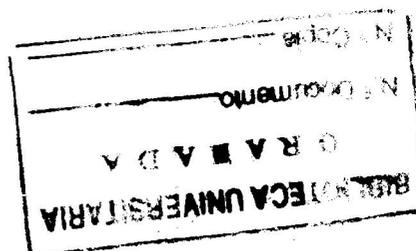


UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

ESTABILIDAD TERMICA DE LA MEMBRANA MIELINICA.

PURIFICACION CON DETERGENTES

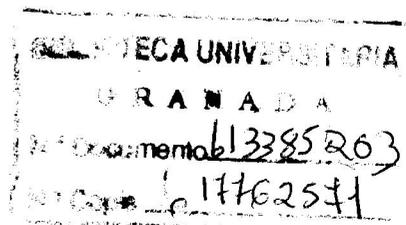
DE SUS PROTEINAS MAYORITARIAS



JAVIER RUIZ SANZ

TESIS DOCTORAL

1990



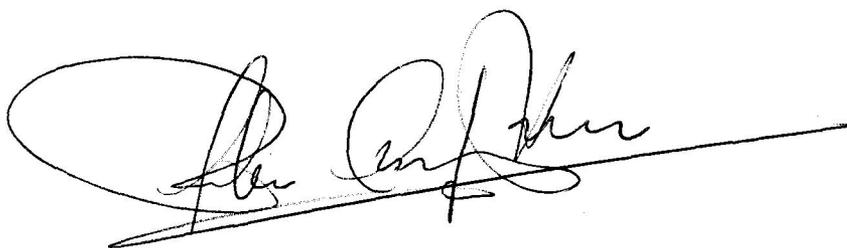
Memoria presentada para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias

A handwritten signature in black ink, reading "Javier Ruiz", written over a horizontal line.

Firmado: Javier Ruiz Sanz
Licenciado en Ciencias, Sección Biológicas

Visado en Granada, a 5 de Noviembre de 1990

EL DIRECTOR DE LA TESIS

A handwritten signature in black ink, reading "Pedro Luis Mateo Alarcón", written over a horizontal line.

Firmado: Pedro Luis Mateo Alarcón
Catedrático de Química Física
de la Universidad de Granada

A mi padre y a mi madre

Y, al principio, todo fue curiosidad.

La curiosidad, el imperativo deseo de conocer, ...

(Isaac Asimov)

Una vez finalizado el trabajo y redacción de esta Memoria es el momento en el que puedo sentarme con tranquilidad a pensar retrospectivamente ... parece que fue ayer cuando llegué a trabajar a este laboratorio y ya son cuatro años viviendo en Granada; y hay tanto que agradecer ...

En primer lugar he de agradecer a mi Director de Tesis, D. Pedro Luis Mateo Alarcón, el que me aceptara desde un principio en su Grupo de investigación y que siempre haya tenido abierta la puerta de su despacho para cualquier consulta profesional o de cualquier otro carácter. No sólo me ha dirigido durante el período de Tesis sino que me ha ayudado a sentirme como uno más del Grupo de investigación desde el primer día en que llegué.

A D. Obdulio López Mayorga, un magnífico investigador y mejor persona. Siempre dispuesto a echar una mano cuando la electrónica y la informática se cruzaban por mi camino. En los momentos difíciles, cuando todo se tuerce, me ha enseñado a aceptar que la investigación es así.

A D. Félix M^a Goñi Urcelay, que me inició en el camino de la investigación enseñándome a dar mis primeros pasos por este sendero y él fue quien me presentó a este Grupo de investigación de la Universidad de Granada.

AGRADECIMIENTOS

A D. José L.R. Arrondo, que ha puesto a mi disposición su equipo de espectroscopía FT-IR así como toda la ayuda que le he solicitado sobre su especialidad de trabajo. A este respecto, también agradecer a José Castresana su ayuda inestimable en la realización y asesoramiento de los experimentos de FT-IR.

Por supuesto he de agradecer a todo el Grupo de investigación de este laboratorio la ayuda que en ningún momento me ha negado y me ha servido tanto para irme familiarizando con esta rama de la Química tan sumamente ardua para el neófito, como para integrarme en esta tierra andaluza (ni mucho menos ardua). Es difícil ponerse a dar los nombres de todas estas personas porque seguro que se me olvidaría citar alguno que no debiera quedarse en el tintero. De todas formas, como nombres muy especiales para mí citaré a Isa una gran compañera ya que los días negros de laboratorio se convertían en grises al contarnos mutuamente los mil y un problemas que surgen a los aspirantes a Doctor; a Quico compañero de laboratorio y de piso que siempre ha estado dispuesto a explicarme cualquier tema; a Enrique, a Ana y a todo el resto del personal que me han aceptado a pesar de ser vasco.

También quiero citar la ayuda que me han brindado los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular, Parasitología Molecular y Microbiología de esta Facultad.

Una mención especial he de hacérsela a Jesús Ruiz, con quien he compartido muchos momentos en este tortuoso camino de la purificación del proteolípido, y en quien he encontrado una persona que hace frente a las adversidades con buena cara. Espero que nuestra colaboración no acabe aquí y siga siendo fructífera en el futuro.

Finalmente, no podría acabar estos agradecimientos sin mencionar a mi familia que han sabido comprender y me han apoyado tanto a pesar de la distancia que nos separa; especialmente a mi hermano José Ignacio quien me introdujo el "gusanillo" por la investigación. Y cómo no agradecer al miembro más reciente de mi familia (y más allegado), a María, sin ella no sé cómo podría haber acabado esta Tesis, su apoyo y confianza me han ayudado en todo momento y me seguirán ayudando en el futuro.

Granada, 6 de Noviembre de 1990

INDICES

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	9
II. 1. Membrana mielínica	11
II. 1.1. Introducción	11
II. 1.2. Morfología	12
II. 1.3. Función de la mielina	15
II. 1.4. Composición bioquímica	16
II. 1.4.1. Composición lipídica	18
II. 1.4.2. Composición proteica	21
II. 2. Proteínas mayoritarias de la mielina	23
II. 2.1. Proteolípido de mielina	23
II. 2.1.1. Introducción	23
II. 2.1.2. Purificación	24
II. 2.1.3. Secuencia y estructura	25
II. 2.1.4. Propiedades químico físicas	30
II. 2.2. Proteína básica de mielina	31
II. 2.2.1. Introducción	31
II. 2.2.2. Purificación	32
II. 2.2.3. Secuencia	33
II. 2.2.4. Propiedades químico físicas	34
II. 2.3. Fracción Wolfram	35
II. 2.4. Proteína DM-20	36

	<u>Página</u>
II. 3. Detergentes	37
II. 3.1. Introducción	37
II. 3.2. Clasificación	39
II. 3.3. Concentración micelar crítica	39
II. 3.4. Solubilización de membranas	42
III. MATERIALES Y METODOS	45
III. 1. Materiales	47
III. 1.1. Reactivos	47
III. 1.2. Material biológico	48
III. 1.3. Instrumentación	48
III. 2. Métodos	52
III. 2.1. Aislamiento de la membrana mielínica	52
III. 2.2. Purificación de proteínas por disolventes orgánicos	54
III. 2.3. Purificación de proteínas por detergentes	57
III. 2.4. Reconstitución	58
III. 2.5. Técnicas de purificación y análisis bioquímico	60
III. 2.5.1. Análisis de concentración de proteína	60
III. 2.5.2. Análisis de concentración de lípidos	61
III. 2.5.2.1. Determinación de fosfolípidos	61
III. 2.5.2.2. Determinación de glicolípidos	63
III. 2.5.2.3. Determinación de colesterol	64
III. 2.5.3. Extracción de lípidos	65
III. 2.5.4. Cromatografía en capa fina para análisis de lípidos	66

	<u>Página</u>
III. 2.5.5. Cromatografía en columna	67
III. 2.5.5.1. Cromatografía de afinidad	67
III. 2.5.5.2. Cromatografía de exclusión en gel	68
III. 2.5.5.3. Cromatografía de intercambio iónico	69
III. 2.5.6. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida	70
III. 2.6. Técnicas instrumentales	73
III. 2.6.1. Calorimetría diferencial de barrido	73
III. 2.6.1.1. Introducción	73
III. 2.6.1.2. Instrumentación	75
III. 2.6.1.3. Experimento calorimétrico	78
III. 2.6.1.4. Adquisición y procesamiento de datos	82
III. 2.6.1.5. Fundamentos teóricos	86
III. 2.6.1.5.1. Modelo de equilibrio entre dos estados	87
III. 2.6.1.5.2. Modelo de equilibrio entre más de dos estados	91
III. 2.6.1.5.3. Reversibilidad en la desnaturalización	92
III. 2.6.1.5.4. Modelos cinéticos	94
III. 2.6.2. Análisis térmico en gel de poliacrilamida	98
III. 2.6.2.1. Introducción	98
III. 2.6.2.2. Experimento de ATG	100
III. 2.6.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier	103
III. 2.6.3.1. Introducción	103
III. 2.6.3.2. Instrumentación	104
III. 2.6.3.3. Espectroscopía de FT-IR de proteínas	109
III. 2.6.3.4. Experimento de FT-IR	115

IV. RESULTADOS	117
IV. 1. PLP purificado por disolventes orgánicos	119
IV. 1.1. Introducción	119
IV. 1.2. CDB del PLP purificado por disolventes orgánicos	120
IV. 1.3. FT-IR del PLP purificado por disolventes orgánicos	136
IV. 2. Estabilidad térmica de la membrana mielínica	144
IV. 2.1. Introducción	144
IV. 2.2. Efecto de la conservación sobre la transición calorimétrica de la mielina ..	147
IV. 2.2.1. Efecto del almacenamiento en cámara fría de la mielina	147
IV. 2.2.2. Efecto de la congelación y almacenamiento de la mielina a -20°C	150
IV. 2.2.3. Efecto de la liofilización de la mielina	153
IV. 2.3. Efecto de la fuerza iónica y del pH sobre la transición calorimétrica de la mielina	155
IV. 2.4. Efecto de disolventes orgánicos y detergentes sobre la transición calorimétrica de la mielina	161
IV. 2.4.1. Efecto de la mezcla cloroformo:metanol sobre la mielina	161
IV. 2.4.2. Efecto de los detergentes sobre la mielina	162
IV. 2.5. Efecto de la velocidad de barrido sobre la transición calorimétrica de mielina	177
IV. 2.6. Análisis térmico en gel de poliacrilamida de la mielina	186
IV. 2.7. Espectroscopía FT-IR de la mielina	198
IV. 3. Purificación de las proteínas mayoritarias de la mielina	206
IV. 3.1. Solubilización de las proteínas de mielina	207

	<u>Página</u>
IV. 3.2. Purificación del PLP	212
IV. 3.2.1. Purificación del PLP con desoxicolato sódico	212
IV. 3.2.2. Purificación del PLP con Triton X-100	216
IV. 3.2.3. Purificación del PLP con octilglucósido	220
IV. 3.3. Purificación de la PBM	225
IV. 3.3.1. Purificación de la PBM con colato sódico	226
IV. 3.3.2. Purificación de la PBM con Chaps	229
IV. 4. Reconstitución del proteolípido de mielina	233
IV. 4.1. Introducción	233
IV. 4.2. Reconstitución del PLP purificado con Triton X-100	234
IV. 4.3. Reconstitución del PLP purificado con octilglucósido	241
V. DISCUSION	263
VI. CONCLUSIONES	301
VII. BIBLIOGRAFIA	305

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA	FIGURA	PAGINA
II. 1.1 13	IV. 1.4 125
II. 1.2 17	IV. 1.5 128
II. 2.1 24	IV. 1.6 129
II. 2.2 27	IV. 1.7 133
II. 2.3 27	IV. 1.8 134
II. 2.4 28	IV. 1.9 135
II. 2.5 32	IV. 1.10 137
III. 2.1 53	IV. 1.11 138
III. 2.2 55	IV. 1.12 140
III. 2.3 56	IV. 1.13 141
III. 2.4 59	IV. 1.14 142
III. 2.5 77	IV. 2.1 145
III. 2.6 A 84	IV. 2.2 146
III. 2.6 B 85	IV. 2.3 149
III. 2.7 90	IV. 2.4 151
III. 2.8 105	IV. 2.5 154
III. 2.9 107	IV. 2.6 156
III. 2.10 110	IV. 2.7 159
III. 2.11 114	IV. 2.8 163
IV. 1.1 121	IV. 2.9 165
IV. 1.2 122	IV. 2.10 168
IV. 1.3 124	IV. 2.11 171

FIGURA	PAGINA	FIGURA	PAGINA
IV. 2.12	173	IV. 3.10	227
IV. 2.13	176	IV. 3.11	228
IV. 2.14	179	IV. 3.12	231
IV. 2.15	180	IV. 3.13	232
IV. 2.16	182	IV. 4.1	235
IV. 2.17	184	IV. 4.2	239
IV. 2.18	185	IV. 4.3	240
IV. 2.19	189	IV. 4.4	245
IV. 2.20	190	IV. 4.5	247
IV. 2.21	193	IV. 4.6	248
IV. 2.22	197	IV. 4.7	250
IV. 2.23	200	IV. 4.8	251
IV. 2.24	201	IV. 4.9	253
IV. 2.25	203	IV. 4.10	254
IV. 2.26	204	IV. 4.11	256
IV. 3.1	208	IV. 4.12	257
IV. 3.2	209	IV. 4.13	260
IV. 3.3	211	IV. 4.14	261
IV. 3.4	214	V. 1	286
IV. 3.5	215	V. 2	293
IV. 3.6	218	V. 3	296
IV. 3.7	219	V. 4	297
IV. 3.8	222		
IV. 3.9	223		

INDICE DE TABLAS

II. 1.1	19
II. 3.1	38
II. 3.2	40
III. 2.1	111
IV. 1.1	126
IV. 1.2	127
IV. 1.3	131
IV. 2.1	148
IV. 2.2	152
IV. 2.3	157
IV. 2.4	160
IV. 2.5	166
IV. 2.6	170
IV. 2.7	175
IV. 2.8	181
IV. 2.9	194

A: Absorbancia

Ac: Acido graso libre

AC: Anhidrasa carbónica

ANSA: Acido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico

ATG: Análisis térmico en gel de poliacrilamida

CDB: Calorimetría diferencial de barrido

Ce: Cerebrósido

CM-: Grupo intercambiador de columnas de intercambio catiónico (carboximetil)

CMC: Concentración micelar crítica

CMC_{ef}: Concentración micelar crítica efectiva

Cap: Capacidad calorífica aparente

Cp: Capacidad calorífica

Cp(D): Capacidad calorífica del estado desnaturalizado

Cp(N): Capacidad calorífica del estado nativo

Cp^{ex}: Capacidad calorífica de exceso

Cp^q: Variación de Cp entre Cp(N) y Cp(D)

Cp,d: Capacidad calorífica parcial del disolvente

Cp,p: Capacidad calorífica parcial de la proteína

Co: Colesterol

Chaps: 3-[(3-colamido propil) dimetilamonio] 1-propano sulfonato

DM: Proteína DM-20

E: Energía de activación

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier

FW: Fracción Wolfgram

ΔH : Incremento de entalpía molar

ΔH^{vH} : Incremento de entalpía de van't Hoff

Δh : Incremento de entalpía específica

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

k: Constante cinética

K: Constante de equilibrio / Kelvin

m_p : Cantidad de proteína en gramos

Q: Calor desarrollado hasta una determinada temperatura

Qt: Calor total desarrollado en la transición

P: Potencia

PBM: Proteína básica de mielina

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PG: Fosfoglicérido

pI: Punto isoelectrico

Pla: Plasmalógeno

PLP: Proteolípido de mielina

p/p: Relación peso/peso

p/v: Relación peso/volumen

RMN: Resonancia magnética nuclear

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PA: Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

SM: Esfingomielina

Su: Sulfátido de cerebrósido

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

t: Tiempo

T: Temperatura

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

Td: Temperatura de transición obtenida por calorimetría diferencial de barrido

T_m : Temperatura a la cual C_p es máxima (modelo cinético de dos estados)

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

v : Velocidad de barrido de temperatura

V : Volumen de la célula calorimétrica

V_d : Volumen específico parcial del disolvente

V_p : Volumen específico parcial de la proteína

v/v : Relación volumen/volumen

X_n : Fracción nativa de proteína

ZPD: Punto del interferograma de FT-IR de máxima respuesta

ν : Número de onda

τ : Anchura media del pico a media altura en espectroscopía de FT-IR

I. INTRODUCCION

La membrana de mielina juega un papel fundamental en la transmisión del impulso nervioso en los animales con un sistema nervioso muy desarrollado (Morell, 1984). Gracias a esta membrana los impulsos se transmiten a través de las fibras nerviosas mielinizadas a una mayor velocidad y con un menor gasto energético que en el caso de las fibras no mielinizadas. Esta membrana actúa como aislante eléctrico de los axones, presentando un elevado contenido lipídico y siendo su fracción proteica menor que la encontrada en la mayoría de las membranas. Unas pocas proteínas mayoritarias, proteolípido de mielina y proteína básica de mielina, constituyen aproximadamente el 90% del contenido proteico de la mielina en el sistema nervioso central. Se sabe, por otra parte, que estas proteínas están directamente relacionadas con enfermedades del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple y encefalomiелitis (Eylar, 1980; Gregson, 1983), pero aún hoy día se desconocen sus funciones en la mielina y, por tanto, sobre sus implicaciones en estas enfermedades nerviosas.

Este desconocimiento del papel desempeñado por las proteínas mayoritarias de la mielina se debe en gran parte a la dificultad de su purificación mediante procedimientos suaves. Estas dos proteínas normalmente se han venido purificando mediante la utilización de disolventes orgánicos y/o disoluciones muy ácidas (Oshiro y Eylar, 1970; Monreal, 1975; Aguilar et al., 1983; Helynck et al., 1983; Cheifetz y Moscarello, 1985). Se considera actualmente que estos métodos tradicionales de purificación alteran muy posiblemente de forma irreversible la estructura secundaria y terciaria de las proteínas durante el proceso de purificación. Por esta razón se están desarrollando actualmente métodos más suaves para la

purificación de ambas proteínas mediante la utilización de detergentes (Smith et al., 1984; Riccio et al., 1985), los cuales, en principio, se supone que alteran menos la estructura de las proteínas (Tanford y Reynolds, 1976). De todas formas, una complicación en el proceso de purificación de estas proteínas es la falta de actividad enzimática, o alguna otra característica funcional, que permita comprobar las posibles alteraciones de su conformación nativa durante y al final del proceso de purificación y reconstitución.

En el grupo de trabajo de Calorimetría de Proteínas del Departamento de Química Física de la Universidad de Granada se había realizado, dentro de un proyecto de colaboración, un trabajo puntual sobre el proteolípido de mielina (Mateo et al., 1986), encontrándose una transición reversible centrada en 60 °C y atribuída a la desnaturalización térmica de dicha proteína. Puesto que se trataba de la primera proteína intrínseca de membrana que presentaba una desnaturalización reversible (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987) y dado el interés evidente del propio sistema, se planteó un estudio posterior más profundo y sistemático de dicha transición. Al mismo tiempo se pensó en abordar la purificación de esta proteína, así como la de la básica de mielina, por métodos menos drásticos que los propuestos en la bibliografía, es decir, con la utilización de diversos detergentes. Este es, muy resumido, el origen y génesis del trabajo que se presenta en esta Memoria.

Previamente al trabajo de purificación, se ha tenido que realizar un estudio sobre la estabilidad térmica de la membrana de mielina bajo diversas condiciones, estableciéndose así las condiciones adecuadas de trabajo para los estudios posteriores. Como se ha indicado anteriormente, aparte del estudio de la transición descrita a 60 °C, se ha pretendido aquí purificar tanto el proteolípido como la proteína básica de mielina por métodos alternativos basados en el uso de detergentes. Con este fin se han utilizado los detergentes ya propuestos

en la bibliografía para la purificación del proteolípido de mielina, desoxicolato sódico y Triton X-100 (Smith, 1977; Smith et al., 1984), con los que se ha intentado optimizar el método de purificación evitando, por ejemplo, etapas que implicaran una concentración muy alta de detergente. Se han usado además otros detergentes originales para la purificación de estas proteínas y que pudieran mejorar aspectos de dicha purificación. En cualquier caso, y posteriormente a la purificación, se ha tratado de reconstituir estas proteínas en liposomas formados por sus lípidos naturales. Hasta la fecha sólo se encuentra en la bibliografía la reconstitución de estas proteínas una vez purificadas por disolventes orgánicos (Carmona et al., 1987; Surewicz et al., 1987a; Surewicz et al., 1987b; Goñi et al., 1988; Carmona et al., 1988), mientras que en los casos contados en que se proponen detergentes para su purificación, no se ha abordado su reconstitución o no se ha podido reconstituirlas en un medio lipídico (Smith, 1977; Smith et al., 1984; Riccio et al., 1985).

Por otra parte, aunque el Grupo posee ya cierta experiencia en la aplicación a proteínas hidrosolubles de técnicas calorimétricas, tanto isotérmicas (Cortijo et al., 1982; Mateo et al., 1984; Barón et al., 1989), como de barrido (López-Lacomba et al., 1985; Sánchez-Ruiz et al., 1988a; Sánchez-Ruiz et al., 1988b; Cladera et al., 1988; López-Lacomba et al., 1989; Guzmán et al., 1990), era la primera vez que abordaba la purificación de proteínas de membrana, el uso de detergentes, y la aplicación de técnicas calorimétricas a estos sistemas. Precisamente, dada la ausencia de actividad funcional del proteolípido y la dificultad concomitante para comprobar su conformación nativa durante el proceso de purificación, se pensó que si se disponía de la traza calorimétrica de barrido para su desnaturalización, ésta podría jugar un papel análogo, ya que estos perfiles térmicos pueden en muchos casos considerarse característicos para una proteína dada (Mateo, 1984). En este sentido se ha utilizado una transición endotérmica detectada en la mielina a 80 °C por calorimetría de barrido. Con el fin, además, de determinar la naturaleza de dicha transición

se ha recurrido, durante la realización del presente trabajo, a la técnica de análisis térmico en gel de poliacrilamida. Esta es una técnica muy reciente (Soler et al., 1984; Rigell y Freire, 1987; Morin et al., 1990) que complementa muy bien la de calorimetría diferencial de barrido en el estudio térmico de biomembranas, y de cuya utilización previa en España conocemos un solo caso (Artigues et al., 1987). Ha sido pues necesario la puesta a punto de la misma, lo que entre otras cosas ha llevado al diseño y construcción de un baño térmico cuasi adiabático, capaz de realizar barridos lineales de temperatura que simulen los de calorimetría de barrido.

No son muchas las técnicas físicas que pueden utilizarse en el estudio de proteínas de biomembranas. De ellas, la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier ha adquirido un protagonismo particular en años recientes, siendo capaz de proporcionar información sobre la estructura secundaria de proteínas de membrana (Surewicz y Mantsch, 1988; Surewicz et al., 1990), así como sobre el grado de orden/desorden de los lípidos en la bicapa (Cortijo et al., 1982; Villalaín et al., 1988; Jackson et al., 1989). Aunque en este Grupo de trabajo no se disponía de experiencia previa sobre el uso de esta técnica, el disponer de un instrumento adecuado en los Servicios Técnicos de esta Universidad animó al uso de la misma como técnica complementaria en el proyecto propuesto. Habría que señalar que aunque el equipo instrumental existía, prácticamente no se había utilizado, por lo que hubo que ponerlo a punto, dotándolo de diversos accesorios, tales como controlador de temperatura, células herméticas para líquidos o desecador de aire. En esta tarea ha sido de ayuda inestimable la colaboración mantenida con el Departamento de Bioquímica de la Universidad del País Vasco, con amplia experiencia en el uso de esta técnica, tanto en asesoramiento como en la propia realización en dicha Universidad de muchos experimentos y su posterior análisis y tratamiento de datos.

Por otra parte, es también de destacar que en el estudio de la purificación de proteínas

y uso de detergentes a lo largo de esta Memoria se ha trabajado en estrecha colaboración con el Dr. J. Ruiz Cabello del Departamento de Química Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

En el conjunto pues del presente trabajo, se han abordado sistemas biológicos y utilizado técnicas, que es de esperar que permitan a este Grupo de Investigación ampliar sus líneas futuras de trabajo y hacer uso de nuevos enfoques metodológicos. El hecho de que esto sea ya una cierta realidad en el presente, y el que cristalice aún más ampliamente en el futuro, sería la mejor recompensa a los esfuerzos innovadores realizados.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

II. 1. MEMBRANA MIELINICA

II. 1.1. Introducción

En todos los animales vertebrados superiores la división del cerebro y de la médula espinal en regiones blancas y grises (sustancia blanca y sustancia gris) es evidente a simple vista. La proporción de sustancia blanca respecto a la gris aumenta conforme se asciende en la escala evolutiva.

La sustancia blanca está formada por una serie de cilindros estrechamente empaquetados; éstos son los **axones**, por los cuales se transmiten los impulsos nerviosos. La mayoría de estos axones se encuentran rodeados de una cubierta lipídica, que es la **mielina**.

La palabra mielina viene del griego "*myelós*", que significa médula. El patólogo alemán Rudolf Virchow la describió en 1854 (Virchow, 1854) denominándola con este nombre, al observar que era especialmente abundante en la médula o parte central del cerebro.

La mielina es una extensión de la membrana plasmática de la célula que la produce. Estas células son las células oligodendrogiales en el sistema nervioso central (SNC) y las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP). Aunque las capas mielínicas de ambos sistemas nerviosos presentan una apariencia similar por microscopía, tienen diferente ultraestructura y composición química y, hasta cierto punto, presentan diferentes propiedades físicas. De ahora en adelante nos referiremos únicamente a la mielina del SNC a no ser que se especifique lo contrario.

La mielina presenta unas características muy peculiares tanto morfológica, bioquímica, fisiológica, como inmunológicamente, lo cual la ha convertido en una estructura única de particular interés para la investigación científica.

II. 1.2. Morfología

La vaina mielínica, que rodea a los axones, proviene del plegamiento en espiral alrededor del axón de un apéndice de la membrana de las células oligodendrogliales. La mayor parte de esta vaina está formada por pares de membranas muy estrechamente empaquetados y separados por espacios estrechos de fluido. Esta prolongación citoplasmática que se enrolla alrededor del axón lo hace de fuera hacia dentro, quedando así cada vez más empaquetadas las membranas; ocasionalmente quedan algunos compartimentos citoplasmáticos, denominados cisuras de Schmidt-Lanterman, que permanecen como restos de citoplasma comunicados con el cuerpo de la célula emisora.

La visión de la mielina al microscopio electrónico muestra un patrón característico constituido por una serie de líneas oscuras y claras alternantes separadas por zonas no teñidas que corresponden a la unión de las caras citoplasmáticas y extracelulares, respectivamente (Figura II. 1.1).

La naturaleza periódica de esta disposición de membranas hace posible que la organización molecular de la mielina pueda examinarse por técnicas de difracción, tales como la difracción de rayos X y la difracción de neutrones. Estas técnicas han permitido calcular la separación entre las membranas y el análisis de las fuerzas e interacciones entre ellas (Franks y Levine, 1981). En general la distancia existente entre las superficies de estas membranas arrolladas en espiral viene determinada por un balance entre fuerzas atractivas

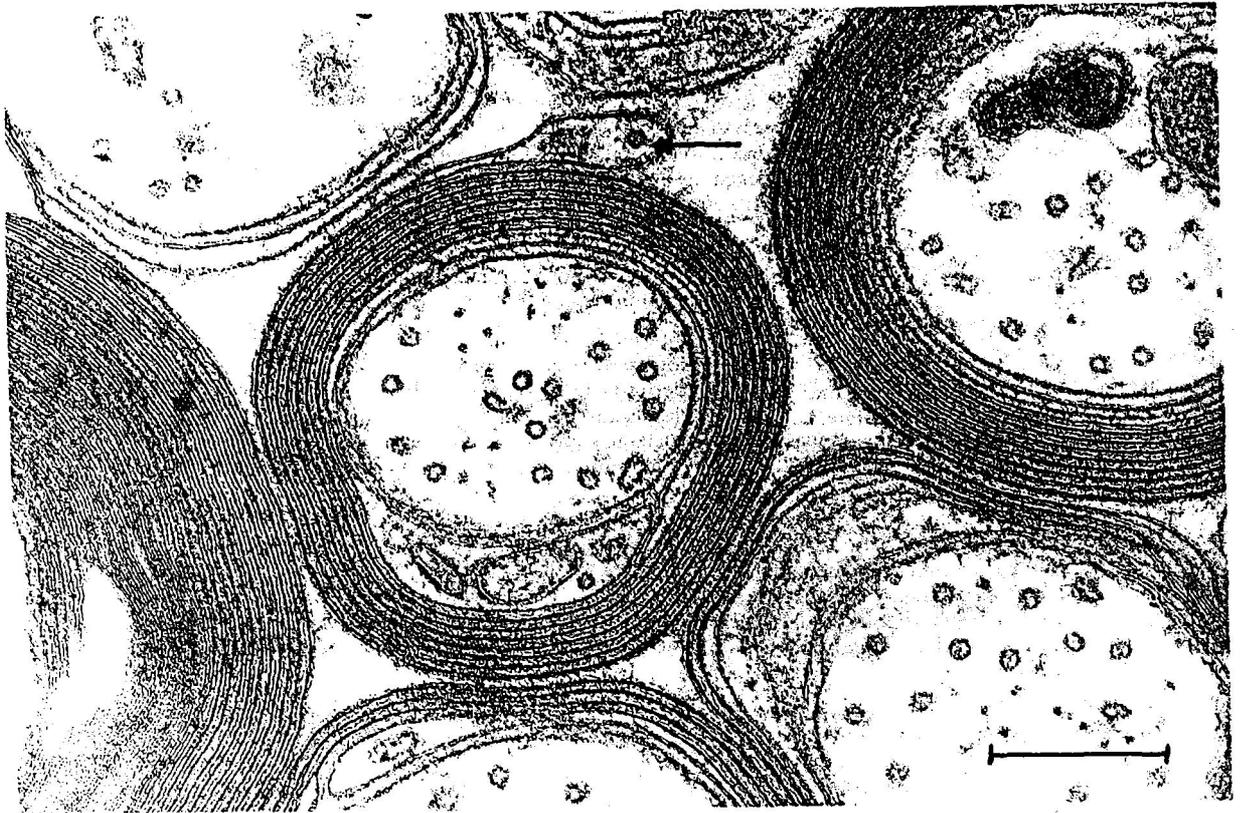


FIGURA II. 1.1: Micrografía electrónica de una sección transversal de axones mielinizados del SNC. Las capas de mielina que envuelven a los axones se observan como líneas concéntricas claras y oscuras. La célula que forma la vaina mielínica se compacta sobre sí misma y forma una doble capa de mielina que se enrolla alrededor del axón. En esta micrografía se puede observar el comienzo del enrollamiento (—→) donde se encuentra la mayor parte del citoplasma y el núcleo de la célula oligodendroglial. El segmento de la parte inferior derecha muestra la magnificación de la imagen, y corresponde a $0,25 \mu\text{m}$ (Lehninger, 1986).

y repulsivas y por un contacto entre componentes que sobresalen hacia el espacio intermembranal (Rand, 1981). La atracción entre las membranas se debe a las fuerzas de van der Waals, mientras que la repulsión proviene de dos tipos de fuerzas: (a) la fuerza electrostática que puede actuar sobre largas distancias y (b) la fuerza de hidratación que proviene del agua ligada a las moléculas de lípido y proteína y que debe eliminarse para que las superficies se acerquen más entre sí; ésta última actúa sobre distancias de decenas de Å disminuyendo rápidamente su intensidad con la distancia a la superficie (Kirschner et al., 1984).

Se han medido las separaciones entre las membranas de la mielina por perfiles de densidad electrónica tanto de difracción de rayos X como de difracción de neutrones (Franks et al., 1982), obteniéndose unos valores medios de 30-40 Å en la parte citoplasmática y de 30-50 Å en la parte extracelular. Estos valores son mayores que los obtenidos para diferentes mezclas de fosfolípido-colesterol en exceso de agua (de 15-27 Å) (McIntosh, 1980). Esta mayor separación en la mielina se debe a componentes de la membrana que sobresalen hacia el espacio acuoso y actúan como puntales para mantener la separación. Se ha sugerido que estos componentes son proteínas de la membrana mielínica ya que, gracias a experimentos de criofractura y de difracción de rayos X, se ha observado que en las zonas donde no hay proteínas la separación es menor (de hasta 20 Å), acercándose así a la distancia característica para mezclas de fosfolípido-colesterol (Winter, 1982). Estas separaciones entre membranas varían tanto entre especies diferentes como dentro de la misma especie según la edad (Padrón y Mateu, 1981), comprobándose que se deben a diferencias en la composición lipídica (diferente longitud en la cadena hidrocarbonada) y en la composición proteica (menor contenido de proteínas en los animales inmaduros).

Los estudios de difracción de rayos X no sólo han servido para el estudio de la separación y del espesor de las membranas de la mielina, sino que también se han utilizado

para observar la organización molecular con mayor detalle, mediante el análisis de los perfiles de densidad electrónica obtenidos con una resolución de 10 Å (Kirschner et al., 1979; Kirschner y Ganser, 1982). Así, se han observado hombros asimétricos en la zona interna del perfil de la bicapa que se atribuyen a una distribución asimétrica del colesterol, encontrándose éste en una proporción dos veces superior en la mitad extracelular de la bicapa que en la citoplasmática. Asimismo, se ha observado una distribución asimétrica de los plasmalógenos de fosfatidiletanolamina, localizándose únicamente en la mitad citoplasmática de la bicapa. Por último, gracias a estos estudios se ha concluido que las proteínas de mielina se hallan uniformemente distribuidas entre las dos mitades de la bicapa, ya que se obtiene el mismo perfil electrónico para la mielina completa que desproteïnizada.

II. 1.3. Función de la mielina

Ya en 1878 Ranvier especulaba sobre la función de la mielina en su libro "*Leçons sur l'Histologie du Système Nerveux*" (Ranvier, 1878) aproximándose bastante a la realidad actual:

¿Cuál es la función de la capa mielínica en sí misma? Claramente tiene una función protectora, protege al cilindro axónico de la compresión... Quizás la mielina también tenga otra función, probablemente sea una capa aislante.

En la actualidad, se afirma precisamente que la principal función de la mielina es la de aislar al axón del medio interneuronal, facilitando de este modo la conducción del impulso nervioso. Este aislamiento no es total, ya que la cubierta mielínica no es continua a lo largo

de todo el axón sino que se interrumpe de vez en cuando dejando en contacto la membrana plasmática del axón con el medio interneuronal en los denominados nodos de Ranvier.

Debido a la gran resistencia eléctrica que presenta la vaina mielínica, siendo de 10 a 20 veces mayor que la de las disoluciones salinas extracelulares, se impide la conducción eléctrica a través de ella. De este modo, la corriente bioeléctrica generada en la región de baja resistencia eléctrica del nodo de Ranvier fluye de un nodo a otro despolarizando la membrana únicamente en esas regiones. Esto origina una conducción "saltatoria" del impulso cuya velocidad es proporcional al diámetro de la fibra nerviosa mielinizada; mientras que la velocidad de transmisión en una fibra amielinizada es proporcional a la raíz cuadrada del diámetro de la fibra (Ritchie, 1984). Este hecho representa un gran ahorro en tamaño para mantener una cierta velocidad de transmisión. Sin embargo, la existencia de fibras mielinizadas representa una ventaja aún mucho mayor en cuanto a la energía consumida por el axón. Así, comparando dos fibras nerviosas que conduzcan las señales con una misma velocidad, de rana (mielinizada) y de calamar (no mielinizada), la relación entre sus diámetros puede ser de 40 mientras que el calamar necesita unas 3000 veces más energía que la rana para transmitir los impulsos nerviosos por estas fibras. Por lo tanto, existen dos importantes razones, espacio y consumo energético, que harían impracticable un sistema nervioso complejo sin fibras mielinizadas.

II. 1.4. Composición bioquímica

La característica más notable de la composición de la mielina con respecto a otras membranas plasmáticas o intracelulares es su elevada relación lípido/proteína; dependiendo de su fuente de origen, la mielina aislada contiene un 70-85% de lípido y un 15-30% de

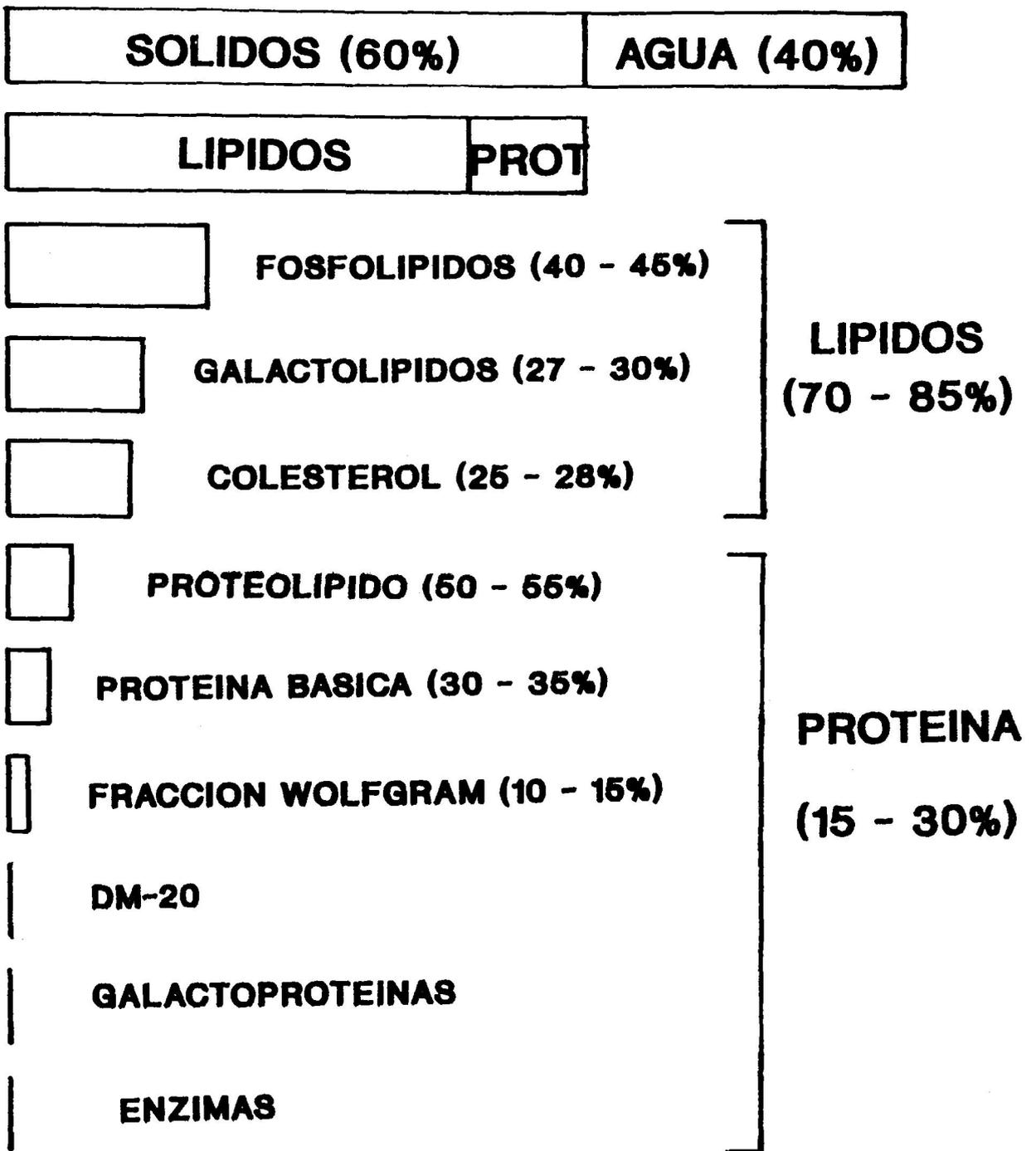


FIGURA II. 1.2 : Esquema ilustrativo de la composición de la membrana mielínica del SNC. Los tantos por ciento que se muestran para el contenido de lípido y de proteína totales son en peso seco; los tantos por ciento que se indican para cada clase de lípido y de proteína son en peso del total de lípido y de proteína respectivamente (Norton y Cammer, 1984). En la referencia no se especifica el contenido (%) de DM-20, galactoproteínas y enzimas presentes en la membrana.

proteína en peso seco (ver Figura II. 1.2).

Los análisis de la mielina aislada no pueden dar información de su contenido en agua *in vivo*; pero es obvio que es una estructura relativamente deshidratada ya que el menor contenido en agua de la sustancia blanca (72%) con respecto a la sustancia gris (82%) se debe principalmente al alto contenido de mielina de la sustancia blanca. Gracias a estudios de difracción de rayos X (Finean, 1960) se ha estimado el contenido de agua en la mielina sobre un 40% en peso.

A modo ilustrativo se puede decir que 100 g de sustancia blanca fresca contienen unos 70 g de agua y unos 30 g de sólidos; de los sólidos presentes en la sustancia blanca unos 15 g pertenecerían a la mielina. De esta forma, en el compartimento mielínico se hallaría la mitad del material sólido y tan sólo 10 g (15%) de los 70 g de agua que contiene la sustancia blanca.

Como ya mencionamos anteriormente sólo nos vamos a referir a la mielina del SNC, que es el material biológico utilizado durante este trabajo.

II. 1.4.1 Composición lipídica

Sólo existen pequeñas diferencias entre la composición lipídica de la mielina y la de la sustancia blanca, como puede observarse en la Tabla II. 1.1.

La característica más notable de los lípidos de la mielina es el elevado contenido de galactoesfingolípidos (cerebrósidos y sulfátidos) (Zalc et al., 1981). La mielina también está enriquecida en colesterol y en fosfoglicéridos de etanolamina en su forma de plasmalógeno (plasmeniletanolamina) con respecto a otras membranas. Estos tres tipos de lípidos representan el 65% de los lípidos totales de la mielina. Cuando la composición lipídica se expresa como relación molar, las cantidades de colesterol:fosfolípido:galactolípido varían

TABLA II. 1.1

Composición lipídica de la mielina y de la sustancia blanca del SNC de diferentes fuentes, así como del cerebro total de rata. Los valores de lípidos y proteínas totales vienen expresados en % de peso seco, mientras que los demás se expresan como % del peso de lípidos totales. PG se refiere a fosfoglicéridos. Los valores dados en la Tabla corresponden a valores medios de animales adultos obtenidos por Norton y Cammer (Norton y Cammer, 1984).

SUSTANCIA	MIELINA			SUSTANCIA BLANCA CEREBRO		
	Humana	Bovina	Rata	Humana	Bovina	Rata
Proteína total	30,0	24,7	29,5	39,0	39,5	56,9
Lípido total	70,0	75,3	70,5	54,9	55,0	37,0
Colesterol	27,7	28,1	27,3	27,5	23,6	23,0
Galactolípido total	27,5	29,3	31,5	26,4	28,6	21,3
Cerebrósido	22,7	24,0	23,7	19,8	22,5	14,6
Sulfátido	3,8	3,6	7,1	5,4	5,0	4,8
Fosfolípido total	43,1	43,0	44,0	45,9	46,3	57,6
PG etanolamina	15,6	17,4	16,7	14,9	13,6	19,8
PG colina	11,2	10,9	11,3	12,8	12,9	22,0
PG serina	4,8	6,5	7,0	7,9	11,4	7,2
PG inositol	0,6	0,8	1,2	0,9	0,9	2,4
Esfingomielina	7,9	7,1	3,2	7,7	6,7	3,8
Plasmalógeno	12,3	14,1	14,1	11,2	12,2	11,6

entre 4:3:2 y 4:4:2.

Los largos restos de cadenas hidrocarbonadas de mielina se caracterizan por la existencia de una alta proporción de aldehídos grasos. Estos aldehídos grasos, que derivan primariamente de fosfatidiletanolaminas y, en menor proporción, de fosfatidilserinas, constituyen un sexto del total de los restos grasos de fosfoglicéridos. Suelen ser aldehídos palmíticos, esteáricos y oléicos, siendo rara la existencia de aldehídos poliinsaturados.

Como norma general, los fosfolípidos de la mielina contienen cantidades altas de ácidos grasos monoinsaturados y bajas de saturados y poliinsaturados con respecto a los fosfolípidos de la sustancia gris.

La región hidrofóbica de la bicapa mielínica presenta la característica de que el 25% de las cadenas hidrocarbonadas que la forman son de 4 a 6 carbonos más largos que la media en otras membranas. La mayoría de estas cadenas largas se encuentran en esfingomielinas, cerebrósidos y en sulfatos de cerebrósidos. Como la longitud de las cadenas de los lípidos de mielina varían entre 17 y 30 Å, y la región hidrofóbica de la bicapa es de unos 45 Å de anchura, se ha sugerido que debe producirse una interdigitación de las cadenas hidrocarbonadas más largas confiriendo una mayor fluidez al centro de la bicapa (Griffith et al., 1974).

A pesar de la gran cantidad de datos existentes sobre la composición lipídica de la mielina, se sabe muy poco sobre la distribución de estos lípidos en las dos mitades de la bicapa; de todas formas, se pueden hacer tres observaciones importantes:

- El colesterol aparece asimétricamente distribuido, habiendo más cantidad en la mitad externa de la bicapa que en la interna, con una relación aproximada de 2:1. Según esta relación, la proporción molar del colesterol con respecto a los otros lípidos sería de 1:1 en la mitad externa y de 3:7 en la interna. Esto indica que la mitad externa de la bicapa puede estar cercana al nivel de saturación de colesterol, según estudios realizados con modelos de

membrana (Reiber, 1978).

- La mayoría de los cerebrósidos se encuentran localizados en la mitad externa de la bicapa, lo cual provoca que el nivel de saturación de colesterol admitido en esa capa disminuya. Se puede concluir que la mitad externa de la bicapa contiene casi exclusivamente colesterol y glicolípidos, mientras que la mayor parte del fosfolípido se encontraría en la mitad interna.

- Los plasmalógenos de etanolamina, la especie más abundante de fosfolípidos en la mielina, se encuentran exclusivamente en la mitad interna.

II. 1.4.2. Composición proteica

Mientras que la composición lipídica de la mielina del SNC es cualitativamente la misma que la mielina del SNP, la composición proteica difiere en gran medida entre ambas. Como ya se ha comentado anteriormente, vamos a centrarnos exclusivamente en la mielina del SNC.

La composición proteica de la mielina es relativamente simple, constituyendo dos proteínas al menos el 80% del total de proteína (Figura II. 1.2). Ambas proteínas son bastante básicas, una de ellas con composición similar a la de las histonas, conocida como **proteína básica de mielina (PBM)** y la otra, de carácter muy hidrofóbico, conocida normalmente como **proteolípido de mielina (PLP)**. El resto de las proteínas están en un grupo heterogéneo compuesto por algunos enzimas, glicoproteínas y un número de proteínas de estructura y función desconocidas, la mayoría de ellas de un peso molecular superior al de las dos proteínas mayoritarias (Lees y Sakura, 1978). Estas proteínas, minoritarias cuantitativamente, juegan un papel importante dentro de la mielina debido a su contribución en la mielinogénesis y en el mantenimiento metabólico y estructural de estas membranas

multilamelares (Norton y Cammer, 1984).

Siempre se había creído que la mielina era un tejido inerte que contenía poca o ninguna actividad enzimática, pero en estos últimos años se han identificado un número elevado de enzimas asociados a la mielina. Tal realidad conduce al replanteamiento de un papel funcional más activo para la mielina; así, recientemente se ha descrito una actividad de recuperación de iones para la membrana (Helynck et al., 1983).

Las glicoproteínas, a pesar de ser un componente minoritario, tienen gran importancia en el desarrollo y patología de la mielina (Quarles, 1980). La más abundante y mejor estudiada de estas proteínas es la denominada MAG, con un peso molecular de 100.000 y constituye un 1% de la proteína total de la mielina; su contenido en carbohidratos es elevado llegando a constituir hasta un tercio de la molécula, presentando una proporción alta de ácido siálico, además de fucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina (Quarles et al., 1983).

II. 2. PROTEINAS MAYORITARIAS DE LA MIELINA

II. 2.1. Proteolípido de mielina

II. 2.1.1 Introducción

El término **proteolípido** fue propuesto por Folch y Lees (Folch y Lees, 1951) para describir a una clase de lipoproteínas que se caracterizaban por su solubilidad en disolventes orgánicos y su insolubilidad en medios acuosos. El proteolípido de mielina (PLP) es química y físicamente distinto de otros proteolípidos, no observándose reacción inmunológica con proteolípidos de otras membranas (Macklin et al., 1982).

El PLP es la única proteína de la mielina soluble en mezclas de cloroformo-metanol, por lo que normalmente ha sido purificada utilizando disolventes orgánicos (Gagnon et al., 1971; Monreal, 1975; Aguilar et al., 1983). En realidad, se ha observado que los solubilizados de mielina con cloroformo-metanol contienen también pequeñas cantidades de PBM; esta solubilización de la PBM parece estar relacionada con la eliminación de las sales durante la obtención de mielina y con la presencia de lípidos ácidos con los que forma complejos iónicos durante el proceso de solubilización (Palmer y Dawson, 1969).

II. 2.1.2. Purificación

Los métodos convencionales de purificación del PLP (Monreal, 1975; Lees y Sakura, 1978) utilizan disoluciones orgánicas e, incluso, delipidan exhaustivamente la proteína (Aguilar et al., 1983), por lo que el PLP se ve sometido a procesos muy drásticos lo cual puede afectar a su conformación durante la purificación. En los últimos años se han utilizado diversos detergentes para que las condiciones de purificación sean más suaves y, así, intentar conservar en lo posible la estructura nativa del PLP (Smith et al., 1984; Ruiz-Cabello et al., enviado).

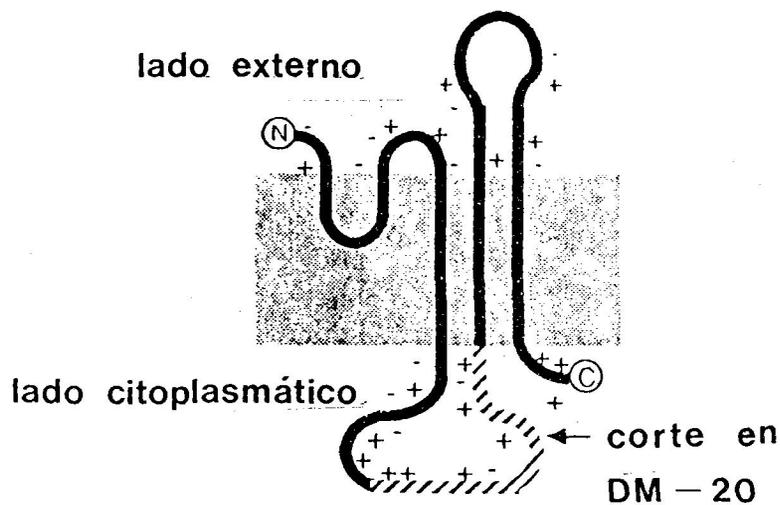


FIGURA II. 2.1: Representación esquemática de la secuencia aminoacídica de delección del PLP en la proteína DM-20 (Nave et al., 1987).

En electroforesis de SDS-poliacrilamida el PLP aparece como una banda correspondiente a un peso molecular de 24.000-26.000 cuando en realidad su peso es de 30.000. Esto se debe a que al ser una proteína muy hidrofóbica se une comparativamente a más moléculas de SDS y consecuentemente presenta una movilidad electroforética mayor, obteniéndose así un peso molecular aparente menor al compararla con proteínas patrones (See y Jackowski, 1989). Por lo general también se observa, junto con la banda correspondiente al PLP, una banda de menor peso molecular (20.000) que corresponde a la DM-20 y que es muy difícil de separar del PLP. De hecho se ha observado que ambas proteínas poseen muchas propiedades en común e incluso presentan entrecruzamiento inmunológico (Trifilieff et al., 1986). Recientemente se ha secuenciado la DM-20 y se ha observado que sólo difiere de la secuencia del PLP en una delección interna de 35 restos aminoacídicos (del resto 116 al 150 de los 276 que posee el PLP) (Nave et al., 1987) (Figura II. 2.1).

II. 2.1.3. Secuencia y estructura

La secuencia aminoacídica del PLP de mielina bovina contiene 276 restos con un peso molecular de 29869; se observa una clara segregación en dominios hidrofóbicos e hidrofílicos (Lees et al., 1983), siendo los restos apolares un 66% del total, por lo que presenta un marcado carácter hidrofóbico. El PLP presenta además una mayor abundancia de aminoácidos dicarboxílicos que básicos, pero debido a que la mayor parte de los restos glutámicos y aspárticos están amidados su punto isoeléctrico es bastante básico ($pI=9,2$).

En su secuencia el PLP presenta 14 restos de cisteína, de los cuales se pueden acilar solamente 4 (Vacher et al., 1984); esto hace suponer que los otros 10 restos se encuentran formando puentes disulfuro. Así, Shaw y colaboradores (Shaw et al., 1989) mediante un estudio del PLP de mielina bovina, concluyen que la Cys-200 y la Cys-219 se encuentran

formando un puente disulfuro localizado probablemente en la cara extracelular de la membrana; los otros 4 puentes disulfuro estarían formados por los restos Cys-5, Cys-6, Cys-9, Cys-108, Cys-138, Cys-140, Cys-183 y Cys-227, mientras que los grupos tiol libres corresponden a los restos Cys-24, Cys-32, Cys-34 y Cys-168 (Shaw et al., 1989).

Un hecho muy importante en la composición del PLP de mielina es la presencia de ácidos grasos en un 2-4% en peso (unos 2 ó 3 moles/mol de proteína), principalmente palmítico, oléico y esteárico (Stoffyn y Folch-Pi, 1971), que se encuentran unidos por enlaces éster, posiblemente a grupos alcohol de aminoácidos hidroxílicos, como serina o treonina. Estudios realizados recientemente han demostrado que uno de los ácidos grasos está unido al PLP por un enlace éster a la treonina 198 (Stoffel et al., 1983); también se cree que un resto de cisteína se encuentra formando un enlace tioléster con otro ácido graso (Ross y Braun, 1988). Aunque todavía se desconoce el papel fisiológico desempeñado por estas cadenas hidrocarbonadas, se ha demostrado que contribuyen a la estabilización de la estructura terciaria de la proteína (Bizzozero et al., 1986).

Se han desarrollado varios métodos predictivos para obtener la estructura secundaria de las proteínas a partir de su secuencia aminoacídica (Maxfield y Scheraga, 1976; Robson y Suzuki, 1976; Nagano, 1977; Chou y Fasman, 1977; Chou y Fasman, 1978; Sebald y Hoppe, 1981). A partir del conocimiento de la estructura primaria del PLP (Stoffel et al., 1983) han aparecido dos modelos teóricos de su estructura terciaria (Stoffel et al., 1984; Laursen et al., 1984) basados en los actuales métodos de predicción de estructura secundaria, en la localización de los puentes disulfuro y en la ubicación de la proteína en la membrana (Figuras II. 2.2 y II. 2.3). En ambos modelos la cadena polipeptídica presenta cuatro regiones hidrofóbicas, tres de las cuales atraviesan la membrana totalmente en forma de hélices α , mientras que la otra región penetra parcialmente en la membrana y vuelve a salir por el mismo lado.

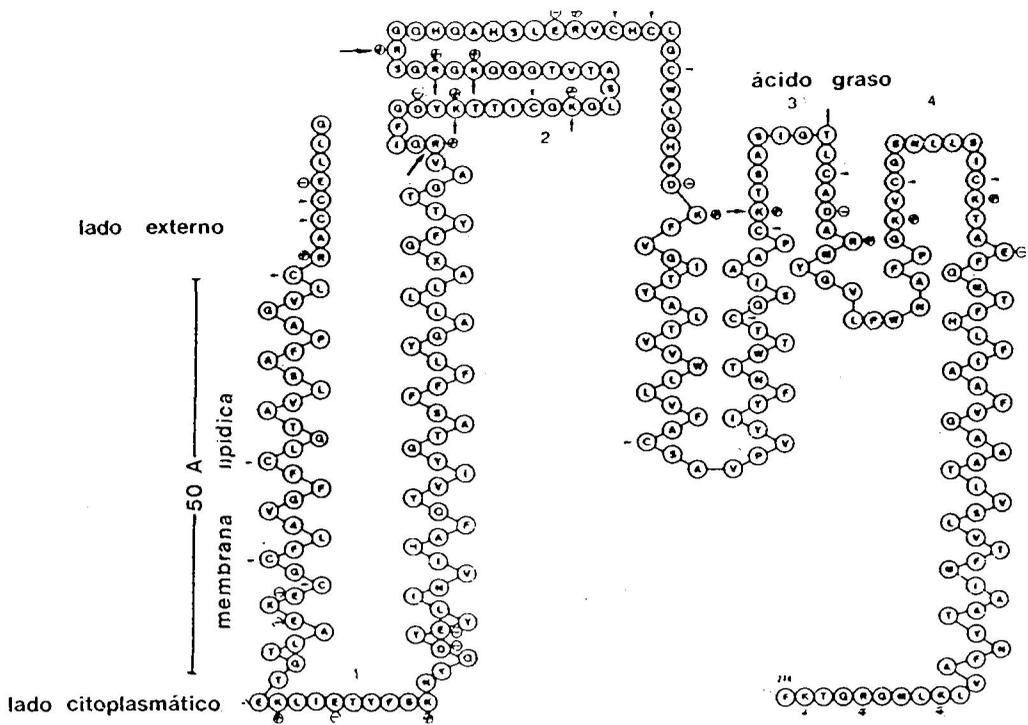


FIGURA II. 2.2: Modelo teórico de la estructura terciaria del PLP en la membrana mielínica propuesto por Stoffel y colaboradores (Stoffel et al., 1984).

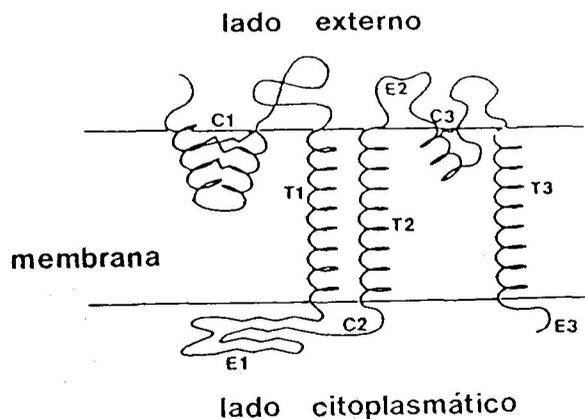


FIGURA II. 2.3: Modelo teórico de la estructura terciaria del PLP en la membrana mielínica propuesto por Laursen y colaboradores (Laursen et al., 1984). T1, T2 y T3 son segmentos hidrofóbicos transmembrana; C1 y C3 son segmentos parcialmente hidrofóbicos cismembrana porque entran y salen por el mismo sitio de la membrana. Finalmente, los segmentos de la cadena peptídica E1, E2 y E3 son dominios cargados extra membrana.

Estos dos modelos presentan ligeras diferencias, Laursen y colaboradores proponen que los giros se localizan en los restos 13-17 y 32-35, mientras que Stoffel y colaboradores localizan un giro en la posición 168-173. Estos modelos, como ya se ha dicho, son meramente teóricos y no están confirmados experimentalmente. Incluso, en ambos modelos se sitúa la cadena hidrocarbonada del ácido graso unido a la treonina 198 muy alejada de la bicapa, lo que la sitúa en un medio hidrofílico siendo termodinámicamente desfavorable.

Recientemente, Hudson y colaboradores han publicado un trabajo (Hudson et al., 1989) donde proponen una nueva disposición estructural del PLP en la membrana del oligodendrocito y suponen que esta estructura no variará mucho en la mielina compacta (Figura II. 2.4).

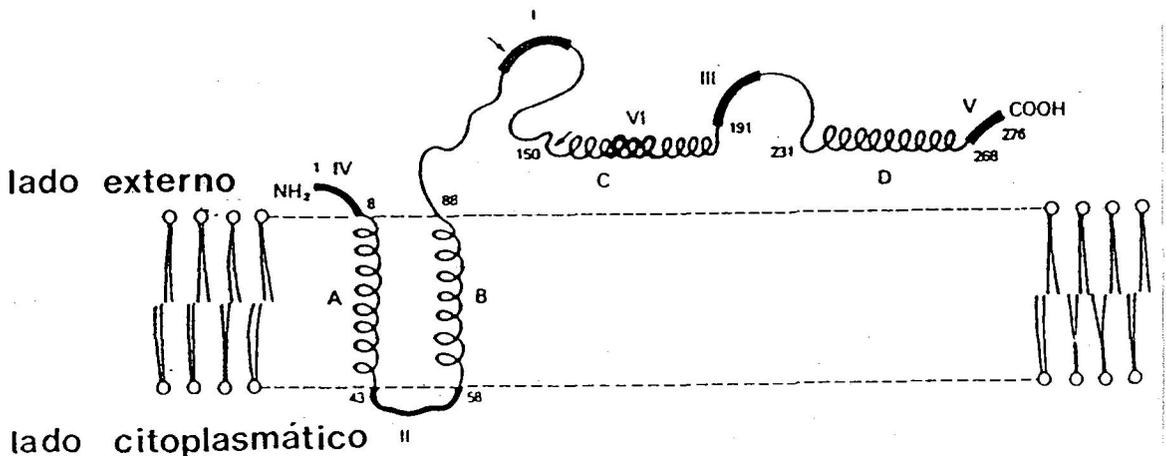


FIGURA II. 2.4: Modelo propuesto por Hudson y colaboradores (Hudson et al., 1989) para la conformación del PLP en la membrana del oligodendrocito. Se muestra la localización de los péptidos sintéticos utilizados para la determinación de la orientación del PLP (I-IV) con líneas más gruesas. También se muestra la región peptídica que falta en la proteína DM-20 (restos del 116 al 150) entre las dos flechas.

Mediante un estudio de anclaje de anticuerpos de anti-péptidos del PLP, proponen que el PLP presenta únicamente dos segmentos transmembranales en forma de hélice α y la gran mayoría de la proteína se localiza en la cara extracelular de la membrana del oligodendrocito, donde se encuentran dos segmentos en hélice α y los extremos amino y carboxilo (Hudson et al., 1989). La disparidad entre este modelo y los propuestos teóricamente (Stoffel et al., 1984; Laursen et al., 1984) puede explicarse si el PLP se reestructura durante su paso de la membrana del oligodendrocito a la mielina compacta, aunque los autores del modelo más reciente no creen que se produzca un cambio tan radical (Hudson et al., 1989). En cuanto a estudios experimentales del PLP purificado, poco es lo que se encuentra en la bibliografía. De lo realizado hasta la fecha, se ha hecho bien con el PLP purificado por disolventes orgánicos y delipidizado posteriormente (Surewicz et al., 1987a; Carmona et al., 1987), o bien con el PLP purificado por detergentes pero sin eliminar las moléculas de detergente para su estudio (Smith et al., 1984), por lo que es probable que las estructuras obtenidas en estos estudios no correspondan a las que posee la proteína en su estado nativo.

De lo que sí se encuentra mayor documentación es sobre las interacciones lípido-PLP (Boggs et al., 1982a; López-Lacomba, 1987; Goñi et al., 1988). En estos trabajos se introduce el apoproteolípido en bicapas lipídicas artificiales observándose un comportamiento en la bicapa análogo al que presentan otras proteínas intrínsecas de membrana, como es el caso del PLP; mediante diversas técnicas químico físicas se obtiene que aumenta ligeramente el orden estático de las cadenas hidrocarbonadas en el estado fluído de la bicapa, aumentando también la microviscosidad de la bicapa conforme aumenta la fracción molar de proteína. Gracias a estos datos se ha estimado que un promedio de 37 moléculas de fosfolípido quedan perturbadas por molécula de PLP al incluirse éste en las bicapas.

II. 2.1.4. Propiedades químico físicas

El PLP muestra una serie de propiedades muy peculiares probablemente debidas a su alta hidrofobicidad, lo que le hace adoptar una estructura característica, aún no establecida. Así, es resistente a la desnaturalización por urea o por cloruro de guanidinio; también se ha observado que el apoproteolípido es resistente al ataque de enzimas proteolíticos como pepsina, tripsina, papaína y erepsina (Lees y Brostoff, 1984).

Cuando se calienta el PLP en presencia de SDS o de agentes tioles se agrega (Cockle et al., 1978); este hecho acarrea grandes inconvenientes a la hora de realizar electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, ya que si se emplean los métodos convencionales de preparación de muestra el PLP se agrega y no entra en el gel de electroforesis. Así, se tienen que utilizar otros métodos de preparación de la muestra para la electroforesis (Ludwig et al., 1979; Cózar, 1986). En este trabajo, después de probar varios métodos de preparación, se observó que mezclando la muestra de proteína con el tampón mencionado en Materiales y Métodos, y dejando incubar esta mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente no aparecían agregados en el origen de electroforesis, obteniéndose resultados iguales a los obtenidos con los otros métodos, mucho más laboriosos (ver Apartado de Materiales y Métodos III. 2.5.6).

Recientemente se ha descrito una transición térmica reversible observada por CDB para el PLP purificado por disolventes orgánicos (Mateo et al., 1986). Estos autores obtienen que la transición, que suponen debida al PLP, es térmicamente reversible en presencia de una serie de lípidos que permanecen con el PLP durante su purificación, mientras que al delipidar la proteína la transición desaparece, lo cual indicaría que el PLP se desnaturaliza al eliminar esos lípidos que le rodean. Esta transición térmica es la única reversible descrita hasta el momento para proteínas intrínsecas de membrana (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987), por lo que

en este trabajo se ha investigado con mayor profundidad dicha transición (ver Apartado de Resultados IV. 1).

Mediante microscopía electrónica de criofractura se ha observado que en la mielina compactada artificialmente se segrega el PLP lateralmente y las membranas libres de partículas se acercan más entre sí (Kirschner et al., 1979); por todo esto se sugiere que el PLP es un componente mayoritario de los puntales que mantienen la separación normal de las membranas de mielina. También se ha sugerido una posible función ionofórica de esta proteína, ya que Lin y Lees han observado flujo de protones a través de liposomas reconstituidos con PLP (Lin y Lees, 1982); sin embargo no hay evidencia todavía de actividad ionofórica *in vivo*.

II. 2.2. Proteína básica de mielina

II. 2.2.1. Introducción

La proteína básica de mielina constituye entre el 30% y el 40% del contenido de proteína de la mielina del SNC. En realidad, es una familia de proteínas básicas de diferente peso molecular pero con secuencias similares de aminoácidos, que aparecen en diferentes especies de mamíferos, de las cuales la más abundante y la más estudiada es una proteína con un peso molecular de 18.500 daltons. También pueden encontrarse otras proteínas básicas de menor y mayor peso molecular en ciertas especies, aunque en concentraciones menores y sus secuencias primarias parecen derivar de la proteína de 18.500 por deleciones o por inserciones como puede verse en la Figura II. 2.5 (Barbarese et al., 1977; Greenfield et al.,

1982). En la mielina del SNC de cerebro bovino la proteína básica mayoritaria es la de 18.500, mientras que las otras tres, incluidas en la Figura II. 2.5, son nulas o prácticamente inexistentes; por ello cuando hablemos de proteína básica de mielina (PBM) nos referiremos exclusivamente a la de 18.500.

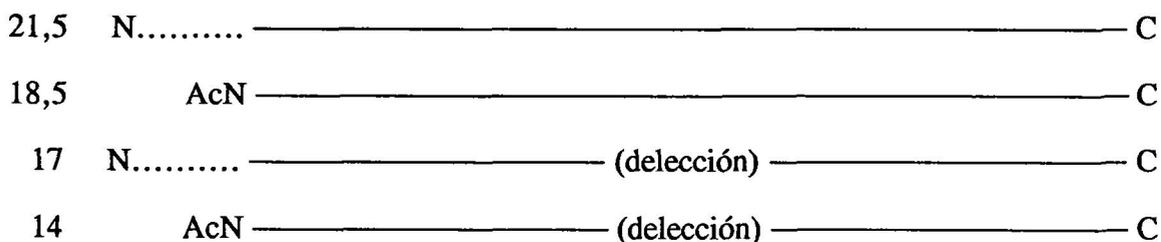


FIGURA II. 2.5: Esquema de las supuestas relaciones secuenciales de las diferentes proteínas básicas de la mielina del SNC (Barbarese et al., 1977). A la izquierda de cada una se indica el peso molecular correspondiente en kilodaltons.

II. 2.2.2. Purificación

La PBM se puede purificar a partir de tejido del SNC homogeneizado mediante delipidación con cloroformo:metanol (2:1 v/v) y posterior extracción ácida; también se extrae fácilmente a partir de mielina parcialmente delipidada mediante ácidos diluídos. Los procesos posteriores de purificación implican cromatografía de exclusión en gel y/o de intercambio iónico (Oshiro y Eylar, 1970; Deibler y Martenson, 1973; Chou et al, 1976; Cheifetz y Moscarello, 1985).

También se han desarrollado otros procedimientos, en principio menos agresivos que los anteriores, mediante la utilización de detergentes (Riccio et al., 1985; Ruiz-Cabello et al., enviado) o por extracción con sales de cloruro cálcico (Gow y Smith, 1989).

II. 2.2.3. Secuencia

La PBM de cerebro de vaca es una cadena polipeptídica de 169 restos aminoacídicos de composición conocida con un peso de 18.300 (Eylar et al., 1971; Brostoff et al., 1974). Su secuencia sólo difiere en un 10% al compararla con las secuencias de las proteínas correspondientes a otras especies (Gibson et al., 1984). Tiene aproximadamente un 54% de restos polares y un 46% de apolares, por lo que presenta un cierto carácter hidrofílico, comportándose como una proteína extrínseca o semiextrínseca que se dispone en la superficie de la membrana miélnica por la parte interna y parcialmente incluida en ella (Lees y Brostoff, 1984).

Una característica peculiar es su elevado porcentaje de restos básicos (24%) que se encuentran distribuidos al azar por toda la cadena de aminoácidos; aparte de restos de arginina y lisina posee una alta proporción de restos de histidina. Además, la mayor parte de los restos de glutámico se hallan amidados, por lo que su punto isoeléctrico es muy básico ($pI > 10$).

En la secuencia de aminoácidos también se observa una elevada proporción de restos de prolina, habiéndose encontrado una secuencia triprolina (Pro-Pro-Pro) en el punto medio de la cadena, que se sugiere como un espaciador rígido de dos regiones polipeptídicas: una que presenta estructura definida mientras que la otra aparecería desordenada (Moore et al., 1983). Las predicciones de estructura secundaria asignan un 20% de estructura β a esta proteína (Stoner, 1984; Martenson, 1986).

II. 2.2.4. Propiedades químico físicas

La PBM aislada es soluble en medios acuosos a pH ácido o neutro y es estable en condiciones extremas, tales como en ebullición a 100 °C durante una hora (Lees y Brostoff, 1984).

Estudios químico físicos con diversas técnicas indican que la PBM se comporta básicamente como una estructura al azar cuando se encuentra en disolución acuosa. Así, estudios de dicroísmo circular (Gow y Smith, 1989) y de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (Surewicz et al., 1987b) de la PBM en disoluciones acuosas concluyen que su estructura es mayoritariamente al azar (hasta un 80%); mientras que si se incluye en un medio lipídico su estructura se organiza llegando a presentar alrededor de un 53% de estructura β -antiparalela y un 15% de hélice α (Surewicz et al., 1987b).

Estudios de RMN (Moore et al., 1983) y CDB (Boggs et al., 1982b) de la PBM en bicapas de fosfatidilglicerol concluyen que posee un comportamiento típico de proteína semiextrínseca, produciendo una interdigitación de las cadenas hidrocarbonadas al incluirse en la bicapa.

Probablemente la PBM se presenta en la mielina formando dímeros, de acuerdo con estudios realizados tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" (Golds y Braun, 1978). Como la PBM y el PLP forman al menos el 80% de la proteína total de la mielina es lógico pensar que juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura en multicapas de esta membrana con una periodicidad característica, aunque todavía no existen suficientes datos experimentales para confirmar dicha hipótesis.

II. 2.3. Fracción Wolfgram

El término de Fracción de Wolfgram se utiliza para designar a un doblete (o triplete) de bandas de alto peso molecular que aparece en los geles de SDS-poliacrilamida. Wolfgram la obtuvo al realizar una extracción de la sustancia blanca con cloroformo:metanol (2:1 v/v) a pH 2 observando que en ese extracto aparecían otras proteínas además del PLP; al ajustar este extracto a pH 5 estas otras proteínas precipitaban (Wolfgram, 1966).

Esta fracción es insoluble tanto en agua como en cloroformo-metanol a pH neutro, aunque sí es soluble en cloroformo-metanol a pH ácido. Contiene un 53% de restos aminoacídicos polares y un 47% de apolares.

Al realizar una electroforesis en gel de SDS-PA de la mielina la Fracción Wolfgram aparece, en un principio, como dos bandas en la zona de 43.000-60.000 separadas entre sí por un intervalo de peso de entre 5.000 y 10.000. Al resolver con mayor precisión estas dos bandas se observa, sin embargo, que la banda de mayor movilidad electroforética está en realidad formada a su vez por un doblete con una diferencia de peso de 2.500-3.000 (Drummond y Dean, 1980).

Se ha observado que la proteína de mayor peso molecular (W_2) coemigra con la tubulina y tiene mapas peptídicos y composición aminoacídica similares, así como inmunidad cruzada (Reig et al., 1982), lo que sugiere que esta W_2 puede estar implicada en procesos contráctiles relacionados con la mielinización.

El doblete de menor peso molecular (W_1) se ha identificado como el enzima 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfohidrolasa (CNP), ya que se ha comprobado que el peso molecular, la composición aminoacídica y las propiedades inmunológicas de W_1 coinciden con las determinadas para el CNP previamente purificado de la mielina (Sprinkle et al., 1980). Este doblete corresponde a dos proteínas con pesos moleculares de 46.000 y 48.000 y que

presentan una secuencia aminoacídica muy similar (CNP₁ y CNP₂). Se supone que su función está relacionada con el rápido crecimiento, y el posterior mantenimiento, de la membrana mielínica durante la biogénesis de la membrana del oligodendrocito (Sprinkle, 1989).

II. 2.4. Proteína DM-20

Esta proteína se ha incluido en este apartado no tanto por su abundancia en la mielina sino por su enorme relación con el PLP. Así, al realizar una electroforesis en gel de SDS-PA de la mielina se puede observar una banda electroforética ligeramente por debajo de la correspondiente al PLP; ésta es la DM-20 que electroforéticamente presenta un peso molecular de 20.500.

La DM-20 es soluble en mezclas de cloroformo-metanol; de hecho suele aparecer junto con el PLP en los extractos de cloroformo-metanol al intentar purificar esta proteína. Incluso, sigue apareciendo al purificar el PLP mediante detergentes (Ruiz-Cabello et al., enviado).

La composición aminoacídica es muy similar a la del PLP, presentando ambas proteínas entre sí entrecruzamiento inmunológico (Trifilieff et al., 1986). Recientemente, se ha observado (Figura II. 2.1) que la DM-20 difiere del PLP por una delección interna de 35 restos aminoacídicos (del 116 al 150) en el dominio hidrofílico más grande del PLP (Nave et al., 1987). Esta enorme semejanza entre ambas proteínas, tanto química como física, podría explicar la dificultad de separarlas a la hora de la purificación del PLP.

