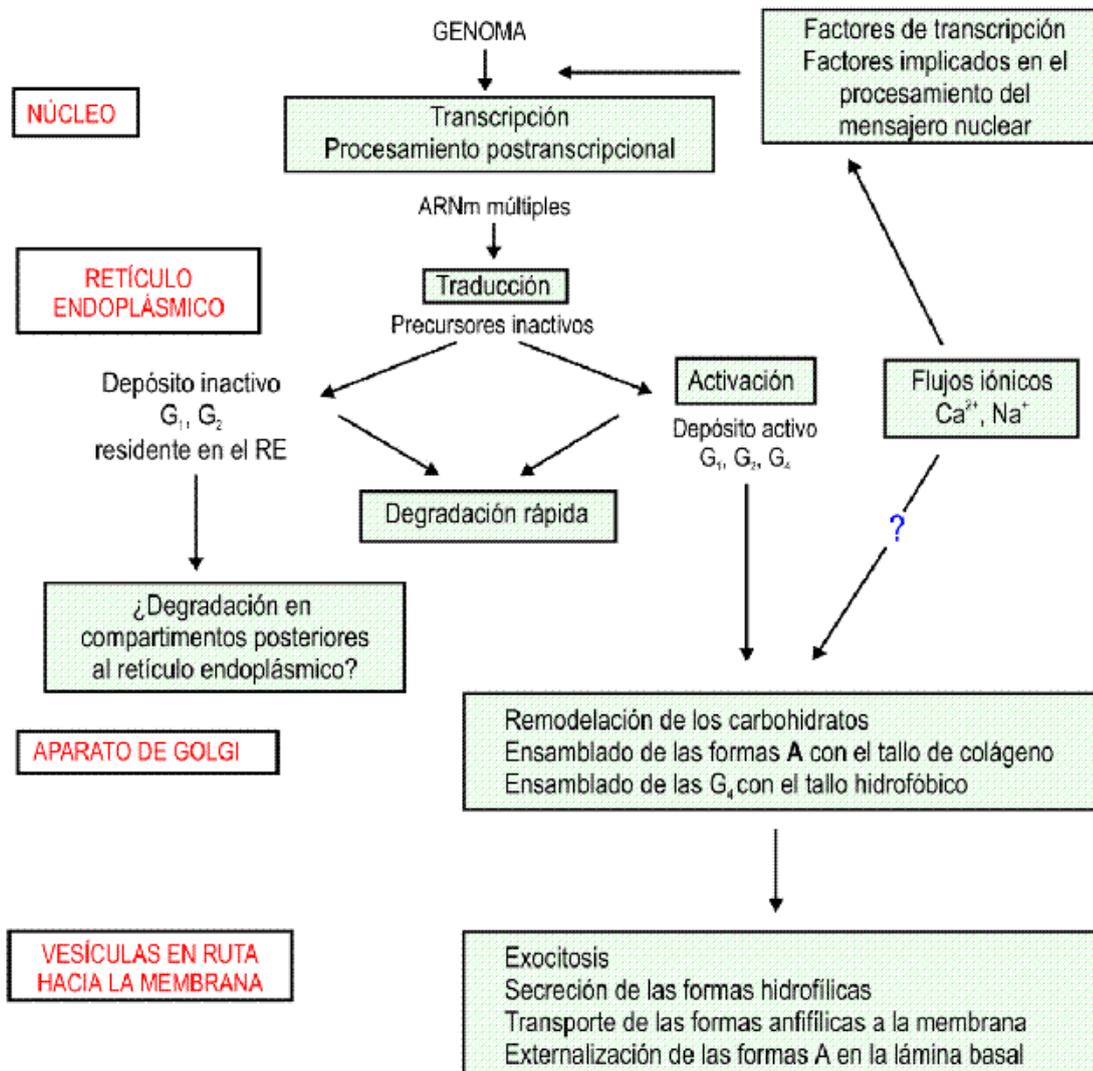


Fig. 1.13. Regulación de la biosíntesis, maduración y transporte de las formas moleculares de AChE. Según Vallete y col., 1991.

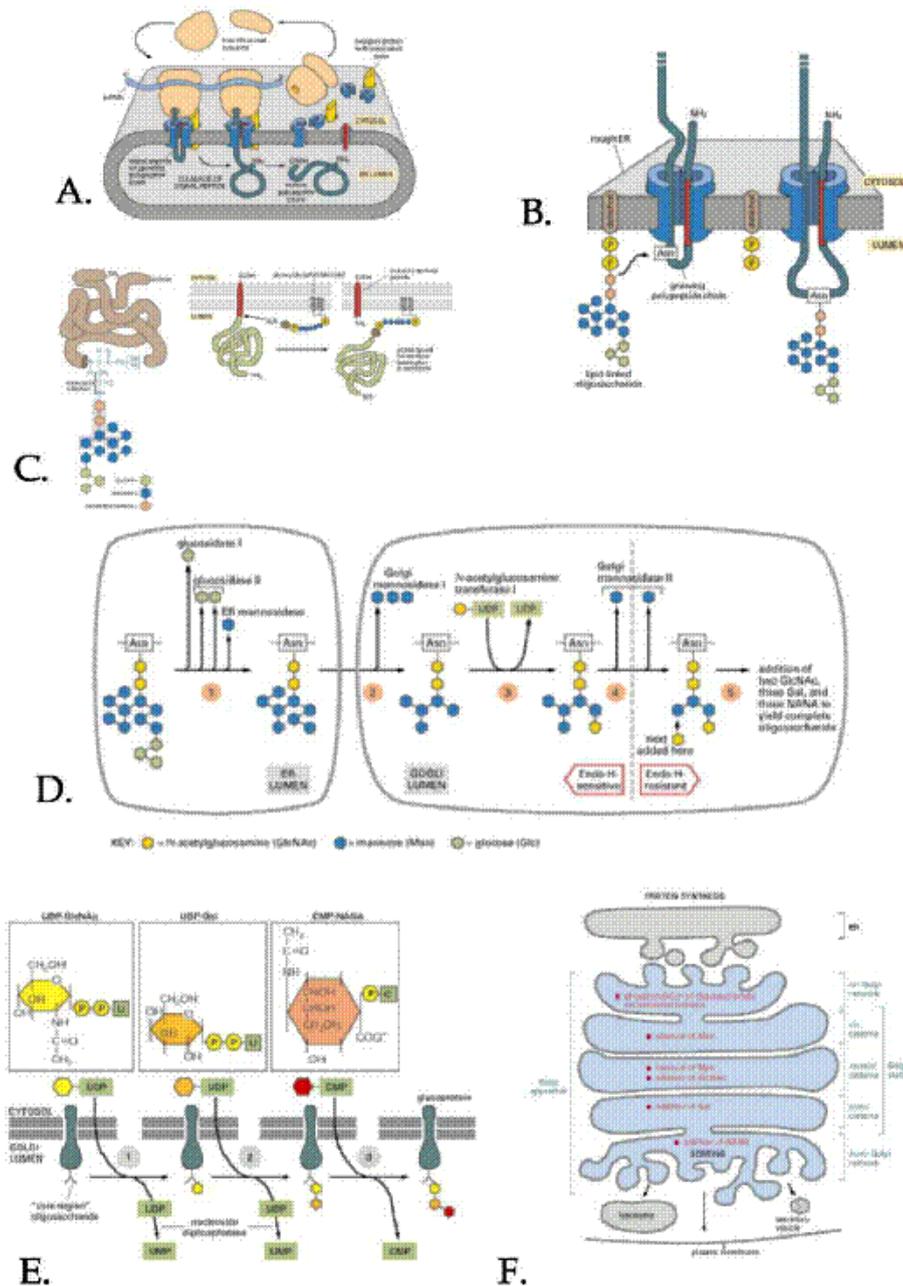


Figura 1.14. Síntesis y glicosilación proteica en el RER y remodelación de los oligosacáridos en el AG. Durante la síntesis proteica (A) tiene lugar la incorporación a la proteína de un bloque de oligosacáridos unidos a un lípido portador, el dolicol (B). En (C) podemos observar con más detalle la composición de dicho oligosacárido, así como la incorporación de un resto GPI, que también ocurre en una fase temprana de la síntesis polipeptídica. Posteriormente los azúcares son modificados en un proceso iniciado en el RER y continuado a lo largo del tránsito por las cisternas del AG (D y F) para dar lugar a oligosacáridos complejos a los que se ha adicionado N-acetilglucosamina, galactosa o ácido N-acetilneuramínico (GlcNAc, Gal y NANA respectivamente) (E).

Hasta el momento, no hay ninguna evidencia de la existencia de oligosacáridos O-ligados a las moléculas de ChE {Liao, Heider, et al. 1992 K130 /id}. El número de sitios de N-glicosilación depende del organismo {Rachinsky, Camp, et al. 1990 L106 /id}{Arpagaus, Chatonnet, et al. 1991 M160 /id}. Las secuencias primarias de AChE y BuChE humanas contienen respectivamente 3 y 9 sitios potenciales de N-glicosilación localizados en la superficie de la molécula. En el caso de la AChE, la eliminación de estos sitios por mutagénesis conlleva una reducción de la secreción enzimática del 20% al 1%, según que se eliminen uno o los tres restos de Asn. En cualquier caso, no parece que la actividad enzimática cambie {Velan, Kronman, et al. 1993 N140 /id}, si bien en cultivos celulares de pollo, la tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación) suprime la formación de enzima activa sin afectar a la síntesis proteica {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}.

Aunque se ha observado la conservación de algunos sitios de N-glicosilación en las ChEs de distintos animales {Liao, Heider, et al. 1991 M061 /id}, la maduración de las cadenas de glicanos varía en función del tejido, debido quizás a una glicosilación específica del mismo. La glicosilación también cambia según el estado de desarrollo {Parekh, Tse, et al. 1987 F125 /id}. A su vez, de acuerdo con su distinta localización subcelular, las diferentes formas moleculares sufren una glicosilación heterogénea. {Rotundo 1988 G034 /id}{Rotundo, Thomas, et al. 1989 H002 /id}{Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1996 P100 /id}{Vidal 1996 1411 /id}{Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1997 S001 /id}.

La composición de las cadenas de glicanos puede influir en la actividad enzimática. Así, diferencias en la composición de azúcares en los dímeros de AChE anclados por GPI, debidas a su diferente localización celular (eritrocitos y linfocitos bovinos), modifican la K_m para acetilcolina, a pesar de que, en ambos casos los dímeros muestran las mismas propiedades hidrodinámicas {Méflah, Bernard, et al. 1984 NT367 /id}. Es probable que los glicanos intervengan en la unión al sustrato alterando las cargas electrostáticas locales. Estudios cinéticos han puesto de relieve la influencia de las cargas superficiales de AChE en la velocidad de unión a ACh {Nolte, Rosenberry, et al. 1980 302 /id}.

Elec-39 es una inmunoglobulina IgM dirigida contra la AChE de *Electrophorus* capaz de reaccionar con las moléculas G_2^A de los órganos eléctricos de *Torpedo* {Bon,

Meflah, et al. 1987 1165 /id}{Musset, Frobert, et al. 1987 1513 /id}. Este anticuerpo está dirigido contra un carbohidrato y su especificidad es similar a la del anticuerpo HNK-1. Se sabe que HNK-1 y otros anticuerpos relacionados (NC-1, L2), interaccionan con glicolípidos y glicoproteínas implicadas en procesos de adhesión celular. El epítipo glicídico que reconoce este anticuerpo contiene glucuronilsulfato. Es posible que la AChE participe en los procesos de adhesión celular {Keilhauer, Faissner, et al. 1985 1514 /id}. En determinadas formas de AChE, existen secuencias de carbohidratos muy similares a los glicolípidos y glicoproteínas involucrados en funciones de adhesión celular (glicoproteína asociada a la mielina, N-CAM, ependiminas, etc.). Tal vez la abundante AChE en los órganos eléctricos de Torpedo y Electrophorus, desempeñe un papel estructural en la formación y estabilización de las sinapsis, además de su función catalítica {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}.

De acuerdo con todos los datos aportados, se puede deducir que la correcta glicosilación de las subunidades de ChE es importante para la oligomerización y posterior secreción de las moléculas finales {Rotundo, Thomas, et al. 1989 H002 /id}, así como para protegerlas de la proteólisis {Lucas & Kreutzberg 1985 D074 /id}. En algunos casos, se ha observado que las enzimas carentes de carbohidratos, o con glicosilación anómala, pueden perder su actividad o dirigirse a un compartimento celular erróneo {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1994 O003 /id}{Vidal 1996 1411 /id}.

Las lectinas constituyen una magnífica herramienta para el estudio de la glicosilación de las proteínas. La interacción de una determinada glicoproteína con concanavalina-A (Con-A), aglutinina de germen de trigo (WGA), aglutinina de ricino (RCA) o lectina del artrópodo *Limulus*, aporta evidencias indirectas de la presencia de manosa, N-acetilglucosamina (NAcGlc), galactosa terminal, o ácido siálico, respectivamente. Su uso ha permitido determinar la compleja composición oligosacáridica de las moléculas de AChE de la membrana celular o de secreción {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1997 S001 /id}{Moral-Naranjo, Campoy, et al. 1999 1586 /id}.

El uso de lectinas en un estudio temporal de la síntesis proteica permite conocer la secuencia de ensamblado de las formas de ChE. Tras la aplicación de un inhibidor irreversible de AChE, en muy poco tiempo se observa la aparición de formas globulares (monómeros, dímeros y tetrámeros), todas ellas reactivas con Con-A, revelando que se

ensamblan en el RER. La detección de formas asimétricas tiene lugar 90 minutos más tarde (tiempo suficiente para la incorporación de NAcGlc). Todas las moléculas asimétricas reaccionan con Con-A y WGA, pero tan sólo una parte de ellas interacciona con RCA, lo que indica que el ensamblado es anterior a la incorporación de galactosa terminal en las cisternas del Golgi trans.

La importancia fisiológica de esta diferente reactividad a RCA de las moléculas asimétricas reside en su diferente localización subcelular final. Las especies asimétricas dirigidas a la matriz extracelular del músculo esquelético sí incorporan los restos de Gal terminal, mientras que aquellas moléculas que no la poseen, pasan del Golgi a las membranas internas del músculo, en concreto, al retículo sarcoplásmico {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1997 S001 /id}.

La composición glicídica de las distintas formas de ChEs puede verse afectada a consecuencia de ciertas patologías, como la distrofia muscular en ratones. El uso de lectinas permite detectar esas diferencias y a su vez ofrece gran información acerca de los posibles mecanismos moleculares que acontecen. En músculo de ratones distróficos, la fracción de moléculas A_{12} no reconocidas por RCA disminuye notablemente. También se han detectado diferencias en el nivel de glicosilación de las formas G_4^A unidas a la membranas de músculo normal y distrófico; en este último aumenta considerablemente su reactividad con la lectina RCA {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1994 O003 /id} {Vidal 1996 1324 /id}.

Los patrones de glicosilación de las ChEs extraídas de diversos tejidos de un mismo animal son específicos, según queda constatado mediante electroforesis desnaturante con SDS y no desnaturante e interacción con anticuerpos. También se han detectado cambios en la glicosilación en función del estadio de desarrollo. Así, la movilidad electroforética de la AChE de eritrocitos de fetos humanos y de adultos es distinta debido a cambios en los carbohidratos {Bartha, Olah, et al. 1987 BC021 /id}.

En un mismo tejido también podemos encontrar cambios en la glicosilación de las distintas formas moleculares de ChE {Méflah, Bernard, et al. 1984 NT367 /id}. Por ejemplo, el anticuerpo Elec-39 interacciona sólo con las formas diméricas del órgano eléctrico de Torpedo y no con las formas asimétricas {Bon, Meflah, et al. 1987 1165

fid {Musset, Frobert, et al. 1987 1513 *fid*}. El uso de los anticuerpos HNK-1 y Elec-39 en células de neuroblastoma humano ha permitido demostrar que sólo las formas anfifílicas G_4^A de AChE llevan el epítipo reconocido por estos anticuerpos y que posiblemente participan en los procesos de adhesión celular, mientras que las moléculas G_1 y G_4 hidrofílicas carecen de él {Johnson & Moore 2001 1754 *fid*}. Mediante estos estudios comprobamos que cada clase de molécula está sometida a diferentes procesos de maduración que la conducen por rutas distintas hacia su localización final.

En músculo de ratón, los análisis de glicosilación con lectinas muestran diferencias en la interacción con WGA entre las moléculas asimétricas de AChE, las tetraméricas de AChE y BuChE y las formas ligeras (dímeros y monómeros) de ambas ChEs {Cabezas-Herrera, Campoy, et al. 1994 0063 *fid*}.

Dado que el patrón de glicosilación de las formas moleculares de ChEs es específico del tejido, el uso de lectinas puede aportar información relevante acerca del origen de aquellas formas que por alguna razón confluyen en un mismo medio, como es el caso de las formas de secreción. Ello queda bien ilustrado con el ejemplo de la BuChE de LCR (líquido cefalorraquídeo): la BuChE G_4^H de plasma humano interacciona casi al 100% con RCA, al contrario que su homóloga de cerebro humano {Tomel 1992 1567 *fid*}. Eso nos permite deducir que la BuChE del LCR (líquido cefalorraquídeo) procede del cerebro y del plasma. Pero a su vez, hemos de destacar que en los casos de meningitis bacteriana toda la BuChE G_4^H del LCR interacciona con RCA, lo que sugiere un trasvase de la enzima plasmática al LCR debido al cambio de permeabilidad de la barrera hematoencefálica como consecuencia de esta patología {Tomel, Sáez-Valero, et al. 1992 K165 *fid*}. Este caso en concreto es un perfecto ejemplo de la posible utilidad diagnóstica de los ensayos con lectinas. Así mismo, recientemente se ha visto que la AChE del córtex frontal y LCR (extracción postmortem) de pacientes con Alzheimer posee un patrón de glicosilación diferente al de la enzima de grupos control o de enfermos con otro tipo de demencias. En cambio, en el cerebelo de pacientes con Alzheimer, donde rara vez se forman placas amiloideas, la glicosilación de AChE es normal. Los estudios indican que la proporción de formas ligeras de AChE (G_2^A y G_1^A) aumenta en la corteza cerebral y LCR de pacientes con Alzheimer, al tiempo que cambia el patrón de glicosilación respecto al de las formas

homólogas de individuos sanos {Sáez-Valero, Sbema, et al. 1997 1553 /id}{Sáez-Valero, Sbema, et al. 1999 1650 /id}{Talesa 2001 4229 /id}.

En muestras de LCR (extracción ante mortem) de pacientes con Alzheimer también se ha observado una glicosilación anómala de AChE y BuChE respecto al grupo control {Saez-Valero, Mok, et al. 2000 4241 /id}{Saez-Valero, Barquero, et al. 2000 4244 /id}{Saez-Valero & Small 2001 4242 /id}. La glicosilación aberrante de AChE, representa un satisfactorio marcador de la patología, con una sensibilidad de detección de la patología del 60-80%, pero el análisis de la glicosilación de las dos enzimas, AChE y BuChE, en LCR (ante mortem) ofrece más de un 90% de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de pacientes con Alzheimer {Saez-Valero & Small 2001 4236 /id}. De esta manera, la alteración en la glicosilación de AChE y BuChE se perfila como un valioso marcador bioquímico para el diagnóstico fiable de Alzheimer, en combinación con otros marcadores de LCR, como A-beta ($A\beta$) o tau {Saez-Valero & Small 2001 4236 /id}.

4.1. Localización celular de las formas moleculares de AChE

El repertorio de formas moleculares de AChE posiblemente determine la ubicación correcta de las colinesterasas en su sitio funcional. En las células de neuroblastoma murino T₂₈, el uso de inhibidores impermeables permite demostrar que las moléculas G₄ se localizan esencialmente en la superficie celular, mientras que las formas G₁ y G₂ tienen una disposición mayoritariamente intracelular {Lazar & Vigny 1980 B048 /id}. Esta diferencia se ha confirmado in vivo en cerebro de rata, empleando el anticuerpo monoclonal anti-AChE ZR1. Este anticuerpo penetra en el sistema nervioso central cuando se inyecta en sangre: in vivo se ha visto su interacción con la forma G₄ de cerebro, pero no con la G₁, mientras que en disolución este anticuerpo reconoce por igual a ambas moléculas {Brimijoin, Balm, et al. 1990 L092 /id}.

Los anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de las subunidades H o T demuestran la diferente distribución de las formas A y G₂^A. Las formas A quedan restringidas a las áreas de los contactos sinápticos, mientras que las formas G₂^A están ausentes de las hendiduras sinápticas, se localizan preferentemente en la superficie de las terminales nerviosas {Abramson, Ellisman, et al. 1989 H044 /id}.

En las células polarizadas, como las células epiteliales, las proteínas con anclaje de glicolípidido se dirigen a la superficie apical {Lisanti, Le Bivic, et al. 1990 4256 /id}. En fracciones subcelulares del órgano eléctrico de Torpedo, la forma G_2^A con anclaje de GPI se localiza en la membrana presináptica, como demuestran los ensayos inmunocitoquímicos {Abramson, Ellisman, et al. 1989 H044 /id}{Mailly, Ben Younés-Chennoufi, et al. 1989 1471 /id}. Una combinación de técnicas de localización inmunohistoquímica y de digestión con PIPLC prueba la presencia de G_2^A en las terminales nerviosas {Eichler, Silman, et al. 1990 L094 /id}.

Probablemente, la existencia de los dos tipos de formas de AChE ancladas a la membrana, los dímeros G_2^A anclados por GPI y los tetrámeros G_4^A con tallo hidrofóbico, refleje la necesidad de dirigir la enzima hacia diferentes dominios membranales, si bien esta suposición no se ha demostrado experimentalmente. De hecho, en el sistema nervioso de mamíferos la forma G_4^A con PRiMA (mayoritaria en cerebro de mamíferos) tiene una localización preferentemente sináptica {Marquis & Fishman 1985 D041 /id}, mientras que en el sistema eléctrico de Torpedo abundan las formas G_2^A ancladas por GPI {Li & Bon 1983 1470 /id}{Futerman, Fiorini, et al. 1985 139 /id}{Mailly, Ben Younés-Chennoufi, et al. 1989 1471 /id}{Eichler, Silman, et al. 1992 K270 /id}.

4.2. Secreción de las colinesterasas

En diversos tejidos, las colinesterasas se transportan a la superficie celular y eventualmente se vierten al medio extracelular. Sólo se secretan las moléculas plegadas correctamente y con los oligoglicanos idóneos {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}. Las células nerviosas y musculares secretan AChE in vivo e in vitro {Carter & Brimijoin 1981 B074 /id}{Greenfield 1985 961 /id} y en la mayoría de los fluidos corporales como suero, saliva, LCR, etc., encontramos formas solubles de AChE, aunque se desconoce la función que ejercen.

En cultivos de células musculares de pollo, en los que la mayoría de las moléculas activas de AChE son secretadas {Rotundo & Fambrough 1980 B030 /id} esencialmente como formas G_2 y G_4 {Vallette, Vigny, et al. 1986 928 /id}, la tunicamicina inhibe la secreción, señalando la importancia de la glicosilación en este proceso. En cultivos neuronales, la sensibilidad a colchicina pero no a citocalasina B sugieren la participación

de los microtúbulos en el mecanismo de secreción, y descarta la necesidad de los filamentos de actina {Lucas & Kreutzberg 1985 D074 /id}.

In vivo, G₄ es la principal forma secretada por los músculos {Carter & Brimijoin 1981 B074 /id} y sistemas nerviosos central {Greenfield 1985 961 /id} y periférico {Biagioni, Odorisio, et al. 1989 1065 /id}. La secreción de las formas A de AChE y BuChE precede al anclaje a la lámina basal, e.g. en las uniones neuromusculares. La estimulación eléctrica de las terminales motoras nerviosas y de las células cromafines induce la secreción de AChE in vivo {Toutant & Massoulié 1988 11 /id}. In vitro, esta secreción parece estar regulada por la propia actividad muscular {Brockman & Younkin 1986 1083 /id}{Fernandez-Valle & Rotundo 1989 H001 /id}{Vallette & Massoulié 1991 M003 /id}.

En cultivos de células PC12, la liberación de AChE transcurre por los dos tipos de secreción conocidos: exocitosis constitutiva y regulada {Schweitzer 1993 N121 /id}. El conjunto de formas moleculares liberado difiere en cada caso, por lo que ha de existir cierta independencia en el empaquetamiento de las moléculas en los dos tipos de vesículas. Probablemente, la naturaleza del estímulo recibido determine el espectro de formas de AChE liberadas.

4.2.1. Transporte axonal de AChE.

En estudios con cultivos celulares de ganglio cervical superior de rata, en los que la extensión de las neuritas es promovida por el factor de crecimiento neural (NGF), se observa que en los cuerpos celulares predominan las formas globulares, G₄, G₂ y G₁, junto a algunas trazas de A₁₂, mientras que en los axones hay principalmente formas A₁₂ y, en menor medida, formas G₄, que se encuentran en la superficie exterior de la membrana axonal {Rotundo & Carbonetto 1987 1469 /id}.

En los nervios motores, la AChE viaja hacia las terminales nerviosas por el flujo axonal, cuyo componente lento transporta esencialmente a las formas ligeras G₁ y G₂, mientras que el flujo rápido axonal lleva la totalidad de formas A₁₂ y prácticamente el 20% de G₄, permaneciendo el resto en estado estacionario. Por estimulación de las motoneuronas se liberan las formas G₄ en las uniones neuromusculares {Skau & Brimijoin 1978 B032 /id} y en el sistema nervioso central {Greenfield 1985 961 /id}.

5. FISIOLÓGÍA NEUROMUSCULAR Y COLINESTERASAS

Todos los músculos de vertebrados poseen actividad colinesterasa, principalmente AChE, aunque también pueden presentarse importantes cantidades de BuChE {Vigny, Gisiger, et al. 1978 B005 /id}. De hecho, esta última es la única ChE en corazón de Torpedo. En algunas especies, la proporción de BuChE en músculo cardíaco llega a ser considerable {Gómez, Moral-Naranjo, et al. 1999 EP002 /id}.

El músculo esquelético de mamíferos es capaz de producir todos los componentes moleculares de AChE {Younkin, Rosenstein, et al. 1982 C027 /id}{Brimijoin 1983 C058 /id}{Younkin y col., 1982; Brimijoin, 1983}, aunque en otras especies se puede encontrar una sola forma molecular, como sucede en el músculo de *Electrophorus* con la forma A₁₂ {Bon & Massoulié 1978 220 /id}.

En cultivos de células musculares de mamíferos se comprueba que las especies A₁₂ y G₄ son principalmente extracelulares y las A₈, G₂ y G₁ internas {Younkin, Rosenstein, et al. 1982 C027 /id}{Brockman, Younkin, et al. 1984 1027 /id}{Inestrosa, Matthew, et al. 1985 209 /id}{Rubin, Chalfin, et al. 1985 1098 /id}. Mediante procedimientos bioquímicos y citoquímicos se ha podido demostrar la presencia de AChE en el retículo sarcoplásmico, tanto en las membranas de las cisternas terminales como en las del sistema longitudinal {Vidal, Muñoz-Delgado, et al. 1987 F077 /id}{Cánovas-Muñoz, Campoy, et al. 1990 L078 /id}{Campoy, Cabezas-Herrera, et al. 1992 K408 /id}.

En el músculo esquelético, se encuentra AChE en las uniones neuromusculares. Si describimos una sinapsis neuromuscular, las formas A se hallan ancladas a la lámina basal de la hendidura sináptica por asociación a glucosaminoglicanos, mientras que las formas unidas a la membrana, principalmente G₄^A con tallo hidrofóbico, y en ocasiones, G₂^A con anclaje de GPI, se encuentran a lo largo de las membranas pre- y postsinápticas, incluyendo los pliegues de unión. Experimentos de regeneración selectiva de fibras nerviosas o musculares han puesto de manifiesto que los dos tipos de fibras pueden contribuir a la producción de las formas asimétricas de AChE que se localizan en las placas terminales {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}.

La porción de membrana postsináptica directamente opuesta a la terminación nerviosa está totalmente ocupada por receptores de ACh (AChR) densamente empaquetados, por lo que las formas A de la lámina basal, próximas a los receptores, pueden hidrolizar muy rápidamente la acetilcolina, impidiendo la desensibilización de los receptores.

En los compartimentos que rodean a la sinapsis de los músculos de contracción rápida, abunda la forma G₄ con tallo hidrofóbico {Gisiger & Stephens 1988 G065 /id}, cuya función podría ser la hidrólisis de la ACh que difunde desde la hendidura sináptica. A su vez, los pliegues localizados a nivel postsináptico en los vertebrados podrían servir como hendiduras para la difusión de ACh y su posterior hidrólisis por la AChE que se localiza en ellos {Massoulié, Pezementi, et al. 1993 N025 /id}.

Por otro lado, el patrón de formas moleculares de AChE parece depender de la naturaleza del músculo {Toutant & Massoulié 1988 11 /id}. Por ejemplo, en los músculos rápidos de rata, como el extensor digitorum longus (EDL), hallamos principalmente G₁, G₄ y A₁₂, mientras que los músculos lentos, como soleus, poseen una distribución más compleja, con proporciones significativas de G₂, A₄ y A₈, y menos de G₄ {Groswald & Dettbarn 1983 53 /id}.

En ratones y ratas, los porcentajes de las formas moleculares de un determinado músculo parecen coincidir con los de la motoneurona que lo inerva, sugiriendo una adaptación mutua entre el nervio y el músculo {Gisiger & Stephens 1983 274 /id}{Gisiger & Stephens 1984 C039 /id}.

Durante el desarrollo, los músculos rápidos y lentos exhiben inicialmente un patrón de formas de AChE muy parecida, adquiriendo después su carácter distintivo. Esta maduración se ve afectada en las distrofias musculares {Skau 1983 C040 /id}{Yeakley, Janavs, et al. 1987 A8 /id}{Oliver, Chatel, et al. 1992 K395 /id}.

El tipo de estimulación muscular también influye en el patrón de formas moleculares de un determinado músculo. Ciertos experimentos apoyan que es el tipo de inervación el que impone dicho patrón, aunque la actividad muscular también ejerce un control preciso sobre la producción de formas de AChE. Esta regulación se puede observar bajo los efectos del ejercicio en condiciones fisiológicas. Entrenamientos de carreras prolongadas

inducen variaciones en los niveles de G_4 opuestas en músculos antagonistas: G_4 aumenta en los músculos extensores, que ejercen una actividad dinámica, y disminuye en los músculos flexores, cuya actividad es tónica.

La desnervación de los músculos esqueléticos conlleva un drástico efecto en las moléculas colinérgicas, que incluye un aumento considerable de los receptores de ACh (AChR) {Laufer & Changeux 1989 4257 /id}. El patrón de formas moleculares de AChE puede verse afectado de muy diversas maneras, aumentando o disminuyendo la actividad de formas G o A según la especie animal, lo que parece indicar que la regulación de la expresión de AChE depende de la especie y el tipo muscular. En rata, la desnervación produce en último lugar una reducción de la liberación de AChE G_4 en los músculos {Carter & Brimijoin 1981 B074 /id}.

Ya hemos comentado anteriormente que en cerebro, G_4 es la forma predominante de AChE, aunque también encontramos pequeñas cantidades intracelulares de G_1 y G_2 y, en menor medida, formas asimétricas. La desnervación del hipocampo de ratón supone un descenso de formas G_4^A y un aumento de formas G_1 , G_2 y G_4^{NA} , que en general se traduce en una fuerte caída de la actividad AChE. En los ganglios autónomos, encontramos AChE concentrada en la membrana postsináptica. La desnervación también produce un descenso de la actividad AChE de los ganglios, ya sean simpáticos o parasimpáticos.

6. FUNCIONES ALTERNATIVAS DE LAS COLINESTERASAS

Se ha sugerido que las colinesterasas puedan desarrollar acciones no relacionadas con la transmisión colinérgica {Greenfield 1984 346 /id}{Greenfield 1991 M087 /id}{Appleyard 1992 K266 /id}, en los que además podrían ejercer otras actividades catalíticas, como la actividad arilacilamilasa sensible a serotonina asociada a la BuChE {Balasubramanian 1984 113 /id}. Anteriormente hemos hablado de la capacidad detoxificante de BuChE y la posible participación de AChE en interacciones estructurales, dos ejemplos de las funciones alternativas de estas enzimas. A su vez, la presencia de colinesterasas en plantas {Madhavan, Sarath, et al. 1995 P059 /id}{Momonoki 1997 P082 /id} y bacterias {Rodriguez, Ellis, et al. 1993 N141 /id}{Pérez, Rodriguez, et al. 2002 P083 /id}, donde su significado biológico es aún desconocido, apoya la multiplicidad funcional de estas enzimas.

Entre las funciones no clásicas, figura en primer lugar la hidrólisis de ACh en contextos no sinápticos. En este sentido, se postula que la colinesterasas transportadas por la sangre en forma soluble (BuChE) o asociadas a células sanguíneas (AChE) se encargan de eliminar restos de ACh para evitar acciones colinérgicas no deseadas.

El abordaje del estudio de estas funciones atípicas ha de realizarse con cierta cautela, puesto que la actividad puede no ser el único factor relevante, a la vista de las posibles implicaciones estructurales de las colinesterasas y de la existencia de depósitos de AChE inactiva en distintos tejidos (**Apartado. I.4.**).

6.1. Colinesterasas en el crecimiento celular y el desarrollo embrionario.

Antes de comenzar la sinaptogénesis, se expresan proteínas del operador colinérgico, incluyendo las ChEs. De hecho, se ha propuesto que una característica común de las neuronas en desarrollo es la aparición de un sistema colinérgico primitivo, independientemente de los neurotransmisores que finalmente produzcan {Filogamo & Marchisio 1971 4260 /id}.

Se ha observado que tanto AChE como BuChE se expresan en estadios tempranos de la embriogénesis, antes de la formación de las sinapsis. A este nivel, podrían llevar a cabo un papel morfogenético. Esta temprana expresión ha llevado a introducir el término “colinesterasa embrionaria” {Drews 1975 A095 /id}{Layer, Girgert, et al. 1985 MT1755 /id}{Drews, Schmidt, et al. 1986 1436 /id}.

La distribución no colinérgica de AChE es notable si se consideran las elevadas cantidades de enzima que aparecen en numerosas neuronas no colinérgicas inmaduras, durante el desarrollo del sistema nervioso, sin ir acompañadas de ChAT o ACh.

Por otro lado, la existencia de proteínas transmembranales parecidas a AChE en el citoesqueleto, sugiere que las interacciones célula-célula pueden verse afectadas por competición entre AChE y esas proteínas, lo que podría explicar por qué en muchos tipos tumorales la superproducción de AChE coincide con las fases de proliferación celular o migración invasiva {Drews 1975 A095 /id}{Noda, Lammerding-Koppel, et al. 1998 4261 /id}.

La presencia de BuChE en las células de Schwann y en las células que rodean a los axones y conos de crecimiento de las fibras nerviosas en desarrollo, sugiere que su actividad puede influir en los procesos de elongación y locomoción axonal {Dubovy & Haninec 1990 BU002 /id}. BuChE comparte esta función con AChE, ya que en estudios del desarrollo del embrión de pollo, se ha observado una expresión diferencial de AChE y BuChE en cerebro y retina {Layer 1983 C102 /id}{Layer, Girgert, et al. 1985 MT1755 /id}{Layer 1990 1211 /id}{Layer 1991 M086 /id}{Layer 1991 M212 /id}.

Durante el desarrollo del sistema neuromuscular también se observa una expresión temprana de las ChEs. En primer lugar se expresa BuChE en el somito, en lugares de movimiento celular, la AChE aparece más tarde en la motoneurona y en la presunta célula muscular en desarrollo, durante los procesos de diferenciación neural o muscular {Layer, Alber, et al. 1988 G007 /id}.

En la proliferación y diferenciación de las líneas hematopoyéticas también se ha observado la influencia de mecanismos colinérgicos. La presencia de formas G₂ de AChE en la superficie de los timocitos suele usarse como marcador de su desarrollo y maduración {Rossi, Vicini, et al. 1991 BC063 /id}, mientras que en los megacariocitos se ha detectado la presencia de BuChE y AChE, como se detallará en el **Apdo. I.6.2**.

Koelle y colaboradores fueron los primeros en describir cierta dependencia entre la expresión de AChE y la de BuChE {Koelle, Koelle, et al. 1976 3782 /id}{Koelle, Smyrl, et al. 1977 4265 /id}{Koelle, Koelle, et al. 1977 4264 /id}. La presencia de moléculas activas de BuChE favorece la expresión de AChE, un fenómeno observado durante la diferenciación celular de neuronas o en periodos de recuperación de AChE tras su inhibición irreversible con agentes organofosforados, como el gas sarin {Koelle, Rickard, et al. 1979 4275 /id}{Koelle, Ruch, et al. 1982 4274 /id}.

Con frecuencia, una relación BuChE/AChE anormal durante el desarrollo de un tejido particular, indica una alteración patológica grave {Layer 1995 P077 /id}.

Se ha explorado el papel de AChE en el crecimiento de las neuritas empleando una batería de inhibidores. Los datos indican que la AChE puede actuar como un factor potenciador de crecimiento de las neuronas dopaminérgicas. Puesto que la adición de BW284c51 (inhibidor del sitio aniónico periférico, PAS) a cultivos organotípicos de

cerebro de rata, disminuye la supervivencia y crecimiento neuronal, mientras que el ecotiopato (inhibidor del sitio catalítico) no ejerce efecto alguno {Jones, Holmes, et al. 1995 NC019 /id}, se considera que la catálisis no está involucrada en el efecto promotor de crecimiento de las neuritas de AChE. Además, se ha visto que el efecto es más potente cuando es ejercido por las formas G₁ de AChE que por las G₄, lo que sugiere cierta participación del péptido H C-terminal en la promoción del crecimiento.

Mediante microinyección de DNA y transfección de células de glioma en cultivo {Karpel, Sternfeld, et al. 1996 NC026 /id}, se ha visto que las diversas isoformas de AChE ejercen efectos diferentes en el desarrollo celular y morfología de los astrocitos del SNC. Tan sólo las células transfectadas con la AChE-H humana mostraron un intenso crecimiento, lo que no ocurrió en la transfección con AChE-R. Por tanto, parece existir cierta correlación entre el desarrollo de la glía y la isoforma de AChE expresada.

En células de neuroblastoma, se ha observado que durante la etapa de diferenciación se produce un incremento en los niveles de AChE asociada a la membrana y de secreción, correspondiéndose principalmente con la isoforma G₄. Con inhibidores específicos para AChE y BuChE, así como con anticuerpos, ha demostrado la implicación de la AChE en la adhesión de las células de neuroblastoma. Esta función de adhesión es ejercida a través del PAS de la AChE. En cambio, la BuChE parece tener un efecto anti-adhesivo {Johnson & Moore 2000 NC058 /id}.

La expresión temprana de AChE en el cartílago de aves instigó el estudio posterior en embriones de mamíferos. En ratas, la expresión condrogénica de AChE es paralela al desarrollo de las patas posteriores {Umezú, Nagata, et al. 1993 N088 /id}. En humanos, la AChE se expresa en condrocitos y osteoblastos en función de su estado de proliferación y diferenciación, así como de la presencia de factores osteogénicos, tales como el 17β-estradiol y la 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃), que poseen sitios de unión en el promotor de ACHE {Grisaru, Lev-Lehman, et al. 1999 BM001 /id}. La supresión de la producción de AChE con oligonucleótidos antisentido, potencia la proliferación de osteoblastos tumorales en cultivo (células Saos-2). Por otro lado, la expresión del ARNm de AChE-T parece aumentar con la diferenciación de los osteoblastos, al tiempo que disminuye la densidad celular, y después de la semana 20 de gestación. Estos datos sugieren que la AChE-T puede estar implicada en la morfogénesis, ajustando los procesos

de proliferación y diferenciación para que la osteogénesis transcurra con normalidad {Grisaru, Sternfeld, et al. 1999 1647 *fid*} {Grisaru, Lev-Lehman, et al. 1999 BM001 *fid*}. Por inmunofluorescencia, se ha comprobado la distribución intracelular de AChE en osteoblastos, así como su participación en las interacciones celulares con la matriz extracelular que son esenciales para la formación y remodelación ósea {Genever, Birch, et al. 1999 4276 *fid*}.

En las células Caco-2 (procedentes de un adenocarcinoma de colon humano) también se ha observado que la actividad AChE aumenta según progresa la diferenciación celular {Plageman, Pauletti, et al. 2002 TNN026 *fid*}.

Los estudios con ratones homocigóticos AChE^{-/-} (sin actividad AChE) y heterocigóticos AChE^{+/-} (con el 50% de actividad) han sido de gran utilidad para determinar el papel fisiológico de AChE y BuChE y conocer en profundidad la contribución de AChE al desarrollo embrionario, así como el papel potencialmente compensatorio de BuChE. Los ratones nulos (knock-out) para AChE, incapaces de expresar actividad AChE, son capaces de sobrevivir hasta tres semanas después de su nacimiento {Xie, Stribley, et al. 2000 MT1861 *fid*}, lo que pone en entredicho la necesidad de AChE para la supervivencia. La supervivencia de los ratones homocigóticos AChE^{-/-} apunta a que, si bien la AChE juega un papel clave en la embriogénesis y desarrollo del feto, no es absolutamente necesaria, puesto que otras proteínas, como por ejemplo la BuChE, pueden suplir su falta {Li, Stribley, et al. 2000 BU001 *fid*}. Los ratones knock-out (AChE^{-/-}) son extremadamente sensibles a los efectos tóxicos de ciertos organofosforados, a dosis no letales para los ratones normales (AChE^{+/+}). La administración de bambuterol, inhibidor específico de BuChE, induce la muerte de los ratones knock-out, manifestando el papel compensador de BuChE.

El desarrollo relativamente normal de los ratones knock-out para AChE, contrasta con el fenotipo letal de los mutantes de *Drosophila*, inviábiles ya desde el estado embrionario {Greenspan, Finn, et al. 1980 MT1860 *fid*} debido a la carencia de BuChE. Estos y otros resultados indican que, BuChE y posiblemente otras serín-esterasas, suplen a la AChE cuando esta está ausente.

La falta de AChE en ratones AChE^{-/-} no impide la organogénesis en embriones; no obstante, los ratones muestran importantes alteraciones a partir del nacimiento, que se traducen en deficiencias durante el desarrollo. Los ratones AChE^{+/-} manifiestan fenotipo normal, salvo la reducción en un 50% de la actividad AChE y su extrema sensibilidad a los organofosforados. Ya que hay ratones heterocigóticos capaces de sobrevivir con un solo alelo de AChE, que provee de la cantidad de enzima necesaria para el mantenimiento de un desarrollo y crecimiento normal, podemos plantearnos si existen humanos heterocigóticos. De ser así, se podrían explicar las diferentes respuestas a los tratamientos con inhibidores de ChEs observadas en los enfermos con procesos neurodegenerativos.

6.2. Papel de AChE en la hematopoyesis

La AChE se expresa en diferentes líneas hematopoyéticas {Burstein, Adamson, et al. 1980 1434 /id}{Soreq & Zakut 1993 1570 /id}{Toutant, Richards, et al. 1990 BC051 /id}, sugiriendo que la enzima interviene en el ajuste de la composición celular hematopoyética normal. De hecho, en varias ocasiones se ha postulado un posible papel de la AChE como reguladora del crecimiento durante la hematopoyesis {Paoletti, Mocali, et al. 1992 BC052 /id} y se ha correlacionado el elevado riesgo de desarrollar leucemias con la exposición a insecticidas inhibidores de AChE {Brown, Blair, et al. 1990 L213 /id}. Los estudios epidemiológicos han revelado una relación significativa entre la disminución de las ChEs en sangre y la aparición de leucemias en trabajadores agrícolas expuestos a organofosforados {Brown, Blair, et al. 1990 L213 /id}.

En ratones, los análogos de ACh o los inhibidores de AChE, parecen aumentar la cantidad de plaquetas in vivo {Burstein & Harker 1983 4277 /id}, por lo que debe haber alguna implicación de los mecanismos colinérgicos en los procesos hematopoyéticos. La inhibición de la expresión del gen ACHE con oligonucleótidos antisentido en los progenitores de las células sanguíneas, interfiere con la producción de megacariocitos (los progenitores de las plaquetas, MKs) {Lapidot-Lifson, Patinkin, et al. 1992 4284 /id}{Patinkin, Seidman, et al. 1990 L203 /id}. Además, el gen ACHE reside en un locus cromosómico sujeto a frecuentes rupturas durante los procesos de malignidad hematopoyética {Ehrlich, Viegas-Pequignot, et al. 1992 4281 /id}, mutación y amplificación génica en leucemias {Lapidot-Lifson, Prody, et al. 1989 144 /id} y otras

anormalidades de las células sanguíneas, incluyendo la deficiencia plaquetaria asociada al lupus eritematoso {Zakut, Lapidot-Lifson, et al. 1992 BC055 /id}.

El uso de oligonucleótidos antisentido en cultivos de células de médula ósea de ratón conlleva la destrucción del ARNm de AChE a las 2 horas de su administración. Poco después, aumenta la concentración de ARNm de AChE y se producen cambios transcripcionales generales, expansión de los progenitores, proliferación de las células madre y supresión de la apoptosis en la progenie {Lev-Lehman, Ginzberg, et al. 1994 BC053 /id}, por lo que se puede atribuir a la AChE cierta participación en los procesos de expansión celular hematopoyética.

En humanos, la membrana de los eritrocitos posee una actividad AChE importante {Dutta-Choudhury & Rosenberry 1984 C035 /id}, aunque no sucede lo mismo en los megacariocitos maduros (MKs). En cambio, en roedores la actividad AChE es considerable en los megacariocitos y plaquetas, y muy baja en eritrocitos. Tras el estudio de diversas especies, se pudo concluir que en mamíferos, la AChE se encuentra en los eritrocitos o bien en las plaquetas {ZAJICEK 1957 4286 /id}. De hecho, recientemente se ha sugerido que los cambios en los niveles de expresión de AChE tienen lugar a nivel del progenitor común de MKs y eritrocitos, por lo que podrían estar involucradas citoquinas como la eritropoyetina o la trombopoyetina.

Por otro lado, la AChE parece ejercer una intrigante acción no colinérgica sobre las membranas de los macrófagos. Al cultivar macrófagos procedentes del peritoneo de rata en presencia de AChE, se observa un incremento en el consumo de oxígeno, independiente de los procesos respiratorios mitocondriales. La incapacidad del BW284c51 para bloquear este efecto, descarta la implicación de la actividad catalítica de AChE. Estos estudios demuestran la capacidad de AChE de inducir procesos de respiración no mitocondrial en macrófagos, independientemente de sus sitios catalítico y periférico {Klegeris, Budd, et al. 1994 NC015 /id}.

El papel que la AChE puede ejercer en los precursores de las células hematopoyéticas, puede tener cierta relación con la distribución de la enzima, nuclear o asociada a la membrana plasmática. Se ha demostrado que en los MKs la AChE puede residir en dos compartimentos diferentes: en los precursores de los MKs de rata se ha

detectado actividad AChE en las cisternas del Golgi perinucleares, mientras que en los MKs de rata y ratón, en sus diversos niveles de maduración, la actividad AChE se encuentra en los característicos túbulos y cisternas de las membranas lisas {Tranum-Jensen & Behnke 1977 4287 /id}. La localización nuclear de la AChE en los megacarioblastos humanos refuerza la hipótesis de un posible papel regulador durante la fase de proliferación temprana de los MK {Soreq, Patinkin, et al. 1994 BC019 /id}, pero dado que la secuencia de la AChE no posee ninguna señal de localización nuclear, ha de haber alguna proteína (o proteínas) desconocida asociada al núcleo que pueda transportar a la AChE hacia dicha localización.

6.3. Mecanismos catalíticos no colinérgicos.

Además de los ésteres de colina {Layer & Willbold 1995 1580 /id}, las colinesterasas son capaces de hidrolizar otros productos tan diferentes como pueden ser la aspirina y sus derivados neutros {Masson, Froment, et al. 1998 1589 /id}.

También se ha puesto de manifiesto la actividad arilacilamidasa (AAA), que permite que AChE y BuChE hidrolicen el enlace amida de algunas arilacilamidas, como el sustrato o-nitroacetanilida {George & Balasubramanian 1980 MT1757 /id}{George & Balasubramanian 1981 1444 /id}{Balasubramanian 1984 113 /id}. El desconocimiento de la identidad del sustrato endógeno de la actividad AAA hace que aún se ignore la función fisiológica de la misma, aunque se sabe que la serotonina (5-hidroxitriptamina) e inhibidores clásicos de las ChEs son capaces de reducir la actividad arilacilamidasa {George & Balasubramanian 1981 1444 /id}. Algunos autores han sugerido que las ChEs podrían estar implicadas en la percepción y/o modulación del dolor. De hecho, varios productos analgésicos, como el paracetamol, contienen un grupo acilamida susceptible de ser hidrolizado por esta actividad AAA. La serotonina prolongaría los efectos analgésicos al bloquear su hidrólisis vía inhibición de la AAA de las colinesterasas {Balasubramanian & Bhanumathy 1993 N114 /id}.

También se ha discutido ampliamente acerca de la existencia de una actividad proteolítica en las ChEs {Lockridge 1982 118 /id}{Small 1989 121 /id}, que podría estar implicada en la maduración y/o degradación de neuropéptidos, como en la generación de péptidos similares a encefalina a partir de cromogranina A {Ismael, Millar, et al. 1986 128

/id}. Todavía existe cierta controversia acerca de la asociación de las actividades colinesterasa y proteasa {Chatonnet & Masson 1986 1212 /id}{Checler 1990 111 /id}.

Anteriormente hablamos de la capacidad de BuChE de hidrolizar la succinilcolina (o suxametonio, anestésico miorelajante usado en cirugía), permitiendo que el paciente recupere la ventilación pulmonar. De hecho, en personas que han estado expuestas a insecticidas organofosforados, el bloqueo de la BuChE ralentiza en extremo la degradación del suxametonio, pudiendo provocar la aparición de episodios de apnea {Pérez-Guillermo, García-Carmona, et al. 1987 1191 /id}{Perez, Martinez Pretel, et al. 1988 4288 /id}. Pero la BuChE también es capaz de hidrolizar drogas como la fisostigmina {Silver 1974 19 /id}, cocaína {Lynch, Mattes, et al. 1997 MT1719 /id}{Lynch, Mattes, et al. 1997 MT1719 /id}{Browne, Slaughter, et al. 1998 MT1865 /id} y heroína {Lockridge, Mottershaw-Jackson, et al. 1980 1090 /id}{Valentino, Lockridge, et al. 1981 1101 /id} por medio de su actividad colinesterasa, aunque en algunos casos actúa con actividad no esterásica.

La BuChE del plasma transforma la cocaína en el derivado metiléster de la ecgonina. Este efecto queda patente por la persistencia del alcaloide en el plasma de cerdos hepatectomizados, más acusada si se inhibe la BuChE residual en el plasma con iso-OMPA {Kamban, Franks, et al. 1994 P065 /id}. Dada la aparición temprana de BuChE durante el desarrollo del SNC, es posible que la enzima proteja al feto de los efectos perniciosos del alcaloide así como de otros agentes tóxicos {Gatley 1991 M126 /id}.

Aunque la BuChE del plasma humano participe en el metabolismo de la cocaína, su potencial terapéutico, con vistas a la desintoxicación, es escaso por su reducida eficiencia catalítica {Mattes, Lynch, et al. 1997 S104 /id}. No obstante, últimamente se ha obtenido un mutante de BuChE A328W/Y332A que hidroliza al alcaloide con elevada eficiencia y puede ser suministrado a pacientes con sobredosis {Sun, El Yazal, et al. 2001 4292 /id}{Sun, Pang, et al. 2002 4291 /id}{Sun, Shen, et al. 2002 4290 /id}.

Por otro lado la capacidad de BuChE para hidrolizar acetilcolina, sin sufrir inhibición por exceso de sustrato, permite considerarla como una “enzima de apoyo” en la hidrólisis del neurotransmisor, cuando la actividad AChE esté inhibida o ausente, como ocurre a elevada concentración de colina o en ratones knock-out para AChE.

Se ha observado cierta correlación entre los niveles de BuChE en plasma y las alteraciones hepáticas. En la hepatitis se ha detectado un incremento de la aspartato aminotransferasa sérica del ácido glutámico (SGOT) simultáneo al descenso de la BuChE. La determinación de los niveles séricos de actividad BuChE podría ser útil para analizar la función hepática, especialmente en enfermedades crónicas del hígado, como la cirrosis, ya que la actividad BuChE parece estar relacionada con la actividad sintética de las células hepáticas.

A pesar de que la BuChE se expresa en una numerosos tejidos, como la sustancia blanca cerebral, los sistemas vascular, respiratorio, digestivo y urogenital, así como en diversas glándulas endocrinas y exocrinas {Silver 1974 19 /id}, aún no se le ha adjudicado ninguna función biológica evidente.

Se ha detectado actividad BuChE en las células de Schwann y entre los pliegues de mielina que rodean a muchos axones centrales. El hecho de que los compuestos organofosforados favorezcan la desmielinización apoya que la BuChE sea importante para el mantenimiento de la capa de mielina. Sin embargo, conviene señalar que otros inhibidores anti-colinesterasa no poseen dicho efecto desmielinizante {Davies 1963 4556 /id}.

Mediante estudios histoquímicos y de Western blot se ha puesto de manifiesto la capacidad de BuChE de formar complejos con β -lipoproteínas {Lawrence & Melnick 1961 4557 /id}, mediante los cuales la enzima sería transportada en la circulación en estado inactivo. La lecitina (fosfatidilcolina) es un componente esencial de las lipoproteínas. La base de esta unión sería una interacción meramente física en la que la cabeza polar de la lipoproteína, fosforilcolina si nos referimos a la lecitina, interaccionaría con los sitios esterásico y aniónico de la BuChE, con el consiguiente bloqueo de la actividad enzimática. De hecho, se han detectado interacciones similares entre AChE y lipoproteínas de la membrana de eritrocitos {Kutty, Chandra, et al. 1976 4293 /id} {Grafius, Bond, et al. 1971 4294 /id}.

Es de destacar que la síntesis de BuChE tiene lugar principalmente en hígado, donde además transcurre el metabolismo de los ácidos grasos {CLITHEROW, MITCHARD, et al. 1963 4295 /id}. Algunos de los intermedios de la β -oxidación, como la butiril-CoA

pueden dar lugar, en presencia de colina, a butirilcolina la cual posee una poderosa acción nicotínica, siendo necesaria su rápida eliminación para evitar la aparición de indeseables efectos tóxicos. Además, la presencia de BuChE en células endoteliales de capilares corticales y vénulas postcapilares del hígado sugiere que la BuChE ayuda a promover el crecimiento tisular previniendo la formación de ésteres de colina, potencialmente tóxicos, a consecuencia del intenso metabolismo de ácidos grasos en el tejido en crecimiento.

El aumento de los niveles de BuChE durante la ingesta de alimentos y su descenso en periodos de ayuno sugieren la participación de esta enzima en la asimilación de nutrientes {Waterlow 1950 4559 /id}{Harrison & Brown 1951 4558 /id}. También se ha observado un incremento en los niveles séricos de BuChE en condiciones asociadas a un metabolismo lipídico anormal, como sucede en la hiperlipoproteinemia {Cucuianu, Popescu, et al. 1975 4296 /id}{Cucuianu, Zdrenghea, et al. 1976 4297 /id}{Chu, Fontaine, et al. 1978 4298 /id}, obesidad {Chu, Fontaine, et al. 1978 4298 /id}{Cucuianu, Popescu, et al. 1968 4299 /id} y diabetes {Antopol, Tuchman, et al. 1973 4560 /id}. Estos pacientes tienen en común altos niveles de triglicéridos y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Aunque los datos sugieren la participación de BuChE en el metabolismo de los lípidos {Kutty & Payne 1994 4300 /id}, los estudios en células Caco-2 descartan su participación directa en la síntesis de triglicéridos {Randell, Rogers, et al. 2001 TNN028 /id}.

Hay quienes consideran a BuChE como una enzima superflua, dada la existencia de un número indeterminado de personas portadoras de variantes genéticas “silentes” de BuChE, en las que la actividad enzimática oscila entre el 0-10% de la normal. De las 39 variantes genéticas identificadas para BuChE, 30 corresponden a formas silentes {Lockridge & Masson 2000 BUREV002 /id} y son originadas por mutaciones puntuales o por cambios en la pauta de lectura durante su síntesis {Lockridge & Masson 2000 BUREV002 /id}.

El Tritón X-100 (TX-100) es un detergente frecuentemente utilizado para extraer la enzima de los tejidos. Se ha observado que la BuChE se inhibe por este detergente, lo que explicaría la aparente pérdida de actividad BuChE al centrifugar los extractos en gradientes de sacarosa con TX-100, en relación con la actividad recuperada en gradientes con Brij 96 o sin detergente {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1996 P100 /id}{Gómez, Moral-

Naranjo, et al. 1999 EP002 /id}. La inhibición se debe a que las moléculas monoméricas de TX-100, pero no los agregados micelares, se comportan como inhibidores reversibles porque ocupan el “hueco de acomodo del acilo” en el centro activo de la BuChE {Li, Stribley, et al. 2000 BU001 /id}. La resistencia de la AChE a tal inhibición se atribuye al menor tamaño del “hueco del acilo”.

6.4. Funciones no catalíticas

La regulación de la expresión espacio-temporal de AChE durante estadíos tempranos de la embriogénesis, en la extensión embrionaria de neuritas y desarrollo muscular (antes de la sinaptogénesis), así como la presencia de esta enzima en contextos no colinérgicos, como en neuronas no colinérgicas y en células hematopoyéticas, osteogénicas y neoplásicas, motivó el estudio de posibles “actividades no-clásicas” de AChE.

En un principio quedó muy clara la participación de AChE en la neuritogénesis mediante una actividad no catalítica, ya que el uso de inhibidores dirigidos a su centro activo, como edrofonio o tacrina, no bloqueaban tal efecto. En cambio, inhibidores del sitio aniónico periférico (PAS), como el propidio o la galamina, demostraron que el PAS es el responsable de la actividad neurotrófica de AChE {Muñoz, Aldunate, et al. 1999 NC050 /id}. También ha quedado demostrada la participación del PAS en los procesos de adhesión, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio catalítico o contra el PAS de la molécula de AChE {Johnson & Moore 1999 NC057 /id} {Johnson & Moore 2000 NC053 /id}. De hecho, se ha observado que la AChE humana es capaz de interactuar, a través del PAS, con la laminina-1 de ratón y con el colágeno tipo IV humano, dos componentes importantes de la matriz extracelular. Se ha establecido que esta interacción acontece mediante mecanismos electrostáticos, ya que se ve afectada por la fuerza iónica y el pH del medio. La laminina-1 posee una homología significativa con la β -neurexina, de la que se sabe que es capaz de interactuar con AChE en cerebro de vertebrados, mientras que el colágeno tipo IV posee restos de hidroxiprolina capaces de interactuar con los residuos del PAS {Johnson & Moore 2003 NC064 /id}.

La AChE es capaz de interactuar con el péptido beta-amiloide (**Abeta**, $A\beta$) y promover la formación de la fibrillas amiloides en la enfermedad de Alzheimer, gracias a un ambiente hidrofóbico cercano al PAS. Se ha identificado el motivo estructural de AChE

que participa en la interacción con A β . Inicialmente, los ensayos cinéticos indicaron que un péptido hidrofóbico de 35 restos de la superficie enzimática, por sí sólo era capaz de mimetizar los efectos de la molécula completa de AChE en la formación de las placas amiloides, y mediante análisis de RP-HPLC se determinó su incorporación en las fibrillas A β en formación {De Ferrari, Canales, et al. 2001 NC065 /id}. Posteriormente se ha concretado que un fragmento de 14 restos del péptido T de AChE (556-599 de AChE humana) es responsable del ensamblaje en las fibrillas amiloides debido a su homología secuencial con el péptido β amiloide. Como ya explicamos anteriormente, el cambio de una estructura en hélice- α a hebra- β en este fragmento de 14 restos favorece el autoensamblaje en las clásicas fibrillas amiloides bajo condiciones fisiológicas {Cottingham, Voskuil, et al. 2003 4148 /id}.

Greenfield y col. demostraron que la actividad motora o la estimulación sensorial en ratas y conejillos de indias está relacionada con la liberación de AChE junto a dopamina en la sustancia nigra, una estructura pobre en sinapsis colinérgicas. Como consecuencia, se produce la hiperpolarización de las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales debida a la apertura de canales de K⁺ dependientes de ATP. Se ha observado que este efecto es específico de AChE y no de BuChE, y que es independiente de la actividad colinesterasa, ya que esta función moduladora persiste después de la inhibición irreversible de AChE {Massoulié, Pezzementi, et al. 1993 N025 /id}.

La presencia de AChE en los progenitores de las células sanguíneas sentó la base de su posible participación en los procesos de hematopoyesis y trombopoyesis {Paoletti, Mocali, et al. 1992 BC052 /id}{Lev-Lehman, Deutsch, et al. 1997 BC054 /id}. Se ha demostrado la activación transcripcional del gen ACHE bajo la activación linfocitaria inducida por hemaglutinina, y se ha puesto de manifiesto que en este proceso colaboran las acciones catalíticas y no clásicas de AChE {Kawashima & Takeshi 2000 BC005 /id}.

En ratones transgénicos que expresan elevados niveles de AChE se ha observado un drástico descenso del ARNm que codifica a la β -neurexina en la médula espinal embrionaria, seguido de un posterior deterioro de la función neuromuscular {Andres, Beerli, et al. 1997 NC029 /id}, asociada a graves aberraciones en la ultraestructura neuromuscular y amiotrofia pronunciada. En función de estos datos se puede establecer la

hipótesis de que los mecanismos que regulan la expresión neuronal de AChE también intervienen en las rutas colinérgicas de interacción célula-célula. Se sugiere que la expresión de β -neurexina in vivo está concertada con los niveles de AChE {Andres, Beerl, et al. 1997 NC029 /id}.

Puede decirse que las uniones neuromusculares (“neuromuscular junctions”, NMJ) son sinapsis colinérgicas altamente especializadas y morfológicamente distintas {Sanes & Lichtman 1999 4301 /id}. Alteraciones en la actividad de las NMJ producen desórdenes musculares caracterizados por un deterioro de la estructura y función muscular. Al inducir un estado de estrés en las NMJ suprimiendo la actividad AChE con el inhibidor DFP, o aumentando la expresión de la variante AChE-T, se han observado elevados niveles de los ARNm de c-fos y AChE-R. Cabe destacar que ratones transgénicos para AChE-R cuadruplican la densidad de NMJ (Evron, T. y Soreq, M., datos no publicados) e incrementan el número de neuritas asociadas a pequeñas terminales inmaduras, por lo que se deduce que los mecanismos compensatorios inducidos por el estrés en NMJ están destinados a incrementar el número de sinapsis funcionales.

7. CONDICIONES PATOLÓGICAS RELACIONADAS CON LAS COLINESTERASAS

Ciertas anomalías en la composición de formas moleculares de AChE, en sus propiedades moleculares o en su distribución pueden relacionarse con diversas situaciones patológicas y, por consiguiente, ser útiles en su diagnóstico {Rakonczay & Brimjoin 1988 469 /id}. En un número considerable de enfermedades también se han observado anomalías en otros componentes el operador colinérgico, como la colina acetiltransferasa (enzima que sintetiza la ACh) o el receptor nicotínico (AChRn).

Debido a que el papel fisiológico de AChE es vital y que en vertebrados existe un único gen para esta enzima, no se conocen defectos asociados a la propia estructura del gen. En cambio para BuChE se han identificado distintas variantes derivadas de mutaciones genéticas naturales {Lockridge, Bartels, et al. 1991 1252 /id}{Lockridge 1991 1251 /id}{La Du, Bartels, et al. 1991 1413 /id}{Primo-Parma, Bartels, et al. 1992 1253 /id}{Takagi, Narahara, et al. 1997 S028 /id}{Lockridge & Masson 2000 BUREV002 /id}.

7.1. AChE en patologías humanas

7.1.1. Hemoglobinuria paroxismal nocturna

Es una enfermedad causada por la incapacidad celular de producir proteínas con anclaje de glicolípido, lo que origina una carencia del factor que acelera la descomposición o deterioro (decay accelerating factor, DAF), que protege a las células de la lisis mediada por el complemento. Por el mismo motivo, los eritrocitos carecen en su superficie de dímeros de AChE anclados mediante GPI, y este defecto se correlaciona con la gravedad de la enfermedad {Metz, Bradlow, et al. 1960 900 /id}{Chow, Telen, et al. 1985 28 /id}{Turner 1994 MT1737 /id}.

7.1.2. Defectos del tubo neural.

La AChE del líquido amniótico tiene un importante valor diagnóstico de posibles defectos del tubo neural, como la espina bífida. Generalmente, en tales casos se produce un incremento de la actividad total de AChE, aunque la detección de una banda específica o una electroforma anómala, en un gel de electroforesis no desnaturalizante, ofrece un método más seguro de diagnosis, sin falsos positivos. Probablemente esta electroforma se caracterice por un patrón de glicosilación diferente, como le sucede a una forma de BuChE localizada en el fluido cerebroespinal de niños que padecen meningitis.

El grupo el Dr. Vidal ha demostrado un incremento significativo de las actividades AChE y BuChE en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de niños con meningitis bacteriana {Tomel & Vidal 1991 M118 /id}{Tomel, Campoy, et al. 1993 N153 /id}. También se han observado alteraciones en el grado de interacción con RCA de la BuChE de LCR, de modo que en condiciones fisiológicas normales, sólo el 60% de la enzima reacciona con la lectina, mientras que la condición patológica no sólo aumenta la actividad BuChE en el LCR, sino también el porcentaje de interacción con la lectina. Se sabe que la enzima plasmática reacciona en su totalidad con la RCA {Tomel, Sáez-Valero, et al. 1992 K165 /id}, por lo que es probable que estemos observando una convergencia de la enzima de origen neural y plasmático, debido quizás a un deterioro de la barrera hematoencefálica y no por una alteración de la secreción de la BuChE neural {Tomel, Sáez-Valero, et al. 1992 K165 /id}. La fracción de BuChE-RCA⁺ se ha propuesto como índice del grado de

integridad de la barrera hematoencefálica, de modo que el aumento se correlaciona con el deterioro de la permeabilidad de la misma.

7.1.3. Síndromes Miasténicos.

Estas patologías se originan por mutaciones en alguna de las proteínas de la unión neuromuscular, esenciales para el correcto acoplamiento de la excitación con la contracción, o por autoinmunidad.

Uno de los síndromes miasténicos está relacionado con cambios en la composición de formas de AChE en las sinapsis neuromusculares {Engel, Lambert, et al. 1977 C116 /id}. La ausencia total de formas asimétricas produce una fatigabilidad extrema debida a la desensibilización de los receptores nicotínicos durante el ejercicio, empeorando la situación con la administración de edrofonio (un inhibidor reversible de AChE). La causa de este defecto probablemente reside en los procesos de ensamblaje, procesamiento y estabilización de las formas A en la lámina basal de la sinapsis o quizás a una anomalía en la expresión de las subunidades del tallo de colágeno. Como resultado, los músculos de los enfermos carecen de formas asimétricas, su ausencia hace que la cantidad de ACh en las proximidades de los receptores nicotínicos sea excesiva, una situación que se traduce en el funcionamiento anormal de los receptores {Lindstrom 1998 MT1760 /id}{Donger, Krejci, et al. 1998 4533 /id}{Ohno, Engel, et al. 2000 4534 /id}.

En la myasthenia gravis, la deficiencia de los receptores se ve compensada parcialmente por una gran disponibilidad de acetilcolina. Durante mucho tiempo, la falta de receptores se atribuyó a una respuesta autoinmune, que produciría anticuerpos frente a los receptores de acetilcolina reduciendo el número necesario para la excitación muscular. En el tratamiento de la myasthenia gravis se vienen utilizando inhibidores de la AChE para evitar la hidrólisis del neurotransmisor y compensar el déficit de receptores {Keesey 1998 4309 /id}. Sin embargo, estos inhibidores promueven la sobreexpresión de la variante “readthrough” de la enzima, AChE-R, en músculo de ratones sanos, al tiempo que dañan la integridad del músculo y la estructura de la unión neuromuscular (NMJ) {Lev-Lehman, Evron, et al. 2000 4312 /id}. De este modo, la AChE-R podría participar en la etiología de patologías diversas. El incremento de la síntesis de AChE-R con fármacos anti-AChE y los efectos adversos de esta variante de AChE ponen en entredicho la utilidad de los

inhibidores de AChE para detener la progresión de las miastenias y alertan sobre sus efectos nocivos en otras patologías. En cambio, recientemente se ha observado que el uso de oligonucleótidos antisentido, que disminuyen selectivamente los niveles de AChE-R en sangre mejoran la supervivencia, fuerza neuromuscular y el estado clínico de ratas moribundas con miastenia grave autoinmune experimental (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) {Brenner, Hamra-Amitay, et al. 2003 4106 /id}.