II. 3. DETERGENTES

II. 3.1. Introducción

Las sustancias anfifílicas o anfipáticas (Tanford, 1973) constituyen un grupo muy heterogéneo de sustancias cuya característica común es el poseer en su molécula dos zonas diferenciadas, una polar y otra apolar (Tabla II. 3.1). Los grupos polares pueden estar cargados o no, siendo éstos últimos menos hidrófilos que los iónicos. La zona apolar, lipofílica, puede presentar cadenas alquílicas o anillos aromáticos. Las diferencias estructurales se reflejan en el comportamiento de los anfífilos en medio acuoso (Hartley, 1977).

Los anfífilos hidrosolubles se conocen también como surfactantes. Los detergentes son anfífilos hidrosolubles con capacidad para solubilizar lípidos.

Para solubilizar una proteína de membrana de forma que ésta conserve en lo posible su estructura nativa hay que utilizar un medio de solubilización que se asemeje lo más posible al medio de la proteína en la interfase lípido/agua. Debido a que los detergentes poseen una zona hidrófila y otra hidrófoba, como los lípidos de membrana, se utilizan en la solubilización de estas proteínas para procurar la preservación de la estructura proteica (Tanford y Reynolds, 1976).

TABLA II. 3.1

Clasificación de las sustancias anfifílicas según su solubilidad en agua y su comportamiento.

CLASE	COMPORTAMIENTO GENERAL	EJEMPLOS
Insolubles no hidratables	Insolubles en agua	Triacilglicéridos Diacilglicéridos Colesterol Acidos grasos de cadena larga
Insolubles hidratables	Cristales-líquidos (ej. bicapas)	Fosfolípidos Monoacilglicéridos Ciertos glicolípidos
Solubles con mesomorfismo liotrópico	Micelas por encima de su CMC, cristales líquidos a altas concentraciones	Muchos detergentes Lisolecitina Gangliósidos
Solubles sin mesomorfismo liotrópico	Micelas por encima de su CMC	Sales biliares Saponinas Cloropromazina

II. 3.2. Clasificación

Los detergentes pueden presentar carga iónica en la zona hidrófila, utilizándose esta característica como criterio de clasificación (ver Tabla II. 3.2).

Otro criterio para su clasificación es la naturaleza de su zona hidrofóbica, bien alifática o bien aromática. Así, los detergentes que presentan su zona hidrofóbica de naturaleza alifática o arilalifática se incluyen en el grupo A, mientras que los que la tienen de naturaleza policíclica aromática entran dentro del grupo B (Tabla II. 3.2). Los detergentes del grupo A forman micelas por encima de su CMC y cristales líquidos a altas concentraciones (dando lugar a estructuras cúbicas, hexagonales o laminares); los del grupo B forman únicamente micelas por encima de su CMC.

La diferencia más notable entre las estructuras de los detergentes es que la zona polar de los no iónicos es mucho mayor que la de los iónicos. Una característica de las sales biliares es que el anillo de ciclopentanofenantreno del que derivan, posee una cara con carácter hidrofílico y la otra hidrofóbica.

II. 3.3. Concentración micelar crítica

Todos los detergentes poseen una capacidad para formar en agua unas estructuras denominadas micelas. Las micelas se pueden definir como agregados coloidales termodinámicamente estables, que forman las moléculas de detergente espontáneamente al sobrepasar un límite de concentración característico de cada especie, lo que se conoce como su concentración micelar crítica (CMC), a temperaturas por encima de la temperatura micelar crítica (temperatura mínima a la cual se pueden formar micelas). A temperaturas

TABLA II. 3.2

Clasificación de los detergentes según la naturaleza de la zona hidrofóbica y de la zona hidrofílica. Los valores de CMC que se dan en la Tabla corresponden a valores obtenidos en agua destilada entre 20 °C y 25 °C.

Grupos	Subgrupos	Ejemplos	CMC (mM)	Peso micelar
<u>GRUPO A</u>	Aniónicos	Decilsulfato sódico	33,0	14.000
		Dodecilsulfato sódico	8,2	18.000
		Dodecilsulfonato sódico	9,8	15.000
	Catiónicos	Bromuro de cetiltrimetil amonio	0,9	62.000
		Cloruro de dodecil amonio	15,9	12.000
	Anfolíticos	Lisofosfatidilcolina		92.000
		Dodecil-N-betaína	0,8	26.000
		Chaps	1,4	6.150
	No iónicos	Triton X-100	0,2	90.000
		Octilglucósido	23,0	8.000
		Polioxietilenos		
	<u>GRUPO B</u>	Sales biliares	Colato sódico	14,0
Desoxicolato sódico			5,0	3.000
Saponinas		Digitonina		

bajas el detergente forma cristales insolubles, en los que tanto la región hidrocarbonada de la molécula de detergente como la hidrofílica se encuentran ordenadas. A estas temperaturas hay una concentración de monómeros, por debajo de la CMC, en equilibrio con los cristales, y esta concentración de monómeros va aumentando conforme aumenta la temperatura. Cuando se alcanza la temperatura micelar crítica la concentración de monómeros en equilibrio llega al valor de la CMC, se comienzan a formar micelas produciéndose entonces un súbito aclaramiento de la disolución de detergente.

La CMC depende de la naturaleza del detergente, de la fuerza iónica del medio y de la temperatura (Tanford, 1974). La CMC disminuye al aumentar el carácter hidrofóbico del detergente y aumenta tanto con la presencia de dobles enlaces como con la ramificación en las cadenas alifáticas.

Asímismo, los grupos hidrófilos se oponen a la formación de micelas, por lo que debido a sus grupos cargados los detergentes iónicos presentan unas CMC del orden de 100 veces mayores que las de los no iónicos. La fuerza iónica favorece la formación de micelas debido a la reducción de las repulsiones electrostáticas entre las zonas polares.

El tamaño y forma de las micelas dependen de la naturaleza del detergente y de las condiciones del medio. En general, a valores bajos de CMC en los detergentes no iónicos corresponden agregados de elevado peso micelar, mientras que a valores altos de CMC de detergentes iónicos corresponden agregados de bajo peso micelar (Helenius y Simons, 1975). Las propiedades de los detergentes del grupo A (ver Tabla II. 3.2) sugieren que sus micelas adquieren formas esféricas; sin embargo, los requerimientos espaciales de sus grupos polares y el volumen y longitud de sus grupos apolares indican que la mayoría de dichas micelas han de tener un aspecto elipsoidal para poder acomodar el número de moléculas que contienen. Los detergentes del grupo B (ver Tabla II. 3.2) difieren mucho de los del grupo A, en especial las sales biliares. En éstas, los grupos polares se encuentran distribuidos por

diferentes partes de la molécula y no hay una "cabeza polar" muy bien definida; como se dijo anteriormente, sus grupos hidroxilos se encuentran orientados hacia uno de los lados de la estructura cíclica, presentando una cara polar y la otra apolar. En disolución acuosa las sales biliares forman pequeños agregados que interaccionan a través de sus superficies hidrofóbicas.

II. 3.4. Solubilización de membranas

La CMC de los detergentes afecta directamente a su capacidad para la solubilización de las membranas y a la posterior reconstitución de las proteínas solubilizadas. Debido a la dificultad a la hora de medir la concentración de detergente que interacciona con la membrana, no es fácil relacionar directamente la CMC de un detergente con su capacidad para solubilizar membranas (Reynolds, 1982). De esta forma, el método más efectivo para optimizar la solubilización, a la vez que se preserva la actividad de la proteína, es hacer un estudio de solubilización en un amplio intervalo de relación detergente/lípido. Como el grado de solubilización depende tanto de la concentración de lípidos como de la CMC, es útil conocer la concentración efectiva del detergente. Así, Rivnay y Metzger (Rivnay y Metzger, 1982) han descrito un parámetro (τ) para medir esta concentración:

$$\tau = \frac{[\text{Detergente}] - \text{CMC}_{ef}}{[\text{Fosfolípido}]}$$

La CMC_{ef} , o concentración micelar crítica efectiva, se refiere a la CMC medida en unas condiciones experimentales específicas, ya que la CMC suele disminuir en presencia de lípidos y proteínas, aunque frecuentemente en la práctica se usan para la CMC_{ef} los valores de CMC. El parámetro τ da una idea de la relación molar entre la concentración de detergente en forma micelar y la concentración de fosfolípido utilizada. Por lo general, al aumentar τ aumentará el grado de solubilización, aunque también aumenta el riesgo de desnaturalización de la proteína.

Al añadir pequeñas cantidades de detergente a una disolución que contenga membranas se producirá un equilibrio entre moléculas de detergente en forma de monómero libre y moléculas interaccionando con la membrana, incluidas en la bicapa fosfolipídica o interaccionando con las proteínas. Esta interacción de las moléculas de detergente con la membrana produce cambios en las propiedades de la misma, como cambios en la permeabilidad, lisis, fusión entre membranas, etc. A medida que se aumenta la concentración de detergente la membrana se va saturando de estas moléculas. Cuando se alcanza el punto de saturación la membrana comienza a solubilizarse formando micelas mixtas de proteína-fosfolípido-detergente (Helenius y Simons, 1975).

Un paso posterior a la solubilización de la proteína de membrana es la reconstitución de aquélla. Para este paso se necesita eliminar y sustituir el detergente unido a la proteína por fosfolípidos naturales o sintéticos. La CMC del detergente juega un papel muy importante en la reconstitución, ya que cuanto mayor sea esta concentración más fácil será eliminar el detergente y su sustitución por vesículas lipídicas. Se han desarrollado muchos métodos de reconstitución ya que cada proteína de membrana tiene unas características muy

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

particulares y los métodos de reconstitución no son igualmente aplicables a todas ellas. Una revisión de los métodos más generales es la realizada recientemente por Jones y colaboradores (Jones et al., 1987).

III. MATERIALES Y METODOS

III. 1. MATERIALES

III. 1.1. Reactivos

La sacarosa utilizada en la obtención de membrana mielínica era de Panreac. El cloruro sódico, cloruro potásico, fosfato sódico, pirofosfato sódico, glicina y acetato sódico utilizados fueron de Merck. Los detergentes para solubilizar la mielina: Triton X-100, desoxicolato sódico, colato sódico, n-octil β -D-glucósido y 3-[(3-colamido propil) dimetilamonio] 1-propano sulfonato (Chaps) se obtuvieron de Sigma. Las resinas cromatográficas: *Sephacryl S-300*, *Blue Sepharose CL-6B* y *CM-Sephadex C-50* pertenecían a Pharmacia; las resinas adsorbentes que se utilizaron para la eliminación del Triton X-100 fueron *Bio-Beads SM-2* de la casa Bio-Rad y *Extracti-Gel D* de la casa Pierce. Para la realización de electroforesis se utilizó acrilamida, Coomassie Brilliant Blue R y Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) de la casa Sigma, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) de BDH y dodecilsulfato sódico (SDS) de Fluka; las proteínas usadas como patrones de movilidad electroforética eran un kit proporcionado por la casa Sigma. Para la determinación de proteínas se usó carbonato sódico, hidróxido sódico, sulfato cúprico, tartrato sódico-potásico y reactivo de Folin-Ciocalteus de Merck; el citrato sódico era de la casa Probus y la seroalbúmina bovina de Sigma. En el análisis de lípidos se utilizó heptamolibdato amónico, sulfito sódico, bisulfito sódico y ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANSA) de Merck. Para la determinación de colesterol se empleó un kit proporcionado por la casa Sigma; el colesterol empleado en esta Memoria también se obtuvo de Sigma; el ácido

perclórico y el ácido sulfúrico de Panreac; el silicagel G (tipo 60) para la cromatografía en capa fina era de Merck. Los disolventes orgánicos cloroformo y metanol eran de Panreac; el éter etílico y el benceno se obtuvieron de Quimon.

III. 1.2. Material biológico

Se ha utilizado sustancia blanca de cerebro vacuno de animales recién sacrificados. La extracción de esta sustancia blanca se ha efectuado a 4°C con la menor demora posible y una vez finalizada la operación, se ha utilizado bien directamente para la obtención de membrana mielínica, o bien se ha almacenado congelándose a -20°C para su posterior utilización.

Antes de la extracción de sustancia blanca, se ha procedido siempre al lavado del cerebro introduciéndolo en una disolución al 9% (p/v) de cloruro sódico. Durante el proceso, la sustancia blanca que se va extrayendo se sumerge en una disolución de igual composición que la anterior, hasta su utilización para obtener membrana mielínica o hasta su congelación para su almacenamiento.

III. 1.3. Instrumentación

Para la obtención de membrana mielínica se utilizó una ultracentrífuga L5-40 de Beckman con un rotor tipo Ti-35 de la marca Beckman, mientras que para la reconstitución del proteolípido (PLP) se utilizó esta centrífuga con un rotor tipo Ti-70 o SW-65 de la misma casa.

El colector de fracciones conectado a las columnas de cromatografía era Buchler LC100 de Hucoa-ErlÖs. Las bombas peristálticas utilizadas eran de la casa LKB.

Las medidas de absorción para las diferentes determinaciones bioquímicas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman 55 de la casa Perkin Elmer, de medida puntual.

Para las medidas de pH se empleó un electrodo combinado Ingold junto con un pH-metro Crison 501, siendo su sensibilidad de $\pm 0,01$ unidades de pH. Para ajustar el electrodo se usaron tampones de referencia de pH 7,0 y pH 4,0 de la marca Crison.

El aparato de electroforesis utilizado era de Bio-Rad y estaba alimentado por una fuente de tensión constante de la casa Arrosu Radio.

Las medidas de densitometría de los geles electroforéticos se realizaron en un espectrofotómetro DU-70 de la casa Beckman.

Para realizar los experimentos de análisis térmico en gel de poliacrilamida (ATG) se diseñó y construyó un sistema programador de temperaturas basado en la utilización de un baño de agua completamente rodeado de poliestireno expandido como material termoaislante, con el objeto de obtener unas condiciones de cuasi adiabaticidad. Se utilizaron rampas lineales de voltaje, generadas por un contador binario y digital-analógico (López-Mayorga, 1983), para crear barridos de temperatura en el tiempo. Esta señal, a su vez, es utilizada por un controlador proporcional de la potencia suministrada al baño como señal de referencia o función de control, de forma que la temperatura se ajuste a rampas lineales cuya pendiente puede seleccionarse sobre un amplio intervalo de valores. Las muestras, en tubos eppendorf modificados para una fácil manipulación, estaban en íntimo contacto con el agua del baño

de forma que, a las velocidades de barrido del trabajo, la temperatura de las muestras se encontrase muy próxima a la temperatura del agua del baño.

Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido (CDB) se realizaron en dos modelos de calorímetros diferenciales de barrido de alta sensibilidad diseñados por Privalov (Privalov, 1980): DASM-1M y DASM-4. Ambos microcalorímetros se interficiaron a ordenadores Inves PC-640X a través de conversores, usando para ello el sistema de entradas/salidas analógico/digital de Data Translation DT-2801. Los datos, digitalizados con un período de muestreo dependiente de la velocidad de barrido y filtrados por promedio numérico, se almacenaban sobre discos flexibles en archivos de datos secuenciales. El análisis de éstos se realizó a tiempo diferido mediante programas de análisis calorimétrico diseñados por el Dr. E. Freire.

Los experimentos de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier se han llevado a cabo en un modelo 20SXB FT-IR de la casa Nicolet conectado a un minicomputador Nicolet 1280 perteneciente a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Este aparato presenta el espejo móvil sustentado por un colchón de aire para que la fricción sea mínima. La velocidad utilizada para el espejo móvil fue de 0,5 cm/s, consiguiéndose una resolución en el espectro de 2 cm^{-1} . El detector es de sulfato de triglicina deuterada. Todos los experimentos se han realizado en disolución acuosa por lo que se han recogido 400 espectros para cada experiencia para mejorar la relación señal/ruido. Las muestras se han introducido en una célula de temperatura variable P/N 21500 de Specac con separadores de $6 \mu\text{m}$ de grosor. La temperatura de la célula se ha regulado mediante un controlador automático de temperatura de la casa Specac diseñado para este tipo de célula. Para evitar el vapor de agua, el aparato se ha purgado constantemente con aire que es pasado

previamente por un secador de adsorción *Ecody* de la marca Zander.

Parte de la experimentación de espectroscopía infrarroja se ha desarrollado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad del País Vasco. El espectrofotómetro utilizado en estos experimentos es un Nicolet 520 conectado directamente a un ordenador PC. El espejo móvil se haya suspendido por un colchón de aire. El detector de la señal es de sulfato de triglicina deuterada. La resolución de los espectros obtenidos en esta Memoria es de 2 cm^{-1} . En cada experimento se han recogido 300 barridos y, antes de cada experimento de muestra o de referencia, se ha realizado el espectro de fondo correspondiente a ese momento mediante el uso de una lanzadera en la cámara de muestra. Para evitar el vapor de agua se ha purgado constantemente el aparato con aire seco, que previamente se pasaba por un secador de adsorción *Ecody* de la marca Zander.

La posibilidad de pasar los espectros obtenidos en el FT-IR del Departamento de Bioquímica a un ordenador PC, ha permitido la utilización de programas adecuados para calcular la cuarta derivada y la autodeconvolución de Fourier de los espectros, permitiendo distinguir los diferentes componentes de la banda amida I. Por este motivo, la mayoría de los experimentos sobre la estructura proteica de las muestras mielínicas se ha realizado en el aparato de FT-IR del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad del País Vasco, mientras que el estudio sobre los cambios observados en la parte lipídica de la mielina, y en sistemas derivados de la mielina obtenidos aquí durante los procesos de purificación, se ha realizado fundamentalmente con el FT-IR de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

III. 2. METODOS

III. 2.1. Aislamiento de la membrana mielínica

La membrana mielínica se ha obtenido a partir de sustancia blanca de cerebro vacuno siguiendo el método descrito por Toews y colaboradores (Toews et al., 1976) aunque introduciendo ligeras modificaciones. El método seguido se basa fundamentalmente en dos propiedades que presenta esta membrana:

- El hecho de que al homogeneizar la sustancia blanca en una disolución de sacarosa isotónica con el medio fisiológico y de baja fuerza iónica la mielina se desprende del axón y forma vesículas libres. Si existe presencia de iones en la disolución de homogeneización los axones se separan intactos del homogenado y no se desprende la mielina.

- Estas vesículas que se forman, debido a su alta relación lípido/proteína, presentan la densidad más baja de entre todas las fracciones de membrana del sistema nervioso.

Así, mediante una serie de centrifugaciones diferenciales, esquematizadas en la Figura III. 2.1, obtenemos el aislamiento de la membrana mielínica.

Después de la segunda centrifugación en sacarosa 0,85 M, la banda flotante de membrana mielínica se lava para eliminar la sacarosa. Para ello se resuspende dicha banda en una disolución tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se somete a una centrifugación de 25 minutos a 20.000 x g. El sedimento obtenido de esta centrifugación se resuspende de nuevo en el tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se vuelve a realizar el proceso dos veces más. Finalmente, el último sedimento se resuspende en un volumen

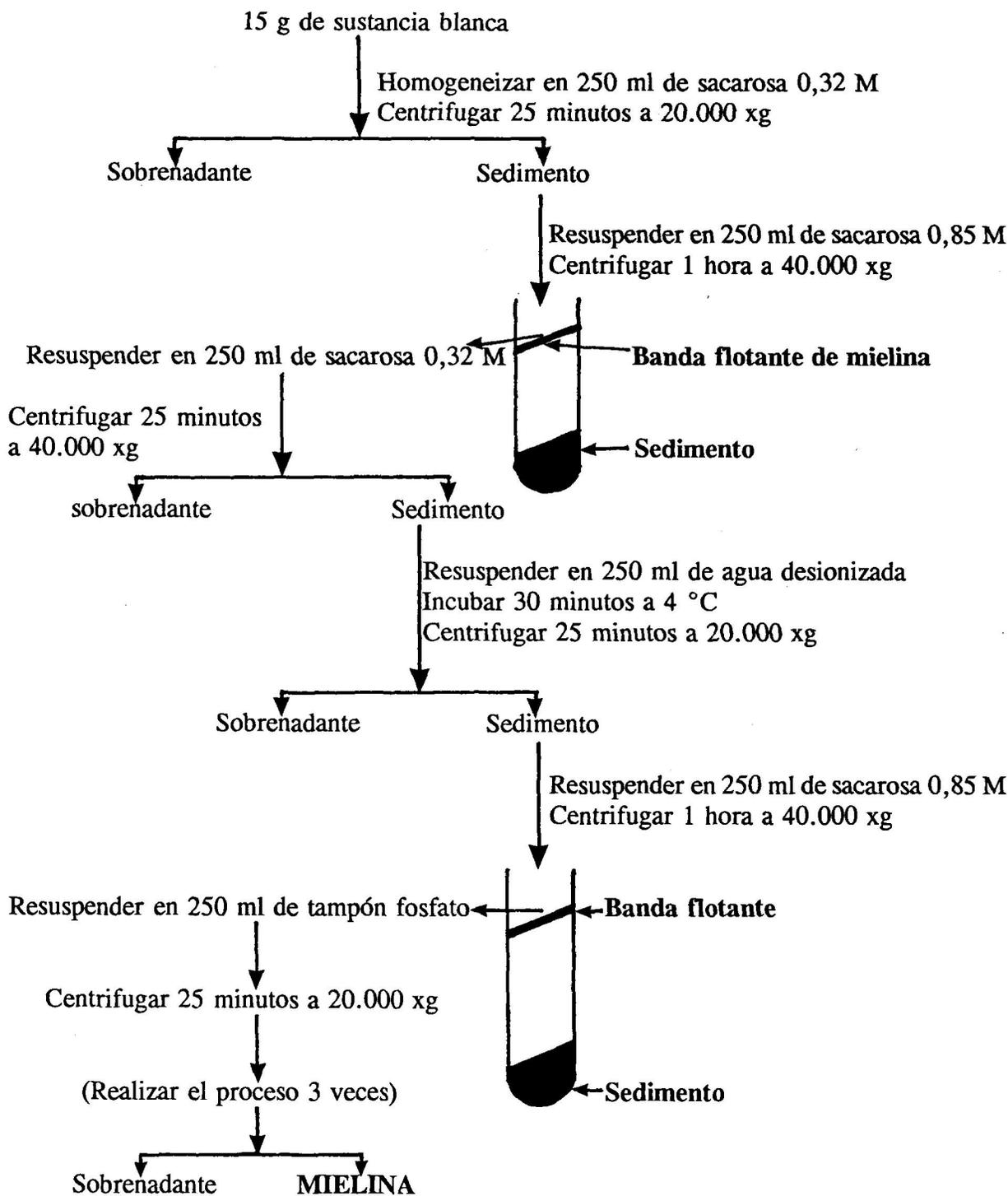


FIGURA III. 2.1: Esquema del procedimiento de aislamiento de la membrana mielínica a partir de sustancia blanca de cerebro vacuno, basado en el método desarrollado por Toews y colaboradores (Toews et al., 1976).

determinado (entre 20 y 40 ml) de este tampón. La mielina así obtenida se almacena a 4 °C en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), a no ser que se especifique de otra manera.

La pureza de la mielina que se obtiene mediante este procedimiento se ha comprobado por microscopía electrónica mediante contraste negativo, obteniéndose resultados satisfactorios y concordantes con la bibliografía (Raine, 1984) como puede observarse en las Figuras III. 2.2 y III. 2.3.

III. 2.2. Purificación de proteínas por disolventes orgánicos

De las diferentes variaciones que existen para la purificación del proteolípido de mielina (PLP) mediante disolventes orgánicos (Gagnon et al., 1971; Nicot et al., 1973; Monreal, 1975; Lees y Sakura, 1978; Aguilar et al., 1983), se ha seguido la utilizada por Monreal (Monreal, 1975) ya que fue la empleada en el estudio por CDB del PLP (Mateo et al., 1986) que se quería corroborar y ampliar como parte de esta Memoria.

Se parte para ello de toda la sustancia blanca extraída de un cerebro vacuno (aproximadamente 60 g), añadiéndole 600 ml de la mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v). Se homogeniza con una trituradora y se filtra por papel de filtro en un embudo de placa porosa, llevando el volumen final a 600 ml con cloroformo:metanol (2:1 v/v). A esta disolución se le añaden 300 ml de cloruro potásico 0,1 M y se agita suavemente, para no formar demasiado emulsionado, a 4 °C durante 4 horas. Posteriormente, se decanta la fase orgánica y se vuelve a llevar el volumen a 600 ml con cloroformo:metanol (2:1 v/v). Se añaden otros 300 ml de cloruro potásico 0,1 M repitiéndose la operación anterior, aunque esta vez se deja incubando toda la noche a 4 °C.

Una vez decantada la fase orgánica y llevado el volumen a 600 ml se lava dos veces



FIGURA III. 2.2: Micrografía electrónica, por contraste negativo mediante tinción con ácido fosfotúngstico al 2%, de la mielina obtenida en esta Memoria basándose en el método de Toews y colaboradores (Toews et al., 1976). El microscopio utilizado es un TEM 902 de la marca Zeiss perteneciente a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. La distancia del segmento situado en la base de la figura indica la magnificación de la micrografía y corresponde a $0,82 \mu\text{m}$.



FIGURA III. 2.3: Otro aspecto de la mielina obtenida en esta Memoria. Las condiciones son las mismas que las descritas en la Figura III. 2.2. En esta micrografía electrónica se puede apreciar la disposición en multicapas de la membrana mielínica. El segmento situado en la base de la figura corresponde a $0,82 \mu\text{m}$.

con 120 ml de agua destilada, agitando muy suavemente el embudo de decantación. La fase orgánica resultante del último lavado se concentra a 150 ml en rotavapor. A este concentrado se le añaden 450 ml de éter:etanol (1:1 v/v), enfriado previamente a -20 °C, y se incuba la mezcla durante toda la noche a -20 °C con el fin de que precipite la fracción proteolipídica.

Esta mezcla se centrifuga a 7.000 xg durante 20 minutos. El precipitado se disuelve en los mismos tubos de centrifugación con éter:etanol (1:1 v/v) a -20 °C, volviéndose a centrifugar a 7.000 xg durante 20 minutos. Se recoge el precipitado final y se disuelve en el volumen necesario de cloroformo:metanol (2:1 v/v).

Posteriormente se liofiliza, para lo cual se añaden 7 volúmenes de benceno enfriado a -20 °C a la disolución de cloroformo:metanol, lo cual eleva el punto de fusión de esta última y permite la correcta liofilización de la muestra. El liofilizado se conserva a -20 °C hasta su utilización.

III. 2.3. Purificación de proteínas por detergentes

Los métodos de purificación por detergentes utilizados en este trabajo se han basado inicialmente en los realizados por Smith (Smith, 1977 y Smith et al., 1984) y por Riccio y colaboradores (Riccio et al., 1985), aunque se les han introducido considerables mejoras que se explicarán en el Apartado de Resultados (IV. 3).

Un esquema general del método de purificación para ambas proteínas podría ser el que a continuación se describe (Figura III. 2.4):

La membrana mielínica obtenida a partir de sustancia blanca, como ya se ha descrito anteriormente, se mezcla con una disolución del detergente apropiado en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se agita durante 90 minutos a 4 °C. Posteriormente se centrifuga la mezcla

a 20.000 xg durante 30 minutos, obteniéndose un sobrenadante, en el cual se encuentra la mielina solubilizada.

Este solubilizado, sin previa concentración, se pasa por una columna de cromatografía de intercambio iónico, o bien por una de afinidad y otra de extrusión en gel, según los casos. Se eluye la proteína con el eluyente adecuado y, si es necesario, se aumenta la fuerza iónica de éste con cloruro sódico.

Se recoge la elución mediante un colector de fracciones, detectando la existencia de proteína mediante medidas de la densidad óptica a 280 nm. Posteriormente se determina la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) modificado (Wang y Smith, 1975).

Por último, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PA) de las fracciones más relevantes para localizar la proteína a purificar y su grado de pureza.

III. 2.4. Reconstitución

Una vez purificada la proteína se procede a la eliminación del detergente en que se encuentra y a su reconstitución en lípidos. Fundamentalmente se ha reconstituido el PLP, mientras que la PBM se ha reconstituido o simplemente se ha eliminado el detergente. El proceso utilizado es muy similar para ambas, basándose en la eliminación por diálisis del detergente que presenta la disolución de proteína y su sustitución por lípidos. Anteriormente al uso de este método de reconstitución se han probado otros métodos que se explicarán detenidamente en el Apartado de Resultados correspondiente (Apartado IV. 4).

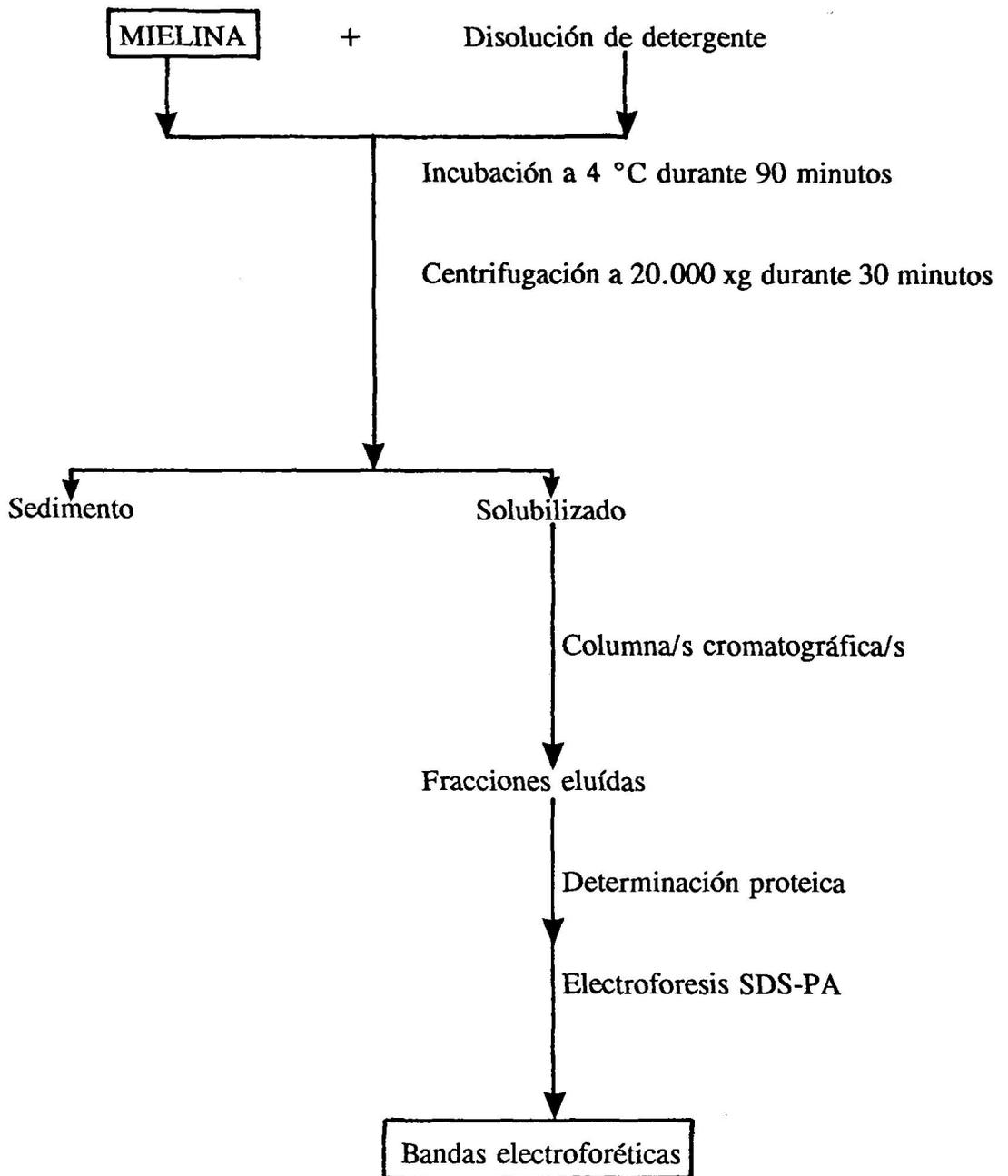


Figura III. 2.4: Esquema general de la purificación del PLP y de la PBM mediante el uso de detergentes.

III. 2.5. Técnicas de purificación y análisis bioquímico

III. 2.5.1. Análisis de concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína se ha utilizado el método de Lowry (Lowry et al., 1951) modificado (Wang y Smith, 1975), que se basa en la medida del color resultante de la reacción del Biuret de los enlaces peptídicos con el cobre en medio alcalino y de la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteus (fosfomolibdico-fosfowolfrámico) por las tirosinas y triptófanos.

Reactivos:

Disolución A: Na_2CO_3 al 2% (p/v) en NaOH 0,1 M.

Disolución B₁: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% (p/v).

Disolución B₂: Tartrato sódico-potásico al 2% (p/v).

Disolución C: Se prepara mezclando las disoluciones A, B₁ y B₂ en la proporción 100:1:1 (v/v). Esta disolución se desecha después de un día de su preparación.

Disolución D: Triton X-100 al 5% (p/v).

Disolución E: SDS al 10% (p/v).

Disolución F: Reactivo de Folin-Ciocalteus. La disolución comercial se diluye con agua destilada en la relación 1:1 en el momento de su utilización.

Procedimiento:

Se toma una cantidad de muestra de la disolución proteica que contenga

entre 50 y 150 μg de proteína. Se añaden 100 μl de disolución D y se completa el volumen hasta 1 ml con agua destilada. A continuación se añaden 5 ml de disolución C, se agita y se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añaden 1 ml de disolución E y 0,5 ml de disolución F. Se agita la mezcla hasta que ésta sea uniforme y se esperan 40 minutos, tras los cuales se mide la densidad óptica a 750 nm.

Para la curva patrón se utilizó una disolución de seroalbúmina bovina (1 mg/ml), de la cual se tomaban alícuotas de 50, 100 y 150 μl .

La modificación del método (Wang y Smith, 1975) estriba en la adición de un exceso de Triton X-100, el cual no desarrolla color hasta una concentración del 2% (v/v), para evitar interferencias de los detergentes no iónicos y catiónicos con el método. A su vez, la adición de SDS es para evitar la precipitación que ocurre al interaccionar el Triton X-100 con el reactivo de Folin-Ciocalteus.

III. 2.5.2. Análisis de concentración de lípidos

III. 2.5.2.1. Determinación de fosfolípidos

Se ha determinado la concentración de fosfolípidos a través del análisis de fósforo inorgánico; para ello es preciso convertir todo el fósforo orgánico de la muestra en fósforo inorgánico. Para tal conversión se ha utilizado ácido perclórico que a reflujo oxida los fosfolípidos produciendo desprendimiento de fósforo inorgánico.

El fósforo inorgánico se ha determinado mediante el método de Bartlett (Bartlett,

1959) que se basa en la reacción del fósforo inorgánico en medio alcalino con el molibdato, originando el anión fosfo-molibdato, el cual se reduce con ANSA formando estequiométricamente un complejo de color azul.

Reactivos:

Disolución A: Heptamolibdato amónico al 5% (p/v).

Disolución B: HClO_4 al 60% (p/v).

Disolución C: ANSA al 0,25% (p/v) y Na_2SO_3 al 0,5% (p/v) en una disolución de NaHSO_3 al 15% (p/v). Esta disolución se conoce como reactivo de Fiske y se prepara disolviendo poco a poco las dos primeras sustancias en la disolución de bisulfito sódico. Se filtra y se deja reposar una noche en el congelador después de su preparación. Luego se almacena a 4°C al abrigo de la luz.

Procedimiento:

Se añade una cantidad de muestra que contenga de 2 a 8 μg de fósforo y se evapora hasta sequedad. Para digerir el fósforo se añaden a la muestra evaporada 1,2 ml de disolución B y dos gotas de disolución A. El tubo se tapa con una bola de vidrio y se calienta durante 1 hora entre 180 y 200 $^\circ\text{C}$.

Una vez realizada la digestión del fósforo orgánico en inorgánico se procede a la determinación colorimétrica. Cuando el tubo se ha enfriado se le añaden 0,4 ml de disolución A, 0,4 ml de disolución C y 8 ml de agua destilada. Se mezcla por inversión del tubo y éste se introduce en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Una vez que se ha enfriado el tubo se lee la densidad óptica a 830 nm.

La curva patrón se ha realizado añadiendo 10, 20, 30 y 40 μ l de una disolución de fosfato sódico, previamente desecado en estufa a 120 °C, que contenga 0,2 mg de fósforo inorgánico/ml (6,45 mM).

III. 2.5.2.2. Determinación de glicolípidos

Se ha determinado la concentración de glicolípidos, en su mayoría cerebrósidos y sulfátidos, indirectamente mediante determinación de hexosas por una modificación del método del ácido sulfúrico-fenol propuesta por Kushwaha y Kates (Kushwaha y Kates, 1981). Este método se basa en que los azúcares en presencia de ácidos concentrados sufren una deshidratación dando lugar a furfurales (derivados aldehídicos del furano), y estos últimos pueden condensarse en fenoles dando productos coloreados.

Reactivos:

Disolución A: Fenol al 5% (p/v).

Disolución B: Acido sulfúrico concentrado.

Procedimiento:

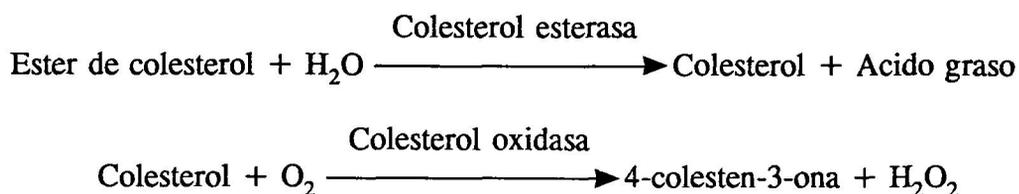
Se toma una alícuota de la muestra que contenga entre 30 y 60 μ g de hexosas y se lleva a sequedad, obteniéndose en el fondo del tubo una fina capa lipídica. Posteriormente se añaden al tubo 2 ml de agua y 1 ml de disolución A y se mezcla intentando no alterar la capa lipídica. Una vez realizada la mezcla, se añaden 5 ml de disolución B y se vuelve a mezclar hasta homogeneidad. Por último se introduce el tubo durante 5 minutos en agua hirviendo para desarrollar el color. Cuando se haya enfriado (después de 30

minutos) se procede a leer la densidad óptica a 490 nm.

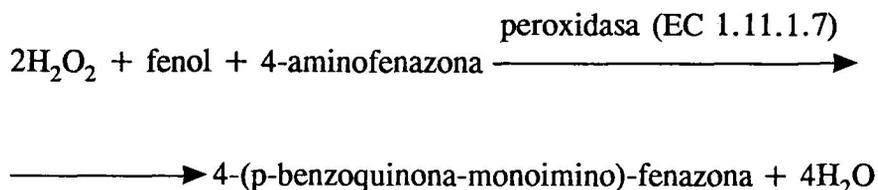
Para realizar la curva patrón se ha utilizado una disolución de glucosa (1 mg/ml), tomando 20, 40 y 80 μ l para los diferentes puntos de referencia.

III. 2.5.2.3. Determinación de colesterol

Para la determinación del colesterol se ha utilizado un kit de colesterol de la marca Sigma, el cual se basa en un ensayo enzimático (Allain et al., 1974; Siedel et al., 1983). Este método se basa en la ruptura de los ésteres de colesterol por la colesterol esterasa (EC 3.1.1.13) dando colesterol libre, el cual por oxidación mediante la colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6) produce H_2O_2 :



Este H_2O_2 se puede medir cuantitativamente para conocer la cantidad de colesterol en la muestra, mediante la reacción:



donde se obtiene como producto 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona que presenta un máximo de absorción a 500 nm. La intensidad del color obtenido es directamente proporcional al total de colesterol de la muestra en un intervalo entre 10 y 60 μg de colesterol.

III. 2.5.3. Extracción de lípidos

Para la extracción de lípidos, tanto de sustancia blanca como de mielina, se ha utilizado la técnica de Santiago y colaboradores (Santiago et al., 1964) que se emplea para la extracción total de lípidos de tejidos animales y de sus fracciones subcelulares.

En un tubo de centrífuga se dispone una cantidad de la muestra, previamente homogeneizada, o de la disolución de muestra que contenga entre 10 y 15 mg de proteína. Se añade un volumen igual de ácido perclórico frío 0,6 M, lo cual produce la precipitación de los complejos lipoproteicos, que se separan centrifugando en una centrífuga de mesa (en nuestro caso de la casa Selecta) a la máxima velocidad durante 15 minutos. Queda un sobrenadante limpio que se elimina por decantación.

El precipitado se resuspende y se le añaden 2,5 ml de cloroformo:metanol:ácido clorhídrico concentrado (200:100:1 v/v) frío. Se deja 30 minutos a temperatura ambiente, agitando de vez en cuando. Posteriormente, se añaden 7 ml de ácido clorhídrico 0,1 M frío, se mezcla bien el contenido del tubo y se centrifuga de nuevo en la centrífuga de mesa, esta vez durante 20 minutos. Después de la centrifugación, se elimina la fase acuosa y se guarda la fase orgánica. La interfase proteínica que se obtiene se somete a un nuevo tratamiento con 2,5 ml de la mezcla de disolventes anterior y, tras agitación vigorosa, se añaden otros 7 ml de ácido clorhídrico 0,1 M frío y se centrifuga en las mismas condiciones ya descritas. La nueva fase orgánica se une a la anterior y juntas forman el extracto lipídico, que se evapora

con rotavapor y se tiene una noche en desecador con vacío.

Se comprobó que estos extractos lipídicos estaban libres de proteínas mediante cuantificación proteica por el método de Lowry modificado (Wang y Smith, 1975).

III.2.5.4. Cromatografía en capa fina para análisis de lípidos

Se ha utilizado cromatografía en capa fina, tanto unidimensional como bidimensional, para el análisis cualitativo de diferentes muestras de extractos lipídicos.

Para ello, se utilizan placas de vidrio con un soporte cromatográfico de silica gel G (tipo 60). Antes de su utilización se activan en estufa a 100 °C durante 1 hora, para eliminar las moléculas de agua del soporte. Una vez pinchada la muestra en un extremo, se introduce la placa en una cámara cromatográfica que contenga la mezcla de disolventes adecuada.

En el caso de cromatografía unidimensional la placa se desarrolla en una mezcla de cloroformo:metanol:agua (65:25:4 v/v), lo cual sirve para separar los diferentes tipos de fosfolípidos que contenga la muestra (Neskovic y Kostic, 1968). Para la cromatografía bidimensional se sigue el método empleado por Rouser y colaboradores (Rouser et al., 1970) que desarrolla la placa primeramente en una mezcla de cloroformo:metanol:amoníaco (65:25:4 v/v), mientras que para el desarrollo en la segunda dimensión, perpendicular a la anterior, utiliza cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua (6:8:2:2:1 v/v).

El revelado de las placas para la detección de las manchas lipídicas se ha realizado bien por inmersión de la placa en una cámara con vapores de yodo, o bien rociándola con una disolución concentrada de ácido sulfúrico y posterior calentamiento de la placa para desarrollar el color.

III. 2.5.5. Cromatografía en columna

Para la purificación del PLP y de la PBM mediante detergentes se han utilizado diversas técnicas de cromatografía en columna. En todas ellas los geles se han equilibrado con una disolución tampón que contenía siempre una concentración relativamente baja del detergente en que se encontraba la proteína a purificar. Tanto el eluyente como el gel hidratado se desgasifican antes de empaquetar la columna, especialmente para el caso de la cromatografía de exclusión en gel.

La columna empaquetada se conecta a una bomba peristáltica para regular el flujo de la elución, y ésta, a su vez, se conecta a un colector de fracciones para recoger la elución automáticamente en fracciones iguales.

III. 2.5.5.1. Cromatografía de afinidad

Para seguir el método empleado por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984) en la purificación del PLP cuando la mielina se solubiliza con desoxicolato sódico al 2% (p/v), se ha utilizado en un primer paso *Blue Sepharose CL-6B* para eliminar gran parte de la Fracción Wolfgram y de la PBM. Se ha observado que la Fracción Wolfgram se une específicamente a esta resina mediante el ligando que tiene unida a la matriz, Cibacron Blue F3G-A, mientras que la PBM se une en gran medida de manera inespecífica a esta resina. El procedimiento seguido se explica a continuación:

La resina, equilibrada en tampón 50 mM de pirofosfato sódico, 0,5% (p/v) de desoxicolato sódico (pH 9,0), se empaqueta en una columna de 23 x 1 cm de diámetro. Se introduce en la columna el solubilizado de mielina obtenido con desoxicolato sódico. Posteriormente se eluye la columna con el mismo tampón, eluyéndose el PLP con otras

proteínas. Para eliminar la Fracción Wolfgram y la PBM retenidas en la resina, se eluye ésta con urea 6 M. Luego se vuelve a equilibrar la columna para posteriores usos.

Esta resina de afinidad también se ha empleado para la purificación de la PBM, tanto con colato sódico, como con Chaps. El método empleado en estos casos es similar al descrito previamente y se explica detenidamente en el Apartado de Resultados correspondiente (IV.3).

III. 2.5.5.2. Cromatografía de exclusión en gel

Este tipo de cromatografía se ha utilizado como segundo paso en la purificación del PLP mediante desoxicolato sódico, empleándose *Sephacryl S-300* en una columna de 90 x 2,4 cm de diámetro.

Esta cromatografía permite la separación de proteínas con respecto a su peso molecular, mediante el retardo en la elución de las de menor peso molecular debido al mayor camino recorrido por la matriz de la resina utilizada. Para una correcta separación se necesita una columna suficientemente larga, según las condiciones, y que la resina se empaquete uniformemente y sin burbujas de aire, por lo que se requiere la desgasificación de la resina y un especial cuidado en el empaquetamiento de la misma en la columna. También conviene, para una mayor resolución en la separación de las proteínas, que el flujo de la elución sea lento y constante; en nuestro caso se realizó a un flujo de 20 ml/hora mediante una bomba peristáltica.

Para que las fracciones eluidas no estén excesivamente diluídas, se concentra la muestra obtenida de la cromatografía de afinidad por ultrafiltración a través de una membrana YM-30 de Amicon. Este concentrado se introduce en la columna y, posteriormente, se eluye con tampón 50 mM de pirofosfato sódico, 0,5% (p/v) de desoxicolato sódico (pH 9,0).

III. 2.5.5.3. Cromatografía de intercambio iónico

Este tipo de cromatografía se ha utilizado para purificar tanto el PLP como la PBM con distintos detergentes. Se ha aprovechado la capacidad que presentan las proteínas que se quieren purificar de interaccionar con las cargas eléctricas de la matriz de la resina y quedar retenidas en la columna hasta que no se aumenta la fuerza iónica del tampón de elución. Debido a que inicialmente quedan retenidas no es necesario concentrar previamente el solubilizado de mielina.

Para purificar el PLP, tanto con Triton X-100 como con octilglucósido, se utilizó como resina *CM-Sephadex C-50*. Esta resina es un intercambiador catiónico ya que en la matriz presenta grupos carboximetilos, los cuales, al pH en los que presente carga negativa el extremo carboxílico, interaccionan débilmente con los grupos de las proteínas cargados positivamente a ese pH. Como los dos detergentes aquí empleados, Triton X-100 y octilglucósido, son no iónicos, no interfieren en las interacciones entre los grupos carboximetilos y las cargas positivas de las proteínas.

El *CM-Sephadex C-50* se equilibra con tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) que contiene una cantidad determinada del detergente utilizado, 0,25% (p/v) de Triton X-100 ó 1% (p/v) de octilglucósido, y se empaqueta en una columna de 20 x 2,5 cm de diámetro, para el caso del Triton X-100, o de 10 x 2,5 cm de diámetro, para el caso del octilglucósido. Como la proteína a purificar se queda retenida en la matriz en las condiciones de trabajo, no es necesario concentrar la muestra a cromatografiar y, así, se aplica directamente el solubilizado de mielina a la columna. Una vez aplicada la muestra, se eluye con el tampón con el que se ha equilibrado la columna para eliminar las proteínas no retenidas. Seguidamente, se aumenta en pasos discretos la fuerza iónica del tampón de elución, por adición al mismo de cloruro sódico, para debilitar las interacciones entre los carboximetilos y los

grupos catiónicos de las proteínas y, así, se eluyen las diferentes proteínas. El flujo de elución empleado es de 48 ml/hora, para el caso del Triton X-100, y de 36 ml/hora para el caso del octilglucósido. La elución se recoge mediante un colector en fracciones de 4 ml y de 3 ml respectivamente.

III. 2.5.6. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

Tanto en los experimentos de ATG como en los sucesivos pasos de purificación se han realizado electroforesis en geles de SDS-PA. Estas se han basado en el método de Laemmli y Farre (Laemmli y Farre, 1973) introduciendo ligeras modificaciones.

En todos los casos se ha utilizado la técnica de electroforesis discontinua (Ornstein, 1964) que permite una mayor resolución en la separación de las bandas de proteínas. Se basa, esencialmente, en la utilización de un gel de menor concentración de poliácridamida y diferente pH (gel apilador) donde se aplica la muestra, respecto del gel en el que se resuelven las bandas electroforéticas (gel separador). Mediante la elección adecuada de los tampones y valores de pH que se utilizan en ambos geles, se logra que las proteínas al pasar del gel apilador al separador, en la electroforesis, se dispongan en finísimas bandas ordenadas una sobre otra según sus movibilidades, aumentándose de esta manera la resolución de la técnica.

Reactivos:

Disolución A: Acrilamida al 29,2% (p/v) y TEMED al 0,8% (p/v). Esta disolución se filtra y se guarda a 4°C en oscuridad.

Disolución B: Tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8). Se almacena a 4°C.

Disolución C: Tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8). Se almacena a 4°C.

Disolución D: Tampón de disolución de la muestra. Se compone de: 1 ml de

disolución C, 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de SDS al 10% (p/v), 0,4 ml de 2-mercaptoetanol y 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,05% (p/v).

Disolución E: Tampón de desarrollo. Se compone de 1,5% (p/v) de Tris, 7,2% (p/v) de glicina y 0,5% (p/v) de SDS y se lleva a pH 8,3. Se diluyen 400 ml de esta disolución con 1600 ml de agua destilada para cada desarrollo.

Procedimiento:

Primeramente se prepara el gel separador (10 cm) al 12% de poliacrilamida: para 25 ml se mezclan 10,3 ml de disolución A, 6,25 ml de disolución B, 0,25 ml de SDS al 10% (p/v), 8,2 ml de agua destilada y desionizada, 0,125 ml de persulfato amónico al 10% (p/v) y 10 μ l de TEMED.

Una vez polimerizado el gel separador, se procede a añadir encima el gel apilador (2 cm) al 4% de poliacrilamida. Para 10 ml de gel apilador se mezclan 1,3 ml de disolución A, 2,5 ml de disolución C, 0,1 ml de SDS al 10% (p/v), 6,1 ml de agua destilada, 50 μ l de persulfato amónico al 10% (p/v) y 10 μ l de TEMED.

La muestra se mezcla con la disolución D en volúmenes iguales y se aplica al gel apilador un volumen (inferior a 50 μ l) que contenga unos 30 μ g de proteína. Se ha observado que si se calienta la muestra con la disolución D el proteolípido forma agregados (Cockle et al., 1978) que no penetran en el gel, desapareciendo la banda correspondiente a esta proteína. Así, las muestras se mezclan con la disolución D y se dejan 30 minutos incubando a temperatura ambiente antes de aplicarlas al gel, evitándose la formación de

dichos agregados.

Mientras la muestra atraviesa el gel apilador se aplica una intensidad de 16 mA por placa con la fuente de alimentación; una vez que ha pasado al gel separador se aumenta la intensidad a 24 mA por placa.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñen con una disolución de Coomassie Brilliant Blue R al 0,1% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v). Para la destinción se utiliza una disolución de metanol al 40% (v/v) y de ácido acético al 7% (v/v).

Para la conservación de los geles ya desteñidos y poder medir las intensidades de las bandas espectrofotométricamente, se introducen en una disolución de glicerol al 10% (v/v) y de metanol al 40% (v/v) durante 30 minutos; luego se plastifica el gel por las dos caras con papel de celofán.

En los casos que procede, se realizan las densitometrías de las diferentes calles en los geles plastificados midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro DU-70 de la casa Beckman, dotado con los accesorios necesarios para medidas densitométricas.

III. 2.6. Técnicas instrumentales

III. 2.6.1. Calorimetría diferencial de barrido

III. 2.6.1.1. Introducción

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) consiste en la medida de la capacidad calorífica de un sistema en función de la temperatura, y permite el estudio y caracterización de las transiciones térmicamente inducidas en dicho sistema. Para el estudio de transiciones térmicas en macromoléculas biológicas existe el inconveniente de las extremadamente pequeñas cantidades de calor que se tienen que determinar experimentalmente. Este hecho se debe a dos razones fundamentales: por una parte es muy difícil disponer de grandes cantidades de estas macromoléculas, ya que su obtención a partir de sus fuentes naturales es laboriosa y de muy bajo rendimiento; en cuanto a su obtención comercial, en los casos en que ésta sea posible, suele ser de costo muy elevado para tales cantidades. Por otra parte, dado el elevado peso molecular de estas macromoléculas y que el calor usual para estas transiciones térmicas (desnaturalización) es de unos pocos cientos de kJ por mol, el calor experimental a determinar en una muestra que contiene normalmente del orden de mg de sustancia es muy pequeño. Además, la concentración de estas macromoléculas no se puede, ni incluso debe aumentarse demasiado, ya que se producen procesos de interacciones intermoleculares, lo que provoca efectos térmicos adicionales en las medidas calorimétricas.

El estudio de las transiciones térmicas de estas macromoléculas biológicas ha sido posible gracias al desarrollo de una nueva generación de microcalorímetros de barrido,

durante la década de los setenta, que presentan unas características especiales de sensibilidad, precisión y exactitud. De los tipos actualmente comercializados, uno de los más adecuados para esta clase de estudio es el diseñado por el Dr. P.L. Privalov (Privalov, 1980), cuyos dos modelos comercialmente disponibles se han utilizado en la realización de este trabajo: **DASM-1M** y **DASM-4**. Estos dos modelos de microcalorímetro presentan una serie de características técnicas que les convierten en candidatos apropiados para el estudio calorimétrico de las citadas transiciones en macromoléculas biológicas:

1.- El calentamiento de la muestra es continuo y su velocidad prefijada de antemano, de manera que en todo momento del barrido se dispone de información sobre la capacidad calorífica (C_p) aparente de la muestra y del calor absorbido por ésta en cualquier proceso térmicamente inducido. Un hecho importante es que en todo momento no deben existir gradientes de temperatura en la muestra, es decir, debe existir equilibrio térmico en la muestra, lo que dependerá de la forma y volumen de las células (muestra y referencia) y de la naturaleza de la muestra (Privalov y Potekhin, 1986).

2.- Estos microcalorímetros son diferenciales ya que realizan la medida de C_p del contenido de la célula de muestra con respecto al contenido de la célula de referencia. Ambas células son gemelas y sufren el mismo proceso de calentamiento durante el experimento.

3.- El conjunto de las dos células es un sistema adiabático, gracias a la existencia de dos corazas concéntricas que engloban en una disposición simétrica a las células. Sus temperaturas se controlan de forma que en todo momento sean, o tiendan rápidamente a ser, la misma que la de las células.

4.- El conjunto de la unidad calorimétrica, células, sensores, corazas,... es un sistema no desmontable; lo cual impide un cambio en las condiciones físicas del aparato de experimento en experimento. Esta es la razón fundamental de su alta reproducibilidad experimental con respecto al resto de los otros calorímetros de barrido comerciales.

III. 2.6.1.2. Instrumentación

Brevemente descrito, un microcalorímetro diferencial de barrido está formado por dos células (de muestra y de referencia) térmicamente aisladas y que se pueden calentar a una velocidad constante de tal forma que se mantenga la misma temperatura en ambas células durante el barrido. Cuando se produce un proceso térmicamente inducido, el sistema de control del aparato aporta la cantidad necesaria de calor a la célula adecuada para mantener la misma temperatura que en la otra célula, que es el valor que se mide, como se indicará posteriormente.

Seguidamente se van a exponer las características esenciales de los dos modelos utilizados.

DASM-1M:

Volumen de las células: 1 ml.

Intervalo de temperatura de experimentación: de 0 a 100 °C.

Velocidades de barrido disponibles: 0,125 , 0,25 , 0,5 , 1 y 2 K/min.

Nivel de ruido: 0,5 μ W.

Reproducibilidad de línea base sin volver a llenar las células: 2,0 μ W.

Reproducibilidad de línea base volviendo a llenar las células: 0,1 mJ/K.

DASM-4:

Volumen de las células : 0,5 ml.

Intervalo de temperatura de experimentación: de 0 a 130 °C.

Velocidades de barrido disponibles: 0,125 , 0,25 , 0,5 , 1 y 2 K/min.

Nivel de ruido: $0,2 \mu\text{W}$.

Reproducibilidad de línea base sin volver a llenar las células: $0,5 \mu\text{W}$.

Reproducibilidad de línea base volviendo a llenar las células: $0,05 \text{ mJ/K}$.

En la Figura III. 2.5 se representa un esquema de las unidades calorimétricas de ambos modelos. La configuración del sistema es de células gemelas y, debido a que el equilibrio térmico se alcanza fundamentalmente por conducción, se han optimizado las condiciones para que la conducción térmica sea rápida. De esta forma, las células en el modelo DASM-1M están construídas con oro y las del DASM-4 con platino, materiales adecuados gracias a su carácter inerte y a su alta conductividad térmica; también se observa en general una gran relación superficie/volumen en el diseño de las células, especialmente en el DASM-4: en el DASM-1M son en forma de moneda de unos 20 mm de diámetro y 3 mm de espesor en una disposición relativa de planos enfrentados, mientras que en el DASM-4 son capilares que forman una hélice compacta (Figura III. 2.5).

El acceso a las células se realiza, en ambos modelos, por tubos capilares de platino que desembocan a una cámara hermética que se puede presurizar para trabajar a presión constante. Esta sobrepresión contribuye a evitar la formación de burbujas en las disoluciones de trabajo durante el calentamiento de las células, lo cual provocaría artefactos en la medida calorimétrica. El trabajar a presión constante hace además que el calor medido sea en realidad un incremento de entalpía.

Las células están en íntimo contacto con una termopila que detecta cualquier diferencia de temperatura entre ambas células, produciendo una señal eléctrica proporcional a la misma que va a servir para incrementar, mediante un sistema regulador, la potencia recibida por la célula de menor temperatura para que esta diferencia se anule. Este aumento de potencia es lo que se va a ir registrando durante el barrido de temperatura.

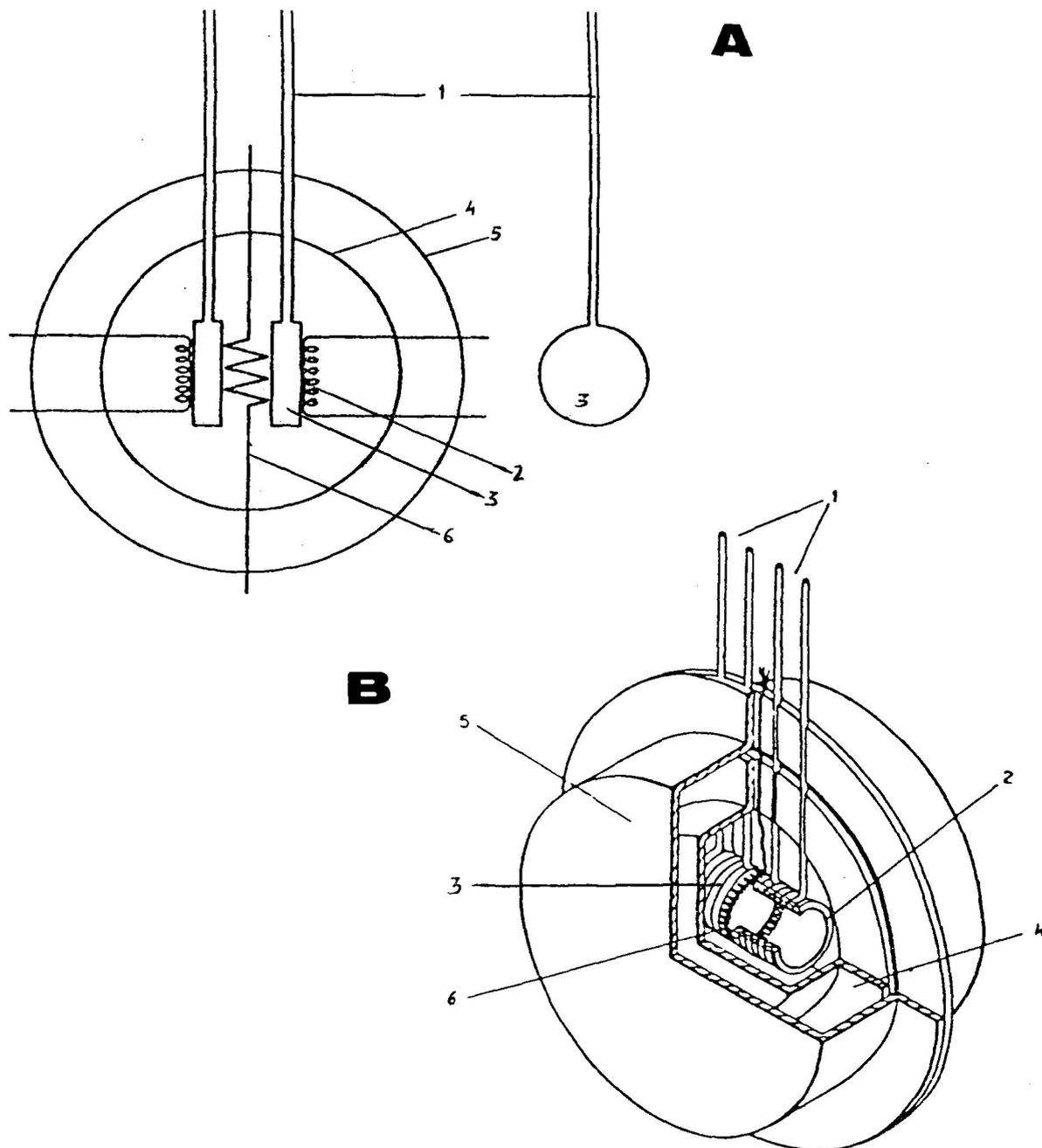


FIGURA III. 2.5: Esquema de los bloques calorimétricos de los microcalorímetros diferenciales de barrido (A) DASM-1M y (B) DASM-4, diseñados por el Dr. P.L. Privalov. 1) entrada de los capilares; 2) calentador de las células; 3) células de referencia y muestra; 4) coraza adiabática interna; 5) coraza adiabática externa; 6) termopila. (Tomado de Privalov, 1980).

La adiabaticidad del sistema se establece por dos corazas concéntricas de plata que engloban a las células calorimétricas, cuya temperatura se controla a través de los termosensores y efectores apropiados para que sea igual en todo momento a la de las células y, de esta forma, que todo el bloque calorimétrico (células y corazas interna y externa) forme un sistema adiabático.

Finalmente todo este sistema está encerrado en un bloque metálico, equipado con módulos Peltier para facilitar el enfriamiento hasta temperaturas inferiores a la ambiental.

III. 2.6.1.3. Experimento calorimétrico

Un experimento calorimétrico típico para, por ejemplo, la desnaturalización de una proteína, consta de las siguientes etapas:

- A. Línea base instrumental
- B. Calibrado
- C. Barrido de la muestra
- D. Segundo calentamiento de la muestra

A. Línea base instrumental:

Debido a que es imposible tener dos células idénticas, hay que obtener la diferencia de capacidad calorífica entre las dos células debida a las pequeñas diferencias en su construcción y localización. Para esto se realiza previamente al barrido de muestra una línea base como referencia, que se obtiene llenando ambas células con el tampón donde se va a encontrar disuelta la muestra, y realizando un barrido en las mismas condiciones a las que se realizará posteriormente con la muestra. El termograma obtenido se restará del realizado con la muestra, para eliminar los incrementos de capacidad calorífica debidos a aspectos

instrumentales y, de esta forma, poder medir los cambios de calor debidos únicamente a procesos térmicos de la muestra.

B. Calibrado:

El aparato de CDB registra cambios de potencia, por lo que para poder reflejar el experimento en cambios de capacidad calorífica y entalpía habrá que determinar el factor de conversión. Para ello se realiza un calibrado. Consiste en suministrar durante un tiempo determinado, t , una potencia eléctrica suplementaria, P , a la resistencia de una de las dos células. Como $W = P t$, se puede determinar inmediatamente el trabajo eléctrico, W , realizado. Así, conocida el área del calibrado y su energía correspondiente se puede determinar posteriormente la entalpía calorimétrica del proceso térmico que sufre la muestra. Otra forma de actuar a este respecto, que es la que se ha empleado en este trabajo, es la de medir la altura del calibrado en milivoltios (mV) para obtener una constante de calibración, k' , en $\mu\text{W}/\text{mV}$ y, de esta forma, conociendo la velocidad de barrido, v , en K/min se transforman los valores de C_p del termograma que se obtienen en mV, $C_p'(\text{mV})$, en unidades de J/K mediante:

$$C_p(\text{J}/\text{K}) = k'(\mu\text{W}/\text{mV}) C_p'(\text{mV}) 1/v(\text{min}/\text{K}) 10^{-6}(\text{J}/\mu\text{J}) 60(\text{s}/\text{min}) \quad (\text{III.1})$$

haciendo obviamente la corrección para el paso de minutos a segundos y de microjulios a julios. Posteriormente, conociendo la concentración de la muestra y el volumen de la célula se conoce la cantidad de muestra implicada en el experimento, c (g). Dividiendo lo obtenido anteriormente, $C_p(\text{J}/\text{K})$, por c se transforman los datos en $\text{J K}^{-1} \text{g}^{-1}$. Todos estos factores: constante de calibración, velocidad de barrido, y cantidad de muestra se pueden reunir en uno sólo, f , para pasar directamente los datos originales en mV a datos en $\text{J K}^{-1} \text{g}^{-1}$

$$f = \frac{k'(\mu\text{W/mV}) 60 (\text{s/min}) 10^{-6} (\text{J}/\mu\text{J})}{c (\text{g}) v (\text{K/min})} \quad (\text{III.2})$$

a su vez,

$$C_p(\text{J/K g}) = C_p'(\text{mV}) f \quad (\text{III.3})$$

valor que multiplicado por el peso molecular de la muestra y expresado en kJ daría lugar al valor molar de C_p en $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$.

Las potencias que se pueden suministrar para realizar los calibrados son: para el DASM-1M de 10, 50 y 250 μW y para el DASM-4 de 25, 50 y 100 μW . Los calibrados se pueden hacer durante la realización de cualquier barrido de temperatura, ya sea de línea base o de barrido de muestra, evitando que coincida con la zona de temperaturas donde ocurre el proceso térmicamente inducido de la muestra.

C. Barrido de la muestra:

En este barrido de temperatura, la célula de muestra se llena de una disolución de la muestra a estudiar (mielina o proteína purificada) de concentración conocida, mientras que la célula de referencia se llena con el tampón de disolución de la muestra.

Cuando dentro de la célula de muestra comienza la desnaturalización de la proteína, u otro proceso endotérmico, se produce una absorción de calor en esta célula que es rápidamente restituida por el sistema de compensación del calorímetro mediante un suministro adicional de potencia a dicha célula para igualar de nuevo y en todo instante la temperatura de las dos células. Lo que realmente se registra en el termograma es una diferencia de potencial proporcional a la potencia adicional que se tiene que suministrar; esta

medida de diferencia de potencial multiplicada por el factor f , anteriormente explicado, nos va a dar el calor o incremento de entalpía, en $J K^{-1} g^{-1}$, que sufre la proteína en la célula de muestra al producirse el proceso endotérmico.

Generalmente, el termograma del barrido con la muestra aparece por debajo de la línea base debido a que la C_p de la proteína en la disolución es menor que la del agua que reemplaza (Privalov y Khechinashvili, 1974).

A partir de la distancia de C_p del barrido de muestra con respecto al de la línea base se puede incluso obtener la capacidad calorífica específica parcial de la proteína, $C_{p,p}(T)$, por medio de la ecuación (Privalov y Khechinashvili, 1974)

$$C_{p,p}(T) = C_{p,d}(T) V_p(T)/V_d(T) - \Delta Cap(T)/m_p \quad (III.4)$$

donde $\Delta Cap(T)$ es la distancia entre el registro de la muestra (proteína) y el de la línea base, $C_{p,p}(T)$ y V_p son la capacidad calorífica y el volumen específico parcial de la proteína, mientras que $C_{p,d}(T)$ y V_d son los correspondientes valores del disolvente, y m_p es la cantidad de proteína en gramos en el interior de la célula de muestra.

D. Segundo calentamiento de la muestra:

Una vez terminado el barrido de la muestra hasta la temperatura deseada, se deja enfriar la unidad calorimétrica y, sin abrir el compartimento presurizado de las células, se puede registrar un segundo barrido. Este segundo barrido sirve como un criterio para determinar si el proceso endotérmico que le ocurre a la muestra es reversible o irreversible; se admite que si en este segundo barrido no se vuelve a producir el proceso endotérmico es que se trata de un proceso irreversible.

Durante este trabajo, generalmente, se ha utilizado el segundo calentamiento como

línea base para evitar posibles efectos derivados de procesos de agregación de la muestra desnaturalizada que provocan la desviación a alta temperatura tanto en el barrido de muestra como en el segundo calentamiento de la misma.

III. 2.6.1.4. Adquisición y procesamiento de datos

La adquisición de datos del termograma se ha realizado mediante un ordenador Inves PC-640X conectado al microcalorímetro mediante un conversor analógico/digital (DT-2801). Esta adquisición de datos se controla mediante un programa, desarrollado en este Departamento por el Dr. O. López-Mayorga, que genera un fichero de datos digitalizados con un período de muestreo determinado por el usuario. Cada dato tomado se genera por un promedio de un número de medidas también variable. Los ficheros generados están formados por tres columnas de datos: temperatura en °C, altura de la señal en mV y tiempo en segundos, y su extensión suele ser de unos 1000 a 1500 datos por barrido.

El ΔH de una transición se obtiene a partir del área bajo la curva calorimétrica. Para obtenerla se siguen estos pasos:

- Primeramente se resta al barrido de muestra la línea base o, más frecuentemente, el segundo calentamiento, para eliminar las diferencias entre ambas células debidas a condiciones intrínsecas del instrumento. Este proceso se conoce como **corrección de la línea base instrumental**.

- Un termograma corregido consiste en una representación de la capacidad calorífica de exceso del sistema debida al proceso de la desnaturalización, Cp^{ex} , frente a la temperatura. Sin embargo, después de restar la línea base instrumental, existen dos contribuciones a la Cp así obtenida de esta resta: (a) la Cp^{ex} , debida al proceso de la desnaturalización, y (b) la Cp^q , debida a la capacidad calorífica intrínseca de la mezcla de

macroestados de la proteína, la cual viene dada por:

$$Cp^q(T) = \sum_i Cp_i(T) x_i(T) \quad (III.5)$$

donde $Cp_i(T)$ es la capacidad calorífica intrínseca del estado i y $x_i(T)$ es la fracción presente del estado i a la temperatura T . Esta Cp^q da lugar a lo que se conoce con el nombre de **línea base química** y tiene una determinada variación con la temperatura. Superpuesta a esta variación se registra la Cp^{ex} debida al proceso endotérmico de desnaturalización de la proteína. A esto se debe que los termogramas sin línea base química restada tengan el principio y el final de la curva a distinta altura, debido a la diferencia entre la capacidad calorífica del estado nativo $Cp(N)$ y la del estado desnaturalizado $Cp(D)$ de la proteína (Figura III. 2.6.A). La variación de la Cp^q del sistema con la temperatura es conocida fuera de los límites de la transición pero su variación durante la transición debe determinarse por un método empírico (Takahashi y Sturtevant, 1981) y una vez que se conoce se resta del termograma quedando sólo Cp^{ex} (Figura III. 2.6.B). El método consiste en establecer dos niveles de capacidad calorífica definidos por las prolongaciones de la tendencia de la traza a ambos lados de la transición y calcular entonces los valores de Cp^q para la línea base química a cada temperatura entre ambos niveles según la siguiente ecuación:

$$Cp^q = Cp(N) + [Cp(D) - Cp(N)] (Q/Q_t) \quad (III.6)$$

donde $Cp(N)$ y $Cp(D)$ son los valores de la capacidad calorífica a cada temperatura definidos por las prolongaciones de la traza a ambos lados de la transición para el estado nativo y el desnaturalizado respectivamente, Q es el calor desarrollado hasta cada temperatura, y Q_t es el calor total de la transición. Según la anterior ecuación, el valor de Cp^q varía a lo largo de

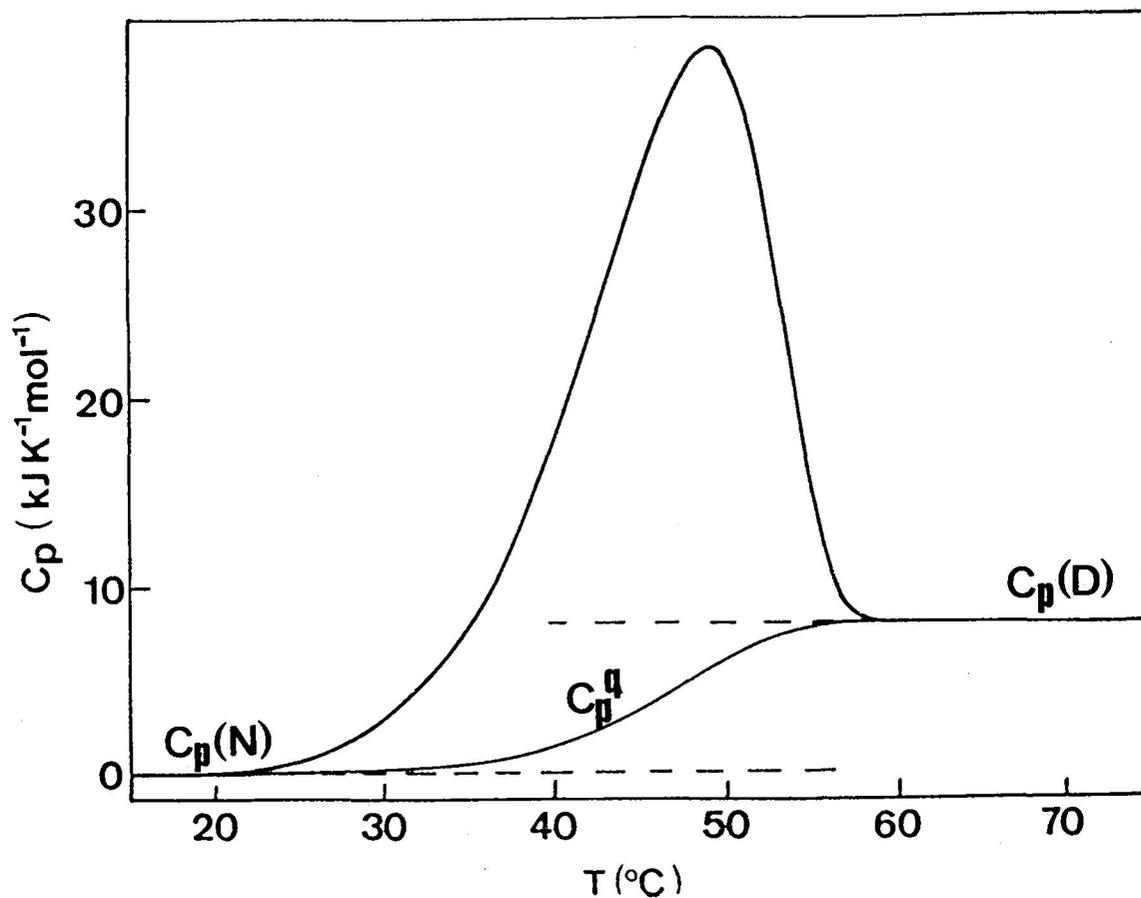


FIGURA III. 2.6.A: Ejemplo de trazado de línea base química para la traza calorimétrica correspondiente a la desnaturalización térmica de la carboxipeptidasa B en 20 mM de pirofosfato sódico (pH 9,0) a una velocidad de barrido de 0,25 K/min (Conejero-Lara, 1988). Las líneas discontinúas representan las prolongaciones de los niveles de capacidad calorífica $C_p(N)$ y $C_p(D)$.

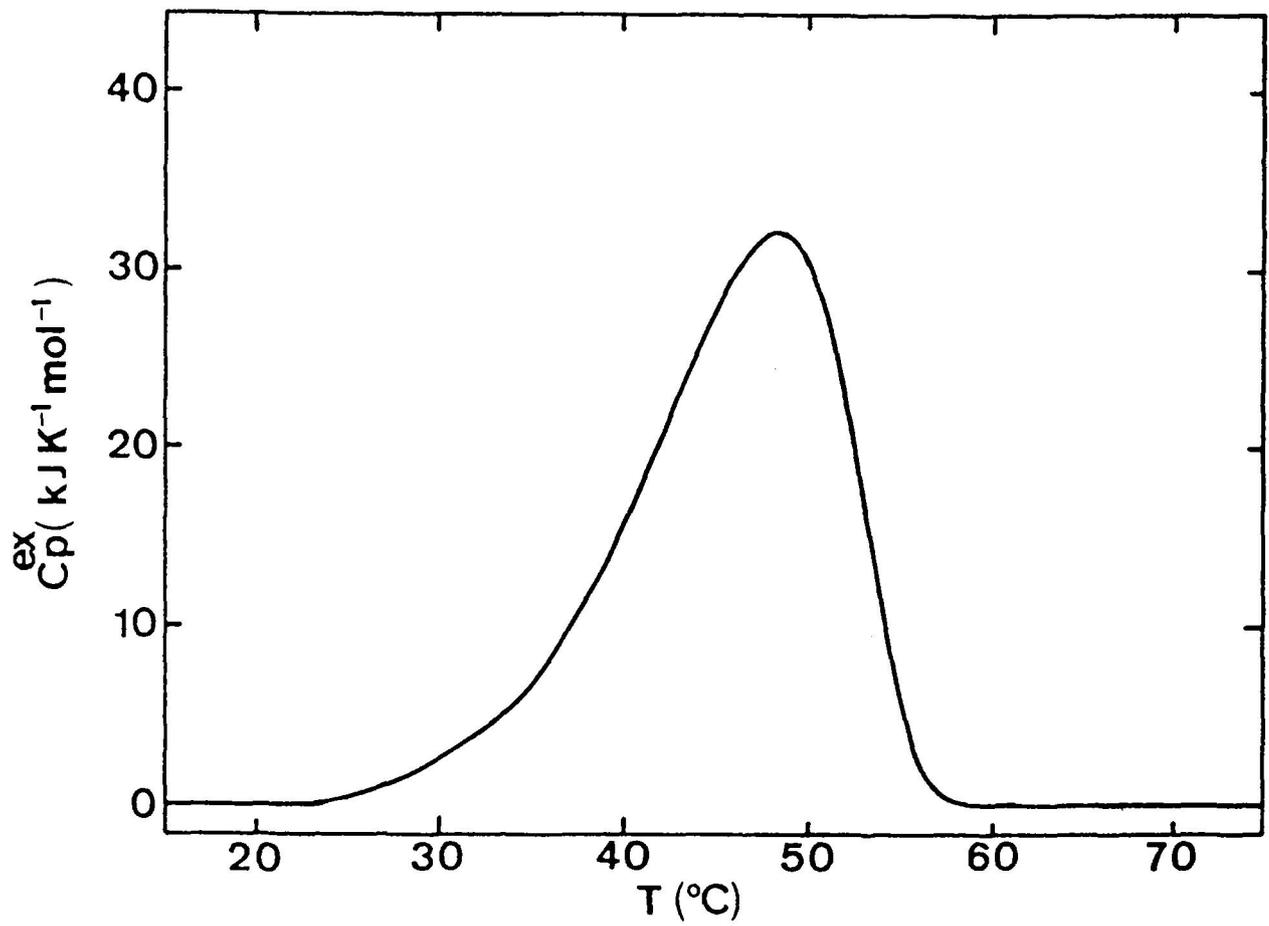


FIGURA III. 2.6.B: Traza calorimétrica resultante después de la corrección de línea base química de la traza representada en la Figura III. 2.6.B.

la transición entre los dos niveles proporcionalmente al calor desarrollado a cada temperatura, lo cual es razonable pero totalmente empírico. Como se observa en la Figura III. 2.6.A la línea base química se asemeja mucho a un polinomio de tercer grado, por lo que en esta Memoria la corrección de línea base química se ha realizado mediante ajuste a un polinomio de tercer grado de la nueva línea de base obtenida después de la corrección de línea base instrumental (Figura III. 2.6. B). Este procesamiento se ha realizado mediante el tratamiento de los ficheros de datos en un programa cedido por el profesor E. Freire a este Departamento.

- Con el programa anterior se puede obtener el área de la curva calorimétrica en unidades de mV. Multiplicando este valor obtenido por el factor de conversión adecuado, f , se convierte en unidades de $J K^{-1} g^{-1}$. Esta conversión se puede realizar con el mismo programa y finalmente almacenar estos datos ya convertidos en un fichero que conserva la misma estructura que el fichero inicial.

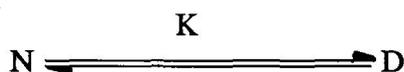
III. 2.6.1.5. Fundamentos teóricos

En este apartado se van a exponer las bases teóricas del análisis de las trazas de CDB correspondientes a la desnaturalización térmica de proteínas. Hasta muy recientemente, todos los modelos utilizados para este tipo de análisis se basaban en la termodinámica del equilibrio. Así, tanto si se consideraba que el proceso de desnaturalización implicaba únicamente dos estados (nativo y desnaturalizado), como si había que introducir la existencia de estados intermedios adicionales en el análisis, se suponía que existía equilibrio químico en todo momento (Freire y Biltonen, 1978). La información obtenida mediante este tipo de análisis consiste fundamentalmente en los cambios de las magnitudes termodinámicas (energía de Gibbs, entalpía, entropía y capacidad calorífica) de las diversas etapas de que consta el

proceso de desnaturalización, así como las poblaciones relativas de los diversos estados en función de la temperatura.

III. 2.6.1.5.1. Modelo de equilibrio entre dos estados

En la Figura III. 2.7 se muestra la variación de calor (entalpía) (A) y de capacidad calorífica (B) para una proteína cuya desnaturalización térmica tiene lugar únicamente entre los estados nativo (N) y desnaturalizado (D), los cuales se encuentran en equilibrio en todo momento



y en donde por simplicidad hemos supuesto que $C_p(N) = C_p(D)$.

Teniendo en cuenta que la constante de equilibrio para el proceso de desnaturalización viene dada por

$$K = [D]/[N] \quad (\text{III.7})$$

podemos expresarla en función de la fracción de proteína desnaturalizada

$$K = X_d/(1 - X_d) \quad (\text{III.8})$$

Como estamos suponiendo un proceso de dos estados en el equilibrio se cumple la ecuación de van't Hoff, donde designaremos como ΔH_{vH} al incremento de entalpía que proporciona la variación de K con T

$$\left(\frac{d \ln K}{dT}\right)_p = \frac{\Delta H^{vH}}{RT^2} \quad (\text{III.9})$$

y sustituyendo K por la ecuación (III.8) obtenemos

$$\frac{1}{X_d(1-X_d)} \left(\frac{dX_d}{dT}\right)_p = \frac{\Delta H^{vH}}{RT^2} \quad (\text{III.10})$$

Si denominamos Td como la temperatura de desnaturalización a la que X_d vale 1/2 y sustituimos T=Td en la ecuación (III.10) obtenemos

$$\Delta H^{vH} = 4RT_d^2 \left(\frac{dX_d}{dT}\right)_{T=T_d} \quad (\text{III.11})$$

Como se observa en la Figura III. 2.7 el calor que se va desarrollando durante el proceso (altura de la curva en (A) o área bajo la curva en (B)) es proporcional a X_d de forma que

$$X_d = Q(T)/Q_t \quad (\text{III.12})$$

Sustituyendo esta expresión en la ecuación (III.12) y dado que la derivada del calor desarrollado con respecto a la temperatura a presión constante, dQ(T)/dT, es el incremento de la capacidad calorífica, ΔC_p, obtenemos

$$\Delta H^{vH} = 4RT_d^2 \frac{\Delta C_p^m}{Q_t} \quad (\text{III.13})$$

donde ΔC_p^m es el incremento de capacidad calorífica en el máximo de la curva, para este caso a la temperatura T_d, y Q_t es calor total del proceso de desnaturalización correspondiente

al área total de la curva.

Este valor de ΔH^{vH} puede compararse con la entalpía calorimétrica molar del proceso, ΔH , correspondiente al área bajo la curva experimental de C_p frente a T , es decir:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (\text{III.14})$$

donde T_1 y T_2 son las temperaturas inicial y final de la transición.

Para una transición de dos estados, que en general incluya una $\Delta C_p(d) = C_p(D) - C_p(N)$ no nula, conociendo experimentalmente el ΔH a una T dada y el incremento de C_p de desnaturalización, $\Delta C_p(d)$, es posible obtener mediante ecuaciones básicas de Termodinámica los valores de ΔH , ΔS e ΔG del proceso en función de la temperatura (Privalov y Khechinashvili, 1974; Privalov, 1979; Mateo, 1984).

Para un proceso reversible de dos estados debe cumplirse que $\Delta H^{vH} = \Delta H$. En el caso de que la macromolécula sufra una transición entre más de dos estados se va obtener que $\Delta H^{vH} < \Delta H$ (Mateo, 1984). Estos estados intermedios corresponden, por lo general, a situaciones en la molécula en que solamente una región o dominio de la misma se ha "desplegado" respecto a su estructura nativa plegada. De esta forma, aunque ΔH^{vH} tiene únicamente sentido termodinámico en una transición reversible entre dos estados, su cálculo es interesante ya que el valor del cociente $\Delta H / \Delta H^{vH}$ puede indicar el número mínimo de dominios o regiones de la macromolécula que experimentan la desnaturalización más o menos independientemente (Mateo, 1984). Por otra parte, en sistemas que experimentan una transición térmica con cooperatividad intermolecular se da la desigualdad $\Delta H^{vH} > \Delta H$, caso de la transición en bicapas lipídicas de estado gel a estado cristal líquido (McElhaney, 1986). En este caso, el cociente entre $\Delta H^{vH} / \Delta H$ proporciona una estimación del número promedio de moléculas que forman la unidad cooperativa del proceso.

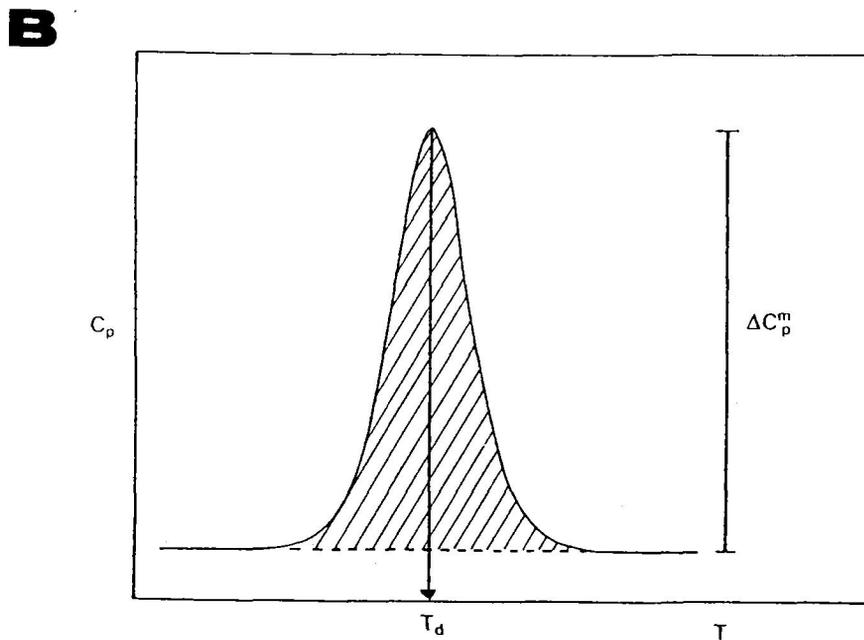
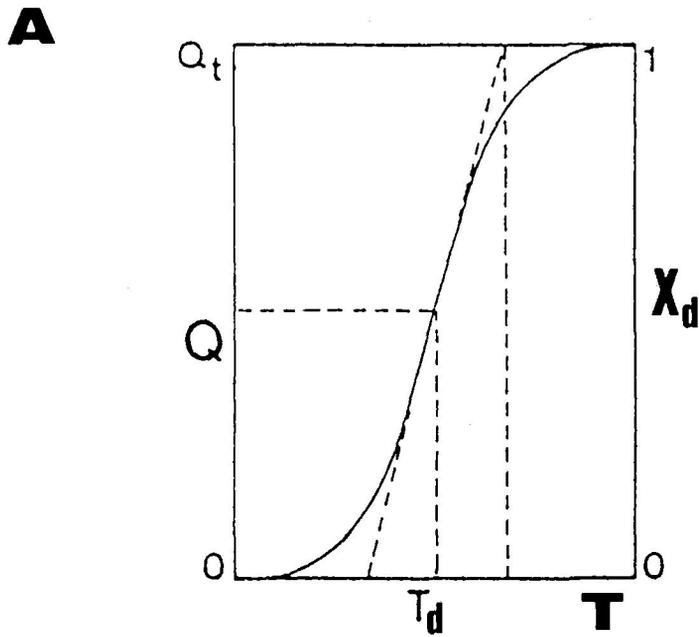


FIGURA III. 2.7: Representaciones de (A) la evolución del calor, Q , y del avance de la reacción, X_d , como una función de temperatura durante un proceso reversible de dos estados sin cambio total en la C_p ; (B) variación de la C_p con la temperatura para el mismo proceso descrito en A. (Gráfica tomada de Mateo, 1984).

III. 2.6.1.5.2. Modelo de equilibrio entre más de dos estados

Para poder aplicar todo el tratamiento termodinámico explicado hasta el momento se tiene que cumplir que el proceso térmico sea de equilibrio y entre dos estados, $N \rightleftharpoons D$. En la realidad suelen abundar las proteínas compuestas de diversos dominios, de peso molecular relativamente elevado, cuya desnaturalización transcurre a través de estados intermedios que poseen la suficiente estabilidad termodinámica como para que dichos estados se encuentren suficientemente poblados durante el proceso térmico. Un esquema general del proceso sería



donde I_1 e I_n son el estado nativo (N) y el estado totalmente desnaturalizado de la proteína (D) respectivamente, mientras que $I_2 \dots I_{n-1}$ son los estados intermedios significativamente poblados. En este caso se obtiene que $\Delta H > \Delta H^{VH}$, con lo que gran parte del desarrollo anterior pierde aquí su aplicabilidad. No obstante, se ha podido obtener, para algunas de estas proteínas, información relativa al posible número de dominios que las componen, su asociación a regiones específicas de la proteína y su mayor o menor independencia (Privalov, 1982).

Freire y Biltonen (Freire y Biltonen, 1978) demostraron que puede obtenerse la función de partición del sistema, $Z(T)$, como una función continua de T , a partir únicamente de datos de CDB de alta sensibilidad,

$$Z(T) = \sum_{j=0}^{j=n} w_j \exp(-\Delta G_j/RT) \quad \text{(III.15)}$$

donde w_j es la degeneración del estado j e ΔG_j es la diferencia de energía de Gibbs entre el

estado j y el estado inicial tomado como referencia: $\Delta G_j = G(\text{estado } I_j) - G(\text{estado } I_0)$. Freire y Biltonen (Freire y Biltonen, 1978) demuestran que la función de partición del sistema puede obtenerse mediante la expresión:

$$Z(T) = \exp \int_{T_0}^T \frac{\langle H \rangle}{RT^2} dT \quad (\text{III.16})$$

donde $\langle H \rangle$ es la entalpía de exceso por mol a una temperatura dada, T .

Una vez conocida la función de partición, $Z(T)$, se puede determinar el número de estados intermedios y obtener información termodinámica sobre las diversas etapas de que consta el proceso de desnaturalización. En algunos casos se han podido correlacionar estas etapas con el desplegamiento de dominios concretos de la proteína (Privalov et al., 1981; Privalov, 1982; Potekhin y Privalov, 1982; Privalov y Medved, 1982; Novokhatny et al., 1984; Rigell et al., 1985; Tsalkova y Privalov, 1985; López-Lacomba et al., 1989).

III. 2.6.1.5.3. Reversibilidad en la desnaturalización

Todo el análisis termodinámico descrito en los dos apartados anteriores se basa, como ya se ha indicado, en la condición de que el proceso de desnaturalización sea reversible. Lógicamente, no se puede aplicar la termodinámica del equilibrio a procesos que transcurran irreversiblemente.

Se acepta generalmente que el tratamiento de datos en el equilibrio es aplicable en aquellos casos en que las transiciones observadas son calorimétricamente reversibles, es decir, cuando el barrido original se reproduce, tras enfriar, en el segundo calentamiento de la muestra. Sin embargo, en la mayoría de los casos el segundo calentamiento no muestra

ninguna transición, lo que indica que la transición térmica en el primer barrido condujo a un estado de la proteína incapaz de plegarse de nuevo para volver al estado nativo; esto se debe posiblemente a algún tipo de alteración de la proteína (agregación, alteración química de restos) inducido por la alta temperatura (para una revisión de posibles causas de irreversibilidad a alta temperatura ver Klibanov y Ahern, 1987). Dado que estos procesos de alteración son irreversibles, pudiendo estar cinéticamente controlados, cabe esperar que los termogramas de CDB correspondientes a la desnaturalización irreversible de proteínas dependan claramente de la velocidad de barrido a la que se realiza el experimento, como de hecho se ha observado experimentalmente en algunos casos. De esta forma, se han propuesto recientemente en este Departamento modelos para el análisis de las trazas de CDB que tienen en cuenta el carácter cinético de los procesos de alteración irreversible de las proteínas (Sánchez-Ruiz et al., 1988a; Sánchez-Ruiz, enviado), habiendo ya aplicado estos modelos a diferentes proteínas (Sánchez-Ruiz et al., 1988a; Sánchez-Ruiz et al., 1988b; Guzmán et al., 1990; Galisteo et al., en prensa; Conejero et al., en prensa).

En este trabajo se ha observado que la desnaturalización de la mielina es irreversible y cinéticamente controlada, por lo que no sería correcto aplicar ningún tratamiento de datos basado en la termodinámica del equilibrio. Se ha intentado así aplicar un enfoque cinético (Sánchez-Ruiz et al., 1988a; Freire et al., 1990) que se describirá a continuación. De todas formas, la entalpía calorimétrica obtenida del área bajo la curva de la capacidad calorífica de desnaturalización es una medida correcta ya que su valor es independiente del efecto cinético; de hecho, la única información termodinámica directamente accesible por CDB de una transición irreversible es su entalpía calorimétrica.

III. 2.6.1.5.4. Modelos cinéticos

Como se ha indicado, en este Departamento se vienen desarrollando modelos cinéticos para poder analizar las transiciones de CDB correspondientes a la desnaturalización irreversible de proteínas (Sánchez-Ruiz et al., 1988a; Freire et al., 1990). Es de destacar que estos modelos son, en la actualidad, los únicos existentes en la bibliografía que tienen en cuenta el carácter cinético de las trazas calorimétricas.

A continuación se describe de forma sucinta el **modelo cinético simple o de dos estados**, el cual se ha aplicado a nuestros resultados experimentales (Apartado IV. 2). Este modelo considera que el proceso de desnaturalización se puede representar como un proceso cinético de primer orden entre dos estados, nativo (N) y desnaturalizado (D), cuya constante de velocidad, k , cambia con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius.



El tratamiento matemático de este modelo conduce a varios procedimientos para el cálculo de la energía de activación, E , del proceso de desnaturalización (Sánchez-Ruiz et al., 1988a).

Procedimiento A: Para una temperatura dada, T , el calor absorbido, Q , será proporcional a la cantidad de proteína desnaturalizada; por lo tanto, el calor desarrollado a una temperatura determinada, Q , y el calor total de desnaturalización, Q_t , pueden expresarse

$$Q = [D] \Delta H V \quad (\text{III.17})$$

$$Q_t = c \Delta H V \quad (\text{III.18})$$

donde V es el volumen de la célula calorimétrica, $[D]$ es la concentración de proteína desnaturizada, c es la concentración total de proteína y ΔH es la entalpía total del proceso de desnaturalización por mol de proteína.

Como el proceso cinético se supone de primer orden, la ecuación de velocidad para dicho proceso viene determinada por

$$\frac{d[N]}{dt} = -k [N] \quad (III.19)$$

Teniendo en cuenta que la velocidad de barrido es $v = dT/dt$, la expresión anterior se puede escribir

$$k = - \frac{v}{[N]} \frac{d[N]}{dT} \quad (III.20)$$

La concentración de proteína nativa es $[N] = c - [D]$ y según las ecuaciones III.17 y III.18 se puede expresar como

$$[N] = \frac{Q_t - Q}{\Delta H V} \quad (III.21)$$

Si derivamos esta ecuación anterior respecto a la temperatura resulta

$$\frac{d[N]}{dT} = - \frac{1}{\Delta H V} \frac{dQ}{dT} = - \frac{C_p}{\Delta H V} \quad (III.22)$$

y si la sustituimos en la ecuación III.20, haciendo uso de la expresión III.21, obtenemos

$$k = \frac{v C_p}{Q_t - Q} \quad (III.23)$$

donde C_p es la capacidad calorífica a una temperatura determinada.

Esta última ecuación permite el cálculo de la constante de velocidad a partir de los datos calorimétricos obtenidos por CDB. Así, si suponemos que los valores de la constante de velocidad se ajustan a la ecuación de Arrhenius, $k = A \exp(-E/RT)$, en el intervalo de temperaturas en que se produce la transición calorimétrica, se puede obtener la energía de activación del proceso, E , por un ajuste de $\ln k$ frente a $1/T$. Esta ecuación, según el modelo de partida, debe ser válida para cualquier velocidad de barrido, por lo que todos los valores de k obtenidos a una misma temperatura en experimentos a diferentes velocidades de barrido deben corresponder a un mismo valor, es decir, todos los valores de k obtenidos a cualquier velocidad de barrido deben corresponder a una misma recta en una gráfica de Arrhenius.

Procedimiento B: Este método se basa en la influencia de la velocidad de barrido sobre la temperatura a la cual la curva de capacidad calorífica presenta el valor máximo, T_m .

De la ecuación III.20 y aplicando la ecuación de Arrhenius se obtiene

$$\frac{d \ln[N]}{dT} = - \frac{k}{v} = - \frac{A}{v} \exp(-E/RT) \quad (\text{III.24})$$

La elaboración matemática de la ecuación III.24 conduce en este caso a la expresión

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E} \exp(-E/RT_m) \quad (\text{III.25})$$

De esta forma para que se cumpla el modelo cinético simple, al representar $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$ se debe obtener una línea recta cuya pendiente es $-E/R$.

Procedimiento C: La obtención a partir de la ecuación III.24 de una expresión que nos dé la concentración de estado nativo en función de la temperatura requiere la evaluación de la integral de Arrhenius, $\exp(-E/RT) dT$; esta integral carece de expresión algebraica simple. Sin embargo, en este caso se puede convertir en una expresión fácilmente integrable teniendo en cuenta que, dentro del estrecho intervalo de temperatura de una transición calorimétrica, se puede aceptar el que $1/T_m - 1/T$ no difiere apreciablemente de $(T - T_m)/T_m^2$. Por lo tanto, la integración de la ecuación de Arrhenius conduce finalmente a una expresión de la forma

$$\ln \frac{c}{[N]} = \exp \left(\frac{E}{R} \frac{(T - T_m)}{T_m^2} \right) \quad (\text{III.26})$$

en la que teniendo en cuenta la ecuación III.21 se obtiene

$$\ln \left(\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q} \right) = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (\text{III.27})$$

que permite el cálculo de la energía de activación a partir de la representación del miembro de la izquierda frente a $1/T$. Es interesante hacer notar que para $T = T_m$ la ecuación III.27 predice

$$\frac{Q_t}{Q_t - Q_m} = e \quad (\text{III.28})$$

Según este procedimiento, para cada velocidad de barrido se deben obtener valores concordantes de energía de activación, así como las T_m para cada curva, que deben, a su

vez, coincidir con las experimentales, todo ello dentro del error experimental.

Procedimiento D: Para $T=T_m$ y utilizando las ecuaciones III.24 y III.25, se llega a una nueva ecuación para E, curiosamente muy parecida a la de la ΔH^{vH} (ecuación III.13) para transiciones reversibles de dos estados, que proporciona directamente el valor de E

$$E = \frac{e R T_m^2 C_p^m}{Q_t} \quad (\text{III.29})$$

Esta expresión puede utilizarse para obtener directamente la energía de activación a partir de parámetros del máximo de las trazas.

Hay que hacer notar que las expresiones finales de cada uno de los cuatro procedimientos descritos, para obtener la energía de activación del proceso de desnaturalización, implican diferentes aproximaciones y emplean diferentes parámetros calorimétricos obtenidos en los experimentos de CDB. Por lo tanto, si los valores de energía de activación que se obtienen por los distintos procedimientos coinciden, se puede afirmar que el modelo cinético simple es válido para explicar ese proceso de desnaturalización.

III. 2.6.2. Análisis térmico en gel de poliacrilamida

III. 2.6.2.1. Introducción

El análisis térmico en gel de poliacrilamida (ATG) es una técnica que se basa en la solubilidad diferencial que presentan algunas proteínas, especialmente proteínas intrínsecas de membrana, entre sus estados nativo y desnaturalizado.

Es una técnica relativamente reciente que se aplicó por vez primera en el estudio de la desnaturalización térmica de las membranas de eritrocito (Lysko et al., 1981). Lysko y colaboradores observaron que al calentar la membrana de eritrocito se produce una agregación de las proteínas existentes en la bicapa debido, posiblemente, a la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre proteínas próximas que se despliegan y dejan expuestos grupos con posibilidad de reaccionar entre sí. Al realizar una electroforesis en ausencia de ditioneitol, u otro agente reductor de puentes disulfuro, de muestras calentadas a diferente temperatura, se observa que desaparecen bandas proteicas y aparecen agregados en el origen de electroforesis correspondientes a las proteínas que sufren la desnaturalización. De esta forma, la electroforesis en condiciones no reductoras se puede utilizar para relacionar transiciones térmicas de CDB con la desnaturalización de determinadas proteínas en sistemas complejos. Así, se han estudiado sistemas como la membrana de eritrocito (Lysko et al., 1981), el receptor de acetilcolina del *Torpedo californica* (Soler et al., 1984; Artigues et al., 1987) y la membrana de las gotas de grasa de la leche (Burnier y Low, 1985).

En los últimos años, se ha introducido una variación en esta técnica permitiéndole una mayor aplicación. Rigell y colaboradores (Rigell et al., 1985) observaron que durante el proceso de desnaturalización térmica del complejo citocromo c oxidasa se producían cambios en la solubilidad de determinadas subunidades del complejo enzimático y que las subunidades nativas se podían separar de las desnaturalizadas mediante una solubilización diferencial por detergentes. Gracias a esta modificación en la técnica, se puede determinar la temperatura de desnaturalización de una proteína (o subunidad) que sufra un cambio en las propiedades de solubilidad durante el proceso de desnaturalización, como es de esperar en las proteínas intrínsecas de membrana.

Combinando esta técnica con la técnica de CDB se pueden llegar a asignar transiciones endotérmicas de un termograma complejo a proteínas o subunidades proteicas

determinadas del sistema que se estudia (Rigell et al., 1985; Rigell y Freire, 1987; Goins y Freire, 1988; Thompson et al., 1989; Morin et al., 1990). Como se observa en estos trabajos citados, hay proteínas dentro de estos sistemas estudiados que no presentan un cambio de solubilidad asociado a la desnaturalización térmica y, por tanto, no se puede obtener información sobre ellas con la técnica de ATG; este suele ser el caso de proteínas hidrosolubles y extrínsecas de membrana.

III. 2.6.2.2. Experimento de ATG

En la realización de un experimento de ATG se pueden distinguir una serie de pasos sucesivos:

- 1.- Calentamiento de la muestra a una cierta velocidad de barrido.
- 2.- Solubilización diferencial de la muestra calentada.
- 3.- Electroforesis en gel de SDS-PA.
- 4.- Densitometría del gel obtenido y tratamiento de datos.

1.- Para la realización de un experimento de ATG y su posterior comparación con los experimentos obtenidos de CDB se necesita simular un barrido de temperatura lo más parecido al realizado en la CDB. Con tal fin, se ha utilizado un baño de agua completamente rodeado de poliestireno expandido para minimizar las pérdidas de calor con el exterior. En la parte superior de este baño se ha instalado una gradilla para introducir en ella tubos eppendorf. En los tubos eppendorf se depositan 150 μ l de membrana mielínica en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0); a estos tubos se les corta el tapón y se pone una varilla de vidrio que ajuste perfectamente con el fin de poder sacar el tubo del baño con la mayor facilidad posible. La temperatura del baño se ha aumentado a una velocidad constante de 1 K/min

hasta un máximo de 94 °C; cuando se alcanza la temperatura deseada se extrae un tubo con muestra, el cual se introduce inmediatamente en un baño de hielo. Para realizar el barrido de temperatura se ha utilizado un generador de rampas lineales de voltaje basado en un conversor digital-analógico diseñado y construido en este laboratorio (López-Mayorga, 1983). Esta señal creada por el generador es utilizada como referencia por un controlador proporcional de potencia. Este controlador compara dicha señal con la señal analógica de salida de un termómetro Lauda R 42/2 y suministra al baño una potencia proporcional hasta que la diferencia entre ambas señales se anula. La sonda del termómetro se encuentra sumergida en el tampón de disolución de la muestra dentro de un tubo eppendorf con el fin de medir la temperatura real de la muestra.

2.- Una vez realizado el barrido de temperatura y que todas las muestras han estado al menos durante 15 minutos en el baño de hielo se procede a la solubilización diferencial. Como cada sistema de proteínas presenta unas propiedades de solubilización diferentes no se han podido utilizar las condiciones descritas en la bibliografía y se ha tenido que realizar un estudio previo para determinar las condiciones óptimas de solubilización diferencial en nuestro sistema de membrana miélnica. Después de realizar un estudio a diferentes condiciones se decidió utilizar como detergentes solubilizantes el colato sódico y el Triton X-100; este estudio, así como las condiciones para cada detergente, se describirán más adelante en el Apartado de Resultados (IV. 2). Un esquema del procedimiento de solubilización es el siguiente: Se añaden 50 μ l de la disolución adecuada de detergente a los 150 μ l de mielina en el mismo tubo eppendorf y se agita brevemente para mezclar el contenido; posteriormente se sonica el tubo en un baño de sonicación durante un tiempo corto (entre 45 y 90 segundos, según el detergente utilizado) y seguidamente se centrifuga a 17.000 rpm durante 15 minutos en cámara fría en una centrífuga modelo Crist Haemofuge para

obtener el solubilizado.

3.- El solubilizado obtenido en el paso anterior va a contener sólo las proteínas que permanecen nativas a esa temperatura, excepto la PBM que se solubiliza a todas las temperaturas no presentando una solubilidad diferencial en las condiciones estudiadas; esto es posiblemente debido a que la PBM es una proteína semiextrínseca y no presenta diferencias de solubilidad entre su estado nativo y el desnaturalizado. Para la realización de la electroforesis en gel de SDS-PA se toman 50 μ l del solubilizado y se mezclan con 50 μ l de tampón de muestra de electroforesis (ver Apartado de Métodos) y se añaden 10 μ l de una disolución de 0,5 mg de anhidrasa carbónica/ml que se utiliza como patrón interno para normalizar las intensidades de banda de las diferentes calles en la electroforesis. Una vez realizada la mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realiza la electroforesis pinchando 40 μ l de la mezcla por calle, tal y como se describe en el Apartado de Métodos III. 2.5.6.

4.- Una vez terminada la electroforesis, y después de haber teñido y desteñido el gel, se seca y plastifica este gel (ver apartado de Métodos) para poder realizar la densitometría de todas las calles. Como se ha explicado con anterioridad, las medidas de densitometría se han efectuado en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-70 a 600 nm y promediando 10 lecturas por milímetro; las áreas de los picos se han obtenido por integración directa del aparato después de restar línea base. Las áreas de cada proteína así obtenidas se dividen por el área de la banda de anhidrasa carbónica de la calle correspondiente para corregir posibles errores al pinchar las muestras o en el proceso de tinción y destinción. Estos datos finales se han tratado mediante un programa general de ajuste no lineal de mínimos cuadrados amablemente cedido por el Dr. E. Freire de la Johns Hopkins University (EE.UU.); este

programa es general y permite al usuario crear distintos programas de ajuste no lineal por mínimos cuadrados para ecuaciones diferentes. En nuestro caso, hemos aplicado una ecuación deducida a partir del modelo cinético de dos estados para trazas irreversibles (Sánchez-Ruiz et al., 1988a) de la que se obtiene la temperatura a la cual la C_p es máxima, T_m , y así poder contrastarla con la temperatura del máximo en la transición de desnaturalización de los experimentos realizados por CDB.

III. 2.6.3. Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier

III. 2.6.3.1. Introducción

La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, FT-IR, se basa en los principios de la interferometría y de la transformación de Fourier para presentar una serie de ventajas sobre la espectroscopía infrarroja convencional (dispersiva). Mientras que ésta última irradia a la muestra con un intervalo estrecho de longitudes de onda secuencialmente hasta completar el intervalo espectral deseado, la espectroscopía FT-IR irradia la muestra con todo el intervalo espectral de longitudes de onda simultáneamente. Esta técnica de FT-IR presenta fundamentalmente dos ventajas sobre la espectroscopía infrarroja convencional:

1- Aumento de la sensibilidad y de la velocidad (ventaja de Fellgett). Como se ha dicho al principio del apartado, en la técnica de FT-IR se trabaja con todas las longitudes de onda a la vez, por lo que el tiempo que se tarda en obtener un espectro es mucho menor que en la técnica convencional. Esto permite realizar estudios cinéticos y trabajar con muestras inestables (por ejemplo, proteínas a temperaturas altas). Además, de esta forma, se puede

conseguir un aumento de la relación señal/ruido para un mismo tiempo de experimentación ya que el número de espectros que se puede tomar es mucho mayor, con lo que se mejora dicha relación señal/ruido. Debido a que la señal es siempre la misma pero el ruido es aleatorio, al promediar un mayor número de espectros se mejora la relación señal/ruido, siendo ésta proporcional a la raíz cuadrada del número de espectros promediados.

2- Mayor rendimiento óptico (ventaja de Jaquinot). La técnica FT-IR no necesita rendijas para obtener pequeños intervalos de longitudes de onda, por lo que la superficie de incidencia de la fuente luminosa sobre la muestra es mucho mayor. De esta forma, la intensidad de luz que llega a la muestra es mayor y, así, la sensibilidad aumenta. Sólo por esta ventaja la técnica de FT-IR puede llegar a ser unas 2000 veces más sensible que la técnica convencional.

Además, los espectrofotómetros de FT-IR utilizan un láser (de HeNe) para controlar la posición del espejo móvil; como se conoce con exactitud la longitud de onda del láser, ésta constituye una referencia interna de longitud de onda, determinando las bandas con gran precisión (de $\pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$ en números de onda).

III. 2.6.3.2. Instrumentación

En la Figura III. 2.8 se observa un esquema de los elementos fundamentales de un espectrofotómetro de FT-IR. Este presenta tres elementos fundamentales:

- 1 - Una fuente luminosa (FL).
- 2 - Un interferómetro de Michelson (IM).
- 3 - Un detector (D).

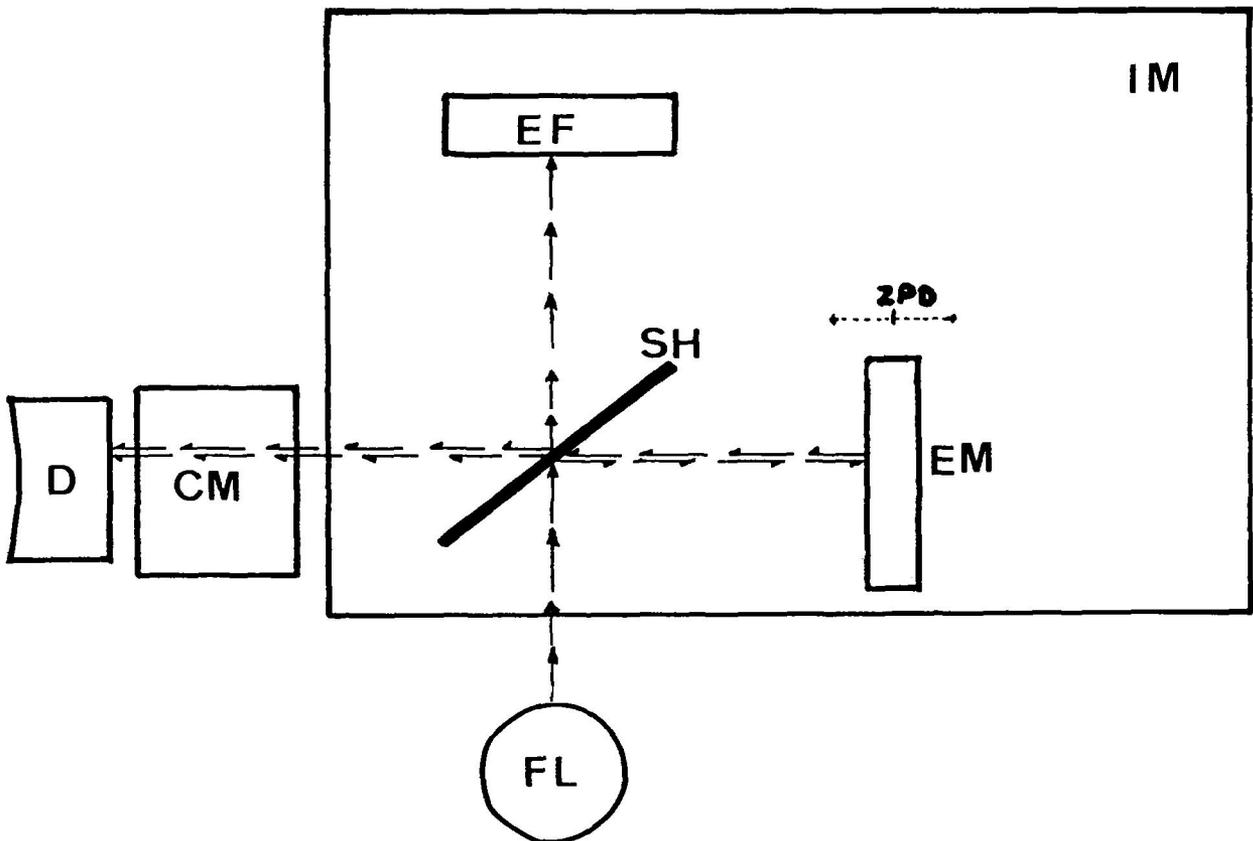


FIGURA III. 2.8: Esquema de los elementos fundamentales que componen un espectrofotómetro de FT-IR. CM, cámara de muestra, D, detector, EF, espejo fijo, EM, espejo móvil, FL, fuente luminosa, IM, interferómetro de Michelson, SH, separador de haces. ZPD representa el lugar en el que EM dista lo mismo de SH que éste de EF; se indica además el desplazamiento de EM como retardo máximo (ver texto).

1 - La fuente luminosa es policromática, similar a la de los espectrofotómetros convencionales, e irradia un haz luminoso con todas las longitudes de onda dentro del intervalo de infrarrojo. Por lo general y para el Nicolet 20SXB, el intervalo de números de onda emitido está entre 4000 y 1000 cm^{-1} .

2 - El interferómetro de Michelson está formado por un separador de haces y dos espejos, uno fijo y otro móvil; esta parte del espectrofotómetro reemplaza al monocromador de los espectrofotómetros convencionales. El espejo móvil tiene que desplazarse con una velocidad constante por lo que hay que minimizar su rozamiento; en el Nicolet 20SXB este espejo está suspendido por un colchón de aire.

La luz policromática de la fuente luminosa incide en el separador de haces, el cual es un espejo semirreflectante que, idealmente, refleja sobre el espejo fijo el 50% de la radiación incidente y el otro 50% lo transmite incidiendo sobre el espejo móvil. Tanto el espejo móvil como el fijo reflejan toda la radiación que les llega, la cual se recombina de nuevo en el separador de haces. Es aquí donde se producen las interferencias constructivas y destructivas dependiendo de la posición del espejo móvil con respecto al espejo fijo. Así, cuando la diferencia entre las distancias del separador de haces a los espejos fijo y móvil es $n/4$ ($n = 0$ ó número par) veces la longitud de onda, se creará una interferencia constructiva y el detector mide una intensidad máxima para esa determinada longitud de onda. Para el caso de que esta distancia sea de $n/4$ ($n =$ número impar) veces la longitud de onda, la interferencia será destructiva y el detector no medirá nada para esa longitud de onda (hay que tener en mente que se trabaja con todas las longitudes de onda a la vez). De esta forma se crea un haz de longitudes de ondas moduladas sinusoidalmente, cuyas frecuencias vienen determinadas por la velocidad con la que el espejo móvil se desplaza. A esta resultante se le denomina interferograma (Figura III. 2.9). Este interferograma contiene

toda la información acerca de la emisión de la fuente. Este haz resultante atraviesa la célula donde la muestra absorbe selectivamente determinadas longitudes de onda y, posteriormente, incide sobre el detector. Así, el detector medirá el interferograma afectado por la absorción de la muestra.

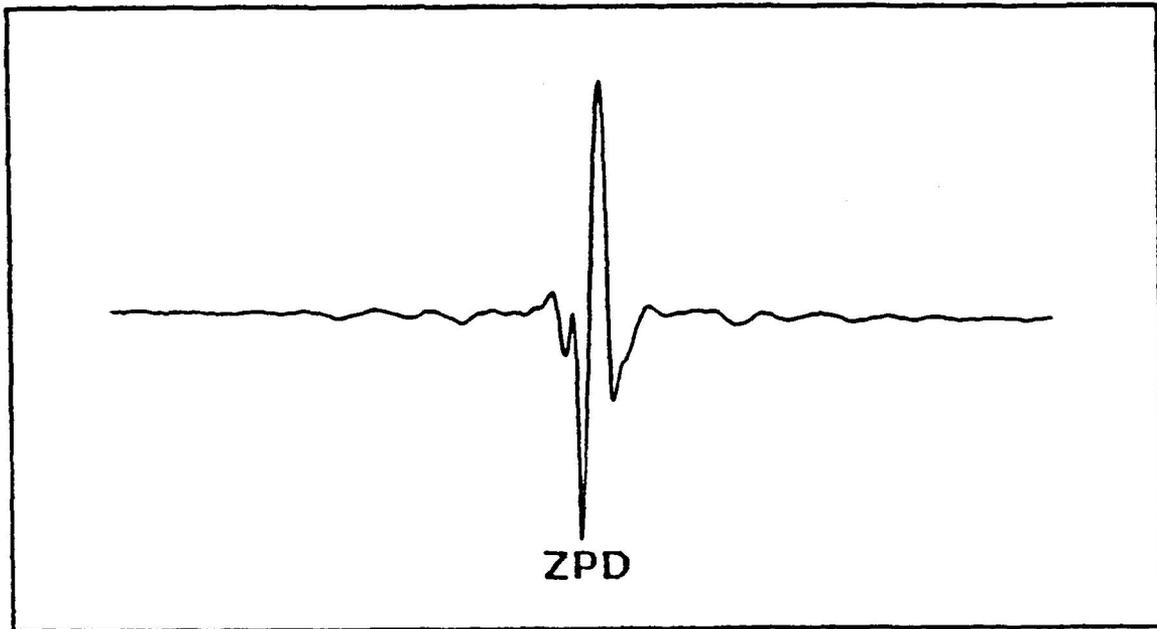


FIGURA III. 2.9: Representación de un interferograma obtenido en un espectrofotómetro de FT-IR. ZPD, corresponde al punto del espejo móvil equidistante al separador de haces con respecto al espejo fijo, donde todas las longitudes de onda se suman.

3 - El detector es muy distinto al de los espectrofotómetros convencionales de infrarrojo. En los espectrofotómetros de FT-IR el detector tiene que distinguir una modulación de la intensidad en función del tiempo (del desplazamiento del espejo móvil); esta intensidad varía del orden de unas 1000 veces por segundo, por lo que el tiempo de respuesta del detector tiene que ser muy corto. Hay dos tipos de detectores: los térmicos y los cuánticos. En el caso del Nicolet 20SXB el detector es de tipo térmico, denominado TGS (triglicina sulfato). La respuesta del detector es la suma de todas las longitudes de onda, sinusoidalmente moduladas, presentes dentro del intervalo de la fuente luminosa. La respuesta en el punto ZPD, posición del espejo móvil en la que éste se encuentra a igual distancia del separador de haces que éste lo está del espejo fijo, es máxima ya que es el único punto en el que todas las longitudes de onda están en fase simultáneamente.

La resolución en un espectrofotómetro FT-IR viene determinada por la longitud que se desplaza el espejo móvil respecto del punto ZPD, cuanto mayor sea este recorrido mayor será la resolución. Este fenómeno sucede ya que la transformada de Fourier solamente puede distinguir dos frecuencias distintas si existe una diferencia en sus ondas moduladas; así, si dos frecuencias son similares también lo serán sus ondas moduladas y sólo se apreciará esta diferencia si el espejo se desplaza un espacio mayor. En los experimentos realizados en esta Memoria se ha trabajado con un retardo máximo, δm , de 0,5 cm (desplazamiento del espejo con respecto al punto ZPD), por lo que la resolución en los espectros es de 2 cm^{-1} .

Si un aparato de FT-IR está bien diseñado, el ruido existente se debe al detector y puede disminuirse acumulando interferogramas. Estadísticamente el ruido disminuye con la raíz cuadrada del número de interferogramas tomado para cada experimento; en nuestro caso se ha escogido tomar 400 interferogramas con el fin de disminuir el ruido pero no alargar excesivamente el tiempo de experimentación.

III. 2.6.3.3. Espectroscopía de FT-IR de proteínas

La aplicación de la espectroscopía infrarroja al estudio de las moléculas biológicas en su medio acuoso natural se ha visto grandemente dificultada durante mucho tiempo debido a la fuerte absorción que presenta la molécula del agua en la zona del infrarrojo (Figura III. 2.10). Esta dificultad se ha podido solucionar mediante el empleo de la espectroscopía de FT-IR que, como se ha explicado anteriormente, permite aumentar en gran medida la relación señal/ruido; así, se pueden restar espectros con gran precisión y distinguir la señal debida a la muestra dentro de un gran fondo de la referencia.

Como se observa en la Figura III. 2.10, el agua absorbe fundamentalmente en tres zonas del intervalo de infrarrojo; de ellas, la banda que absorbe alrededor de 1640 cm^{-1} es de gran importancia en el estudio biológico, ya que las proteínas presentan una zona de absorción entre $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ (amida I) de la que se puede obtener información sobre su estructura secundaria. Además esta banda del agua varía sensiblemente con cambios en la temperatura, pH, fuerza iónica,... lo cual obliga a que los espectros de referencia y de muestra se hagan en condiciones lo más parecidas para poder hacer una resta correcta.

La banda del agua, que se debe a la flexión y tensión del enlace O-H, se puede desplazar hacia números de onda menores usando D_2O como disolvente en vez de H_2O . Esto permite detectar mejor la señal de la amida I, por lo que hay gran cantidad de estudios de proteínas realizados en D_2O (Lee et al., 1985; Arrondo et al., 1987; Surewicz et al., 1987a; Surewicz et al., 1987b; Jackson et al., 1989), aunque hay que tener en cuenta que la deuteración debe ser completa y, en cualquier caso, se está alterando el medio natural de la proteína.

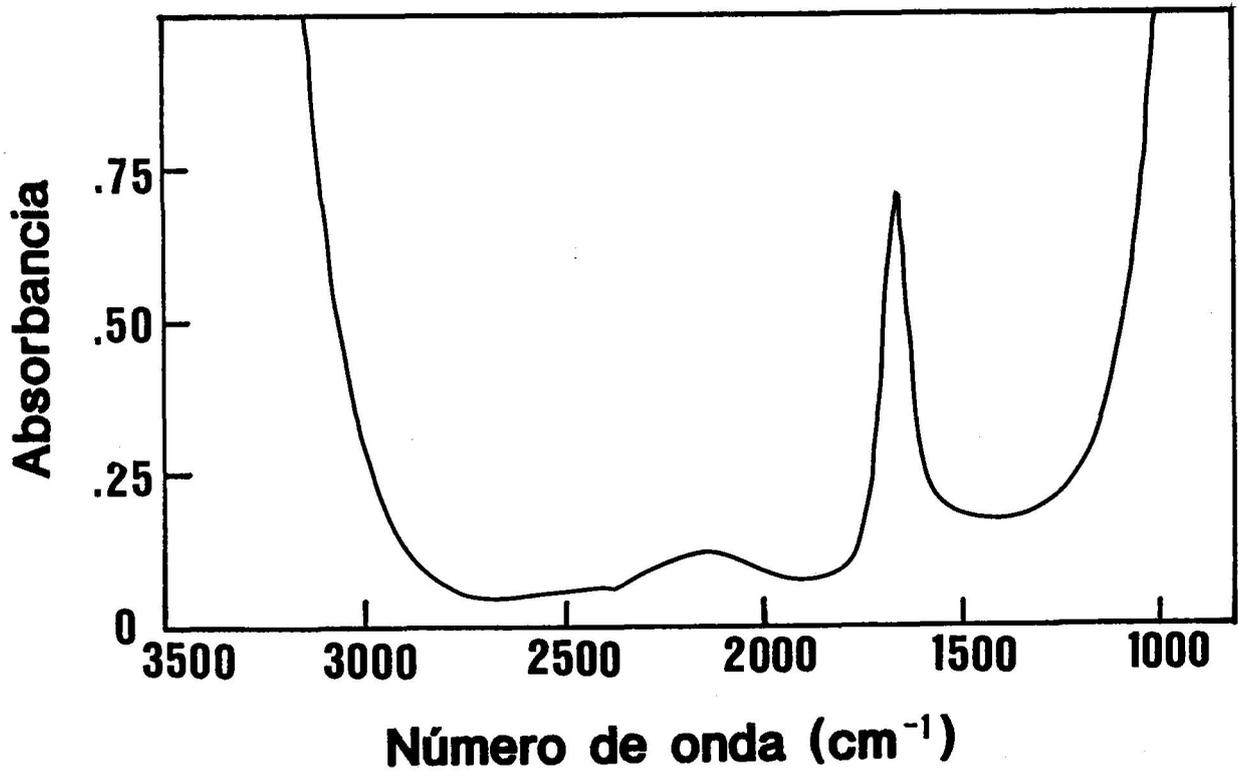


FIGURA III. 2.10: Espectro de FT-IR entre 800 y 3500 cm⁻¹ de agua destilada a 20 °C. Se han tomado 400 barridos con una resolución de 2 cm⁻¹.

La banda amida I se debe fundamentalmente a la tensión del C=O (en un 80%) y a la tensión del C-N y la flexión del C=O, todas ellas en el enlace peptídico (Krimm y Bandekar, 1986). La vibración de estos enlaces se ve afectada por la presencia de puentes de hidrógeno, variando sus frecuencias características según la estructura secundaria que adopte la proteína. En la Tabla III. 2.1 se indican las frecuencias características para cada tipo de estructura secundaria de proteínas tanto en H₂O como en D₂O (Dong et al., 1990).

TABLA III. 2.1

Números de onda característicos de la banda amida I para distintas estructuras secundarias de proteínas (Dong et al., 1990).

ESTRUCTURA	AMIDA I EN H ₂ O (cm ⁻¹)	AMIDA I EN D ₂ O (cm ⁻¹)
Hélice α	1656 \pm 2,0	1650-1655
Estructura β	1624 \pm 0,5 1638 \pm 1,0	1630-1640 1680-1690
Giros	1666 \pm 1,0 1672 \pm 1,0 1680 \pm 1,0	1670-1680
Desordenada	1650 \pm 1,0	1644

Como se observa en la Tabla III. 2.1, las frecuencias características de cada tipo de estructura se encuentran muy próximas entre sí y, debido a que suelen ser bandas bastante anchas, se suelen solapar llegando a formar una única banda en la que aquéllas son prácticamente indistinguibles. De esta forma, hasta hace pocos años, se determinaba la estructura secundaria de las proteínas a partir de la forma global de la banda que engloba todas las componentes (banda amida I), por lo que la información así obtenida era solamente cualitativa y a menudo bastante imprecisa. Un gran avance para superar este problema y poder resolver la estructura proteica por espectroscopía infrarroja ha sido el desarrollo de procedimientos computacionales para el aumento de la resolución de las bandas anchas obtenidas por esta técnica. Estos métodos de "*estrechamiento de bandas*" permiten descomponer las complejas bandas amida en sus diferentes componentes. Susi y Byler (Susi y Byler, 1983) fueron los primeros en aplicar estos métodos de aumento en la resolución a los espectros de infrarrojo de proteínas. Hay que matizar que este tipo de tratamiento de datos no aumenta la resolución instrumental sino que aumenta las diferencias de los componentes ya resueltos en la medida, haciendo más fácil su localización. Los métodos más usuales para el aumento en la resolución de estas bandas son la autodeconvolución de Fourier y la segunda o cuarta derivada del espectro de absorción o de su transformada de Fourier (Cameron y Moffatt, 1987; Surewicz y Mantsch, 1988; Braiman y Rothschild, 1988; Dong et al., 1990).

Los estudios de la dinámica molecular han demostrado que la relajación vibracional se puede expresar como una banda lorenziana (Oxtoby, 1981):

$$A(\nu) = A_0 \tau^2 / [\tau^2 + (\nu - \nu_0)^2]$$

donde A_0 es la absorbancia máxima de la banda, ν_0 es el número de onda para A_0 y τ es la anchura media del pico a media altura. La autodeconvolución de Fourier de esta ecuación nos conduce a una expresión con un término de decaimiento exponencial, de tal forma que cuanto

mayor sea el valor de τ mayor es el término de decaimiento en la autodeconvolución (Surewicz y Mantsch, 1988). Por lo tanto, si al término de decaimiento se le multiplica por un factor determinado, la anchura de la nueva banda (τ') disminuirá, definiéndose el factor de aumento de resolución como: $K = \tau/\tau'$.

Otro método de aumento de resolución en infrarrojo es el desarrollo de la segunda o cuarta derivada tanto del espectro de absorción como de su transformada de Fourier (Cameron y Moffatt, 1987; Surewicz y Mantsch, 1988), ya que al realizar derivadas pares los puntos de inflexión se convierten en máximos haciéndose mucho más visibles.

Gracias a estos dos métodos de tratamiento de datos se pueden observar con mayor claridad las frecuencias características de los diferentes tipos de estructura secundaria que presenta la proteína problema, como se ilustra en la Figura III. 2.11. De todas formas hay que tener en cuenta que estos métodos explicados distorsionan el espectro original y aumentan el ruido o los picos de vapor de agua existentes en el espectro resta.

Estos métodos permiten la identificación de las estructuras presentes en la proteína, pero solo de una forma cualitativa, ya que al procesar los datos se producen distorsiones en la forma del espectro y se estrechan las bandas que forman la envolvente. De todos modos se están desarrollando programas de ajuste de curvas para, una vez conocidos los números de onda de los picos, descomponer el espectro en las bandas correspondientes a cada tipo de estructura y poder determinar su contribución en tanto por ciento a la estructura total (Surewicz et al., 1987a; Surewicz et al., 1987b; Surewicz y Mantsch, 1988). Recientemente Dong y colaboradores (Dong et al., 1990) han publicado un método para determinar la contribución de cada tipo de estructura secundaria midiendo el área de los picos correspondientes de la segunda derivada, habiéndolo experimentado con éxito para 12 proteínas globulares. De todas formas, estas determinaciones cuantitativas de estructura secundaria todavía son tema de polémica en los congresos internacionales, ya que diferentes

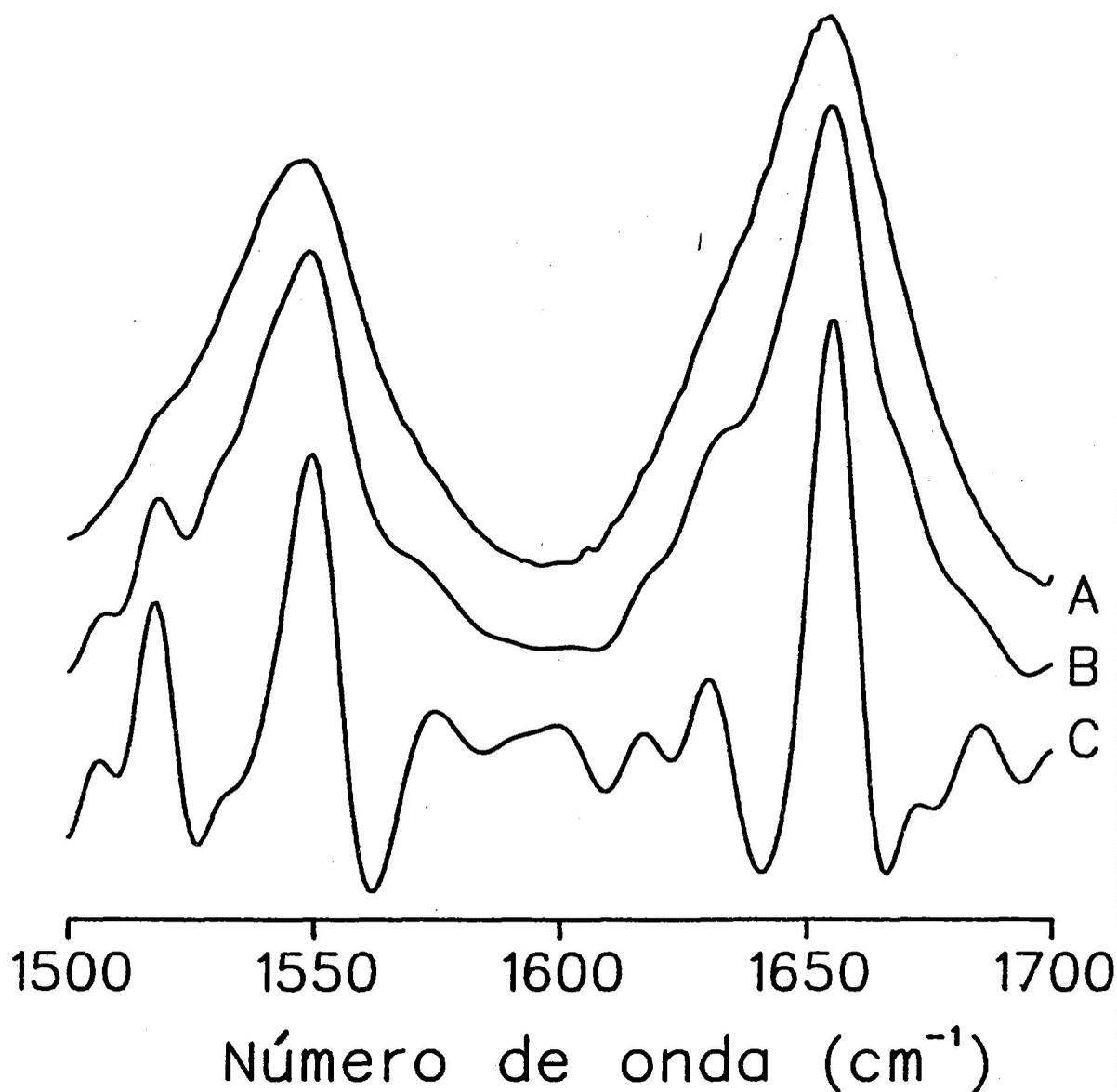


FIGURA III. 2.11: Espectro de FT-IR entre 1500 y 1700 cm^{-1} de la membrana mielínica en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 20 °C, (A) después de restar el espectro del tampón acuoso; (B) autodeconvolución de Fourier del espectro resta en la que se ha utilizado una anchura media de la banda lorentziana standar de 19,5 cm^{-1} y un factor de aumento de resolución, K, de 1,9; (C) cuarta derivada de la transformada de Fourier del espectro resta con una apodización del 22%.

descomposiciones pueden dar ajustes muy similares. Además, para este procesamiento de datos hay que suponer que las absorbancias intrínsecas de cada tipo de estructura dentro de la amida I son semejantes, hecho aún no demostrado.

III. 2.6.3.4. Experimento de FT-IR

Para la realización de un experimento de FT-IR hay que tomar dos espectros diferentes: de fondo y de referencia o de muestra. Todos ellos tienen que realizarse en las mismas condiciones para optimizar la señal (resolución, número de interferogramas,...).

El espectro de fondo se realiza sin interponer nada al paso del haz de luz en la cámara de muestra; así se obtiene el espectro de la fuente luminosa, es decir, la intensidad de luz incidente para todo el intervalo de longitudes de onda.

Tanto el espectro de referencia como el de muestra se realizan interponiendo una célula para líquidos, que contendrá la referencia o la muestra, entre el interferómetro de Michelson y el detector. De esta forma se obtiene información de la intensidad transmitida bien por la referencia, bien por la muestra. Como la transmitancia es el cociente entre la luz incidente y la luz transmitida, siempre hay que dividir, tanto el espectro de referencia como el de muestra, por el espectro de fondo.

Una vez obtenidos los espectros de referencia y de muestra en transmitancia se procede a la resta del componente de la referencia en la muestra. Para ello se resta al espectro de muestra el espectro de referencia multiplicado por un factor, entre 0 y 1, que se considere el más adecuado; para tal fin se toma como criterio el anular la absorbancia en la zona entre 1700 y 1900 cm^{-1} , en la que absorbe el agua y no la proteína; hay que tener en cuenta que si se trabaja con lípidos, en la zona de 1800 cm^{-1} hay absorción debido a los grupos carbonilos (Jackson et al., 1989).

En este trabajo la referencia ha sido siempre tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0); debido a que el agua absorbe fuertemente en la zona de la amida I hay que escoger un factor de multiplicación de la referencia lo más adecuado posible. El criterio que se ha seguido para ello ha sido que la zona entre 1800 y 1900 del espectro resta quede plana ya que en esa zona la muestra no absorbe radiación. Se han realizado espectros de referencia para cada temperatura de trabajo de la muestra porque el espectro del agua se ve afectado fuertemente por la temperatura.

También se ha registrado un espectro de vapor de agua para restárselo a los espectros de muestra en los que aparecen bandas características de vapor de agua, ya que estas bandas de vapor de agua aparecen en la zona de la amida I e interfieren para la determinación de la estructura de la proteína, especialmente al trabajar con la segunda o cuarta derivada, dado que son bandas muy agudas. Esto no ha sido necesario en todos los espectros ya que la cámara de muestra ha sido constantemente purgada con aire seco (ver Apartado de Materiales).

IV. RESULTADOS

IV. 1. PLP PURIFICADO POR DISOLVENTES ORGANICOS.

IV. 1.1. Introducción

Debido a que la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha con el PLP han utilizado métodos de obtención basados en disolventes orgánicos, también en este trabajo se ha purificado el PLP mediante disolventes orgánicos para verificar alguno de los resultados descritos en la bibliografía y contrastar lo obtenido de esta manera con los resultados del PLP purificado con detergentes. Especialmente se quería profundizar en el estudio de la transición térmica reversible, previamente obtenida en este laboratorio (Mateo et al., 1986), y asignada a la desnaturalización térmica reversible del PLP.

Para la purificación del PLP por disolventes orgánicos se ha utilizado sustancia blanca extraída de cerebro vacuno en el mismo día de la purificación (ver Apartado III. 1.2.). La purificación se ha llevado a cabo según Monreal (Monreal, 1975) y los pasos seguidos se detallan en el Apartado de Métodos (III. 2.2). Una vez obtenido el PLP purificado se liofiliza y el sólido obtenido se almacena a -20 °C, como así viene indicado en la bibliografía. La pureza del PLP en este liofilizado se ha comprobado mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PA) y se observa que la DM-20 aparece acompañando al PLP en una proporción considerable ya que ambas proteínas son muy similares y es muy difícil su separación (Trifilieff et al., 1986; Nave et al., 1987). La PBM no aparece prácticamente en estas preparaciones de PLP por disolventes orgánicos. Así, densitometrías de geles de

electroforesis indican un porcentaje mínimo de PLP del 75%, correspondiendo el resto fundamentalmente a DM-20 con cantidades despreciables de PBM. La proteína total constituye un 14% del peso seco del liofilizado, lo que indica una relación molar lípido/proteína de 240/1, suponiendo un peso molecular medio para los lípidos de 775.

IV. 1.2. CDB del PLP purificado por disolventes orgánicos

Los experimentos de CDB llevados a cabo con el PLP purificado por disolventes orgánicos se han realizado a una velocidad de barrido de 1 K/min. Una cantidad de este PLP, liofilizado y almacenado a -20 °C, se ha resuspendido en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) para obtener una concentración final de 5 mg de peso seco/ml (0,7 mg proteína/ml). Una vez resuspendido el PLP se han realizado los experimentos de CDB. Como se observa en la Figura IV. 1.1 se obtiene una transición endotérmica con una Td de 52 °C y totalmente reversible cuando se recalienta la misma muestra, análoga a la ya descrita en la bibliografía (Mateo et al., 1986).

Para comprobar en este caso la naturaleza de esta transición se han extraído los lípidos del liofilizado siguiendo el método de Santiago y colaboradores (Santiago et al., 1964) que se explica en Métodos (Apartado III. 2.5.3). Con los lípidos así obtenidos se ha realizado CDB en las mismas condiciones que las elegidas para el PLP obteniéndose una transición muy similar a la que se obtiene con el liofilizado aunque con una Td algo inferior, 48 °C, y una menor área bajo la curva (Figura IV. 1.2.). También en este caso se observa que la transición es totalmente reversible y la forma de la curva en ambas muestras (Figuras IV. 1.1 y IV. 1.2) es muy similar.

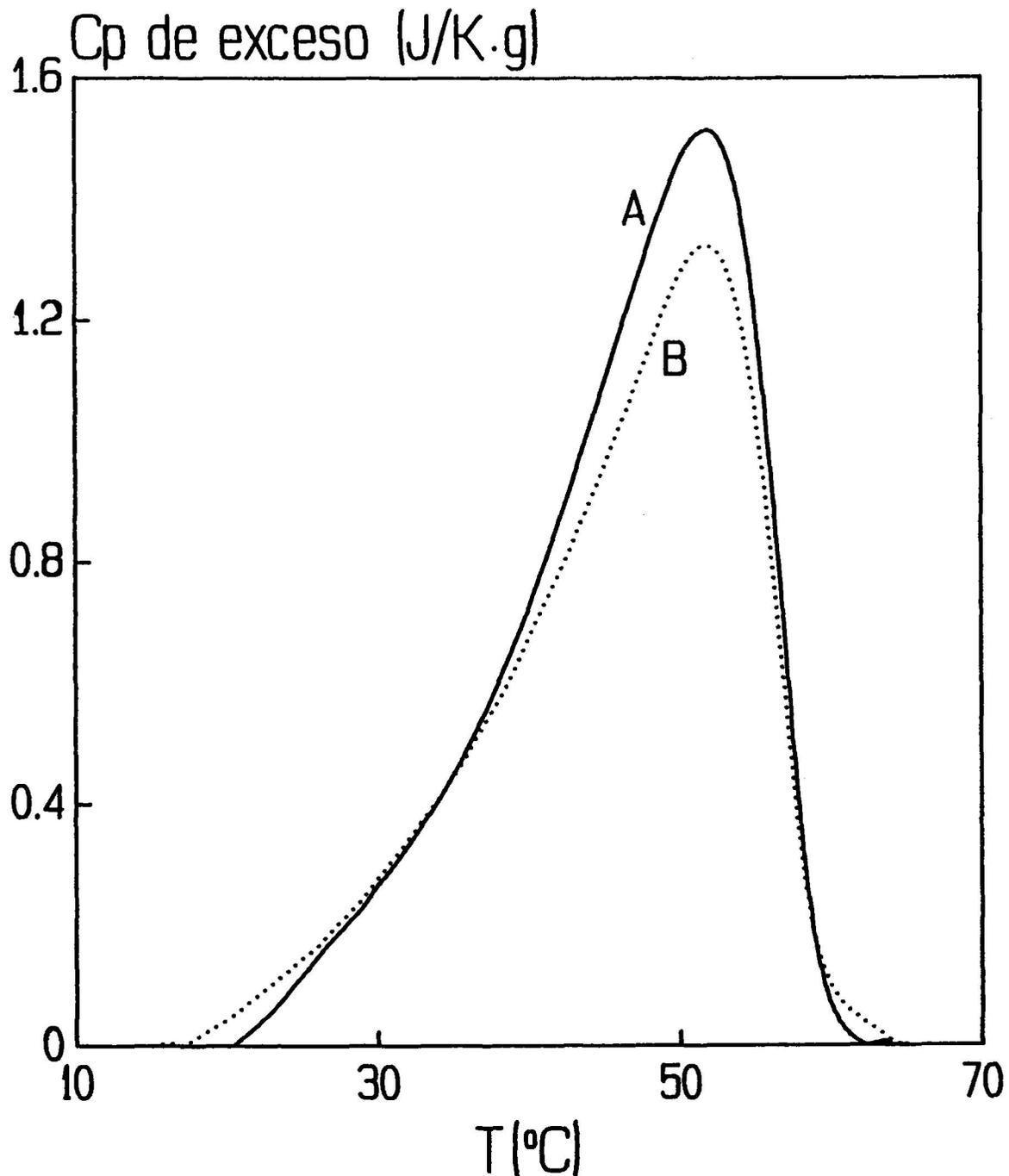


FIGURA IV. 1.1: Perfil de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondiente al PLP purificado por disolventes orgánicos (Monreal, 1975) y resuspendido en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). A, primer barrido; B, recalentamiento de la muestra. La velocidad de barrido es de 1 K/min. La concentración empleada es de 4,3 mg de lípido/ml y de 0,7 mg/ml de proteína. Los valores de Cp de exceso van referidos a g de lípido presente en la muestra.

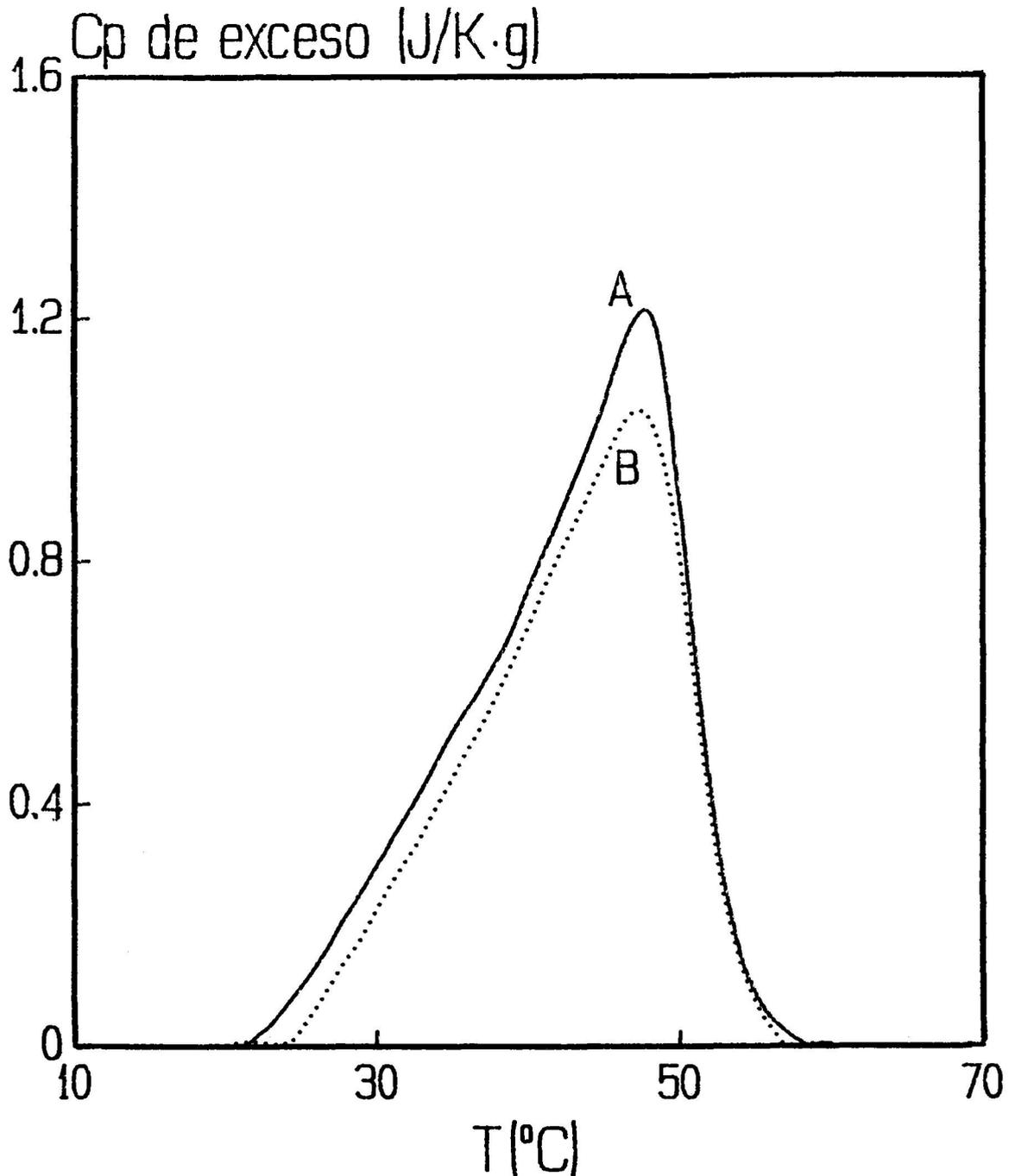


FIGURA IV. 1.2: Perfil de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondiente a los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos. Los lípidos se han resuspendido en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) para obtener una concentración de 5 mg/ml. A, primer barrido de la muestra, B, recalentamiento de la misma muestra. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

Debido a esta similitud entre ambas endotermas se ha realizado un estudio más detallado con el fin de intentar confirmar la aparente naturaleza lipídica de la endoterma obtenida con el PLP purificado con disolventes orgánicos, en contraposición a la naturaleza proteica anteriormente asignada (Mateo et al., 1986). De esta forma, se han realizado barridos de CDB, tanto del liofilizado como de los lípidos extraídos de él, añadiendo cantidades crecientes de colesterol. Para esto se han preparado disoluciones del liofilizado, del lípido extraído y de colesterol en cloroformo:metanol (2:1 v/v); se toma el volumen adecuado de cada disolución para la relación escogida (de liofilizado y colesterol o de lípido extraído y colesterol), se evapora el disolvente de la mezcla correspondiente en corriente de nitrógeno hasta sequedad y se tiene una noche en desecador para asegurarse de la eliminación de posibles trazas de disolvente. Posteriormente el resto sólido se resuspende en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se realiza el barrido de CDB. En las Figuras IV. 1.3 y IV. 1.4 se incluyen los resultados de CDB que corresponden a transiciones reversibles y donde se observa que el colesterol reduce la entalpía y la Td de la transición en ambos casos, liofilizado y lípidos extraídos (Figuras IV. 1.5 y IV. 1.6), lo cual es característico del efecto del colesterol en transiciones debidas a lípidos (Sturtevant, 1974; Mabrey et al., 1978). En las Tablas IV. 1.1. y IV. 1.2. se observa un comportamiento muy similar para ambos sistemas pero con algunas diferencias. En ambos casos disminuye la Td al aumentar la proporción de colesterol en la muestra, pero lo hace de una forma mucho más rápida para el caso de los lípidos extraídos. Lo mismo sucede con la entalpía, para el caso de los lípidos extraídos del liofilizado se llega a hacer prácticamente nula con un 22,5% (p/p) de colesterol, mientras que para el caso del liofilizado con un 37,5% (p/p) de colesterol todavía se observa la transición.