Una hipótesis alternativa en auge es que el tumor benigno del tímo (timoma) y la hiperplasia tímica, generalmente asociados a las miastenias, producen una hipersecreción de timopoyetina (una hormona tímica con gran afinidad de unión a los receptores de acetilcolina), que al unirse a los receptores deteriora la transmisión colinérgica a nivel de las NMJ {Fawcett & Bloom 1995 4561 /id}.

En una patología neuromuscular poco frecuente, la producción de autoanticuerpos contra la AChE conlleva la inhibición y precipitación de AChE {Livneh, Sarova, et al. 1988 1474 /id}. El resultado es una parálisis y atrofia muscular, que empeora tras la administración de edrofonio. Finalmente se produce la muerte por fallo respiratorio.

7.1.4. Anticuerpos contra las colinesterasas en ciertas patologías

En diversas situaciones patológicas, podemos encontrar anticuerpos dirigidos contra AChE. En la oftalmopatía de Grave, una enfermedad autoinmune, se generan anticuerpos contra tiroglobulina, capaces de reaccionar con AChE, debido a la homología secuencial entre ambas {Swillens, Ludgate, et al. 1986 4027 /id}{Weetman, Tse, et al. 1988 4314 /id}{Ludgate, Dong, et al. 1989 H069 /id}.

Brimijoin y colaboradores reprodujeron un modelo de reacción autoinmune anti-AChE. Usando anticuerpos capaces de reaccionar con todas las formas de AChE, observaron el desarrollo de un síndrome de simpatectomía permanente (ptosis, hipotensión y braquicardia) {Rakonczay & Brimijoin 1986 D045 /id}.

En pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, también se han detectado anticuerpos contra AChE. La interacción de los anticuerpos con las moléculas de AChE podría estar involucrada en la degeneración de motoneuronas característica de esta enfermedad {Hirano 1973 1476 /id}{Conradi, Ronnevi, et al. 1990 1475 /id}.

Por otro lado, en personas que han sufrido transfusiones sanguíneas o mujeres que paren repetidamente niños con grupos sanguíneos opuestos a los de la madre, aparecen anticuerpos contra la variante alélica de AChE que define el grupo sanguíneo YT.

7.1.5. Las colinesterasas en trastornos neurodegenerativos

Junto con otras alteraciones neurodegenerativas como la demencia frontotemporal, la enfermedad de Parkinson y el mal de Creutzfeld-Jacob, la enfermedad de Alzheimer o demencia senil tipo Alzheimer (Senile Dementia Alzheimer Type, SDAT o Alzheimer Disease, AD), se debe a un procesamiento anormal de ciertas proteínas.

La SDAT representa el mayor porcentaje de las demencias seniles irreversibles y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, en particular de la reciente, de la función cognitiva y de la orientación temporoespacial. Su origen es aún desconocido y probablemente multifactorial.

Una de las principales causas de su desarrollo parece ser la pérdida de la inervación colinérgica del córtex. Se ha observado pérdida neuronal en el hipocampo, un centro de la memoria y en la corteza cerebral implicada en el razonamiento, la memoria, el lenguaje y otros procesos del pensamiento. Disminuye la actividad AChE, sobre todo las formas G₄ de AChE {Atack, Perry, et al. 1983 C108 /id}{Younkin, Goodridge, et al. 1986 D057 /id}{Fishman, Siek, et al. 1986 X007 /id}{Arendt, Brückner, et al. 1992 K319 /id}, probablemente debido a la pérdida de las fibras colinérgicas presinápticas. Para preservar la cantidad de ACh, se ha venido tratando a los pacientes desde hace más de diez años, con tacrina y donepezil, dos inhibidores de AChE, que frenan las alteraciones en los primeros estadios del Alzheimer, aunque estos fármacos pierden su razón de ser una vez que han degenerado las neuronas colinérgicas. A pesar de que el nivel de AChE del fluido cerebroespinal parece ser el mismo en pacientes sanos y enfermos, se ha detectado en los pacientes de Alzheimer una forma de AChE que parece diferir en la glicosilación {Navaratnam, Priddle, et al. 1991 M073 /id}, como también sucede en la espina bífida.

Otros signos de la enfermedad son los acúmulos de proteínas ya en el interior neuronal ya en el espacio intercelular. Los primeros son las marañas o nudos neurofibrilares que recuerdan pares de hebras arrolladas en helicoide, constituidas por la proteína **tau**. Esta proteína suele asociarse a la tubulina, responsable de la formación de los

microtúbulos que, entre otras funciones, generan vías de tránsito de moléculas, nutrientes y componentes celulares. Las marañas neurofibrilares contienen actividades AChE y BuChE, juntas o separadas {Coleman, Geula, et al. 1992 K372 *fid*}. Pero estos cúmulos de tau no son exclusivos de la enfermedad de Alzheimer. Es mucho más importante el segundo tipo de depósitos, las placas seniles o placas amiloides, denominadas así porque su principal componente es el péptido β -amiloide (Abeta, A β). Las placas se forman en los espacios intercelulares y generalmente se acompañan de células reactivas inflamatorias, la microglía. A pesar de que las placas aparecen en la mayoría de la gente de edad, su abundancia en hipocampo y corteza cerebral es específica de los enfermos de Alzheimer y se generan mucho antes que las marañas neuronales {Peter H. & George-Hyslop 2001 4562 *fid*}.

A principios de los ochenta, surgió la denominada “hipótesis colinérgica” para explicar el origen del SDAT. Su desarrollo inicial está estrechamente vinculado a cambios estructurales en las sinapsis colinérgicas {Dekosky & Scheff 1990 1478 *fid*}, pérdida de receptores de ACh {Mash, Flynn, et al. 1985 1479 *fid*} y muerte de neuronas productoras de ACh {Davis & Maloney 1976 1480 *fid*}. La hipótesis colinérgica postula que la causa principal de la demencia es el descenso de la cantidad de ACh en regiones cerebrales relacionadas con la memoria y aprendizaje. Los resultados histoquímicos indican que la degeneración de las proyecciones colinérgicas que ascienden al córtex e hipocampo incide directamente en la etiología de la enfermedad.

Según algunos autores, existe una correlación entre el deterioro de la función cognitiva, la aparición de placas seniles y la pérdida de las enzimas ChAT y AChE del córtex frontal {Perry, Tomlinson, et al. 1978 1259 *fid*}. En pacientes con Alzheimer, la actividad AChE no sólo disminuye en varias regiones del cerebro, sino también en eritrocitos, linfocitos y plasma {Layr 1995 P077 *fid*}.

El hallazgo de actividades AChE y BuChE en las estructuras patológicas de los enfermos llevó a pensar que las ChEs estaban implicadas en la agregación o consolidación de las placas seniles. Al cruzar ratones transgénicos para el péptido amiloide humano con ratones transgénicos para la AChE humana, se observó que las crías, doble transgénicas para ambas proteínas, desarrollaban las placas un 30-50% más rápido que los padres. Su

cantidad aumentaba con la edad y llegaban a ser mucho más numerosas en los dobles transgénicos al cabo de 9-12 meses {Rees, Hammond, et al. 2003 4098 /id}.

De hecho, se ha observado que la forma G_4^A de AChE purificada de cerebro se une eficientemente al péptido $A\beta$ soluble, induciendo su agregación in vitro {Soto, Castaño, et al. 1995 1483 /id}. Posteriormente se demostró que la AChE favorece el ensamblado de los péptidos $A\beta$, sugiriendo que el entorno hidrofóbico próximo al sitio periférico de la AChE sea quien facilite el plegamiento y posterior agregación {Inestrosa, Alvarez, et al. 1996 EST099 /id}{Alvarez, Alarcón, et al. 1998 MT1672 /id}{De Ferrari, Canales, et al. 2001 NC065 /id}. Recientemente se ha observado que un fragmento de 14 aminoácidos del péptido T presenta homología secuencial con el péptido β -amiloide {Greenfield & Vaux 2002 4161 /id}. En general, la conformación en α hélice del péptido T completo (40 aminoácidos) evita el desarrollo de la conformación amiloideogénica rica en hebras- β del fragmento de 14 restos {Cottingham, Voskuil, et al. 2003 4148 /id}. Las hebras- β de este pequeño fragmento se autoensamblan espontáneamente en las clásicas fibrillas amiloides bajo condiciones fisiológicas. Quedan por establecer los mecanismos que inducen la reorganización de las subunidades de AChE a nivel de los aminoácidos 586-599 y que conllevan a la formación de las fibrillas.

La reciente implicación de la AChE en la apoptosis de células de neuroblastoma, avala la hipótesis de la posible asociación entre AChE y la apoptosis neuronal en la enfermedad de Alzheimer {Yang, He, et al. 2002 NC060 /id}.

Tras la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Parkinson se presenta como el trastorno neurodegenerativo más importante del SNC. Aunque no se sabe mucho de la implicación de AChE en esta patología, en el 30% de los casos se observa una disminución global de la actividad AChE, así como cambios en el patrón de formas moleculares, con la caída típica del contenido de formas G_4^A {Perry, Curtis, et al. 1985 X006 /id}{Ruberg, Rieger, et al. 1986 D048 /id}.

7.1.6. Las colinesterasas y la modulación de enfermedades asociadas al estrés.

Las respuestas al estrés hematopoyético producen cambios rápidos en la composición de las células sanguíneas que hacen aumentar la cantidad de linfocitos y

plaquetas {Brenner, Shek, et al. 1998 4315 /id}{Ceddia, Price, et al. 1999 4317 /id}{Bain, Phillips, et al. 2000 4316 /id}. Se sospecha que la AChE es uno de los factores que intervienen en la respuesta hematopoyética al estrés, partiendo de su participación en los cambios neuronales inducidos por estrés {Kaufer, Friedman, et al. 1998 MT1739 /id}{Soreq & Seidman 2001 REVACHE002 /id}.

AChE es expresada en las células hematopoyéticas de todos los mamíferos, de hecho, en ratón viene usándose como marcador citoquímico de los megacariocitos desde hace más de tres décadas {Jackson 1973 4318 /id}{Paulus, Deschamps, et al. 1980 4319 /id} y es bien conocida su implicación en la megacariocitopoyesis y producción de plaquetas {Burstein & Harker 1983 4277 /id}{Lev-Lehman, Ginzberg, et al. 1994 BC053 /id}

La variante readthrough de AChE, AChE-R, es expresada en células embrionarias y tumorales {Karpel, Ben Aziz-Aloya, et al. 1994 O133 /id}{Karpel, Sternfeld, et al. 1996 NC026 /id} y su cantidad aumenta en respuesta al estrés psicológico y a la inhibición de AChE {Meshorer, Erb, et al. 2002 4322 /id}. Después de un trauma, se observa una sobreexpresión persistente de AChE-R en cerebro de ratón, que está implicada en los cambios en la estructura y función neuronales asociados al estrés {Shohami, Kaufer, et al. 2000 4323 /id}{Cohen, Erb, et al. 2002 16 /id}.

El estrés agudo incrementa el riesgo de neurodegeneración. La variante AChE-R se acumula en el cerebro de mamíferos en periodos de estrés intenso y parece atenuar la posible neurodegeneración. Al contrario sucede con la variante sináptica (codificada por el transcrito T), que intensifica todas las características propias de las respuestas al estrés neuronal {Sternfeld, Shoham, et al. 2000 3814 /id}. Los ratones transgénicos para AChE-T son más sensibles a los accidentes cerebrovasculares {Shohami, Kaufer, et al. 2000 4323 /id} y a los inhibidores de AChE {Shapira, Tur-Kaspa, et al. 2000 4080 /id}. Diversos estudios en ratones transgénicos (para las variantes T y R de AChE) y control afianzan la función moduladora de AChE-R, que previene el salto desde un estado de estrés agudo hacia una enfermedad neurológica progresiva {Sternfeld, Shoham, et al. 2000 3814 /id}.

El equipo de la Dra. Soreq ha demostrado el papel activo de la variante AChE-R en el sistema hematopoyético y su posible implicación en la respuesta al estrés. Ha observado

que el tratamiento de los progenitores de las células CD34⁺ humanas con cortisol, a concentraciones similares a las del plasma durante el estrés moderado (0,6 μ M) aumenta 150 veces el nivel del ARNm para la AChE-R. Así mismo, en ratones sometidos a estrés natatorio se ha identificado el péptido C-terminal de AChE-R con anticuerpos. De hecho, los elementos promotores de AChE tienen sitios consenso para la unión de factores hematopoyéticos así como para factores inducidos por estrés. El potenciador distal de AChE liga al receptor de glucocorticoides a través de elementos de respuesta (GRE). Además, varios factores de transcripción hematopoyéticos tienen sitios de unión en el promotor de AChE, como STAT5, que junto con el receptor de glucocorticoides participa en la modulación de la inducción transcripcional {Pfitzner, Jahne, et al. 1998 4086 /id}{Batshake, Nilsson, et al. 1999 4087 /id}{Chida, Wakao, et al. 1998 4089 /id}{Fuller & Zhang 2001 4088 /id}. Los estudios sugieren que ARP, el péptido C-terminal de AChE-R, es un nuevo factor de crecimiento hematopoyético, capaz de promover la expansión del linaje mieloide y la trombopoyesis característica del estrés. Se ha propuesto incluso que ARP puede mejorar la eficiencia de la expansión de células madre hematopoyéticas ex vivo, para su posterior trasplante en la médula ósea {Deutsch, Pick, et al. 2002 4091 /id}.

Se ha observado un aumento de los ARNm para c-fos y AChE-R conforme cambian el número y estructura de las terminales motoras, las ramificaciones de los axones motores y en varias miopatías. Ya hemos comentado que los ratones que expresan elevados niveles de AChE-R, o en los tratados con DFP, aumenta el número de neuritas y de terminales inmaduras, lo que sugiere que las uniones musculares poseen mecanismos compensatorios, que se activan en condiciones de estrés para aumentar el número de sinapsis (Evron T. y Soreq, M., datos no publicados). Probablemente, las moléculas catalíticamente inactivas de AChE-R estén implicadas en estas acciones morfogénicas {Lev-Lehman, Evron, et al. 2000 4312 /id}.

Una de las causas de la infertilidad masculina es el estrés, aunque se desconocen las proteínas que intervienen en el proceso. Se ha observado una alteración en la calidad espermática asociada a la localización de AChE-R. Tras procesos de estrés, los niveles de AChE-R aumentan en los espermatozoides y otras células espermáticas, especialmente en la cabeza de los espermatozoides testiculares. En los ratones transgénicos para la variante R

de AChE se da un aumento persistente de la expresión, por lo que son un buen modelo de estudio de las condiciones de estrés prolongado. Bajo tales condiciones, las cabezas de los espermatozoides siguen expresando AChE-R, mientras que en los espermatozoides testiculares la expresión queda relegada a la cola, correlacionándose con una caída en el número de espermatozoides y su movilidad. Parece que la expresión de AChE-R se relaciona con la pérdida de la calidad espermática, por lo que podría erigirse como marcador molecular de infertilidad relacionada con el estrés {Mor, Grisaru, et al. 2001 4324 /id}.

7.1.7. Colinesterasas y cáncer

La actividad y naturaleza de las colinesterasas, puede verse alterada a nivel genético o proteico en diversos carcinomas, por lo que estas enzimas pueden ser importantes marcadores potenciales de ciertos desórdenes del crecimiento celular.

El grupo el Dr. Vidal ha aportado abundante información sobre la actividad colinesterásica y la composición de formas moleculares en meningiomas {Sáez-Valero & Vidal 1995 P009 /id}{Sáez-Valero & Vidal 1996 P107 /id}, gliomas {Sáez-Valero, Poza-Cisneros, et al. 1996 CAN041 /id}{García-Ayllón, Saez-Valero, et al. 2001 CAN042 /id} y neurinomas {García-Ayllón, Sáez-Valero, et al. 1999 1585 /id}. En meningiomas y neurinomas predomina la actividad AChE, mientras que BuChE prevalece en los gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas y meduloblastomas). Las diferencias observadas en los perfiles de formas moleculares de AChE y/o BuChE en meningiomas, gliomas y neurinomas pueden ser útiles para el diagnóstico, o para completar los resultados de los análisis histopatológicos. Los gliomas muestran niveles de BuChE particularmente elevados, acordes con la presencia de la enzima en células gliales {Sáez-Valero, Poza-Cisneros, et al. 1996 CAN041 /id}, mientras que la relación AChE/BuChE varía independientemente del grado de malignidad {Wolleman & Zoltan 1962 A101 /id}{Razon, Soreq, et al. 1984 C064 /id}{Sáez-Valero, Poza-Cisneros, et al. 1996 CAN041 /id}.

Se han detectado formas aberrantes de BuChE sérica en varias clases de cáncer, por ejemplo, en un leiomioma peritoneal que genera moléculas de BuChE desprovistas de ácido siálico, debido a las neuraminidasas circulantes {Ogita 1975 4563 /id}. En diversos

tumores humanos existe una correlación entre el crecimiento de células neoplásicas y la expresión anormal y/o amplificación de los genes para AChE y/o BuChE {Soreq, Ehrlich, et al. 1992 1564 /id}. También se ha observado la co-amplificación con varios oncogenes en algunas leucemias, megacariocitopoyesis anormales y en carcinomas ováricos malignos {Lapidot-Lifson, Prody, et al. 1989 144 /id}.

En el suero de pacientes de diversos tipos de cáncer (pulmón, ovario, mama, tracto digestivo...) sometidos a quimioterapia, se ha encontrado una actividad ChE anormal, intermedia entre AChE y BuChE, ya que responde a los inhibidores de AChE (BW284c51) y de BuChE (iso-Ompa) {Zakut, Even, et al. 1988 CAN023 /id}{Zakut, Ehrlich, et al. 1990 L110 /id}. El Dr. Vidal ha identificado ChEs híbridas (heterotetrámeros con mezcla de subunidades de AChE y BuChE) en gliomas, pero no en cerebro normal, meningiomas o neurinomas {García-Ayllón, Saez-Valero, et al. 2001 CAN042 /id}.

La policitemia verdadera (policitemia vera o eritremia) se origina por un trastorno clonal de las células precursoras hematopoyéticas que origina la proliferación en exceso de las líneas celulares eritrocítica, granulocítica y megacariocítica. A esta patología se le atribuye un estado precanceroso, ya que tras la aplicación de agentes mutagénicos aparecen neoplasias, concretamente, leucemia mieloide aguda {Landaw 1986 MT1659 /id}. En las células sanguíneas de los pacientes se ha detectado una intensa amplificación de los genes de las ChEs, así como de los oncogenes c-raf, c-myc y c-fes/fos. Quizás en estados precancerígenos, los genes amplificados de las ChEs podrían intervenir en el mantenimiento del estado proliferativo. De hecho, en la mayoría de los tumores analizados, el gen de BuChE se amplifica antes que el de AChE y a su vez, ambos se amplifican antes que los oncogenes {Soreq & Zakut 1993 1570 /id}, de manera similar a lo que ocurre en el estado embrionario {Layer 1983 C102 /id}.

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo que, junto a la proliferación celular, permite asegurar la homeostasis en los tejidos. Este mecanismo ha de estar muy regulado, ya que alteraciones en el mismo prolongarían la supervivencia celular, lo que podría contribuir a la transformación neoplásica celular. El envejecimiento celular proporciona un ambiente favorable para la inestabilidad genética y la acumulación de mutaciones. De hecho, los cambios en las rutas apoptóticas se relacionan con la

aparición de resistencia a fármacos, radiación o destrucción celular por respuestas inmunológicas.

Las administración de cortisona a ratones neonatos produce un aumento de la actividad AChE en el córtex del timo {Bulloch & Lucito 1988 1617 *fid*}. También se observa que en células de eritroleucemia (K562) y radiadas aumenta la actividad AChE al tiempo que cesa la proliferación {Schwenke, Peterson, et al. 1995 4325 *fid*} y que en los folículos de Graaf aumenta la actividad AChE en los procesos de maduración y ovulación {Ishwar, Sankaranarayanan, et al. 1987 4326 *fid*}{Guraya, Sharma, et al. 1995 4327 *fid*}. Estos antecedentes, junto al papel reconocido de la AChE en los procesos de desarrollo embrionario (donde la apoptosis es necesaria para la remodelación de los tejidos) hicieron pensar en una posible relación entre la actividad AChE y la apoptosis.

Mediante la tinción histoquímica de Karnowsky y Roots para actividad AChE y la técnica del TUNEL (del inglés “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labelling”) se han correlacionado los procesos de fragmentación del DNA característicos de la apoptosis con la expresión de actividad AChE. Ensayos con anticuerpos dirigidos contra la AChE-T corroboran la presencia de la enzima en el núcleo de las células apoptóticas.

Con inhibidores específicos de AChE (BW248c51, tacrina, eserina), o de BuChE (iso-OMPA), se ha confirmado la participación de AChE en la apoptosis, ya que la inhibición de la actividad AChE asegura la viabilidad celular. Este efecto también se consigue con oligonucleótidos antisentido o mismatch que impiden la expresión de AChE.

Pero quizás lo más relevante de este estudio fue la distribución heterogénea de AChE en las células durante la apoptosis. Inicialmente la actividad AChE se localiza en el citoplasma para más tarde pasar al núcleo, al tiempo que se inician los procesos de condensación y fragmentación del DNA que desencadenan la muerte celular. Es probable que la AChE afecte a los componentes nucleares responsables de la condensación de la cromatina y su posterior fragmentación. En este punto, cabe destacar la posible relevancia de las actividades no colinérgicas, como la actividad peptidasa de la AChE.

En un estudio realizado en células de neuroblastoma humano SK-N-SH, se observó un aumento paralelo de las actividades AChE y caspasa-3 (principal responsable de la apoptosis) bajo apoptosis inducida {Yang, He, et al. 2002 NC060 /id}, aunque aún queda por determinar la posible relación entre ambas enzimas.

En algunos tipos de tumores se han detectado anomalías en el gen de AChE {Soreq, Lapidot-Lifson, et al. 1991 3999 /id}. El gen ACHE humano se localiza en la posición 7q22. Curiosamente, se ha relacionado la pérdida de heterocigosidad en 7q22 con ciertos tipos de cáncer, como el de ovario {Neville, Thomas, et al. 2001 4329 /id}, mama {Zeng, Watson, et al. 1999 4331 /id} próstata {Lundgren, Mandahl, et al. 1992 4332 /id}{Takahashi, Shan, et al. 1995 4333 /id}, hígado {Parada, Hallen, et al. 1998 4338 /id} y ciertos tipos de leucemias {Fischer, Brown, et al. 1998 4334 /id}{Johansson, Mertens, et al. 1993 4335 /id}{Johnson & Cotter 1997 4336 /id}, así como en el leiomioma uterino {Ozisik, Meloni, et al. 1993 4337 /id}. Estos antecedentes, junto a datos recientes que relacionan AChE con la apoptosis, sugieren que la AChE podría actuar como un gen supresor de tumores {Stephenson, Czepulkowski, et al. 1996 4339 /id}. Evidencias epidemiológicas de la carcinogénesis de muchos pesticidas sustentan esta hipótesis. El uso de insecticidas organofosforados, inhibidores de AChE, está relacionado con el desarrollo de leucemias y linfomas no-Hodgkin, y aunque se desconoce el mecanismo molecular, se ha visto que la exposición de ratas a organofosforados puede inducir la aparición de tumores en la glándula mamaria {Cabello, Valenzuela, et al. 2001 CAN055 /id}. La explicación más plausible sería que, en ausencia de actividad AChE, tras su inhibición irreversible, aparecerían células resistentes a la apoptosis que iniciarían una expansión celular incontrolada.

A su vez, la síntesis de AChE durante la apoptosis puede ayudar a entender el origen de las moléculas de AChE en las placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer, de modo que si se demuestra que las moléculas proceden de las neuronas apoptóticas, tendríamos un método para prevenir y aliviar la enfermedad, vía supresión de la actividad AChE con oligonucleótidos antisentido.

Podemos concluir afirmando que los cambios en la actividad, o en las propiedades estructurales de las ChEs en los carcinomas, nos ofrecen la posibilidad de usarlas como marcadores tumorales. Sin embargo, sus implicaciones van más allá, porque quizás la

sobreexpresión de las ChEs esté relacionada con la causa primaria del neoplasma y juegue un papel directo o indirecto en la neoplasia {Soreq & Zakut 1990 4012 /id}{Soreq & Zakut 1990 146 /id}

7.1.8. Amplificación de los genes de las colinesterasas en células no cancerosas

En algunos casos se han asociado diversas condiciones patológicas a la expresión de ciertas secuencias genómicas de los genes ACHE y BUCHE. En la enfermedad autoinmune lupus eritematoso, caracterizada por una deficiencia plaquetaria grave o trombocitopenia, se ha observado la amplificación específica de la región central del gen de BuChE, así como ciertas anomalías en la secuencia de AChE amplificada {Zakut, Lapidot-Lifson, et al. 1992 BC055 /id}.

También se ha informado de un caso de amplificación del gen de BuChE, transmitido hereditariamente, que podría ser el resultado de un mecanismo de adaptación a la exposición a pesticidas anti-colinesterásicos.

8. DEFICIENCIA DE LAMININA-2 Y ACTIVIDAD COLINESTERASA

Las distrofias musculares forman un grupo heterogéneo de miopatías hereditarias. Producen debilidad y degeneración progresiva del músculo esquelético, aunque también pueden afectar al sistema nervioso {Engel 1986 D126 /id}. Se han identificado hasta 20 clases de distrofias, en su mayoría causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas del eje distrofina (del citoesqueleto), complejo glicoproteico (del sarcolema) y proteínas de la matriz extracelular {Bushby 1999 REVDIS016 /id}{Matsumura, Saito, et al. 1999 REVDIS023 /id}{Cohn & Campbell 2000 REVDIS011 /id}{Emery 2002 REVDIS040 /id}. En la **Tabla I.4.** aparece un listado de las distrofias musculares más comunes y las proteínas implicadas.

La distrofia muscular más frecuente y devastadora en humanos es la **distrofia de Duchenne** (DMD); afecta a uno de cada 3500 varones nacidos {Emery 1993 TS020 /id}. Según la Asociación Española de Enfermedades Musculares, en España hay unos 2000 niños con DMD, que seguramente fallecerán antes de los 25 años por insuficiencia

cardiaca o respiratoria. La **distrofia muscular de Becker** (BMD) es más benigna, menos frecuente y de aparición más tardía que la de Duchenne. A nivel celular, tanto la DMD como la BMD se caracterizan por la pérdida de fibras individuales y la destrucción de la ordenación regular de las miofibrillas, a causa de la degeneración y la necrosis {Anderson & Kunkel 1992 K394 /id}.

Tabla 1.4. Proteínas involucradas en diferentes enfermedades genéticas neuromusculares. Siguiendo una clasificación en base a su localización (en humanos), se muestran aquellas proteínas cuya alteración génica conlleva la aparición de desórdenes musculares. AD/AR-herencia autosómica dominante y recesiva; BMD-distrofia muscular de Becker; CMD-distrofia muscular congénita; DMD-distrofia muscular de Duchenne; FKRP-proteína relacionada con la fukutina; LGMD-distrofia muscular del cinturón escapular; SMN proteína de la supervivencia de la motoneurona; XL-herencia ligada al cromosoma X.

Grupo de proteínas	Distrofia Muscular	Herencia	Localización del gen
Membrana plasmática			
Distrofina	DMD/BMD	XL	Xp21
Sarcoglicano α	LGMD2D	AR	17q12
Sarcoglicano β	LGMD2E	AR	4q12
Sarcoglicano γ	LGMD2C	AR	13q12
Sarcoglicano δ	LGMD2F	AR	5q33-34
Disferlina	LGMD2B/Miopatía de Miyoshi	AR	2p13
Caveolina-3	LGMD1C	AD	3p25
Matriz extracelular			
Laminina α_2	CMD deficiente de merosina	AR	6q2
Colágeno VI	CMD de Ullrich, Miopatía de Bethlem	AR	21q22
Citosólicas			
Calpaína 3	LGMD2A	AR	15q15.1
TRIM32	LGMD2H	AR	9q31-34
Miotubularina	Miopatía miotubular	XL	Xq28
Relacionadas con la			
Fukutina	CMD Fukuyama	AR	9q31-33
FKRP	LGMD2I/CMD1C	AR	19q1
POMF1	CMD músculo-ojo-cerebro	AR	1p32-34
POMT1	CMD Walker-Warburg	AR	9q34
Proteínas sarcoméricas			
Titina	LGMD2J	AR	2q
Miotilina	LGMD1A	AD	5q22-34
Teletonina	LGMD2G	AR	17q11-12
Actina	Miopatía de Nemaline	AD/AR	1q42
Tropomiosina 3	Miopatía de Nemaline	AD/AR	1q21-23
Tropomiosina 2	Miopatía de Nemaline	AD	9p13
Nebulina	Miopatía de Nemaline	AR	2q21-22
Troponina T1	Miopatía de Nemaline	AR	19q13
Proteínas nucleares			
Emerina	DM Emery-Dreifuss	XL	Xq28
Lamina A/C	LGMD1B	AD	1q11-21
SMN	Atrofia muscular espinal	AR	5q11-13

La DMD y la BMD se originan por mutaciones en el gen de la distrofina, que se sitúa en el cromosoma X (Xp21). Casi dos tercios de las mutaciones producen transcritos inestables o proteínas truncadas {Hoffman, Brown, et al. 1987 REVDIS032 *fid*}. Las mutaciones en la región C-terminal de la distrofina, una región rica en Cys que enlaza con el β -dístroglicano, origina la variante más grave de todas las distrofias, la DMD. En cambio, las mutaciones en el extremo N-terminal, donde se ligan distrofina y actina, producen la BMD, una patología más benigna que la DMD, ya que la distrofina puede unirse a la actina por la región N-terminal y por la central.

Las lamininas constituyen una familia de proteínas de la matriz extracelular que configura las membranas basales de numerosos tejidos. Son proteínas heterotriméricas con una cadena pesada (α) y dos ligeras (β y γ). La laminina-1 está compuesta por las cadenas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$, y la laminina-2 por $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. La cadena $\alpha 2$ de la laminina se conoce como merosina, y su cantidad disminuye en los tejidos a causa de diversas mutaciones. Los tejidos que más acusan la falta de merosina son el músculo esquelético y el nervio periférico. El defecto de merosina en el músculo origina una patología muy grave, conocida como **distrofia muscular congénita**. La deficiencia en nervio ocasiona **neuropatía periférica**.

8.1.1. Laminina

Las lamininas constituyen familia de glicoproteínas esenciales para el ensamblado estructural de las membranas basales en la mayoría de los tejidos animales por su capacidad para interactuar con colágeno tipo IV, nidógeno y otros componentes (Fig. 1.15).

Pueden autoensamblarse o unirse a otras macromoléculas de la matriz extracelular y de la superficie de las células, como integrinas, dístroglicanos y otros receptores. A través de esas interacciones, las lamininas contribuyen a la diferenciación celular, formas y movimiento celular, mantenimiento de los fenotipos tisulares y promoción de la supervivencia tisular {Cognato & Yurchenco 2000 MD077 *fid*}.

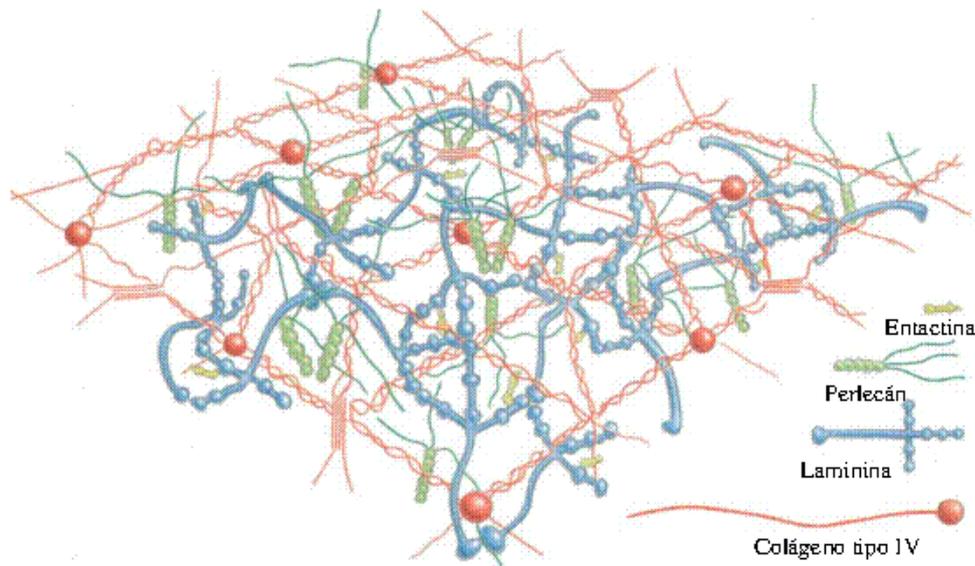


Figura I.15. Organización espacial de las proteínas de la lámina basal. En la lámina basal las proteínas interactúan entre sí formando un entramado reticular. Las proteínas mostradas en la figura se distribuyen a lo largo de toda la fibra muscular. El entramado se completa con otras proteínas específicas de cada región de la fibra. (Tomado de Yurchenco y Schittny, 1990).

Las lamininas están compuestas por tres cadenas polipeptídicas ($\alpha\beta\gamma$). En mamíferos se han identificado 12 heterotrímeros diferentes de laminina {Alberts, Bray, et al. 1994 MT1809 /id}. El tamaño de las cadenas, α (cadena pesada), β y γ (cadenas ligeras) varía entre los 140-400kDa. Las subunidades α , β y γ se asocian entre sí por un gran dominio coiled-coil en α -hélice situado en sus extremos C-terminales (Fig. I.16). La característica estructural de las lamininas es la presencia en tándem de un dominio globular, seguido de un dominio en forma de varilla y un tercer dominio coiled-coil.

Se conocen ocho cadenas de laminina: $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$, $\beta1$, $\beta2$, $\beta3$, $\gamma1$ y $\gamma2$ {Timpl & Brown 1994 4395 /id}. Las interacciones de secuencias de heptámeros determinan el ensamblado coiled-coil, de modo que cada laminina resulta de la combinación de una cadena α , β y γ , pudiendo generar 45 posibles combinaciones de no existir ciertas restricciones de ensamblaje.