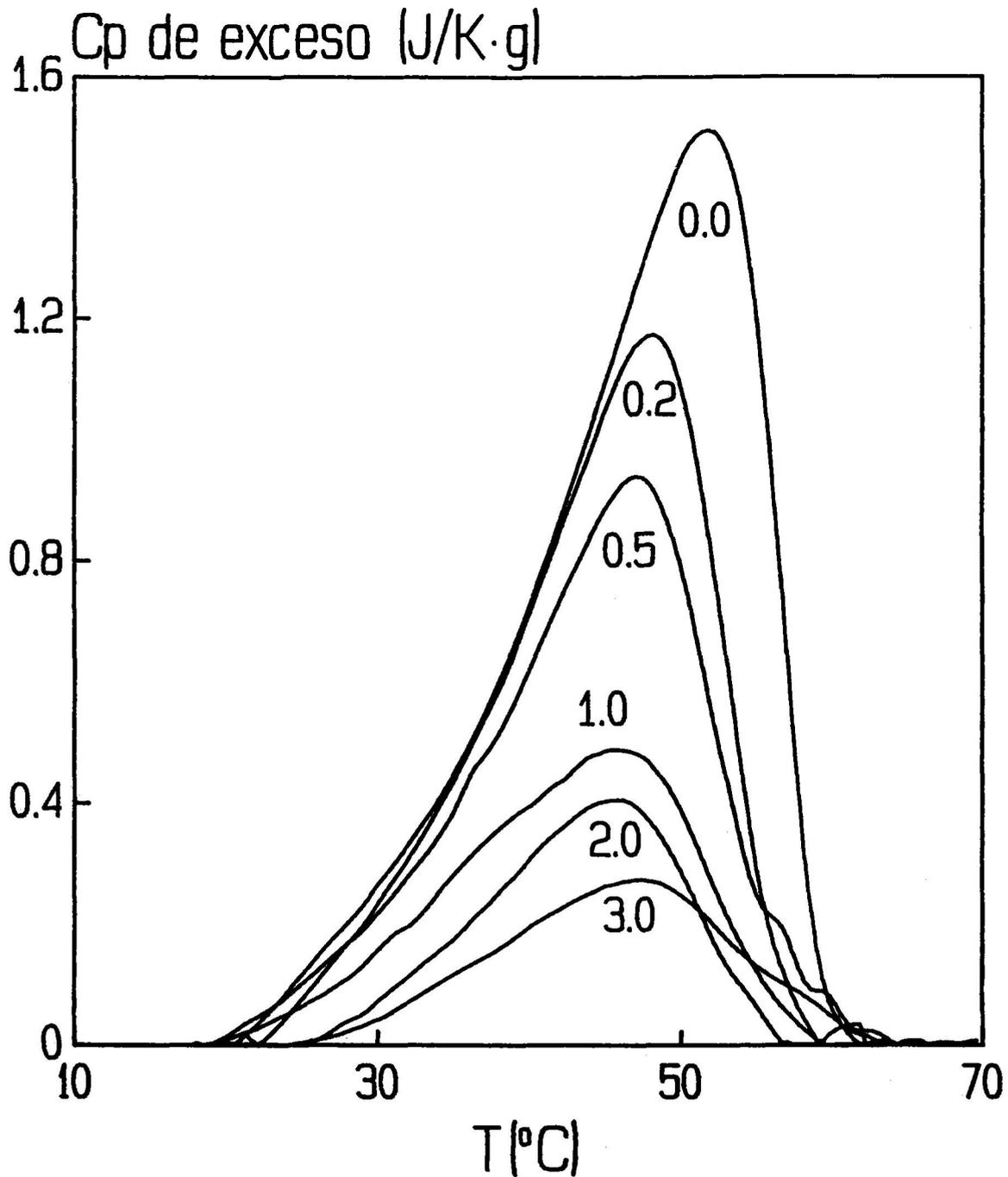


FIGURA IV 1.3: Perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondientes al PLP purificado por disolventes orgánicos en presencia de diferentes concentraciones de colesterol. El PLP se resuspende en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) para obtener una concentración de 4,3 mg de lípido/ml (0,7 mg PLP/ml). La concentración de colesterol correspondiente a cada perfil calorimétrico viene indicada en la figura en mg/ml. Los valores de C_p van referidos a g de lípido. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

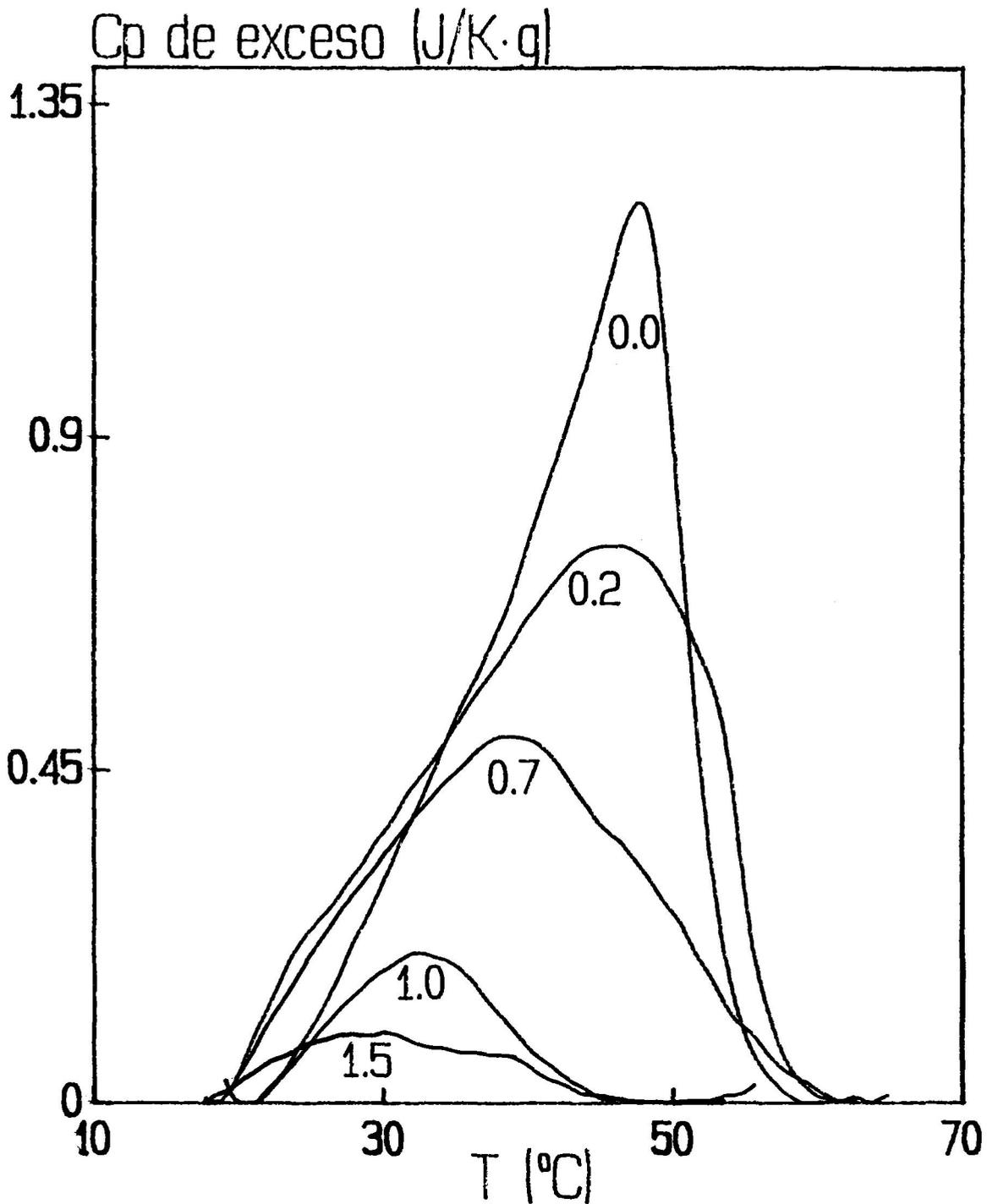


FIGURA IV. 1.4: Perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondientes a los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos en presencia de diferentes concentraciones de colesterol. El lípido se resuspende en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) para obtener una concentración de 5 mg/ml. La concentración de colesterol correspondiente a cada perfil calorimétrico viene indicada en la figura en mg/ml. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

TABLA IV. 1.1

Valores de la entalpía específica de la transición, Δh , en J/g de lípido, y de la temperatura del máximo, T_d , en °C, obtenidos para el liofilizado del PLP con distintos porcentajes en peso de colesterol. La velocidad del barrido de temperatura ha sido de 1 K/min. Al lado del porcentaje se indica la concentración del colesterol en mg/ml.

<u>Colesterol</u>		<u>Primer calentamiento</u>		<u>Segundo calentamiento</u>	
<u>%</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Td</u>	<u>Δh</u>	<u>Td</u>	<u>Δh</u>
0,0	0,0	51,9	27,6	51,9	25,0
4,4	0,2	48,2	20,8	47,0	18,3
0,4	0,5	47,0	17,1	46,5	13,7
18,9	1,0	45,9	10,4	44,5	7,9
31,7	2,0	45,4	8,2	45,2	5,9
41,1	3,0	47,3	5,3	45,0	2,9

TABLA IV. 1.2

Valores de la entalpía específica de la transición, Δh , en J/g, y de la temperatura del máximo, T_d , en °C, obtenidos para los lípidos extraídos del liofilizado de PLP con diferentes porcentajes en peso de colesterol. La velocidad de barrido de temperatura ha sido de 1 K/min. Al lado de los porcentajes se indica la concentración de colesterol en mg/ml.

<u>Colesterol</u>		<u>Primer calentamiento</u>		<u>Segundo calentamiento</u>	
<u>%</u>	<u>mg/ml</u>	<u>Td</u>	<u>Δh</u>	<u>Td</u>	<u>Δh</u>
0,0	0,0	47,7	18,3	47,4	18,2
3,9	0,2	45,7	17,8	44,6	10,5
12,3	0,7	38,0	13,1	38,4	5,9
16,7	1,0	32,1	2,6	32,6	2,1
23,1	1,5	30,1	1,6	30,1	1,5

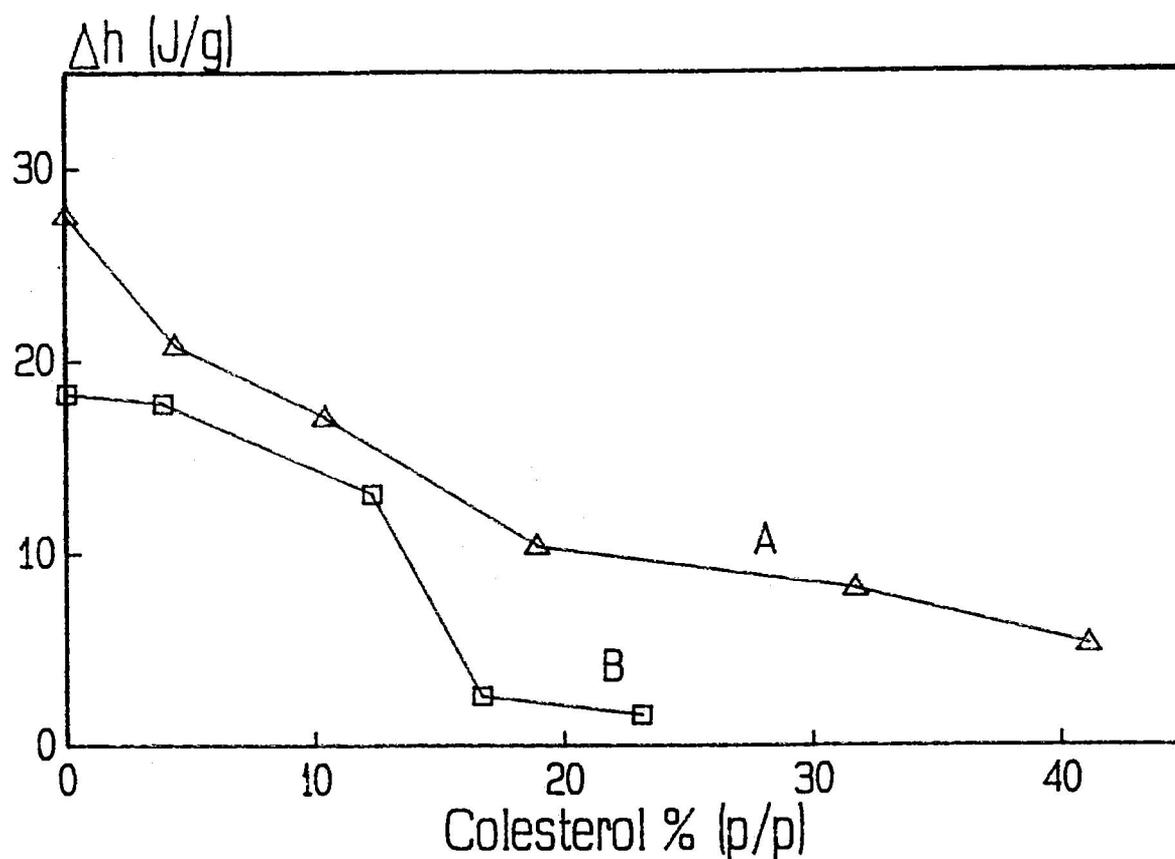


FIGURA IV. 1.5: Representación del incremento de entalpía específica (A) del PLP y (B) de los lípidos extraídos del PLP frente a la concentración de colesterol presente en la muestra. Los datos corresponden a los perfiles calorimétricos mostrados en las Figuras IV. 1.3 y IV. 1.4.

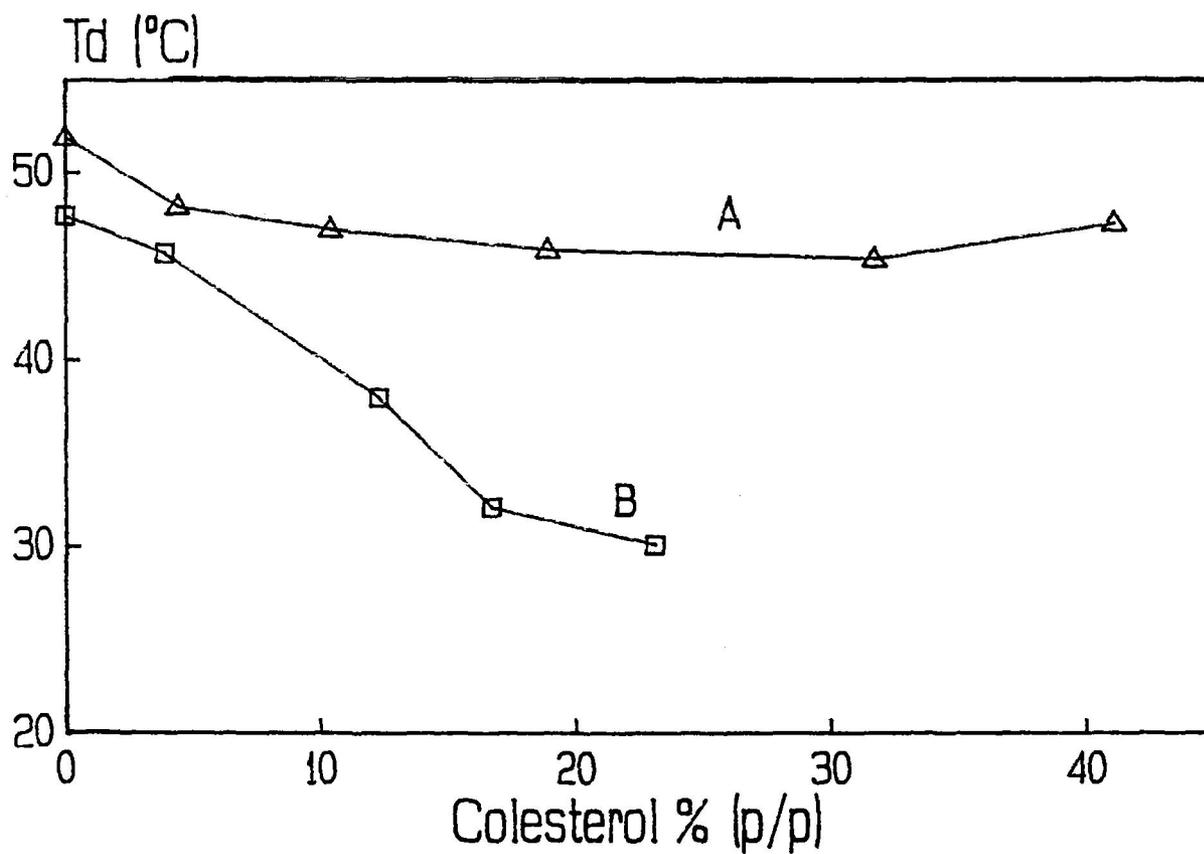


FIGURA IV. 1.6: Representación de la temperatura a la que la capacidad calorífica es máxima (A) del PLP y (B) de los lípidos extraídos del PLP frente a la concentración de colesterol presente en la muestra. Los datos corresponden a los perfiles calorimétricos mostrados en las Figuras IV. 1.3 y IV. 1.4.

Las entalpías de van't Hoff de los barridos de CDB, tanto del PLP purificado por disolventes orgánicos como del lípido extraído del liofilizado, se mantienen prácticamente iguales a medida que varía la proporción de colesterol en la muestra, aunque la entalpía de van't Hoff es ligeramente mayor en el caso de los lípidos extraídos del liofilizado (223 kJ/mol) que en el caso del PLP purificado por disolventes orgánicos (195 kJ/mol). La relación entre la entalpía de van't Hoff y la entalpía calorimétrica, r , es de 10 para el PLP purificado por disolventes orgánicos y de 15 para los lípidos extraídos del liofilizado, ambos en ausencia de colesterol. Según estudios previos (Sturtevant, 1974; Mabrey y Sturtevant, 1978), esta relación de entalpías, r , da una idea del número medio de moléculas lipídicas que sufren la transición a la vez, es lo que se conoce como **unidad cooperativa** en la transición. Por tanto la unidad cooperativa es menor en presencia de PLP (≈ 10 moléculas) que en ausencia del mismo (≈ 15 moléculas), lo que parece indicar que al interactuar la proteína con los lípidos disminuye la cooperatividad de éstos en la transición (Chapman et al., 1979; Goñi, 1987).

Estos datos parecen indicar que si bien la transición obtenida mediante CDB del PLP purificado con disolventes orgánicos se debe principalmente al componente lipídico presente en la muestra, hay un efecto aparente del PLP afectando en parte a esa transición con respecto a la obtenida sólo con los lípidos extraídos. Posiblemente se deba a interacciones del PLP con el medio lipídico, como se ha descrito en la bibliografía para la mayoría de las proteínas de membrana (Chapman et al., 1979; Goñi, 1987).

También es de reseñar que a medida que se añade colesterol, tanto al liofilizado como a sus lípidos extraídos, la reversibilidad tiende a disminuir ya que el Δh en el segundo calentamiento se va haciendo proporcionalmente menor, siendo más acusada la diferencia para el caso de los lípidos extraídos (Tablas IV. 1.1 y IV. 1.2).

También se ha realizado un análisis de lípidos (ver Apartado de Métodos 2.5.2), tanto de los lípidos extraídos del liofilizado de PLP como de los extraídos directamente de la sustancia blanca y de la mielina (Tabla IV. 1.3). Los datos obtenidos para los lípidos de sustancia blanca y de mielina coinciden con los descritos en la bibliografía (Norton y Cammer, 1984) llegando el colesterol a constituir aproximadamente una cuarta parte del peso seco de los lípidos en ambos sistemas.

TABLA IV. 1.3

Análisis bioquímico de los lípidos extraídos de sustancia blanca, de mielina y del liofilizado del PLP purificado por disolventes orgánicos. Los datos se dan en forma de tanto por ciento del peso seco de los lípidos totales y son el resultado de la media de al menos dos medidas independientes.

Procedencia del lípido	Colesterol (% p/p)	Fosfolípido (% p/p)	Galactolípido (% p/p)
Sustancia blanca	22,9	41,2	33,6
Mielina	21,7	42,6	32,6
Liofilizado de PLP	0,8	53,4	32,0

Se ha realizado también cromatografía en capa fina bidimensional (Figura IV. 1.7), en donde se observan ligeras diferencias entre los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos y los extraídos de la sustancia blanca. Estas diferencias no son muy apreciables debido a la limitación de sensibilidad de la técnica. De todas formas, se observa que en los lípidos extraídos del PLP hay menos variedad, especialmente se aprecia la carencia de plasmalógenos y de cerebrósidos. En estas cromatografías de capa fina no se aprecian diferencias significativas en el contenido de colesterol entre ambas muestras; esto puede ser debido a que el colesterol aparece con el frente de la elución y el frente puede encontrarse teñido por diversas impurezas de los eluyentes. En el Departamento de Química Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, el Dr. J. Ruiz Cabello ha realizado experimentos de HPLC de los lípidos de estas dos muestras (Figura IV. 1.8). Mediante esta técnica, mucho más sensible que la cromatografía en capa fina, se observa que los lípidos extraídos del PLP presentan menores cantidades de ácidos grasos y de fosfatidilcolina y esfingomielina que los lípidos extraídos de la sustancia blanca. La presencia de plasmalógenos y de colesterol es prácticamente nula en los lípidos extraídos del PLP, mientras que en los de sustancia blanca se encuentran en una alta proporción.

El hecho más notable de estos análisis de lípidos es que en los lípidos extraídos del liofilizado el colesterol es prácticamente inexistente, lo cual debe estar relacionado con el hecho de que dicho liofilizado dé lugar a una transición térmica en CDB. De hecho, y como ya se ha indicado, la adición de colesterol a estos lípidos (23% p/p) provoca que esta transición se ensanche y disminuya notablemente. Precisamente esta pequeña transición se asemeja mucho a la obtenida con lípidos tanto de la mielina como de la sustancia blanca (Figura IV. 1.9) cuyo contenido en colesterol es alrededor del 23% (Tabla II. 1.1). Por otra parte, dado lo ancho de estas transiciones, el error que se comete en el cálculo de su entalpía es mayor.

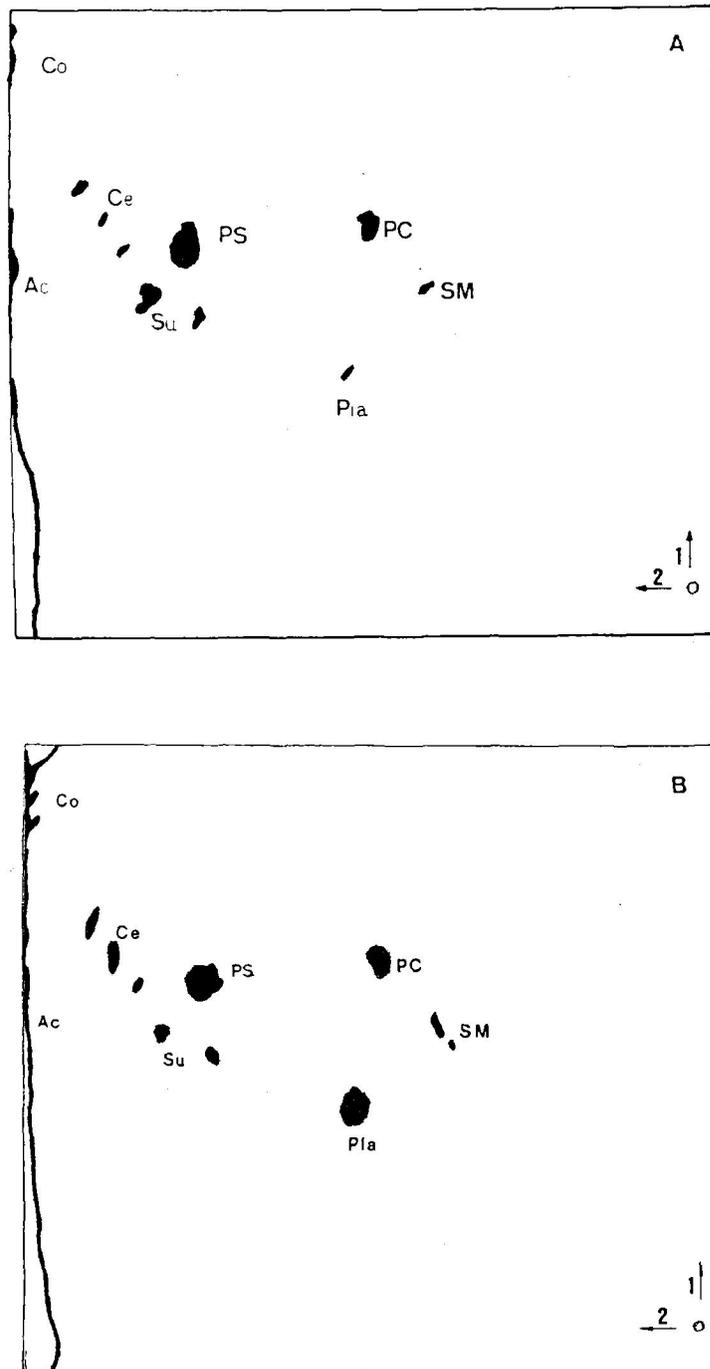


FIGURA IV. 1.7: Cromatografías bidimensionales en capa fina (A) de los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos y (B) de los lípidos extraídos de la sustancia blanca de cerebro vacuno. El primer desarrollo (1) se realiza con una mezcla de cloroformo:metanol:amoníaco (65:25:4 v/v); el segundo desarrollo (2), perpendicular al primero se efectúa con una mezcla de cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua (6:8:2:2:1 v/v). Los diferentes lípidos vienen indicados por las siguientes abreviaturas; Ac, ácidos grasos libres, Ce, cerebrósidos, Co, colesterol, PC, fosfatidilcolinas, PE, fosfatidiletanolaminas, Pla, plasmalógenos, SM, esfingomielinas, y Su, sulfátidos de cerebrósidos.

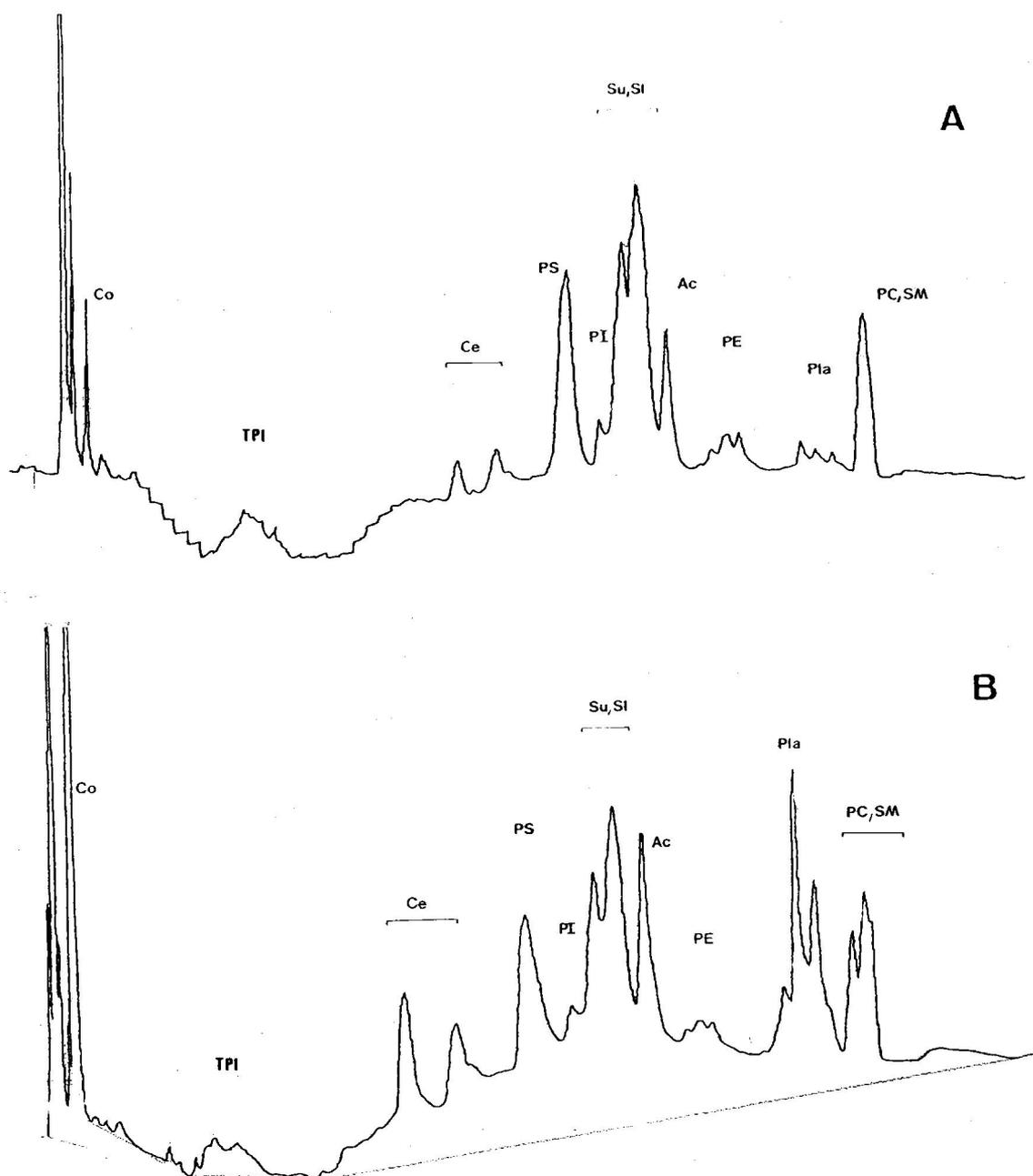


FIGURA 1.8.: Registros de HPLC en columna de fase normal (A) de los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos y (B) de los lípidos extraídos de la sustancia blanca de cerebro vacuno (Ruiz-Cabello, 1990). Los diferentes lípidos vienen indicados por la siguientes abreviaturas; Ac, ácidos grasos libres, Ce, cerebrósidos, Co, colesterol, PC, fosfatidilcolinas, PE, fosfatidiletanolaminas, PI, fosfatidilinositoles, Pla, plasmalógenos, PS, fosfatidilserinas, SI, sulfolípidos, SM, esfingomielinas, Su, sulfátidos de cerebrósidos y, TPI, trifosfoinositoles.

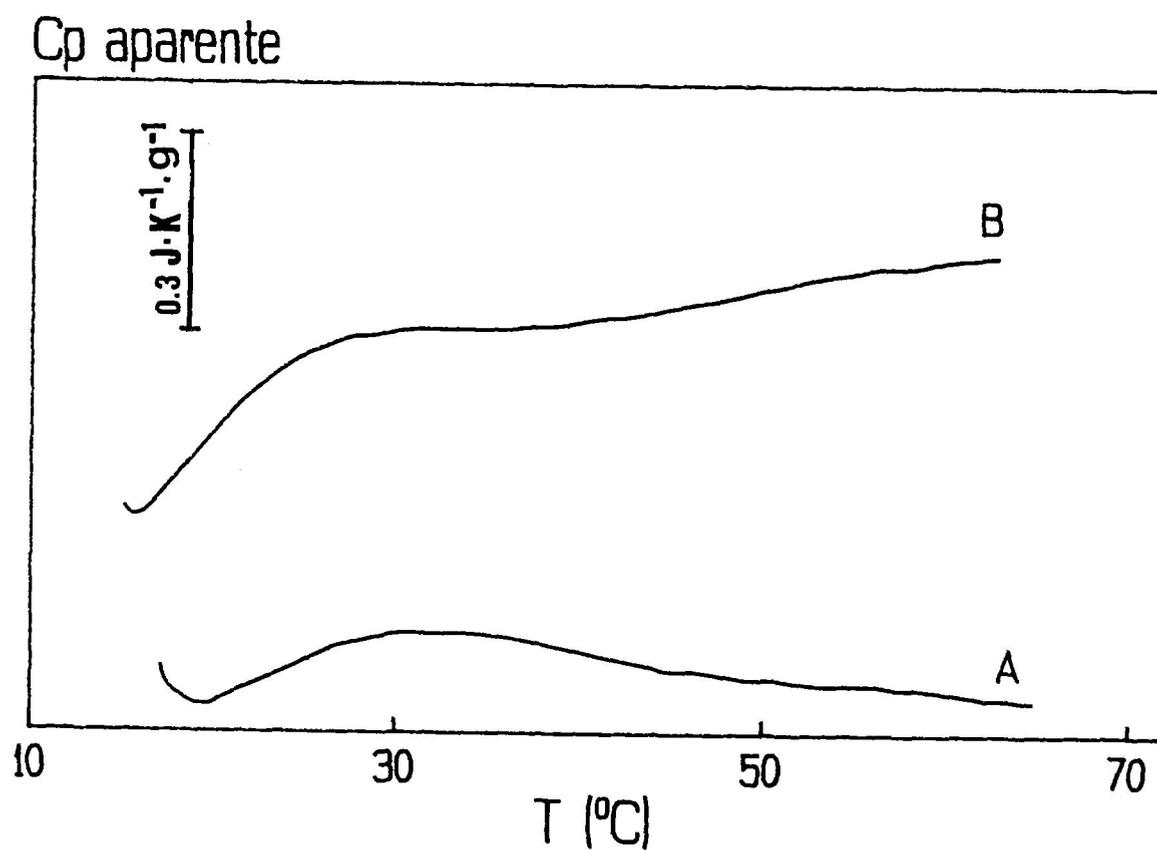


FIGURA IV. 1.9: Registros originales de CDB: (A) lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos en presencia de 1,5 mg/ml de colesterol (23% p/p); (B) lípidos extraídos de la sustancia blanca de cerebro vacuno. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

IV. 1.3. FT-IR del PLP purificado por disolventes orgánicos

Dentro del estudio propuesto en este Apartado sobre la transición térmica descrita para el PLP purificado por disolventes orgánicos, se han realizado experimentos de FT-IR en medio acuoso de dicho PLP. Para poder distinguir las bandas características de las diferentes estructuras secundarias existentes en la proteína se han empleado métodos ya descritos para tal fin, como son: la autodeconvolución de Fourier y la cuarta derivada de los espectros de FT-IR (Surewicz y Mantsch, 1988) (ver Apartado III. 2.6.3). Así, se observa que a 20 °C el PLP purificado por disolventes orgánicos presenta dos componentes en la banda amida I (entre 1600 y 1700 cm^{-1}), siendo los números de onda de los máximos de estas dos componentes 1655,6 y 1630,0 cm^{-1} (Figura IV. 1.10). Estas frecuencias son características de hélice α y estructura β , respectivamente (Dong et al., 1990). También se observa una pequeña componente a 1685 cm^{-1} , característica de giros β . Estos resultados concuerdan bastante bien con los obtenidos por otros autores para el apoproteolípido de mielina purificado por disolventes orgánicos (Surewicz et al., 1987a; Ayala et al., 1987; Carmona et al., 1988).

Los espectros de FT-IR obtenidos cuando el PLP se calienta hasta 60 °C no varían significativamente, pero si se sigue calentando hasta 80 °C y se enfría hasta 20 °C se observa que la componente de estructura β (1630,0 cm^{-1}) aumenta, mientras que la correspondiente a hélice α disminuye ligeramente (Figura IV. 1.11). Estos datos indicarían que el PLP sufre un cierto cambio conformacional irreversible en el intervalo de temperaturas entre 60 °C y 80 °C. La ausencia de manifestación energética de dicho cambio en CDB arroja dudas sobre una interpretación como debida a la desnaturalización térmica del PLP.

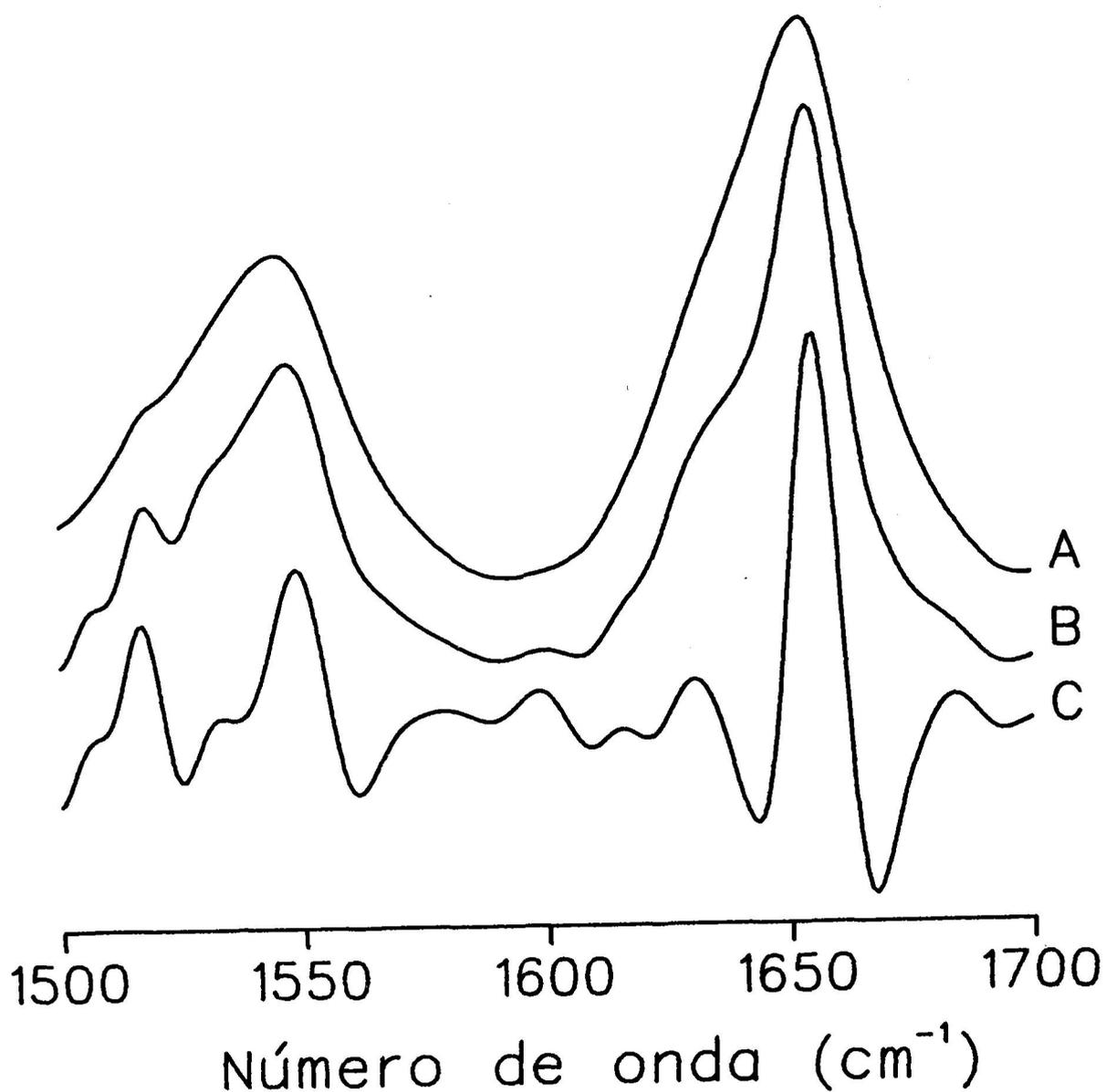


FIGURA IV. 1.10: Espectro de FT-IR entre 1500 y 1700 cm^{-1} del PLP purificado por disolventes orgánicos en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 20 °C, (A) después de restar el espectro del tampón acuoso; (B) autodeconvolución de Fourier del espectro resta; (C) cuarta derivada del espectro resta.

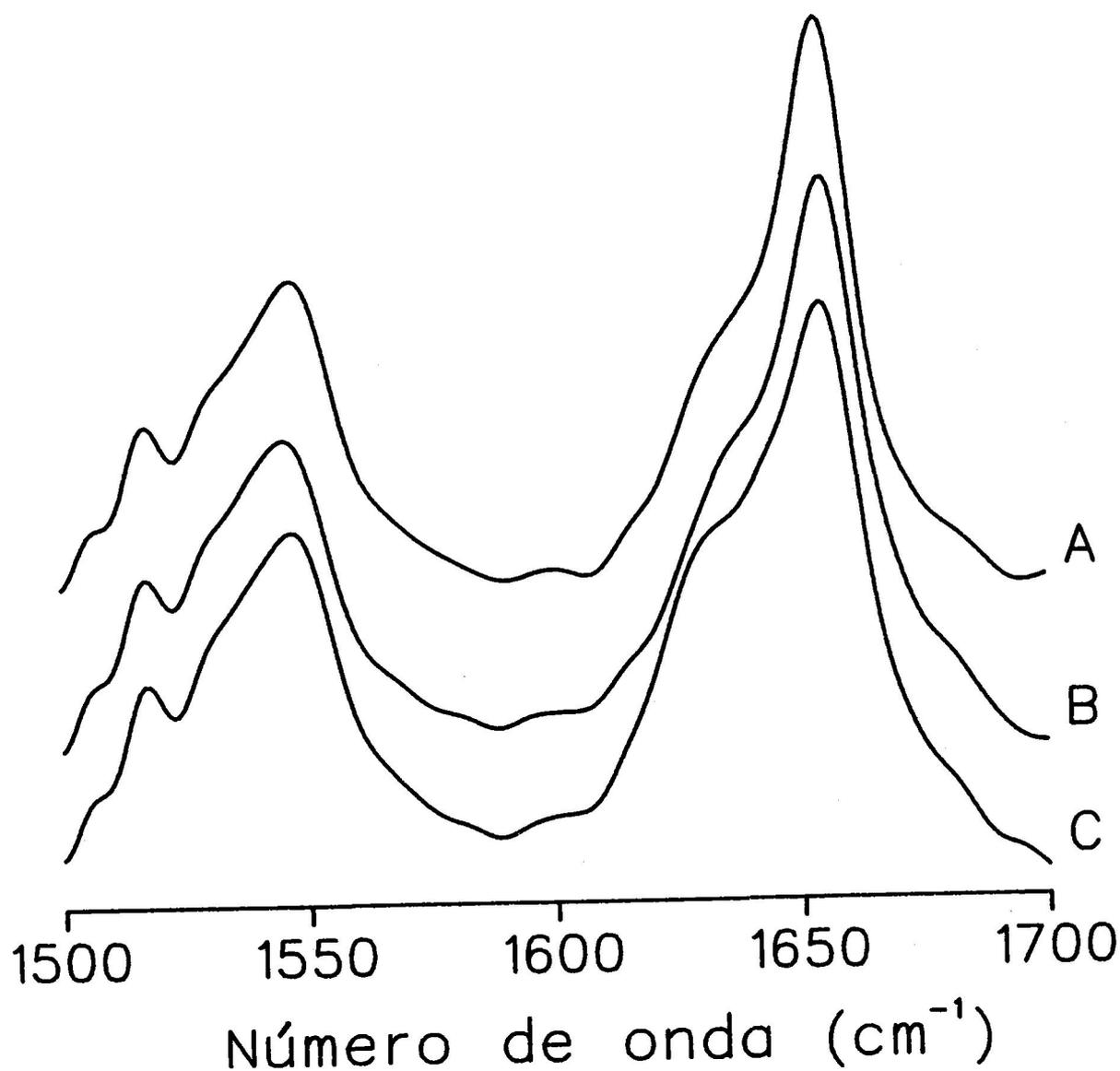


FIGURA IV. 1.11: Autodeconvolución de Fourier de los espectros de FT-IR del PLP purificado por disolventes orgánicos en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a (A) 20 °C, (B) 60 °C y, (C) después de calentar a 80 °C y enfriar hasta 20 °C.

En estos experimentos de FT-IR se ha analizado también la zona del espectro entre 2800 y 3000 cm^{-1} , que corresponde a las vibraciones asimétrica (alrededor de 2850 cm^{-1}) y simétrica (alrededor de 2920 cm^{-1}) de tensión de los enlaces C-H, por lo que esta zona permite obtener información del orden estático de las cadenas hidrofóbicas de los lípidos presentes en la membrana (Cameron y Mantsch, 1978; Cortijo y Chapman, 1981; Brauner y Mendelson, 1986; Jackson et al, 1989). En la Figura IV. 1.12 se observa que los máximos correspondientes a ambas transiciones se desplazan hacia números de onda mayores a medida que aumenta la temperatura a la que se encuentra la muestra de PLP. Este desplazamiento es muy pequeño entre 20 y 40 °C, y entre 60 y 80 °C; el desplazamiento tiene lugar principalmente en el intervalo de temperaturas entre 40 y 60 °C (Figura IV. 1.13). A 20 °C el máximo de la vibración asimétrica se encuentra a 2850,2 cm^{-1} , lo cual es característico cuando los lípidos de la membrana se encuentran en fase gel (Jackson et al., 1989), mientras que a 80 °C se ha desplazado a 2853,6 cm^{-1} , que es característico cuando los lípidos se encuentran en fase cristal líquido. Esto nos indica que los lípidos presentes con el PLP están sufriendo una transición de fase en este intervalo de temperatura. Esta transición es el paso de una ordenación relativamente alta de los lípidos en la membrana (fase gel) a otra fase en la que se encuentran más desordenados (fase cristal líquido) (Goñi et al., 1986). El punto medio de esta transición se puede asignar, mediante el ajuste indicado en la Figura IV. 1.13, a una temperatura de 49 °C, la cual es muy próxima a la obtenida por CDB.

Este proceso es además reversible, ya que una vez calentada la muestra hasta 80 °C, si ésta se deja enfriar hasta 20 °C, los máximos vuelven a los números de onda que presentaban antes del calentamiento (Figura IV. 1.12). La entalpía de van't Hoff calculada a partir de este desplazamiento de bandas es de 140 kJ/mol; este valor se correlaciona aceptablemente, dentro del error experimental, con el obtenido por CDB (195 kJ/mol de lípido).

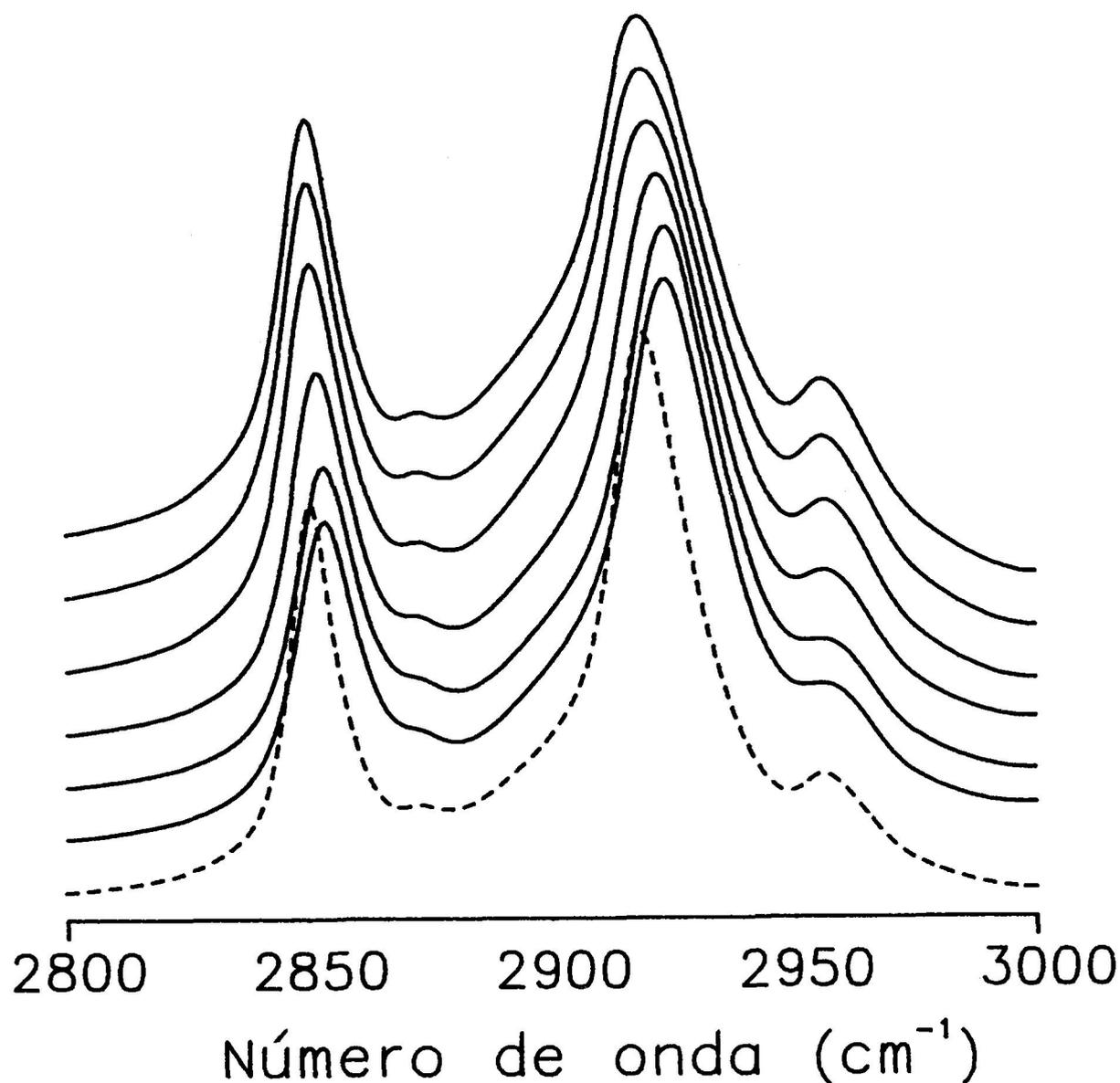


FIGURA IV. 1.12: Espectros de FT-IR entre 2800 y 3000 cm^{-1} del PLP purificado por disolventes orgánicos en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a temperaturas sucesivas. Las temperaturas de los espectros son, de arriba hacia abajo, 20, 30, 40, 50, 70 y 80 °C; la línea discontinua corresponde al espectro de la misma muestra calentada a 80 °C después de haberla enfriado hasta 20 °C.

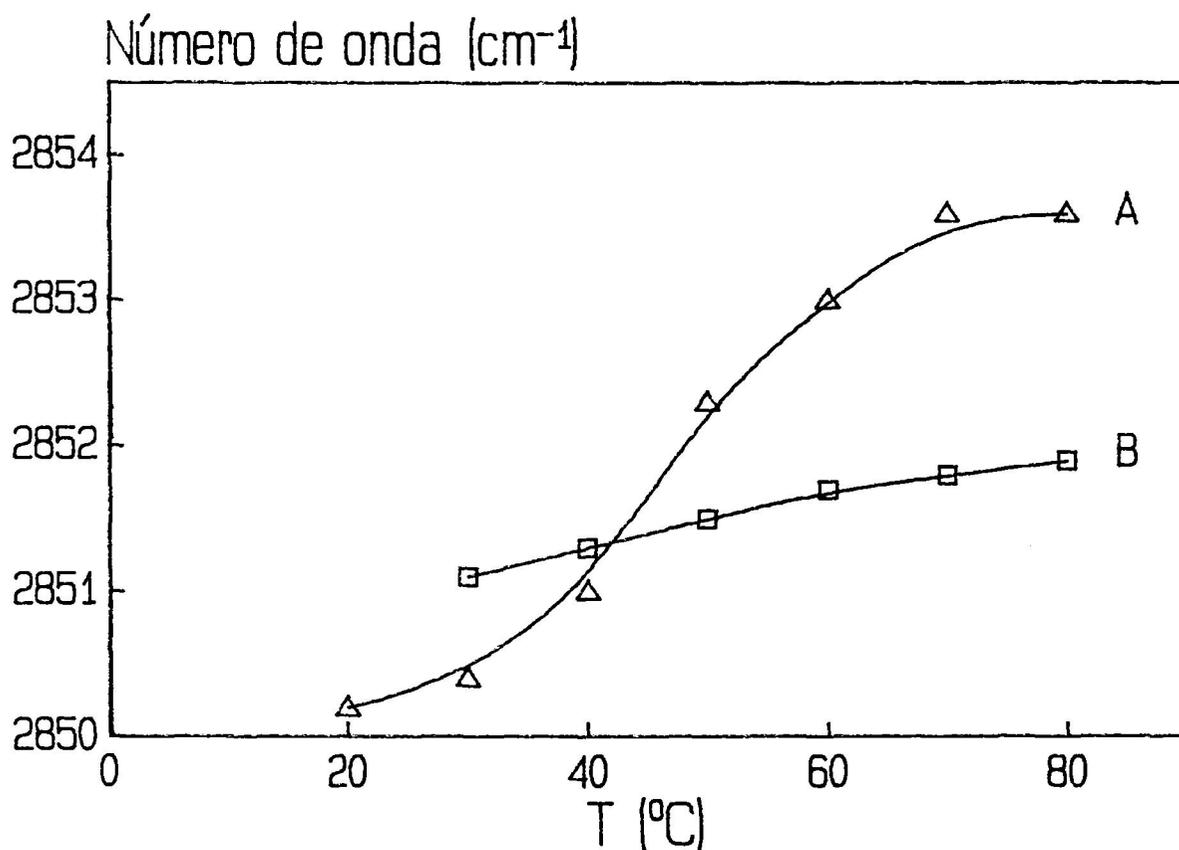


FIGURA IV. 1.13: Representación del número de onda del máximo de la vibración asimétrica de tensión del enlace C-H del componente lipídico del PLP purificado por disolventes orgánicos, (A) en ausencia de colesterol y, (B) en presencia de 3 mg/ml de colesterol (41% p/p). Las líneas continuas corresponden a un ajuste siguiendo un modelo termodinámico reversible de dos estados.

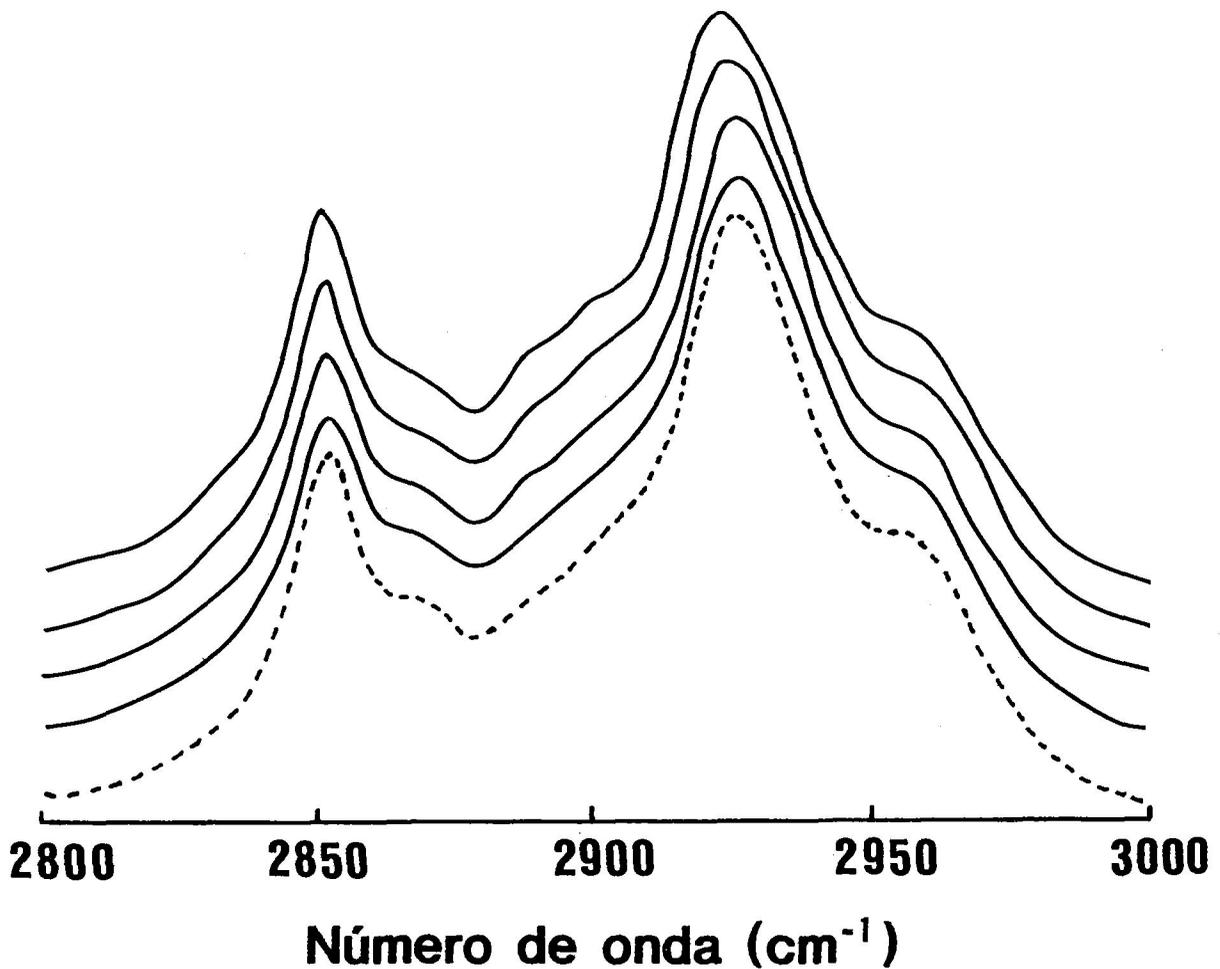


FIGURA IV. 1.14: Espectros de FT-IR entre 2800 y 3000 cm⁻¹ del PLP purificado por disolventes orgánicos en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y en presencia de 3 mg/ml de colesterol (41% p/p) a varias temperaturas. Las temperaturas de los espectros son, de arriba hacia abajo, 30, 50, 70 y 90 °C; la línea discontinua corresponde al espectro de la misma muestra calentada a 80 °C después de haberla enfriado hasta 30 °C.

También se ha observado que al añadir una cantidad determinada de colesterol tal que la proporción de éste con respecto al lípido existente en el liofilizado de PLP sea de un 41% (p/p), similar a la cantidad máxima añadida en los experimentos de CDB, el desplazamiento de los máximos correspondientes a la vibración de tensión del enlace C-H disminuye, aunque sigue estando centrada a unos 48 °C (Figuras IV. 1.13 y IV. 1.14). El número de onda del máximo de la vibración simétrica a 30 °C se encuentra a 2851,1 cm⁻¹, indicando que en presencia de esta proporción de colesterol el lípido no se encuentra en una fase gel sino que se encuentra en un estado más fluido y, por tanto, la transición de estado no va a ser tan pronunciada como en ausencia de colesterol. Resultados similares se obtienen para lípidos sintéticos en presencia de cantidades crecientes de colesterol (Jackson et al., 1989). Este hecho coincide con los resultados obtenidos por CDB (Figuras IV. 1.3 y IV. 1.4). La entalpía de van't Hoff calculada a partir de este desplazamiento en los espectros de FT-IR es de 102 kJ/mol, mientras que la obtenida por CDB es de 178 kJ/mol. En este caso los valores presentan una mayor diferencia que en el caso de ausencia de colesterol; habría que hacer notar que aquí las transiciones, tanto de CDB como de FT-IR, son mucho menos pronunciadas y, por tanto, el cálculo de dicha entalpía está sujeto a un mayor error.

Estos experimentos de FT-IR confirman con mayor certeza que la transición obtenida por CDB del PLP purificado por disolventes orgánicos, previamente asignada a transición de proteína (Mateo et al., 1986), se debe a la transición de fase que experimentan los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos. Esta transición no se manifiesta en los lípidos extraídos de mielina o de sustancia blanca debido al alto contenido de colesterol presente en estos lípidos (Figura IV. 1.9). Resulta evidente, por otra parte, que el colesterol se elimina durante la purificación del PLP por disolventes orgánicos y es entonces cuando los lípidos pueden sufrir la transición de estado que se observa tanto por CDB como por FT-IR.

IV. 2. ESTABILIDAD TERMICA DE LA MEMBRANA MIELINICA

IV. 2.1. Introducción

Se ha aislado membrana mielínica a partir de sustancia blanca de cerebro vacuno según se especifica en el Apartado de Métodos (III. 2.1.). Se ha observado mediante CDB que esta membrana mielínica suspendida en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) presenta una transición endotérmica con una entalpía de desnaturalización de $4,7 \pm 0,6$ J/g y una temperatura de desnaturalización de $80,3 \pm 0,2$ °C cuando la velocidad de calentamiento es de 1 K/min (Figura IV. 2.1), observándose en esta transición un pequeño hombro a unos 70 °C. En raras ocasiones se ha observado además que aparece una transición muy pequeña y ancha centrada a unos 55 °C. Como aparece en el registro original de la figura, el recalentamiento de la muestra no presenta transición alguna por lo que la transición inicial es calorimétricamente irreversible. Incluso se ha comprobado que el hombro sobre 70 °C desaparece cuando el calentamiento se lleva hasta 70 °C y se procede al enfriamiento (Figura IV. 2.2), lo cual indica que esta transición es independiente de la centrada a 80 °C y no debe su irreversibilidad a procesos posteriores (como agregación) que puedan producirse a temperaturas superiores a 70 °C.

Dado su carácter irreversible es de suponer que la transición en su conjunto se deba fundamentalmente a la desnaturalización térmica de una o varias de las proteínas mayoritarias de la mielina.

Una vez obtenida esta transición calorimétrica de la membrana mielínica se han

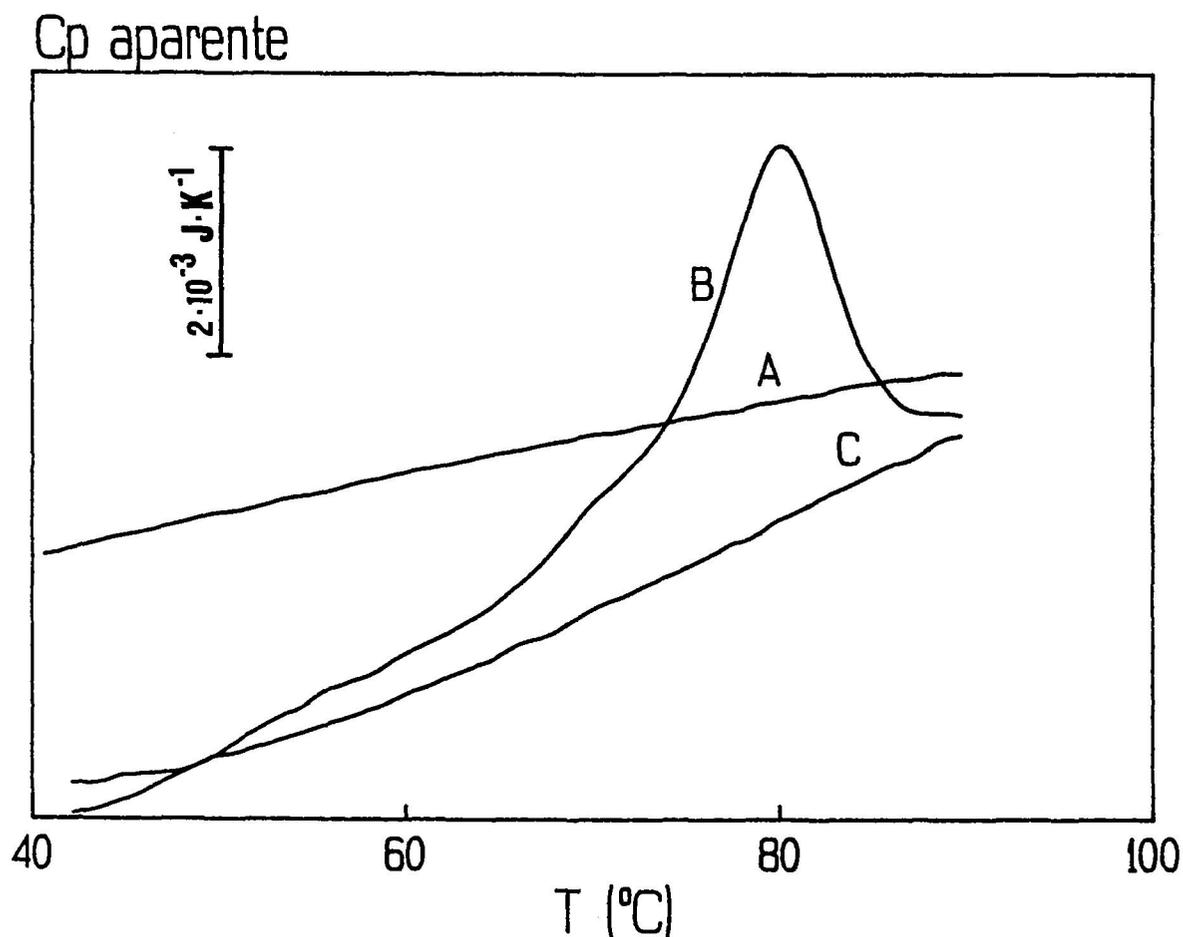


FIGURA IV. 2.1: Registro original de CDB de la membrana mielínica en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). (A) línea base con el tampón fosfato; (B) primer calentamiento; (C) recalentamiento de la muestra. La concentración de la mielina en el experimento mostrado es de 4,6 mg/ml de proteína total. La velocidad del barrido es de 1 K/min.

Cp aparente

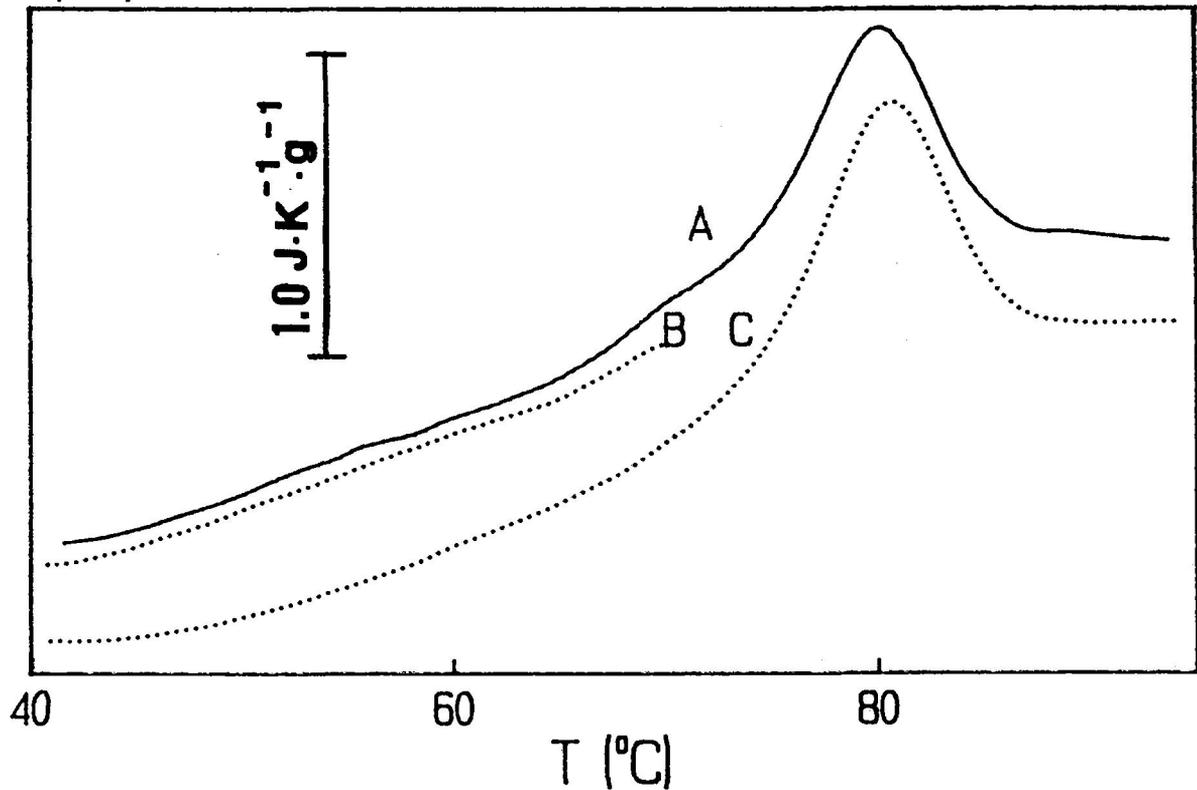


FIGURA IV. 2.2: Registro original de CDB de la membrana mielínica en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). (A) Calentamiento hasta 90 °C; (B) calentamiento de una nueva muestra hasta 70 °C; (C) calentamiento hasta 90 °C de la mielina previamente calentada hasta 70 °C. La concentración de la mielina en los experimentos mostrados es de 7,5 mg/ml de proteína total. La velocidad del barrido es de 1 K/min.

realizado diversos estudios para observar cómo se ve afectada esta transición por diversos factores y, por tanto, poder observar cómo varía la estabilidad térmica de la mielina. Así, se han realizado estudios sobre el modo de conservación de la mielina, efecto del pH y de la fuerza iónica, efecto de disolventes orgánicos y detergentes, y efecto de la velocidad de calentamiento. También se ha intentado asignar esta transición a la desnaturalización de alguna o algunas proteínas determinadas, para lo que se ha utilizado, en este Apartado, la técnica de análisis térmico en gel de poliacrilamida (ATG). Por último, el estudio de la mielina se ha completado con experimentos de FT-IR.

IV. 2.2. Efecto de la conservación sobre la transición calorimétrica de la mielina

Se ha estudiado la influencia del modo y tiempo de conservación de la mielina en la transición que presenta por CDB. Para tal fin, la mielina, que se aísla en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), se ha almacenado a 4 °C ó a -20 °C durante distintos tiempos; también parte de ella se ha liofilizado nada más terminar su extracción de la sustancia blanca.

IV. 2.2.1. Efecto del almacenamiento en cámara fría de la mielina

Con respecto al tiempo de almacenamiento se observa que la entalpía de la transición endotérmica de la mielina disminuye paulatinamente conforme transcurre el tiempo de almacenamiento a 4 °C; incluso cuando el tiempo es largo se observa un desplazamiento de la temperatura de desnaturalización hacia temperaturas más elevadas y la forma de la endoterma se hace más asimétrica presentando una ligera deformación alrededor de 80 °C (Figura IV. 2.3). También puede observarse que el hombro centrado a 70 °C disminuye con

el tiempo hasta desaparecer. La estabilidad térmica de la mielina se ve afectada notablemente a partir de la primera semana de almacenamiento a 4 °C, aunque en los primeros días el efecto es casi inapreciable (Tabla IV. 2.1).

TABLA IV. 2.1

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica de desnaturalización, Δh , de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), almacenada a 4 °C durante distintos períodos de tiempo. La velocidad de barrido utilizada en los experimentos de CDB es de 1 K/min.

Tiempo a 4 °C	T_d (°C)	Δh (J/g)
1 hora	80,9	6,0
2 días	80,7	5,9
7 días	81,5	5,4
9 días	81,6	4,8
14 días	84,2	3,2

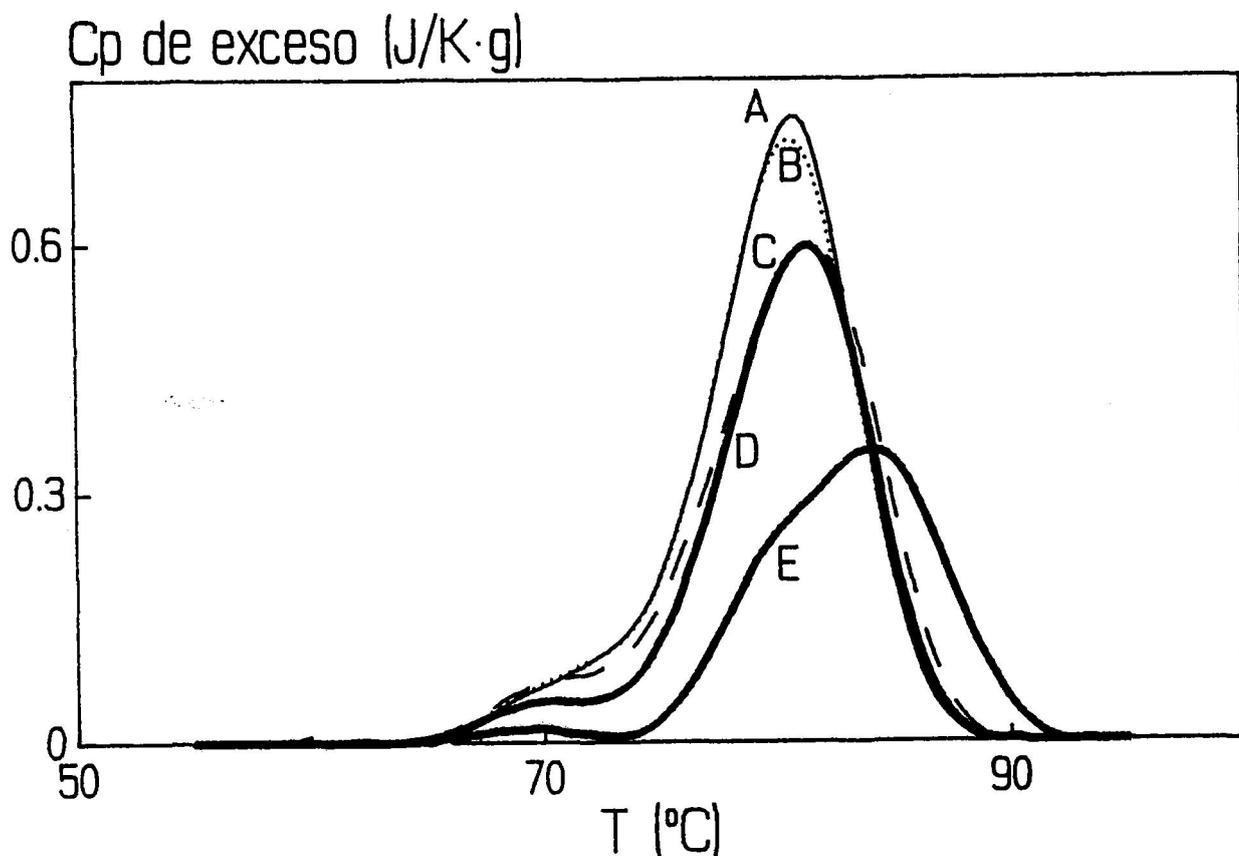


FIGURA IV. 2.3: Perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondientes a la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) almacenada a 4 °C durante diferente tiempo: (A) 0 días, (B) 2 días, (C) 7 días, (D) 9 días y (E) 14 días. La concentración de proteína total en todas las muestras es de 8,2 mg/ml. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

IV. 2.2.2. Efecto de la congelación y almacenamiento de la mielina a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Para el estudio del efecto de la congelación sobre la estabilidad térmica de la mielina, parte de la mielina obtenida a partir de la sustancia blanca de cerebro bovino (ver Apartado de Métodos III. 2.1) se ha congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas. Conforme transcurre el tiempo de congelación se extrae la alícuota correspondiente y después de descongelarse a temperatura ambiente se procede al experimento de CDB.

Se observa que al congelar la mielina, incluso durante 3 horas solamente, la transición calorimétrica de ésta comienza a verse afectada; la entalpía de desnaturalización disminuye ligeramente y empieza a observarse un aumento del hombro centrado a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la Figura IV. 2.4 se comprueba que a medida que transcurre el tiempo de congelación aumenta el pico de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ llegando a predominar sobre el de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$; incluso, cuando el tiempo de congelación es muy largo (un mes) el pico de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ desaparece y permanece el de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una entalpía claramente inferior (Tabla IV. 2.2). Así pues, la transición de mielina centrada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pasa aparentemente a otra centrada a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que aparece un hombro cuando la mielina se encuentra almacenada poco tiempo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

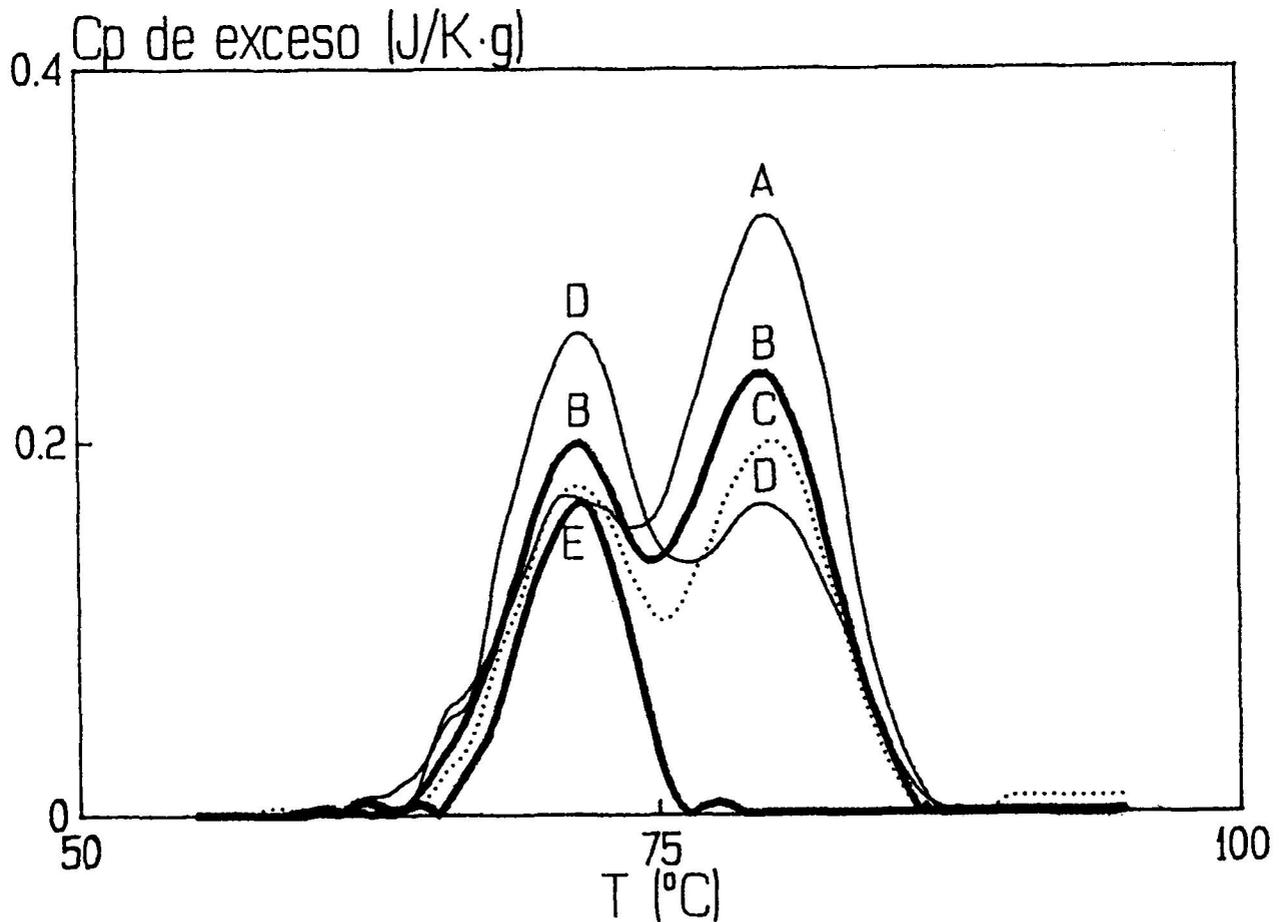


FIGURA IV. 2.4: Perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondientes a la mielina en tampón 20 mM fosfato sódico (pH 7,0) congelada a -20°C durante diferente tiempo: (A) 2 días, (B) 7 días, (C) 11 días, (D) 22 días y (E) 36 días. La concentración de la proteína total en todas las muestras es de 6,6 mg/ml. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

TABLA IV. 2.2

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica de desnaturalización, Δh , de la mielina en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), congelada previamente a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante distintos períodos de tiempo. La velocidad de barrido es de 1 K/min. La T_d que se indica en la Tabla corresponde a la del pico predominante (ver Figura IV. 2.4).

Tiempo $-20\text{ }^\circ\text{C}$	T_d ($^\circ\text{C}$)	Δh (J/g)
2 días	79,8	3,6
7 días	79,5	3,0
11 días	79,9	2,5
22 días	71,6	2,9
36 días	71,7	0,9

IV. 2.2.3. Efecto de la liofilización de la mielina

Para este estudio se ha procedido a liofilizar parte de la mielina obtenida a partir de la sustancia blanca (ver Apartado III. 2.1). Para facilitar la liofilización, se ha procedido previamente a eliminar la mayor parte del tampón en el que se encuentra la mielina mediante centrifugación a 20.000 xg durante 15 minutos. Una vez liofilizada se disuelve la muestra en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se procede a realizar el experimento de CDB. En los experimentos por CDB de la mielina liofilizada, como se puede observar en la Figura IV. 2.5, aparece una transición con una temperatura de desnaturalización inferior (71 °C) a la obtenida en condiciones normales (almacenada a 4°C) y con una entalpía de desnaturalización inferior ($1,6 \pm 0,3$ J/g), lo cual parece indicar que la liofilización desestabiliza la membrana y no es un procedimiento adecuado de almacenamiento en nuestro caso. Hay que indicar que la transición calorimétrica de mielina liofilizada se obtiene alrededor de los 70 °C, lo mismo que la mielina congelada durante largos períodos de tiempo (Figura IV. 2.4). Este hecho parece indicar que la liofilización tiene un efecto similar a la congelación prolongada sobre la estabilidad térmica de la membrana mielínica.

Como se deduce de los resultados expuestos anteriormente, el hecho de almacenar la mielina de una u otra forma repercute considerablemente en la transición endotérmica. Por lo tanto, a la hora de realizar experimentos posteriores, caso de la purificación de proteínas presentes en la mielina, hay que elegir un sistema de almacenamiento adecuado para utilizarlo normalmente. De esta forma, se ha escogido el almacenamiento a 4 °C, ya que parece ser el medio en el que la mielina se encuentra más estable. Como se ha observado que con el tiempo esta mielina se va alterando, se ha procurado realizar todos los experimentos de purificación con preparaciones de mielina obtenidas el mismo día o, como mucho, el día anterior.

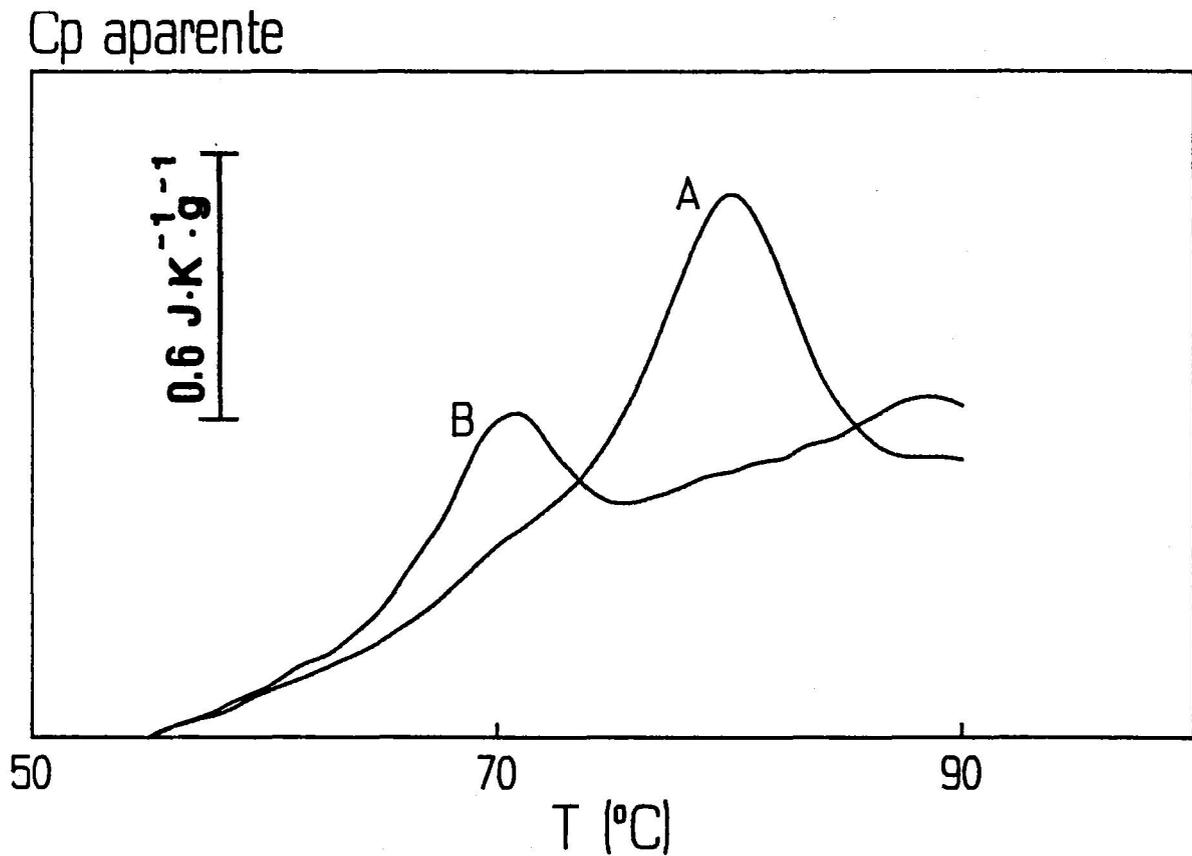


FIGURA IV. 2.5: Registros originales de CDB de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) (A) conservada durante 1 día a 4 °C, (B) previamente liofilizada. La concentración de proteína es de 4,6 mg/ml en A y de 2,7 mg/ml en B. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

IV. 2.3. Efecto de la fuerza iónica y del pH sobre la transición calorimétrica de la mielina

Se ha llevado a cabo un estudio sobre la influencia de diversas condiciones, como son el pH y la fuerza iónica, en la transición endotérmica de la mielina obtenida por CDB. Para obtener la mielina en el medio adecuado se ha partido de una muestra de la mielina aislada en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y, mediante dilución con el tampón correspondiente y posterior centrifugación a 20.000 xg durante 15 minutos, se ha lavado del tampón inicial y se ha cambiado al nuevo medio. Este proceso de lavado se ha realizado dos veces para cada muestra, observándose que el cambio era aceptable ya que mediante diálisis se obtenían resultados calorimétricos idénticos. Para volver a las condiciones iniciales de 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) se procede de manera análoga. Los tampones utilizados para el estudio en función del pH han sido: 20 mM de glicina (pH 3,0), 20 mM de acetato sódico (pH 5,0) y 20 mM de pirofosfato sódico (pH 9,0). Todos los experimentos de CDB se han realizado a una velocidad de barrido de 1 K/min. Para elevar la fuerza iónica se ha utilizado cloruro potásico.

Se ha observado que el aumento de la fuerza iónica, añadiendo cloruro potásico, no afecta sensiblemente a la transición de mielina a pH 7,0 (Figura IV. 2.6). Cuando se añade 0,1 M de KCl al tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) la temperatura de desnaturalización no varía, mientras que si se añade 0,5 M de KCl ésta aumenta ligeramente. La variación en los valores de entalpía no es particularmente significativa dentro del error experimental. Hay que hacer notar que cuando se aumenta la fuerza iónica con KCl el hombro a 70 °C prácticamente desaparece y vuelve a recuperarse cuando se elimina el KCl del tampón.

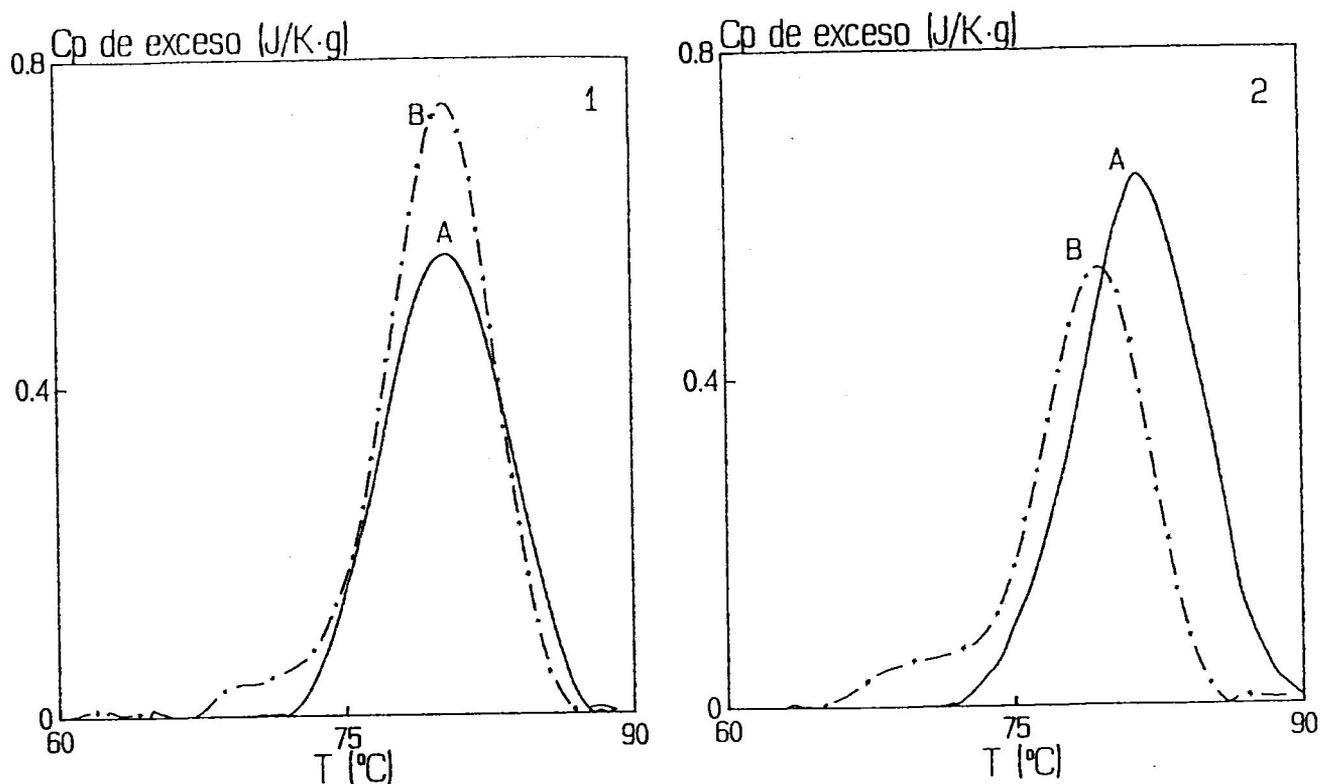


FIGURA IV. 2.6: Efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad térmica de la mielina. En línea continua se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) con (1) 0,1M de KCl, (2) 0,5 M de KCl. En línea discontinua se representan los respectivos perfiles después de eliminar el cloruro potásico. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

TABLA IV. 2.3

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica de desnaturalización, Δh , obtenidos para la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a diferente fuerza iónica. La velocidad de barrido utilizada en estos experimentos de CDB es de 1 K/min.

Cloruro potásico	Cloruro potásico		Vuelto a 0M KCl	
	T_d (°C)	Δh (J/g)	T_d (°C)	Δh (J/g)
0,0 M	80,3	4,7	---	---
0,1 M	80,3	4,4	80,3	5,2
0,5 M	81,5	5,0	79,5	4,1

Si bien la fuerza iónica no afecta significativamente a la transición de mielina a pH 7,0, como se puede observar en la Figura IV. 2.6 y en la Tabla IV. 2.3, sí se observa un gran efecto del pH en esta transición calorimétrica (Figura IV. 2.7). Cuando la mielina se pasa a pH 3,0 la transición se desplaza a 71 °C y su entalpía disminuye en gran medida; además aunque la muestra se vuelva a pasar a pH 7,0 la transición no recupera los valores típicos de pH 7,0 (Figura IV. 2.7.A). En el caso de pH 5,0 la entalpía de la transición también es muy pequeña pero la temperatura de desnaturalización se obtiene a 81 °C; al volver al pH 7,0 se recuperan la temperatura y entalpía características, observándose incluso el hombro a 70 °C (Figura IV. 2.7.B). La mielina a pH 9,0 presenta una transición calorimétrica a 71 °C y con un valor entálpico mayor que a pH 7,0; al volver la muestra a pH 7,0 tanto la temperatura de desnaturalización como el incremento de entalpía recobran los valores característicos de la mielina a pH 7,0 (Figura IV. 2.7.C).

Por lo tanto, observamos que el pH influye en gran medida en la transición de la mielina aunque este efecto es reversible tanto a pH 5,0 como a pH 9,0; sin embargo, a pH 3,0 la mielina se debe encontrar en un medio demasiado ácido y el efecto de este pH sobre la transición térmica, y consecuentemente sobre la conformación nativa de las proteínas presentes en la mielina, es irreversible. Hay que distinguir entre la reversibilidad del efecto del pH y la reversibilidad de la transición térmica, ya que en todos los barridos realizados a diferente fuerza iónica o pH la transición de la mielina es calorimétricamente irreversible, es decir, la traza del recalentamiento no presenta en ningún caso endoterma alguna.

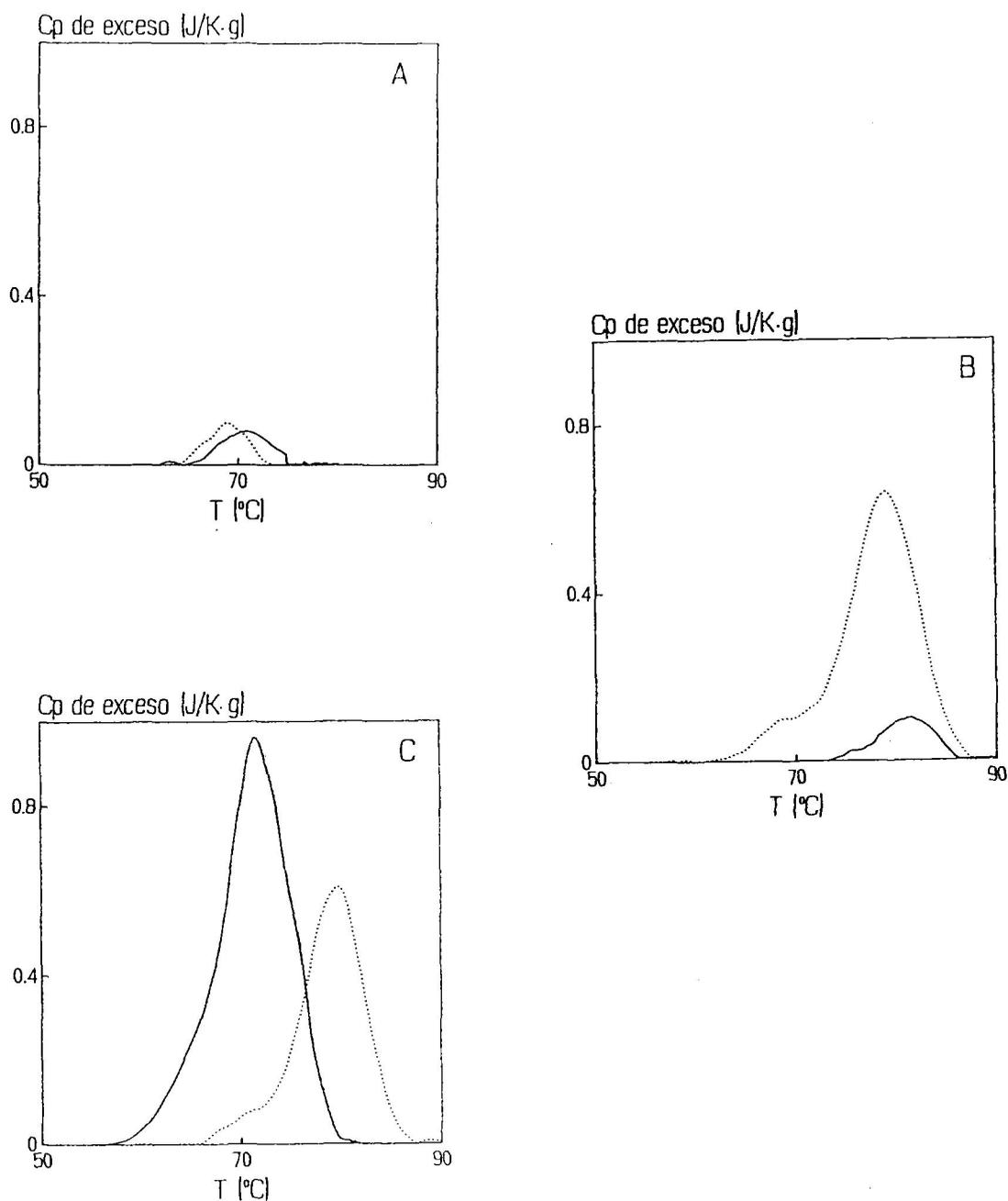


FIGURA IV. 2.7: Efecto del pH sobre la estabilidad térmica de la mielina. En línea continua se representan los perfiles de capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura de la mielina en tampón (A) 20 mM de glicina (pH 3,0), (B) 20 mM de acetato sódico (pH 5,0) y (C) 20 mM de pirofosfato sódico (pH 9,0). En línea discontinua se representan los respectivos perfiles después de volver la muestra al tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). La velocidad de barrido es de 1 K/min.

TABLA IV. 2.4

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica de desnaturalización, Δh , de la membrana mielínica a diferentes valores de pH y a pH 7 después de haber estado incubada al pH indicado. La velocidad de barrido utilizada para estos experimentos de CDB es de 1 K/min.

pH inicial	pH inicial		Vuelto a pH 7,0	
	T_d (°C)	Δh (J/g)	T_d (°C)	Δh (J/g)
3,0	70,8	0,5	69,2	0,5
5,0	80,9	0,7	79,3	5,1
7,0	80,3	4,7	-----	-----
9,0	71,5	7,6	79,5	5,2

IV. 2.4. Efecto de disolventes orgánicos y detergentes sobre la transición calorimétrica de la mielina

Como se ha explicado en el Apartado de Antecedentes Bibliográficos el PLP se ha venido purificando preferentemente por disolventes orgánicos, especialmente mediante extracción con disoluciones de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) (Monreal, 1975). Por esta razón se ha estudiado el efecto de esta mezcla orgánica sobre la transición calorimétrica obtenida para la mielina.

También se ha estudiado, de forma paralela, el efecto de diversos detergentes (octilglucósido, colato sódico y Chaps) sobre la estabilidad térmica de la mielina. Estos detergentes se han utilizado en esta Memoria para la purificación del PLP y de la PBM como métodos alternativos y, en un principio, menos desnaturalizantes que la purificación tradicional de estas proteínas por disolventes orgánicos. Por esta razón se ha estudiado el efecto de estos detergentes sobre la transición calorimétrica de la mielina y, por tanto, de la estabilidad térmica de la membrana.

IV. 2.4.1. Efecto de la mezcla cloroformo:metanol sobre la mielina

Para el estudio de la influencia de la mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v), utilizada tradicionalmente en la purificación del PLP (Monreal, 1975), se han preparado mezclas de mielina en tampón fosfato con diferentes cantidades del sistema cloroformo:metanol. Para tal fin se ha procedido de la siguiente manera: a la mielina en tampón fosfato obtenida de la sustancia blanca se le ha añadido la mezcla cloroformo:metanol en la proporción adecuada para obtener las relaciones tampón fosfato:mezcla orgánica (v/v)

de 1:0, 10:1, 5:1, 1:1 y 0:1. Tras agitación de la mezcla, se ha procedido seguidamente a la liofilización de todas las muestras para eliminar la mezcla orgánica. Una vez liofilizadas las muestras se redisuelven en el tampón fosfato y se procede al experimento calorimétrico a una velocidad de barrido de 1 K/min.

En la Figura IV. 2.8 se observa que incluso a relaciones tan bajas como la de 10:1, la mezcla orgánica anula prácticamente la transición mielínica que se obtiene en fosfato (a 70 °C, ya que son muestras liofilizadas). Además de reducirse drásticamente la entalpía de la transición, se observa un pequeño desplazamiento de la temperatura de desnaturalización hasta los 68 °C. En las relaciones fosfato:mezcla orgánica de 1:1 y 0:1 esta transición de 70 °C desaparece por completo pero aparece otra transición mucho más ancha centrada sobre los 45 °C.

Estos resultados parecen indicar que la mezcla orgánica elimina la estructura nativa de la proteína (o proteínas) responsable de la transición mielínica, por lo que inducen a pensar que la utilización de disolventes orgánicos en la purificación de las proteínas de la mielina, en concreto la mezcla cloroformo:metanol, no es aconsejable, ya que puede alterar la estructura nativa de dichas proteínas e incluso estar provocando su desnaturalización. Se ha observado que para todas las mezclas realizadas, las transiciones calorimétricas obtenidas son irreversibles.

IV. 2.4.2 Efecto de los detergentes sobre la mielina

Debido a que en este trabajo se han utilizado detergentes para la purificación de las proteínas de la mielina PLP y PBM (ver Apartado de Resultados IV. 3), se ha planteado, de manera análoga al estudio anteriormente expuesto, hasta qué punto y de qué forma afectan

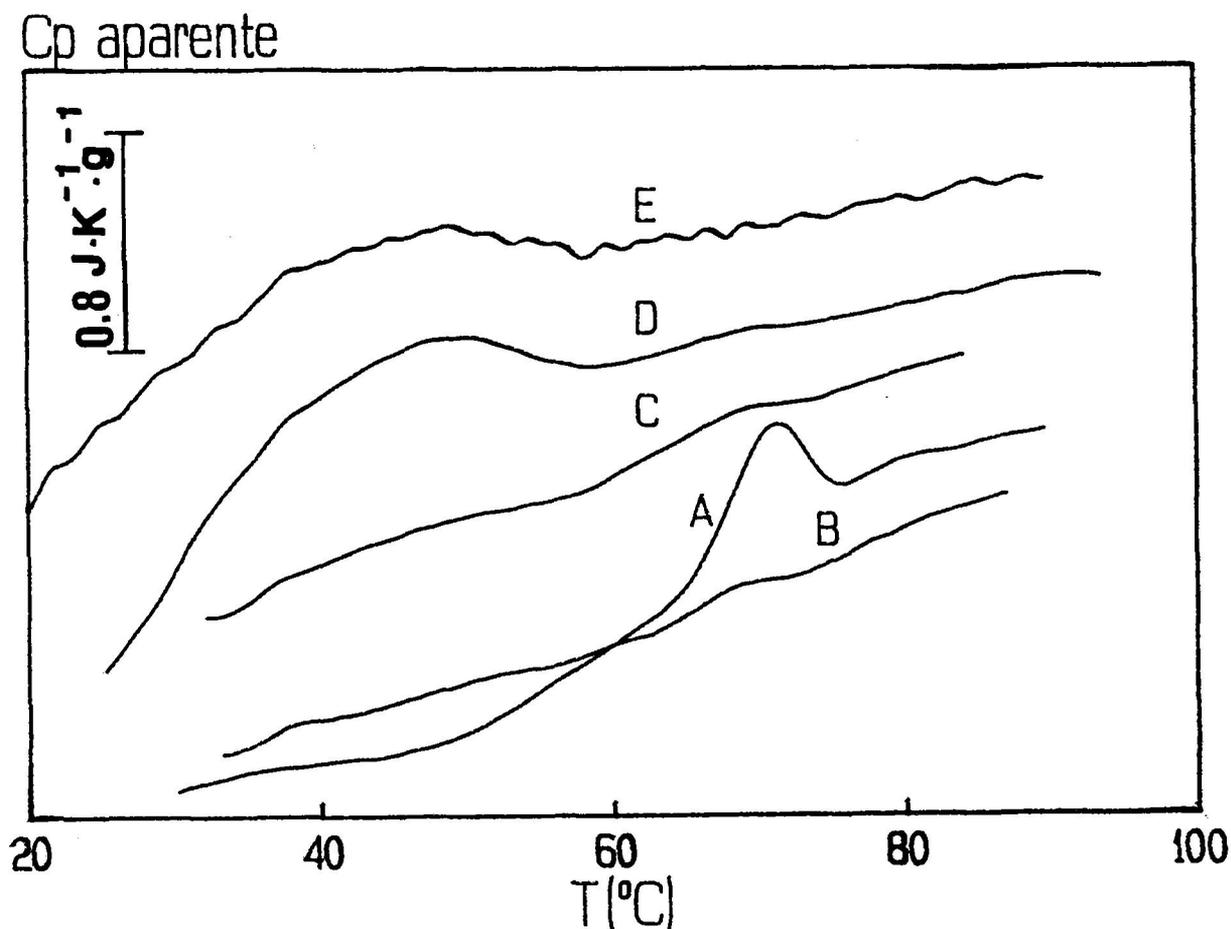


FIGURA IV. 2.8: Efecto de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) sobre la estabilidad térmica de la mielina. Se representan los registros originales de CDB de la mielina que se ha tenido en diferentes proporciones de tampón fosfato:mezcla orgánica (v/v); (A) 1:0, (B) 10:1, (C) 5:1, (D) 1:1 y (E) 0:1. Todas estas mezclas se liofilizan previamente al experimento de CDB y se resuspenden en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) (ver texto).

los detergentes más utilizados a la transición calorimétrica de la mielina. De esta forma se ha estudiado la influencia del octilglucósido, detergente seleccionado para la purificación del PLP, y del colato sódico y del Chaps, empleados en la purificación de la PBM.

En un estudio inicial del efecto de los detergentes sobre la transición térmica de la mielina se han realizado una serie de experimentos en los que se varía la concentración de colato sódico presente en la disolución de mielina. Para tal fin se ha mezclado una disolución de mielina en tampón fosfato con diferentes disoluciones de colato sódico en el mismo tampón en unas proporciones determinadas para obtener una concentración final de proteína de 4,3 mg/ml y concentraciones de 0,1%, 0,2%, 0,4% y 0,6% (p/v) de colato sódico. Estas mezclas se han incubado introduciéndolas en recipientes posteriormente cerrados en ambos extremos y disponiendo éstos en un disco giratorio de 17 cm de diámetro, agitándolas a 16 rpm durante 45 minutos a 4 °C; seguidamente se ha realizado el experimento calorimétrico a una velocidad de barrido de 1 K/min. En la célula de referencia se introduce una disolución de colato sódico de la concentración correspondiente a la muestra para eliminar el efecto debido exclusivamente al detergente.

En la Figura IV. 2.9 se observa que la transición mielínica va disminuyendo su entalpía de desnaturalización así como su temperatura en el máximo de la traza con la concentración de colato. Para las concentraciones de 0,1% y 0,2% de colato sódico el efecto no es demasiado acentuado aunque a 0,2% se distingue más marcadamente el hombro a 70 °C. A concentraciones mayores de colato (0,4% y 0,6%) el efecto es muy grande, desplazándose la temperatura del máximo por debajo de los 70 °C y la entalpía de desnaturalización disminuye hasta valores de 1 J/g. Para el 0,4% de colato se observa la existencia de un segundo pico centrado sobre los 74 °C, el cual prácticamente desaparece cuando la concentración de colato es del 0,6%.

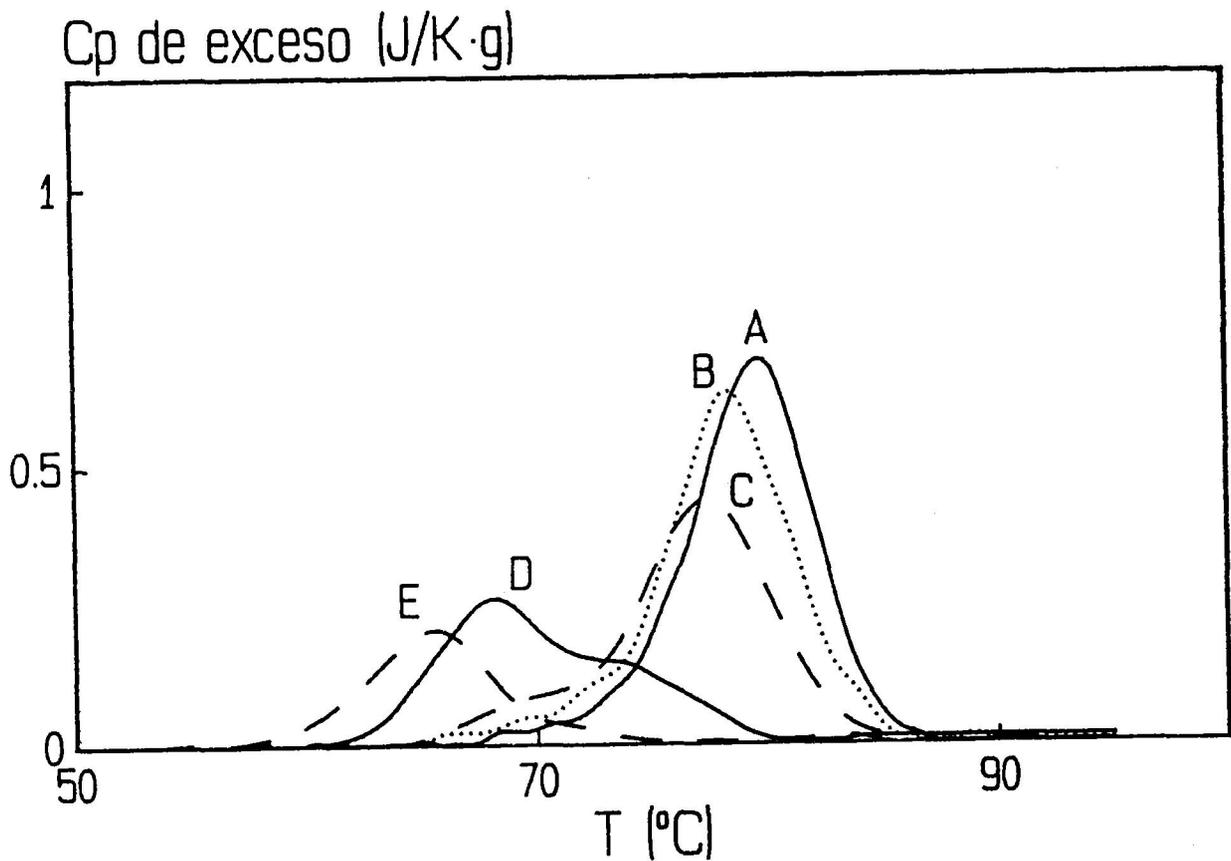


FIGURA IV. 2.9: Efecto del colato sódico sobre la estabilidad térmica de la mielina. Se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura para la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) con diferentes concentraciones de colato sódico; (A) sin colato sódico, (B) 0,1% (p/v), (C) 0,2% (p/v), (D) 0,4% (p/v) y (E) 0,6% (p/v). La velocidad de barrido es de 1 K/min.

TABLA IV. 2.5

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica de desnaturalización, Δh , de la mielina en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) con diferentes concentraciones de colato sódico. Los valores entre paréntesis corresponden a la muestra incubada con detergente después de haberlo eliminado mediante diálisis exhaustiva. La velocidad de barrido en los experimentos de CDB es de 1 K/min.

Colato sódico (p/v)	T_d (°C)	Δh (J/g)
0,0 %	79,7	4,9
0,1 %	78,3	4,4
0,2 %	77,5	3,4
0,4 %	68,2 (68,0)	2,3 (1,3)
0,6 %	65,6 (67,9)	1,4 (1,4)

Para observar si el efecto del colato sódico sobre la transición mielínica es reversible, se ha procedido a eliminar el detergente, mediante diálisis exhaustiva, en las muestras de mielina con detergente que presentan una mayor variación de la traza calorimétrica, es decir, las correspondientes a las concentraciones de 0,4% y 0,6%. Como se observa en la Figura IV. 2.10, al eliminar el detergente las trazas calorimétricas se hacen más simétricas ya que los hombros que aparecen en presencia del detergente disminuyen e incluso desaparecen. Estas trazas se asemejan a la traza obtenida a 70 °C en la mielina, bajo determinadas condiciones ya citadas anteriormente, aunque la temperatura del máximo es algo inferior, alrededor de 68 °C, y la entalpía de desnaturalización no aumenta, presentando valores cercanos a 1 J/g (Tabla IV. 2.5).

De esta forma se observa que el efecto del colato sódico sobre la mielina es algo más drástico que el causado por el octilglucósido o el Chaps (Figuras IV. 2.11 y IV. 2.12), hecho que es de esperar si se tiene en cuenta el carácter iónico del colato, lo cual puede afectar en mayor grado la estructura de las proteínas. Además este efecto no desaparece totalmente al eliminar el detergente ya que la entalpía de desnaturalización permanece con valores muy bajos, lo que podría indicar que hay una gran proporción de proteína desnaturalizada.

En el estudio de la influencia del octilglucósido y del Chaps sobre la transición térmica de la mielina se ha seguido un protocolo diferente al utilizado con el colato sódico, ya que estos detergentes son, a nuestro entender, los más apropiados de entre los empleados en esta Memoria para la purificación del PLP y de la PBM respectivamente (Apartado IV. 3). Así se ha procedido a mezclar disoluciones de detergente y de mielina en las proporciones adecuadas para obtener relaciones detergente/proteína similares a las utilizadas en la solubilización de la mielina previa a la purificación. Posteriormente se ha dializado la mezcla

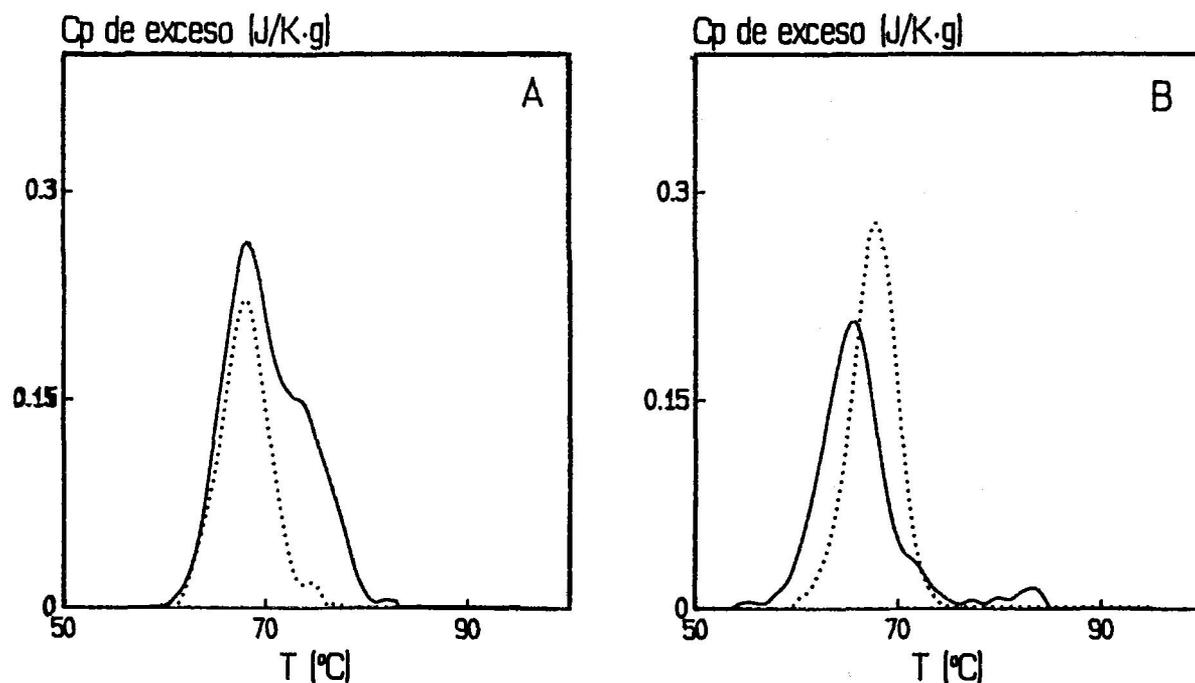


FIGURA IV. 2.10: Efecto del colato sódico y de su eliminación sobre la estabilidad térmica de la mielina. En línea continua se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) con, (A) 0,4% (p/v) y (B) 0,6% (p/v) de colato sódico. En línea discontinua se representan los respectivos perfiles calorimétricos después de haber eliminado el colato sódico mediante diálisis exhaustiva. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

y se han ido extrayendo alícuotas a diferentes tiempos de diálisis para observar por CDB el efecto de la eliminación del detergente.

En el caso del octilglucósido se ha mezclado una suspensión de mielina en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) con una disolución de octilglucósido en el mismo tampón para obtener una mezcla que contiene 4,5 mg proteína/ml y un 2% (p/v) de octilglucósido, que son aproximadamente las concentraciones que se utilizan en la solubilización de la membrana para la posterior purificación del PLP. Esta mezcla, con un volumen final de 2 ml, se ha dializado frente a 2 L de 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) durante los tiempos que se indican en la Tabla IV. 2.6. Cada vez que se renueva el tampón de diálisis se extrae un alícuota de la muestra y se realiza un experimento de CDB a 1 K/min, mientras que el resto de la muestra continúa dializándose. En la célula de referencia se introduce el correspondiente tampón de diálisis para que la cantidad de detergente sea lo más similar posible en ambas células y el efecto térmico debido exclusivamente al detergente sea mínimo.

Se observa que al añadir el octilglucósido y después de realizar el primer cambio de la diálisis (a las 4 horas 30 minutos) la transición de la mielina se desplaza a una temperatura de desnaturalización de 61,5 °C y su entalpía de desnaturalización disminuye de forma considerable (Figura IV. 2.11). En el segundo cambio (a las 18 horas) la transición se ha desplazado a 70,5 °C y la entalpía no varía. En el último cambio de la diálisis (a las 41 horas) el pico no se desplaza prácticamente (71,2 °C) pero sí aumenta su entalpía de desnaturalización pero sin llegar a alcanzar los valores obtenidos con la mielina sin añadir octilglucósido (Tabla IV. 2.6).

Paralelamente a los experimentos de CDB se ha llevado a cabo un control de la eliminación del octilglucósido durante la diálisis; para ello se ha empleado un protocolo idéntico al utilizado para los experimentos de CDB pero añadiendo C¹⁴-octilglucósido de New

TABLA IV. 2.6

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica de desnaturalización, Δh , de la membrana miélica con octilglucósido sometida a diálisis durante diversos tiempos (ver texto). La velocidad de barrido utilizada para estos experimentos de CDB es de 1 K/min. El primer valor (0 horas) corresponde a la mielina sin añadir octilglucósido. También se indica la cantidad residual de detergente no dializado, % radioactividad, mediante el análisis radioactivo (ver texto).

Tiempo de diálisis	T_d (°C)	Δh (J/g)	% Radioactividad
0,0 horas	80,5	5,7	
4,5 horas	61,5	1,4	37,2
18,0 horas	70,5	1,3	3,4
41,0 horas	71,2	2,5	< 0,1

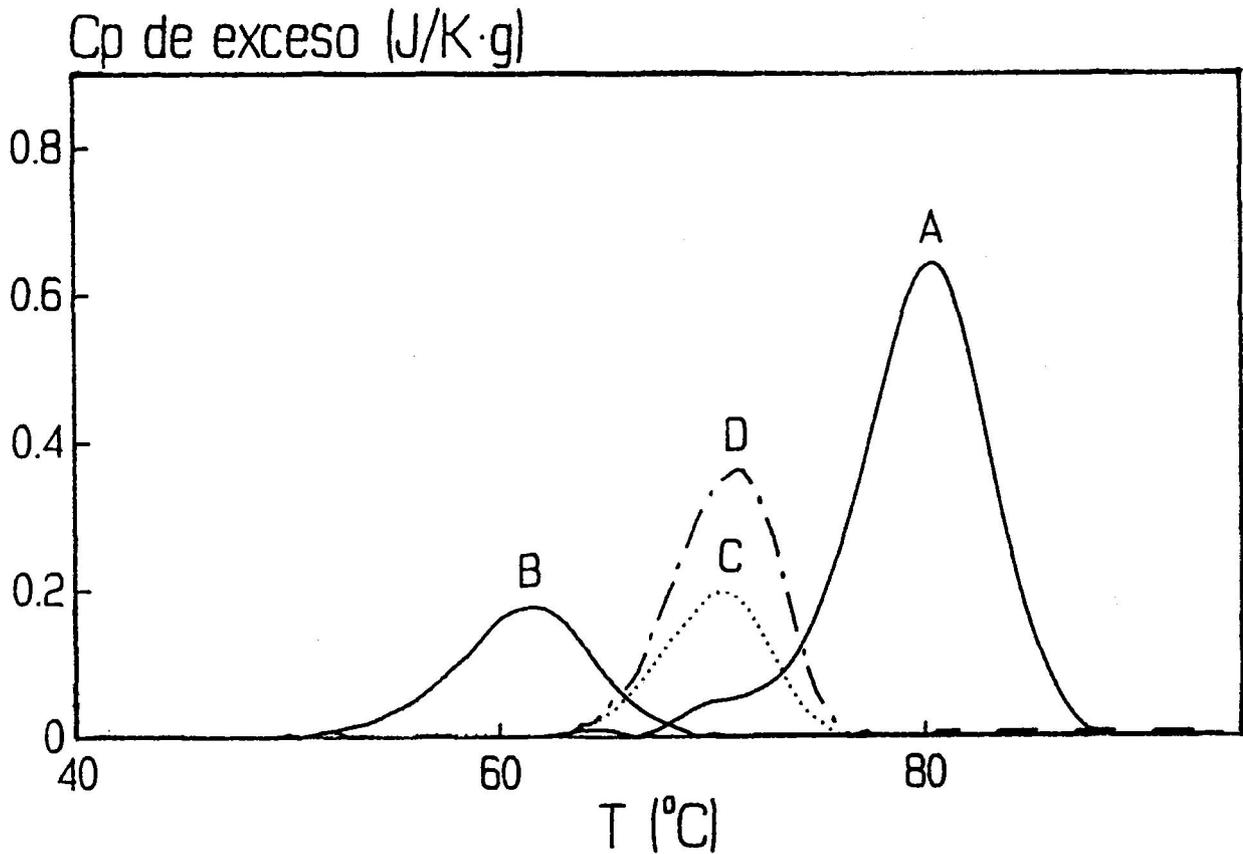


FIGURA IV. 2.11: Efecto del octilglucósido sobre la estabilidad térmica de la mielina. Se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura para la mielina en tampón fosfato a la que se le ha añadido octilglucósido hasta una concentración de un 2% (p/v) y se ha dializado para eliminar el detergente. (A) sin octilglucósido; (B) después de 4 horas y media con un cambio de la diálisis; (C) después de 18 horas con dos cambios de la diálisis; (D) después de 41 horas con tres cambios de la diálisis. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

England Nuclear amablemente cedido por el Dr. Francisco Gavilanes de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid; las medidas de radioactividad de las muestras se han realizado en un contador de centelleo Betamatic de la casa Beckman, en colaboración con el Dr. Jesús Ruiz Cabello de la Universidad Complutense de Madrid. Se observa que en el primer cambio de diálisis la radioactividad disminuye hasta un 37% de la inicial, en el segundo cambio sólo queda un 3% y en el tercero la radioactividad ha desaparecido totalmente. Por lo tanto en las trazas B y, en mucha menor extensión, C de la Figura IV. 2.11 existe un efecto del octilglucósido que aún no se ha dializado; mientras que en la traza D no puede haber efecto del detergente residual en la muestra ya que se ha dializado totalmente. El cambio que se observa en la traza D respecto de la traza A tiene que ser debido a algún efecto que ha provocado el detergente en la solubilización, de forma que al eliminarse éste, la mielina no ha recuperado totalmente la disposición inicial, ya que el valor de la entalpía de desnaturalización va aumentando con el tiempo de diálisis pero no llega a alcanzar el valor inicial y, además, la T_d permanece a 70 °C. Este hecho parece ser significativo pues, como se ha explicado anteriormente, se han obtenido endotermas de mielina a 70 °C alterando factores de muy diversa naturaleza, como son congelación y liofilización; además también se ha obtenido este efecto cuando se incubaba la mielina a pH 9,0, volviéndose en este caso a recuperar la transición a 80 °C cuando la muestra de pH 9,0 se lleva de nuevo a pH 7,0.

A la muestra que se ha mezclado con octilglucósido y se ha dializado durante 41 horas, con cuatro cambios del tampón de diálisis (traza D de la Figura IV. 2.11), se le ha añadido colesterol en una proporción colesterol:proteína total de 1:1 (p/p) y se ha incubado 30 minutos a 35 °C y 1 hora a 4°C, mezclándose en un disco giratorio a 16 rpm. Esta adición de colesterol se ha realizado ya que se supone que en la diálisis se pueden estar perdiendo componentes lipídicos, como puede ser el caso del colesterol, por razones que se

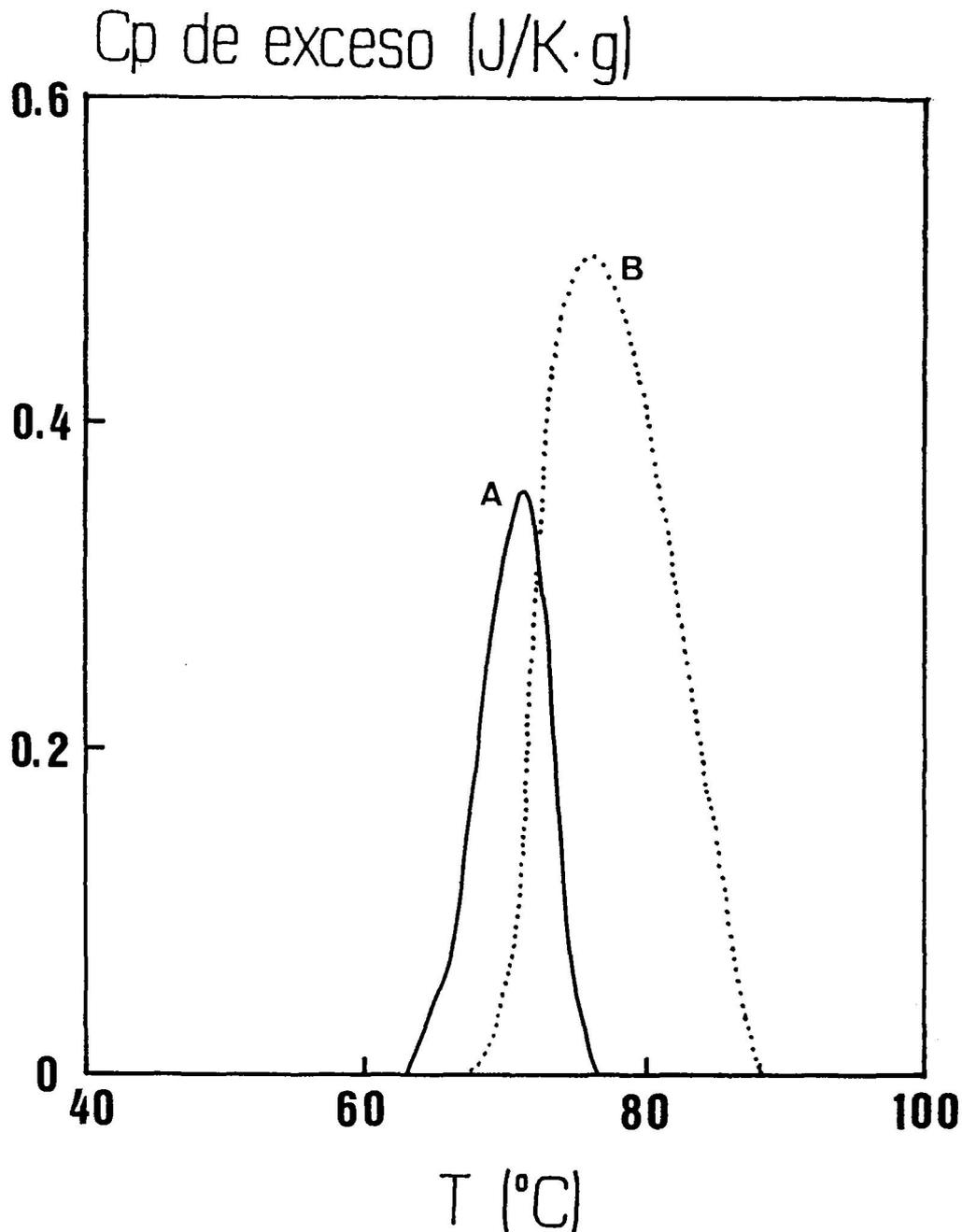


FIGURA IV. 2.12: Perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura, correspondientes a la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a la que se añade octilglucósido hasta una concentración de un 2% (p/p) y se dializa posteriormente durante 41 horas (ver texto) para eliminar dicho detergente. (A) sin adición de colesterol; (B) añadiendo colesterol en una proporción de colesterol:proteína 1:1 (p/p). La velocidad de barrido es de 1 K/min.

explicarán en el Apartado de Resultados IV. 4. Al añadir este colesterol se observa (Figura IV. 2.12) que se produce un desplazamiento de la Td a temperaturas superiores (alrededor de los 75 °C) y un aumento de su entalpía específica de desnaturalización (5,3 J/g). Esto indica que al añadir colesterol a la mielina que ha estado en presencia de octilglucósido y posteriormente dializada, los parámetros calorimétricos, Td y Δh , recuperan unos valores muy próximos a los obtenidos para la mielina en tampón fosfato sin añadir colesterol (traza A de la Figura IV. 2.11).

Para el estudio de la influencia del Chaps sobre la transición calorimétrica de la mielina se ha procedido de manera análoga a la seguida con el octilglucósido. Se ha mezclado una disolución de mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) con una disolución de Chaps en el mismo tampón para obtener una mezcla que contiene 3,5 mg/ml de proteína total y un 4% (p/v) de Chaps, que son concentraciones similares a las utilizadas en la solubilización de la mielina para la purificación de la PBM mediante Chaps (Apartado IV. 3). Esta mezcla, con un volumen final de 5 ml, se ha dializado frente a 5 L de 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) durante los tiempos que se indican en la Tabla IV. 2.7. Los experimentos de CDB se han realizado con alícuotas que se han ido extrayendo de la diálisis; cada vez que se extraía una alícuota se realizaba un cambio del tampón de diálisis. Se observa que el comportamiento de la mielina en presencia de Chaps es similar al experimentado en presencia de octilglucósido, aunque en presencia de éste último la Td de la mielina disminuye a temperaturas inferiores (Figura IV. 2.11). A las 5 horas y 30 minutos de diálisis se obtiene una transición con una entalpía muy baja (0,7 J/g) centrada sobre los 68 °C. A medida que transcurren el tiempo y los cambios de diálisis se observa un desplazamiento de la Td y un aumento de la entalpía de desnaturalización (Figura IV. 2.13). Después de tres cambios de tampón en un tiempo total de 45 horas 30 minutos se obtiene una

TABLA IV. 2.7

Valores de la temperatura de desnaturalización, T_d , y de la entalpía específica, Δh , de la mielina en presencia de Chaps a diferentes tiempos de diálisis para la eliminación del detergente. En cada experimento de CDB se realiza un cambio del tampón de diálisis. El primer valor (0 horas) corresponde a la mielina sin añadirle Chaps. La velocidad de barrido en los experimentos de CDB es de 1 K/min.

Tiempo de diálisis	T_d (°C)	Δh (J/g)
0,0 horas	80,5	5,7
5,5 horas	68,2	0,7
21,5 horas	69,1	3,4
45,5 horas	71,3	3,6

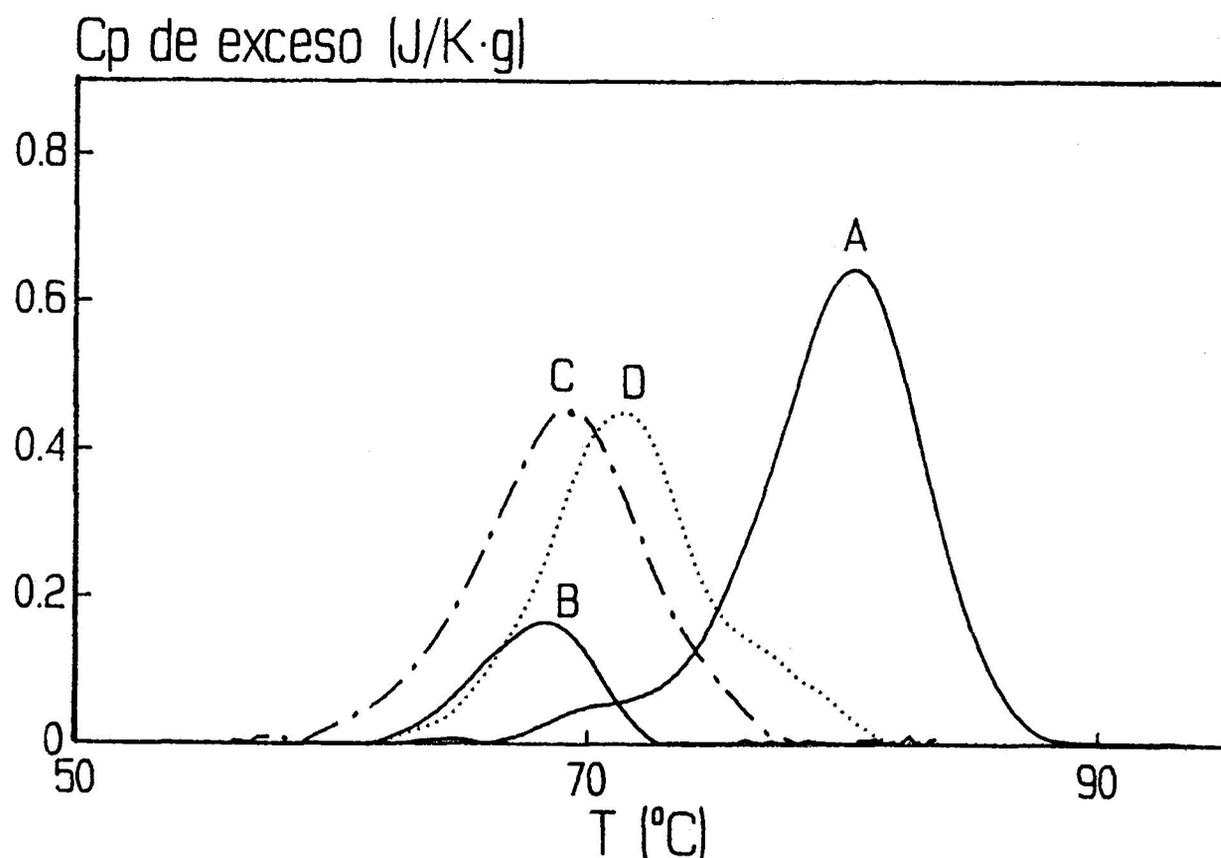


FIGURA IV. 2.13: Efecto del Chaps sobre la estabilidad térmica de la mielina. Se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura para la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a la que se ha añadido Chaps hasta una concentración del 4% (p/v) y se ha dializado posteriormente para eliminar dicho detergente. (A) sin Chaps; (B) después de 5 horas y 30 minutos con un cambio de la diálisis; (C) después de 21 horas y 30 minutos con dos cambios de la diálisis; (D) después de 45 horas y 30 minutos con tres cambios de la diálisis. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

transición centrada sobre los 71 °C y con una entalpía específica de 3,6 J/g (Tabla IV. 2.7).

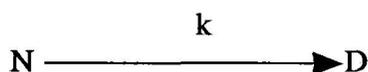
De esta forma, se observa que ambos detergentes, Chaps y octilglucósido, tienen un efecto muy similar sobre la mielina; aunque para el caso del Chaps parece que al dializar el detergente se recupera una mayor proporción de la entalpía de desnaturalización asignada a la mielina en ausencia de detergente, que en el caso del octilglucósido. Es de destacar el hecho de que con ambos detergentes y tras la diálisis la transición se queda centrada sobre los 70 °C y no recupera su Td inicial de 80 °C.

IV. 2.5. Efecto de la velocidad de barrido sobre la transición calorimétrica de la mielina

Como se ha explicado anteriormente en este Apartado, la transición calorimétrica de la membrana mielínica obtenida por CDB es irreversible ya que el segundo barrido de la muestra no presenta transición alguna en el perfil calorimétrico (ver Figura IV. 2.1). Al ser irreversible esta transición, es de esperar que el proceso no sea de equilibrio, pudiendo estar cinéticamente controlado. Para comprobar si esta transición está cinéticamente controlada se han realizado experimentos a diferentes velocidades de barrido y se ha observado un desplazamiento de la temperatura de desnaturalización hacia temperaturas inferiores a medida que la velocidad es más lenta (Figura IV. 2.14), por lo que se concluye que el proceso no es de equilibrio y está cinéticamente controlado, no pudiéndose aplicar por lo tanto modelo alguno de equilibrio al análisis de las trazas para obtener parámetros termodinámicos.

Por esta razón se ha intentado aplicar el modelo cinético simple o de dos estados desarrollado en este laboratorio por el Dr. José Manuel Sánchez Ruiz (Sánchez-Ruiz et al., 1988a). El modelo cinético simple supone que la proteína pasa de su estado nativo, N, al estado desnaturalizado, D, mediante un proceso cinético irreversible de primer orden con una

constante cinética, k , que sigue la ecuación de Arrhenius



Este modelo permite obtener los parámetros cinéticos del proceso de desnaturalización mediante diversos caminos y utilizando diferente información calorimétrica obtenida experimentalmente de los barridos de CDB; si los parámetros cinéticos calculados por los diferentes caminos coinciden se puede concluir que el proceso cumple este modelo cinético simple (ver Apartado III. 2.6.1.5.4).

Uno de los métodos para hallar los parámetros cinéticos es la utilización de la ecuación que describe el efecto de la velocidad de barrido sobre la temperatura del máximo de la transición calorimétrica (ecuación III.25). Siguiendo el modelo cinético simple al representar $\ln(v/T_m^2)$ vs. $1/T_m$, donde v es la velocidad de calentamiento y T_m es la temperatura del máximo de la transición, se obtiene una línea recta de cuya pendiente se puede calcular la energía de activación, E (procedimiento B, Apartado III. 2.6.1.5.4). En la Figura IV. 2.15 se observa que en nuestro caso esta representación da una buena línea recta obteniéndose una E de 550 kJ/mol. Aunque en la Figura IV. 2.15 se muestra que la velocidad de calentamiento tiene el efecto sobre la temperatura del máximo de la transición predicho por el modelo cinético simple, para comprobar con fidelidad que el proceso de desnaturalización de la mielina sigue este modelo hay que obtener E por otros caminos que empleen otros parámetros calorimétricos diferentes, obtenidos a su vez del experimento de CDB, y comparar los resultados. Un segundo método consistiría en la representación de Arrhenius, $\ln k$ vs. $1/T$, recordando que k , la constante cinética del proceso, se halla utilizando los parámetros calorimétricos v , C_p , Q_t y Q , que corresponden a velocidad de calentamiento, capacidad calorífica a una temperatura T , calor total de la transición y calor desarrollado en el proceso hasta una temperatura T , respectivamente (ecuación III.23). En

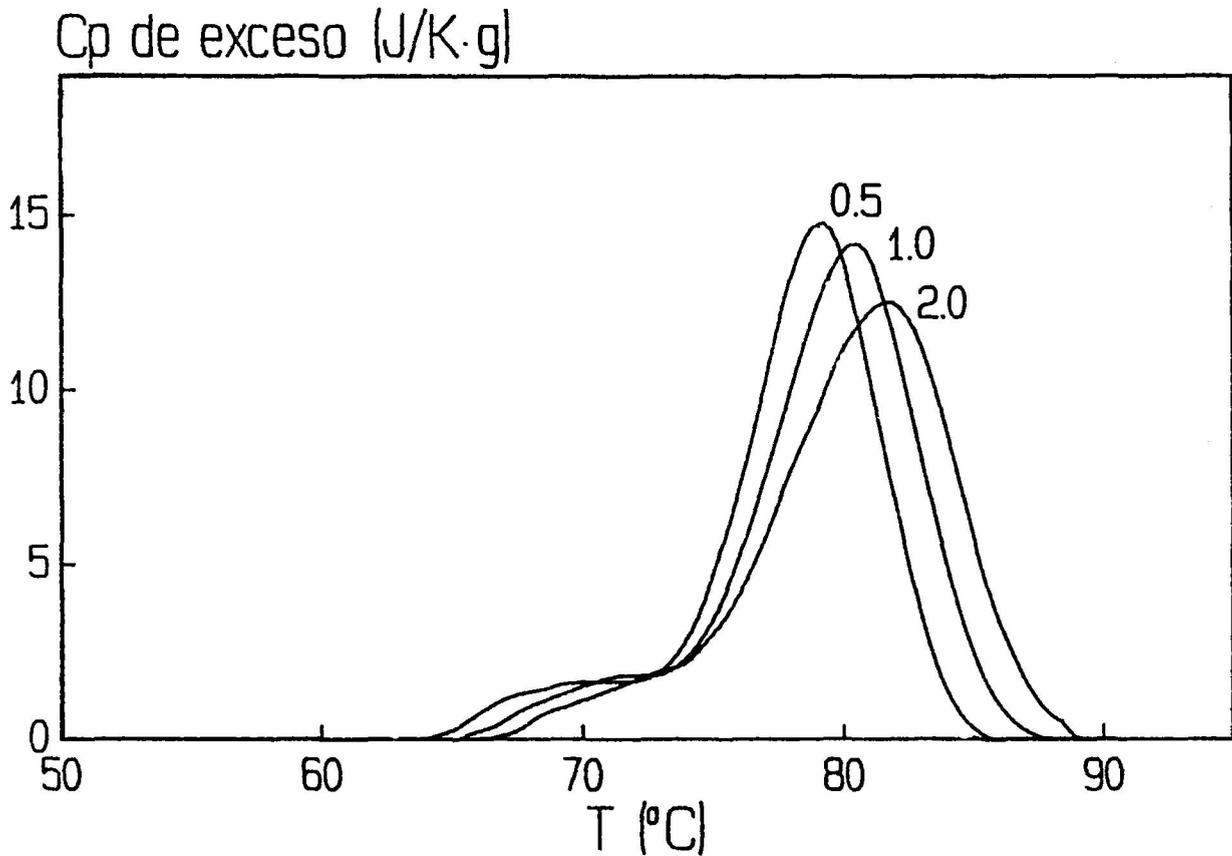


FIGURA IV. 2.14: Efecto de la velocidad de barrido sobre la transición calorimétrica de la mielina. Se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a diferentes velocidades de barrido, las cuales se indican al lado de la traza correspondiente en K/min. La concentración de proteína total en la mielina es de 5,8 mg/ml.

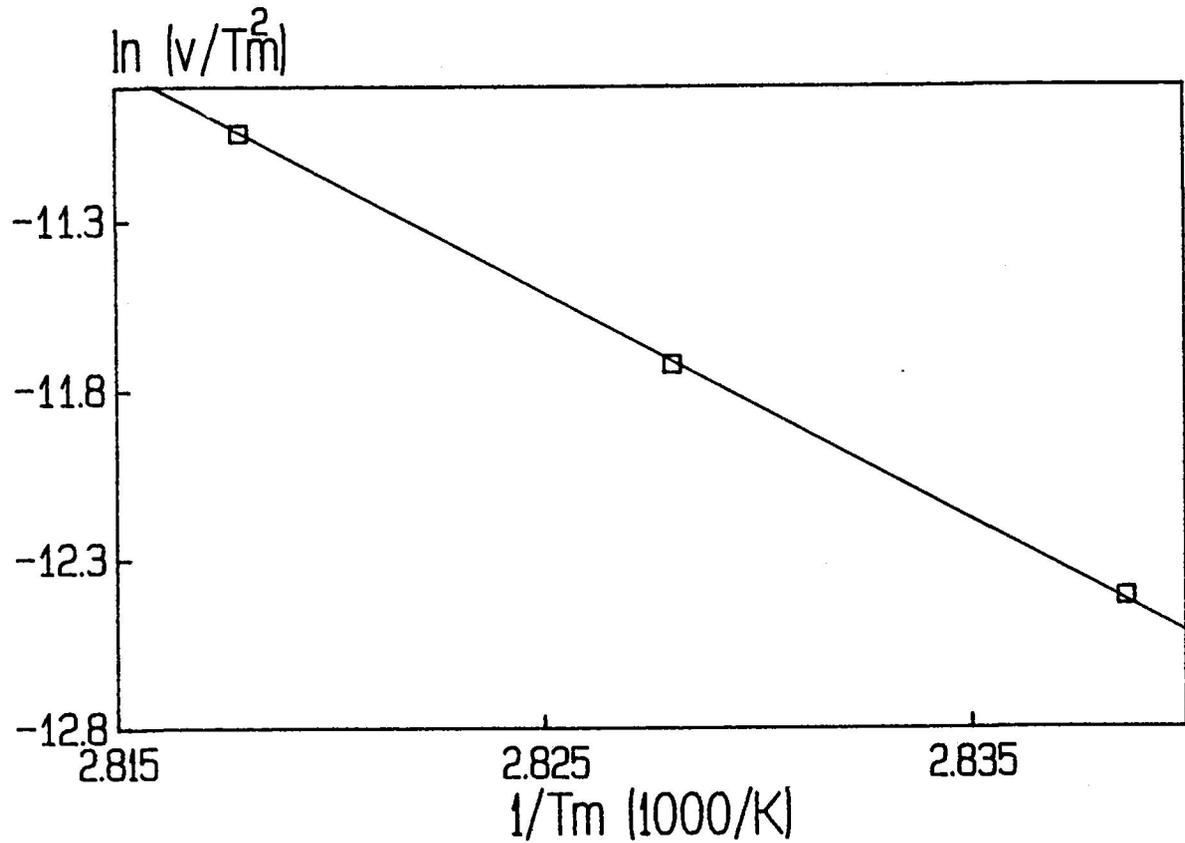


FIGURA IV. 2.15: Efecto de la velocidad de barrido sobre el máximo en la transición calorimétrica de la mielina. Se representa $\ln(v/T_m^2)$ frente a $1/T_m$, que corresponde al procedimiento B del modelo cinético simple (Apartado III. 2.6.1.5.4). La línea recta corresponde al ajuste lineal por mínimos cuadrados.

esta representación de Arrhenius se debe obtener una línea recta para cada velocidad de barrido de cuya pendiente se calcula el valor de E (procedimiento A, Apartado III. 2.6.1.5.4). Si el proceso de desnaturalización sigue el modelo cinético simple los valores de E obtenidos para las diferentes velocidades de barrido tienen que coincidir entre sí y con el obtenido por el método anterior; además las rectas para las diferentes velocidades deben superponerse ya que k es únicamente función de la temperatura y, por tanto, independiente de la velocidad de barrido.

TABLA IV. 2.8

Valores de la energía de activación, E, del proceso de desnaturalización térmica de la membrana mielínica en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) determinados a partir de los distintos métodos de cálculo siguiendo el modelo cinético simple (ver Apartado III. 2.6.1.5.4).

METODO	A	B	C	D
E (kJ/mol)	380 ± 50	550 ± 8	370 ± 40	375 ± 30

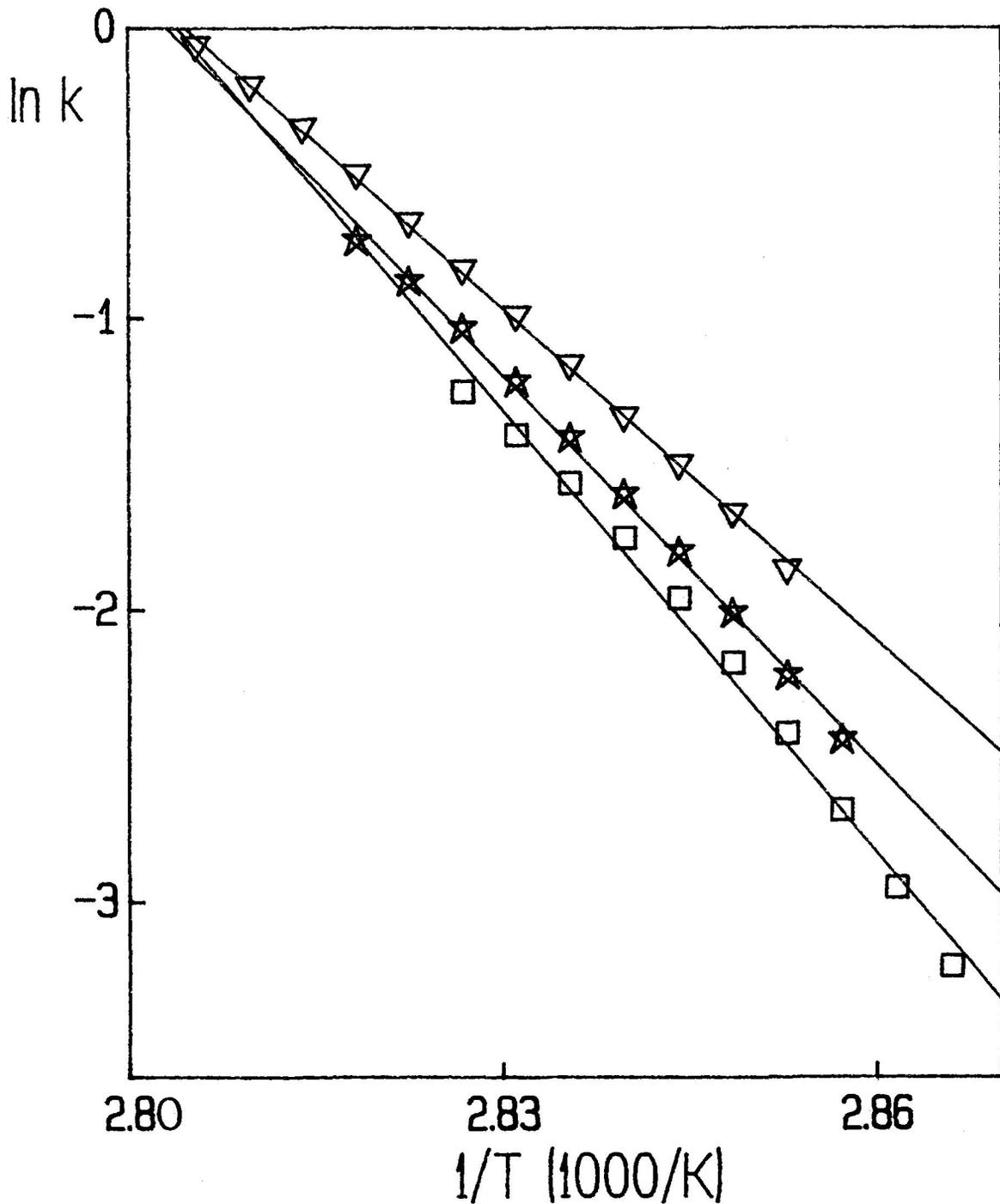


FIGURA IV. 2.16: Representación de Arrhenius del proceso cinético de desnaturalización térmica de la mielina a diferentes velocidades de barrido; (\square) 0,5 K/min, (\star) 1 K/min y (∇) 2 K/min. Las líneas rectas corresponden al ajuste lineal por mínimos cuadrados de los puntos que se representan para cada velocidad de barrido.