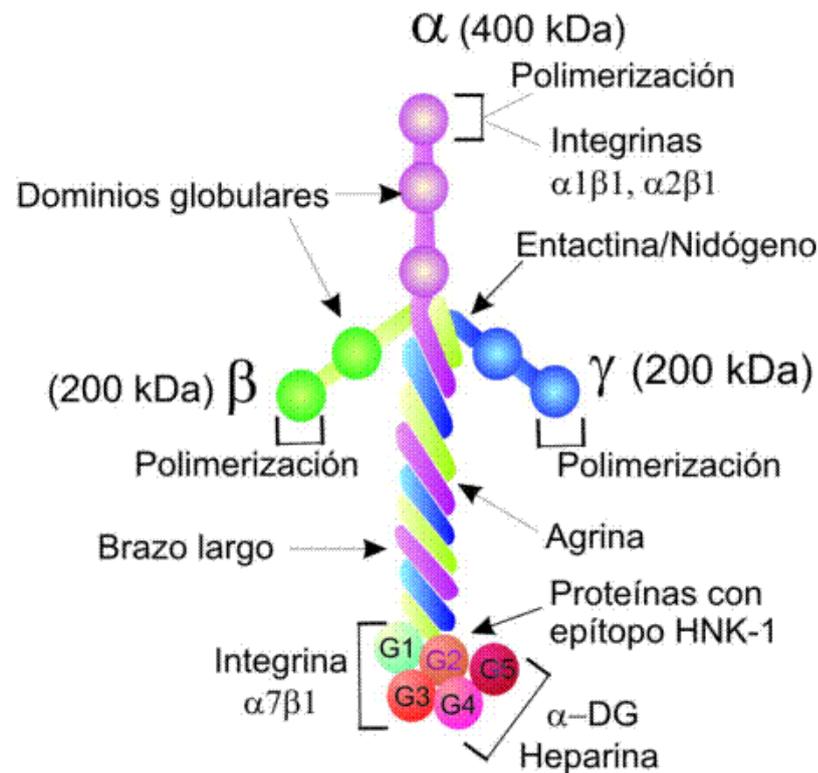


Figura I.16. Estructura cruciforme de la molécula de laminina. Se muestra la posición de cada cadena en la estructura y la localización de los dominios G a los que se unen diversas proteínas. En los tres brazos cortos se encuentran los dominios implicados en la polimerización de las moléculas de laminina. Se señala la posición de los sitios de unión a integrinas, a componentes del DGC (α -DG) y a proteínas de la matriz extracelular (agrina, entactina/nidógeno). (Basado en Colognato y col, 1999).

La laminina-1 ($\alpha_1\beta_1\gamma_1$), la primera en descubrirse, es esencial en la embriogénesis {Dziadek & Timpl 1985 4401 /id}{Shim, Kwon, et al. 1996 4402 /id}{Smyth, Vatansever, et al. 1999 4403 /id}. En la **Figura I.16** podemos ver que la laminina 1 posee sitios de unión a entactina/nidógeno {Aumailley, Wiedemann, et al. 1989 4418 /id}{Fox, Mayer, et al. 1991 4416 /id}{Battaglia, Mayer, et al. 1992 4565 /id}{Mayer, Nischt, et al. 1993 4419 /id}{Brown, Sasaki, et al. 1997 4566 /id}, agrina {Denzer, Brandenberger, et al. 1997 MD081 /id}{Denzer, Schulthess, et al. 1998 4422 /id}{Kammerer, Schulthess, et al. 1999 MD039 /id}, integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_7\beta_1$ y α -dístroglicano {Sonnenberg, Modderman, et al. 1988 4428 /id}{Aumailley, Timpl, et al. 1990 4426 /id}{Kramer, Vu, et al. 1991 4425 /id}{Lee, Lotz, et al. 1992 4567 /id}{Ervasti & Campbell 1993 1293 /id}{Gee, Blacher, et

al. 1993 TS001 /id}, así como con glicoconjugados que posean el carbohidrato HNK-1 {Hall, Carbonetto, et al. 1997 MD079 /id}.

En las membranas basales del músculo estriado, células de Schwann y trofoblastos predomina la laminina-2. Esta variante de laminina está compuesta por las cadenas α_2 , β_1 y γ_1 {Yamada, Hori, et al. 1995 4432 /id}. La cadena α_2 de la laminina se conoce como merosina y en zonas extrasinápticas del músculo se asocia preferentemente con las cadenas β_1 y γ_1 , dando lugar a la laminina-2, mientras que en las uniones neuromusculares se asocia con las cadenas β_2 y γ_1 originando la laminina-4 {Vachon, Loechel, et al. 1996 MT1709 /id}.

El defecto de merosina en el músculo origina una clase de distrofia, conocida como distrofia muscular congénita (CMD). La deficiencia de merosina en nervios ocasiona una neuropatía periférica. La mitad de los pacientes con CMD muestran un déficit total o casi total de cadenas α_2 de laminina por las mutaciones en el gen LAMA2, situado en 6q22-q23 en humanos, y que codifica la subunidad α_2 de laminina {Tomé, Evangelista, et al. 1994 O147 /id}. En los músculos de algunos enfermos disminuye la expresión del ARNm para merosina {Hayashi, Koga, et al. 1995 P109 /id}, aunque el tamaño de la proteína es normal. La causa de esta deficiencia podría ser una o varias mutaciones en las regiones no codificadoras del gen que afectan a la transcripción y/o estabilidad del mensajero.

El déficit de merosina impide que los niños con CMD caminen antes de los 4 años; los enfermos fallecen en la infancia por fallo respiratorio. El cuadro clínico incluye una hipotonía neonatal grave, rigidez articular, contracturas y anomalías en la mielinización de la sustancia blanca del SNC {Teixeira-Bautista, Garcia-Garcia, et al. 1998 4342 /id}. La laminina-2 puede ser detectada en biopsias de piel y en las vellosidades coriónicas, por lo que su ausencia sirve para el diagnóstico prenatal de la CMD.

En la CMD no cambia la distrofina ni los complejos del distroglicano o del sarcoglicano. La deficiencia de merosina parece ser la causante de la necrosis muscular observada en la CMD {Ozawa, Yoshida, et al. 1995 1304 /id}.

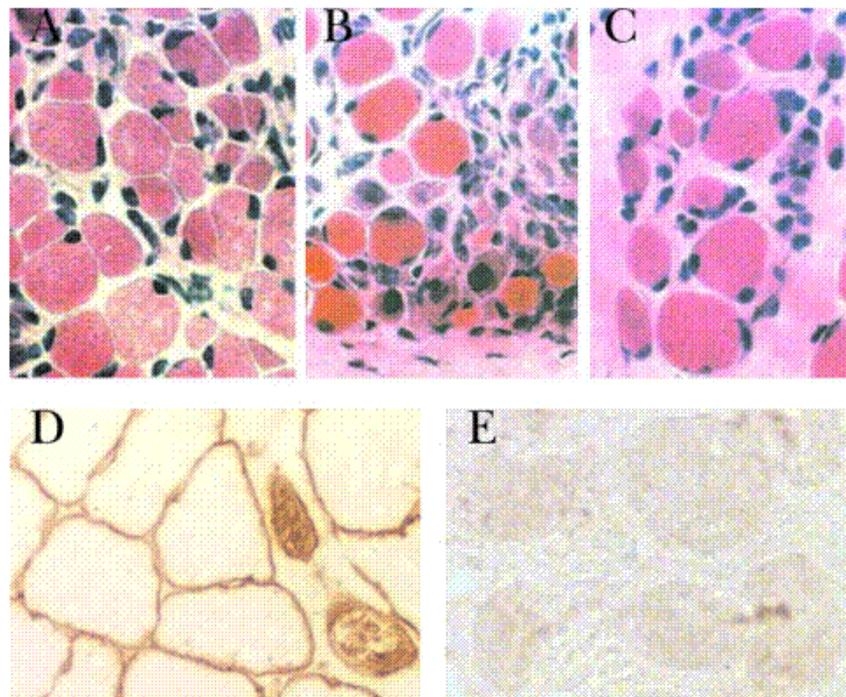


Fig 1.17. Secciones de músculos normales y con CMD. Tinción con hematoxilina/eosina. En la parte superior se aprecian los cambios histológicos debidos a la CMD: variabilidad en el tamaño de las fibras musculares (A), aparición de fibras inmaduras (B) y aumento del tejido conectivo (C). La tinción de la merosina en un músculo normal (D) muestra su distribución en la lámina basal muscular y en los nervios intramusculares. En las secciones de músculo distrófico no aparece teñido para merosina (E).

Se ha observado que las lamininas-2 y 4 (ambas portadoras de merosina) participan en el proceso de desarrollo de las uniones neuromusculares induciendo la agregación (clustering) de los receptores de acetilcolina (AChRs) en la membrana postsináptica y potenciando la interacción de éstos con las integrinas $\alpha 7\beta 1$, en un efecto sinérgico con las moléculas de agrina neuronales {Burkin, Kim, et al. 2000 4446 *fid*}.

La falta de merosina impide la formación de laminina-2 en músculo esquelético y nervio periférico, así como laminina-4 en la unión neuromuscular. En su ausencia, otras lamininas podrían ocupar su lugar en la lámina basal, pero al no poder fijarse a los receptores de la membrana (α -DG, integrina $\alpha 7\beta 1$) se debilita la conexión del citoesqueleto con la lámina basal. La merosina se localiza también en el sistema nervioso, donde participa en el crecimiento de neuritas y en la migración de las células de Schwann,

por lo que su defecto puede afectar al desarrollo del sistema nervioso. No obstante, en los pacientes con CMD, sólo se han observado cambios mínimos en la sustancia blanca. A nivel histológico, muestran complicaciones en el sistema nervioso periférico {Shorer, Philpot, et al. 1995 1332 /id}.

También se ha observado un déficit parcial de laminina- $\alpha 2$ en pacientes con LGMD2I {Brockington, Blake, et al. 2001 4381 /id}{Brockington, Yuva, et al. 2001 4380 /id}. En algunas formas graves de CMD (Fukuyama, Walter-Warburg, y formas músculo-ojo-cerebro y FKRP), además de la deficiencia en laminina- $\alpha 2$, se han apreciado cambios en la glicosilación del α -dístroglicano, debidas a mutaciones en los genes de glucosiltransferasas.

Una de las variantes de CMD se origina por una deficiencia de la cadena $\alpha 7$ de la integrina. La integrina es un receptor heterodimérico situado en la lámina basal, que sirve de nexo con el citoesqueleto mediante su interacción con la laminina- $\alpha 2$, actuando también en la transducción de señales procedentes de la matriz extracelular.

Numerosos investigadores utilizan los ratones **Lama2dy** como modelo de estudio de la distrofia muscular congénita. Estos animales padecen un tipo de distrofia que se transmite de forma autosómica recesiva y que deriva de mutaciones en el gen LAMA2 para la cadena $\alpha 2$ de laminina {Straub, Rafael, et al. 1997 TS037 /id}. En roedores, el gen LAMA2 se localiza en 10A4-B1.

Se conocen dos cepas de ratones que sufren la misma mutación, los 129ReJ y los C57BL/6J. Los ratones mutantes, al igual que los humanos con CMD, sufren hipertrofia muscular progresiva por la degeneración y desmielinización en los nervios periféricos {Sunada, Bernier, et al. 1994 O148 /id}. Son estériles, con reducción del tamaño testicular y deficiencias de la señal gonadotrófica {Amador, Mayerhofer, et al. 1992 TS045 /id}. Además, son de menor tamaño y peso que sus homólogos normales y suelen morir a los 2-6 meses. En la **Figura I.18** se puede ver el aspecto diferente de un ratón normal y otro distrófico Lama2dy.

Al igual que los pacientes distróficos, los ratones Lama2dy tienen mayor actividad creatina quinasa en suero (344 U.L) que los controles (28 U.L) {Gómez 2000 3792 /id}. La

microscopía electrónica revela que la lámina basal del músculo está fragmentada en los ratones (y en humanos con CMD), mientras que la membrana plasmática permanece intacta {Xu, Christmas, et al. 1994 1331 /id}{Minetti, Bado, et al. 1996 MT1728 /id}. Además, las uniones neuromusculares pierden los pliegues sinápticos, la terminal nerviosa se encuentra separada del músculo y las vesículas de secreción quedan dispersas en la terminal. Los cambios en las uniones neuromusculares son iguales que los observados en ratones mutantes en la cadena $\beta 2$ de laminina, y derivan de la falta de lamininas en esas regiones, con independencia de la cadena mutada.

El hecho de que los mutantes Lama2dy muestren una miopatía grave asociada a un menor tamaño y peso corporal, sin que se altere la membrana celular, sugiere que la laminina podría actuar como transmisora de una señal específica a la célula muscular necesaria para su correcta funcionalidad, más que ejerciendo un papel mecánico en el mantenimiento de la integridad de la membrana. Se sabe que la laminina, por su capacidad de interactuar con las células a través de receptores de superficie, incluido el α -dístroglicano {Edwards, Hatton, et al. 1998 MT1729 /id}, está implicada en procesos de proliferación, diferenciación y migración. En este sentido, se ha establecido que ciertas lamininas juegan un papel importante en la regulación de la diferenciación sináptica en el ratón {Patton, Miner, et al. 1997 MT1711 /id}{Patton, Chiu, et al. 1998 MT1712 /id}.

Algunas de estas miopatías afectan a la cantidad y/o composición de las formas moleculares de las ChEs y el estudio de estas enzimas en tejidos sanos y patológicos puede ayudar a entender los mecanismos que controlan la síntesis, ensamblado y procesamiento de las ChEs y a aclarar su posible implicación en la manifestación de la enfermedad.

El análisis de las formas moleculares de las ChEs en músculo distrófico de ratón Lama2dy ha revelado una marcada pérdida de los tetrámeros de AChE con subunidad PRiMA, hecho que se atribuye a un problema en la maduración del músculo a lo largo del desarrollo {Gisiger & Stephens 1983 C041 /id}{Gisiger & Stephens 1984 C039 /id}{Gisiger & Stephens 1988 G065 /id}{Skau 1990 L085 /id}{Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1997 S001 /id}. Además, en comparación con los músculos de los ratones sanos, los tejidos patológicos muestran mayores actividades AChE y BuChE y un aumento en la proporción de especies ligeras {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1994 O003 /id}{Cabezas-Herrera, Campoy, et al. 1994 O063 /id}. Estas anomalías parecen ser

específicas del tejido, pues no se observan en el suero de ratones distróficos {Cabezas-Herrera, Moral-Naranjo, et al. 1994 O003 /id}, cerebro {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1996 P100 /id}{Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1997 S004 /id} o corazón {Gómez, Moral-Naranjo, et al. 1999 EP002 /id}.

En nervio ciático de ratón Lama2^{dy} se observa un acusado descenso de la actividad AChE y un aumento al doble de la actividad BuChE {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 2002 3831 /id}. Sin embargo, mientras que la distribución de las moléculas de AChE es la misma en nervio control y patológico, en el último disminuye notablemente la cantidad de formas G₄^A de BuChE y aumenta la de las demás moléculas {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 2002 3831 /id}. Los cambios en la actividad BuChE se atribuyen a la neuropatía periférica producida por la desmienilización de los nervios periféricos en ratones Lama2^{dy} y en pacientes aquejados de CMD.



Fig 1.27. Fotografía de un ratón control y un ratón distrófico Lama2^{dy}. Externamente, la distrofia se manifiesta con una reducción significativa del tamaño corporal en los ratones Lama2^{dy}. Llama la atención la disposición rígida de las extremidades posteriores y su marcada atrofia, en comparación con los ratones normales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La relación funcional entre los sistemas nervioso e inmune ha sido objeto de profundos estudios desde los años 70 y 80. La acción sinérgica de los dos sistemas es decisiva para recuperar la homeostasis debida al estrés. Después de establecer el papel de la noradrenalina (NA) como principal modulador de los órganos linfoides, investigaciones recientes atribuyen al sistema colinérgico un papel cada vez más destacado en el diálogo entre los sistemas inmune y nervioso {Rinner, Felsner, et al. 1998 4483 /id}, bien a través del neurotransmisor ACh {Qiu, Peng, et al. 1996 1632 /id}, bien con el concurso de agonistas colinérgicos (Rinner and Schauenstein, 1997) como ya vimos en el **Apartado I.9.**

En la distrofia muscular por deficiencia de merosina, la separación del sarcolema de la membrana basal viene acompañada de un proceso inflamatorio local, por el acceso de macrófagos y células T $CD4^+$ y $CD8^+$ a las miofibras en degeneración {Spencer, Walsh, et al. 1997 1748 /id}. Las reacciones inmunes que acompañan a la degeneración miofibrilar probablemente contribuyen a la patología del músculo {Lagrotta-Cándido, Canella, et al. 1998 1740 /id}. La afección de los tejidos linfoides por la distrofia viene respaldada por los cambios observados en la morfología del timo y en el microambiente celular en ratones distróficos mdx (distrofina⁻, merosina⁺), cambios que ocurren en paralelo a la necrosis y regeneración de las miofibras {Quirico-Santos, Ribeiro, et al. 1995 1691 /id}. En ratones distróficos Lama2dy disminuye el tamaño del timo y el número de timocitos en comparación con los ratones normales {Magner, Chang, et al. 2000 1607 /id}.

La laminina- $\alpha 2$ o merosina, que también se expresa en el timo, parece ejercer un papel activo durante el desarrollo de los timocitos. Es posible que la laminina-2 participe en la transducción de señales necesarias para la supervivencia celular y diferenciación en determinados estadios del desarrollo del timo {Magner, Chang, et al. 2000 1607 /id}. Los linfocitos $CD4^+CD8^+$ son los únicos que se afectan por la distrofia muscular debida a la deficiencia de merosina; tales linfocitos muestran mayor sensibilidad a las señales apoptóticas que los $CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^-$. Un posible ligando de la merosina en el timo es el antígeno-6 de activación muy tardía (del inglés very late activation antigen-6, VLA-

6). El antígeno-6 y la merosina parecen influir conjuntamente en la supervivencia de los linfocitos doblemente positivos {Iwao, Fukada, et al. 2000 1584 /id}.

En bazo de origen humano se ha medido la actividad AChE, observándose variaciones en los patrones y en el nivel de actividad bajo ciertas condiciones patológicas, como en la esplenomegalia esquistosomiásica {Rakhawy, Tarkhan, et al. 1976 BC025 /id}. En bazo también hay expresión de merosina, aunque hasta el momento se desconoce si la distrofia muscular congénita por deficiencia de merosina afecta histológica y funcionalmente a este órgano.

Los trabajos recogidos en esta memoria pretenden profundizar en la relación entre los sistemas inmune y colinérgico, bajo las condiciones de estrés generadas por la distrofia muscular congénita ocasionada por la deficiencia en merosina. A través del estudio de las propiedades moleculares de las colinesterasas en bazo y timo pretendemos:

1. Analizar si la distrofia muscular por deficiencia de merosina afecta a la actividad AChE y/o BuChE de bazo y timo.
2. Averiguar si la distrofia altera la distribución de las formas moleculares de estas enzimas.
3. Descubrir si la condición patológica produce cambios en la estructura de las subunidades AChE y/o BuChE.
4. Indagar si los niveles de expresión de los mensajeros de AChE en estos tejidos se ven afectados por la distrofia.

Para dar respuesta a esos objetivos generales se procedió a:

- ◆ Valorar las actividades de AChE y BuChE en muestras de bazo y timo normales y distróficos para determinar si se alteran por la distrofia.
- ◆ Extraer las colinesterasas débil y fuertemente unidas a las membranas mediante el uso secuencial de tampones salinos y con detergente. En cada caso se determinaron los porcentajes de solubilización, se identificaron las formas moleculares por su coeficiente de sedimentación y se analizaron los cambios en los patrones de formas moleculares de

las colinesterasas en bazo normal (BN) y distrófico (BDy) y en timo normal (TN) y distrófico (TDy).

- ◆ Establecer la verdadera naturaleza de las formas de AChE en BN y sus propiedades hidrofílicas o anfifílicas. El comportamiento anfifílico de las formas se estableció por su retención en la matriz hidrofóbica fenil-agarosa, así como por su distinta migración en las electroforesis practicadas con diversos detergentes.
- ◆ Determinar si el bazo es capaz de secretar formas hidrofílicas de AChE. Para tal fin, se utilizaron los soportes de afinidad preparados con edrofonio y fasciculina-2, inhibidores del sitio aniónico del centro activo y del sitio aniónico periférico de AChE respectivamente.
- ◆ Investigar si los dímeros y los monómeros de AChE tienen restos de GPI que los ancle a las membranas en BN y TN y en tal caso, si el procesamiento de la AChE con esta unidad de anclaje se ve afectado por la distrofia.
- ◆ Conocer si la distrofia afecta a la glicosilación de las moléculas de las ChEs en bazo y timo haciendo uso de lectinas específicas para distintos azúcares terminales en los oligoglicanos.
- ◆ Analizar los posibles cambios en el tamaño de las subunidades de AChE de bazo y timo mediante el uso de anticuerpos, técnicas de inmunoprecipitación y Western blotting.
- ◆ Explorar la posible presencia de formas inactivas de AChE en bazo y timo mediante la combinación de técnicas de inmunoprecipitación o de unión a distintos soportes con las técnicas de Western blotting.
- ◆ Identificar y cuantificar los niveles de los distintos ARN mensajeros de los diferentes transcritos de AChE (T, H o R) en los órganos normales y distróficos para determinar si la distrofia afecta la expresión del gen.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

9. MATERIALES

9.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o, en su defecto, del mayor grado de pureza posible. Si no se indica lo contrario, las disoluciones fueron preparadas con agua Milli-RX purificada por electrodesionización, sistema RX, grado analítico tipo II. Los reactivos que lo requerían se disolvieron en agua Milli-Q Plus (tipo I, grado reactivo).

A continuación se detallan los productos usados y su procedencia. De Sigma se obtuvieron los siguientes reactivos:

Los empleados para la extracción de ChEs: HEPES, EGTA, EDTA, pepstatina A, bacitracina, benzamidina, inhibidor de tripsina (de soja), aprotinina, leupeptina; ácido iodoacético; los productos para la medida de actividad ChE: ioduro de acetiltiocolina, ioduro de butiriltiocolina, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), dibromuro de 1,5-bis-(4-allyldimetilamoniofenil)-pentan-3-ona (BW284c51) y tetraisopropil-pirofosforamida (iso-OMPA); los marcadores de coeficiente de sedimentación (catalasa de hígado bovino y fosfatasa alcalina de intestino bovino) sacarosa; los detergentes Triton X-100, Brij 96, CHAPS y desoxicolato sódico (DOC) y los reactivos para electroforesis y Western blot: albúmina de suero bovino (BSA), acrilamida, bis-acrilamida, β -mercaptoetanol, persulfato amónico (PSA), TEMED, SDS, azul de Coomassie R-250, disolución reveladora de la actividad fosfatasa alcalina (BCIP/NBT, B-6404), Tween 20, proteínas estándares no coloreadas (SDS-6H) y preteñidas (P-1677), papel de filtro para blotting, membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de tamaño de poro, AChE de eritrocito bovino y de anguila. La matriz hidrofóbica de fenil-agarosa, las proteasas colagenasa (tipo VII) y tripsina (tipo XI), citrato sódico, cloruro de edrofonio, la matriz de Sepharose 6B epoxi-activada (para la síntesis de edrofonio-Sepharose), acetato sódico, borato sódico y azida sódica. También fueron de Sigma la resina de Sepharose-4B y las lectinas Con A y LCA ligadas a Sepharose y WGA, RCA, APA, AI y LTA unidas a agarosa.

En cuanto a los demás reactivos, kit de desglicosilación (E-5006B) y la fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (GPI-02B), purificada de *Bacillus thuringiensis* fueron de Glyko (Novato, CA, USA). El p-nitrofenilfosfato y la proteína G-agarosa se obtuvo de

Boehringer Mannheim o de Roche (Alemania). La lectina de *Sambucus nigra*, inmovilizada en matriz de agarosa, procedió de Vector Lab. (USA).

La agarosa activada con bromuro de cianógeno, CNBr-activated Seph-4B, empleada para inmovilizar la fasciculina se adquirió a Pharmacia. La fasciculina-2 fue de Latoxan (Valence, Francia).

De Merck fueron: Tris, NaCl, CaCl₂, MnCl₂, fosfato sódico, ácido acético, sulfato de cobre (CuSO₄), ferricianuro potásico (K₃Fe(CN)₆), HCl y cloroformo; de J.T. Baker los alcoholes etanol e isopropil-alcohol (IPA).

Los antisueros generados en cabra contra el extremo N-terminal de AChE de ratón (E-19), el extremo N-terminal de AChE humana (N-19), el extremo C-terminal de AChE de ratón (C-16) y el antisuero de conejo contra el fragmento C-terminal de AChE humana (H-134), procedían de Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, California, USA). El antisuero de cabra contra la AChE de eritrocito humano (BT30-2269) fue de Biotrend Chemikalien GMBH, Alemania) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra el fragmento 411-609 de la AChE humana (clon 46, C46) provenía de BD Biosciences Pharmingen (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA). El antisuero generado contra un péptido de 14 aminoácidos (GMHKAARVGRGER) del extremo C-terminal de AChE-R de ratón (anti-R) procedía de Genosys Biotechnologies y el antisuero generado contra una molécula de AChE recombinante truncada en su extremo C-terminal (anti-Rec), fue suministrado por el Dr. Palmer Taylor (La Jolla, California, USA).

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra/oveja (usados para detectar los anticuerpos N-19, E-19 y C-16), anti-IgG de conejo (para el H134), y el anti-IgG de ratón (para el C-46), todos marcados con fosfatasa alcalina, fueron de SIGMA.

Para valorar la proteína se usó el reactivo de Bradford, obtenido de Bio-Rad. El Lymphoprep, usado para aislar los linfocitos fue de NYCOMED.

En cuanto a los reactivos de biología molecular, el reactivo TRIZOL para el aislamiento de ARN suministrado por Life Technologies (GibcoBRL, New York, USA).

De Ambion se adquirieron los decámeros al azar, “random decamers”, para RT-PCR y los cebadores y cebadores competidores del cDNA 18S, “primers:competimers 18 S” usados en los experimentos de semicuantificación.

La mezcla de desoxinucleótidos (dNTP), fue de Boehringer Mannheim o de Eppendorf. De este último también procede el kit de la Hotmaster Taq DNA polimerasa (que incluye el tampón de reacción). El inhibidor de ribonucleasa fue de Amersham Life Science. De SIGMA se obtuvo el dimetilsulfóxido (DMSO) y los marcadores de tamaño, Step ladder 50 bp. La agarosa fue suministrada por SIGMA o por Bio-Rad.

El kit de la retrotranscriptasa se obtuvo de Invitrogen, M-MLV RT (retrotranscriptasa del virus de leucemia murina de Moloney), que incluye el tampón de reacción y el DTT, además de la enzima. Los primers específicos para los transcritos de AChE también fueron de Invitrogen.

10. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

10.1. Extracción de las proteínas asociadas a las membranas celulares

La bicapa lipídica proporciona la estructura básica de las membranas biológicas, pero son las proteínas de membrana las que llevan a cabo la mayor parte de sus funciones específicas. Ello explica la enorme variabilidad que existe en la cantidad y el tipo de proteínas dependiendo del tipo de membrana.

Al igual que en los lípidos de membrana, podemos encontrar cadenas de oligosacáridos unidos a las proteínas de membrana dando lugar a la aparición de una cubierta de carbohidratos que abarca la superficie celular, denominada glicocalix o cubierta celular.

Las proteínas de membrana se asocian con la bicapa lipídica de modos muy diversos. El modo de asociación determina, en gran medida, el método más adecuado para su solubilización (**Fig. II.1**). En función de su localización en la bicapa, las proteínas de membrana pueden clasificarse como **intrínsecas o integrales y extrínsecas o periféricas** {Capaldi 1982 326 /id}. Las proteínas intrínsecas se encuentran embutidas en la membrana, en mayor o menor medida, estableciendo interacciones con los lípidos

adyacentes. Por consiguiente, su solubilización requerirá la desorganización de la bicapa fosfolipídica (con disolventes orgánicos o detergentes), o la separación de la estructura de anclaje a la membrana (por métodos químicos o enzimáticos). Una vez separadas, las proteínas integrales son poco estables en medios acuosos por su fuerte tendencia a agregarse y precipitar, efecto que se mitiga añadiendo detergentes o glicerol al medio. A su vez, podemos distinguir varios tipos de proteínas integrales atendiendo al modo de interacción con la membrana y al porcentaje de su estructura que penetra en la fase hidrofóbica. La solubilización de las proteínas integrales requiere condiciones más drásticas que la de las proteínas periféricas, pues frecuentemente atraviesan la bicapa lipídica una o varias veces y parte de su masa sobresale por uno o ambos lados de la bicapa, es el caso de las **proteínas transmembrana**. Como muestra la **Figura II.1**, dichas moléculas son anfipáticas o anfifílicas, es decir, tienen regiones hidrofóbicas que atraviesan la membrana e interaccionan con las moléculas lipídicas del interior de la bicapa y regiones hidrofílicas, que quedan expuestas al medio acuoso, a un lado u otro de la membrana.

La actividad biológica de estas proteínas depende tanto de sus dominios hidrofílicos, como del segmento o segmentos transmembrana. A su vez, la hidrofobicidad de algunas de esas proteínas transmembrana puede aumentar si incorpora restos de ácidos grasos.

Otras proteínas integrales de membrana se localizan en el citosol de la célula, permaneciendo unidas a la bicapa sólo por uno o varios restos de ácido graso o por un derivado poliisopreno. Con menor frecuencia, algunas proteínas de membrana se orientan hacia la superficie externa de la célula, quedando unidas a la bicapa por un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI) incorporado al extremo C-terminal. Con independencia de que la unión se establezca mediante una cadena de ácido graso o un resto de GPI, consideramos a estas proteínas como **ectoproteínas**, en el sentido de que la mayor parte de la molécula se localiza en la fase acuosa y, por lo general, su actividad biológica no depende de la bicapa lipídica. En este caso, la membrana actúa simplemente como un soporte estructural o proporcionando un medio de localización y/u organización. A menudo, las ectoproteínas se liberan de la bicapa con proteasas o fosfolipasas, que las separan de su anclaje a la membrana (lípidos o proteínas), quedando éste inmerso en la bicapa y manteniendo la proteína su actividad biológica prácticamente inalterada. Las

proteínas unidas a la membrana mediante GPI se diferencian claramente del resto porque con frecuencia pueden ser liberadas con la enzima PI-PLC que corta la parte lipídica del GPI de las proteínas que lo poseen.

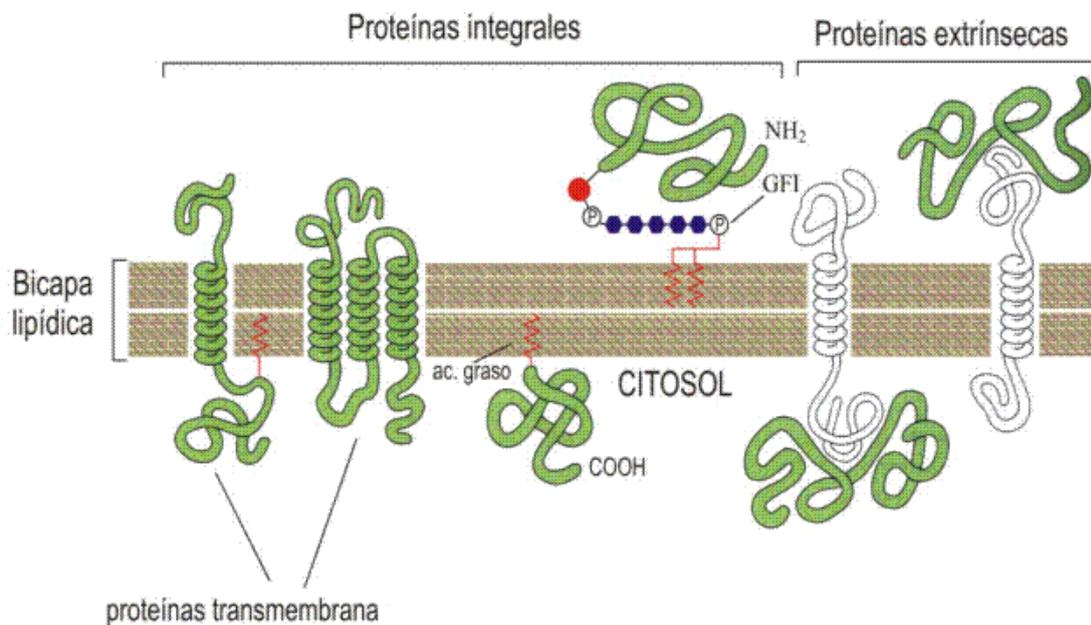


Figura II.1. Modos de asociación de las proteínas de membrana con la bicapa lipídica. Las proteínas transmembrana se encuentran embebidas en mayor o menor medida en la bicapa lipídica. Algunas atraviesan la membrana una sola vez; otras poseen múltiples segmentos α -hélice cruzando la bicapa. Hay proteínas de membrana que se hallan unidas a la bicapa por restos de ácido graso o restos de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas proteínas exponen gran parte de su masa a la fase acuosa. En un grupo aparte se sitúan las proteínas extrínsecas, cuya única relación con la bicapa consiste en la interacción no covalente con otras proteínas de membrana.

Algunas proteínas se mantienen en la superficie de la membrana, vía interacción no covalente con otras proteínas o con las regiones expuestas de los fosfolípidos; son las proteínas periféricas o extrínsecas. Se extraen de la membrana con procedimientos relativamente suaves (simplemente alterando las condiciones iónicas del medio, modificando el pH o incubando con agentes quelantes), que interfieren con las interacciones proteína-proteína sin afectar a la bicapa lipídica. Aunque los detergentes

pueden ayudar a liberar este tipo de proteínas, a diferencia de lo que sucede con las proteínas intrínsecas de membrana, no son necesarios para mantenerlas en disolución.

En general, el modo de unión de una proteína a la membrana se relaciona con su función. Así pues, sólo las proteínas transmembrana pueden actuar sobre ambos lados de la bicapa o transportar moléculas a su través. Por ejemplo, muchos receptores de la superficie celular son proteínas transmembrana, capaces de unirse a moléculas señalizadoras en el espacio extracelular para la generar diferentes señales intracelulares en el lado citosólico de la membrana plasmática. Por el contrario, las proteínas situadas sobre un lado de la bicapa lipídica suelen asociarse exclusivamente con dicha monocapa lipídica o con dominios proteicos situados en ella. Tal es el caso de algunas proteínas que participan en la señalización intracelular.

10.2. Solubilización de las proteínas de membrana con detergentes

Los detergentes son moléculas anfipáticas relativamente pequeñas, más o menos solubles en disoluciones acuosas, según la naturaleza de sus restos hidrofílicos. Por encima de cierta concentración, llamada concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de detergente se unen entre si por la parte hidrofóbica, formando agregados termodinámicamente estables denominados **micelas**, que se hallan en equilibrio con los monómeros libres. Las micelas presentan una estructura esférica, y en ellas el detergente se orienta con su porción apolar hacia el interior y la cabeza polar hacia el disolvente.

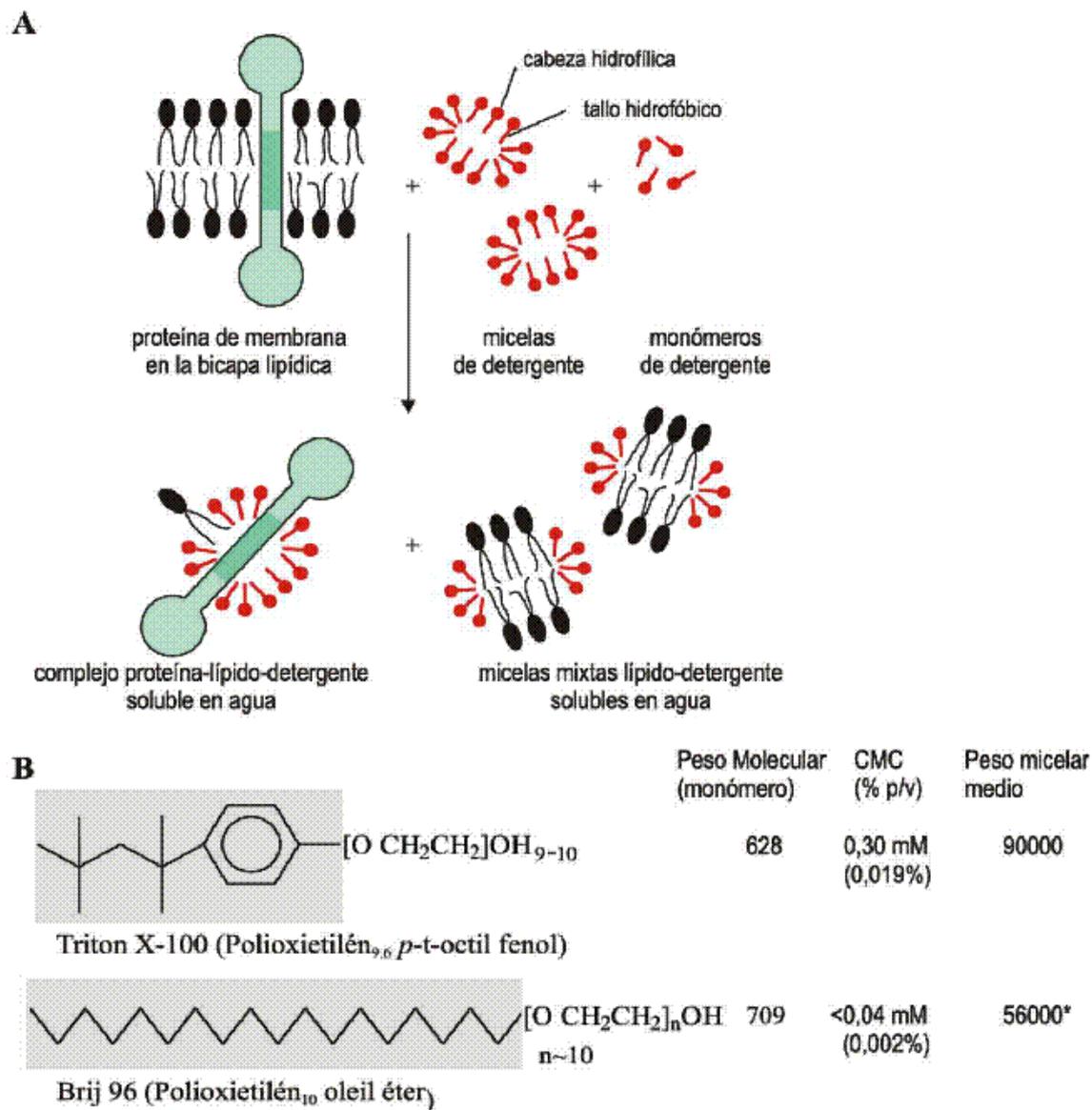
Cuando se añaden a las membranas, los detergentes particionan en la bicapa rápidamente, desplazando a las moléculas lipídicas y uniendo sus porciones hidrofóbicas a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana. Existe una concentración crítica de detergente en la que la membrana pierde su estabilidad y comienza a desintegrarse, pudiendo llegar finalmente a “solubilizarse” en sus componentes, lípidos y proteínas, cuando se eleva la proporción de detergente (**Fig. II.2.A**). Generalmente, los lípidos forman micelas mixtas con el anfífilo, mientras que las proteínas de la disolución se rodean de una capa monomolecular de detergente que media entre la superficie hidrofóbica de la proteína y el medio acuoso, hacia el que las moléculas de detergente orientan sus extremos polares. A veces, los agregados detergente-proteína incluyen lípidos que han quedado fuertemente unidos. Los extremos polares de los detergentes pueden estar cargados, como

en el caso del dodecil sulfato sódico (SDS) o del cetiltrimetilamonio (CTA), detergentes aniónico y catiónico, respectivamente, o carecer de carga como ocurre con el Triton X-100 (detergente no iónico).

Con el uso de detergentes no muy agresivos, como el Triton X-100 o las series del Brij (**Fig. II.2.B**), es posible llegar a solubilizar y purificar muchas proteínas integrales de membrana, si no en su estructura espacial íntegra, sí al menos en su conformación activa. Una ventaja de estos detergentes no iónicos es su capacidad para conservar las interacciones proteína-proteína, de modo que mantienen la estructura cuaternaria de las proteínas incluso a concentraciones elevadas, lo que resulta imprescindible para el análisis de proteínas oligoméricas como las colinesterasas.

Las propiedades de los éteres de polioxietileno no iónicos, como el Triton X-100, cambian con la temperatura. Cuando ésta aumenta linealmente, el tamaño de las micelas del detergente se incrementa de forma exponencial. Dicho proceso conduce a la separación del detergente en una fase no acuosa, a una temperatura concreta conocida como punto nube. A dicha temperatura, una disolución de detergente pasa de ser un sistema micelar isotrópico a otro bifásico, con una fase pobre en detergente y otra rica en micelas gigantes, lo cual puede ser útil para la extracción de proteínas de membrana {Bordier 1981 1039 /id}.

Como las proteínas de membrana presentan, además de interacciones hidrofóbicas, otras iónicas, en los tampones de solubilización es conveniente añadir altas concentraciones de NaCl.



*El dato del Pm de la micela corresponde al polioxietilén₁₀ tridecil éter

Figura II.2. Solubilización de las proteínas de membrana con detergentes. A, El detergente desorganiza la bicapa lipídica y solubiliza las proteínas en forma de complejos proteína-lípido-detergente. También solubiliza los fosfolípidos de la membrana. B, Se muestran las estructuras del Triton X-100 y del Brij 96, dos detergentes muy utilizados para este fin. La porción hidrofóbica de cada detergente aparece sombreada.

10.3. Extracción de AChE y BuChE de bazo normal (BN) y distrófico (BD) y timo normal (TN) y distrófico (TD) de ratón.

The Jackson Memorial Labs. (Bar Harbor, ME), proporcionaron las parejas reproductoras heterocigóticas para la mutación *dy* en el gen de merosina (LAMA2). Los machos, de la cepa C57, se cruzaron con hembras de la cepa 129 ReJ. Su cruce proporcionó ratones híbridos 129B6F₁/J, el 75% con fenotipo normal (Lama2^{+/+}) y el 25% restante, distrófico (Lama2^{dy}). Los ratones fueron criados en el Servicio de Mantenimiento de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, siguiendo fielmente las normas de cuidado ético. A la edad de 3-4 meses, se procedió a su sacrificio para extraer los órganos. Después de la anestesia con éter, se abre la cavidad torácica y se procede a la punción cardíaca inyectando una disolución salina isotónica con anticoagulante (NaCl 154mM y EDTA 5,4mM, pH 7,4) que será bombeada en cada latido hacia otros órganos. La operación sirve para reducir la cantidad de sangre en los diferentes órganos y disminuir así la contaminación con la AChE de los eritrocitos. Para evitar el exceso de presión sanguínea, se realiza un corte a nivel de la vena subclavia, por el que fluye la sangre que inmediatamente se recoge con pipeta Pasteur. El proceso finaliza cuando comienza a salir el medio salino. En ese momento los órganos son extraídos, lavados con la misma disolución salina para reducir más el contenido de sangre, congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C para mantener la integridad enzimática.

Para extraer las colinesterasas, las muestras se descongelan lentamente a 4°C, temperatura a la que se realiza todo el experimento. En cada extracción se emplean de 10-20 órganos (bazos o timos), por su pequeño tamaño. Los órganos son nuevamente lavados, esta vez en tampón de extracción HEPES salino (HS): NaCl 1M, HEPES 15mM, EDTA 3mM y EGTA 1mM, pH 7,5 y se elimina cualquier resto de grasa que puedan contener. Se pesan y se homogeneizan al 20% p/v en el tampón de extracción antes mencionado al que se ha añadido un cóctel de antiproteasas compuesto de: inhibidor de tripsina de soja 0,1mg/ml, benzamidina 2mM, bacitracina 1mg/ml, pepstatina A 10µg/ml y leupeptina 20µg/ml, a partir de otra disolución preparada 25x en tampón fosfato 10mM pH 7,5, además de aprotinina 20U/ml.

Después de cortar el tejido en pequeños trozos, se pasan a un homogenizador manual (Potter) de vidrio con émbolo de teflón ajustado a una taladradora. La muestra se somete a 4 series de 5-10 golpes a una velocidad media. Debido a la gran viscosidad de los homogenados resultantes se vuelve a homogenizar con un polytron (ULTRA-TURRAX T8, IKA Labortechnik) al 80-90% de su velocidad máxima, con 4-8 intervalos de 15s intercalados con paradas de 1min, lo que mejora la apariencia del homogenado (H_0). Hay que aclarar que tanto el material biológico como las disoluciones se mantuvieron en hielo durante todo el proceso para evitar la acción de proteasas o la inactivación térmica de nuestras enzimas.

Tras incubar unos 20-30min a 4°C y reservar una alícuota del H_0 , el resto se centrifuga en una ultracentrífuga Centrikon T-1055, rotor Kontron 55,38, a 10000 g_{av} (36000rpm), 1h a 4°C. Se recoge el sobrenadante (S_1) con las ChEs solubles o débilmente unidas a la membrana y el precipitado (P_1), que ahora se resuspende en un mismo volumen de tampón salino con antiproteasas, suplementado con TX-100 1% p/v (HST). El precipitado se homogeniza en las condiciones señaladas antes, pero en este caso el homogenado resultante (H_1) se incuba 1h en agitación orbital a 4°C para favorecer el efecto disgregador del detergente sobre las fracciones membranales. Se reserva una alícuota de H_1 y de nuevo se centrifuga el resto en las mismas condiciones para finalmente obtener el sobrenadante (S_2) con las proteínas fuertemente ligadas a las membranas solubilizadas. Se resuspende el precipitado (P_2) en un pequeño volumen de HST con la ayuda del polytron (H_2) y se guarda.

En cada paso de la extracción también se reserva una alícuota de la mezcla de los tampones de extracción con las antiproteasas, con el fin de determinar su posible interferencia en la medida de proteína posterior.

Finalmente se determinan las actividades AChE y BuChE, así como la cantidad de proteína en las distintas fracciones (H_0 , S_1 , H_1 , S_2 y H_2) para analizar los porcentajes de solubilización en cada etapa del proceso y la distribución de formas de las ChEs en los sobrenadantes. En la **Figura II.3** se muestra un diagrama con el procedimiento de solubilización aplicado al bazo y al timo de ratón.

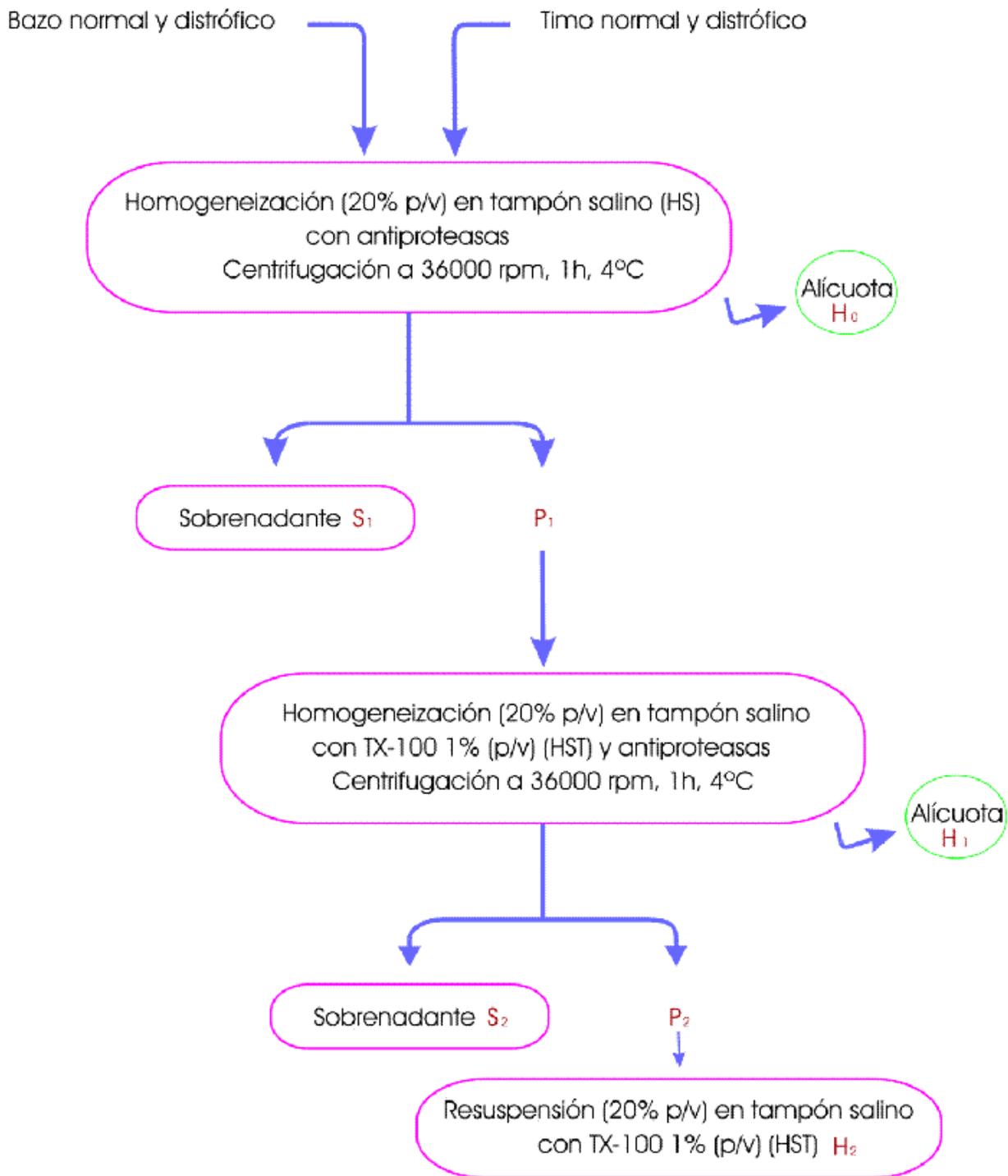


Figura II.3. Extracción secuencial de colinesterasas de BN, BD, TN y TD, haciendo uso de tampones salinos sin y con TX-100.

10.3.1. Digestión con colagenasa y tripsina

Para determinar si la actividad AChE residual que quedaba en el homogenado H₂ correspondía a formas asimétricas (A) o a tetrámeros globulares (G₄) anclados a las membranas se optó por añadir un tercer paso en el proceso de extracción para incluir la digestión con proteasas. En tal caso, el tratamiento produciría la liberación de esas moléculas al medio y aumentaría rendimiento de la extracción enzimática. Además, la identificación de tales formas, por análisis de sedimentación, completaría el patrón molecular de AChE para los órganos normales y distróficos, lo que eventualmente podría arrojar algún dato clave de la manifestación de la patología.

Siguiendo el método de Rossi y Rotundo (1993), el homogenado H₂ se incubó con colagenasa (100U/ml) en presencia de CaCl₂ 10mM, 2h a 37°C. La reacción se detuvo con EGTA 20mM. Por otro lado, otras muestras de H₂ se incubaron con tripsina (50 y 400U/mg proteína), 2h a 37°C. La reacción se bloqueó con la adición del inhibidor de tripsina de soja (10mg/mg tripsina). En ambos casos se procesaron en paralelo muestras “control” incubadas sin proteasa.

Tras los tratamientos, se centrifugaron los homogenados en una ultracentrífuga Centrikon T-1055, rotor Kontron 55,38, a 10000g_{av} (36000rpm), durante 1h a 4°C obteniendo un tercer sobrenadante S₃. Los precipitados se resuspendieron en un pequeño volumen de HST con la ayuda del polytron (H₃). Finalmente, la valoración de las actividades de AChE y BuChE y del contenido de proteína en las muestras S₃ y H₃ incubadas o no con las proteasas permitió determinar si se había liberado la enzima residual.

10.4. Obtención de AChE de linfocitos de ratón.

Como material de partida, usamos 10-20ml de sangre obtenidos por punción cardíaca de los ratones anestesiados, empleando EDTA-K3 como anticoagulante. Diluimos la sangre a la mitad con una disolución de NaCl al 0,9%p/v. Sobre varios tubos que conteniendo 3ml del reactivo Lymphoprep (NYCOMED) se colocan con cuidado 6ml de la sangre diluida a la mitad con NaCl 0,9%(p/v). Este reactivo tiene una densidad de 1,077±0,001g/ml y está constituido por diatrizoato sódico y un compuesto polisacárido

capaz de agregar los eritrocitos, facilitando su sedimentación. Tras centrifugar los tubos en una centrífuga con rotor basculante, a $800g_{av}$ 30min, aparecen tres capas: la inferior (roja) con los hematíes agregados, una capa intermedia (blanca) en la que se concentran las células mononucleares y la superior compuesta por el medio y el plasma. La temperatura es crítica para la óptima separación de las fases, por lo que el proceso se realiza a 20°C . Con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, se recoge la capa de linfocitos ($\sim 1\text{ml}$ por tubo) y se deposita en otro tubo al que se añade el doble de volumen de $\text{NaCl } 0,9\% \text{p/v}$. De este modo disminuye la densidad del medio y facilita la recogida de los linfocitos por centrifugación a $250g_{av}$, 10min. Si el precipitado fuera muy rico en eritrocitos, se procede a su lisis, resuspendiendo las células en 2ml de cloruro amónico ($0,8\% \text{p/v}$). La incubación con el reactivo ha de ser breve, 2-4min. Después se añaden 3ml de PBS y se vuelve a centrifugar como antes. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 1ml de PBS.

Finalmente se procede al recuento de los linfocitos y de los posibles hematíes que puedan quedar. Para ello se depositan unos $20\mu\text{l}$ de muestra en una cámara Bürker y se procede a la observación microscópica con 400 aumentos. Si se desea, se puede determinar la fórmula de la muestra por tinción con azul de metileno (relación 1:1) y posterior visualización al microscopio óptico (400 o 1000 aumentos).

La extracción de la AChE de los linfocitos se realizó en un solo paso; los linfocitos fueron homogeneizados en 1ml de tampón HEPES salino con TX-100 al $1\% \text{p/v}$ (HST) suplementado con el cóctel de antiproteasas. Debido al fuerte anclaje de las moléculas de AChE en la membrana de los linfocitos, el homogenado se incubó 16h para potenciar la acción del detergente y favorecer la total liberación de la AChE. Finalmente, tras reservar una alícuota (H_0), se centrifuga el homogenado en ultracentrífuga Centrikon T-1055, rotor Kontron 55,38, a $10000g_{av}$ (36000rpm), 1h a 4°C . Se recoge el sobrenadante (S_1) y se resuspende el precipitado (H_1) en un pequeño volumen de HST y se determinan las actividades AChE y BuChE así como la concentración proteica a las suspensiones H_0 y H_1 y en el sobrenadante S_1 .

El efecto inhibitor del TX-100 sobre la actividad BuChE constatado por el grupo del Dr. Vidal {Moral-Naranjo, Cabezas-Herrera, et al. 1996 P100 /id}, no supone ningún

inconveniente en el proceso de extracción de las ChEs en linfocitos ya que no hay evidencias de la presencia de BuChE en las membranas linfocitarias.

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERÁSICA

11.1. Fundamento del método de medida

Para valorar las actividades acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa se empleó el método espectrofotométrico de Ellman {Ellman, Courtney, et al. 1961 A091 *fid*} que aprovecha la capacidad del cromógeno ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para oxidar los grupos tioles libres. El sustrato utilizado es la acetiltiocolina (ATCh), si lo que se determina es AChE, o butiriltiocolina (BuTCh) para la BuChE. En ambos casos se trata de un tioanálogo del sustrato preferente.

La enzima, ya sea AChE o BuChE, actúa hidrolizando a su sustrato, de modo que se liberan acetato (o butirato) y tiocolina. La tiocolina reacciona rápidamente con el DTNB, produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato. Dicho anión presenta un color amarillo intenso y un máximo de absorbancia a 412nm ($\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), por lo que es posible seguir espectrofotométricamente su aparición en el medio de reacción. El proceso, para el caso concreto de la AChE, aparece ilustrado en la **Figura II.4**.

Existe un inconveniente en la determinación de la actividad colinesterasa por este método y es la interferencia producida por la reacción del DTNB con los grupos tioles libres en las proteínas de la muestra. Para evitarlo, antes de la adición del sustrato es necesario incubar las muestras con DTNB; de esta manera, los grupos tioles de las proteínas se valoran antes de comenzar la reacción enzimática.

Por otra parte, a pesar de la elevada especificidad de AChE por su sustrato, la capacidad de BuChE para hidrolizar a la ACh aconseja el uso de inhibidores selectivos, como el BW284c51 (dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona) y el iso-OMPA (tetraisopropilpirofosforamida), que son relativamente específicos de AChE y BuChE, respectivamente {Austin & Berry 1953 A094 *fid*}. Así pues, en los ensayos enzimáticos se midió la actividad AChE en presencia de iso-OMPA 50 μM y la BuChE en

la de BW284c51 10 μ M {Tomel & Vidal 1991 M118 /id} {Tomel, Sáez-Valero, et al. 1992 K165 /id} {Sáez-Valero, Tomel, et al. 1993 N057 /id}.

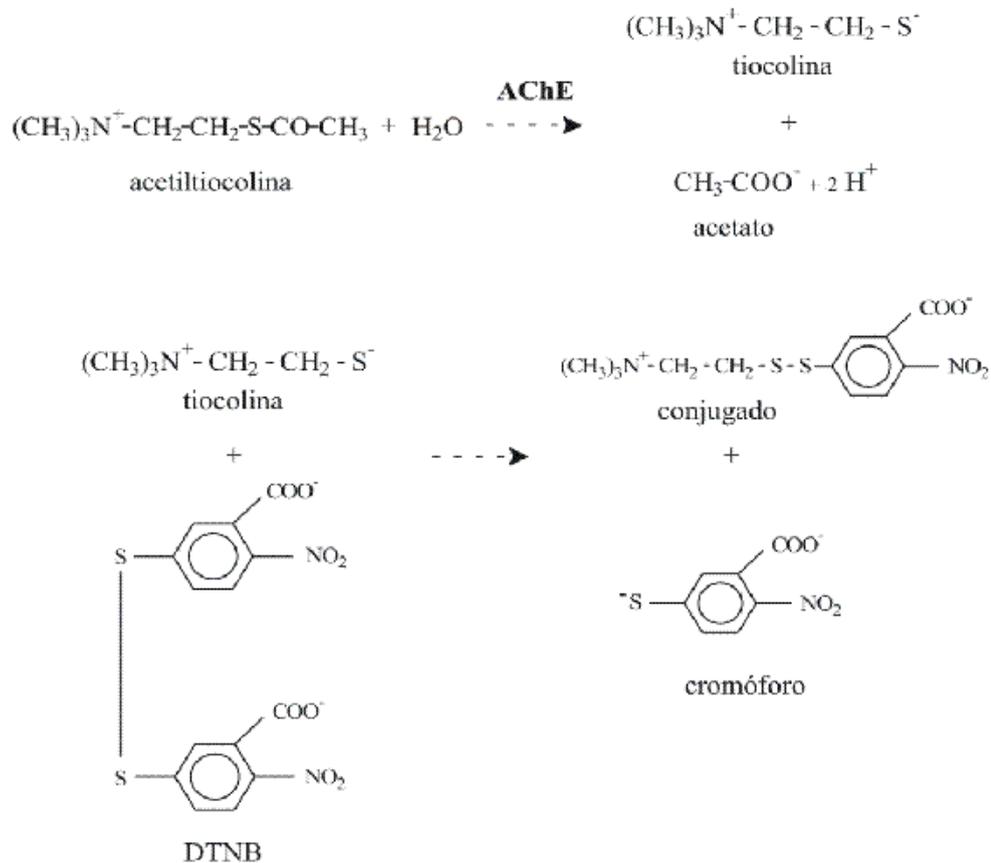


Figura II.4. Determinación de la actividad AChE por el método de Ellman.

11.2. Medida de la actividad colinesterásica en cubeta

Para valorar las actividades AChE y BuChE se utilizaron cubetas de plástico de 1,5ml y un espectrofotómetro de doble haz, Uvikon 930 (Kontron), a 37°C. El medio de reacción contenía tampón de medida (fosfato 100mM, pH 8) con DTNB 0,33mM, 1mM de sustrato (ioduro de acetiltiocolina para la AChE o de butiriltiocolina para la BuChE) y el inhibidor correspondiente.

Para medir la actividad ChE en muestras sin detergente en las que la enzima tiende a agregarse (moléculas con marcado carácter hidrofóbico), se añadió a la cubeta

Triton X-100 al 10%p/v en tampón de medida, para que quedase a una concentración final del 0,5%p/v. Como se ha demostrado que la BuChE se inhibe por la mezcla de sales y Triton X-100 {Sáez-Valero, Tornel, et al. 1993 N057 /id}, la valoración de la actividad BuChE total se llevó a cabo en presencia del detergente Brij 96 a la misma concentración (0,5%p/v), para que se formaran micelas mixtas y evitar así la interacción del TX-100 con las moléculas de BuChE y por ende, su efecto inhibidor.

En cubetas de plástico de 1,5ml, se depositó en primer lugar, un volumen de tampón de medida atemperado a 37°C, al que luego se añadirían resto de reactivos y la muestra hasta completar un volumen final de 1ml. En general, el volumen y la concentración de los reactivos empleados fueron siempre los mismos, así como el orden de adición: 33µl de disolución de DTNB 10mM, 25µl de inhibidor (iso-OMPA 2 mM para AChE o BW284c51 0,4mM para BuChE) y un volumen de muestra, que en la mayoría de los casos era de 25µl. Inmediatamente, se agitaba el contenido de la cubeta y se dejaba incubar durante un periodo de 10-15min para que los grupos tioles libres de las proteínas reaccionaran con el DTNB. Al concluir la incubación se medía la absorbancia a 412nm (A_{412}) en el espectrofotómetro durante 5min, para comprobar que no había incremento de la misma. La reacción se iniciaba con la adición del sustrato (25µl de ATCh o BuTCh 40mM) e inmediatamente después de agitar la cubeta, se registraba el aumento de absorbancia a 412nm y 37°C, frente a una cubeta "blanco". El contenido de la cubeta blanco solo difería del de la cubeta de medida en la ausencia de muestra, cuyo volumen era sustituido por uno equivalente de tampón fosfato. De esta forma se resta el cambio de absorbancia debido a la hidrólisis espontánea (no enzimática) del tioanálogo (ATCh o BuTCh). En ocasiones, la cubeta blanco contenía ambos inhibidores de las colinesterasas y el mismo volumen de muestra, con la finalidad de valorar la posible contribución de actividad esterasa inespecífica en la muestra.

Por tanto, el incremento de absorbancia final resultaba de restar, al aumento de absorbancia medido en la cubeta que contenía la muestra y un único inhibidor, aquél debido a la hidrólisis no enzimática del sustrato, y, eventualmente, el debido a la acción de otras esterasas (en presencia de los dos inhibidores de colinesterasa).

El propio espectrofotómetro representaba los valores de A_{412} respecto al tiempo y transformaba la pendiente de la recta en datos reales de actividad. La actividad enzimática se obtuvo multiplicando el incremento de absorbancia/minuto por un factor (F) que, para un paso óptico de 1cm, se obtiene por la expresión:

$$F = \frac{60 \times 1000 \times V_T}{1.36 \times 10^4 \times V_M}$$

donde V_T y V_M corresponden, respectivamente, al volumen total en la cubeta y al volumen de muestra expresados en mililitros, $1,36 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del cromóforo (ϵ_{412}), y 60 y 1000 son factores de conversión. La actividad viene dada en unidades por mililitro de muestra (U/ml). Una unidad de actividad AChE o BuChE (U) representa la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de sustrato por hora ($\mu\text{mol hora}^{-1}$) en las condiciones de ensayo. Por tanto, la actividad enzimática se expresa en $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ (U/ml) o como actividad específica: $\mu\text{moles hora}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (U/mg).

11.3. Medida en microplaca de valoración

Para determinar la actividad colinesterasa (acetil y butirilcolinesterasa) presente en las fracciones procedentes de los gradientes de densidad de sacarosa (ver **Apdo. II.1.5**), así como la de muestras con baja actividad, se siguió el método de Ellman, modificado adecuadamente para convertirlo en un microensayo colorimétrico {Campoy, Cabezas-Herrera, et al. 1992 K408 /id}. Se utilizaron placas de plástico transparente (Nunc), con 96 pocillos de fondo plano de unos 400 μl , en los cuales se llevaría a cabo la reacción.

En el microensayo, las concentraciones finales de reactivos (sustrato, inhibidor y DTNB) fueron las mismas que para la valoración en cubeta, al igual que el tampón de medida, salvo que en esta ocasión su pH fue de 7,5. En ese caso también se mantuvo la precaución de añadir Brij 96 al tampón de las muestras que llevaban TX-100 para contrarrestar el efecto inhibitor de este último. De este modo, para un volumen final de 275 μl , el volumen de la “mezcla de reacción” fue 200 μl y contenía tampón fosfato 100mM, DTNB 0,45mM y el inhibidor de cada enzima a la concentración adecuada. Para conservar el volumen final, la cantidad de sustrato variaba entre los 25 μl (a concentración

12mM) y los 50 μ l (6mM) según el volumen de muestra fuese, respectivamente, 50 μ l o 25 μ l (o incluso menos, 5 ó 10 μ l completados hasta 25 μ l con tampón fosfato de medida).

La adición de los componentes de la mezcla de reacción siguió siempre el mismo orden: en primer lugar la muestra y luego la “mezcla de reacción” (tampón fosfato, DTNB y el/los inhibidores), incubando todo unos 20min para que tuviera lugar la reacción del DTNB con los grupos tioles libres y la inhibición de la actividad enzimática no deseada. En cada microplaca se dejó la primera columna como “blanco”, una serie de pocillos en los que la muestra se sustituyó por su volumen de agua bidestilada; este blanco servía para medir la absorbancia debida a la hidrólisis espontánea del sustrato. Pero además, para cada muestra se hizo otro “control” adicional que contenía los mismos reactivos (incluida la muestra) y los dos inhibidores de las colinesterasas, con el fin de evaluar el incremento de absorbancia debido a la acción de esterasas inespecíficas.

La reacción se iniciaba con la adición del sustrato, tras la que se realizaba una medida de la placa a tiempo cero y sucesivas medidas a intervalos regulares de tiempo. La duración del ensayo dependía de la actividad de la muestra, y se comprobaba que los incrementos de absorbancia fueran constantes al comparar unos intervalos temporales con otros, es decir, que la actividad fuera lineal con el tiempo. En general, para las muestras obtenidas de los gradientes de sacarosa las medidas requirieron tres horas de incubación, siendo comparados los valores para varios intervalos de tiempo; por ejemplo, 0-60 y 60-120min. Las medidas se realizaron en un lector de placas (Whittaker Bioproducts EIA 400 FW). Se empleó el modo de doble longitud de onda: 405nm y 620nm obteniéndose dos valores de absorbancia distintos que se restaban entre sí, $A_{405} - A_{620}$, para eliminar las posibles interferencias del plástico de la microplaca en la valoración (en realidad este paso es innecesario puesto que la absorbancia del plástico queda anulada al calcular el incremento de absorbancia a 405nm). La diferencia entre este resultado y el aumento de absorbancia medido en los pocillos “control”, dividido entre el intervalo de medida, correspondió al incremento de absorbancia por minuto.

Los valores de actividad colinesterasa obtenidos en los microensayos se expresaron como unidades arbitrarias (UA), que en principio representan un incremento de 0,001 en la diferencia $A_{405} - A_{620}$, por min y por microlitro de muestra. Teniendo en cuenta que el paso óptico es de 0,7cm, se puede calcular que una unidad arbitraria así definida corresponde a

0,029U/ml, pero medidas en diferentes condiciones de temperatura y pH (a temperatura ambiente y pH 7,5) que las determinaciones en espectrofotómetro. No obstante, los valores obtenidos al medir las fracciones de gradiente rutinariamente se normalizaron para tener en cuenta el volumen de muestra aplicado en el gradiente, así como la cantidad de material empleado para la obtención del extracto analizado (en mg de proteína); y por ello se expresan en unidades arbitrarias y no en $\mu\text{moles h}^{-1}\text{ml}^{-1}$ (U/ml). A pesar del inconveniente que ello supone, y aunque las incubaciones no se realicen a 37°C, la medida en microplaca presenta varias ventajas respecto a la medida en cubeta. Una de ellas es la sensibilidad, al poder medir muestras con muy poca actividad durante periodos de tiempo mayores, y usar menores volúmenes de muestra y reactivos. Otra ventaja es el ahorro de tiempo que supone la medida de muchas muestras simultáneamente; que en los 96 pocillos se pueden medir hasta 88 muestras, además de los 8 blancos, una circunstancia especialmente importante a la hora de valorar la actividad AChE y BuChE de cada una de las aproximadamente 40 fracciones que se obtienen de un gradiente de sacarosa.

12. VALORACIÓN DE LA PROTEÍNA EN LOS EXTRACTOS

12.1. Método de Bradford

El método de Bradford es útil para muestras con bajo contenido de proteína; pues detecta cantidades del orden de microgramos. Se basa en el cambio del máximo de absorbancia, de 465nm a 595nm, que se produce cuando el azul brillante de Coomassie G-250 en disolución ácida se une a las proteínas. En medio ácido, el Coomassie es de color rojo-pardo, y a pH alcalino azul intenso. En medio ácido, el cambio de color se debe a que sólo la forma aniónica (azul) es capaz de unirse a las proteínas. La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

La elevada sensibilidad del método exige que el material esté muy limpio. Para valorar la proteína, se elabora una recta patrón, a partir de una disolución de BSA (0,5mg/ml). Para ello, se preparan dos series de tubos con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 μl de dicha disolución, completando el volumen a 0,2ml con agua desionizada.