En la Figura IV. 2.16 se representa este método de cálculo para la desnaturalización de la mielina. Se observa que las rectas obtenidas para cada velocidad de barrido no se superponen por lo que el proceso se aleja del comportamiento predicho por el modelo cinético simple o de dos estados. En la Tabla IV. 2.8 se aprecian los valores de E obtenidos por los dos métodos de cálculo explicados anteriormente, procedimientos B y A, y también se incluyen los valores calculados por un tercer y cuarto métodos, procedimientos C y D; todos estos procedimientos de cálculo se han explicado convenientemente en el Apartado de Métodos III. 2.6.1.5.4. Se observa que aunque los valores de E coinciden según los procedimientos A, C y D, el valor obtenido por el método B es claramente distinto. Este hecho, y el que en las gráficas de Arrhenius los valores de k dependan de la velocidad de barrido (Figura IV. 2.16), lleva a concluir que el proceso de desnaturalización aunque es un proceso irreversible y cinéticamente controlado no sigue estrictamente el modelo cinético de dos estados.

Como se describía al principio de este Apartado IV. 2 la traza calorimétrica de la mielina obtenida por CDB presenta además de la transición principal a 80 °C un hombro sobre los 70 °C (Figura IV. 2.1), que es irreversible e independiente de la transición principal a 80 °C (Figura IV. 2.2). Puesto que al calentar hasta una cierta temperatura (70 °C en el caso de la Figura IV. 2.2), enfriar y volver a calentar se obtenía exclusivamente el segundo pico sin el hombro citado, se decidió hacer uso de este "precalentamiento" para tratar de ver si la transición de 80 °C así obtenida se ajustaba mejor al modelo cinético de dos estados. Por esta razón se ha procedido a calentar la mielina hasta 70,5 - 72,5 °C (ver Figura IV. 2.17) para eliminar el hombro y poder obtener la transición principal únicamente. Este proceso se ha realizado a diferentes velocidades de barrido (0,5, 1 y 2 K/min) y los resultados obtenidos se han tratado de forma análoga a los anteriormente descritos para

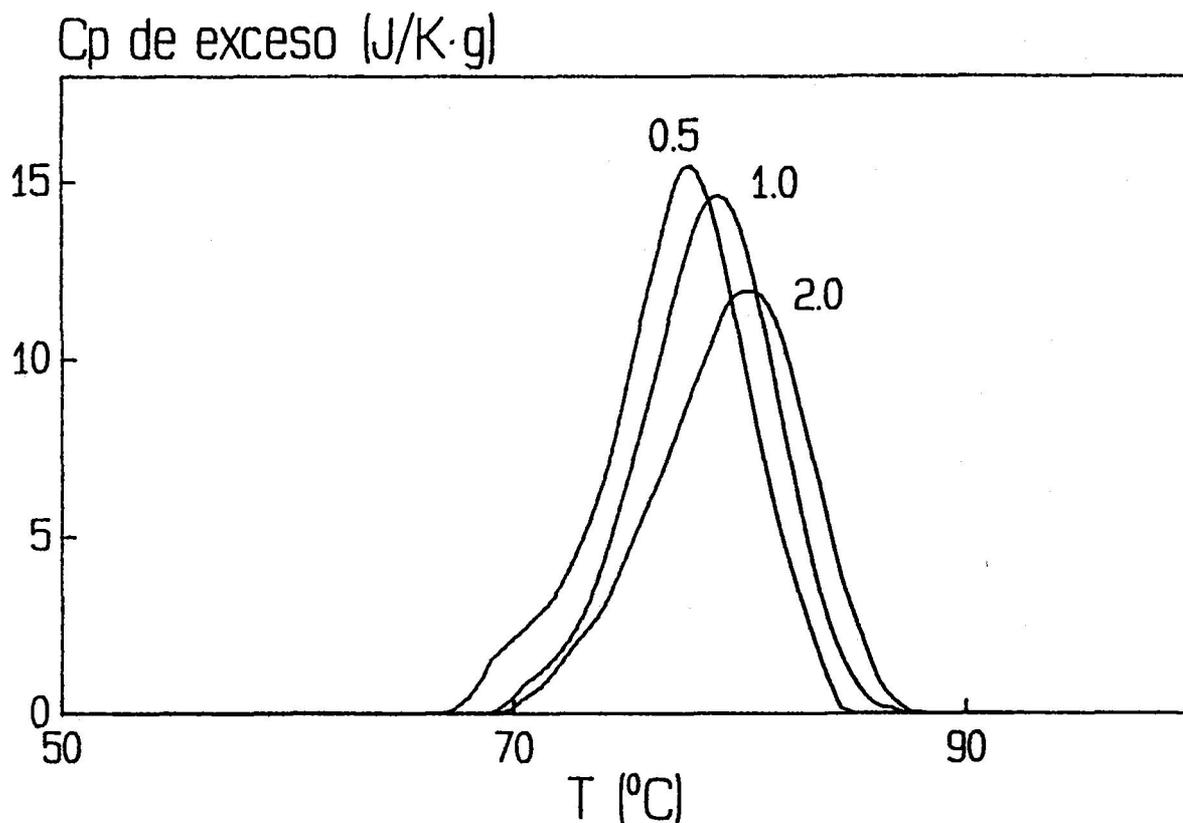


FIGURA IV. 2.17: Efecto de la velocidad de barrido sobre la transición calorimétrica de la mielina. Se representan los perfiles de la capacidad calorífica de exceso frente a la temperatura de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y previamente calentada, hasta 72,5 °C para las velocidades de barrido 1 y 2 K/min y hasta 70,5 °C para 0,5 K/min. Las velocidades de barrido empleadas se indican al lado de la traza correspondiente en K/min. La concentración de proteína total en la mielina es de 5,4 mg/ml.

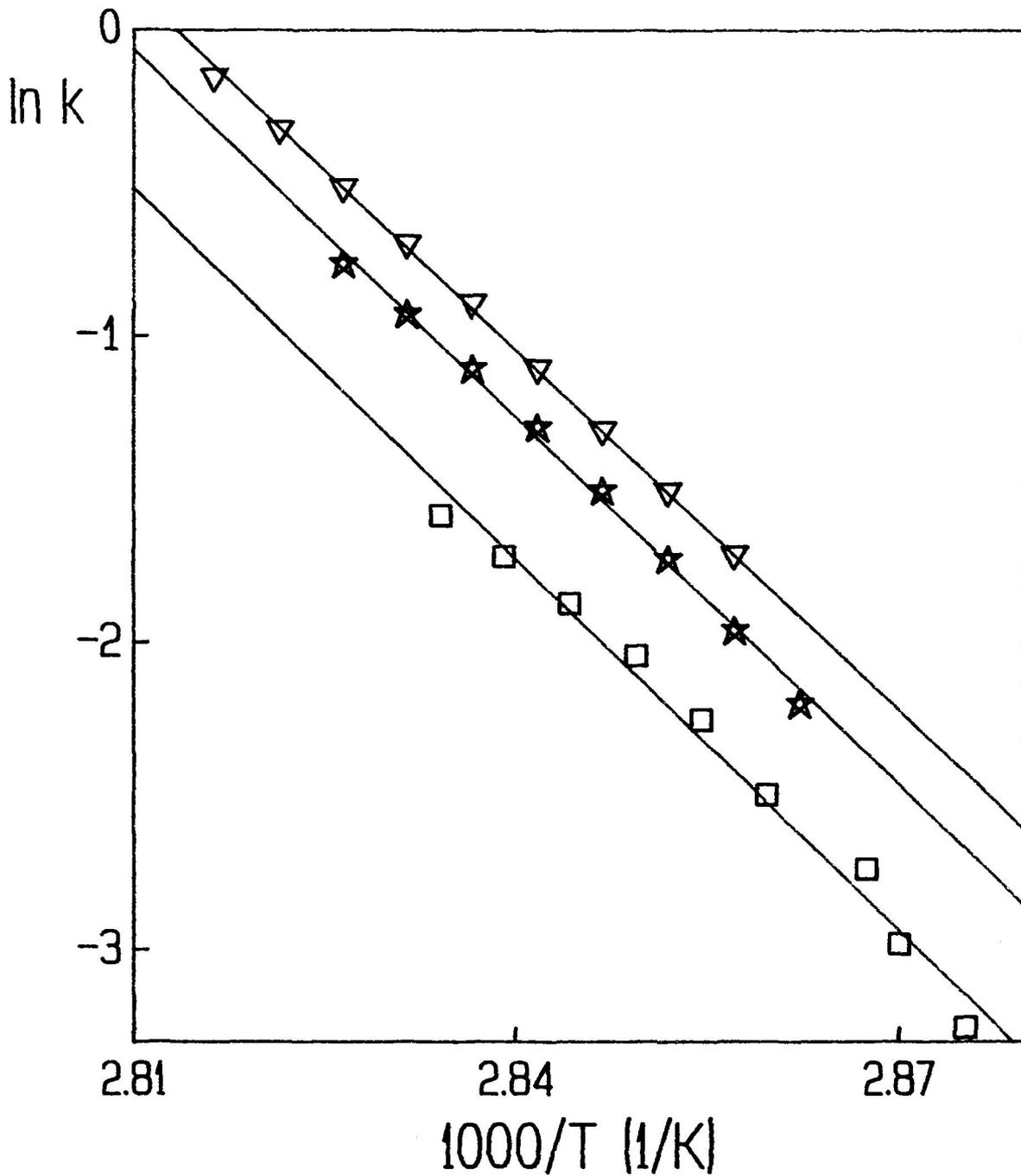


FIGURA IV. 2.18: Representación de Arrhenius del proceso cinético de desnaturalización térmica de la mielina, previamente calentada (ver texto Figura IV. 2.17), a diferentes velocidades de barrido; (\square) 0,5 K/min, (\star) 1 K/min y (∇) 2 K/min. Las líneas rectas corresponden al ajuste lineal por mínimos cuadrados de los puntos que se representan para cada velocidad de barrido.

comprobar si la transición principal, en ausencia del hombro, se ajusta o no a este modelo cinético. Obsérvese, en cualquier caso, que a 0,5 K/min aún permanece una pequeña señal endotérmica sobre los 70 °C después de calentar la muestra hasta 70,5 °C.

Como se observa en la Figura IV. 2.17, la transición térmica de la mielina, previamente calentada, está también controlada cinéticamente. Pero, de forma análoga a lo obtenido con la mielina sin calentar previamente, los valores de E calculados por los diversos procedimientos descritos para el modelo cinético (III. 2.6.1.5.4) no coinciden entre sí. Así por el procedimiento A se obtiene un valor de 330 kJ/mol, por el B de 590 kJ/mol, por el C de 360 kJ/mol y por el D de 360 kJ/mol. Se puede ver que los resultados así obtenidos son muy similares a los descritos para la mielina sin previo calentamiento (Tabla IV. 2.8); es decir, mientras que los valores de E obtenidos por los procedimientos A,C, y D son muy similares, el obtenido por el procedimiento B se vuelve a alejar considerablemente. Además también se ha observado que las representaciones de Arrhenius para las distintas velocidades de barrido no se superponen en una sola línea recta (Figura IV. 2.18).

Por estas razones se concluye que la desnaturalización térmica de la mielina no se ajusta al modelo cinético de dos estados, ni tampoco la transición principal de la traza calorimétrica obtenida a partir de la mielina calentada previamente para eliminar el hombro que aparece a 70 °C.

IV. 2.6. Análisis térmico en gel de poliacrilamida de la mielina

Con el fin de intentar atribuir la transición de la mielina obtenida por CDB a la desnaturalización de unas proteínas concretas, se han realizado estudios de análisis térmico en gel de SDS-PA (ATG). Esta técnica, gracias a la solubilización diferencial entre el estado

nativo y el desnaturalizado que presentan determinadas proteínas de membrana, permite observar individualmente la desnaturalización progresiva de las proteínas que componen un determinado sistema (Rigell et al., 1985). La técnica en sí y la forma de proceder en el experimento se han explicado anteriormente con mayor detalle en el Apartado de Métodos (III. 2.6.2).

Un paso previo para poder realizar estos experimentos de ATG ha sido el buscar las condiciones óptimas para que se produzca una solubilización diferencial de las proteínas que componen la membrana mielínica, lo cual no es algo obvio pues depende de cada sistema en particular. De esta manera, se han probado diferentes detergentes (Triton X-100, octilglucósido, colato sódico y Chaps) a diversas concentraciones y distintos tiempos de sonicación. Se ha observado que tanto el Chaps como el octilglucósido no eran adecuados para la solubilización diferencial en las condiciones probadas, mientras que los otros dos detergentes presentaban una solubilización diferencial aceptable. Así, se han seleccionado experimentos de ATG bajo dos condiciones diferentes de solubilización diferencial:

1.- A 150 μ l de una muestra de mielina previamente calentada hasta cierta temperatura (ver Apartado III. 2.6.2) se le añaden 50 μ l de una disolución de Triton X-100 al 3% (p/v) en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). Se mezcla y se sonica en un baño de sonicación durante 45 segundos. Seguidamente se centrifuga durante 15 minutos para obtener el solubilizado. Mediante estas condiciones se observa una solubilización diferencial del PLP y de la DM-20, mientras que la PBM y la Fracción de Wolfgram no aparecen en el solubilizado en todo el intervalo de temperaturas investigado.

2.- A 150 μ l de la muestra previamente calentada se le añaden 50 μ l de una

disolución de colato sódico al 12% (p/v) en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). Se mezcla y se sonica en un baño de sonicación durante 1 minuto. Se procede como en el caso anterior. En estas condiciones tanto el PLP como la Fracción Wolfgram presentan solubilización diferencial; la DM-20 también sufre solubilización diferencial pero las bandas que aparecen en la electroforesis son demasiado tenues como para medirlas con cierta fiabilidad. La PBM aparece solubilizada en todo el intervalo de temperaturas sin cambio apreciable en la intensidad de su banda electroforética por lo que no se puede detectar solubilización diferencial.

El hecho de que no se hallan encontrado unas condiciones donde se observe una solubilización diferencial entre los estados nativo y desnaturalizado de la PBM no es de extrañar, si se tiene en cuenta que es una proteína semiextrínseca y no tiene capacidad para formar puentes disulfuro ya que no presenta restos de cisteína en su secuencia aminoacídica (Eylar et al., 1971; Brostoff et al., 1974). Así, lo probable es que en nuestro caso la PBM, por este carácter parcialmente hidrofílico, no presente insolubilización en detergentes, ya sea nativa o desnaturalizada, análogamente a lo que ocurre a las subunidades Va y Vb de la citocromo c oxidasa mitocondrial bovina (Rigell y Freire, 1987), o con las subunidades IV y VI de la citocromo c oxidasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Morin et al., 1990).

Una vez que se ha obtenido el solubilizado por una de estas dos formas se procede a la realización de la electroforesis en geles de SDS-PA al 12%, tal y como se indica en el Apartado III. 2.6.2. Después de realizada la electroforesis se tiñen las bandas y se seca el gel para poder efectuar la densitometría de las diferentes calles.

En las Figuras IV. 2.19 y IV. 2.20 se observan las electroforesis correspondientes a dos experimentos de ATG en los que se utilizan ambos métodos de solubilización diferencial

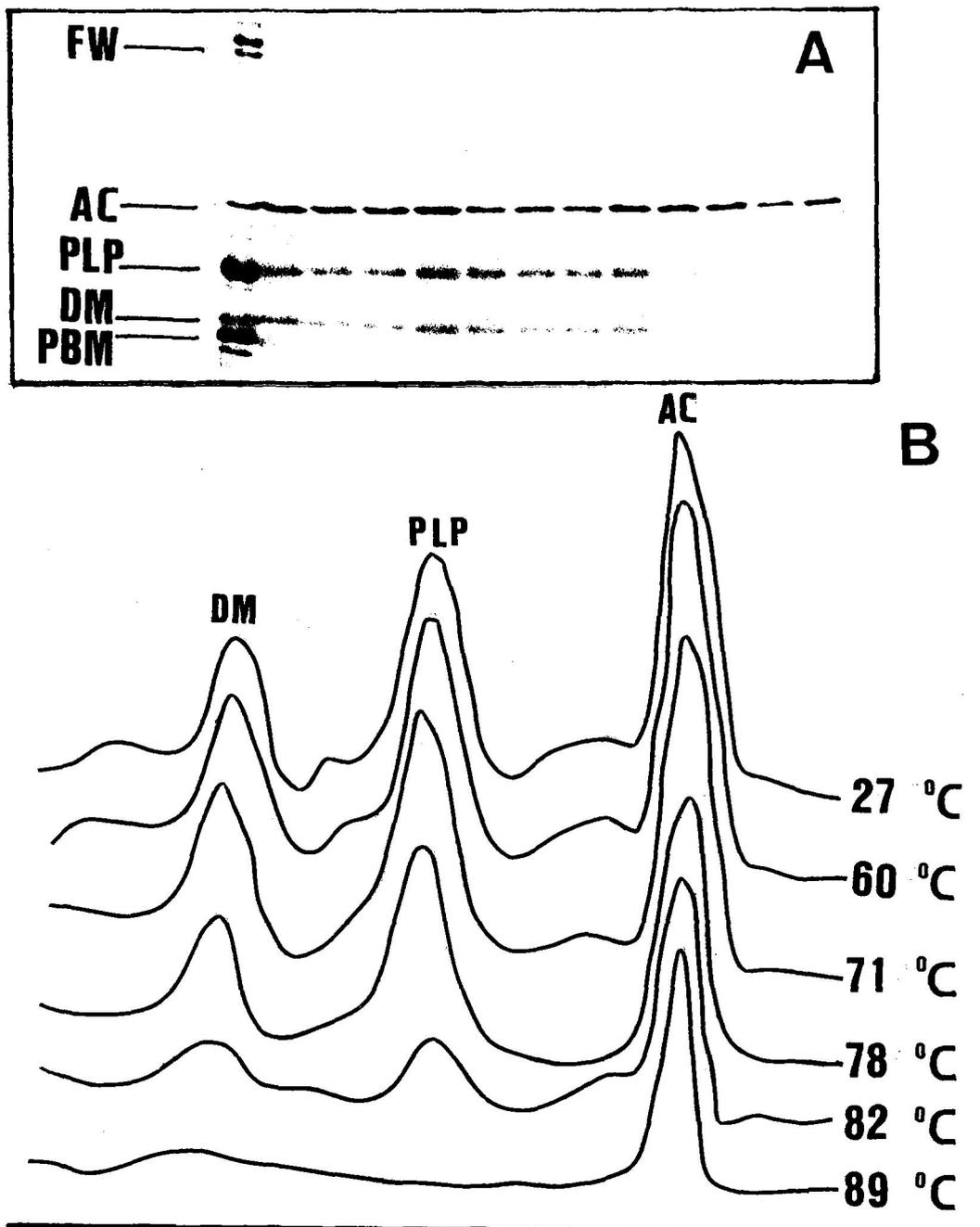


FIGURA IV. 2.19: Análisis térmico en gel de SDS-PA de la mielina, mediante solubilización diferencial con Triton X-100 (procedimiento 1). (A) corresponde a la electroforesis en gel de SDS-PA al 12% del experimento de ATG de la mielina a diferentes temperaturas; la calle de la izquierda corresponde a la mielina, las restantes calles corresponden al experimento de ATG, y las temperaturas son, de izquierda a derecha, 27, 38, 49, 60, 66, 71, 76, 78, 80, 82, 86 y 89 °C. (B) corresponde a las densitometrías de algunas de las muestras del ATG representadas en la electroforesis a las temperaturas que se indican a su lado. FW, Fracción Wolfgram, AC, anhidrasa carbónica, PLP, proteolípido de mielina, DM, DM-20, PBM, proteína básica de mielina. La anhidrasa carbónica sirve de patrón interno para normalizar los valores de las densitometrías.

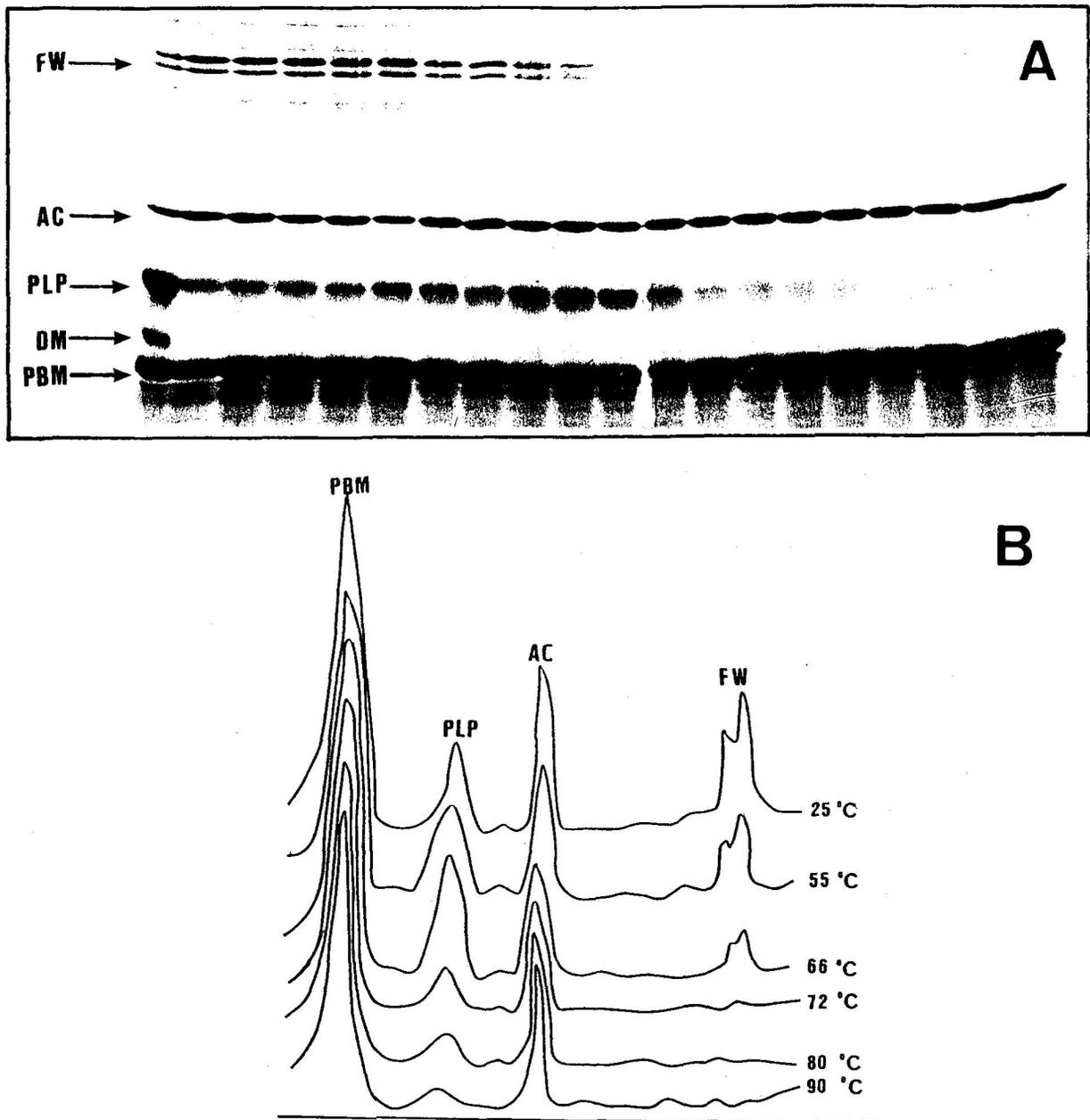


FIGURA IV. 2.20: Análisis térmico en gel de SDS-PA de la mielina, mediante solubilización diferencial con colato sódico (procedimiento 2). (A) corresponde a la electroforesis en gel de SDS-PA al 12% del experimento de ATG de la mielina a diferentes temperaturas; la calle de la izquierda corresponde a la mielina, las restantes calles corresponden al experimento de ATG, y las temperaturas son, de izquierda a derecha, 25, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 80, 82, 84, 86, 90 y 94 °C. (B) corresponde a las densitometrías de las muestras del ATG de algunas de las muestras de las diferentes temperaturas representadas en la electroforesis. FW, Fracción Wolfgram; AC, anhidrasa carbónica; PLP, proteolípido de mielina; DM, DM-20; PBM, proteína básica de mielina. La anhidrasa carbónica sirve de patrón interno para normalizar los valores de las densitometrías.

anteriormente descritos y los perfiles densitométricos de las respectivas calles. Para el caso del Triton X-100 se puede apreciar que las bandas electroforéticas correspondientes al PLP y a la DM-20 desaparecen a temperaturas mayores a 89 °C, mientras que tanto la PBM como la Fracción Wolfgram no se solubilizan en estas condiciones de experimentación. Tanto el PLP como la DM-20 siguen el mismo comportamiento de desnaturalización según los experimentos de ATG, presentando la desnaturalización de la mitad de la población alrededor de los 80 °C. Aplicando el ajuste a la ecuación del modelo cinético simple, que se explica a continuación para el caso del ATG con colato sódico, se obtienen unas temperaturas para el máximo de la transición, T_m , de unos 82 °C para el PLP y de unos 83 °C para la DM-20. Este hecho confirma la gran similitud existente entre la DM-20 y el PLP, conocida tanto en su secuencia aminoacídica como en sus propiedades químico físicas (Trifilieff et al., 1986; Nave et al., 1987) y que ahora se extiende a su estabilidad térmica.

Los experimentos de ATG realizados con colato sódico (Figura IV. 2.20) muestran la desnaturalización progresiva tanto del PLP como de la Fracción Wolfgram. Se observa que la Fracción Wolfgram tiene una desnaturalización de la mitad de la población entre los 55 y 65 °C (según el método de almacenamiento de la mielina) y es total para temperaturas superiores a los 72 °C. En el PLP se observa un comportamiento de desnaturalización similar al obtenido con Triton X-100, como era de esperar, presentando la mitad de la población desnaturalizada a unos 80 °C y a partir de los 90 °C la desnaturalización es total. Para el colato sódico no se observa la banda correspondiente a la DM-20, o en algunos experimentos se distingue una banda muy tenue que no puede medirse con precisión. La banda de la PBM aparece a todas las temperaturas indicando que en estas condiciones se solubiliza tanto en estado nativo como en estado desnaturalizado no pudiendo distinguirse su desnaturalización, como ya se indicó anteriormente.

De estos dos métodos de solubilización se ha escogido el del colato sódico para realizar experimentos de ATG de la mielina conservada a 4 °C durante diferentes tiempos para comparar con los resultados obtenidos mediante CDB. La razón de optar por el colato sódico es que nos da información a la vez del PLP y de la Fracción Wolfgram; además los resultados obtenidos para el PLP se pueden aplicar para la DM-20 como se ha comprobado haciendo experimentos paralelos solubilizando con Triton X-100. Para este estudio comparativo entre CDB y ATG se ha procedido a realizar los experimentos con ambas técnicas simultáneamente y con la misma preparación de muestra. La velocidad del barrido de temperatura tanto del experimento de calorimetría como del baño para el ATG ha sido de 1 K/min. Las áreas de las bandas electroforéticas obtenidas por ATG se han normalizado con el área de la anhidrasa carbónica de la calle correspondiente y estos resultados se han sometido a un ajuste no lineal de mínimos cuadrados (ver Apartado III. 2.6.2.) a una ecuación deducida del modelo cinético simple o de dos estados (ver Apartado III. 2.6.1).

La ecuación de ajuste que se obtiene siguiendo el modelo cinético simple (ver Apartado III. 2.6.1.5.4) es la siguiente:

$$X_n = \exp \left(- \exp \left(\frac{E}{R} \left(\frac{T - T_m}{T^2 m} \right) \right) \right)$$

donde X_n es la fracción de proteína nativa, E es la energía de activación, T la temperatura de calentamiento correspondiente al valor de X_n y T_m la temperatura del máximo del pico de la transición según este modelo. En el ajuste a este modelo se puede observar una dispersión (Figura IV. 2.21) aunque a la hora de calcular los valores de T_m de los experimentos de ATG no se comete apenas error, ya que estos valores de temperatura se hallan en una zona de la curva de gran pendiente con lo que el intervalo de error de temperatura es muy pequeño.

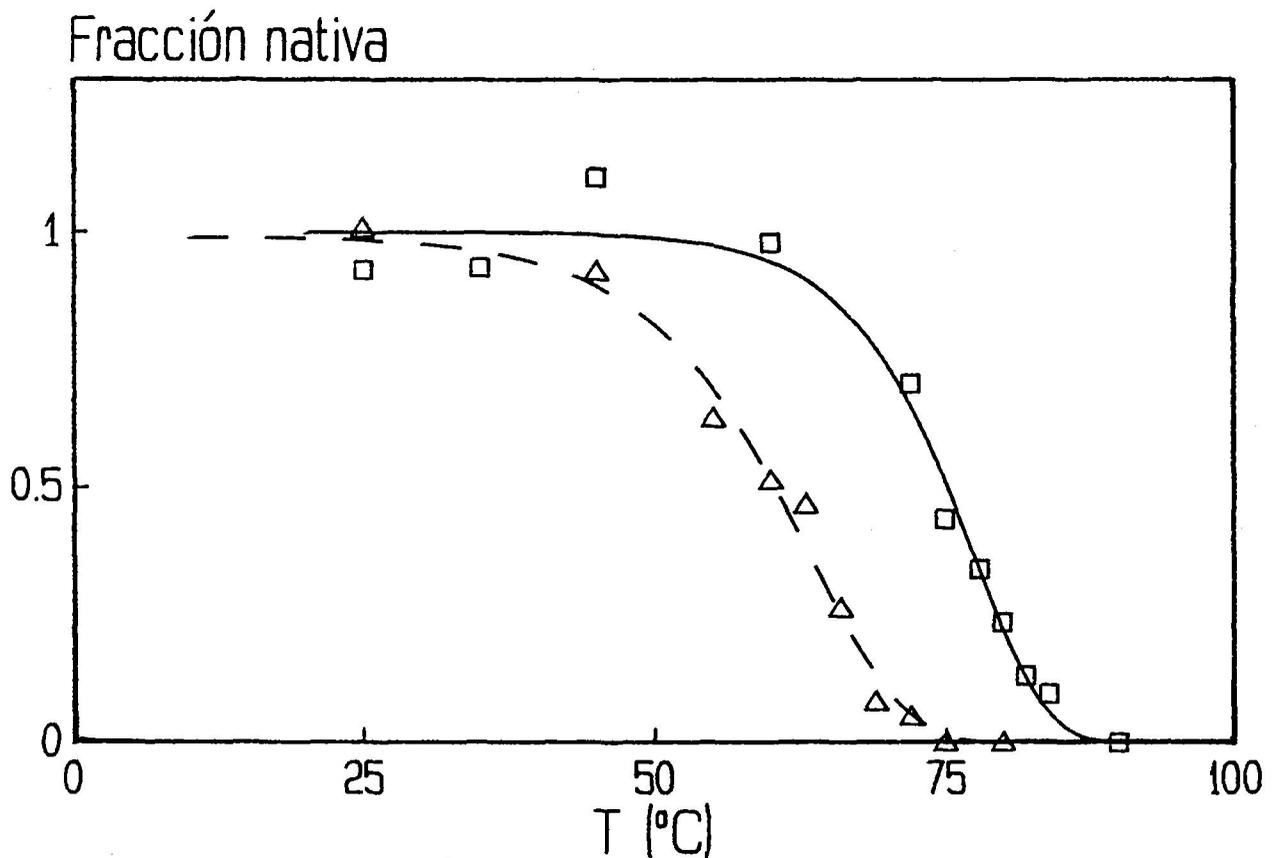


FIGURA IV. 2.21: Representación de la fracción nativa de (□) PLP y de (△) la Fracción Wolfgram frente a la temperatura. Los puntos corresponden a datos experimentales obtenidos del experimento de ATG mostrado en la Figura IV. 2.20. La línea continua corresponde al ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos de PLP a la ecuación del modelo cinético simple descrita en el texto; la línea discontinua corresponde al ajuste respectivo para los datos de la Fracción Wolfgram.

TABLA IV. 2.9

Valores de la temperatura de desnaturalización de la membrana mielínica, Td, obtenidos por CDB. Valores obtenidos a partir de los experimentos de ATG de la temperatura del máximo del pico de la transición, Tm, ajustando los datos de ATG, correspondientes al PLP y a la Fracción Wolfgram, al modelo cinético simple. Los diferentes experimentos corresponden a la mielina almacenada durante diversos tiempos a 4 °C. Los valores de Td son los que aparecen en la Tabla IV. 2.1.

Tiempo a 4 °C	Td (°C)	Tm PLP (°C)	Tm FW (°C)
0 días	80,9	84,8	57,8
2 días	80,7	83,4	57,5
7 días	81,5	81,5	64,3
9 días	81,6	82,4	65,1
14 días	84,2	83,4	64,1

La Tabla IV. 2.9 muestra los resultados de estos ajustes para el PLP junto con la temperatura de transición obtenida del experimento de CDB correspondiente. Se observa que si bien no coinciden exactamente las temperaturas de desnaturalización del PLP con las obtenidas para la mielina por CDB, ambas se aproximan en gran medida, indicando que la transición obtenida en la mielina está directamente relacionada con la desnaturalización del PLP y, muy posiblemente, con la de la DM-20.

Las razones de las discrepancias entre estos valores se pueden explicar teniendo en cuenta varios aspectos:

a- Los datos de CDB de la transición térmica de la mielina no se ajustan exactamente al modelo cinético simple como se ha explicado con anterioridad por lo que es lógico que al aplicar este modelo a los datos obtenidos por ATG no se obtengan resultados totalmente coincidentes con los obtenidos por CDB.

b- El cálculo de las áreas de las bandas electroforéticas está sometido a un amplio margen de error ya que se suelen obtener bandas poco intensas y difuminadas, especialmente en los casos en que la muestra lleva bastantes días de almacenamiento.

c- Hay que tener en cuenta que, muy posiblemente, la transición de la mielina obtenida por CDB no se deba exclusivamente al PLP, sino que se encuentra modificada por otros componentes del sistema tales como otras proteínas (PBM, DM-20), así como por interacción con los lípidos de la membrana. Es posible que estas limitaciones en la comparación entre los resultados de ambas técnicas se deba a la complejidad de la mielina, un sistema formado por muchos más componentes que el PLP, y cuya transición térmica detectada por CDB es tan sensible a un gran conjunto de factores experimentales, como ya se ha explicado con anterioridad en este Apartado IV. 2.

La Tabla IV. 2.9 también muestra los resultados obtenidos del ajuste al modelo

cinético simple a los resultados de los experimentos de ATG para la desnaturalización de la Fracción Wolfgram. A pesar de que en la traza calorimétrica de los experimentos de CDB no se observa ninguna transición de proteína centrada entre los 58 y 64 °C, en los experimentos de ATG se observa la desaparición de la banda electroforética correspondiente a la Fracción Wolfgram, indicando que en ese intervalo de temperatura se produce la desnaturalización térmica de esta proteína. El hecho de que no se detecte transición endotérmica mediante CDB puede deberse a que la relación de Fracción Wolfgram existente en la mielina es muy baja, entre un 10 y un 15% del peso de la proteína total, por lo que su calor de desnaturalización en los experimentos de CDB de mielina será demasiado pequeño como para poderse apreciar. Puede apreciarse una tendencia a aumentar la temperatura de desnaturalización a medida que pasan los días de almacenamiento.

También se han realizado experimentos de ATG para la mielina a la que se ha añadido previamente octilglucósido y se ha eliminado dicho detergente por diálisis (ver Apartado IV. 2.4.2). Este tipo de muestra presenta una transición calorimétrica centrada sobre los 70 °C por lo que se ha creído interesante realizar experimentos de ATG de dicha muestra para observar el comportamiento de desnaturalización de las proteínas presentes en la mielina, especialmente del PLP. El protocolo de experimentación seguido ha sido análogo al descrito anteriormente, aunque al ser una muestra ligeramente diferente se ha tenido que hacer un nuevo estudio para obtener las condiciones óptimas de solubilización diferencial. Así, en estos experimentos, se han mezclado 150 µl de la muestra previamente calentada a la temperatura deseada y 50 µl de una disolución de colato sódico al 6% (p/v) en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y, esta mezcla, se ha sonicado durante 1 minuto. Los pasos ulteriores son idénticos a los descritos para la mielina sin detergente. En la Figura IV. 2.22 se observan los datos experimentales, obtenidos del ATG de la mielina con octilglucósido y

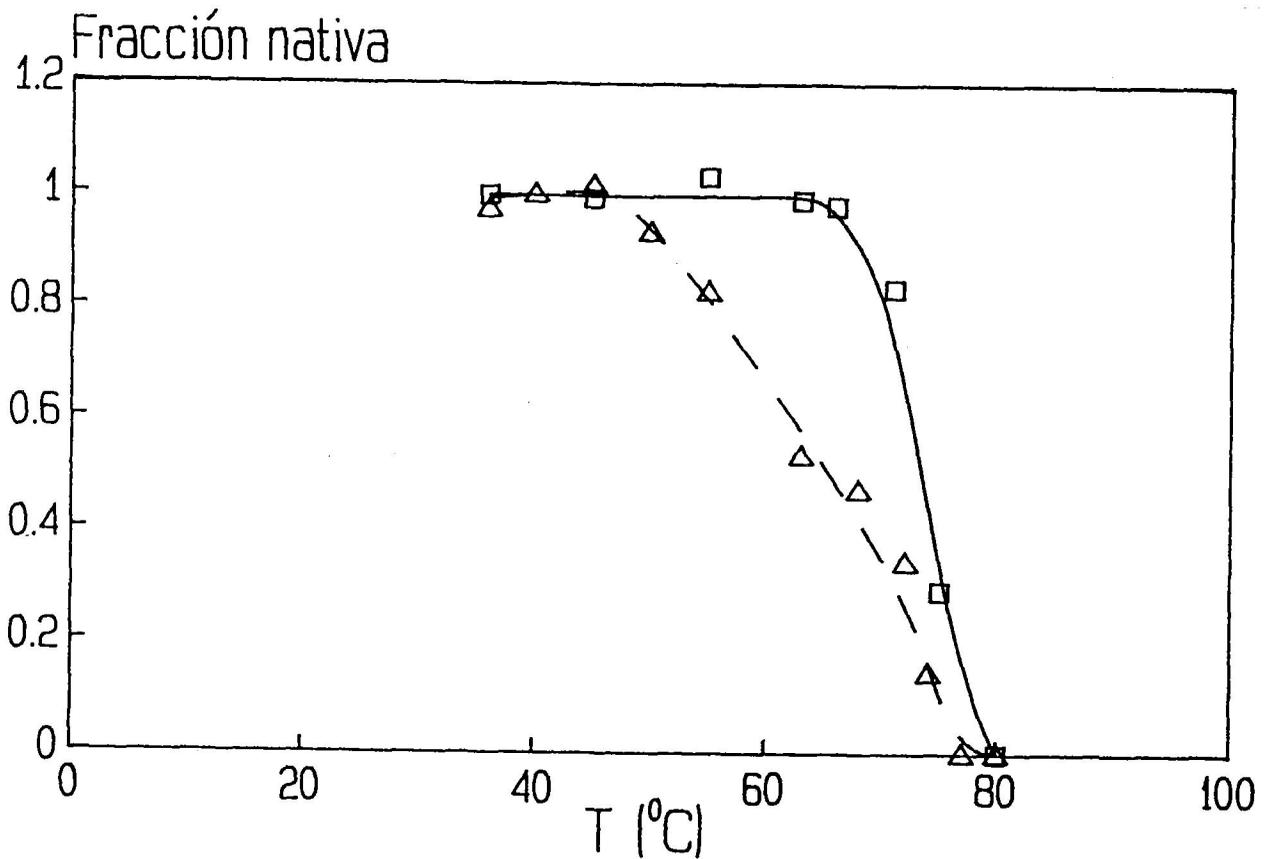


FIGURA IV. 2.22: Representación de la fracción nativa de (□) PLP y de (△) la Fracción Wolfgram frente a la temperatura, correspondiente a una muestra de mielina a la que se le ha añadido octilglucósido hasta una concentración de un 2% (p/v) y posteriormente se ha eliminado dicho detergente mediante diálisis (ver texto). Los puntos corresponden a datos experimentales obtenidos del experimento de ATG. La línea continua corresponde al ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos de PLP a la ecuación del modelo cinético simple descrita en el texto; la línea discontinua corresponde al ajuste respectivo para los datos de la Fracción Wolfgram.

posteriormente dializado, ajustados al modelo cinético simple de la forma descrita previamente en este Apartado. En estos experimentos se obtiene una desnaturalización, visible por ATG, tanto del PLP como de la Fracción Wolfgram. Mediante el ajuste de los datos, estas proteínas presentan una T_m de 74,3 °C y de 65,2 °C para el PLP y la Fracción Wolfgram, respectivamente. Si se comparan estos resultados con los obtenidos para la mielina sin detergente se observa una clara disminución de la T_m para el caso del PLP en la mielina tratada previamente con detergente. Esta disminución de la T_m se correlaciona con la disminución de la T_d obtenida por CDB para la mielina tratada con octilglucósido (Figura IV. 2.11, traza D). Estos resultados hacen presuponer con mayor evidencia que la transición obtenida por CDB para la mielina se deba fundamentalmente a la desnaturalización térmica del PLP. Aunque hay que tener en cuenta que, en este caso, por CDB se obtiene una T_d de 71,3 °C mientras que por ATG la T_m del PLP es de 74,3 °C, las diferencias no son demasiado grandes si se tienen en cuenta las posibles razones argumentadas anteriormente: error del cálculo de áreas de las bandas electroforéticas, no seguir la transición de la mielina por CDB estrictamente el modelo cinético simple, ser la mielina un sistema formado por muchos otros componentes que el PLP (tanto proteínas como lípidos). Para el caso de la Fracción Wolfgram la T_m es similar a la obtenida con la mielina que se ha mantenido almacenada una semana o más tiempo a 4 °C (Tabla IV. 2.9).

IV. 2.7. Espectroscopía FT-IR de la mielina

En este Apartado también se ha aplicado la espectroscopía de FT-IR al estudio de la membrana mielínica, tanto a los componentes proteicos como lipídicos que forman dicha membrana, para poder así comparar con lo descrito en la bibliografía y con lo obtenido en

este trabajo para sistemas más simples procedentes de la mielina. Esta técnica espectroscópica nos permite distinguir claramente los efectos producidos sobre la parte proteica de los producidos sobre la parte lipídica de la membrana, ya que presentan zonas características de vibración diferentes, como se ha explicado en el Apartado IV. 1.

Se han realizado experimentos de FT-IR en medio acuoso de la mielina. Para tal fin, la mielina obtenida a partir de sustancia blanca y en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) (ver Apartado III. 2.1) se concentra por centrifugación a 20.000 xg durante 15 minutos y luego se resuspende en el mismo tampón para obtener una concentración final de unos 10 mg/ml de proteína total. Las condiciones experimentales vienen detalladas en el Apartado de Métodos III. 2.6.3. Para poder observar las diferentes componentes de la banda amida I, se han aplicado a los espectros, una vez restados los del agua, métodos de aumento de resolución utilizados normalmente en la bibliografía, como son la autodeconvolución y la cuarta derivada (Surewicz y Mantsch, 1988; Braiman y Rothschild, 1988).

En la Figura IV. 2.23 se muestra el espectro resultante de la mielina a 20 °C. Se observa que en la zona de la amida I (entre 1600 y 1700 cm^{-1}) se distinguen dos componentes principales, a 1655,4 y a 1629,3 cm^{-1} , que corresponden a hélice α y a estructura β , respectivamente. También puede observarse una pequeña componente a 1686,0 cm^{-1} , que se asigna a giros β . Resultados similares se han descrito para la mielina en presencia de octilglucósido a pH 7,4 (Ayala et al., 1987), donde observan una estructura predominantemente de hélice α con una fuerte componente de estructura β mediante estudios de FT-IR y Raman. La componente de estructura hélice α es predominante aunque la contribución de estructura β es considerable. El espectro de FT-IR es bastante semejante al obtenido con el PLP purificado por disolventes orgánicos (ver Figura IV. 1.10), aunque en

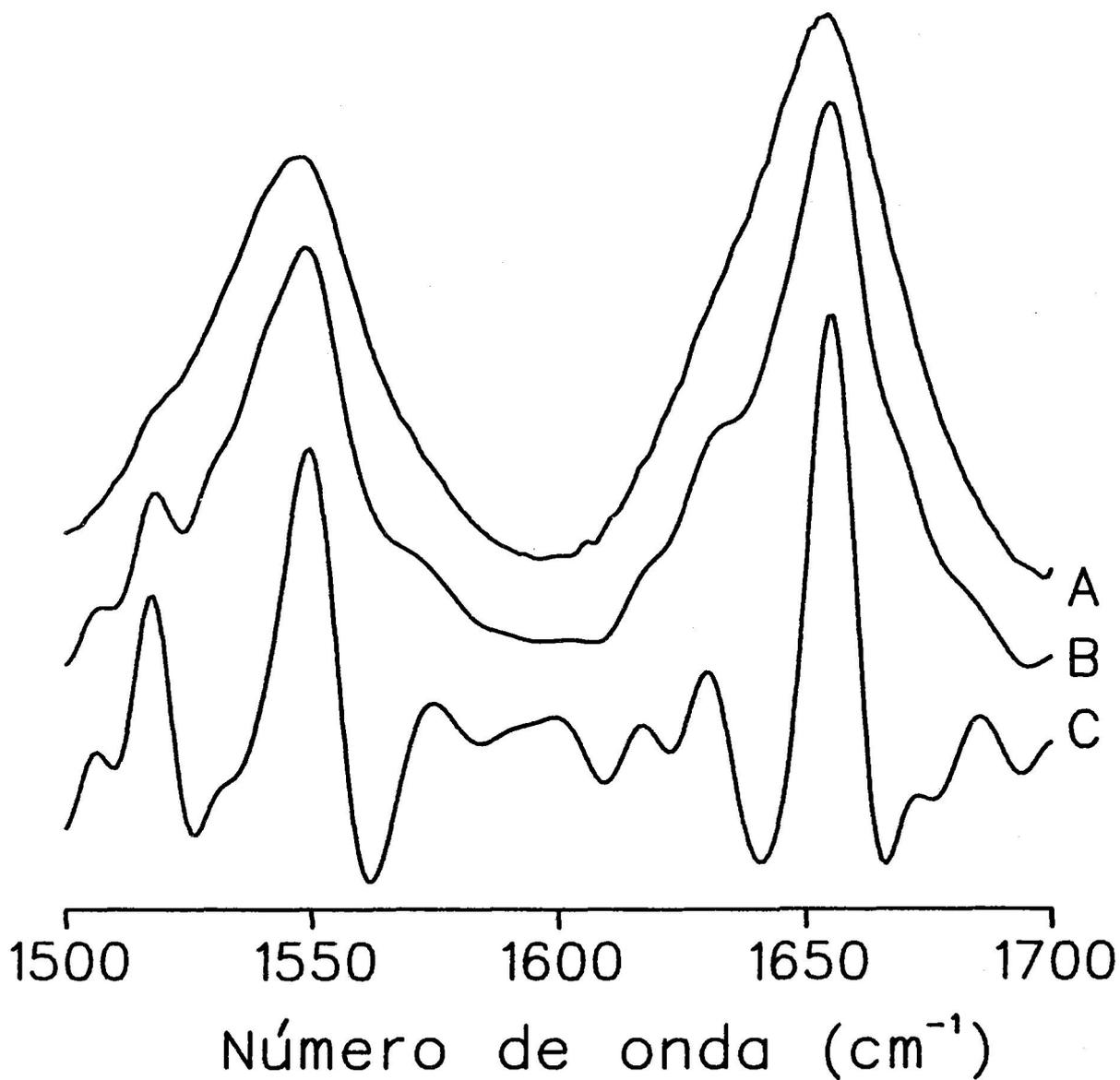


FIGURA IV. 2.23: Espectro de FT-IR entre 1500 y 1700 cm^{-1} de la membrana mielínica en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 20 °C. (A) después de restar el espectro del tampón acuoso; (B) autodeconvolución de Fourier del espectro resta; (C) cuarta derivada del espectro resta.

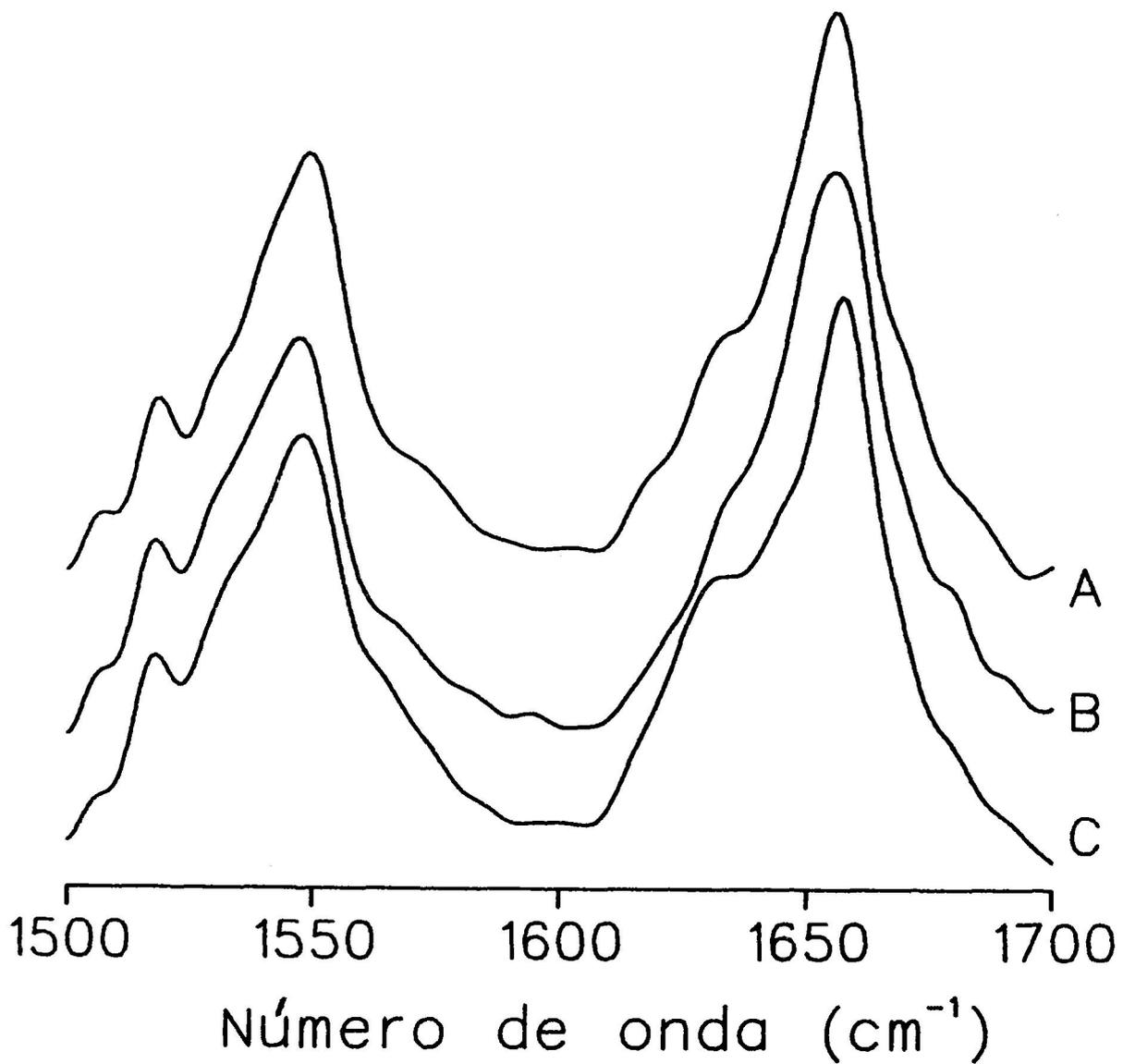


FIGURA IV. 2.24: Autodeconvolución de Fourier de los espectros de FT-IR de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a (A) 20 °C, (B) 60 °C y (C) después de calentar a 90 °C y enfriar hasta 20 °C.

el caso del PLP la componente de estructura β es aún mayor. Esta alta contribución de estructura β en la mielina puede deberse a la presencia abundante de la PBM, ya que se atribuye una proporción superior al 50% de este tipo de estructura a la PBM en medio lipídico (Surewicz et al., 1987b).

Cuando la mielina se calienta hasta 60 °C los espectros obtenidos de la banda amida I no varían significativamente (Figura IV. 2.24). Si se sigue calentando la mielina hasta 90 °C y luego se enfría se observa que la componente de 1629,3 cm^{-1} aumenta considerablemente (Figura IV. 2.24) indicando la desnaturalización de una o varias de las proteínas existentes en la membrana. Esto indica que es en el intervalo de temperatura entre 60 °C y 90 °C cuando aparentemente se produce una desnaturalización de proteínas. Estos resultados son compatibles con los obtenidos por CDB, indicando que la transición calorimétrica obtenida a 80 °C está relacionada con la desnaturalización térmica de una o varias proteínas presentes en la membrana mielínica.

También se ha estudiado la zona del espectro infrarrojo entre 2800 y 3000 cm^{-1} para observar el comportamiento de los lípidos de la membrana con la temperatura. Se observa que los máximos debidos a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-H se desplazan hacia números de onda mayores a medida que aumenta la temperatura de la mielina (Figura IV. 2.25). Cuando se vuelve a enfriar la muestra este desplazamiento se recupera volviendo a la posiciones iniciales que presentaban antes del calentamiento (Figura IV. 2.25). El pico correspondiente a la vibración asimétrica se desplaza de 2851,7 cm^{-1} , a 20 °C, hasta 2853,0 cm^{-1} , a 70 °C (Figura IV. 2.26). Este desplazamiento es prácticamente continuo en este intervalo de temperaturas, aunque presenta una ligera inflexión a 46 °C mediante ajuste de la Figura IV. 2.26 a un modelo de equilibrio de dos estados. Estos datos indican que los lípidos de la mielina a 20 °C se encuentran en un estado más fluido que en

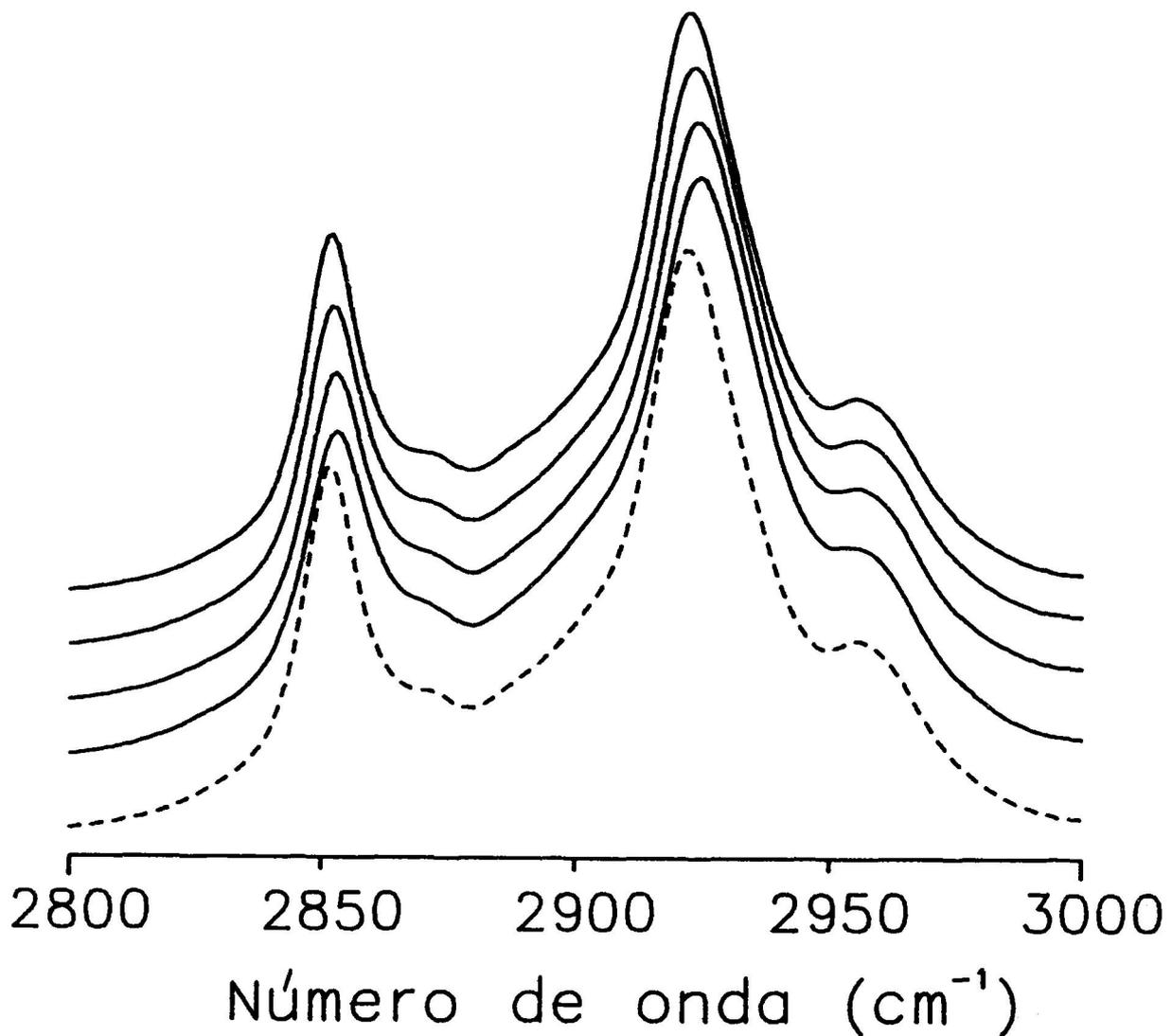


FIGURA IV. 2.25: Espectros de FT-IR entre 2800 y 3000 cm^{-1} de la mielina en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a temperaturas crecientes. Las temperaturas de los espectros son, de arriba hacia abajo, 20, 40, 60 y 80 °C; la línea discontinua corresponde al espectro de la misma muestra calentada a 80 °C después de haberla enfriado hasta 20 °C.

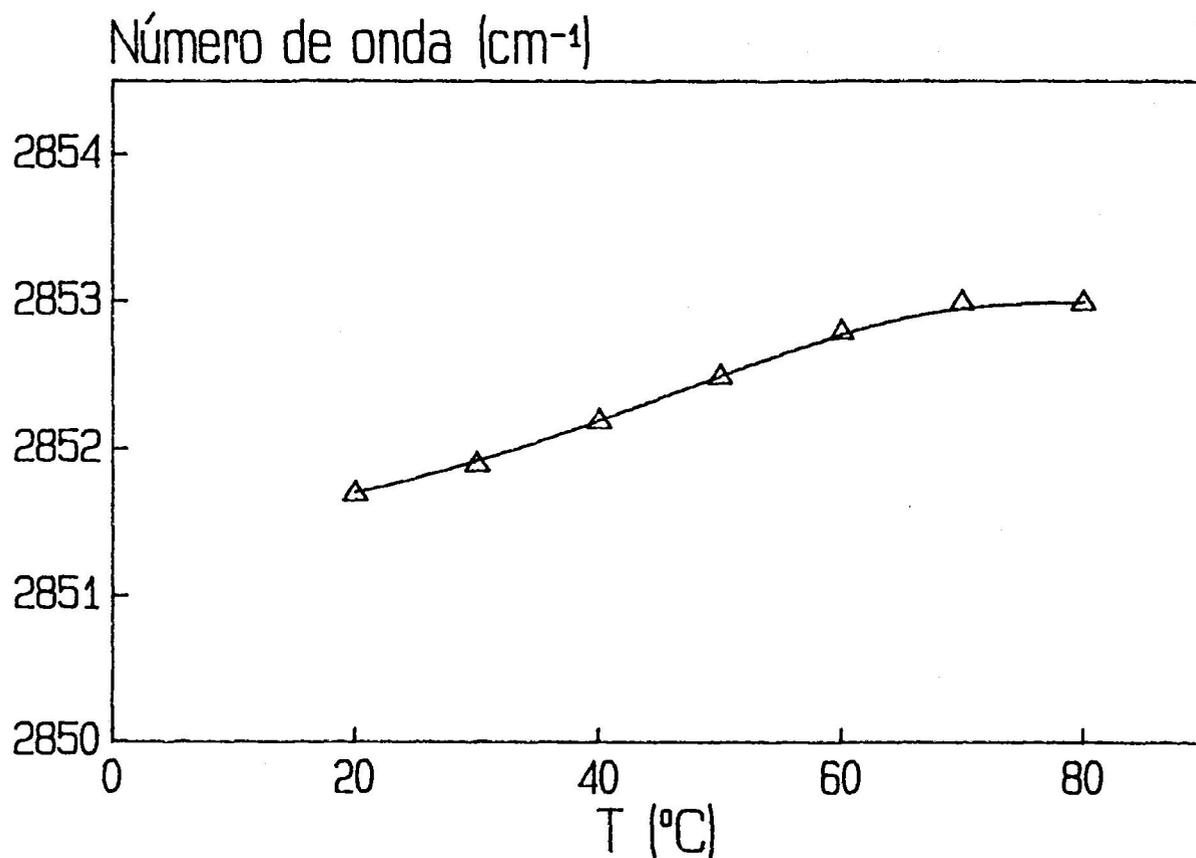


FIGURA IV. 2.26: Representación del número de onda del máximo de la vibración asimétrica de tensión del enlace C-H del componente lipídico de la membrana mielínica. La línea continua corresponde a un ajuste no lineal por mínimos cuadrados siguiendo un modelo reversible de dos estados.

fase gel, y al aumentar la temperatura se van desordenando cada vez más hasta llegar a una fase típicamente de cristal líquido, según la posición del máximo de la vibración asimétrica. El valor de la entalpía de van't Hoff obtenida a partir de la Figura IV. 2.26 es de 100 kJ/mol. Hay que indicar que por CDB normalmente no se observa transición alguna alrededor de esta temperatura, muy posiblemente debido a que es una transición muy ancha y de muy baja entalpía calorimétrica. El hecho de que no se observe ningún cambio de la parte lipídica en la zona cercana a 80 °C es indicativo de que la transición a 80 °C, obtenida por CDB (Figura IV. 2.1), no se debe a lípido y, por tanto, resulta evidente que el principal responsable de dicha transición es el componente proteico de la membrana lipídica, de acuerdo con los resultados ya comentados de ATG.

IV. 3. PURIFICACION DE LAS PROTEINAS MAYORITARIAS DE LA MIELINA

En esta Memoria se ha realizado un trabajo de purificación de las proteínas mayoritarias de la membrana mielínica, PLP y PBM, mediante la utilización de detergentes, con el fin de encontrar vías alternativas a los métodos convencionales de purificación de dichas proteínas. Estos métodos tradicionales han venido usando disolventes orgánicos y/o disoluciones extremadamente acídicas (Oshiro y Eylar, 1970; Monreal, 1975; Aguilar et al., 1983; Helynck et al., 1983; Cheifetz y Moscarello, 1985), medios que probablemente alteran la estructura terciaria y secundaria de las proteínas purificadas. El uso de detergentes viene utilizándose cada vez con mayor frecuencia en la purificación de proteínas de membrana, ya que se supone que en general producen cambios menores que los métodos convencionales en la estructura y, consecuentemente, en la actividad de las proteínas; estos cambios suelen ser además reversibles al reconstituirse la proteína en un medio lipídico (Tanford y Reynolds, 1976; Madden, 1986; Rigell y Freire, 1987; Morin et al., 1990).

En este trabajo se han utilizado detergentes recientemente propuestos para la purificación de estas proteínas de membrana (colato, desoxicolato y Triton X-100), bien siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía (Smith, 1977; Smith et al., 1984; Riccio et al., 1985) o introduciendo nuevos cambios para mejorar el método. También se han empleado nuevos detergentes de reciente utilización en el campo de la purificación de proteínas de membrana (octilglucósido y Chaps). Parte de este trabajo de purificación se ha realizado en colaboración con el Dr. J. Ruiz Cabello del Departamento de Química Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

IV. 3.1. Solubilización de las proteínas de mielina

El primer paso para la purificación de cualquier proteína de membrana mediante el uso de detergentes es la solubilización de la/s proteína/s de la membrana por el detergente utilizado en la purificación. Por esta razón, se ha realizado un estudio previo sobre la solubilización de la mielina por parte de una serie de detergentes con el fin de elegir unas condiciones generales adecuadas en el trabajo de purificación. El método de solubilización seguido se esquematiza en la Figura IV. 3.1.

En estos experimentos de solubilización, tanto la membrana mielínica como las disoluciones de los diferentes detergentes, se encontraban en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), excepto en el caso de la solubilización con desoxicolato sódico que se ha realizado en tampón 50 mM de pirofosfato sódico (pH 9,0). La razón de que en el caso del desoxicolato sódico se haya utilizado este tampón y pH en la purificación del PLP ha sido con el fin de que las condiciones fuesen lo más parecidas a las seguidas por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984) en la purificación del PLP por desoxicolato sódico, como se explicará posteriormente (Apartado IV. 3.2.1). Todas las mezclas mielina-detergente se han mantenido incubándose durante 90 minutos, un tiempo que permite una solubilización efectiva y que no es excesivamente largo. La incubación se ha realizado a 4 °C para evitar una posible desnaturalización de las proteínas durante su solubilización; por esta misma razón todo el proceso restante de purificación se ha realizado también a 4 °C, como se describe en la mayoría de los protocolos de purificación de proteínas. También se ha realizado una segunda solubilización del sedimento obtenido después de la centrifugación, en las mismas condiciones que la primera, y se ha observado que el rendimiento es muy inferior, por lo que solamente se ha procedido a realizar la primera solubilización.

En la Figura IV. 3.2 se observa el comportamiento de los diferentes detergentes

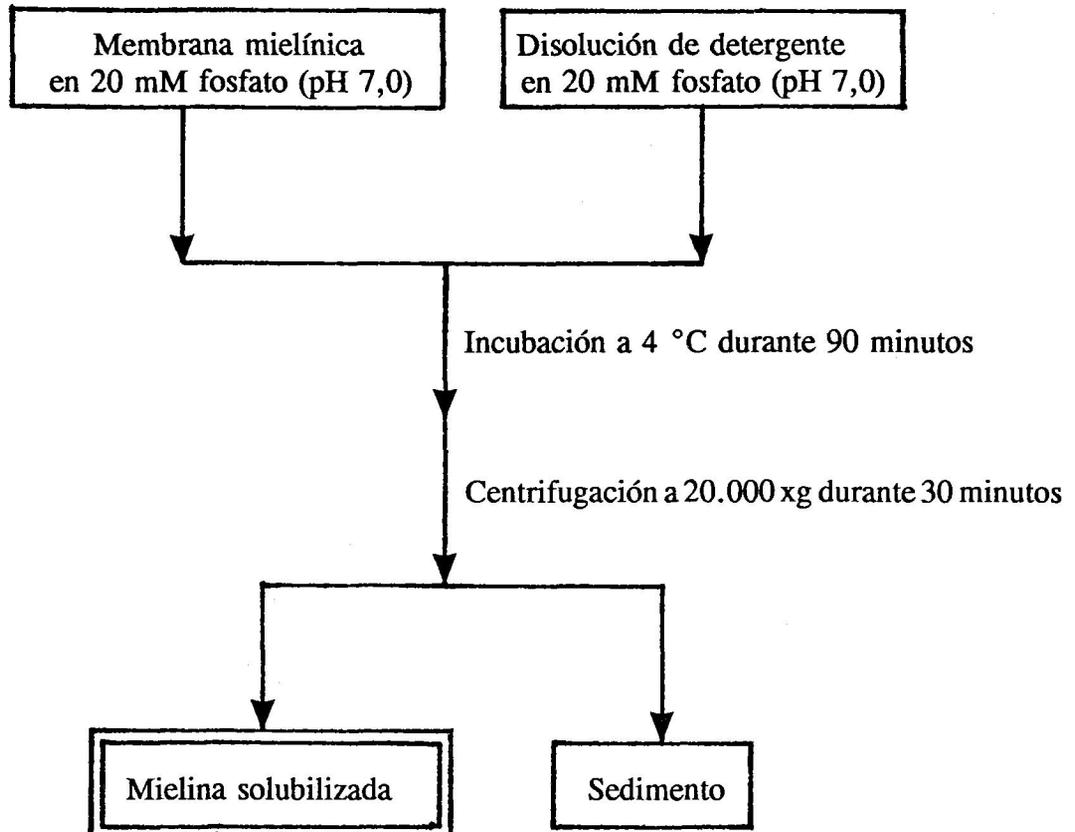


FIGURA IV. 3.1: Esquema general utilizado en esta Memoria para la solubilización de la membrana mielínica en presencia de colato sódico, desoxicolato sódico, Triton X-100, octilglucósido o Chaps.

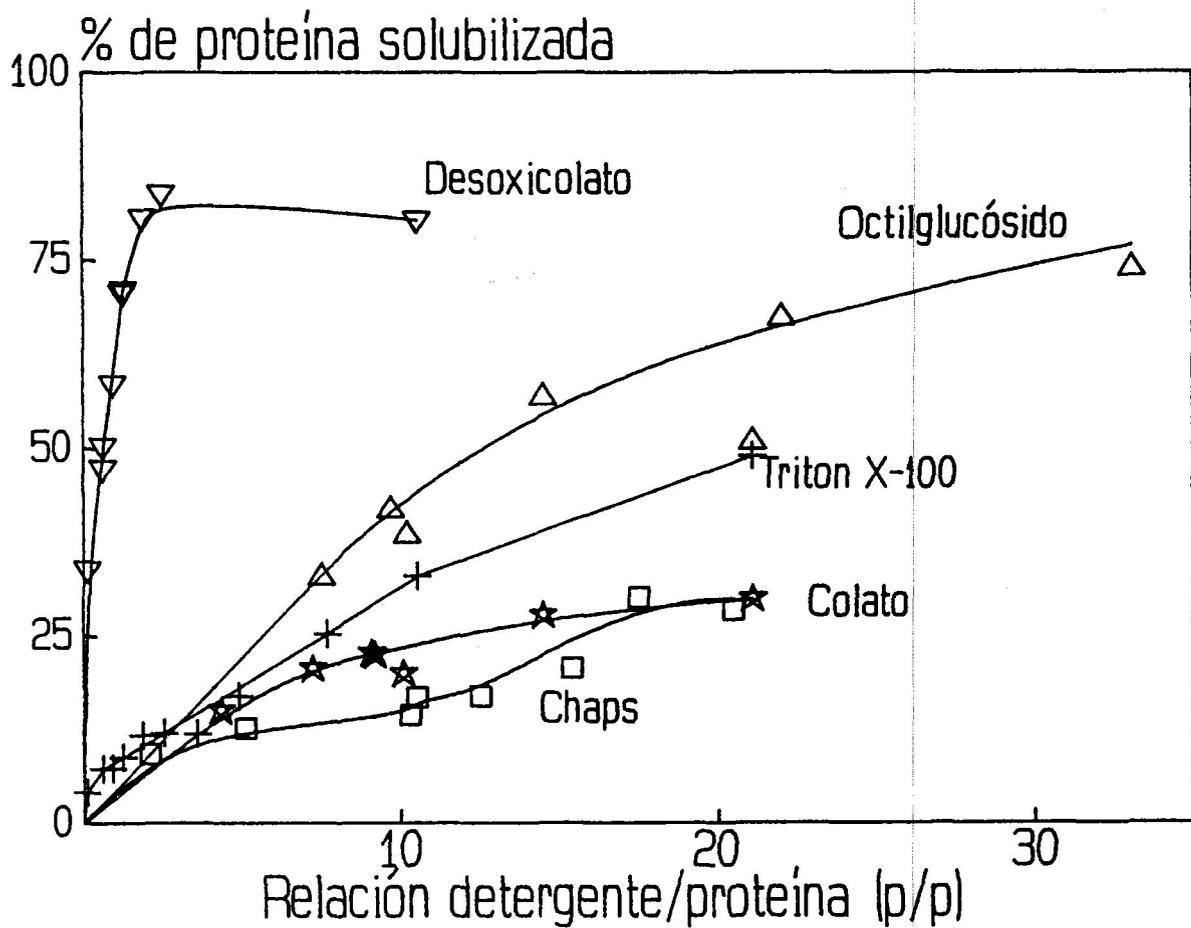


FIGURA IV. 3.2: Representación de la relación detergente/proteína (p/p) frente al % de proteína total de mielina solubilizada. Los detergentes empleados en cada caso se indican en la figura. Las condiciones de solubilización se detallan en el texto.

utilizados en esta Memoria (colato sódico, desoxicolato sódico, Triton X-100, octilglucósido y Chaps) en la solubilización de la membrana miélnica a distintas relaciones detergente/proteína (p/p). La solubilización de la mielina aumenta a medida que aumenta la relación detergente/proteína, como es de esperar (Helenius y Simons, 1975), hasta que se llega a una saturación. En las condiciones utilizadas, se observa una saturación de proteína solubilizada para el desoxicolato sódico, el colato sódico y el Chaps. Para el caso del octilglucósido y el Triton X-100 (detergentes no iónicos) se observa un aumento continuo de solubilización al ir aumentando la proporción de detergente; aunque a partir de una relación detergente/proteína (p/p) de 10 la curva de crecimiento de solubilización se hace más suave. Es de destacar el gran poder solubilizante que muestra el desoxicolato sódico, que para una baja relación detergente/proteína llega a solubilizar cerca del 90% de la proteína total existente en la mielina, mientras que los restantes detergentes presentan unos porcentajes de solubilización no lejanos entre sí para una relación detergente/proteína dada.

El desoxicolato sódico, el Triton X-100 y el octilglucósido solubilizan por igual todas las proteínas mayoritarias que componen la mielina, mientras que el colato sódico y el Chaps solubilizan preferentemente la Fracción Wolfgram y la PBM en relación a la baja solubilización que manifiesta el PLP en presencia de estos dos detergentes (Figura IV. 3.3). Esta selectividad en la solubilización es la causa del menor porcentaje de proteína total solubilizada que presentan estos dos detergentes, con respecto a los otros, si se tiene en cuenta que el PLP representa aproximadamente el 50% de la proteína total de la mielina. Esta característica no descrita hasta ahora, a excepción de la descrita por Riccio y colaboradores con el detergente bromuro de cetil-trimetilamónico (Riccio et al., 1986), se ha aprovechado para una purificación más simple y efectiva de la PBM (ver Apartado IV.3.3).