De acuerdo con el número de ensayos a realizar, se prepara el volumen de reactivo de Bradford necesario, diluido 1:4 en agua. En las microplacas de plástico se colocan dos

volúmenes de 50µl de cada tubo con la proteína estándar, de modo que para cada punto de la recta patrón tenemos cuatro medidas. Las muestras se diluyen adecuadamente y se depositan en la microplaca cuatro volúmenes de cada una de ellas (10, 20, 40 y 50µl), también por duplicado. Los tampones usados en los diferentes pasos de solubilización de la enzima, se diluyen en la misma proporción que las muestras y se sitúan en la microplaca en la misma disposición que éstas, con el fin de usarlos como blancos y eliminar cualquier interferencia debida a las sales, el detergente o las antiproteasas. A continuación se añade a cada pocillo 0,2ml del reactivo de Bradford diluido. La mezcla se incuba 5min para completar la reacción y se lee la absorbancia a 595nm (Microplate Reader Model 680, BioRad). La cantidad de proteína se calcula por referencia a la recta patrón.

13. ANÁLISIS DE SEDIMENTACIÓN

Con el fin de analizar la composición de formas moleculares de las colinesterasas presentes en las muestras, éstas se centrifugaron en gradientes continuos de densidad de sacarosa del 5 al 20%p/v. Cada una de las formas se caracterizó por su coeficiente de sedimentación (S) particular (ver Apdo. II.1.5.3), el cual se calcula comparando la distancia recorrida en el gradiente por la molécula a identificar con la de una proteína estándar de coeficiente de sedimentación conocido {Martin & Ames 1961 A092 *fid*}.

La centrifugación en gradientes de sacarosa conteniendo Brij 96 o Tritón X-100 permite esclarecer el carácter hidrofílico o anfifílico de las proteínas. La interacción del detergente con los dominios hidrofóbicos de las proteínas anfifílicas altera su migración en el gradiente, de modo que en presencia de detergente, cambia el coeficiente de sedimentación de una proteína anfifílica. Este efecto no se da en las proteínas hidrofílicas al carecer de dominios hidrofóbicos.

A su vez, los complejos formados por las proteínas y los detergentes TX-100 y Brij 96 difieren en su comportamiento hidrodinámico. Las asociaciones proteína-Brij 96 avanzan en el gradiente menos que los complejos con TX-100. Las formas anfílicas de AChE y BuChE se separan mejor de las hidrofílicas en los gradientes con Brij 96 {Moya-Quiles, Villalba-Sánchez, et al. 1992 K059 *fid*} {Sáez-Valero, Tomel, et al. 1993 N057 *fid*}, mientras que los dímeros (G₂) y monómeros (G₁) se resuelven mejor en presencia de TX-100 {Nieto-Ceron, Moral-Naranjo, et al. 2004 4555 *fid*}.

13.1. Preparación de los gradientes de sacarosa

En cada recipiente del formador de gradiente, en realidad dos vasos comunicados entre sí (Kontron), se vierten disoluciones de sacarosa al 5% y 20%p/v en tampón Tris-HCl 10mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 1M, MgCl₂ 50mM y Brij 96 (0,5%p/v) o Triton X-100 (0,5%p/v). En el vaso con salida al exterior se ponen 5ml de sacarosa concentrada, y en el otro 5ml de la diluida. El vaso donde se vierte la sacarosa concentrada tiene una salida en su base que se conecta a un tubo fino de silicona. El tubo se ajusta a una bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 2), de modo que su extremo entre en un tubo de centrifuga de 12ml (de polialómero, de Beckman). Al tiempo que se abre el paso que comunica ambos vasos, se pone en marcha la bomba peristáltica. El gradiente se forma a medida que la disolución de sacarosa diluida pasa hacia la cámara de la concentrada, en donde se mezclan mediante un agitador helicoidal. El flujo de salida se controla con la bomba peristáltica.

Para poder calcular los coeficientes de sedimentación de las proteínas, antes de depositar las muestras sobre el gradiente, se añaden 10µl de cada proteína estándar: catalasa de hígado bovino (11,4S) y fosfatasa alcalina de intestino bovino (6,1S).

Una vez depositadas las muestras (200-1000µl), los tubos con los gradientes se centrifugan 20h a 36000rpm y a 4°C, en un rotor basculante Beckman SW41Ti. Tras la centrifugación, los tubos se perforan por su base, con un perforador (Beckman), y se recogen fracciones (entre 38 y 42, de unos 260µl) con la ayuda de la bomba peristáltica (Gilson) y un colector de fracciones (F-100 de Pharmacia).

En cada fracción del gradiente se determina la actividad ChE y la de las enzimas marcadoras. Se representan los resultados gráficamente y se localizan las fracciones con actividad máxima. También se averiguan las posiciones de las proteínas marcadoras. La proporción relativa de cada forma molecular, de AChE o BuChE, se obtiene sumando la actividad de las fracciones que componen cada pico y dividiendo la suma por la actividad total recuperada del gradiente. Si en los perfiles aparecen picos solapados, se separan mediante un programa de desconvolución en curvas de Gauss (Peak-Fit de SPSS, versión 4).

13.2. Medida de actividad colinesterasa y localización de las proteínas marcadoras

La catalasa y la fosfatasa alcalina se disuelven por separado en NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,5, a la concentración de 15 y 20mg/ml, respectivamente. Se añaden 10µl de cada a las muestras y, tras la centrifugación, se identifican aquellas fracciones con mayor actividad.

La actividad catalasa (C) se determina siguiendo la disminución de absorbancia a 240nm (Microplate Reader Model 680, BioRad) de una mezcla de reacción que lleva 0,2ml de peróxido de hidrógeno 1mM, en tampón fosfato 100mM, pH 7,5, y 2µl de muestra. La mezcla de reacción se prepara poco antes de comenzar las medidas, añadiendo 20µl de H₂O₂ (30%v/v) a 20ml de tampón fosfato. La absorbancia disminuye conforme la catalasa descompone el H₂O₂ ($\epsilon = 41M^{-1}cm^{-1}$) en agua y oxígeno molecular. Las medidas se realizan en micoplaca transparente a la luz uv (Costar) y a temperatura ambiente (20-25°C).

A pH alcalino, la fosfatasa alcalina (F) convierte el p-nitrofenilfosfato (pNPP) en fosfato y p-nitrofenol, cuya aparición se mide a 405nm ($\epsilon = 18,2 \cdot 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Antes del ensayo, se mezclan 0,2ml de pNPP 38mM y 10ml de tampón dietanolamina 0,1M, pH 9,8. En cada pocillo de una micoplaca se depositan 5µl de muestra y 250µl de mezcla de reacción. Las medidas se hacen a temperatura ambiente, con el modo dual de longitud de onda, 405nm y 620nm, para medir el incremento de absorbancia ($A_{405} - A_{620}$) en cada pocillo.

13.3. Cálculo del coeficiente de sedimentación

Una vez medidas las actividades AChE y BuChE y las de las enzimas marcadoras en las fracciones del gradiente, se calcula el coeficiente de sedimentación de cada componente molecular de AChE y BuChE, expresado en unidades Svedberg (S), por el método de Martin y Ames {Martin & Ames 1961 A092 /id}, según la siguiente fórmula:

$$S_{\text{proteína problema}} = \frac{(N_t - N_p)}{(N_t - N_e)} \times S_{20,w \text{ proteína estándar}}$$

donde N_t indica el número total de fracciones recogidas del gradiente, N_p , la fracción con el valor máximo de actividad de la forma molecular de AChE o BuChE y N_e , la fracción en la que la actividad de la enzima marcadora es máxima. En cada caso, es conveniente elegir la proteína estándar que migre a la posición más próxima a la forma molecular cuyo coeficiente de sedimentación se desea determinar, por ejemplo, catalasa para las moléculas más pesadas y fosfatasa alcalina para las ligeras.

14. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNAS DE FENIL-AGAROSA

La cromatografía hidrofóbica en fenil-agarosa permite establecer el comportamiento hidrofílico o anfifílico de las proteínas, y en nuestro caso de las formas moleculares de las ChEs. Las proteínas con dominios hidrofóbicos expuestos al medio se ligan a los anillos aromáticos inmovilizados en la matriz. La eficiencia de la separación depende de las interacciones entre el ligando, el agua y la proteína. La temperatura, el pH y la fuerza iónica, entre otros factores, influyen en la separación, lo que proporciona una gran versatilidad en el diseño experimental y en las condiciones de elución.

La técnica puede emplearse con extractos preparados sin o con detergentes, pues los soportes hidrofóbicos son totalmente estables frente a detergentes iónicos o no iónicos. En los experimentos se emplearon los sobrenadantes S_1 y S_2 , obtenidos por extracción de los órganos normales con tampón salino, sin y con TX-100.

Se recomienda realizar el experimento en cámara fría. Antes de comenzar el ensayo es necesario seguir una serie de recomendaciones para conseguir un óptimo empaquetamiento de la resina. Se ha de medir el volumen de la fase estacionaria a emplear para añadirlo en un solo paso a la columna cromatográfica y evitar de este modo que se formen capas de resina con diferente grado de compactación. También es conveniente eliminar las partículas finas resultantes de la fragmentación de la fase estacionaria, ya que empeoran el empaquetamiento. Para ello, la suspensión de la resina se deja sedimentar quedando las partículas en el sobrenadante, que se decanta. Finalmente, es aconsejable depositar un pequeño colchón de tampón en el fondo de la columna antes de iniciar el vertido de la suspensión de la resina para evitar que ésta caiga de forma brusca.

Se rellena la columna cromatográfica, de 10cm x 1cm, con 6ml de fenil-agarosa. Se lava el gel con 20 volúmenes de tampón salino (tampón de equilibrio, HS, NaCl 1M, Hepes 15mM, pH 7,4). Los extractos S₁ y S₂ de bazo (1ml de cada) fueron diluidos en un tampón adecuado para elevar la concentración de NaCl a 1,4M (al aumentar la fuerza iónica favorecemos la unión de las proteínas a la matriz por interacciones hidrofóbicas) y reducir la concentración de TX-100 en S₂ al 0,25%p/v. Una vez diluidos los extractos S₁ y S₂ se depositaron sobre el gel por separado. Se recogieron fracciones, controlando el flujo de salida (13ml/h) con una bomba peristáltica (Gilson 2). Una vez que la muestra ha penetrado en el gel y sin dejar que se seque la superficie de éste, se agrega el medio de equilibrio (25-30ml de HS), conservando el flujo de salida. Se recogieron las ChEs no retenidas (Fracción 1, F1), y aún húmeda la superficie de la resina, se añaden otros 25-30ml del tampón Hepes 15mM pH 7,4 sin sales para liberar la actividad débilmente retenida (F2) y finalmente se eluye con Hepes 15mM pH 7,4 suplementado con Triton X-100 (2% p/v) para liberar las ChEs fuertemente ligadas al gel (F3). En cada paso de la cromatografía se recogen 30-50 fracciones (1ml), con un colector de fracciones (Pharmacia), y en todas se mide la actividad AChE. Los componentes enzimáticos en F1-F3 se identifican posteriormente mediante análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa con Brij 96 o Triton X-100.

15. CONVERSIÓN DE FORMAS ANFIFÍLICAS EN HIDROFÍLICAS

La fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PIPLC) sirve para saber si una proteína particular está anclada a la membrana por un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ver Apdo. I.3.2.2). La PIPLC hidroliza el enlace fosfodiéster del fosfatidilinositol para dar diacilglicerol e inositol-1,2-monofosfato cíclico. La ectoproteína se libera de la membrana al separarse la porción proteica y el diacilglicerol, que permanece en la bicapa. Con PIPLC de origen bacteriano se consigue solubilizar proteínas que lleven GPI, siempre que los hidroxilos del inositol no tengan cadenas acilo adicionales. Si esto ocurre, se hace necesario el tratamiento previo con hidroxilamina alcalina para eliminar las cadenas de ácido graso y permitir la acción enzimática de la PIPLC.

La PIPLC de *Bacillus thuringiensis* es útil para liberar proteínas ancladas por GPI. Tiene un tamaño de 34kDa, es activa a pH neutro (pH óptimo 7-7,4), y su actividad no disminuye en presencia de sales (admite NaCl 0,15M). También se utiliza con éxito en la conversión de proteínas anfifílicas con GPI, en sus variantes hidrofílicas {Low & Huang 1991 M110 /id}{Ferguson 1992 K067 /id}{Sáez-Valero & Vidal 1995 P009 /id}.

Para investigar si la PIPLC podía transformar las formas G_2^A y G_1^A de AChE en sus variantes hidrofílicas, se realizaron análisis de sedimentación preparativos con el extracto S_2 de bazo normal con la finalidad de separar las formas moleculares. Este paso no fue necesario con la fracción S_1 , debido a que en ella predominan las formas G_1^H (alrededor del 90%). Una vez aislados los picos de cada forma molecular, fueron dializados frente a 10 volúmenes de NaCl 1M, Tris-HCl 25mM pH 7,4 a 4°C, para disminuir la concentración de sales y sacarosa y ajustar el medio de la muestra al medio en que viene la PIPLC. En un tubo eppendorf se pusieron 1-1,5ml de S_1 o del pico del gradiente de sacarosa de S_2 con alto contenido de moléculas G_2^A y G_1^A de AChE. El análisis del efecto de la PIPLC sobre las formas G_1^H se realizó como un control adicional de la especificidad de la acción de la PIPLC, así como para corroborar el comportamiento hidrofílico de las moléculas de AChE en S_1 .

El tratamiento se llevó a cabo añadiendo PIPLC de *Bacillus thuringiensis* (3U/ml de muestra) e incubando la mezcla 3h a 37°C (en oscuridad) con agitación ocasional. Como control se utilizó otra muestra incubada en las mismas condiciones, pero sin fosfolipasa. La conversión de las formas anfifílicas en hidrofílicas se verificó por análisis de sedimentación en gradientes con Brij 96.

16. CONVERSIÓN DE LOS DÍMEROS DE ACHE EN MONÓMEROS

Como los extractos de bazo normal eran aparentemente ricos en dímeros anfifílicos de AChE, se estudió el supuesto estado dimérico por su conversión en monómeros. Para ello, se redujo el puente disulfuro que traba las subunidades en los dímeros usando β -mercaptoetanol (β -ME).

Al igual que en el apartado anterior, las formas moleculares se aislaron por análisis de sedimentación preparativo de S_2 de bazo normal y posterior diálisis de los picos atribuidos a las formas G_2^A y G_1^A de AChE. El tampón de diálisis tiene la siguiente composición: NaCl 140mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,5 (la diálisis se realiza a 4°C). La finalidad de la diálisis no es otra que disminuir la cantidad de sales y sacarosa y ajustar el pH de la muestra al pH óptimo del tratamiento de monomerización (la diálisis se realiza a 4°C).

Alrededor de 1,5-2ml de las diferentes muestras que contenían las formas moleculares de AChE: G_1^H (de S_1), G_2^A y G_1^A (de la fracción S_2) de bazo normal fueron incubados con β -mercaptoetanol 14mM (concentración final), con agitación constante, 40min a temperatura ambiente. Otra serie de muestras fue incubada en paralelo, pero sin β -mercaptoetanol. Los grupos tioles libres se bloquearon luego, para impedir el restablecimiento de los enlaces disulfuro por oxidación espontánea. A tal fin, se añadió a la mezcla de reacción iodoacetato 140mM (concentración final), se ajustó el pH a 8,5 con NaOH, y se incubó en agitación, 40min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el tratamiento, el exceso de reactivos se eliminó por diálisis frente a 200ml de NaCl 140mM, Tris 10mM, pH 7,5 a 4°C.

La posible conversión de los dímeros en monómeros se verificó comparando los perfiles de las formas moleculares de AChE en las muestras incubadas o no con β -mercaptoetanol por análisis de sedimentación en Triton X-100.

17. ENSAYOS CON LECTINAS INMOVILIZADAS

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, con capacidad para aglutinar células y precipitar carbohidratos complejos. Las más conocidas son de origen vegetal, aunque se han aislado de virus, bacterias, animales invertebrados y vertebrados. Participan en numerosos procesos biológicos, como el reconocimiento celular y la adhesión, y se caracterizan por su especificidad para reconocer glicanos de diferente composición sin alterarlos. Las lectinas son útiles para investigar, de forma indirecta, la composición de azúcares terminales de los oligosacáridos, e incluso para purificar glicoproteínas.

El estudio de la glicosilación de las distintas formas de colinesterasa se realizó incubando las muestras con lectinas inmovilizadas en matrices de agarosa. Como lectinas se emplearon concanavalina A (Con A), que se une específicamente a restos de α -D-glucosa y α -D-manosa; aglutinina de lenteja (*Lens culinaris* agglutinin o LCA), que reconoce fucosa ligada a N-acetilglucosamina (NAcGlc); aglutinina de germen de trigo (Wheat germ agglutinin, WGA), que se une a NAcGlc y ácido siálico; aglutinina de ricino (*Ricinus communis* agglutinin tipo I, o RCA), que reconoce de modo específico moléculas de galactosa terminales (β -D-galactosa o N-Acetil-D-galactosamina), aglutinina de corteza de saúco (*Sambucus nigra*, SNA) que se liga preferentemente a ácido siálico unido a galactosa terminal en (α -2,6) y en menor grado a (α -2,3), la aglutinina de *Abrus precatorius* (APA) que une β -D-galactosa, la aglutinina de *Artocarpus integrifolia* (AIA), que tiene la capacidad de fijar las moléculas de α -D-galactosa y finalmente la aglutinina de loto (LTA, *Tetragonolobus purpureas*), que liga restos de fucosa.

Para este análisis se mezclaron volúmenes de los extractos S₁ y S₂ (obtenidos de los distintos tejidos), en proporción adecuada a su grado de solubilización. La mezcla resultante se diluye a la mitad con tampón bajo en sal (NaCl 100mM, Hepes 15mM, pH 7,5) para disminuir la fuerza iónica del medio y la concentración de detergente, evitando así cualquier posible interferencia. Las muestras se incubaron con Sepharose 4B (usada como control) o las distintas lectinas inmovilizadas (dos volúmenes de muestra/volumen matriz). Antes de cada prueba experimental, todas las matrices, incluida la Sepharosa 4B, se lavaban tres veces en un tampón Hepes-salino con la misma composición a la que quedaba la mezcla de S₁+S₂ diluida. Debido a que la Con-A requiere la presencia de iones Ca²⁺ y Mn²⁺ para su actuación, también se añadió a cada tubo, el volumen necesario de una disolución 100mM de CaCl₂ y de MnCl₂ para alcanzar una concentración final de 5mM en la mezcla de reacción y así asegurar la presencia de estos iones en el medio, a pesar de la existencia de EDTA y EGTA procedentes de los tampones de extracción.

La incubación se realizaba durante 16h a 4°C con agitación suave (en tubos eppendorf), permitiendo la unión de las glicoproteínas a las lectinas.

La enzima libre se separó de la reconocida por las lectinas por centrifugación de los tubos eppendorf a 3000rpm, 5min a 4°C en una microfuga (Denver Instruments),

precipitando los complejos agarosa-lectina-enzima y recogiendo con mucho cuidado el sobrenadante con la fracción no unida. Se midió la actividad AChE y BuChE en los sobrenadantes y se calculó el porcentaje de interacción con cada lectina por referencia al sobrenadante control de Sepharose 4B (cuya actividad se considera el 100%). Un posterior análisis de sedimentación de los sobrenadantes proporcionó datos más fiables sobre los porcentajes de interacción, así como sobre la interacción de cada una de las formas moleculares con cada lectina ensayada.

1.8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE AChE CON ANTICUERPOS

Con el empleo de anticuerpos es posible conocer la homología estructural entre las ChEs de distintas especies, de diferentes tejidos y entre las formas moleculares de un mismo tejido. De esta forma, intentamos averiguar si había diferencias estructurales entre las formas homólogas de las ChEs de los tejidos normales y distróficos. Los anticuerpos utilizados fueron: E-19 y N-19, dos antisueros generados en cabra dirigidos contra los extremos N-terminales de la AChE de ratón y humano, respectivamente; H-134, un antisuero de conejo contra el fragmento C-terminal de la AChE humana (aminoácidos 481-614); un antisuero de cabra contra el extremo C-terminal de la AChE humana (C-16), un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 de ratón contra el péptido 411-609 de la AChE de cerebro humano (C-46), un antisuero generado contra la AChE de eritrocito bovino (BT3), un antisuero generado contra un péptido de 14 aminoácidos (GMHKAARVGRGER) del extremo C-terminal de AChE-R de ratón (anti-R) y un antisuero generado contra una molécula de AChE-H troncada en su extremo C-terminal, recombinante en células HEK (anti-Rec).

Para la inmunofijación de las actividades AChE y BuChE a los anticuerpos, las muestras se incubaron con proteína G inmovilizada en agarosa, en la que previamente se habían fijado los anticuerpos. Un mililitro de proteína G-agarosa puede ligar de 10 a 20mg de IgG, dependiendo de la especie y subclase de IgG.

En primer lugar, la proteína G inmovilizada (PGA) se diluye 10 veces con BSA 2%*p/v* en PBS (NaCl 140mM en tampón fosfato 10mM, pH 7,2), y la mezcla se incuba

30min a 4°C. De este modo, se evita la unión inespecífica de las proteínas al gel. A continuación, se añade el anticuerpo a la proteína G. En una serie de viales (uno por cada anticuerpo, además del control), se añaden 10µl de anticuerpo a la proteína G-agarosa, preincubada con BSA. En paralelo, se preparan ensayos control, con PGA pero sin anticuerpo. Tras incubar con agitación suave a 4°C durante 4h, se retiran los anticuerpos no unidos a la resina con tres ciclos de lavado, por adición de PBS, centrifugación y eliminación del sobrenadante.

Para la inmunoprecipitación, se usaron mezclas de los sobrenadantes S₁+S₂ (preparadas según la proporción de solubilización en el extracto), o bien los sobrenadantes S₁ o S₂ por separado, obtenidos de las muestras normales y distróficas. En cualquier caso, las muestras se diluyen convenientemente para disminuir la fuerza iónica y la proporción de detergente. Se añaden volúmenes de 0,5-1ml de las muestras diluidas a viales que llevan sólo proteína G-agarosa (control), o los anticuerpos E-19, N-19, H-134, C-16 o C-46 unidos (prueba). La mezcla se incuba 16-24h a 4°C, con agitación orbital suave. En la incubación, sólo las moléculas de AChE con los epítomos particulares son reconocidas por los anticuerpos y se unen a la agarosa. Para recoger la actividad ChE no ligada, se separan las bolitas de gel por centrifugación en microfuga, 5min a 3000rpm, y se retira el sobrenadante. Para calcular el porcentaje de interacción de la enzima con los anticuerpos, se valoran las actividades AChE en los sobrenadantes “prueba” y “control”. Los datos se expresan como porcentaje de actividad AChE ligada respecto a la actividad total. Además, se pueden utilizar los sobrenadantes para identificar las moléculas de AChE no reconocidas por los anticuerpos, por sedimentación en gradientes de sacarosa. Los geles con la enzima retenida pueden ser empleados en ensayos de Western blotting. En tal caso, se lavan tres veces con PBS en (para eliminar la enzima que queda entre las bolitas del gel), se les añade el tampón de muestra desnaturizante y se calientan a 95°C, 4min para liberar todas las proteínas unidas al gel.

Tabla II.1. Características generales de los anticuerpos empleados en los ensayos de inmunoprecipitación y Western blot. La mayoría de los anticuerpos suministrados por diferentes casas comerciales son policlonales, a excepción del anticuerpo monoclonal C-46. Las aplicaciones recomendadas por los fabricantes son: WB= Western blot; IP= Inmunoprecipitación; IH= Inmunohistoquímica, IF= Inmunofluorescencia.

Código	Tipo	Casa comercial	Referencia	Antígeno	Fuente	Reactividad	Aplicabilidad
E-19	IgG policlonal	Santa Cruz	sc-6432	Extremo N-terminal de AChE de ratón	Cabra	AChE de ratón y rata	WB, IH
N-19	IgG policlonal	Santa Cruz	sc-6431	Extremo N-terminal de AChE humana	Cabra	AChE humana	WB, IH
H-134	IgG policlonal	Santa Cruz	sc-11409	Fragmento C-terminal de AChE humana (aminoácidos 481-614)	Conejo	AChE de ratón, rata y humana	WB, IH, IP
C-16	IgG policlonal	Santa Cruz	sc-6430	Extremo C-terminal de AChE humana	Cabra	AChE de ratón, rata y humana	WB, IH
C-46	IgG monoclonal	Transduction Laboratories	A27320	Fragmento de AChE de cerebrohumano (aminoácidos 411-609)	Ratón	AChE de perro, ratón, rata y humana	WB, IP, IF
BT-3	IgG policlonal	Biotrend Chemikalien	0030-2269	AChE de eritrocito bovino	Oveja	AChE de ratón, rata y humana	WB, IH, IP
anti-R	IgG policlonal	Genosys Biotechnologies	-	Fragmento de 14 aminoácidos del péptido R de ratón	Conejo	AChE-R de ratón	WB
anti-Rec	IgG policlonal	Suministrado por P. Taylor	-	AChE recombinante de ratón	Conejo	AChE de ratón	WB, IP

19. PRUEBAS DE WESTERN BLOT

Los experimentos de Western blot se utilizaron para saber si había diferencias en el tamaño de las subunidades de AChE extraídas de los tejidos normales y distróficos. A continuación, se detallan las etapas que comprende un Western blot.

19.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Primero, se separan las proteínas por electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), siguiendo básicamente el método de Laemmli con un sistema discontinuo de tampones {Laemmli 1970 494 /id}. Con tal fin, se empleó un sistema electroforético de pequeñas dimensiones (Mini-Protean II, Bio-Rad), que permite aplicar pequeñas cantidades de muestra y desarrollar en poco tiempo la electroforesis en dos geles.

Preparación del gel separador y del gel concentrador

En primer lugar, se monta el sistema de cristales (7 x 8,5cm) donde polimerizará la acrilamida, usando los espaciadores de 0,75 o 1,5mm. Para el gel separador, la concentración de acrilamida fue del 7,5%p/v, y para un volumen total de 10ml se mezclaron:

Agua purificada	4,85ml
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	2,50ml
SDS 10% p/v	0,10ml
Acrilamida 29,2%-bisacrilamida 0,8%	2,50ml
Persulfato amónico 10% p/v	0,05ml
TEMED	0,01ml

Inicialmente la mezcla se prepara sin persulfato ni TEMED. Se mezclan todos los reactivos con un agitador magnético, evitando la formación de burbujas y la oxigenación de la muestra que puede alterar la polimerización. Se mantiene la mezcla en agitación y tras añadir el persulfato (recién preparado) y el TEMED, comienza la polimerización. Rápidamente se vierte la disolución entre los cristales hasta unos 2cm del borde superior, evitando que se formen burbujas. Por cada gel se necesitan 3,5-4ml de mezcla si

- II.11. Electroforesis No Desnaturalizante en Gel -

empleamos los espaciadores de 0,75mm, o el doble si usamos los espaciadores gruesos (1,5mm).

Inmediatamente después de poner la mezcla entre los cristales, se deposita sobre ella una capa de agua, con sumo cuidado y por los laterales. La capa de agua hace que la polimerización sea uniforme en el borde superior del gel separador y evita que penetre el oxígeno. La polimerización finaliza en menos de 1h, a temperatura ambiente. Al añadir el agua, se aprecia una interfase entre ésta y la mezcla de acrilamida que pronto desaparece y vuelve a aparecer una vez que el gel ha polimerizado. El gel separador puede conservarse a 4°C, siempre que la superficie externa se conserve hidratada (para ello lo más idóneo es cubrir la superficie con tampón Tris 375mM, pH 8,8).

Una vez que ha polimerizado el gel separador se prepara el concentrador, que se diferencia del primero por su menor concentración de acrilamida (4%) y un pH cercano a la neutralidad (6,8), de ahí que se hable de sistema discontinuo de tampones. Para un volumen final de 10ml se mezclan:

Agua purificada	6,
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	2,
SDS 10% p/v	0,
Acrilamida 29,2%-bisacrilamida 0,8%	1,
Persulfato amónico 10% p/v	0,
TEMED	0,
	01ml

Al igual que para el gel separador, el persulfato y el TEMED se añaden inmediatamente antes de usar la mezcla. Tras retirar la capa de agua del gel separador, se agita la mezcla e inmediatamente se vierte con cuidado hasta el borde de los cristales. Después se coloca el peine, que tras la polimerización formará los pocillos en el gel (10 calles). Es importante evitar la formación de burbujas debajo del peine. Se deja polimerizar la mezcla unos 45min a temperatura ambiente.

Tratamiento de las muestras

Antes de la electroforesis, las muestras se desnaturalizan con dodecilsulfato sódico (SDS) y β -mercaptoetanol (β -ME). El SDS es un detergente aniónico que actúa disociando y desnaturalizando a las proteínas; el β -ME es un agente reductor que rompe los enlaces disulfuro inter- e intracatenarios. Con este tratamiento, las proteínas oligoméricas se disocian en sus subunidades y los polipéptidos resultantes adoptan una conformación de ovillo al azar. Por eso, a este tipo de electroforesis se le denomina disociante o desnaturalizante.

Además de su efecto desnaturalizante, el SDS se asocia a los polipéptidos en una relación constante (1,4g de SDS/g de polipéptido), aumentando su carga negativa y, por tanto, su movilidad electroforética. Esta unión anula la carga intrínseca del polipéptido por lo que los diferentes complejos SDS-proteína tienen prácticamente la misma densidad de carga. En definitiva, los efectos debidos a la carga y forma de la cadena polipeptídica quedan suprimidos en el SDS-PAGE, de modo que el único parámetro que determina la separación de las proteínas es su tamaño. La malla tridimensional constituida por la acrilamida, forma una especie de tamiz molecular que ofrece mayor o menor resistencia a la migración de las proteínas en el gel en función de su tamaño, permitiendo su separación. El cálculo del tamaño de las proteínas se establece por referencia a proteínas patrones de masa molecular conocida.

Para calcular la masa de las subunidades de AChE se usó una mezcla de proteínas estándares no coloreadas (Sigma, SDS-6H) de entre 30 y 200kDa, que contenía: anhidrasa carbónica de eritrocito bovino (29kDa), ovoalbúmina (45kDa), BSA (66kDa), fosforilasa b de músculo de conejo (subunidad de 97,4kDa), β -galactosidasa de *Escherichia coli* (subunidad de 116kDa) y miosina de músculo de conejo (subunidad de 205kDa). Los marcadores vienen liofilizados y han de disolverse en tampón de desnaturalización en una relación de 0,5mg proteína/ml, aproximadamente.

Para desnaturalizar las proteínas, las muestras y la mezcla de proteínas patrones se incubaron, por separado, con tampón de carga desnaturalizante (TCD), cuya composición, para un volumen final de 2ml, es la siguiente:

Agua purificada	1,
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	0,
SDS 10% p/v	0,
β -Mercaptoetanol	0,
Glicerol	0,
Azul de bromofenol	0,
(1mg/ml)	0,25ml

El SDS desnatura las proteínas y junto con el β -mercaptoetanol disocia los oligómeros. El glicerol aumenta la densidad de las muestras y evita su difusión al depositarlas sobre el gel. El azul de bromofenol se utiliza para facilitar la aplicación de las muestras y seguir el movimiento del frente.

La desnaturalización se completa calentando las muestras y las proteínas patrones a 95-100°C, 4 min en un bloque calefactor. De esta forma, se consiguen liberar las ChEs unidas a matrices diversas (PGA, fenil-Sepharose o alguna lectina). Después de centrifugar 0,5-1 min a 3000rpm en microfuga, se recoge el sobrenadante, con cuidado para no coger las bolitas de la matriz (en su caso). El sobrenadante se aplica directamente al gel (30-60 μ l según se trate de un gel fino, 0,75mm, o grueso, 1,5mm) o se guarda en congelador. Hay que tener en cuenta que el SDS precipita en frío, por lo que antes de usar muestras que han sido congeladas, hay que calentarlas a 95-100°C para redissolverlo. La relación mg SDS/mg proteína fue siempre mayor que la mínima recomendada, 3mg SDS/mg proteína.

Aplicación de las muestras y recorrido

Finalizada la polimerización del gel espaciador, se retira el peine, se lavan los pocillos del gel con agua, y se coloca el soporte de los geles en el sistema de electroforesis, comprobando que los depósitos con el tampón de recorrido no se comunican entre sí.

Se vierte tampón de recorrido (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%p/v, pH 8,3) en los depósitos con los electrodos, con cuidado para no formar burbujas en las calles o debajo del gel separador y se vuelven a lavar los pocillos con el tampón, asegurándose que están totalmente cubiertos por éste. Se necesitan 400ml de tampón para un sistema de Mini-Protean II. A continuación, en los pocillos se depositan las muestras (30-60 μ l) y las

proteínas estándares (10 μ l en un volumen final de 30-60 μ l). El color azul de las muestras, por el azul de bromofenol, permite comprobar que la muestra se ha depositado correctamente.

En los geles para Western blot, se reserva una calle para las proteínas patrones preteñidas con un colorante azul. Empleando estos patrones coloreados se puede ver la eficiencia de transferencia, y la orientación del gel y de la membrana. Estas proteínas fueron: triosa fosfato isomerasa (26,6kDa), lactato deshidrogenasa (36,5kDa), ovoalbúmina (45kDa), piruvato quinasa (58kDa), fructosa-6-fosfato quinasa (84kDa) y β -galactosidasa (116kDa). Estos patrones coloreados no suelen utilizarse para calcular la masa de la proteína de interés, pues a causa del colorante, la movilidad de las proteínas patrones se altera ligeramente, haciéndolas inapropiadas para este fin.

La electroforesis se desarrolla a voltaje constante (180V) y a temperatura ambiente. Puesto que el recorrido dura poco tiempo (unos 45min) apenas se produce calentamiento, lo que hace innecesario el sistema de refrigeración. El avance del frente se puede seguir observando el desplazamiento del azul de bromofenol, que forma una banda horizontal fina. Cuando el frente está a 1-2mm del final del gel, se detiene la electroforesis.

Electrotransferencia

Mediante un dispositivo apropiado, las proteínas pueden ser transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Para ello, se pone el gel en estrecho contacto con la membrana, y se aplica un campo eléctrico perpendicular al plano del gel. De esta manera las proteínas, que tienen carga negativa debido al SDS, salen del gel en su migración hacia el polo positivo (ánodo) quedando retenidas en la membrana. Posteriormente, la membrana es bloqueada e incubada con los anticuerpos primario y secundario.

Al acabar la electroforesis, se desmonta el sistema y se separan los dos cristales que contienen el gel. Tras realizar un pequeño corte en una esquina del gel separador, para saber siempre la posición de las muestras, se elimina el gel concentrador. A continuación, se sumerge el gel separador en tampón de transferencia (TT, metanol 10%(v/v), glicina 192mM, SDS 0,01%p/v, Tris 25mM, pH 8,3; no es preciso ajustar el pH, ya que las proporciones de glicina y Tris dan lugar al pH deseado), 10min con agitación; de esta

- II.11. Electroforesis No Desnaturalizante en Gel -

forma se evita que durante la transferencia cambie el tamaño del gel a causa del metanol en el tampón, lo que perjudicaría a la transferencia. El SDS facilita la transferencia de las proteínas pero, como todos los detergentes, puede unirse y bloquear la membrana, dificultando así la unión de las proteínas y por ello se emplea a una concentración mucho menor que en la electroforesis. Por su parte, el metanol dificulta la salida de las proteínas del gel, pero mejora la adsorción a la membrana de las de pequeño tamaño (~80kDa, o menores). Por eso, deben ajustarse las cantidades de SDS y metanol en cada caso particular, teniendo en cuenta la clase de membrana utilizada.

En nuestro caso, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (con poros de 0,45 μ m). Las membranas se cortan a un tamaño ligeramente superior al del gel, y se hidratan en agua por capilaridad. Posteriormente se incuban unos minutos en TT. A lo largo del proceso, es necesario manejar las membranas con guantes de látex y pinzas, para evitar mancharlas con grasa y proteínas de las manos.

Para la electrotransferencia se utilizó un sistema Mini Trans-blot (Bio-Rad). Este sistema consiste en dos casetes de plástico en los que el gel es colocado en estrecho contacto con la membrana de nitrocelulosa gracias a la presencia de esponjas (Scotch-brite) y papeles de filtro debidamente preempapados en TT, para permitir la conducción del campo eléctrico aplicado.

Es imprescindible que el montaje de los casetes se realice en una bandeja con abundante TT, para que sus componentes queden sumergidos, evitando que se formen burbujas que puedan afectar a la transferencia.

Sobre la placa negra del casete (que luego quedará hacia el cátodo, polo negativo) se colocan, en este orden, una esponja, un papel de filtro, el gel (cuidando su orientación), la membrana (rodando sobre ella un tubo de ensayo para expulsar el aire y evitar burbujas entre gel y membrana), el otro papel de filtro, la otra esponja y, por último, la tapa clara del casete.

El casete se fija en el soporte que lleva los electrodos, vigilando la orientación de modo que el gel quede cerca del cátodo y la membrana, del ánodo. Después, se sumerge el porta-caset en la cubeta de transferencia que contiene TT frío, así como un recipiente con un bloque hielo y una barra de agitación. Se tapa la cubeta y se coloca todo sobre un

agitador magnético. La transferencia se realizó a 70V, 3h en cámara fría, para disipar el calor, y con agitación. Por efecto del campo eléctrico, las proteínas rodeadas de SDS migran al polo positivo, abandonan el gel y quedan retenidas en la membrana por fuerzas no covalentes. Conviene indicar que, si la transferencia se prolonga, las proteínas pueden llegar a atravesar la membrana.

Finalizada la transferencia, se desmonta el sistema y se recorta la membrana antes de separarla del gel (siguiendo el contorno de éste), marcando una esquina para asegurar la orientación de la membrana. Finalmente, la membrana se seca al aire durante 1-2min para favorecer la fijación de las proteínas.

Después de la transferencia, es conveniente teñir los geles por Coomassie para comprobar que no quedan proteínas en el gel o que a lo sumo sólo quedan en él las proteínas de elevado peso molecular, por su dificultad de transferencia en estas condiciones. Si se emplean marcadores preteñidos, su presencia en la membrana prueba que la transferencia ha sido buena.

Tinción de proteínas en los geles con azul de Coomassie

Generalmente, las bandas de proteína en el gel se revelan con azul de Coomassie; su intensidad de tinte es proporcional a la cantidad de proteína. Para teñir las proteínas, se sumerge el gel 1h en 100ml de la mezcla de tinte, compuesta por azul de Coomassie-R al 0,1% p/v en disolución fijadora (etanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v). De este modo, las proteínas se fijan y tiñen simultáneamente. Es conveniente usar un agitador orbital para distribuir el colorante de forma homogénea y agilizar el proceso.

Tras el tinte, se elimina el exceso de colorante pasando el gel a otra bandeja con el medio de desteñido (etanol 10% v/v, ácido acético 10% v/v). El medio se cambia varias veces hasta que se aprecian las bandas azules de proteína, sobre el fondo incoloro del gel.

Tinción de proteínas en las membranas con el reactivo rojo Ponceau

El tinte con rojo Ponceau es muy útil para comprobar la correcta transferencia y fijación de las proteínas a la membrana. Además, permite localizar los marcadores no coloreados así como las proteínas más abundantes. Como la tinción con rojo Ponceau es reversible, no interfiere con el revelado final de la actividad fosfatasa. Antes de la tinción

- II.11. Electroforesis No Desnaturalizante en Gel -

hemos de rehidratar la membrana con agua (por capilaridad). Después se sumerge la membrana 4min en la disolución de tinte (0,1% Ponceau-S en 1% ácido acético). El exceso de tinción se elimina con sucesivos lavados con agua hasta que se observan claramente las bandas de proteína en rojo. Se marca la posición de las bandas principales y la de los estándares (para calcular después la masa de la proteína problema). La membrana se puede fotografiar, fotocopiar o escanear para conseguir un registro permanente del patrón de proteínas en cada calle y de la posición de los marcadores. Finalmente, se elimina el colorante lavando la membrana con agua o con TTS (Tris 50mM, NaCl 0,9%, pH 7,5).

Detección de las proteínas de interés con anticuerpos

El proceso se desarrolla en tres etapas; las membranas se incuban sucesivamente con tres disoluciones (bloqueante, anticuerpo primario y secundario), intercalando fases de lavado, y al final, se revela la actividad fosfatasa alcalina. Los pasos son:

Bloqueo:

La membrana se incuba 2 horas como mínimo, a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, y con agitación suave, con una disolución de BSA al 3%, en tampón TTS-T (Tris 50mM, NaCl 0,9%, pH 7,5, Tween 20 al 0,1%). La membrana y la disolución se introducen en bolsas de plástico que se sellan por calor, evitando que queden burbujas atrapadas. De esta forma, se reducen el volumen de la disolución (10-12ml por membrana) de bloqueo y la cantidad de anticuerpo en etapas posteriores. Durante el bloqueo, el detergente Tween-20 y la albúmina ocupan los lugares de la membrana de nitrocelulosa que permanecen libres, evitando que más tarde, los anticuerpos se unan a la membrana de modo inespecífico. Tras el bloqueo, las membranas se someten a tres lavados de 5min con TBS-T. Los lavados se realizan en una bandeja con abundante tampón, a temperatura ambiente y con agitación.

Incubación con el anticuerpo primario:

Después de bloquear, la membrana se incuba con el anticuerpo primario, convenientemente diluido en TBS-T con 1% BSA. Los anticuerpos policlonales (N-19 y E-19), generados en cabra contra un péptido del extremo N-terminal de la AChE humana y

de ratón respectivamente, el antisuero de conejo (H134) contra el fragmento C-terminal (aminoácidos 481-614) de la AChE humana, el antisuero de cabra contra el extremo C-terminal de AChE de ratón (C-16), el antisuero de cabra contra la AChE de eritrocito humano (BT3) y el anticuerpo monoclonal tipo IgG1 de ratón contra el péptido 411-609 de la AChE de cerebro humano (C-46), se diluyeron 1/1000. La disolución con el anticuerpo se añade a la membrana y se incuba en cámara fría toda la noche, con agitación suave. En ese tiempo, los anticuerpos se unen a las zonas de la membrana ricas en proteínas que posean el epítipo. La membrana control se incuba en las mismas condiciones, pero sólo con TBS-T y 1% de BSA.

Incubación con el anticuerpo secundario:

Tras retirar la disolución con el anticuerpo primario, las membranas se lavan con TBS-T, con 3 lavados de 5min. A continuación, se incuban 2h, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-cabra/oveja (frente al N-19, E-19, BT3 y C-16) anti-conejo (contra el H134), y el anti-ratón (contra el C-46) diluidos a 1/5000, 1/10000 y 1/2000 en TBS-T con 1% de BSA respectivamente.

Revelado de la actividad fosfatasa alcalina:

Tras retirar el anticuerpo secundario, la membrana se lava con TBS-T y se incuba con Tris 10mM, MgCl₂ 59,3mM, pH 9,2, 30-60 segundos, para llevar el pH se lleva al adecuado para la expresión de actividad fosfatasa. Se elimina el tampón y se revela la actividad fosfatasa con el reactivo BCIP/NBT. El revelador contiene nitroblue tetrazolium 0,48mM (NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 0,56mM (BCIP) y MgCl₂ 59,3mM en Tris 10mM, pH 9,2. La membrana se incuba con el revelador hasta que se observan bandas violetas de la intensidad deseada (unos 5-30min) y se lava con agua para detener la reacción. Las membranas se escanean y se guardan secas en bolsas de plástico selladas.

Para calcular la masa de las subunidades de AChE y BuChE en las muestras normales y distróficas se empleó el programa SigmaGel versión 1.0.

20. ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE EN GEL

Una forma alternativa a los análisis de sedimentación de comprobar el grado de hidrofobicidad de una molécula, es practicar la electroforesis de la proteína nativa en presencia de detergentes con distintas propiedades. TX-100 es un detergente no cargado, el desoxicolato sódico (DOC) tiene carga negativa y CHAPS es un detergente zwitteriónico. Las moléculas hidrofóbicas se unen a los tres tipos de detergentes, por lo que su movilidad electroforética variará en función del tipo de detergente presente en el gel.

El desoxicolato es una molécula con carga negativa, que al unirse a una proteína aumenta su movilidad en el gel con respecto a la que tiene en presencia del TX-100 o CHAPS. A su vez, el número de agregación del detergente (número de moléculas por micela) también afecta a la movilidad de las proteínas. Así, DOC y CHAPS tienen un número de agregación similar (3-19 y 4-14 moléculas, respectivamente), pero como el TX-100 posee un número de agregación mayor, 100-155 moléculas, retrasará la migración de los agregados proteína-TX-100.

20.1. Electroforesis con TX-100/DOC/CHAPS

Para comprobar la movilidad de las formas de AChE de S₁ y S₂ de bazo, se prepararon geles que contenían como detergente TX-100, DOC o CHAPS. Se usó el sistema de peines y espaciadores gruesos, 1,5cm, para aumentar la cantidad de muestra en los pocillos (60µl). La composición de cada gel fue la siguiente para un volumen final de 10ml:

Agua purificada	5
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	2
Acrilamida 29,2%-bisacrilamida	2
TX, DOC o CHAPS 10%p/v	0
Persulfato amónico 10%p/v	0
TEMED	0
	,01 ml

De este modo, la acrilamida en el gel queda a una concentración final del 6% p/v y los detergentes al 0,25% p/v, mientras que el Tris queda a 375mM.

Preparamos dos geles con cada detergente, uno de los cuales será empleado como control de la actividad AChE (ver **Apdo. II.1.12.2**).

Una vez vertida la mezcla en el sistema de cristales, introducimos los peines para la formación de los pocillos. No preparamos gel concentrador (para favorecer la penetración de las muestras en el gel en el caso de que haya agregación de las mismas).

Preparación de las muestras

Mientras se produce la polimerización del gel (aproximadamente 1h), se prepara el tampón de carga (TC) de las muestras (al doble de la concentración, 2x), cuya composición para un volumen final de 1ml es:

Agua purificada	0
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	0
Glicerol	0
TX, DOC o CHAPS	0
Azul de bromofenol	0

Al añadir el tampón de carga a las muestras, los detergentes quedan a la concentración de 0,5%p/v. Como algunas muestras se han extraído con TX-100 1%p/v, su migración en los geles de DOC y CHAPS sería diferente respecto a las que no lo poseen (el TX-100 queda a concentración del 0,2%p/v). Por ello, se iguala la concentración de TX-100 en todas las muestras cargadas en el gel, para anular las diferencias en la migración de las proteínas. Para las electroforesis en geles de DOC y CHAPS, a las muestras que no llevan TX-100 se les añade un volumen adecuado de TX-100 para alcanzar una concentración final de 0,2%p/v en el tampón de carga. En los geles de TX-100 no es necesario ya que el tampón de carga lleva dicho detergente en exceso anulando las diferencias entre las muestras.

Como controles de las formas moleculares de AChE se cargan las siguientes muestras en el gel: AChE de eritrocito bovino (G_2^A), extracto S₂ de cerebro (G_4^A y G_1^A) y SFB (G_1^H).

Los tampones de recorrido también llevan el correspondiente detergente: Tris 25mM, glicina 192mM, TX-100, DOC o CHAPS 0,25%p/v, pH 8,3.

Iniciamos la electroforesis, a 70V para los geles de TX-100 y a 30V para los de DOC y CHAPS a temperatura ambiente pero con agitación para disipar el calor generado por la corriente eléctrica. Hemos comprobado que para los geles de DOC es necesario realizar la electroforesis a 20-25°C (para evitar la precipitación del detergente observada a 4°C). También tomamos la precaución de intercambiar cada hora los tampones de recorrido de los depósitos superior e inferior, así como de medir la intensidad, el pH y la temperatura del sistema para constatar que se mantienen dentro de los valores adecuados. La duración de las electroforesis fue de 6-8h (según el detergente empleado).

20.2. Teñido de AChE: Método de Karnovsky y Roots

Este es un método de tinción específico de colinesterasas extraordinariamente sensible, con un límite de detección por debajo de 1 µg de AChE nativa.

El medio de tinción está compuesto por: citrato sódico 0,1M, sulfato de Cobre ($CuSO_4$) 30mM, ferricianuro potásico ($K_3Fe(CN)_6$) 5mM al que se le añade el sustrato de AChE, ioduro de acetiltiocolina (ATCh) 3mM.

La técnica se basa en la reducción de $K_3Fe(CN)_6$ a $K_4Fe(CN)_6$ por la tiocolina liberada por la enzima y posterior precipitación del ferrocianuro cúprico insoluble. Después la tiocolina reduce el Cu^{2+} a Cu^+ y con los iones I^- forma un complejo insoluble, cobre (I)-tiocolina- I^- . Sólo los dos aniones, CN^- y CNS^- , que forman sales insolubles con el Cu(I) con I^- producen la reacción.

Una vez finalizada la electroforesis, se lavan los geles con tampón acetato 0,2M, CHAPS 0,25%, pH 6,5 durante 5min. Usamos CHAPS para disminuir el posible efecto inhibitor del DOC sobre la actividad enzimática.

Posteriormente incubamos los geles en el medio de tinción (sin ATCh) al que habíamos añadido CHAPS 0,25% p/v e iso-OMPA 50 μ M en el medio (para visualizar la actividad AChE) durante 30min. Los geles “control” destinados a detectar la actividad de esterasas inespecíficas fueron incubados con los inhibidores de BuChE y AChE (iso-OMPA y BW248c51, a concentraciones de 50 y 10 μ M respectivamente).

Posteriormente, se desarrolla la actividad añadiendo nuevamente disolución de teñido, CHAPS e inhibidores, suplementada con el sustrato (ATCh 3mM). El gel puede estar en esta disolución hasta 24h y la reacción se detiene cambiando el medio de teñido por agua.

Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente y con agitación suave, en la oscuridad.

Durante el revelado, se aprecian en primer lugar precipitados blanquecinos (de $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$) poco llamativos que marcan proteínas con actividad AChE, posteriormente el precipitado se toma de color pardo intenso (complejos de Cu(I)-tiocolina-I) según transcurre el tiempo y al contacto con el aire.

21. DESGLICOSILACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE AChE

Como la subunidad de AChE detectada en el extracto S₂ de bazo por el anticuerpo monoclonal C-46, tenía un tamaño inferior al esperado para la subunidad nativa de AChE, cabía la posibilidad de que se tratara de una subunidad libre de carbohidratos. Para saber si la proteína reconocida por C-46 tenía o no restos de oligoglicanos se procedió a su desglucosilación. Se utilizó un kit de Glyko que lleva una N-glicanasa (PNGasa) de *Flavobacterium meningosepticum* recombinante en *E.coli*. Esta endoglicosidasa es una proteína de 35kDa con pH óptimo 8,6, aunque mantiene el 80% de su actividad a pH 7,5-9,5. Posee un sitio de corte altamente específico, hidroliza el enlace entre asparragina (Asn) y N-Acetil-glucosamina de la mayoría de los oligomanosas y de los N-glicanos. Esta ruptura no se ve afectada por la presencia de grupos fosfato, sulfato o ácido siálico. Tras el corte, la Asn pasa a ácido aspártico (Asp).

Como control de la actividad de la enzima (PNGasa) usamos la proteína transferrina. A su vez, para determinar si el anticuerpo sólo es capaz de reconocer a las moléculas desglicosiladas de AChE, pusimos otro control, el extracto S₁ (rico en actividad AChE no reconocida por el anticuerpo C-46), de modo que la aparición de inmunomarcaje en dicho extracto tratado con la PNGasa, corroboraría que el anticuerpo se liga únicamente a las subunidades desglicosiladas.

Antes del tratamiento, hay que tener en cuenta los controles con transferrina, y con los extractos de S₁ y S₂ de bazo, de modo que finalmente tenemos 6 viales. Debido al limitado rango de concentración de glicoproteína (50-500µg) que se puede tratar en cada ensayo, es necesario diluir S₁ a la mitad con HEPES 20mM. Empleamos 35µl de cada muestra (que en el caso de la transferrina corresponden a 5µg).

Añadimos 1,6µl de SDS/β-ME a cada vial para que concentración final de SDS sea 0,1% y la de β-MetOH 50mM. Desnaturalizamos las proteínas calentando a 100°C durante 5min. La desnaturalización previa mejora la acción de la PNGasa y su capacidad para eliminar los N-glicanos.

Añadimos a todos los viales 1,6µl de Nonidet P-40 (NP-40), que queda a una concentración final de 0,75%. Este detergente no iónico va a contrarrestar el posible efecto inhibitor de los detergentes iónicos presentes en la muestra sobre la PNGasa.

Finalmente añadimos 2µl de HEPES 20mM a los viales “control” y 2µl de N-glicanasa (PNGasa) a los viales “prueba”. Incubamos durante 4h a 25°C y luego a 37°C durante 16-20h.

La reacción se detiene con la adición de 5µl del tampón desnaturalizante de electroforesis. Las muestras se hierven y someten a electroforesis y Western blot con el anticuerpo monoclonal C-46.

22. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN EDROFONIO-AGAROSA.

El edrofonio es un inhibidor reversible que se une al subsitio aniónico del centro activo. Basándonos en esta propiedad, la síntesis de un gel de afinidad con este inhibidor puede ser de gran ayuda en los procesos de purificación y concentración de las moléculas de ChE para estudios posteriores.

22.1. Síntesis del gel de afinidad

Como soporte usamos Sepharose epoxi-activada (SIGMA), con capacidad de unir diferentes ligandos. Como la suministran desecada, hay que hidratarla antes de su uso. Pesamos 1g de agarosa y la hidratamos con agua bidestilada unas 48h. Tras la hidratación, se obtienen unos 3,5ml de gel (lo que concuerda con las instrucciones del fabricante).

Lavamos el gel con el fin de eliminar la lactosa empleada como estabilizante. El gel se reparte en ocho tubos de vidrio de 10ml, completando el volumen con agua bidestilada. Agitamos por inversión y centrifugamos los tubos a 4000rpm, 5min. Repetimos el proceso 5 veces y finalmente recogemos el gel en un solo tubo.

Para unir el ligando al gel, mezclamos: una parte de gel y dos partes de la disolución Ed 0,2M. Ajustamos el pH del medio a 10 con NaOH e incubamos a 55°C (en estufa) 24h con agitación. Seguidamente se pone el gel en una columna cromatográfica de 10cm x 1cm y se elimina el Ed no unido lavando el gel, a temperatura ambiente, con acetato sódico 0,1M pH 6,5 (50ml), luego con borato sódico 12mM pH 10 (50ml) y finalmente con agua bidestilada (200ml). Una vez lavada, la matriz se pone en un tubo de vidrio y se resuspende en su volumen de tampón HEPES salino (NaCl 1M, HEPES 15mM, pH 7,5) para dar una relación: 2 volúmenes de suspensión/volumen de gel. Se añade azida sódica al 0,02% y se conserva a 4°C.

Después de unir la AChE a la matriz, se puede liberar la proteína ligada específicamente añadiendo Ed 12mM y NaCl 0,5M en tampón fosfato sódico 50mM, pH 8,0. Si se desea regenerar la matriz de afinidad, hay que lavarla con NaOH 1M (50

veces el volumen del gel) y proceder con la secuencia de acetato sódico, borato sódico y agua antes mencionada.

22.2. Unión de la AChE de bazo a edrofonio-agarosa

A diferencia de las moléculas anfifílicas de AChE, las formas de secreción (hidrofílicas) se unen totalmente a la resina de edrofonio-agarosa {Flores-Flores, Martínez-Martínez, et al. 1996 P072 /id}. La presencia de moléculas de secreción en bazo fue analizada por ensayos de unión a edrofonio-agarosa, con la finalidad de determinar más a fondo el carácter anfifílico o hidrofílico de las moléculas de AChE, sobre todo tras los resultados obtenidos mediante cromatografía hidrofóbica en fenil-Sepharose.

Se prepararon alícuotas de gel a las que se les añadió un volumen de los extractos S₁ y S₂ diluidos a la mitad en HEPES 15mM para disminuir la fuerza iónica y la cantidad de detergente (en S₂). La relación establecida fue: 2,5 volúmenes de muestra (sin diluir)/volumen de gel. Como control de la unión inespecífica de la enzima se usó Sepharose libre del ligando.

A su vez, como control positivo de la fijación de AChE en el gel, se usó una muestra de suero fetal bovino (SFB) a una relación 50 volúmenes de muestra (sin diluir)/volumen de gel, o lo que es lo mismo, 1400U SFB/ml gel. Tras incubar a 4°C durante 16-20h, la actividad AChE no unida al gel se separó por centrifugación a 3000rpm, 5min; las moléculas no ligadas al gel se identificaron por análisis de sedimentación en gradientes con TX-100.

23. UNIÓN DE AChE A FASCICULINA-2

La fasciculina-2 (fas-2) es una toxina polipeptídica extraída del veneno de serpientes {Bourne, Taylor, et al. 1995 O154 /id}, constituida por 61 aminoácidos. Pertenece a la familia de toxinas con tres dedos de serpiente, que incluye a las α -neurotoxinas, proteínas que bloquean de forma selectiva los receptores nicotínicos de ACh {Changeux, Kasai, et al. 1970 4521 /id} y a los agonistas de un subtipo específico de receptor muscarínico. Las fasciculinas son los únicos péptidos que inhiben específicamente a la AChE. El péptido de 61 aminoácidos que constituye la fasciculina, adopta una conformación en tres hélices

debido al establecimiento de 4 enlaces disulfuro. De ellos, el bucle II está constituido por un conjunto de residuos hidrofóbicos que interaccionan con el sitio aniónico periférico de la enzima, ocluyendo estéricamente el acceso del sustrato al sitio catalítico. El bucle I encaja en una hendidura próxima a la entrada del desfiladero catalítico que permite el aumento de la superficie de contacto del bucle II con la abertura del desfiladero. De esta forma, el péptido establece múltiples interacciones polares e hidrofóbicas bloqueando estéricamente el acceso de los ligandos. Se ha observado que la unión de la fasciculina induce el estrechamiento del hueco catalítico y altera el reordenamiento de la triada catalítica, de manera que la fasciculina inhibe a la AChE de manera alostérica y dinámica [Tai, Shen, et al. 2002 3835 /id].

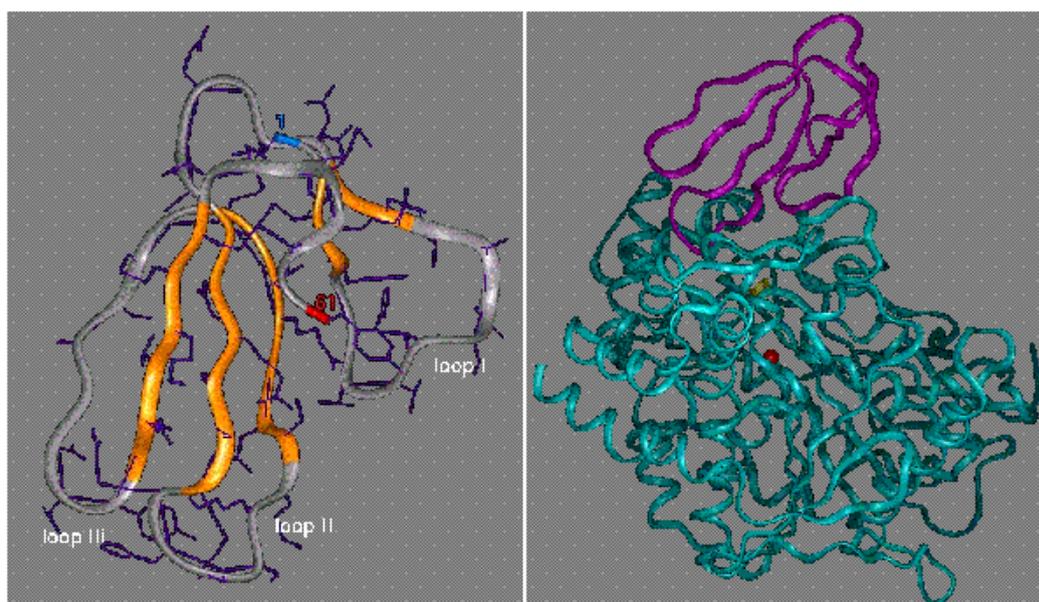


Figura 11.5. Interacción de AChE con fasciculina. En la izquierda se presenta la conformación en tres lazos o bucles del péptido de fasciculina debido a la formación de 4 enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Los extremos amino y carboxilo terminal del péptido se marcan en azul y rojo, respectivamente. En la derecha se muestra la unión del bucle II (central) de la fasciculina con el PAS de la AChE de ratón, sustentada por la interacción de los otros dos bucles con la molécula de AChE. Esta asociación da lugar a una serie de reordenamientos conformacionales que afectan al centro activo de la AChE y al bucle Ω de cisteínas Cys69-Cys96, en particular a la cadena lateral del Trp86 [Tai, Shen, et al. 2002 3835 /id]. Como consecuencia se produce la inhibición enzimática.

El bucle Ω (Cys69-Cys96, ver Fig. I.13) de AChE posee cierta flexibilidad, que se manifiesta en cambios conformacionales originados por la unión de ligandos al centro activo o al PAS de la molécula de AChE. El marcaje del bucle con un fluoróforo como el acrilodan, ofrece diferentes espectros en función de la conformación adoptada. La flexibilidad del bucle es capaz de discriminar entre pequeños cambios en el centro activo, como son la fosforilación o la carbamilación de la Ser activa, que se traducen en diferentes espectros de fluorescencia. La unión de fasciculina-2 al PAS de la AChE, aunque no afecta a la unión del ligando, produce un cambio conformacional dominante en el bucle Ω de la AChE, de modo que la toxina podría ser muy útil para identificar las moléculas de AChE que han estado expuestas a organofosforados o a diversos inhibidores, en función de los cambios de fluorescencia en la enzima modificada {Shi, Radic', et al. 2002 4522 *fid*}.

Ya que las moléculas de BuChE carecen del PAS, la matriz con fas-2 puede ser empleada en procesos de separación y purificación de AChE, como paso previo a su caracterización.

En nuestro caso, dado que la proporción de moléculas de BuChE en los extractos de bazo es insignificante, la unión de AChE de bazo a fasciculina-2 es útil para identificar y separar las diferentes formas enzimáticas.

23.1. Síntesis del gel de afinidad de fasciculina-2

Como matriz usamos Sepharose activada con bromuro de cianógeno (CNBr-activated Seph 4B, Pharmacia). Pesamos 0,1g de resina en un vaso y la hidratamos con 3-4ml de HCl 1mM unos 30min (según el fabricante, 1g de resina hidratada proporciona 4-5ml de gel). Transcurrido ese tiempo, dividimos el volumen de gel en dos tubos eppendorf de 2ml para facilitar su lavado. La resina se lava 8 veces añadiendo HCl 1mM hasta un volumen de 1,5ml; los sobrenadantes se eliminan por centrifugación a 3000rpm, 5min. En los ocho lavados siguientes se utiliza el tampón de acoplamiento (NaCl 1M, fosfato sódico 0,1M, pH 7,0) para acondicionar el gel al paso de unión del ligando. La elección del pH del tampón de acoplamiento viene dada por la velocidad de unión del ligando al gel; a pH 7,0 se consigue ralentizar la unión de la fasciculina-2 y garantizar una buena interacción. En definitiva, tras los ocho lavados con el tampón de acoplamiento y

reunimos el gel en un solo tubo. Entre lavados, dejamos incubar la matriz en el agitador orbital a temperatura ambiente unos minutos.

A continuación, se disuelven 100 μ g de fasciculina en 0,5ml de tampón de acoplamiento, quedando a concentración 29,7 μ M, o lo que es lo mismo a 0,2 μ g/ μ l. Con mucho cuidado se retira el sobrenadante del último lavado del gel y añadimos la fasciculina-2. Agitamos invirtiendo el eppendorf varias veces (no se usa el agitador) e iniciamos la incubación de la resina y el ligando en agitación orbital a 4°C (a esta temperatura la unión de fas-2 a la matriz es más lenta y, por consiguiente, más específica). La unión de fas-2 al gel se controla midiendo la absorbancia a 280nm, así como valorando la concentración proteica, por el método de Bradford, en las fracciones acuosas de la mezcla fas-2-gel tomadas a distintos tiempos. La fase de acoplamiento termina cuando se comprueba que el 80-90% de la fasciculina-2 ha quedado retenida en el gel.

Después de centrifugar el gel a 3000rpm, 5min, se retira el sobrenadante (se reserva). La fasciculina no ligada fuertemente se elimina lavando 7 veces con tampón de acoplamiento (llevando el volumen del gel a 1,5ml).

Para bloquear los sitios libres de la matriz se añade etanolamina 1M pH 8,0. En esta ocasión, interesa que el bloqueo sea rápido, por lo que agitamos suavemente el gel a temperatura ambiente, 24h, cambiando la etanolamina cada cierto tiempo.

Tras el bloqueo se inicia una serie de lavados con cambios bruscos de pH con el fin de eliminar todo aquello que se haya unido inespecíficamente. Los tampones de lavado contienen elevada concentración de sal:

- ◆ Tris 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8,0
- ◆ Acetato 0,1M, NaCl 0,5M, pH 4,0

Lavamos alternativamente cinco veces con cada tampón, llevando el volumen a 1,5ml. El proceso se repite tres veces, lo que supone usar unos 25ml (50 veces el volumen del gel) de cada tampón.

Finalmente equilibramos el gel en el propio tampón de acoplamiento (10 lavados de 1,5ml) y medimos el volumen de la resina (aproximadamente 260 μ l).

Resuspendemos el gel en tampón NaCl 0,5M, HEPES 15mM, TX-100 0,5%, fosfato sódico 50mM, pH 7,5, con azida sódica al 0,02% según la relación: 2 volúmenes suspensión/volumen gel. Conservamos a 4°C.

23.2. Unión de la AChE de bazo a fasciculina-Sepharose

Antes de usarla, la resina de fasciculina-Sepharose se diluye 1:4 con Sepharose libre de fasciculina. A continuación se toman 50 μ l de la resina diluida (“prueba”) y 50 μ l de Sepharose (“control”) y se lavan 3 veces con el mismo tampón de las muestras que se van a incubar (NaCl 0,5M, HEPES 7,5mM, fosfato sódico 50mM, TX-100 0,5%, pH 7,5). Seguidamente, se añade la muestra (0,5ml), diluida a la mitad con tampón fosfato sódico 0,1M, pH 7,5, para rebajar la fuerza iónica y la cantidad de detergente. Usamos el S₁ y el S₂ de bazo normal y como control de la capacidad de unión de la fasciculina-2 empleamos una muestra con elevada actividad AChE, un extracto S₂ de cerebro de ratón.

Incubamos la muestra con la matriz 16-20h con agitación orbital a 4°C y posteriormente centrifugamos la mezcla a 3000rpm 5 min para separar la fracción no unida al gel. El grado de unión a fasciculina-2 se determina comparando los perfiles de las muestras incubadas sólo con la Sepharose y con la fas2-Sepharose en un análisis de sedimentación con TX-100.

24. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En general, los resultados recogidos en la Memoria se expresan como media \pm la desviación estándar. La posible diferencia estadística, en cuanto a actividad colinesterásica y al contenido de proteína, entre las muestras de tejidos normales y tumorales se evaluó con la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney. Se estableció un intervalo de confianza del 95%; $p < 0,05$ y se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows (versión 9,0).

25. ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DE AChE EN TEJIDOS DE RATÓN NORMAL Y DISTRÓFICO.

La identificación y cuantificación de los diferentes transcritos de AChE en órganos de ratón normales y distróficos nos permite subir un escalón en el estudio de las bases moleculares que subyacen en esta patología, al menos en relación con las ChEs.

25.1. Extracción del ARN

Partimos de material fresco, extraído de animales recién sacrificados y perfundidos. Lavamos los órganos en tampón salino con EDTA (NaCl 154mM, EDTA 5,4mM, pH 7,4) para eliminar mejor la sangre, minimizando así la posible contaminación de las muestras con el material genético de las células sanguíneas.

Se extrajo el ARN de bazo, timo, músculo, médula ósea y médula espinal de ratones controles y distróficos.

Antes de comenzar cualquier operación, hemos de asegurarnos de que todo el material es estéril y libre de RNasas (RNase free, Rf). El autoclavado sólo esteriliza (St) y el previo calentamiento a 180°C 4-5h en horno Pasteur también elimina RNasas (StRf) y ácidos nucleicos contaminantes. Las disoluciones tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC) y autoclavadas son StRf.

A partir de este momento denominaremos a los materiales estériles (autoclavados) como St y los que además sean libres de RNasas (sometidos a calentamiento en el horno Pasteur), StRf.

Las muestras se mantienen en hielo en todo momento. Inmediatamente después de obtener los órganos, se pesan y homogeneizan en TRIZOL según la relación: 50-100mg de tejido por ml de TRIZOL (previamente hemos atemperado el reactivo, que normalmente se conserva a 4°C). El TRIZOL es una disolución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. El rendimiento de extracción de ARN es mejor con TRIZOL que con el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi {Chomczynski & Sacchi 1987 3836 /id}. El TRIZOL asegura la integridad del ARN durante el proceso de homogeneización de la muestra inhibiendo las RNasas del medio.