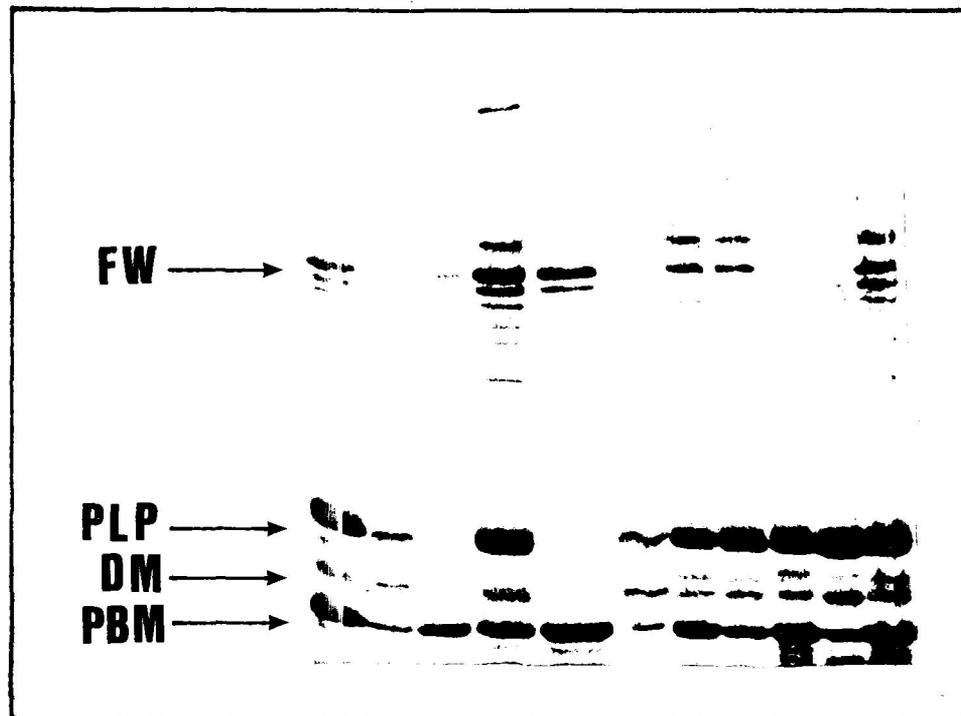


FIGURA IV. 3.3: Electroforesis en gel de SDS-PA al 12% del material solubilizado y no solubilizado de la mielina con diversos detergentes. Las calles de la electroforesis corresponden, de izquierda a derecha, a: mielina, solubilizado con octilglucósido, solubilizado con Chaps, solubilizado con desoxicolato sódico, solubilizado con colato sódico y solubilizado con Triton X-100; las restantes calles corresponden a los respectivos sedimentos, es decir, mielina no solubilizada con octilglucósido, Chaps, desoxicolato sódico, colato sódico y Triton X-100. **FW**, Fracción Wolfgram; **PLP**, proteolípido de mielina; **DM**, DM-20; **PBM**, proteína básica de mielina.

IV. 3.2. Purificación del PLP

Primeramente se ha intentado purificar el PLP con desoxicolato sódico y Triton X-100 siguiendo el protocolo descrito por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984) y, posteriormente, se han realizado modificaciones en el método para hallar nuevos caminos de purificación, a ser posible, más simples y eficaces. Por último, se ha utilizado el detergente no iónico n-octil β -D-glucósido, más conocido por octilglucósido, para purificar el PLP, ya que es un detergente bastante inocuo para las proteínas y muy fácilmente dializable para su posterior eliminación y reconstitución de la proteína purificada.

IV. 3.2.1 Purificación del PLP con desoxicolato sódico

Para esta purificación se ha seguido el método descrito por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984) aunque el tampón utilizado en la disolución de detergente ha sido 50 mM de pirofosfato sódico (pH 9,0) a fin de poder realizar posibles experimentos de CDB una vez obtenida la proteína purificada; la razón del cambio de disolución amortiguadora es que la utilizada por Smith y colaboradores, 200 mM de Tris-HCl (pH 9,3), presenta un gran incremento de su pK al aumentar la temperatura (-0,031 unidades de pH/°C) demasiado elevado para el estudio por CDB ya que al ir aumentando la temperatura en el experimento calorimétrico el pH varía demasiado pudiendo ocurrir una desnaturalización o efectos secundarios debidos al cambio de pH y no solo de temperatura; además el alto calor de protonación del Tris (50 kJ/mol), responsable del gran cambio del pK con la temperatura, afectaría a la medida de calor no pudiéndose obtener una línea base aceptable y originando contribuciones térmicas adicionales a las de la proteína. Para el pirofosfato sódico, el incremento del pK con la temperatura es de -0,006 unidades de pH/°C, debido a su pequeña

entalpía de protonación (6 kJ/mol), y suficientemente bajo como para que sea adecuado en estudios de CDB (Christensen et al., 1976).

Para la solubilización de la mielina se ha utilizado una relación detergente/proteína (p/p) de 3,0, ya que esa relación es la mínima concentración de detergente para la que se obtiene una máxima solubilización (ver Figura IV. 3.2), siendo ésta de un 85% de la proteína total.

El solubilizado de mielina se ha pasado, primeramente, por una columna de 23 cm x 1 cm de diámetro de *Blue Sepharose CL-6B* equilibrada en tampón 50 mM de pirofosfato sódico, 0,5% (p/v) de desoxicolato sódico (pH 9,0). Esta resina es de cromatografía de afinidad y tiene un ligando (Cibacron Blue F3G-A) que presenta especificidad por los nucleótidos 2',3'cíclicos; de esta forma parte de la Fracción Wolfgram se une a la resina. También se ha observado que parte de la PBM queda retenida en la columna por unión inespecífica (Smith et al., 1984). En la Figura IV. 3.4(A) se observa el perfil de elución de esta columna de afinidad para el solubilizado de mielina con desoxicolato sódico, eluyendo con el mismo tampón de equilibrado y a una velocidad de 13 ml/hora. El primer pico se obtiene al eluir con el tampón en que está previamente equilibrada la columna y corresponde a la parte que no queda retenida por la resina. Como se observa en la electroforesis de la Figura IV. 3.5(A), en este pico se eluye fundamentalmente el PLP pero aún con gran cantidad de PBM. También se distingue la banda de la Fracción Wolfgram correspondiente a 60.000 daltons (ver Apartado II. 2.3), mientras que la doble banda de la Fracción Wolfgram correspondiente a 46.000-48.000 daltons queda prácticamente retenida, ya que se ha descrito que esta proteína es una 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfohidrolasa (Sprinkle et al., 1980) y por tanto se unirá con el ligando de la resina. Para eluir la porción proteica unida a la resina se ha tenido que utilizar un agente desnaturizante, en nuestro caso una disolución de urea 6 M. En la Figura IV. 3.5 (A) podemos ver que este segundo pico,

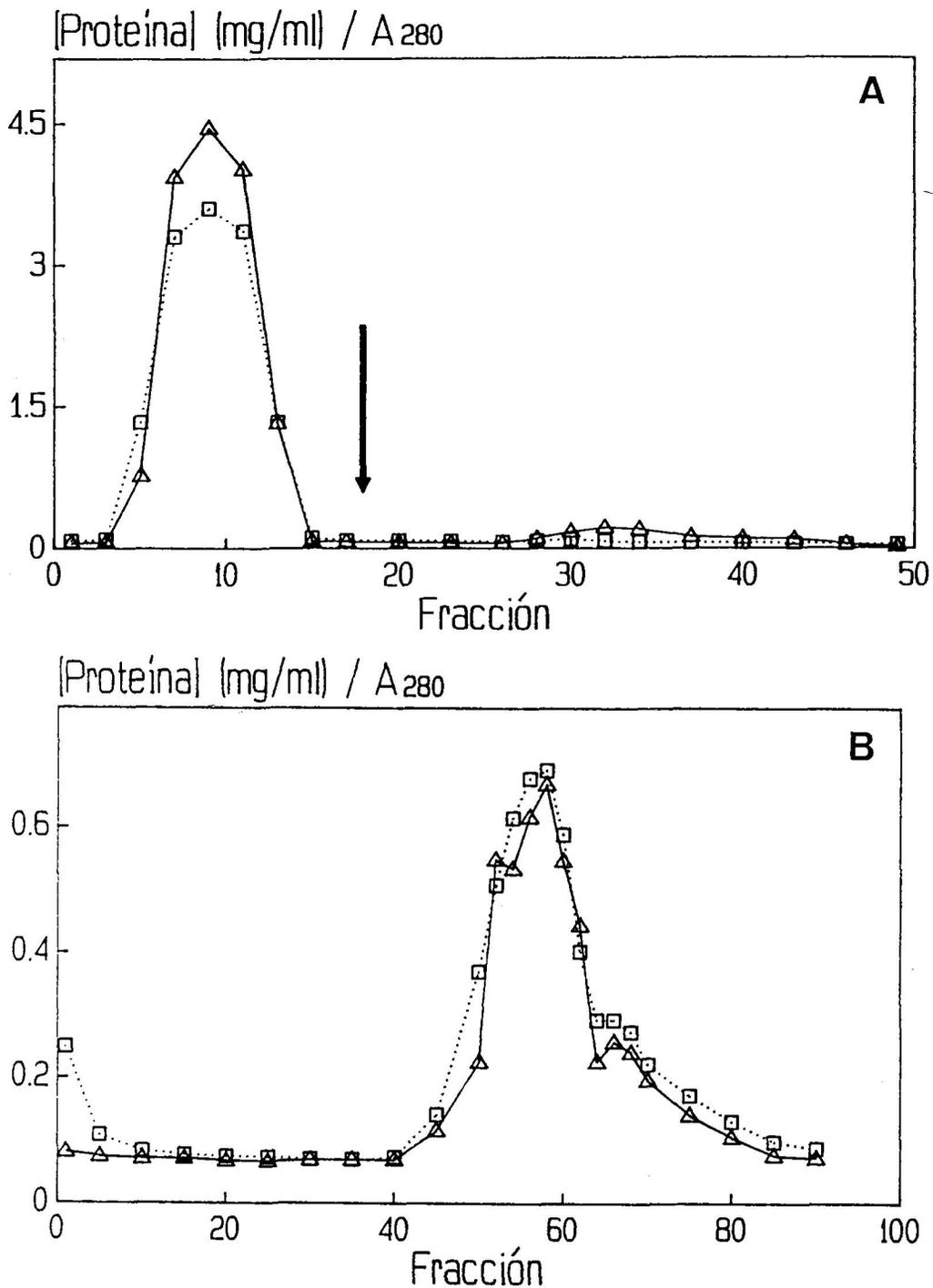


FIGURA IV. 3.4: Purificación del PLP con desoxicolato. (A) Perfil de la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B* del solubilizado de mielina con desoxicolato sódico; la flecha indica el comienzo de la elución con urea 6 M. (B) Perfil de la elución por columna de *Sephacryl S-300* del primer pico obtenido en la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B*. La línea continua representa la concentración de proteína (Wang y Smith, 1975), mientras que la línea discontinua representa la densidad óptica a 280 nm de las diferentes fracciones de las eluciones.

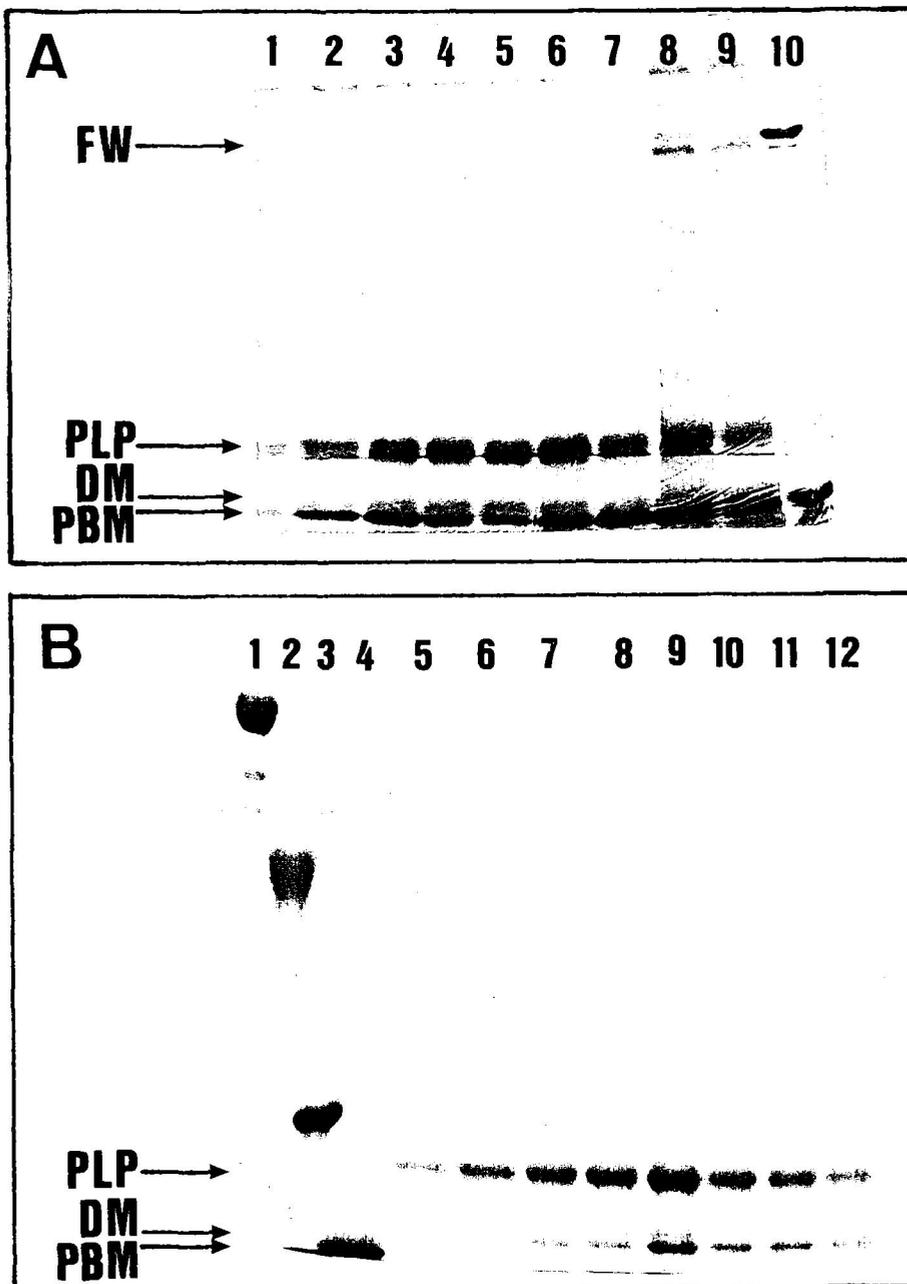


FIGURA IV. 3.5: Electroforesis en gel de SDS-PA al 12% de la purificación del PLP con desoxicolato sódico. **(A)** Electroforesis de la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B* del solubilizado de mielina con desoxicolato sódico; las calles 1 a 9 corresponden a fracciones sucesivas del primer pico de la elución, la calle 10 corresponde al segundo pico de la elución, es decir, cuando se eluye con urea 6 M. **(B)** Electroforesis de la elución por columna de *Sephacryl S-300* del primer pico de la elución con *Blue Sepharose CL-6B*; las calles 1 a 4 corresponden a proteínas patrones: albúmina bovina (66.000), albúmina de huevo (45.000), anhidrasa carbónica (30.000) y β -lactalbúmina (18.400), respectivamente; las calles 5 a la 12 corresponden a fracciones sucesivas del pico de la elución. FW, Fracción Wolfgram; PLP, proteolípidos de mielina; DM, DM-20; PBM, proteína básica de mielina.

obtenido al eluir con urea 6M, contiene fundamentalmente la doble banda de la Fracción de Wolfgram y PBM.

En un segundo paso de purificación, se realiza una cromatografía de tamizado molecular del primer pico obtenido en la elución de la cromatografía de afinidad. Este pico se concentra por ultrafiltración y, posteriormente, se pasa por una columna de 90 cm x 2,4 cm de diámetro de *Sephacryl S-300* equilibrada con tampón 50 mM de pirofosfato sódico, 0,5% (p/v) de desoxicolato sódico (pH 9,0). La elución se realiza con el mismo tampón de equilibrado y con un flujo de 20 ml/hora, recogiendo fracciones de 4 ml. Tanto en el perfil de elución (Figura IV. 3.4.B), como en la electroforesis correspondiente a la elución (Figura IV. 3.5.B), se observa que hay una pequeña separación parcial entre las proteínas PLP y PBM, eluyéndose un poco antes el PLP que la PBM. De todas formas, la separación no resulta adecuada como para obtener suficiente cantidad de PLP para posteriores estudios químicos físicos, especialmente los que se quieren realizar en esta Memoria. Smith y colaboradores obtienen el PLP con un grado de pureza muy elevado a diferencia de lo que se ha obtenido en este trabajo. Una razón para explicar estas discrepancias en la purificación se puede encontrar en las pequeñas variaciones realizadas en el método de purificación (cambio de tampón, ligera diferencia de 0,3 unidades en el pH de las disoluciones,...), ya que se sabe que ligeros cambios en el protocolo de purificación de proteínas pueden conducir a resultados bastante dispares.

IV. 3.2.2. Purificación del PLP con Triton X-100

Esta purificación se ha basado también en la desarrollada por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984), aunque se han realizado ciertas modificaciones con el fin de obtener nuevos caminos de purificación. Mientras que Smith y colaboradores utilizaban fosfocelulosa

como resina de intercambio catiónico, aquí se ha utilizado carboximetil-Sephadex C-50 (CM-Sephadex C-50). Un aspecto importante es que estos autores concentraban el solubilizado antes de pasarlo por la columna de fosfofelulosa. Nosotros, por el contrario, hemos aprovechado el hecho de que el PLP se queda retenido en la resina y, así, no hemos tenido que concentrar el solubilizado. De esta manera, se ha evitado que la concentración de Triton X-100 aumente excesivamente (entre 20 y 30 veces en el trabajo citado), lo cual puede perjudicar a la proteína en gran medida.

Para la solubilización de las proteínas se ha utilizado una relación detergente/proteína (p/p) de 3,0, obteniéndose un rendimiento bajo (alrededor del 15%) pero que permite obtener suficiente cantidad de proteína solubilizada sin tener que elevar demasiado la concentración del Triton X-100, por otra parte, muy difícil de eliminar posteriormente.

Una vez realizada la solubilización de la mielina mediante el uso de Triton X-100, el solubilizado se ha pasado por una columna de 20 cm x 2,5 cm de diámetro de CM-Sephadex C-50 equilibrada en tampón 20 mM de fosfato sódico, 0,25% (p/v) de Triton X-100 (pH 7,0). El flujo de la elución ha sido de 48 ml/hora y el volumen de las fracciones recogidas ha sido de 4 ml.

Primeramente, se ha eluído con el mismo tampón de equilibrado para eluir las proteínas que no se han unido a la resina. Posteriormente, se ha aumentado la fuerza iónica de la disolución de elución con 100 mM de cloruro sódico para despegar las proteínas que se han unido a la resina. En el perfil de elución (Figura IV. 3.6) se observa que aparece el pico de proteína no unida a la resina al principio de la elución y, al aumentar la fuerza iónica, se eluye la proteína anteriormente unida a los grupos carboxilos de la resina. La electroforesis correspondiente a esta elución (Figura IV. 3.7) nos indica que en el pico de

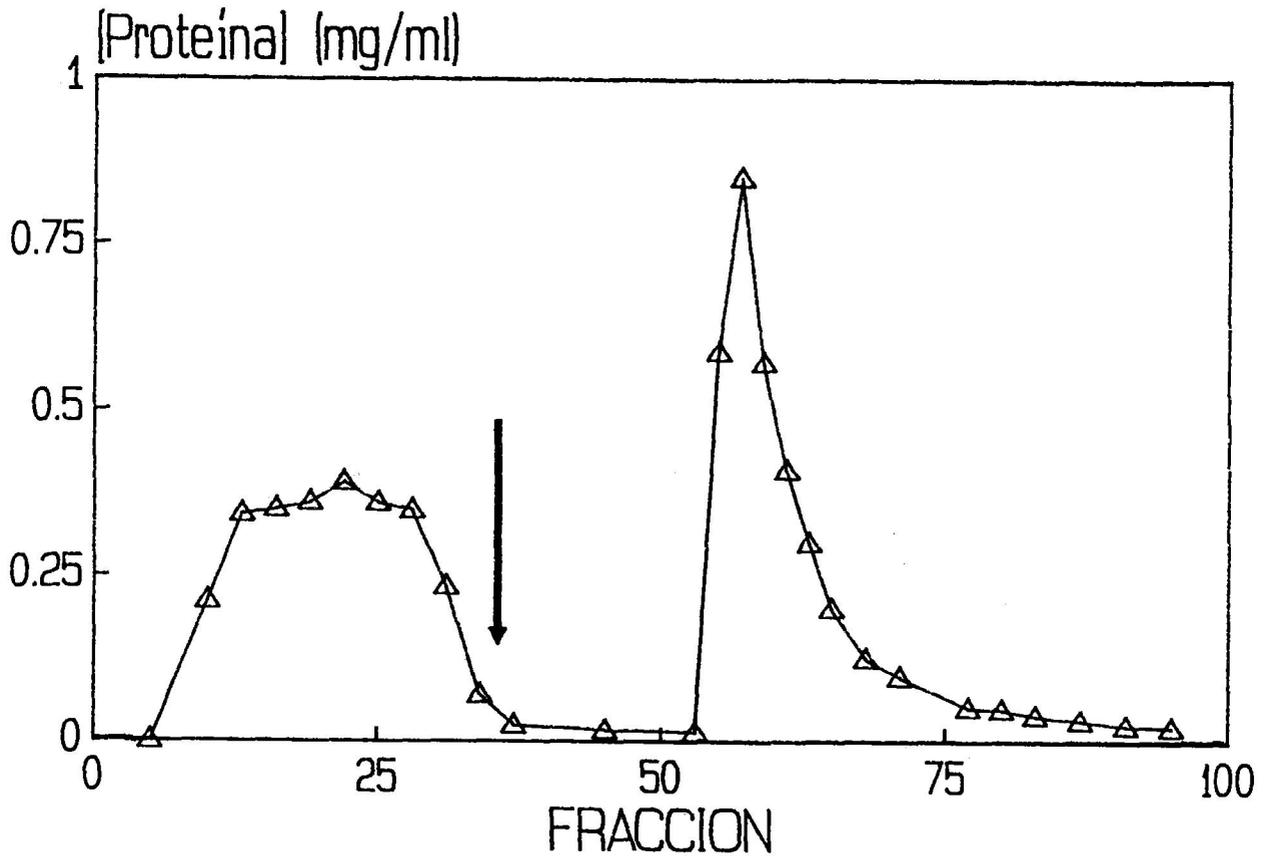


FIGURA IV. 3.6: Purificación del PLP con Triton X-100. Perfil de la elución por columna de *CM-Sephadex C-50* del solubilizado de mielina con Triton X-100; la flecha indica el aumento de fuerza iónica del tampón de elución con 100 mM de cloruro sódico. El flujo de la elución es de 48 ml/hora, recogiéndose fracciones de 4 ml. La línea continua representa la concentración de proteína presente (Wang y Smith, 1975).

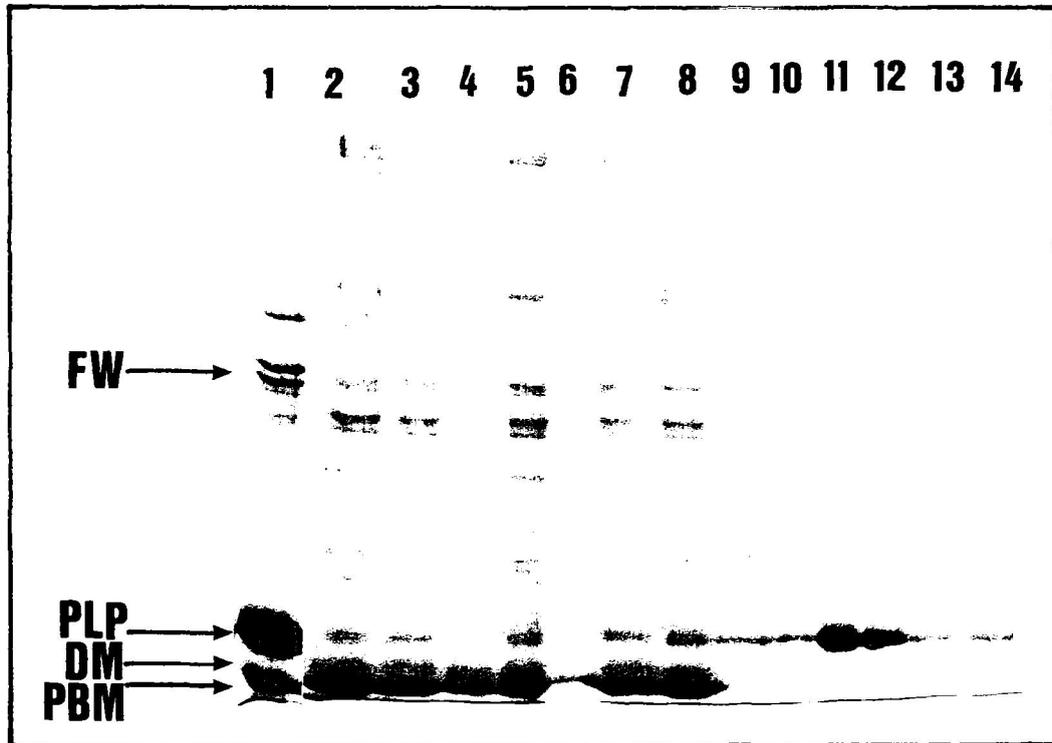


FIGURA IV. 3.7: Electroforesis en gel de SDS-PA al 10% de la purificación del PLP con Triton X-100. En la electroforesis se representan fracciones sucesivas de la elución por columna de *CM-Sephadex C-50* del solubilizado de mielina con Triton X-100. Las distintas calles de la electroforesis corresponden a: 1, mielina, 2 a 8, fracciones sucesivas del primer pico de la elución, 9 a 14, fracciones sucesivas del segundo pico de la elución (con 100 mM de NaCl). FW, Fracción Wolfgram; PLP, proteólípido de mielina; DM, DM-20; PBM, proteína básica de mielina.

proteína no retenida aparece principalmente la PBM, junto con una pequeña cantidad de PLP. También se observa una gran cantidad de bandas electroforéticas que no se corresponden, según su posición en el gel, a las proteínas componentes de la mielina; por lo tanto, se atribuyen a diversos grados de agregación de las diferentes proteínas solubilizadas. Esta aparición de agregados en la electroforesis se ha observado bajo diversas condiciones, como en electroforesis en detergentes (Agrawal et al., 1972) o en presencia de ácidos orgánicos (Lees y Paxman, 1973). El segundo pico, a fuerza iónica de 100 mM NaCl, se observa que corresponde única y exclusivamente a PLP. Los agregados de mayor peso molecular se deberán principalmente a las proteínas de la Fracción Wolfgram, cuyas bandas características no aparecen como tales y, en menor medida, a PLP y PBM ya que la mayor parte de estas proteínas aparece formando su banda electroforética característica. La banda correspondiente a PLP presenta un peso molecular aparente de 24.000 daltons, que coincide muy bien con los datos de la bibliografía (Monreal, 1975; Smith et al., 1984). Las densitometrías de las calles que aparecen en la Figura IV. 3.7, indican que el PLP purificado se obtiene con un mínimo de pureza del 95%. Por lo tanto, el grado de pureza del PLP purificado por Triton X-100 siguiendo el método presentado en esta Memoria es, al menos, tan bueno como el obtenido por Smith y colaboradores, con la ventaja de no concentrar previamente el solubilizado de mielina; esto supone tanto un ahorro en tiempo como una precaución adicional para evitar la posible desnaturalización del PLP.

IV. 3.2.3. Purificación del PLP con octilglucósido

Esta purificación se ha desarrollado empleando un detergente no utilizado hasta la fecha en la purificación del PLP, el octilglucósido, aunque ya ensayado en otras proteínas de membrana debido a la menor perturbación que origina en la estructura proteica con

respecto a otros detergentes, posiblemente debido a su carácter no iónico, así como a su fácil eliminación por diálisis para la posterior reconstitución de la proteína purificada (Jackson y Litman, 1982; Mimms et al., 1981; Rigaud et al., 1988). Tanto esta purificación del PLP con octilglucósido, como la explicada anteriormente con Triton X-100, se han realizado conjuntamente con el Departamento de Química Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (Ruiz-Cabello, 1990).

La solubilización de la mielina por el octilglucósido, como paso previo a la posterior purificación del PLP, se ha realizado tras una selección previa con una relación detergente/proteína (p/p) de 15, obteniéndose un rendimiento de solubilización del 50% de la proteína total de mielina (Figura IV .3.2).

Este solubilizado se ha pasado por una columna de 10 cm x 2,5 cm de diámetro de *CM-Sephadex C-50* equilibrada en tampón 20 mM de fosfato sódico, 1% (p/v) de octilglucósido (pH 7,0). La elución se ha realizado con un flujo de 36 ml/hora y se han recogido fracciones de 3 ml (Ruiz-Cabello et al., enviado); el perfil de dicha elución se presenta en la Figura IV. 3.8. Primeramente se ha eluído la columna con el mismo tampón de equilibrado para eluir las proteínas no unidas a la resina de intercambio catiónico. Posteriormente se ha ido aumentando la fuerza iónica del tampón de elución con concentraciones crecientes y discretas de cloruro sódico de 100, 200 y 500 mM.

Estudios realizados para la optimización de esta purificación, muestran que aunque el segundo pico aparece cuando se ha empezado a eluir con 200 mM de NaCl, la elución previa con 100 mM de NaCl es necesaria, ya que si este primer paso de aumento de fuerza iónica se elimina este segundo pico no aparece. También se ha observado que aumentos en los volúmenes utilizados del tampón que contienen 100 y 200 mM de NaCl durante la elución no mejoran la resolución de los picos correspondientes. En la Figura IV. 3.9 se puede observar la correlación de estos picos con diferentes proteínas constituyentes de la mielina.

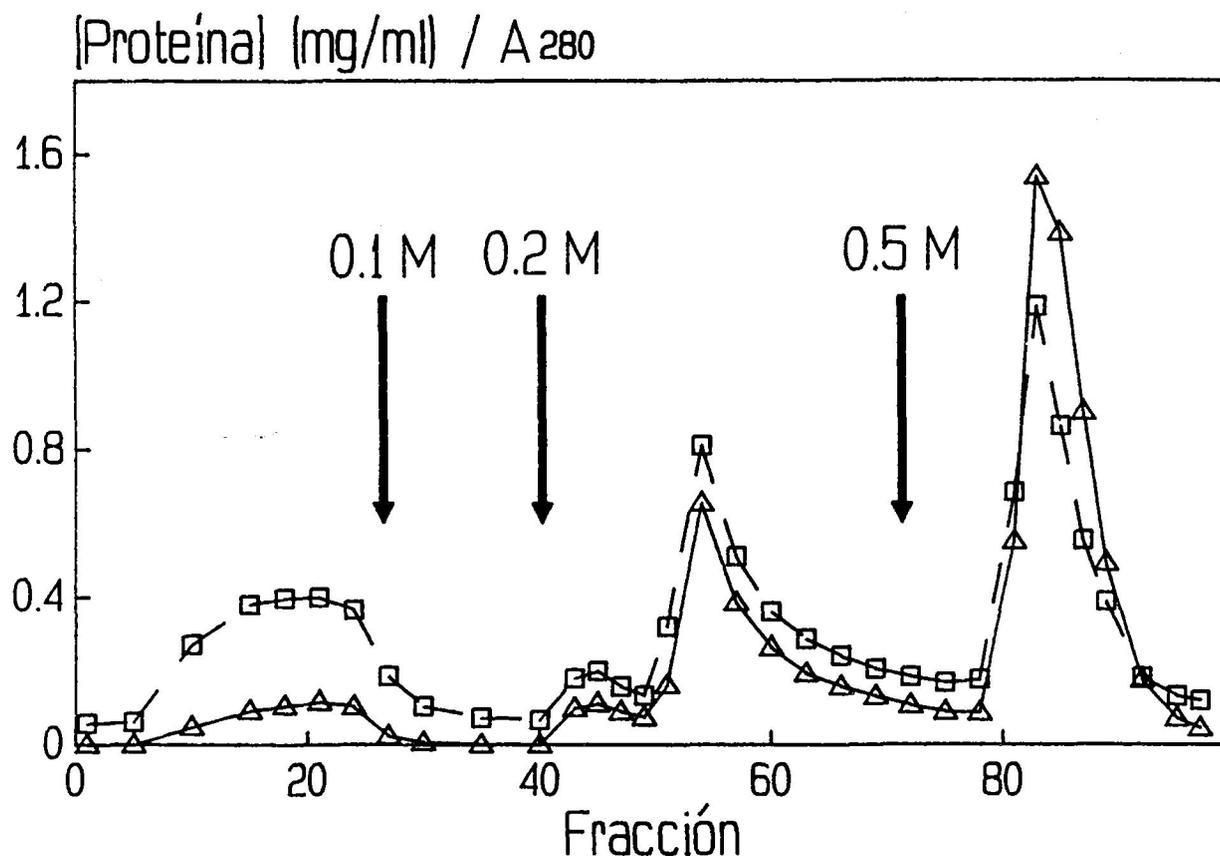


FIGURA IV. 3.8: Purificación del PLP con octilglucósido. Perfil de la elución por columna de *CM-Sephadex C-50* del solubilizado de mielina con octilglucósido; el flujo de la elución es de 36 ml/hora y se recogen fracciones de 3 ml. Las flechas indican el aumento de la fuerza iónica del tampón de elución con 0,1 M, 0,2 M y 0,5 M de cloruro sódico. La línea continua representa la concentración de proteína (Wang y Smith, 1975), mientras que la línea discontinua representa la densidad óptica a 280 nm de las diferentes fracciones de la elución.

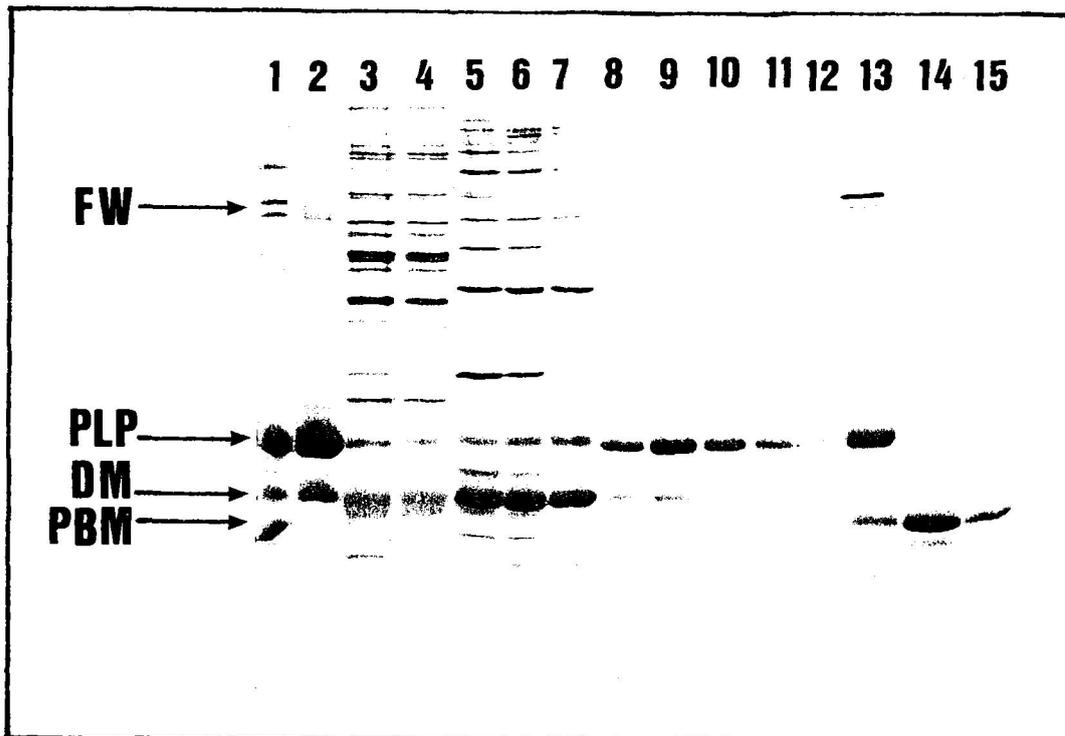


FIGURA IV. 3.9: Electroforesis en gel de SDS-PA al 12% de la purificación del PLP con octilglucósido. En la electroforesis se representan fracciones sucesivas de la elución por columna de *CM-Sephadex C-50* del solubilizado de mielina con octilglucósido. Las distintas calles de la electroforesis corresponden a: 1, mielina, 2, conjunto de las fracciones del tercer pico (fracciones de 51 a 63), 3-4, fracciones del primer pico de la elución (0 M de NaCl), 5 a 7, fracciones del segundo pico (0,2 M de NaCl), 8 a 11, fracciones del tercer pico (0,2 M de NaCl), 12 a 15, fracciones del cuarto pico de la elución (0,5 M de NaCl). FW, Fracción Wolfgram; PLP, proteólípido de mielina; DM, DM-20; PBM, proteína básica de mielina.

El primer pico corresponde a las proteínas que no se unen a la resina y se observa que, como en la purificación con Triton X-100, aparecen diversos agregados de las proteínas solubilizadas; en este caso no se observan prácticamente las bandas características de las proteínas sin agregar, a excepción de la DM-20 y más tenuemente el PLP, indicando que gran parte de éste se ha quedado unido a la resina. En el segundo pico, debido a la elución con 100 mM de NaCl, siguen apareciendo agregados proteicos aunque en menor número; también se observa que se eluye parte de PLP y de DM-20, ésta última en mayor proporción. El tercer pico de la elución corresponde principalmente a PLP, que se eluye juntamente con la DM-20 restante y, en alguna de las fracciones, con una pequeña parte de la Fracción Wolfgram. En el cuarto pico, a fuerza iónica de 500 mM de NaCl, se observa que en las primeras fracciones aparece PLP que no se ha eluído al pasar 200 mM de NaCl, lo que indicaría en este PLP una unión más fuerte con el carboxilo de la resina que la porción de PLP eluída con 200 mM de NaCl. En estas primeras fracciones de este último pico también se observa la Fracción Wolfgram y pequeñas cantidades de PBM. A medida que se eluye con 500 mM de NaCl aparece la PBM bastante pura.

Con este método de purificación se ha conseguido purificar suficientemente el PLP y en cantidades aceptables para estudios posteriores. La densitometría de la calle 2 (Figura IV. 3.9), que corresponde al conjunto de las fracciones del tercer pico de la elución, da una pureza del PLP de un 70%, y con una presencia de DM-20 de 21% y de Fracción Wolfgram de un 8%. Como se observa en la Figura IV. 3.9, durante la elución se obtienen fracciones de mayor pureza, llegando el PLP a constituir cerca del 80% de la proteína de esa fracción (por ejemplo, calle 11 de la Figura IV. 3.9). La pureza que se obtiene mediante octilglucósido no es tan buena como la obtenida con el Triton X-100 (ver Apartado IV. 3.2.2), pero hay que tener en cuenta los problemas que se plantean en la eliminación del Triton X-100 a la hora de reconstituir el PLP purificado, como se comentará posteriormente

en esta Memoria (Apartado IV. 4).

La proteína DM-20 sigue apareciendo en una proporción considerable junto con el PLP a pesar de que se ha mejorado la proporción eliminando parte de ella al eluir con 100 mM de NaCl. Se ha comprobado que aunque se aumente el volumen de elución de 100 mM NaCl no se elimina más cantidad de DM-20, mostrando que la fracción de DM-20 que se eluye con el PLP se encuentra unida a la resina con mayor fuerza, probablemente debido a que su interacción con los grupos carboximetílicos es muy similar a la presentada por el PLP. Como se indicó en el Apartado de Antecedentes Bibliográficos, y hemos comprobado en algunos puntos de este Apartado, la DM-20 presenta muchas similitudes con el PLP y comparte muchas de sus propiedades (Trifilieff et al., 1986; Nave et al., 1987), por lo que hasta ahora no se ha conseguido su separación completa en purificaciones con detergentes, salvo en el caso de la purificación con Triton X-100.

IV. 3.3. Purificación de la PBM

La PBM, como se comentó en el Apartado de Antecedentes Bibliográficos, se ha venido purificando tradicionalmente por disoluciones orgánicas y acídicas (Oshiro y Eylar, 1970). Más recientemente se han desarrollado métodos menos agresivos para su purificación, bien utilizando detergentes (Riccio et al., 1985) o por extracción con sales de cloruro cálcico (Gow y Smith, 1989). En esta Memoria se ha pretendido desarrollar una serie de vías alternativas de purificación de la PBM relativamente suaves, mediante el uso de detergentes. Para ello se ha tenido muy en cuenta la gran ventaja que puede suponer el uso de los detergentes Chaps y colato sódico ya que en el trabajo de esta Memoria se ha descubierto que solubilizan selectivamente a la PBM (ver Apartado IV. 3.1). Por lo tanto, esta proteína se

encuentra enriquecida en los solubilizados de mielina realizados con estos dos detergentes con respecto a las restantes proteínas mayoritarias, lo cual simplifica el proceso de purificación, con el consiguiente ahorro de tiempo y el aumento en la pureza de la proteína finalmente obtenida. De esta forma, se han empleado por primera vez dos detergentes (colato sódico y Chaps), no utilizados anteriormente en la purificación de la PBM, que presentan ventajas sobre los anteriormente utilizados en la purificación de la PBM, a excepción del caso citado anteriormente para el bromuro de cetil-trimetilamonio (Riccio et al., 1986).

Por otra parte, esta proteína también se obtiene con octilglucósido, aunque con menor pureza y rendimiento, como se indica en el Apartado anterior.

IV. 3.3.1. Purificación de la PBM con colato sódico

Para la solubilización de la mielina mediante el colato sódico se ha seguido el protocolo descrito en el Apartado de Resultados 3.1 (ver Figura IV. 3.1). El colato sódico, en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), se ha mezclado con la mielina en el mismo tampón para dar una relación detergente/proteína (p/p) de 14. Con esta relación, se obtiene alrededor de un 25% de la proteína total de la mielina, siendo la mayoría de la proteína solubilizada PBM (ver Figura IV. 3.3). De esta forma, el proceso de solubilización es una etapa más de purificación.

Posteriormente, el solubilizado de mielina se ha pasado por una columna de 4 cm x 1 cm de diámetro de *Blue Sepharose CL-6B* equilibrada en tampón 20 mM de fosfato sódico, 1% (p/v) de colato sódico (pH 7,0). La columna se ha eluído con un flujo de 20 ml/hora y se han recogido fracciones de 2,5 ml. Para eluir las proteínas no unidas a la resina se ha pasado el mismo tampón de elución. Posteriormente, se ha ido aumentando la fuerza iónica del tampón de elución para extraer las proteínas unidas a la resina. Este aumento de fuerza

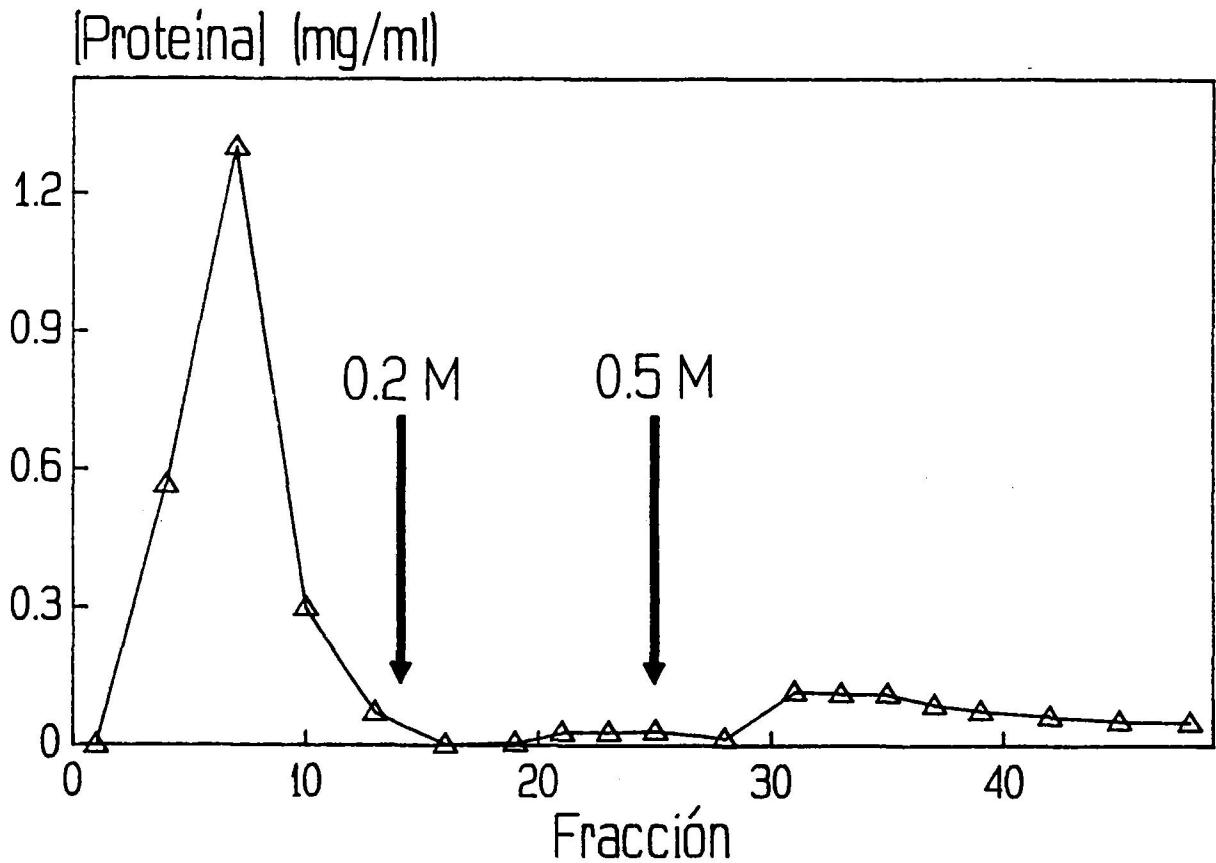


FIGURA IV. 3.10: Purificación de la PBM con colato sódico. Perfil de la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B* del solubilizado de mielina con colato sódico; las flechas indican el aumento de fuerza iónica en el tampón de elución con 0,2 M y 0,5 M de cloruro sódico. El flujo de la elución es de 20 ml/hora y se recogen fracciones de 2,5 ml. La línea continua representa la concentración de proteína presente (Wang y Smith, 1975).

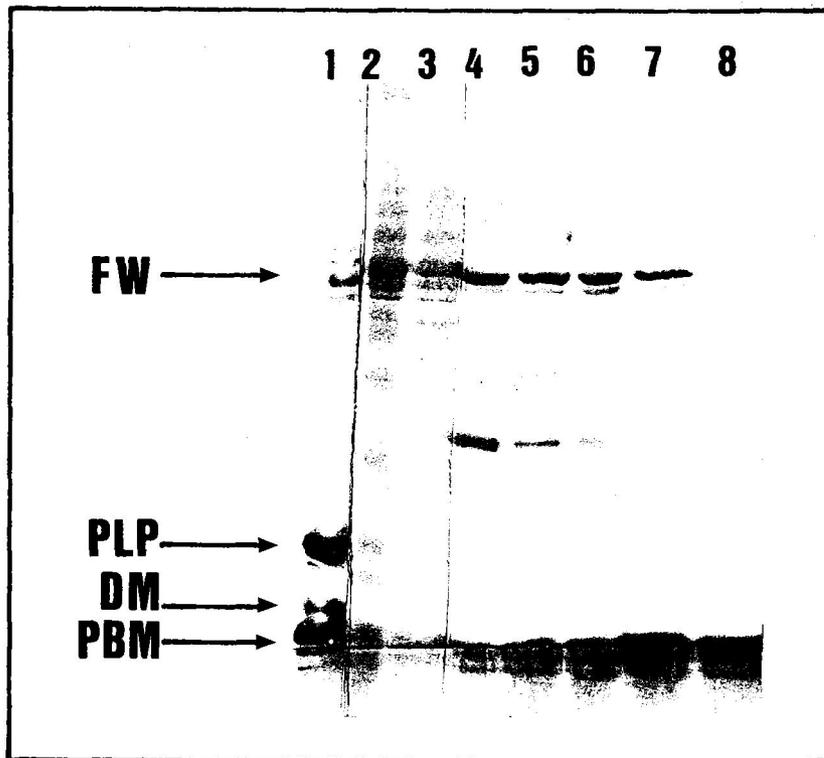


FIGURA IV. 3.11: Electroforesis en gel de SDS-PA al 12% de la purificación de la PBM con colato sódico. En la electroforesis se representan fracciones sucesivas de la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B* del solubilizado de mielina con colato sódico. Las distintas calles de la electroforesis corresponden a: 1, mielina, 2-3, fracciones del primer pico (0 M de NaCl), 4-8, fracciones del tercer pico de la elución (0,5 M de NaCl). FW, Fracción Wolfgram; PLP, proteolípido de mielina; DM, DM-20; PBM, proteína básica de mielina.

iónica se ha realizado en dos pasos discretos, uno con 200 mM de NaCl y el otro con 500 mM de NaCl (Figura IV. 3.10). Se observa que la mayor parte de la proteína no se une a la resina y se eluye en el primer pico. Mediante electroforesis (Figura IV. 3.11), se comprueba que en este pico se eluye una pequeña parte de PBM y cantidades mayores de Fracción Wolfgram, también aparecen bandas correspondientes a agregados de las proteínas solubilizadas. El segundo pico de la elución (200 mM NaCl) no tiene prácticamente proteína y no se ha logrado ver su contenido proteico por electroforesis debido a su muy baja concentración. Al eluir con 500 mM NaCl se liberan todas las proteínas que aún permanecen unidas a la resina. En este caso se observa (Figura IV. 3.11) que se libera la PBM aunque también coeluye una considerable proporción de Fracción Wolfgram, la cual disminuye en las últimas fracciones hasta hacerse prácticamente nula. En estas fracciones del tercer pico se observa una banda electroforética que pertenece a un agregado, cuyo peso molecular aparente (32.000 daltons) se acerca bastante a un dímero de PBM; esta banda también se hace prácticamente nula en las últimas fracciones de la elución. Mediante densitometría se ha determinado que la PBM purificada con colato sódico se obtiene con un grado de pureza no inferior al 80%, llegando a ser cercano al 90% en las últimas fracciones de la elución.

IV. 3.3.2. Purificación de PBM con Chaps

La solubilización de la mielina por parte del Chaps se ha realizado de manera análoga a los casos anteriores. Se ha utilizado una relación detergente/proteína (p/p) de 14, con la cual se obtiene una solubilización de un 20% del total de proteína (ver Figura IV. 3.2), que mayoritariamente es PBM. De esta forma, como en el caso del colato sódico, este paso de solubilización puede permitir una purificación parcial de la PBM, con lo que se facilita y simplifica su posterior proceso de purificación.

Este solubilizado de mielina con Chaps se ha sometido a dos caminos diferentes de purificación: bien a una cromatografía de intercambio iónico, o bien a una cromatografía de afinidad. El procedimiento mediante cromatografía de intercambio iónico, con resina de hidroxiapatito, se ha realizado en la Universidad Complutense de Madrid por el Dr. J. Ruiz Cabello (Ruiz-Cabello, 1990; Ruiz-Cabello et al., enviado). El procedimiento mediante cromatografía de afinidad, con resina *Blue Sepharose CL-6B*, se ha desarrollado como parte del trabajo incluido en esta Memoria. Ambos métodos han dado como resultado la purificación de la PBM en un grado de pureza equivalente y muy elevado.

En la purificación mediante cromatografía de afinidad realizado aquí se ha utilizado una columna de 4 cm x 1 cm de diámetro de *Blue Sepharose CL-6B* equilibrada en tampón 20 mM de fosfato sódico, 1% (p/v) de Chaps (pH 7,0). El flujo utilizado en la elución ha sido de 20 ml/hora y se han recogido fracciones de 2,5 ml. Para eliminar las proteínas no unidas a la resina se ha utilizado el mismo tampón de equilibrado. Las proteínas unidas a la resina se han eluido aumentando la fuerza iónica del tampón en pasos discretos de 100, 200 y 500 mM de NaCl (Figura IV. 3.12). Las proteínas presentes en el primer pico aparecen en la electroforesis (Figura IV. 3.13) como diversos agregados. Cuando se eleva la fuerza iónica con 100 mM de NaCl se eluyen pequeñas cantidades de proteínas componentes de la mielina, especialmente las proteínas de elevado peso molecular incluida la Fracción Wolfgram. Al aumentar la concentración de NaCl a 200 mM se eluye fundamentalmente la Fracción Wolfgram junto con cantidades pequeñas de PLP y DM-20. A fuerza iónica de 500 mM de NaCl se eluye toda la proteína restante que permanecía unida a la resina, obteniéndose la PBM con un elevado grado de pureza, aunque se observan pequeñas contaminaciones de PLP que disminuyen al avanzar la elución. Mediante densitometría, se ha determinado que la PBM se obtiene purificada mediante Chaps con una pureza de al menos el 90%.

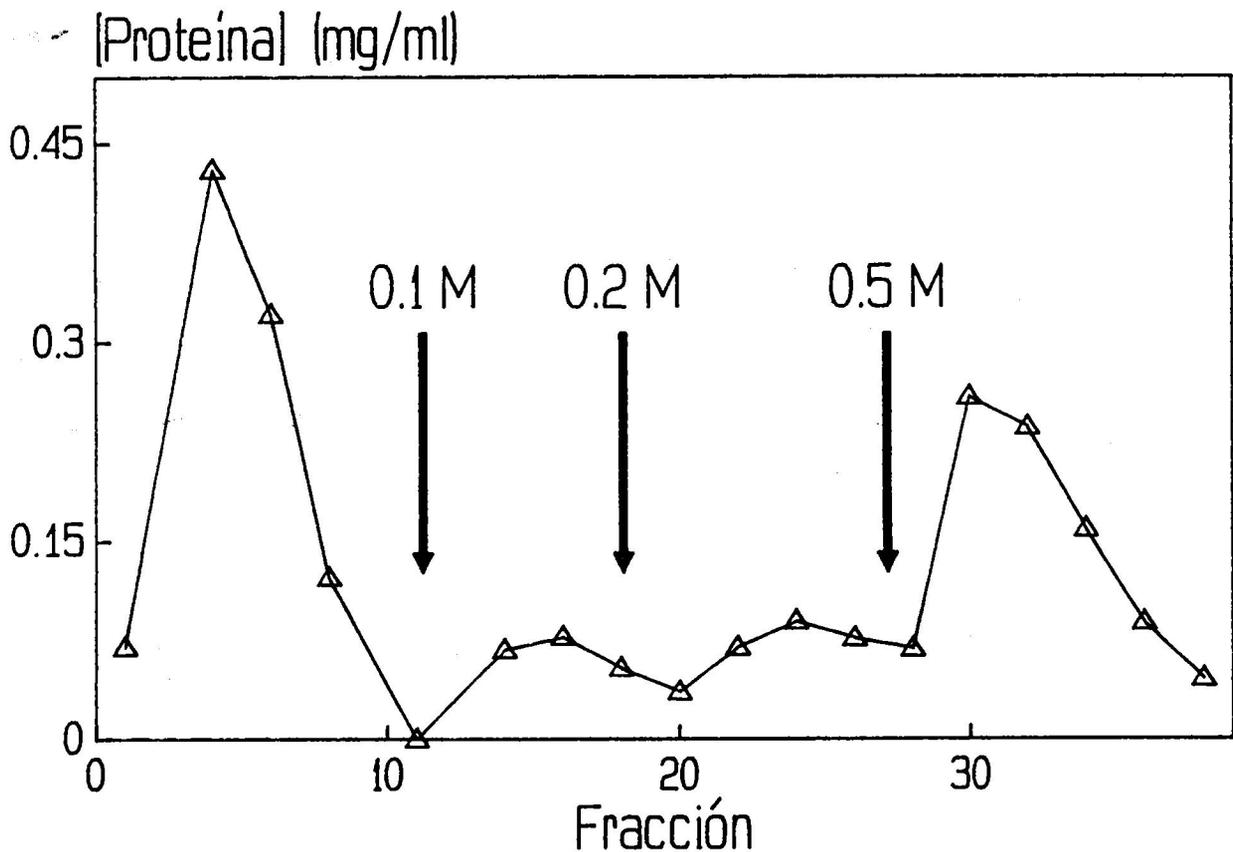


FIGURA IV. 3.12: Purificación de la PBM con Chaps. Perfil de la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B* del solubilizado de mielina con Chaps; las flechas indican el aumento de fuerza iónica en el tampón de elución con 0,1 M, 0,2 M y 0,5 M de cloruro sódico. El flujo de la elución es de 20 ml/hora y se recogen fracciones de 2,5 ml. La línea continúa representa la concentración de proteína presente (Wang y Smith, 1975).

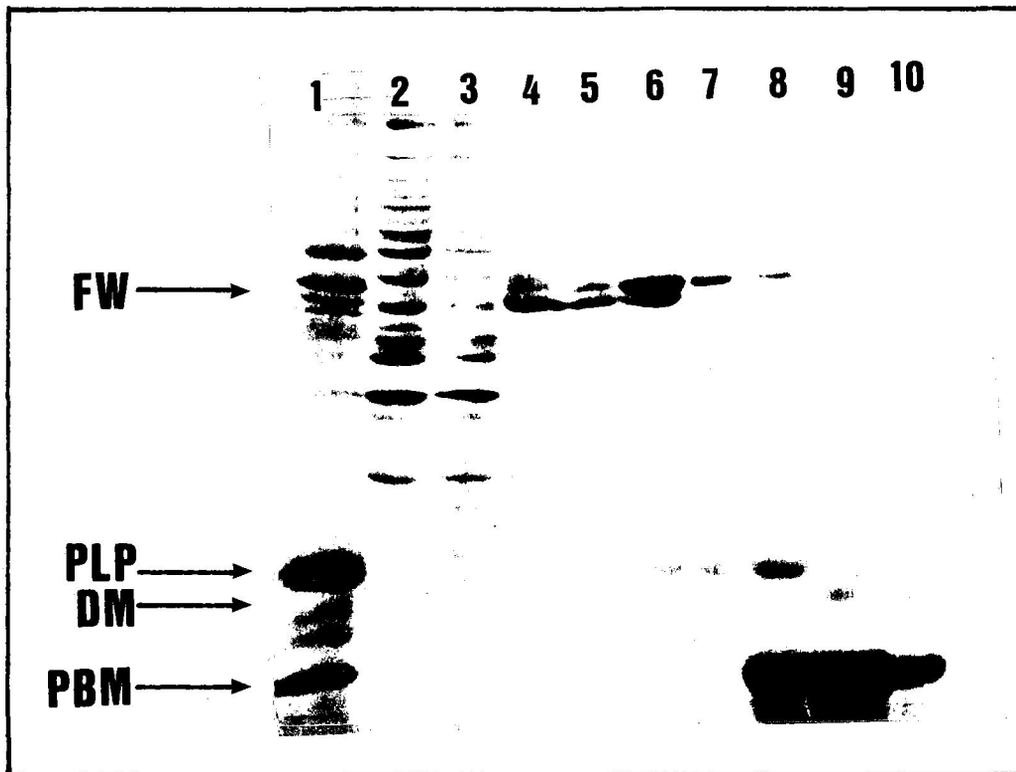


FIGURA IV. 3.13: Electroforesis en gel de SDS-PA al 12% de la purificación de la PBM con Chaps. En la electroforesis se representan fracciones sucesivas de la elución por columna de *Blue Sepharose CL-6B* del solubilizado de mielina con Chaps. Las distintas calles de la electroforesis corresponden a: 1, mielina, 2-3, fracciones del primer pico (0 M de NaCl), 4-5, fracciones del segundo pico (0,1 M de NaCl), 6-7, fracciones del tercer pico (0,2 M de NaCl), 8-10, fracciones del cuarto pico de la elución (0,5 M de NaCl). FW, Fracción Wolfgram; PLP, proteolípido de mielina; DM, DM-20; PBM, proteína básica de mielina.

IV. 4. RECONSTITUCION DEL PROTEOLIPIDO DE MIELINA

IV. 4.1. Introducción

Una vez obtenido el PLP purificado mediante la utilización de detergentes, el siguiente paso para intentar estudiar algunas de sus características químico físicas ha sido el procurar incluir la proteína en un medio lo más parecido posible al que poseía inicialmente en la membrana, aunque en ausencia de las otras proteínas presentes en la misma. Para esto hay que eliminar el detergente y sustituirlo por lípidos naturales, para simular mejor el medio inicial, o por lípidos sintéticos, si se quiere controlar mejor el sistema, o bien si se quiere estudiar el efecto de la proteína sobre las transiciones u otras características de estos lípidos. A este proceso de eliminación del detergente y sustitución por lípidos, se le conoce con el nombre de **reconstitución**. Se han desarrollado una gran variedad de métodos, ya que cada proteína de membrana y detergentes empleados en su purificación tienen unas características especiales, por lo que no existe un método general de reconstitución. Hay muchas revisiones recientes en la bibliografía que intentan dar una visión general de los diversos métodos de reconstitución (Darszon, 1983; Banerjee y Datta, 1983; Hirata, 1986; Madden, 1986; Jones et al., 1987).

En el Apartado de Resultados IV. 3 se comenta el intento de purificación del PLP utilizando tres detergentes distintos. Se observa que con el Triton X-100 y con el octilglucósido se obtiene una purificación aceptable del PLP, mientras que con el desoxicolato sódico la contaminación con PBM es apreciable. De esta forma, en este

Apartado solo se ha intentado reconstituir el PLP obtenido tanto con Triton X-100 como con octilglucósido. Para esta reconstitución se han utilizado los lípidos naturales de la mielina, obtenidos por el método de extracción de Santiago y colaboradores (Santiago et al., 1964). Se han escogido estos lípidos por dos razones fundamentales: (a) intentar simular el medio natural lo mejor posible ya que la composición lipídica de la membrana miélnica es muy característica (ver Apartado II. 1.4.1), y (b) estos lípidos no presentan transición calorimétrica en los experimentos de CDB (ver Apartado IV. 1), por lo que no quedaría enmascarada una posible transición térmica debida a la proteína. Seguidamente se van a describir los diferentes métodos de reconstitución del PLP utilizados en esta Memoria y los resultados obtenidos.

IV. 4.2. Reconstitución del PLP purificado con Triton X-100

El Triton X-100 es un detergente con una concentración micelar crítica muy baja, por lo que es difícilmente dializable y, en muchos casos, su eliminación es problemática. En esta Memoria se han utilizado fundamentalmente dos métodos para intentar su eliminación:

A - Por centrifugación en gradiente de sacarosa.

B - Por utilización de columnas adsorbentes de detergentes.

A.- Centrifugación en gradiente de sacarosa

Este método se basa en el utilizado por Valpuesta en la reconstitución del Complejo III de mitocondria en presencia de Triton X-100 (Valpuesta, 1985). El procedimiento seguido en esta Memoria se esquematiza en la Figura IV. 4.1.

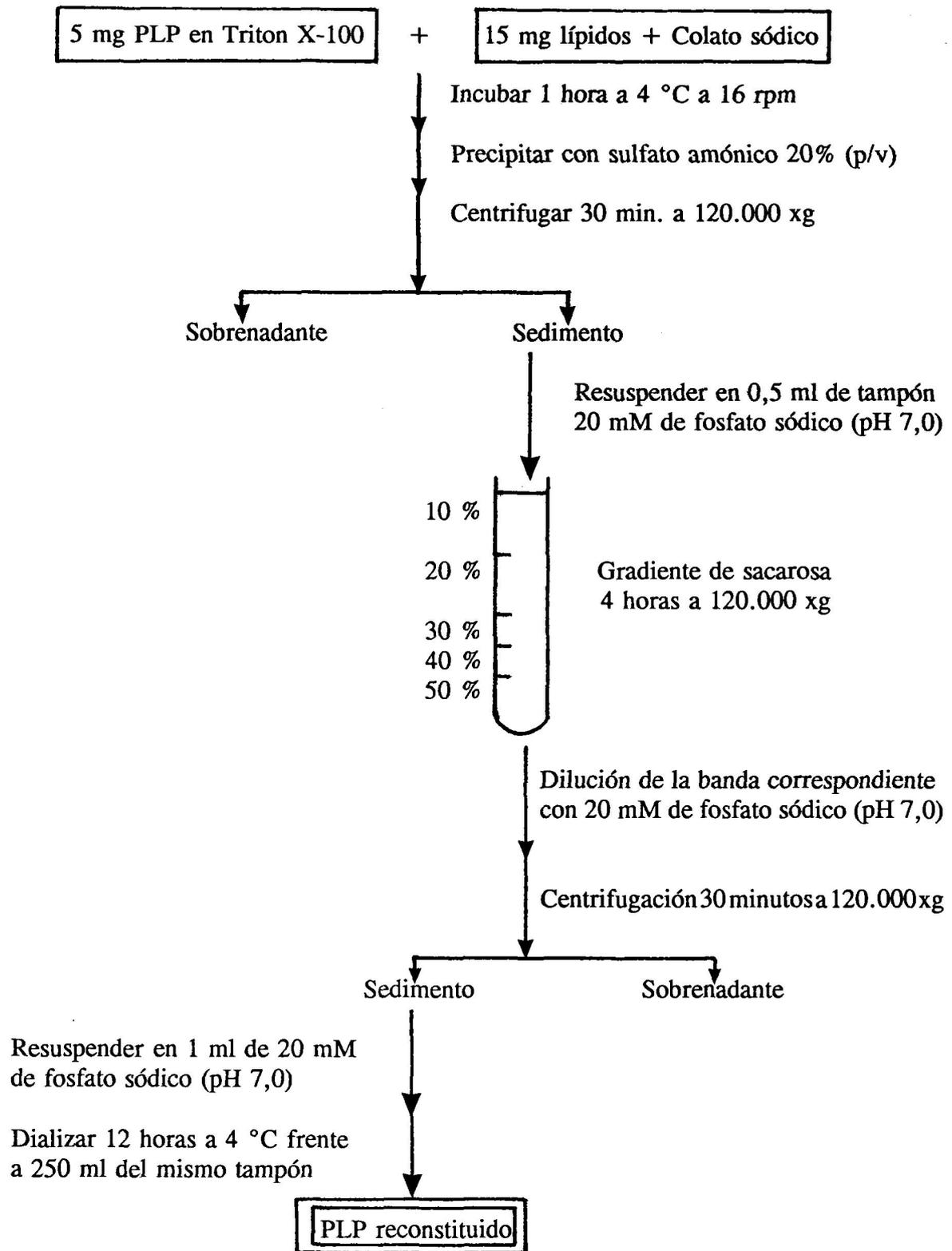


FIGURA IV. 4.1: Esquema de la reconstitución por centrifugación en gradiente de sacarosa del PLP purificado con Triton X-100.

Primero se forman liposomas multilamelares de lípidos extraídos de mielina al resuspender una capa fina de 15 mg de estos lípidos (previamente secados con nitrógeno y tenidos durante una noche en desecador) en 1 ml de tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). Estos liposomas se mezclan con 5 mg del PLP purificado con Triton X-100 (este PLP ha sido previamente concentrado mediante ultrafiltración) y con 300 μ l de una disolución de 100 mg/ml de colato sódico; el colato sódico se añade para facilitar la inclusión de la proteína en los liposomas, como explica Valpuesta en su protocolo de reconstitución. Esta mezcla se incuba a 4 °C durante 1 hora agitándose en un disco horizontal giratorio de 17 cm de diámetro a 16 rpm. Posteriormente se añade sulfato amónico en concentración saturante, 20% (p/v), y se centrifuga 30 minutos a 120.000 xg para que precipite el complejo lipoproteico. El sedimento se resuspende en 0,5 ml de tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se deposita en un gradiente discontinuo de sacarosa, como se indica en la Figura IV. 4.1, centrifugándose 4 horas a 120.000 xg. Después de la centrifugación aparece una banda en la interfase entre el 40% y 50% (p/v) de sacarosa; ésta se recoge y se elimina sacarosa que contiene, diluyéndola con suficiente tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y centrifugando 30 minutos a 120.000 xg. El sedimento obtenido se resuspende en 1 ml del mismo tampón y se dializa durante 12 horas a 4 °C frente a 250 ml del tampón anterior.

Variando la cantidad de colato sódico en la mezcla inicial se obtienen bandas a diferente altura del gradiente de sacarosa, indicando una relación lípido/proteína diferente en los proteoliposomas formados. Así, si se añaden 10 mg de colato sódico la banda aparece en la interfase entre el 10% y 20% (p/v) de sacarosa, mientras que si se añaden 20 mg de colato sódico dicha banda aparece en la interfase entre el 20% y 30% (p/v) de sacarosa. El rendimiento que se ha obtenido con este tipo de reconstitución es muy bajo, inferior al 25%.

B.- Utilización de resinas adsorbentes de detergentes

Un método utilizado con mucha frecuencia, en los últimos años, para la eliminación de detergentes de difícil diálisis (con CMC bajas) consiste en el uso de resinas adsorbentes de detergentes, tales como *Amberlite XAD-2* (Cheetham, 1979; Krämer y Heberger, 1986), *Bio-Beads SM-2* (Holloway, 1973; Horigome y Sugano, 1983) y *Extracti-Gel D* (Necessary et al., 1984; Berman et al., 1985). En esta Memoria se han utilizado resinas de *Bio-Beads SM-2* y de *Extracti-Gel D*.

Para este tipo de reconstitución se mezclan 5 mg de PLP, purificado con Triton X-100 y previamente concentrado por ultrafiltración, con 15 mg de lípidos de mielina en forma de liposomas multilamelares. Esta mezcla se incuba durante 1 hora a 4 °C agitándose a 16 rpm en un disco giratorio, descrito anteriormente. Una vez incubada la mezcla se pasa por una de las dos resinas previamente citadas.

Con la resina de *Bio-Beads SM-2*, la mezcla se pasa por tres columnas iguales consecutivas (4 cm x 0,6 cm de diámetro) que contienen 2 g de esta resina, previamente equilibrada en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). La mezcla se pasa cinco veces seguidas por cada columna, haciendo una ligera presión para la elución de la muestra. Posteriormente ésta se dializa durante 12 horas a 4 °C frente a 250 ml de tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0).

Con la resina de *Extracti-Gel D* la mezcla se pasa por una columna, ya preformada y distribuída por la casa comercial Pierce, eluyendo por gravedad con tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). Posteriormente el eluído se concentra con microconcentradores *Centricon* y se dializa durante 12 horas a 4 °C frente a 250 ml del tampón anterior.

Se ha observado que en ambas resinas se queda retenida una proporción muy elevada de PLP junto con el Triton X-100.

Con el PLP reconstituido de cada una de estas formas se han realizado experimentos de CDB no obteniéndose resultados satisfactorios. La Figura IV. 4.2 muestra un ejemplo de los resultados de CDB obtenidos de la reconstitución del PLP purificado por Triton X-100, en concreto utilizando *Bio-Beads SM-2* para su reconstitución. En todos ellos se observa una transición calorimétrica irreversible centrada sobre los 50 °C- 55 °C. Es muy posible que, aunque irreversible, esta transición se deba a lípido ya que se obtiene un perfil similar cuando se realizan barridos de los lípidos extraídos de estas muestras, siendo en este caso transiciones reversibles, como se muestra en la Figura IV. 4.3 para el caso del PLP reconstituido mediante utilización de *Bio-Beads SM-2*. Esto parece indicar que el componente proteico (PLP) de los proteoliposomas formados en la reconstitución altera a los lípidos de forma que la transición de éstos es irreversible en su presencia; además se observa que la transición de estos lípidos extraídos presenta una Td algo superior (sobre los 56 °C) que en presencia del PLP. Podría ocurrir que en el proceso de eliminación del Triton X-100 y reconstitución del PLP se modifique la composición de los lípidos de la mielina utilizados ya que, como se indicó en el Apartado IV. 1, estos lípidos no presentan transición calorimétrica (ver Figura IV. 1.9).

Por otra parte, no se observa transición adicional alguna a alta temperatura que pueda adscribirse a proteína, indicando que el PLP puede encontrarse ya desnaturalizado. Una de las razones plausibles de esta desnaturalización pudiera ser la alta concentración que alcanza el Triton X-100 al concentrar las fracciones correspondientes al PLP obtenidas en las eluciones cromatográficas, justo antes de comenzar el proceso de reconstitución. Al concentrar el PLP también se concentra el Triton X-100 presente en la disolución, alcanzando concentraciones elevadas, de al menos el 3% (p/v), que pueden afectar a la proteína. Esto se ha observado con mayor claridad en la reconstitución del PLP purificado con octilglucósido como se expondrá a continuación.

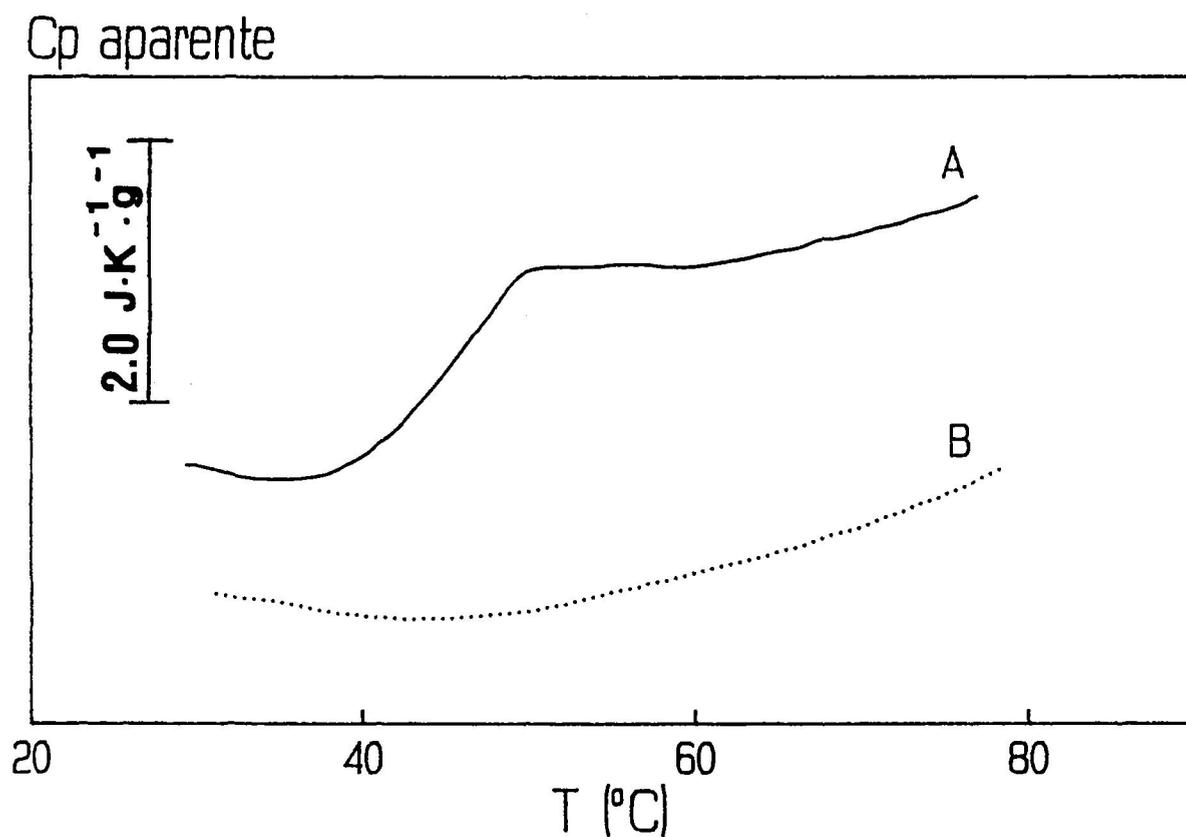


FIGURA IV. 4.2: Registro original de CDB del PLP purificado con Triton X-100 y reconstituido en lípidos de mielina mediante utilización de *Bio-Beads SM-2* en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). (A) calentamiento de la muestra a 1 K/min.; (B) recalentamiento de la muestra a la misma velocidad de barrido. La concentración de PLP en la muestra es de 0,7 mg/ml.