Para facilitar la homogeneización, las muestras se trocean con ayuda de un bisturí (StRf). Los órganos se homogenizan con un polytron (Ultra Turrax T8, IKA Labortechnik), dando 4 pulsos de 15seg a alta velocidad, con intermedios de 1min. Inmediatamente el homogenado se pasa a un eppendorf de 2ml (StRf) y se conserva a -80°C. En este punto, la muestra puede ser conservada durante un mes. Además, la congelación mejora considerablemente el rendimiento y la pureza del ARN.

Para continuar la extracción del ARN, la muestra se descongela lentamente en hielo y se incuba a 20-25°C 5min. En estas condiciones los complejos nucleoproteicos se disocian completamente. Se centrifuga a 12000g_{av}, 10min a 4°C, para conseguir clarificar las muestras, debido a su alto contenido en proteínas, ácidos grasos y polisacáridos.

El ARN se aísla añadiendo cloroformo al sobrenadante clarificado (0,2ml/ml TRIZOL) seguido de una separación de fases. Tras añadir el cloroformo la muestra se agita vigorosamente 15seg y se incuba 2-3min a 20-25°C. Al centrifugar a 12000g_{av}, 15min, 4°C, la mezcla se separa en una fase inferior orgánica rica en fenol-cloroformo (roja), una interfase blanquecina y otra fase superior, acuosa e incolora que lleva el ARN. La capa acuosa se recoge cuidadosamente con una micropipeta, para evitar arrastrar cualquier contaminación, y se deposita en otro eppendorf (StRf). Después, se precipita el ARN con alcohol isopropílico (0,5ml/ml TRIZOL). Agitamos varias veces por inversión y dejamos incubar a T^a ambiente 10min. Tras centrifugar a 12000g_{av}, 10min, 4°C, el ARN precipita en forma de gel, aunque a veces no se aprecia el gel.

El precipitado se lava con etanol al 75% en la proporción: 1ml/ml TRIZOL y se agita por inversión. Centrifugamos a 7400g_{av}, 5min, 4°C, eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el pellet durante 5-10min en una campana de extracción de gases. Es conveniente no secar las muestras completamente ya que entonces disminuye la solubilidad del ARN. Redisolvemos el ARN en un volumen de H₂O (tratada con DEPC, StRf), que depende de la concentración requerida (superior a 1µg/µl). Este volumen se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Vol H}_2\text{O } (\mu\text{l}) = \frac{\text{mg tejido} \times \text{rdto teórico } (\mu\text{g ARN/mg tejido})}{\text{concentración } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

El rendimiento teórico (dato aportado por la bibliografía) es la cantidad esperada de ARN por mg de tejido. Tras agitar suavemente, incubamos los extractos a 55°C, 10min y medimos la concentración de ARN y su pureza.

25.1.1. Medida de la cantidad y pureza de ARN.

Tomamos 2µl de la muestra y se llevan a un volumen final de 1ml con H₂O (StRf) en una cubeta de cuarzo. Agitamos y medimos la absorbancia a 260 y 280nm.

Para el cálculo de la concentración de ARN usamos la fórmula:

$$\text{Conc } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 40 (\mu\text{g}/\text{ml}) \times 0.001 (\text{ml}/\mu\text{l}) \times \frac{V_T (\mu\text{l})}{V_M (\mu\text{l})}$$

Una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 40µg/ml de ácido nucleico (ADN o ARN) de una sola hebra. V_T es el volumen total de medida (1ml) y V_M es el volumen de muestra (2µl).

La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico según el método de Warburg y Christian (1942). Los ácidos nucleicos absorben fuertemente a 260nm y las proteínas a 280nm. Las preparaciones puras de ADN y ARN muestran valores de 1,8 y 2,0 respectivamente. Cuanto mayor sea la contaminación con proteínas o fenol, menor será la relación A₂₆₀/A₂₈₀.

Una vez calculada la concentración de las muestras calculamos el rendimiento real del proceso y preparamos alícuotas de ARN (1µg/µl) que congelamos a -80°C.

25.2. Transcripción inversa o retrotranscripción

La técnica más sensible para detectar y cuantificar el ARN es la transcripción inversa seguida por la reacción en cadena de la polimerasa o RT-PCR. Consiste en la síntesis de una hebra de ADN copia del ARN o ADNc, mediante transcripción inversa, y la posterior amplificación del ADNc por la polimerasa en una reacción de PCR.

Para este proceso diseñamos un programa en el termociclador que nos permite controlar las condiciones de temperatura requeridas en cada paso de la reacción.

En cada tubo eppendorf (StRf) colocamos 5µg de ARN total (son 5µl si partimos de una concentración de ARN de 1µg/µl) y 4,85µl de H₂O (StRf). Con el agua, intentamos evitar que el ARN se pegue al tubo de reacción. Ponemos los tubos en el termociclador e iniciamos el programa calentando a 70°C, 10min, para desnaturalizar el ARN y eliminar las posibles estructuras secundarias que puedan impedir la unión de los primers o cebadores. Las muestras desnaturalizadas se ponen rápidamente en hielo.

Inmediatamente antes de su uso, se prepara la mezcla con el resto de componentes de la reacción:

Orden	Reactivo	Volumen	Concentración final
Tampón de reacción First Strand Buffer 5x			
1	(Tris-HCl 250mM pH 8.3, KCl 375mM y MgCl ₂ 15mM)	4	1x
2	DTT 0,1M	2	10µM
3	Random decamers	2	50µM
4	Mezcla dNTPs 10mM	1	200µM
5	Inhibidor de la ribonucleasa (130U/µl)	0,15	20U

Los decámeros aleatorios, "Random decamers", son secuencias de nucleótidos al azar que se unen al ARN y actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADNc. Al contrario que los primers específicos, permiten la amplificación de todo el ARN de la muestra, lo que es importante para amplificar los estándares internos en estudios de cuantificación.

Ponemos los 9,15µl de la mezcla en cada tubo, de modo que el volumen final es de 19µl. Agitamos suavemente el tubo eppendorf para mezclar los reactivos y el RNA y calentamos a 42°C, 2min, para preparar las condiciones óptimas de la acción enzimática y para permitir que los primers se unan al ARN.

Luego, añadimos 1µl (200U) de retrotranscriptasa M-MLV RT (retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney; Invitrogen) a cada tubo de reacción, alcanzando así un volumen de 20µl. Agitamos suavemente con la mano y centrifugamos ligeramente para reunir el contenido de los tubos.

Colocamos los tubos en el termociclador y continuamos con el programa de RT-PCR. La reacción se desarrolla a 42°C durante 50min; posteriormente se calienta a 72°C, 15min, para inactivar la enzima. Finalizado el proceso, los tubos de reacción se centrifugan brevemente y se conservan a -20°C.

Todos los componentes de la reacción se conservan a -20°C; cuando se necesitan, se descongelan lentamente en hielo, excepto la retrotranscriptasa, que se mantiene a -20°C hasta el momento de su uso.

A su vez, en el medio de reacción todos los componentes se encuentran en exceso, de modo que el ARNm sea el único elemento limitante en la reacción.

25.3. Amplificación de los transcritos de AChE por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) permite amplificar más de un millón de veces una determinada secuencia de ADN.

En una reacción de PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos (primers) de unas 20 bases que son complementarios a las zonas delimitantes de la región que se quiere amplificar.

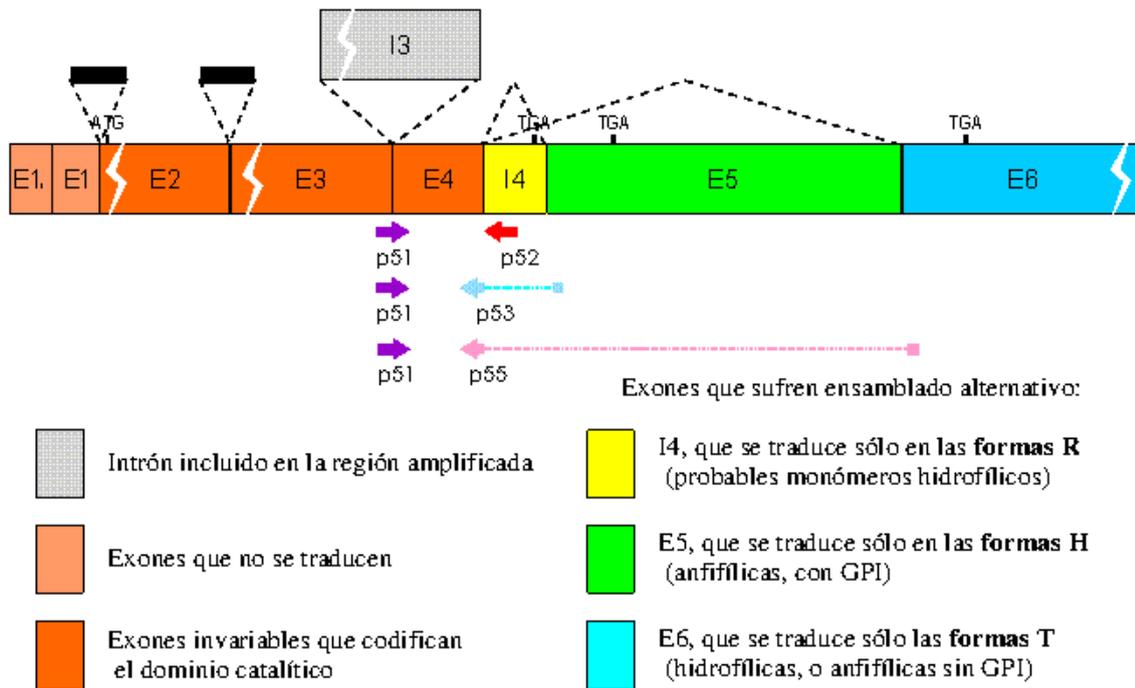
Debido a que los transcritos de AChE se originan por corte y empalme (splicing) alternativo de un preARNm y que comparten gran parte de su secuencia, es preciso emplear una batería de primers específicos que nos permitan amplificar de forma

individualizada cada uno de los transcritos de AChE (R, H o T). Los cebadores se diseñaron de modo que contuvieran las secuencias terminales e iniciales de los exones flanqueantes de un intrón. Con ello, dado el diferente procesamiento de cada transcrito, nos aseguramos una amplificación selectiva y evitamos la amplificación del ADN genómico o del ADNc del ARN inmaduro, que son un inconveniente para los ensayos de cuantificación.

En el esquema de la **Figura II.5 (A)**, se describe la estrategia seguida para la amplificación específica de cada transcrito de AChE, mientras que en (B) se dan las secuencias de los primers empleados y la posición de hibridación en la secuencia del gen ACHE de ratón.

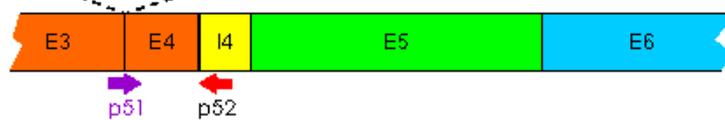
Figura II.5. Posición de los primers específicos para los de AChE de ratón. En **A** se ofrece un esquema del gen ACHE con todos los exones que lo constituyen (los que no se traducen, los constitutivos y los variables según cada transcrito), se incluyen el intrón 13, que es eliminado durante el procesamiento postranscripcional y el intrón 14, que sólo se conserva en el ARNm para la subunidad R. Los primers usados para amplificar específicamente cada transcrito se representan como flechas cuya punta indica la orientación de hibridación y posterior elongación por la Taq polimerasa (5' o 3'). En **B** se muestra un fragmento de la secuencia del cósmido AF312033 que contiene parte del gen de AChE de ratón (se mantiene el código de colores empleado en el esquema A para identificar los exones constitutivos, los variables en cada transcrito y los intrones). El exón E3 ocupa las posiciones 10723-11207, lo que supone un tamaño de 485bp; en negro se representan las bases correspondientes a los extremos inicial y final del intrón 3 (omitimos parte de su secuencia que realmente ocupa las posiciones 11208-12433, 1226bp); el exón E4, con 120bp se extiende entre las posiciones 12434 y 12603. Le sigue el intrón 14, característico de las subunidades R (12604-12719, 116bp) y el exón E5, común en los transcritos de R y H, aunque sólo se expresa en las subunidades H (12720-13383, 664bp). Finalmente, el exón E6, traducido únicamente en las subunidades T, posee un tamaño de 348bp aunque en el fragmento del gen mostrado no aparece completo. Sobre la secuencia del gen, indicamos la posición de hibridación de los primers exclusivos para cada transcrito empleados en los análisis de PCR, resaltando las bases en mayúscula y negrita. Así mismo, debajo se detalla la composición de los primers, así como la secuencia del gen con la que hibridan. Las zonas de intersección entre exones vienen subrayadas en la secuencia de los primers (a excepción del primer 52 cuya secuencia hibrida totalmente con el intrón 14).

Organización y procesamiento alternativo del gen de AChE en mamíferos

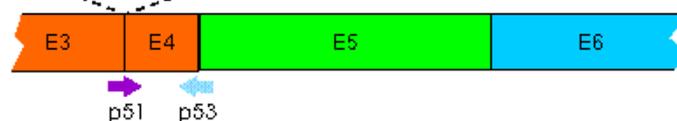


Amplificación de los transcritos de AChE

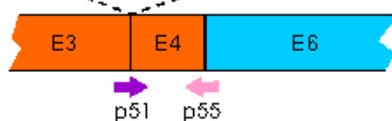
Transcrito R, que se traduce en formas R (posibles monómeros hidrofílicos) de AChE:



Transcrito H, que produce formas H (anfifílicas, con GPI):



Transcrito T, que origina formas T (hidrofílicas, o anfifílicas sin GPI):



A

Posición de los primers 51-55 sobre la secuencia del gen de AChE de ratón

```

10723                                     gtgctggt ggggtggtg
10741 aaggacgagg gctcctactt totggtttac ggggtcccag gcttcagcaa agacaatgaa
10801 tctctcaatca gccgggocca gtctctggct ggggtgcgga tcgggtgtacc ccaagcaagt
10861 gacctggcgg ccgaggctgt gtctctgcat tacacagact ggttgacccc tgaggacctt
10921 actcaccatga gagatgcat gagtgcatg gtaggcgacc acaacgttgt gtgcccgtg
10981 gccacgctgg ctggcgact ggtgcccga ggggcccggg tctatgcta catctttgaa
11041 caccgtgctt ccacactgac ttggcccctc tggatggggg tgccccatgg ctatgaaatc
11101 gagttcaatc ttgggtccc cctggatccc tggctgaact acaccagga ggagaggatc
11161 ttgtctcagc gacttatgaa ataactggacc aATTTTGGCG GCACAGGgtc agtggatattg

12421 tttccttctt cagGGACccc aatgacctc gagactocaa atctccacag tggccacctt
12481 acaccactgc ccgcagcaa tatgtgagcc tgaacctgaa gcccttagag gtgcccgggg
12541 gactgcgcgc ccagacctgc gctttctgga atcgctttct ccccaattg ctaagcgccA
12541 A
12601 CCG GTAGGCG CATGGAGTGG GGggagcagg gaatgcacaa ggcggcaagg gttggaagga
12601 CCG
12661 ggggagagag atgggggtgca aaacacaggg tgtaatccct ctctttctca cctcccagG
12721 CACGGAGGCT CCTTgcacct gcccaagccc cgcocatggg gaggcggccc cgaggcccgg
12781 gccgcaatba gccctgtccc tctctctctt ccttttctc ctccactccg gcttccgtg
12841 gctctaaactg caatcctttc cctttctggt ctcaaagcac acttaactota gtgtgtagct
12901 gagaaggggc cctctcagg gatacagaac cccactccat tctcaagccg agacaaaatg
12961 gacagactca gggatctttg ttaaacaata atcaaaaaa caggatttat tttttttta
13021 atgtaaaaaa ttatcctttg gagcttgagc ctgggtgttg ggggagaagg atccggggct
13081 agttggcgtc agccaaaggg ccttataatc gccaaactat tctgtatctt ctctcttttc
13141 cccaactaac catgaacct tctcccactc tgatcctgtc cctcccctcc gcttccggg
13201 gatttttata tctctctctc ctctctgttc cacctctccc ttcattctcc ggatcatoca
13261 ctgttctctt tccaccacc ccctcggcct ccgacaatgc gtgtgtgcgg ggcactcac
13321 gaccggtctc cactaccoga cctgttccgt tctcccact cttggggggg gccctggccg
13381 cagATACTCT GGACGAGGCG gagcgcagc ggaaggccga gtccaccgc tggagctct
13441 acatggtgca ctggaagaac cagttcgacc actatagcaa gcaggagcgc tgctcagacc
13501 tgtga
    
```

p51 Primer 51: primer Forward en intersección E3/E4 exclusivo de RNA maduro.

Primer: 5' - **ATTTT GCCCG CACAG GGGAC** -3'
 (Coincide con secuencia en gen)

p52 Primer 52: primer Reverse en intrón J4, exclusivo de transcrito R.

Primer: 5' **CCCCA CTCCA TGGCG CTAC** 3'
 Sec en gen: 5' gtag gcgca tggag tgggg 3'

p53 Primer 53: primer Reverse en intersección E4/E5 (zona subrayada en la secuencia), exclusivo de transcrito H.

Primer: 5' **AAGGA GCCTC CGTGG CGGT** 3'
 Sec en gen: 5' accg ccacg gaggc tcttt 3'

p55 Primer 55: primer Reverse en intersección E4/E6, exclusivo de transcrito T.

Primer: 5' **CGCCT CGTCC AGAGT ATCGG T** 3'
 Sec en gen: 5' a ccgat actct ggacg agggc 3'

B

Para amplificar los transcritos de AChE se emplean combinaciones del primer 5' (primer 51) y uno de los primers 52-55 que hibridan en secuencias específicas de cada transcrito, según viene indicado en la **Figura II.5**. El primer 51 se sitúa en la zona de empalme E3-E4, con lo que sólo amplificará los ARNm y no el ADN genómico ni el derivado de los transcritos primarios, que aún conservan el intrón I3. La amplificación selectiva de los transcritos R (E3-E4-I4-E5-E6) se asegura situando el primer 3' (p52) en el intrón I4. Si situamos el primer 3' (p53) entre los exones 4 y 5 únicamente se amplificaría el transcrito H (E3-E4-E5-E6). Para la amplificación del transcrito T (E3-E4-E6) empleamos el primer 3' que hibrida con el extremo 3' del exón 4 y el extremo 5' del exón 6 (p55).

La reacción se llevó a cabo mediante una serie de ciclos, cada uno de los cuales incluye tres pasos:

- Desnaturalización del ADN, mediante calentamiento a 94°C, que rompe los puentes de hidrógeno entre las bases y separa las dos hebras de ADN.
- Annealing o hibridación de los primers a las secuencias de los extremos del fragmento a amplificar.
- Extensión de los cebadores mediante la adición de nucleótidos en su extremo 3' por la Taq polimerasa.

Realizamos una serie de ensayos para determinar las condiciones de temperatura y tiempo óptimos en cada paso para identificar los transcritos en los distintos tejidos, así como la cantidad de ADNc de partida y en número de ciclos a realizar. Finalmente las condiciones óptimas para estudiar los transcritos fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C, 2min; annealing a 63°C, 20s; extensión a 65°C, 40s. El número de ciclos varió entre 30 y 40.

Es imprescindible minimizar los posibles errores de pipeteo, para lo cual se preparan mezclas madre o cocktails que se reparten entre los diferentes tubos, así como las amplificaciones inespecíficas, por lo que todos los reactivos se mantienen en hielo y no

entran en contacto hasta el último momento, antes de pasarlos al termociclador ya precalentado a la temperatura óptima.

Para la amplificación de los transcritos R y T partimos de 1µl de ADNc, mientras que para el transcrito H fue necesario duplicar el volumen. En cualquier caso, el volumen en el tubo de reacción se llevó a 20µl con H₂O (StRf).

Adicionamos 1,5µl de los primers 5' y 3' idóneos para cada transcrito en la pared del tubo de reacción, evitando que entren en contacto con el ADNc hasta el momento de iniciar la PCR. La concentración de los primers es 10µM, por lo que en el medio de reacción quedan a una concentración final de 0,3µM. Previamente se ha preparado un cocktail con el resto de componentes. La siguiente tabla indica el orden de adición de cada uno de ellos, así como la concentración a la que quedan en los 50µl del medio de reacción:

Orden	Reactivo	Volumen	Concentración final
1	H ₂ O (StRf)	18	-
	Tampón de reacción 10x		
2	(Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 500mM, MgCl ₂ 25mM)	5	1x (2,5mM Mg ²⁺)
3	DMSO	2,5	5% v/v
4	Mezcla dNTPs 10mM	1	200µM
5	Hotmaster Taq ADN polimerasa (5U/µl)	0,5	0,05U/µl

El DMSO (dimetilsulfóxido) es un adyuvante que mejora el rendimiento y la especificidad de la PCR.

Utilizamos una Taq polimerasa “Hot Start” (de Eppendorf), que se activa sólo a elevadas temperaturas; de esta forma evitamos la elongación no específica de los primers,

que da lugar a los denominados dímeros de primers o primers-dimers. La enzima se mantiene a -20°C hasta el momento de añadirla al cóctel.

Ponemos los $27\mu\text{l}$ de la mezcla en los tubos de reacción con el ADNc y los primers y agitamos suavemente. Centrifugamos brevemente los tubos para juntar el volumen en el fondo de los viales y los colocamos en el termociclador, iniciando el programa de PCR diseñado con las condiciones de reacción predeterminadas anteriormente.

Una vez finalizado el programa, centrifugamos los tubos nuevamente y los congelamos a -20°C .

Para verificar la especificidad de los resultados obtenidos se realizan controles en los que uno o varios componentes de la reacción (ADNc, primers o Taq polimerasa), son sustituidos por un volumen equivalente de H_2O (StRf).

25.4. Identificación de los transcritos amplificados en un gel de agarosa.

Los productos de reacción de la PCR se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% p/v en presencia de bromuro de etidio (EtBr). El etidio es una molécula cuya fluorescencia es baja en estado libre, pero aumenta considerablemente cuando se intercala entre dos pares de bases de un polinucleótido.

Se diluyen 1,8 g de agarosa en 100 ml de tampón TAE 1x (tampón de electroforesis, Tris-acetato 40mM, EDTA 2mM, pH 8,5,) calentando en placa calefactora. Una vez disuelta, se deja enfriar la agarosa y se añaden $5\mu\text{l}$ de EtBr 10mg/ml (el EtBr es muy sensible al calor) que queda a la concentración final de $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$. Se agita suavemente para evitar la formación de burbujas y se deposita la disolución de agarosa sobre un molde, colocando el peine para la formación de los pocillos. Dejamos que se forme el gel alrededor de 60min.

25.4.1. Preparación de las muestras

Tomamos $15\mu\text{l}$ de cada producto de reacción de la PCR y le añadimos $3\mu\text{l}$ de una disolución que contiene naranja de acridina 6x (que queda a concentración 1x). El colorante facilita el depósito de la muestra y nos informa del avance del frente durante la

electroforesis. También preparamos la mezcla de los marcadores de tamaño y la disolución de carga en una relación 1/6.

La composición del colorante de carga es la siguiente (para un volumen final de 5ml de colorante 6x):

Acid Orange	1
Sacarosa	2
EDTA 0,2M	2
SDS	2

A la mezcla se le añade agua destilada hasta completar un volumen de 5ml, de modo que en la disolución final el colorante Orange G queda a una concentración de 0,25%p/v, la sacarosa se encuentra al 40%p/v, el EDTA a 10mM y finalmente el SDS queda a 100mM. Una vez preparada la disolución, es conveniente su filtración a través de un filtro de 0,22 μ m de diámetro de poro.

Una vez preparado el gel, cargamos las muestras (18 μ l) y los marcadores (15 μ l) en los pocillos. La electroforesis se desarrolla a 60V y en la oscuridad. Debido a su carga negativa, los ácidos nucleicos migran hacia el electrodo positivo (ánodo) separándose en función de su tamaño.

Para visualizar los productos amplificados, el gel se coloca en un trans-iluminador de luz UV (Vilber Lourmat) y se capta la imagen con una cámara digital Nikon Coolpix 4300 a la que se acopla un filtro naranja. Posteriormente, los resultados se analizan (cálculo del tamaño e intensidad de las bandas producto de la reacción) con el programa de software GelPro.

25.5. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE

Para conocer la expresión de cualquier gen es necesario cuantificar el nivel de ARNm. La variabilidad entre las muestras (debida a la distinta calidad o cantidad del ARN), queda minimizada con el uso de un estándar interno. Tal estándar debe mostrar una expresión invariable durante el ciclo celular y entre diferentes tipos celulares y no ha de verse afectado por el tratamiento experimental en estudio, en nuestro caso, la distrofia. La

referencia de la amplificación de nuestro gen respecto a la de un estándar interno nos permite realizar una cuantificación relativa de la expresión génica.

De entre todos los ARNs de una célula, el nivel más elevado corresponden al ARN ribosómico (ARNr), por lo que su proporción respecto al ARN total permanece prácticamente constante de una muestra a otra. Según esto, el ARNr se perfila como el mejor control interno de una reacción de RT-PCR y por ello escogimos el ARNr 18S como estándar interno. A su vez, la cantidad del producto correspondiente a este estándar puede ser atenuada en función de la expresión del fragmento de interés mediante la adición de primers competidores (competimers). Estos también hibridan con secuencias del ARNr, pero tienen su extremo 3' modificado, de modo que bloquean la extensión por la Taq polimerasa, disminuyendo la eficiencia de la amplificación del estándar interno, el ADNc de 18S.

25.5.1. Determinación del rango logarítmico lineal de la PCR

La velocidad de acumulación de los productos de una PCR depende de la eficiencia de la amplificación. A la hora de cuantificar los niveles de expresión de un gen para su posterior comparación y análisis, debemos asegurarnos de que operamos en las condiciones de máxima eficiencia. Para ello, es conveniente definir el rango logarítmico lineal de cada reacción de PCR, que viene a ser el periodo o número de ciclos en el que la eficiencia es máxima y se mantiene constante. Cuando ésta decae, disminuye la velocidad de acumulación de productos. Una eficiencia óptima de amplificación es aquella que permite la replicación de todos los productos de PCR en cada ciclo (en cada ciclo se duplica la cantidad de producto).

Para determinar el rango lineal, se realiza una PCR con varios tubos de reacción (9-10) idénticos en su composición. Para ello se prepara un cóctel con todos los elementos de la reacción y el ADNc obtenido a partir de la RT-PCR con “random decamers” que se reparte en los diferentes tubos.

También preparamos un programa en el TC que nos permite sacar una muestra tras un cierto número de ciclos y continuar la PCR con las demás muestras. Inicialmente, las pruebas se realizan sacando muestras cada 5 ciclos para una primera localización de la

zona lineal y posteriormente se afina el rango sacando un tubo de reacción cada dos ciclos. El tubo de reacción se pone inmediatamente en hielo.

El análisis de los resultados se realiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,8%p/v en presencia de BrEt. Con la ayuda de la cámara digital y la aplicación de software de cuantificación (GelPro) se analizan los resultados para determinar la fluorescencia debida al EtBr en la banda de interés y para cada ciclo.

La representación del número de ciclos frente a la fluorescencia de la banda da como resultado una curva sigmoide en la que se pueden distinguir, una fase temprana de background en la que la fluorescencia del producto es menor que la del fondo del gel, una fase de crecimiento exponencial que comienza cuando se ha acumulado suficiente producto como para detectar su fluorescencia (se corresponde con la fase logarítmica lineal) y una fase de meseta o plateau en la que decae la eficiencia de la amplificación.

A diferencia de los análisis a punto final, los ensayos realizados en la fase logarítmica lineal proporcionan resultados mucho más precisos, ya que el incremento en la señal se corresponde directamente con un incremento del producto de PCR.

Para los ensayos de cuantificación se eligió el número de ciclo correspondiente al umbral de detección de la fluorescencia, pues se ha observado que la fluorescencia en esta zona es invariable y que el umbral queda situado en el centro del rango lineal logarítmico de máxima eficiencia de la PCR.

Según los ensayos realizados, el umbral de fluorescencia queda establecido en el ciclo 29 para los tres transcritos, H, R y T, por lo que los ensayos posteriores y los estudios de cuantificación se realizan con 29 ciclos.

25.5.2. Determinación de la relación óptima de los primers y los competimers 18S

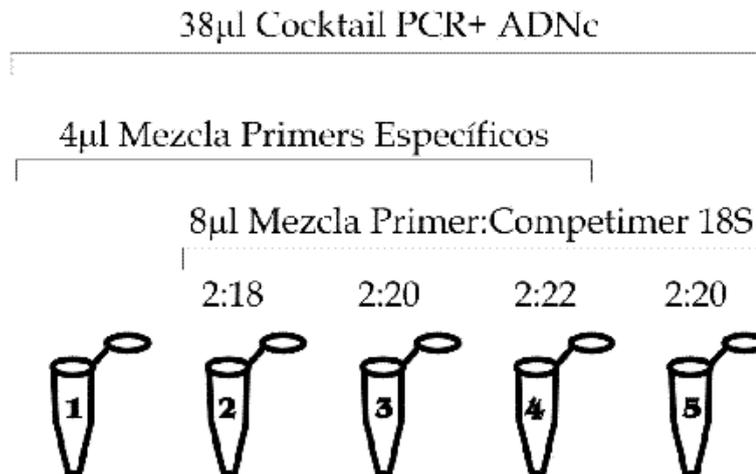
Como hemos mencionado antes, es necesario que el estándar interno elegido para la cuantificación proporcione una cantidad de producto similar a la que produce el transcrito en estudio. De esta forma, se evita que se consuman los reactivos durante la PCR antes de obtener un nivel suficiente del producto de interés, perdiéndose así la amplificación exponencial de dicho producto. También es condición imprescindible que el estándar

interno también se encuentre en la zona lineal de amplificación bajo las condiciones de ensayo determinadas para el transcrito en estudio.

Con la adición de primers competidores o competimers se consigue modular la eficiencia de amplificación del estándar interno, el ARN 18S en nuestro caso.

Para determinar la proporción óptima de los primers:competimers 18S (P:C 18S) se realizan ensayos en los que se prueban varias relaciones para dar con aquella que asegure una amplificación lineal ajustada a la de los transcritos en estudio.

Se prepara una mezcla madre con todos los reactivos de la PCR excepto los primers y se reparte entre los diferentes tubos de reacción. La cantidad de ADNc que se añade viene determinada por el transcrito a ensayar (2µl para el transcrito H y 1µl para los transcritos R y T). A su vez, a cada tubo de reacción se adicionan 8µl de la relación de P:C 18S que corresponda y 4µl de los primers específicos de transcrito.



Como controles de la ausencia de competencia en la amplificación del producto de interés y del estándar interno, se preparan dos tubos en los que sólo se ponen los primers específicos del producto (1) o los P:C 18S (5). De esta forma se puede determinar la fluorescencia de cada banda aislada lo que sirve para comprobar si la eficiencia de la amplificación de un producto se ve alterada por la amplificación del otro.

Para la PCR se usaron las condiciones de temperatura ensayadas previamente (**Aptdo II.2.3**), así como el número de ciclos determinado en el ensayo de linealidad (**Aptdo II.2.5.1**).

Los resultados de la PCR se analizan en geles de agarosa (1,8%p/v) con EtBr y nuevamente se determina la fluorescencia de las bandas de interés. La elección de la relación P:C 18S adecuada sigue dos criterios: la obtención de una señal en el estándar 18S similar a la del producto específico y la ausencia de competencia entre ambos productos. Finalmente, los resultados obtenidos indican que la relación 2:20 de P:C 18S es la más idónea para el estudio de los transcritos H, R y T.

25.5.3. Cuantificación relativa de los transcritos de AChE

Una vez determinados los parámetros de la PCR, el rango lineal y el cociente óptimo de los P:C 18S, podemos comenzar los experimentos de cuantificación de nuestros transcritos.

Se probaron los siguientes órganos: bazo, timo, músculo, médula ósea y médula espinal de ratones control y distróficos.

Se preparan 10 tubos de reacción en los que se deposita el volumen de ADNc de cada tejido adecuado para el transcrito en estudio (2µl para el transcrito H y 1µl para los transcritos R y T), completando a un volumen final de 20µl con H₂O (StRf).

Se preparan las mezclas con los primers específicos de los transcritos y los P:C 18S según la proporción estimada previamente (**Aptdo. II.2.5.2**):

Mezcla de primers específicos (volumen /tubo de reacción):

H₂O+DEP
Primer 5´
Primer 3´

Escalamos los volúmenes para 11 reacciones y ponemos 4µl de la mezcla en la pared de cada tubo de reacción, por lo que quedan a una concentración final de 0,3µM en los 50µl del tubo de reacción.

Mezcla de primers: competimers:

18S Primer
18S Competimer

Escalamos los volúmenes para 11 reacciones y ponemos 8µl de la mezcla en la pared de cada tubo de reacción, evitando el contacto con los primers específicos. Los primers y competimers del ARNr 18S quedan a una concentración final de 0,073 y 0,73µM respectivamente en el tubo de reacción.

Se prepara la mezcla madre con los reactivos de la PCR y la Taq polimerasa, escalando los volúmenes a 11 reacciones:

Orden	Reactivo	Volumen	Concentración final
1	H ₂ O (SIRf)	9	-
	Tampón de reacción 10x		
2	(Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 500mM, MgCl ₂ 25mM)	5	1x (2,5mM Mg ²⁺)
3	DMSO	2,5	5% v/v
4	Mezcla dNTPs 10mM	1	200µM
5	Hotmaster Taq ADN polimerasa (5U/µl)	0,5	0,05U/µl

Finalmente se añaden 22µl de la mezcla madre a cada tubo de reacción y tras agitar y centrifugar, se introducen los tubos en el TC donde se lleva a cabo la reacción con las condiciones de hibridación y extensión determinadas antes (**Apdo. II.2.3**) durante 29 ciclos (**Apdo. II.2.5.1**).

Para revelar los productos de la amplificación, las muestras se analizan en un gel al 1,8% p/v de agarosa en presencia de EtBr y se determina la fluorescencia de las bandas específicas del transcrito y de las bandas del estándar interno. Con el fin de comparar los

niveles de expresión de los transcritos en cada tejido, los datos se normalizan respecto a la expresión del transcrito de ARNr 18S. Para facilitar la comparación entre los distintos órganos, los valores se expresan tomando como referencia los datos obtenidos para bazo normal.