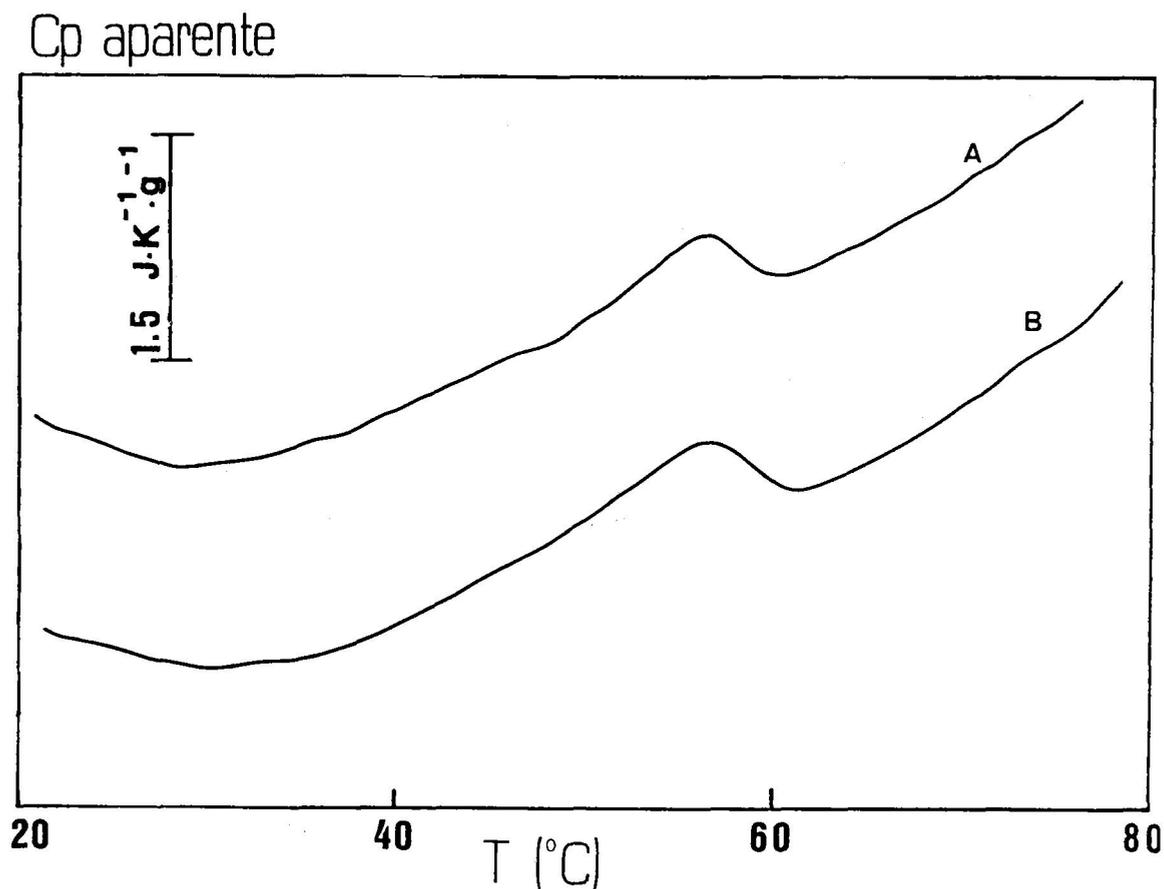


FIGURA IV. 4.3: Registro original de CDB de los lípidos extraídos del PLP purificado con Triton X-100 y reconstituido en lípidos de mielina mediante utilización de *Bio-Beads SM-2* en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). (A) calentamiento de la muestra a 1 K/min.; (B) recalentamiento de la muestra a la misma velocidad de barrido. Las unidades de capacidad calorífica aparente vienen referidas a gramos de proteína existentes en la alícuota de donde se han extraído los lípidos para poder comparar la traza con la de la Figura IV. 4.2.

Otra razón posible que justifique la ausencia de transición específica debida al PLP, puede ser la presencia de trazas de Triton X-100 en el PLP reconstituido ya que en los experimentos de CDB se observan efectos exotérmicos y derivas de la línea base calorimétrica, especialmente en la reconstitución por gradiente de sacarosa. Una pequeña cantidad de detergente presente podría alterar el perfil calorimétrico y, posiblemente, afectaría a la estructura del PLP, pudiendo así eliminar u ocultar la transición debida a la proteína.

Por otra parte hay que tener en cuenta la baja concentración de PLP utilizada en los experimentos de CDB (alrededor de 0,7 mg/ml), debido al bajo rendimiento obtenido en la reconstitución. Esta baja concentración de proteína, junto con la baja entalpía de desnaturalización que presentan las proteínas de membrana (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987), implicaría en su caso una transición calorimétrica quizás demasiado pequeña para su detección.

IV. 4.3. Reconstitución del PLP purificado con octilglucósido

El octilglucósido es un detergente no iónico con una CMC muy alta, alrededor de 20 mM (Hjelmeland y Chrambach, 1984), por lo que es relativamente fácil eliminarlo mediante diálisis. Así, algunas proteínas de membrana purificadas con octilglucósido han podido reconstituirse mediante el método de diálisis (Hirata, 1986; Jones et al., 1987), por lo que este detergente se viene utilizando cada vez con mayor frecuencia que el Triton X-100 en la purificación de proteínas de membrana (Baron y Thompson, 1975; Mimms et al., 1981; Jackson y Litman, 1985).

En esta Memoria se ha intentado reconstituir el PLP purificado con octilglucósido mediante diálisis del detergente. A medida que se realizaban los experimentos de reconstitución, se ha ido modificando convenientemente el método utilizado con el fin de solucionar problemas que se observaban en cuanto a la estabilidad del PLP. Por ejemplo, se ha observado que hay que evitar cualquier paso en el que se concentre el detergente presente con la proteína, ya que parece que ésta se desnaturaliza entonces parcialmente. En un principio se realizaron experimentos de reconstitución del PLP purificado con octilglucósido en los que se concentraban las fracciones adecuadas obtenidas de la elución de CM-Sephadex C-50, previamente a la adición de los lípidos, no obteniéndose entonces transición específica de proteína mediante CDB. Este hecho, junto con los resultados obtenidos en la reconstitución del PLP purificado con Triton X-100, hicieron sospechar que al aumentar la concentración del detergente presente con la proteína se podría alterar su estructura, de tal forma que no aparezca transición por CDB. Debido a esta razón, se han abordado modificaciones del método de reconstitución que eviten la alta concentración del detergente en presencia del PLP. Así, tras varias pruebas se ha escogido un procedimiento de reconstitución basado en la eliminación del octilglucósido por diálisis, previa dilución de la mezcla proteína-detergente-lípido por debajo de la CMC del detergente, lo que a su vez facilita la eliminación de éste.

Como paso previo al estudio posterior del PLP reconstituido, se ha "reconstituido" también el solubilizado obtenido de la mielina con octilglucósido para observar si la transición calorimétrica de la mielina queda alterada por la simple solubilización con este detergente. En este caso, al referirse a "reconstitución" se entiende la obtención del solubilizado de mielina con octilglucósido, separando el material no solubilizado, y la posterior adición de lípidos de mielina en forma de liposomas a este solubilizado para,

posteriormente, eliminar el detergente por diálisis e intentar así aproximarse al medio inicial de la mielina. Hay que tener en cuenta que, en este caso, no hay una purificación de una proteína específica, sino que se utilizan todas las proteínas mayoritarias de la mielina; la electroforesis del solubilizado reconstituido muestra las mismas bandas que las correspondientes a la membrana mielínica (ver Apartados IV. 2 y IV. 3). Por lo tanto, hasta cierto punto no se puede entender como una reconstitución verdadera ya que no existe una única proteína pura en los proteoliposomas formados. Este tipo de experimentos se asemejan a los realizados previamente acerca del efecto del octilglucósido sobre la membrana mielínica (ver Apartado IV. 2), en los que se mezclaba el detergente con la mielina y, después de incubar un determinado tiempo, se procedía a la eliminación del detergente por diálisis, aunque en este caso no se producía la separación del material no solubilizado ni su posterior reconstitución.

A continuación se van a presentar los resultados obtenidos en la reconstitución tanto del solubilizado de mielina como del PLP.

1- Reconstitución del solubilizado de mielina con octilglucósido mediante dilución y posterior diálisis:

Se mezclan 7 mg de proteína del solubilizado de mielina con 7 mg de lípidos de mielina en forma de liposomas multilamelares y se incuba la mezcla durante 1 hora a 4 °C agitando a 16 rpm. Posteriormente, se diluye la mezcla con tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) hasta que el octilglucósido presente en la mezcla se encuentre a una concentración inferior a su CMC. Tras la dilución, se dializa durante 48 horas con cuatro cambios de tampón a 4 °C frente a un volumen de 5 litros en cada cambio de 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). Para concentrar la muestra se procede a centrifugar la mezcla a 120.000 xg durante

1 hora. El sedimento así obtenido se resuspende en 1 ml de tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se dializa durante 12 horas a 4 °C frente a un volumen total de 5 litros del tampón anterior. De esta forma se obtiene el solubilizado de mielina "reconstituido", con el que se realizan experimentos posteriores. Las concentraciones de proteína total utilizadas para estos experimentos han sido de unos 4 mg/ml.

Se han realizado barridos de CDB del solubilizado de mielina una vez "reconstituido" mediante este procedimiento (Figura IV. 4.4). Se obtienen dos transiciones calorimétricas, una centrada alrededor de los 51 °C y la otra a los 70 °C, ambas irreversibles. Una transición análoga a la de baja temperatura se ha observado también para los lípidos extraídos del solubilizado "reconstituido", que en este caso resulta ser reversible como en el caso visto anteriormente para la reconstitución del PLP purificado con Triton X-100. Una posibilidad para explicar la irreversibilidad de la transición a 51 °C sería que aquella se debiera a la transición irreversible a 70 °C, atribuible a proteína, como veremos a continuación en los experimentos de FT-IR. Para comprobarlo se repitió el calentamiento en CDB con nueva muestra del solubilizado "reconstituido", deteniendo el barrido a 60 °C, enfriando y volviendo a calentar esta muestra. Se obtuvo que de nuevo la transición a 51 °C era irreversible al no aparecer en este segundo calentamiento, con lo que se concluye que su irreversibilidad no depende de que se produzca o no en el sistema la desnaturalización proteica, es decir, la transición a 70 °C.

La transición atribuible a proteína presenta una Td de 70 °C, tanto antes de la diálisis final como después de ésta, y su entalpía de desnaturalización es de $1,9 \pm 0,7$ J/g.

También se han realizado experimentos de FT-IR en tampón acuoso del solubilizado "reconstituido" de la forma que se indica en el Apartado de Métodos (III. 2.6.3). En la Figura IV. 4.5 se observa que el solubilizado "reconstituido" en la zona de la amida I ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) presenta dos bandas, a $1656,5$ y a $1630,5 \text{ cm}^{-1}$, características de hélice α y

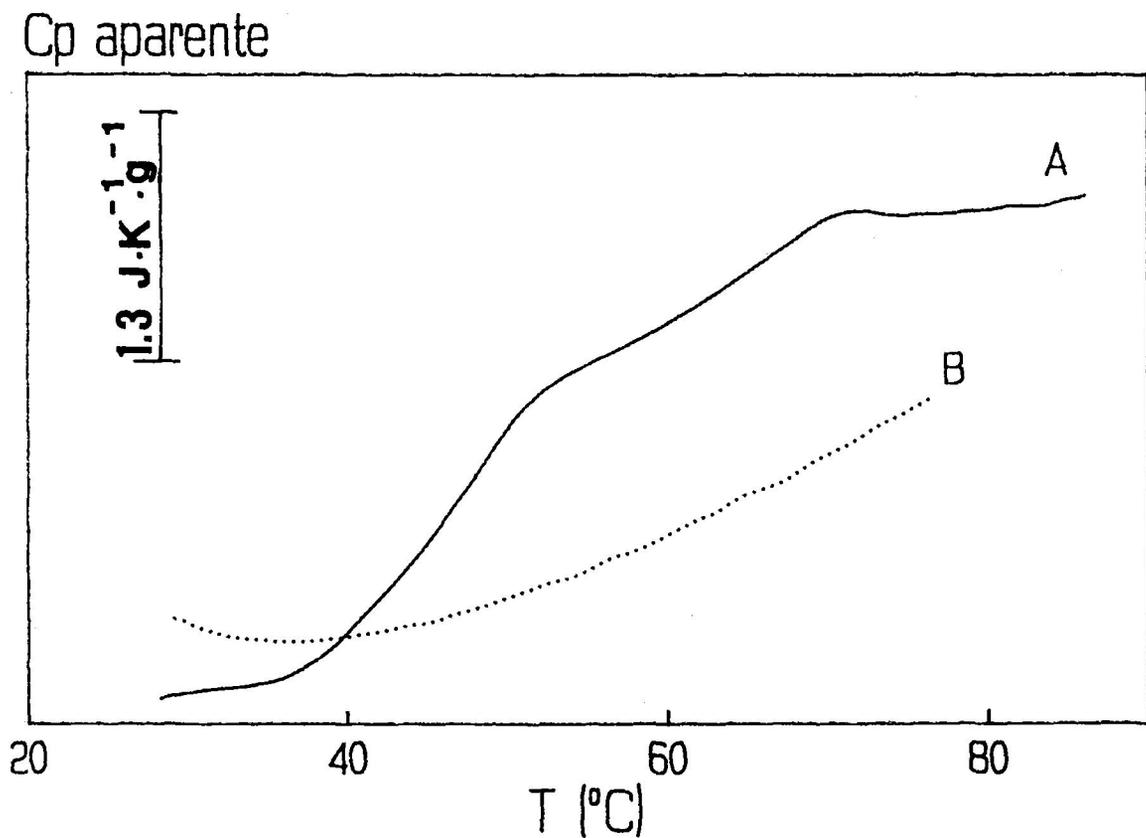


FIGURA IV. 4.4: Registro original de CDB del solubilizado de mielina con octilglucósido tras su "reconstitución" final en lípidos de mielina por el procedimiento de dilución y diálisis (ver texto) en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). (A) calentamiento de la muestra a 1 K/min.; (B) recalentamiento de la muestra a la misma velocidad de barrido. La concentración de proteína en la muestra es de 4,0 mg/ml.

estructura β , respectivamente. También se observa una pequeña componente a $1687,5 \text{ cm}^{-1}$ que se atribuye a giros de la cadena polipeptídica (Dong et al., 1990). El espectro es muy similar al obtenido con la membrana mielínica (ver Figura IV. 2.22). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Surewicz y colaboradores (Surewicz et al., 1987a) con el apoproteolípido de mielina del sistema nervioso central humano. Estos autores reconstituyen este apoproteolípido en DMPC y en DMPG y realizan FT-IR en agua deuterada de estas muestras; obtienen que la estructura mayoritaria es hélice α con un fuerte componente de estructura β .

Al calentar la muestra hasta $60 \text{ }^\circ\text{C}$ no se aprecian diferencias significativas con el espectro obtenido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura IV. 4.6). Si la muestra se sigue calentando hasta $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y se enfría hasta $20 \text{ }^\circ\text{C}$, el espectro de FT-IR muestra que la banda correspondiente a la estructura β (1630 cm^{-1}) ha aumentado considerablemente (Figura IV. 4.6). En la bibliografía se ha descrito para la desnaturalización térmica de determinadas proteínas un aumento de intensidad similar (a 1620 cm^{-1} en agua deuterada) al obtenido aquí (Arrondo et al., 1988; Muga et al., 1988; Prado et al., 1990; Rial et al., 1990). Esto nos indica que el solubilizado de mielina "reconstituido" no se desnaturaliza hasta los $60 \text{ }^\circ\text{C}$, pero en el intervalo de 60 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ se produce la desnaturalización de alguna o de todas las proteínas presentes. Surewicz y colaboradores también obtienen un aumento gradual de la estructura β y una disminución simultánea de la hélice α al calentar la muestra a partir de los $30 \text{ }^\circ\text{C}$ para el apoproteolípido de mielina (Surewicz et al., 1987a).

La zona del infrarrojo entre 2800 y 3000 cm^{-1} muestra las vibraciones asimétrica (alrededor de 2850 cm^{-1}) y simétrica (alrededor 2920 cm^{-1}) de la tensión de los enlaces C-H, por lo que esta zona permite obtener información del orden estático de las cadenas hidrofóbicas de los lípidos presentes en la muestra (Cameron y Mantsch, 1978; Cortijo y

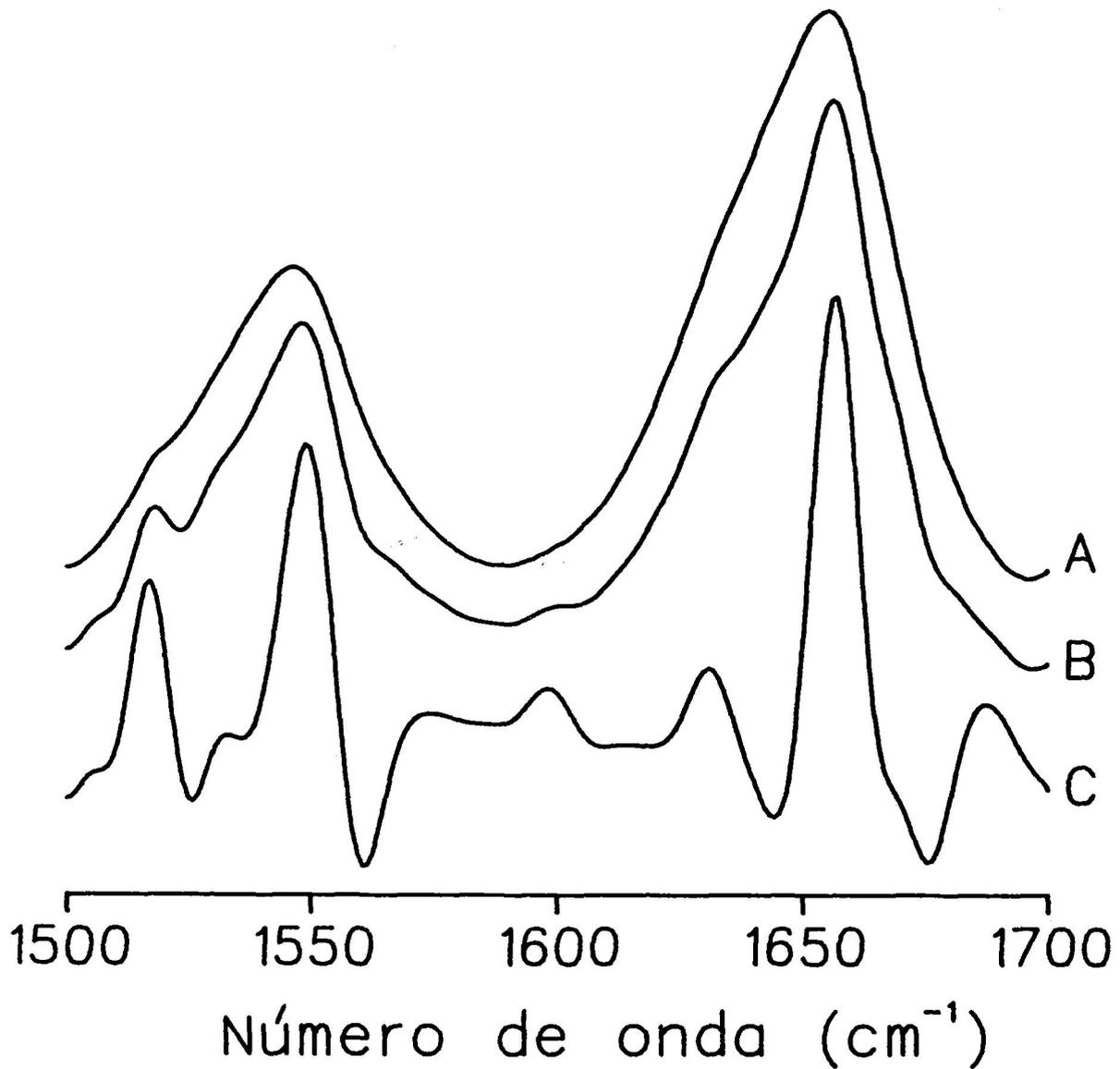


FIGURA IV. 4.5: Espectro de FT-IR entre 1500 y 1700 cm⁻¹ del solubilizado de mielina con octilglucósido y "reconstituido" en lípidos de mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 30 °C. (A) después de restar el espectro del tampón acuoso; (B) autodeconvolución de Fourier del espectro resta; (C) cuarta derivada del espectro resta.

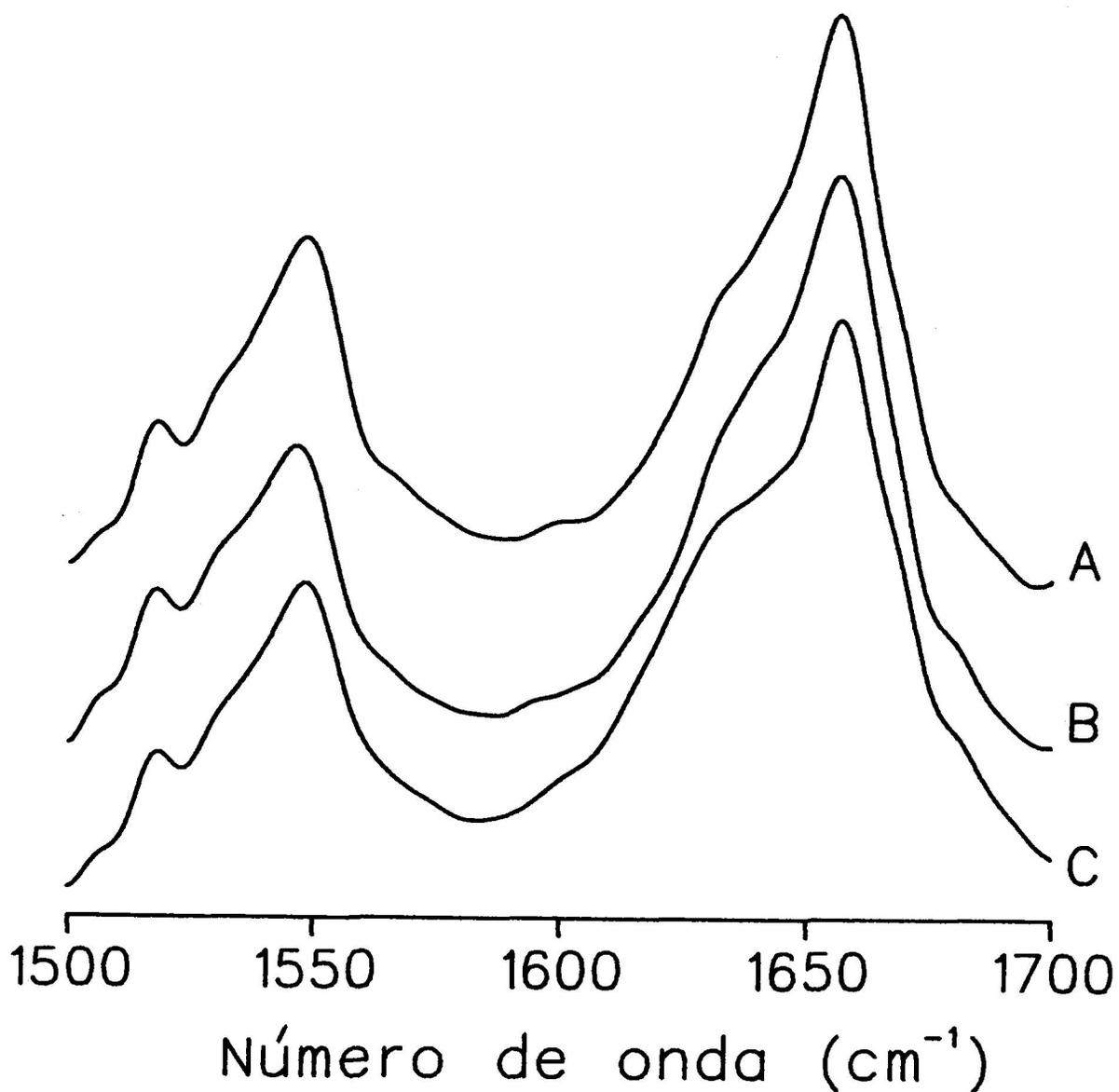


FIGURA IV. 4.6: Autodeconvolución de Fourier de los espectros de FT-IR del solubilizado de mielina con octilglucósido y "reconstituido" en lípidos de mielina en tampón fosfato a (A) 30 °C, (B) 60 °C y (C) 20 °C después de haber calentado hasta 80 °C.

Chapman, 1981; Brauner y Mendelson, 1986). Se observa un ligero desplazamiento de los máximos de los dos picos a números de onda superiores a medida que se aumenta la temperatura (Figura IV. 4.7); al volver a enfriar las muestras estos máximos recuperan su número de onda inicial. En la Figura IV. 4.8 se representa el número de onda del máximo correspondiente a la vibración simétrica frente a la temperatura de calentamiento. El número de onda del máximo es de $2852,5 \text{ cm}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y corresponde a un estado cristal líquido de la membrana (Jackson et al., 1989); al aumentar la temperatura el número de onda del máximo también aumenta de forma gradual hasta llegar a $2853,6 \text{ cm}^{-1}$ a $80 \text{ }^\circ\text{C}$. El desplazamiento es muy pequeño debido a que los lípidos se encuentran ya prácticamente en estado cristal líquido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por lo que no sufren sustanciales cambios de estado con el aumento de temperatura. En los experimentos de CDB de esta muestra se observa una pequeña transición endotérmica centrada alrededor los $51 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura IV. 4.4) atribuible a lípidos. Los datos representados en la Figura IV. 4.8 se han ajustado a un modelo de equilibrio de dos estados obteniéndose un valor de $53 \text{ }^\circ\text{C}$ para la T_d . En estos experimentos del solubilizado "reconstituido" no se observa un cambio brusco del número de onda en la zona de $51 \text{ }^\circ\text{C}$, como cabría esperar de los resultados obtenidos por CDB, sino que el cambio es prácticamente gradual en todo el intervalo de temperatura.

2- Reconstitución del PLP purificado con octilglucósido mediante dilución y posterior diálisis:

Este procedimiento es análogo al correspondiente utilizado para el solubilizado de mielina. Se mezclan 6 mg de PLP, de las fracciones adecuadas sin concentrar de la elución con CM-Sephadex C-50 (ver Apartado IV. 3.2.3), con 15 mg de lípidos de mielina en forma de liposomas multilamelares y se incuba la mezcla durante 1 hora a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ agitando a 16 rpm. Posteriormente se diluye esta mezcla con tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0), hasta

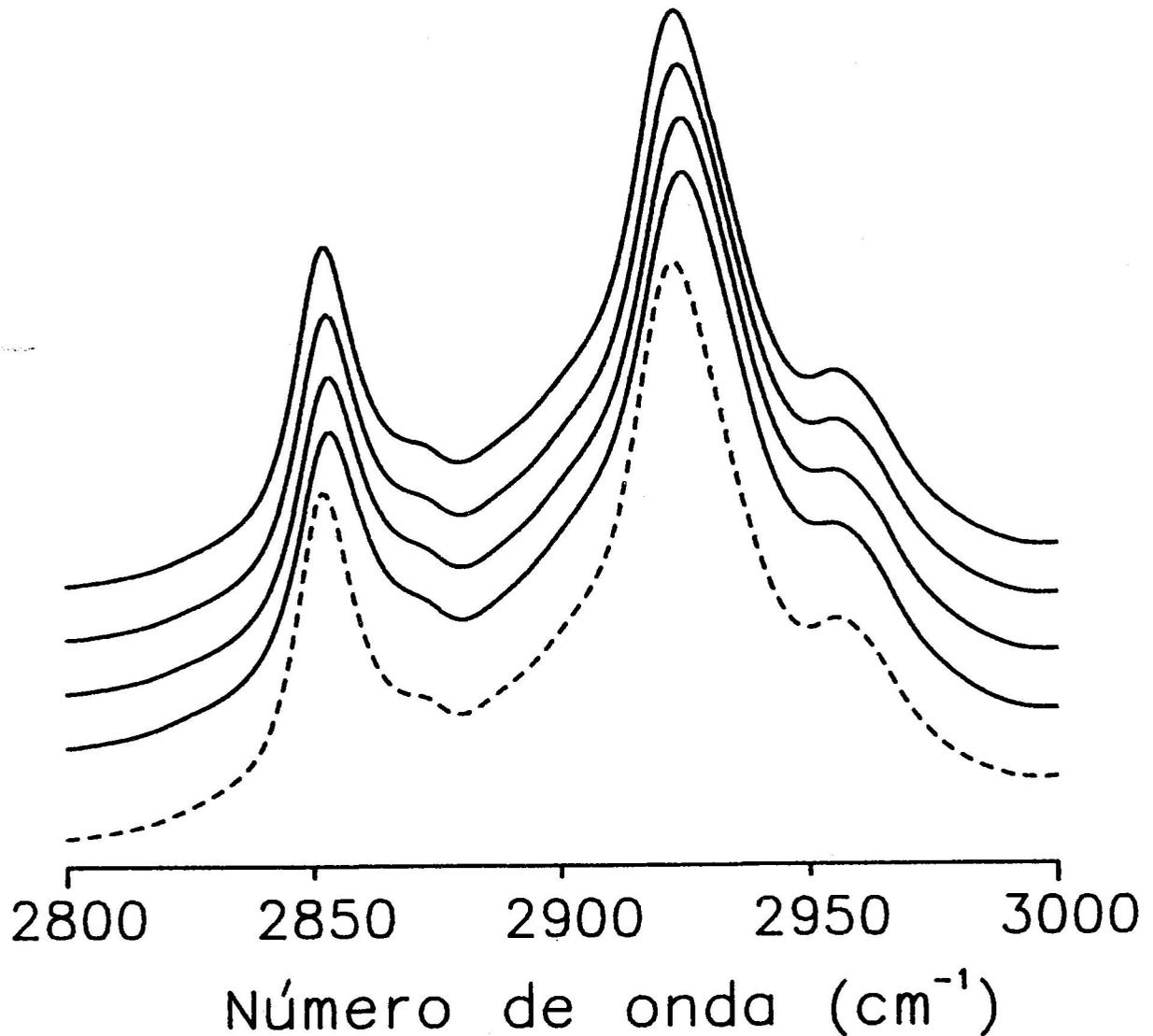


FIGURA IV. 4.7: Espectros de FT-IR entre 2800 y 3000 cm⁻¹ del solubilizado de mielina con octilglucósido "reconstituido" en lípidos de mielina por el procedimiento de dilución y diálisis en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a temperaturas sucesivas. Las temperaturas de los espectros son, de arriba hacia abajo, 30, 50, 70 y 80 °C; la línea discontinua corresponde al espectro de la misma muestra calentada a 80 °C después de haberla enfriado hasta 20 °C.

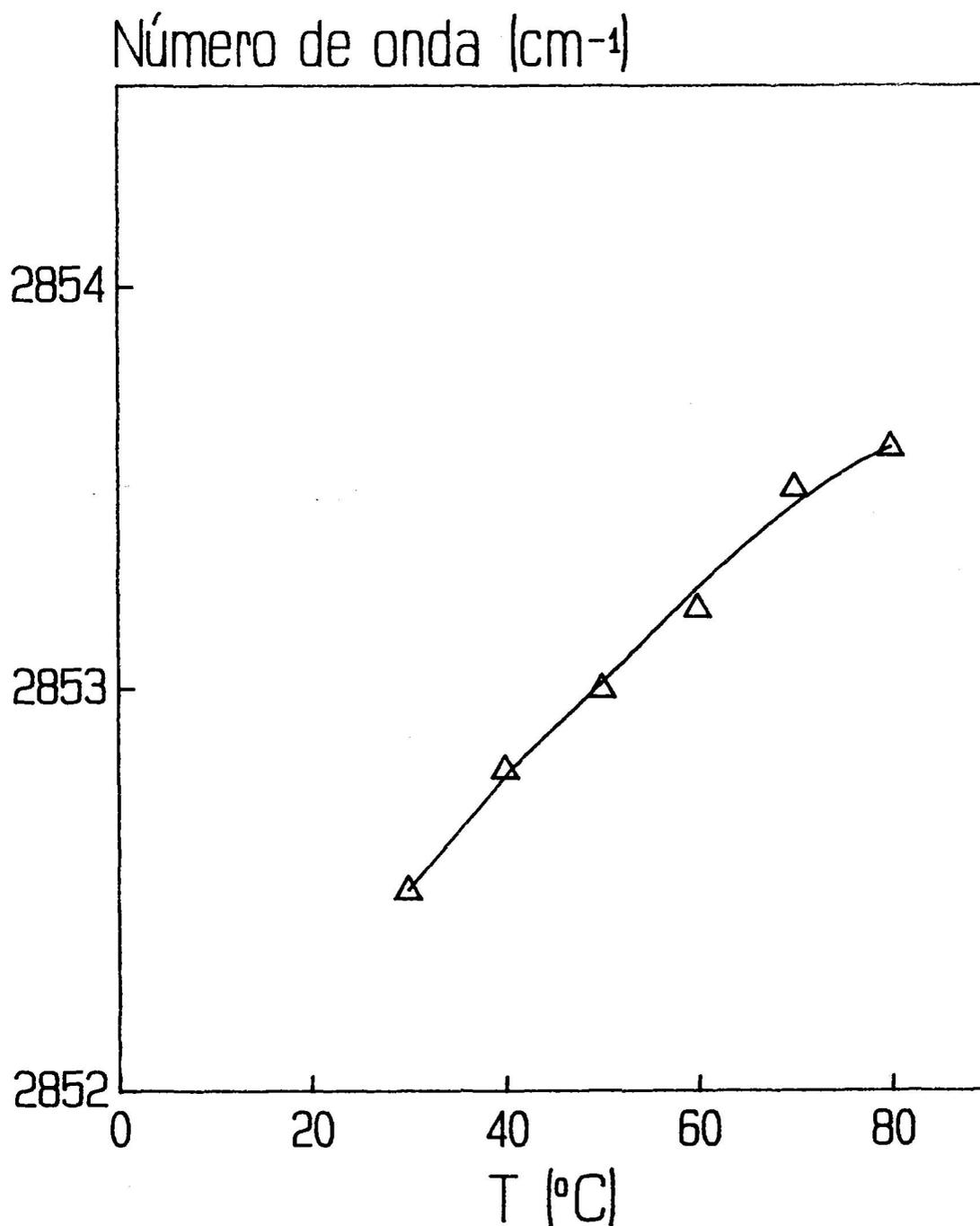


FIGURA IV. 4.8: Representación del número de onda correspondiente al máximo de la vibración asimétrica de tensión del enlace C-H para el componente lipídico del solubilizado de mielina con octilglucósido y "reconstituido". La línea continua corresponde a un ajuste no lineal por mínimos cuadrados siguiendo un modelo termodinámico reversible de dos estados.

que el octilglucósido presente en la mezcla se encuentre a una concentración inferior a su CMC. Tras la dilución, se dializa durante 48 horas con cuatro cambios de tampón a 4 °C frente a un volumen de 5 litros en cada cambio de 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). Para concentrar los proteoliposomas formados, se centrifuga a 120.000 xg durante 1 hora. El sedimento así obtenido se resuspende en 1 ml de tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y se dializa durante 12 horas a 4 °C frente a un volumen total de 5 litros del tampón anterior. De esta forma se obtiene el PLP reconstituido en sus lípidos naturales, con el cual se han realizado experimentos de CDB y FT-IR.

Los resultados obtenidos para el PLP con CDB por este procedimiento de reconstitución son muy similares a los correspondientes al solubilizado "reconstituido" de mielina. En los experimentos calorimétricos, realizados a una concentración de proteína de 1,2 mg/ml, se observan dos transiciones irreversibles (Figura IV. 4.9) que se corresponden con las obtenidas para el solubilizado "reconstituido"; una transición centrada alrededor de los 51 °C y otra a mayor temperatura que presenta una Td de 70 °C y una entalpía de desnaturalización de $2 \text{ J/g} \pm 0,8 \text{ J/g}$. Esta transición que se debe a proteína, como se comprueba por los experimentos de FT-IR, es muy similar a la obtenida con el solubilizado de mielina "reconstituido", por lo que se puede afirmar que la transición centrada a 70 °C obtenida con el solubilizado "reconstituido" se debe fundamentalmente a la presencia del PLP.

La transición centrada a 51 °C se atribuye a lípido debido a que aparece de nuevo como transición reversible en los lípidos extraídos del PLP reconstituido, aunque los lípidos con que inicialmente se reconstituyen estos sistemas no presentan transición calorimétrica. Se supone que durante el periodo de diálisis del proceso de reconstitución se dializa algún componente lipídico y ésta es la causa de la aparición de esta transición. Este fenómeno se

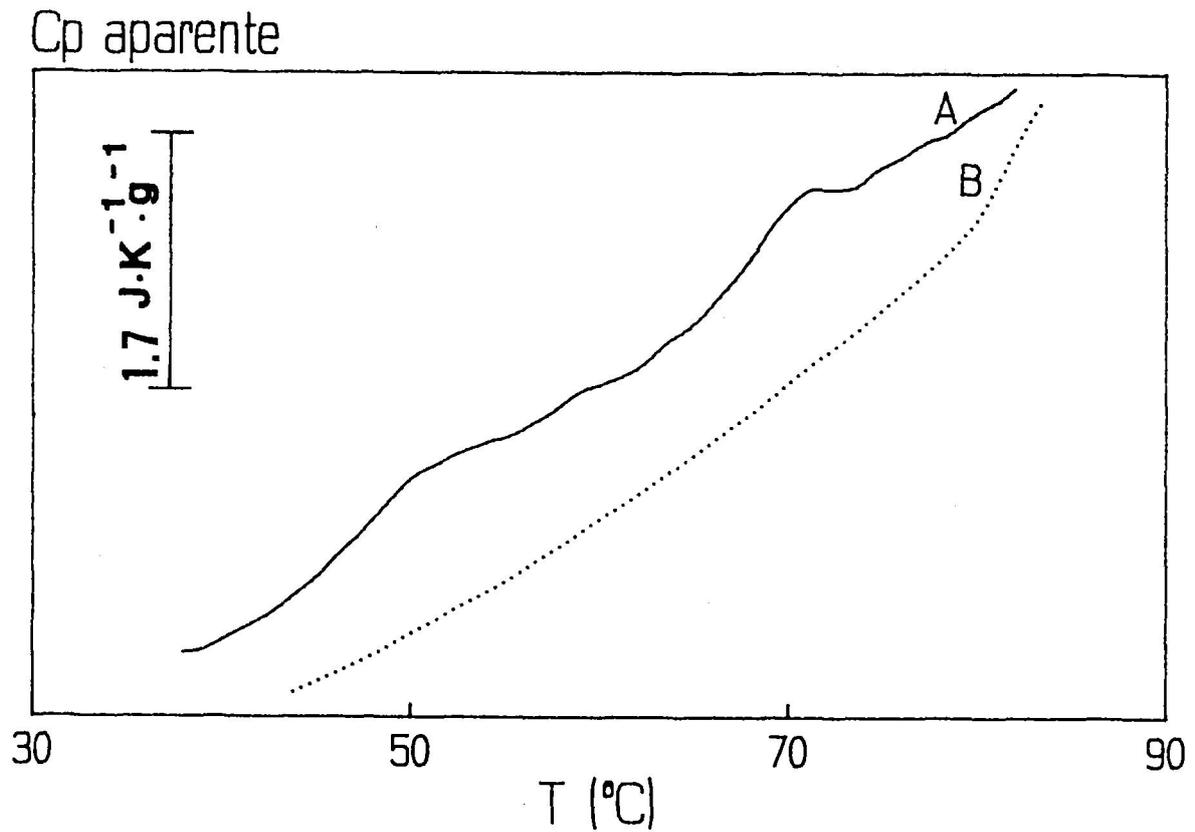


FIGURA IV. 4.9: Registro original de CDB del PLP purificado con octilglucósido y reconstituido en lípidos de mielina por el procedimiento de dilución y diálisis (ver texto) en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). (A) calentamiento de la muestra a 1 K/min.; (B) recalentamiento de la muestra a la misma velocidad de barrido. La concentración de proteína en la muestra es de 1,2 mg/ml.

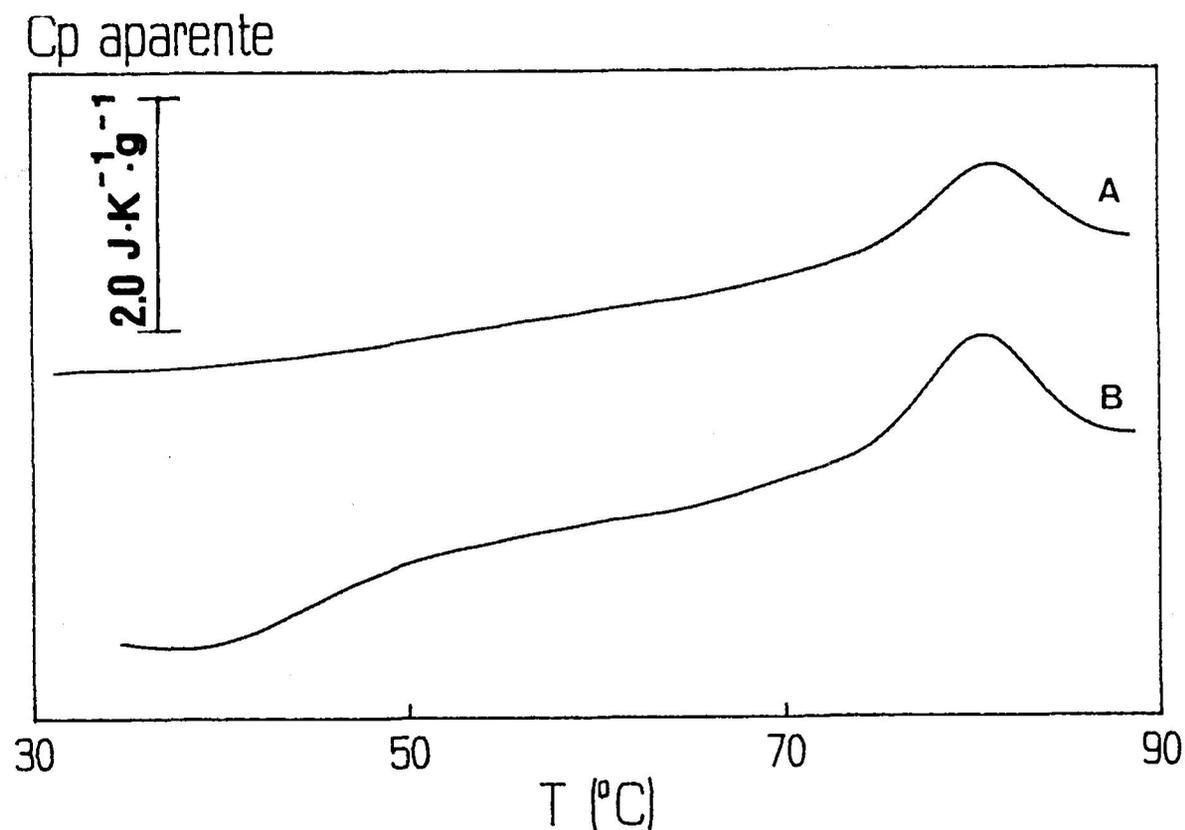


FIGURA IV. 4.10: Registro original de CDB de la mielina en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) sometida a diálisis frente al mismo tampón en que se encuentra suspendida. (A) sin dializar; (B) tras 48 horas de diálisis con dos cambios de tampón. La concentración de la muestra es de 6,4 mg/ml de proteína total. La velocidad de barrido es de 1 K/min.

ha observado de forma análoga para el caso de los lípidos extraídos de la mielina y para el caso de la mielina misma (Figura IV. 4.10). Para ello se ha mantenido en diálisis una disolución bien de lípidos extraídos de la mielina, bien de mielina misma, bajo unas condiciones similares a las utilizadas para la reconstitución. Se observa que, tanto para los lípidos extraídos de la mielina como para la propia mielina, a medida que transcurre el tiempo y los cambios del tampón de diálisis, va apareciendo un pico centrado por los 51 °C, que se hace más pronunciado a medida que transcurre el tiempo de diálisis. Uno de los componentes lipídicos que al ser eliminados pueden dar lugar a esta transición es el colesterol ya que es un componente que "amortigua" las transiciones de fase de los lípidos e, incluso, puede llegar a eliminarlas (Mabrey et al., 1978).

Se han realizado experimentos de FT-IR en tampón acuoso del PLP reconstituido en lípidos naturales de mielina. En la Figura IV. 4.11 se observa que el PLP reconstituido presenta en la banda amida I una fuerte componente de estructura hélice α ($1656,5 \text{ cm}^{-1}$) y una componente menor de estructura β ($1630,5 \text{ cm}^{-1}$); también se aprecia una pequeña componente atribuida a giros en la cadena polipeptídica (1690 cm^{-1}). En este caso la banda de estructura hélice α es mucho más estrecha y pronunciada que en el caso de la mielina (Figura IV. 2.23) y del solubilizado reconstituido (Figuras IV. 4.5), mientras que la presencia de estructura β es bastante inferior. Esto puede deberse al hecho de que en esta muestra la única proteína presente es prácticamente el PLP, cuya estructura se piensa que es principalmente hélice α (Laursen et al., 1984; Stoffel et al., 1984; Surewicz et al., 1987a), mientras que la PBM en medio lipídico muestra una gran proporción de estructura β (Surewicz et al., 1987b), por lo que es lógico que tanto la mielina como el solubilizado "reconstituido" presenten una mayor componente de estructura β en el espectro de FT-IR debido a la presencia de PBM.

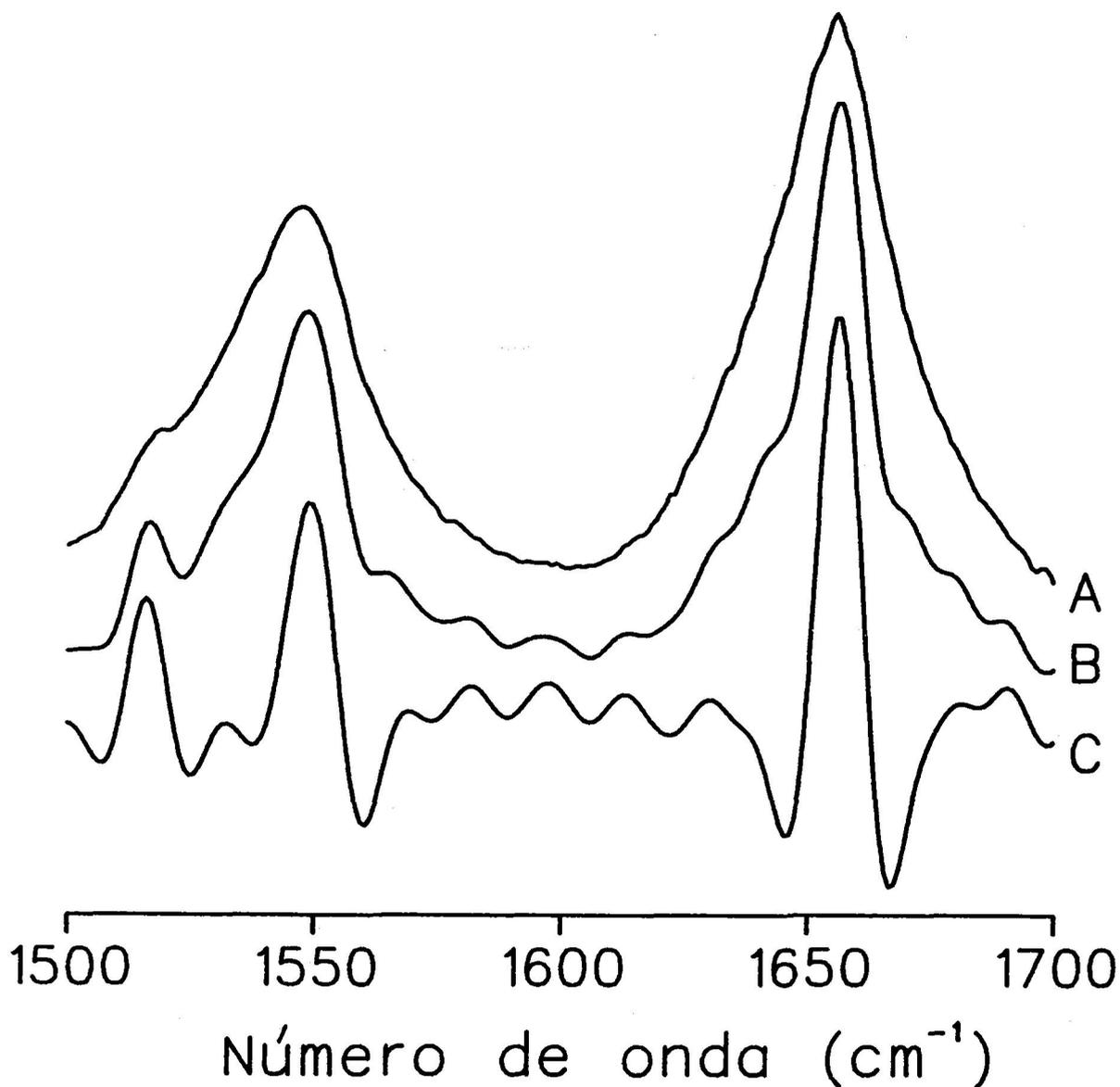


FIGURA IV. 4.11: Espectro de FT-IR entre 1500 y 1700 cm^{-1} del PLP purificado con octilglucósido y reconstituido en lípidos de mielina en 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 30 °C. (A) después de restar el espectro del tampón acuoso; (B) autodeconvolución de Fourier del espectro resta; (C) cuarta derivada del espectro resta.

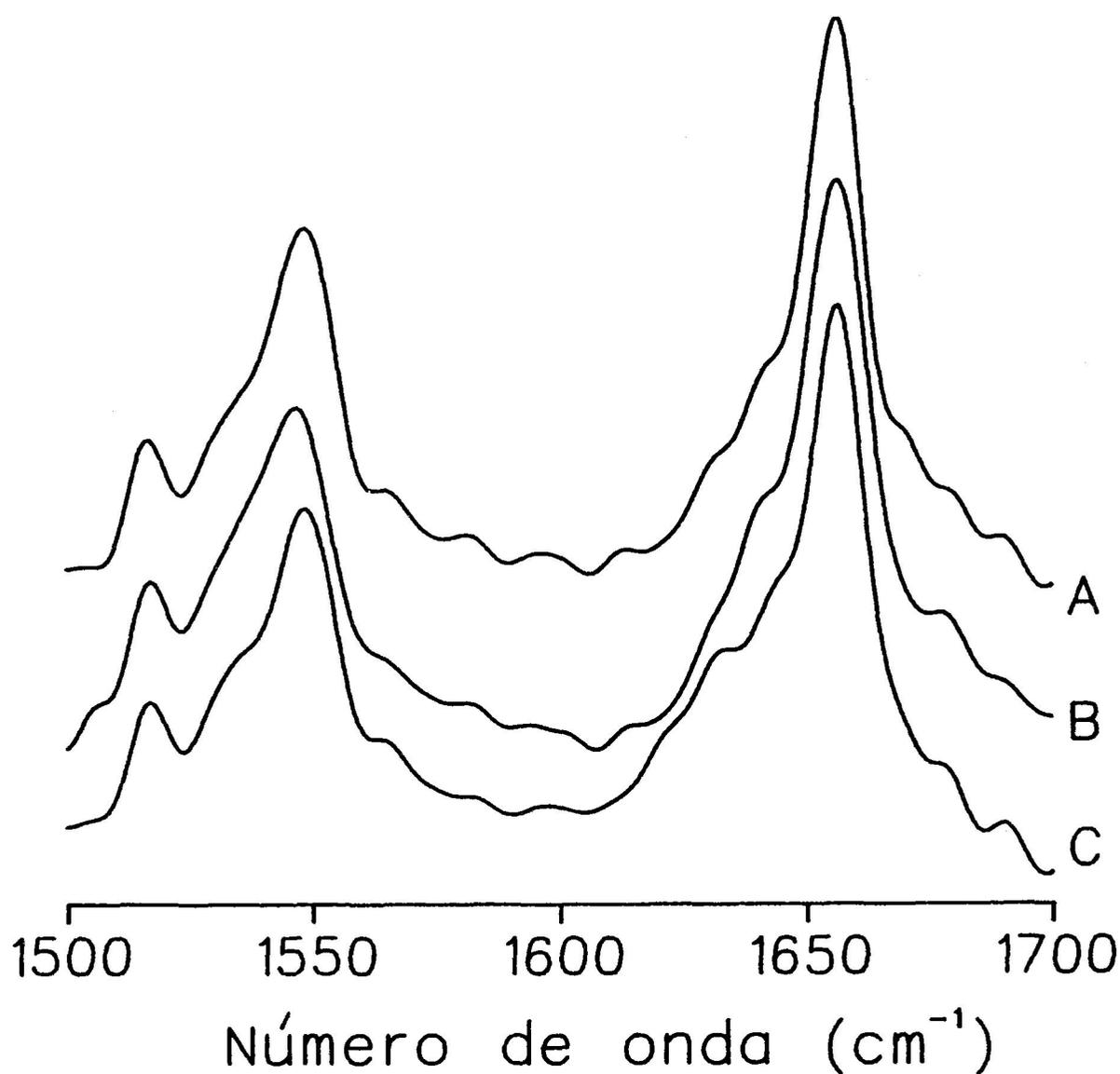


FIGURA IV. 4.12: Autodeconvolución de Fourier de los espectros de FT-IR del PLP purificado con octilglucósido y reconstituido en lípidos de mielina en tampón fosfato a (A) 30 °C, (B) 60 °C y (C) después de calentar a 80 °C y enfriar hasta 20 °C.

Al calentar el PLP reconstituido hasta 60 °C no se observa ningún cambio significativo en el espectro de infrarrojo (Figura IV. 4.12). Si se sigue calentando la muestra hasta 80 °C y luego se enfría hasta 20 °C (Figura IV. 4.12) se observa que la banda a 1630,5 cm⁻¹, correspondiente a estructura β, aumenta considerablemente, mientras que la de 1656,5 cm⁻¹, correspondiente a estructura hélice α, disminuye ligeramente. Estos resultados son acordes con los obtenidos por Surewicz y colaboradores con el apoproteolípido de mielina (Surewicz et al., 1987a), como se ha comentado anteriormente en este mismo Apartado. Un aumento similar en el número de onda (a 1620 cm⁻¹ en agua deuterada) en la desnaturalización de determinadas proteínas se ha descrito en la bibliografía (Surewicz et al., 1987a; Arrondo et al., 1988; Muga et al., 1988; Prado et al., 1990; Rial et al., 1990). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que, de forma similar al solubilizado de mielina "reconstituido", el PLP reconstituido no se desnaturaliza hasta los 60 °C, mientras que en el intervalo de temperatura entre 60 y 80 °C se produce su desnaturalización irreversible provocando un aumento de estructura β y una disminución de hélice α, que correspondería a la transición de CDB a 70 °C.

Al analizar la zona del espectro infrarrojo correspondiente a los grupos metilenos de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (2800 - 3000 cm⁻¹), se observa un desplazamiento de los números de onda de los máximos hacia números mayores a medida que aumenta la temperatura (Figura IV. 4.13). En el PLP reconstituido la vibración asimétrica de la tensión del enlace C-H se desplaza desde 2851,7 cm⁻¹ a 2853,4 cm⁻¹ al aumentar la temperatura desde 30 °C a 80 °C. Al enfriar la muestra los máximos de estos picos vuelven a los números de onda iniciales, indicando que es un proceso reversible. El desplazamiento de los máximos es progresivo, estando centrado en la zona de los 52 °C, según ajuste de los datos de la Figura IV. 4.14 a un modelo de equilibrio de dos estados. Este hecho parece corroborar

que la transición observada a 51 °C por CDB se debe a lípidos. Este pequeño cambio no es un verdadero cambio del estado gel de los lípidos al estado cristal líquido, como el que se observa con el PLP purificado con disolventes orgánicos (ver Figura IV. 1.13), lo cual puede deberse a que la presencia de cantidades altas de colesterol existente en los lípidos de mielina mantiene a la bicapa lipídica en un estado fundamentalmente de cristal líquido incluso a bajas temperaturas. Este pequeño desplazamiento en los números de onda indicaría un cambio de estado de los lípidos presentes en la muestra pero no un cambio verdadero de gel-cristal líquido. Esta pequeña variación en el número de onda del máximo, menor que en el caso del PLP purificado por disolventes orgánicos (ver Apartado IV. 1), concuerda con que la transición obtenida a 51 °C por CDB tenga una entalpía muy inferior a la obtenida con el PLP purificado por disolventes orgánicos.

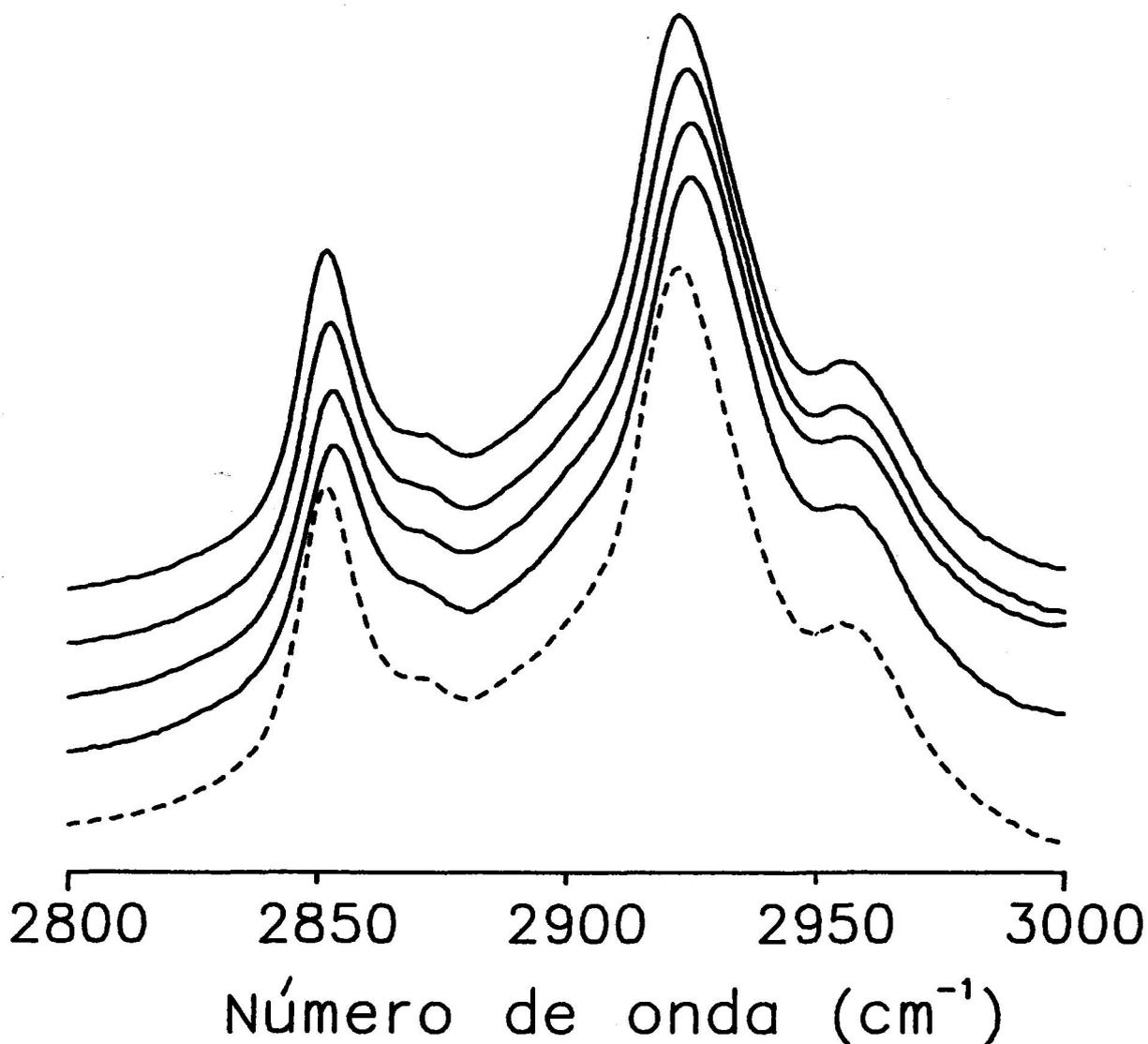


FIGURA IV. 4.13: Espectros de FT-IR entre 2800 y 3000 cm^{-1} del PLP purificado con octilglucósido y reconstituido en lípidos de mielina en tampón fosfato a temperaturas sucesivas. Las temperaturas de los espectros son, de arriba hacia abajo, 30 , 50 , 70 y $80 \text{ }^\circ\text{C}$; la línea discontinua corresponde al espectro de la misma muestra calentada a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ después de haberla enfriado hasta $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

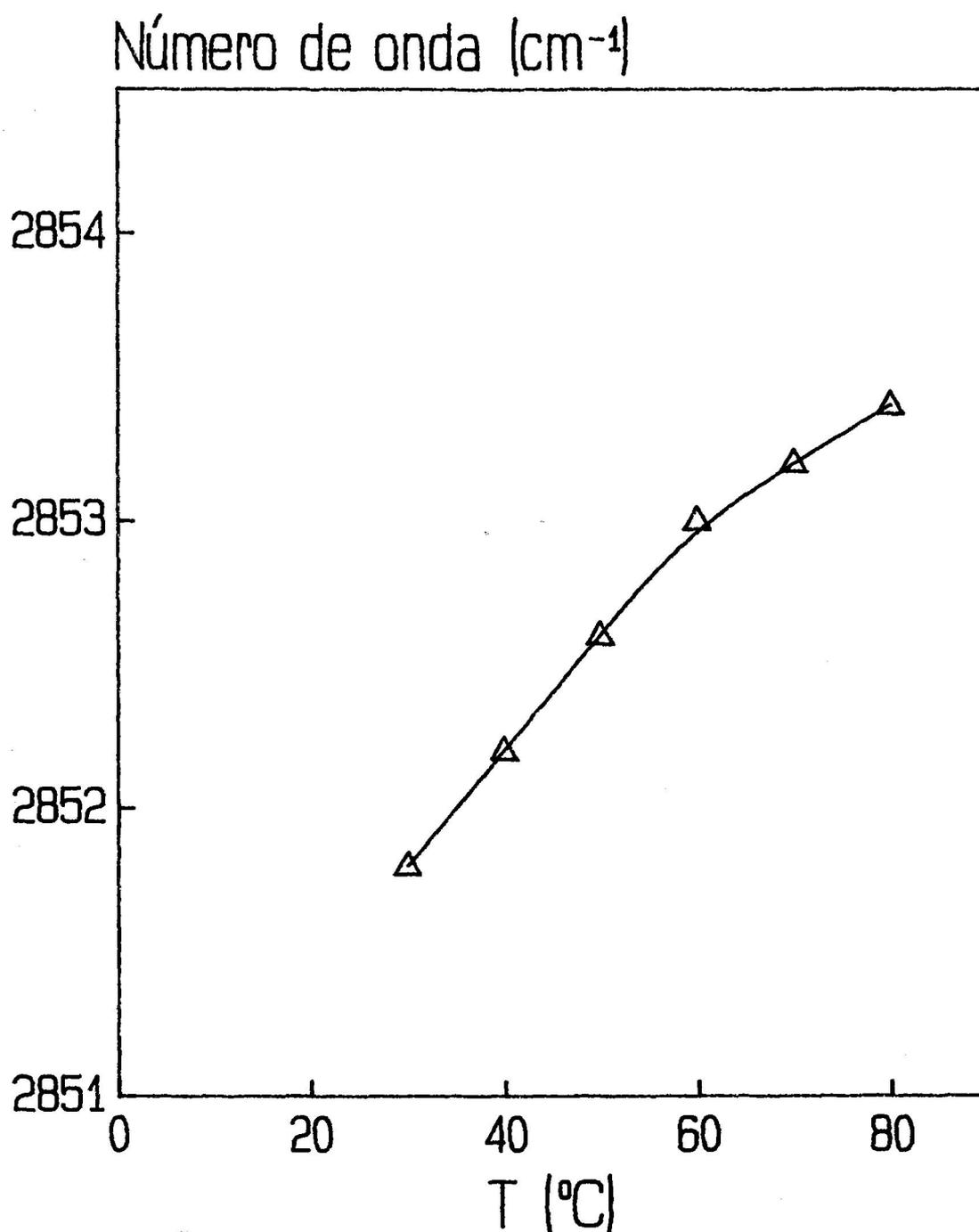


FIGURA IV. 4.14: Representación del número de onda del máximo de la vibración asimétrica de tensión del enlace C-H del componente lipídico frente a la temperatura de calentamiento del PLP purificado con octilglucósido y reconstituido. La línea continua corresponde a un ajuste no lineal por mínimos cuadrados siguiendo un modelo termodinámico reversible de dos estados.

V. DISCUSSION

Una de las líneas de trabajo del Departamento de Química Física consiste en el estudio de la estabilidad térmica de proteínas por calorimetría diferencial de barrido. En esta Memoria se recoge la primera investigación en esta línea centrada en membranas biológicas, la mielina, y en proteínas de membrana como la proteína básica de mielina y, en particular, el protolípido de mielina. Las razones de esta elección se citan en la Introducción de esta Memoria y se basan en el papel fundamental desempeñado por la mielina en la transmisión del impulso nervioso de animales desarrollados (Morell, 1984), así como en su relevancia en ciertas enfermedades del sistema nervioso central (Eylar, 1980; Gregson, 1983). Por otra parte, en un estudio puntual realizado sobre el PLP obtenido por disolventes orgánicos, se obtuvo una transición térmica reversible, que se interpretó como debida a la desnaturalización de dicha proteína (Mateo et al., 1986). El carácter reversible era ya de por sí muy llamativo pues era el único caso conocido para la desnaturalización térmica de una proteína intrínseca de membrana (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987). De hecho, dado este carácter reversible, se realizó la deconvolución termodinámico-estadística de la correspondiente endoterma (resultados no incluidos en esta Memoria), lo que daba lugar a tres transiciones que podrían correlacionarse con el desplegamiento de dominios incluidos en los modelos propuestos para el PLP (Stoffel et al., 1984; Laursen et al., 1984; Hudson et al., 1989).

Por esta razón el estudio propuesto se inició cronológicamente con una investigación más exhaustiva de la citada transición reversible. El plan previsto incluía analizar la influencia de cambios en el medio acuoso (pH, fuerza iónica) y en el hidrofóbico (diferente

composición de lípidos en la bicapa), así como de cortes proteolíticos, en la estabilidad térmica del PLP y de sus dominios. Esta planificación tuvo que modificarse, sin embargo, cuando los primeros resultados pusieron en tela de juicio la correcta adscripción de la transición térmica reversible a la desnaturalización del PLP; de hecho, resultados posteriores muestran que esta transición es fundamentalmente debida a lípidos (ver Apartado IV. 1 de Resultados y discusión posterior). Esta situación provocó el que se replanteara el trabajo en base a la propuesta de un nuevo método para la purificación del PLP.

Puesto que la investigación químico física de biomembranas requiere estudiar primero la membrana natural en su conjunto (para luego tratar de separar sus componentes, aislarlos y reconstituirlos, e investigar sus interacciones) se abordó primero el estudio de la estabilidad térmica de la mielina, quedando la purificación de sus proteínas mayoritarias, su posible reconstitución y estudio químico físico, para una segunda etapa. Como se indica en la Introducción, esta decisión suponía enfrentarse por primera vez con el estudio de proteínas intrínsecas de membrana, el uso de detergentes para su purificación y posterior reconstitución, y la puesta a punto de nuevas técnicas bioquímicas (análisis térmico en gel de SDS-PA) y físicas (FT-IR).

Por otra parte, una dificultad intrínseca de los propios sistemas en estudio, y que afecta al propio concepto de "reconstitución" arriba empleado, estriba en la ausencia de una función biológica controlable para el PLP, o la propia PBM, lo que imposibilita saber con certeza si la conformación con que estamos tratando en una situación dada se corresponde en realidad con la nativa. Esta limitación es obviamente extensiva a los trabajos realizados hasta la fecha con el PLP, por ejemplo. En este sentido se ha intentado utilizar como observable conformacional una transición térmica a aproximadamente 80 °C que se ha encontrado en la mielina y que según los resultados de FT-IR y análisis térmico de gel (ver Apartado IV. 2 de Resultados) parece corresponder fundamentalmente a la desnaturalización

del PLP. Esta propuesta de observable adecuado se basa en que las curvas de CDB para una cierta proteína, bajo unas condiciones experimentales dadas, son características de su conformación y muy sensibles a posibles modificaciones en dicha conformación (Mateo, 1984). Así pues, la citada transición térmica se ha utilizado para comprobar hasta qué punto, una vez purificadas las proteínas mayoritarias de la mielina, la "reconstitución" del PLP en sus lípidos naturales daba lugar a una conformación equiparable a la nativa.

* * * * *

Dentro del estudio del crudo proteolipídico obtenido por disolventes orgánicos (Apartado IV. 1 de Resultados), se ha obtenido una transición térmica reversible por CDB centrada en los 52 °C (Figura IV. 1.1) y similar a la obtenida en un estudio previo (Mateo et al., 1986), salvo que en este caso la transición reversible aparecía a los 60 °C. De hecho, aunque el crudo se ha obtenido aquí siguiendo sistemáticamente el protocolo de preparación (Monreal, 1975; Cózar, 1986), surgen algunas diferencias entre nuestra muestra de crudo y la de los autores citados y cuyas referencias se han utilizado. Así, en nuestro caso encontramos un contenido de proteína total del 14% (w/w) del peso seco del crudo liofilizado (relación molar lípido/proteína $\approx 240/1$), mientras que en el crudo utilizado en el trabajo previo de CDB (Mateo et al., 1986), así como en otras citas de estos autores (Monreal, 1975; Cózar, 1986), y que denominaremos a partir de ahora como crudo 2, se indica un contenido de lípido del 60% (w/w) con menos de un 4% de PBM y con otros componentes menores no especificados (Mateo et al., 1986), siendo el PLP la proteína obviamente mayoritaria. Si suponemos que el 60% de lípido presenta un peso molecular promedio de 775 y que el 40% restante corresponde exclusivamente a PLP, de peso molecular 30.000, la relación molar lípido/proteína resultante es aproximadamente 60, frente al valor de 240 obtenido por

nosotros.

Por otra parte, el PLP en el crudo viene aquí acompañado fundamentalmente por la DM-20, proteína muy difícil de separar del PLP, más que por la PBM. De hecho la composición proteínica de este crudo, obtenida por densitometría de sus bandas electroforéticas, es de un 75% de PLP y un 25% de DM-20, sin presencia prácticamente de PBM o Fracción Wolfgram. Una proporción similar de una proteína de 20 kDa, asimilable a la DM-20, respecto del PLP ha sido también obtenida en un trabajo de purificación del apoproteolípido a partir del crudo obtenido por disolventes orgánicos (Helynck et al., 1983). En cualquier caso, y salvo este último trabajo citado, resulta sorprendente la alta proporción de DM-20 obtenida en nuestra preparación de crudo, cuando su presencia no es ni mencionada en la mayor parte de los trabajos relativos al crudo proteolípido (Monreal, 1975; Aguilar et al., 1983; Cózar, 1986; Mateo et al., 1986). Esta situación es aún más llamativa si tenemos en cuenta que incluso en la mielina se considera que la proporción de DM-20 es muy baja (Morell, 1984), aunque no hemos encontrado datos cuantitativos a este respecto. Precisamente nosotros hemos realizado una estimación cuantitativa del contenido en proteína de la mielina por densitometría de una gran cantidad de geles electroforéticos y hemos encontrado que así como el PLP y la PBM son, como era de esperar, las especies mayoritarias con un 41% - 42% para cada una del total de proteínas presentes, existía también una presencia análoga de DM-20 y Fracción Wolfgram sobre el 8% - 9%. Es decir, que de acuerdo con nuestros resultados, la DM-20 se encuentra en una proporción aproximada frente al PLP de 1 a 5; esta relación es comparable a la de 1 a 3 encontrada en nuestras preparaciones de crudo, lo cual parece muy lógico dado la gran similitud estructural ya comentada y el gran número de propiedades que comparten ambas proteínas. Podría darse así el caso de que por este gran parecido, la presencia de la DM-20 haya estado frecuentemente infravalorada al asimilarse al PLP, dado además que la DM-20 es una

proteína comparativamente menos conocida y de hallazgo y estudio mucho más reciente que los del PLP o la PBM. De hecho, en trabajos relativos a la presencia de proteínas en la mielina o en el crudo del PLP aparecen a veces bandas electroforéticas en la zona de peso correspondiente a la DM-20 que no se comentan en dichos artículos (Monreal, 1975 ; Ross y Braun, 1988), o bien la banda asignada al PLP es tan ancha que bien pudiera englobar ambas proteínas (Cózar, 1986).

En cuanto a los resultados de CDB de ambos crudos, el aquí obtenido y el que hemos denominado como crudo 2, existen también analogías y diferencias. Así para ambas muestras se ha encontrado una transición reversible, en nuestro caso con una Td de 52 °C, y de 60 °C para el crudo 2 (Mateo et al., 1986). Esta diferencia no es muy elevada teniendo en cuenta las diferencias que parecen existir entre ambos crudos. La entalpía de la transición es también distinta en ambos casos, 28 J/g y 50 J/g para el nuestro y el crudo 2 respectivamente; sin embargo, ambos valores van referidos a distintos tipos de componente, el primero es por g de lípido y el segundo por g de proteína. Si normalizamos estos valores a g de proteína encontramos en nuestro caso una entalpía de 172 J/g de proteína, un valor siete veces superior al de las proteínas hidrosolubles compactas con el mismo valor de Td (Privalov, 1979) y, consecuentemente, descabellado para una proteína de membrana; si normalizamos a g de lípido encontramos que el valor citado para el crudo 2 se convierte en 33 J/g de lípido, un valor que, dentro del error experimental, se corresponde muy bien con el valor encontrado en esta Memoria, 28 J/g de lípido, y que es similar a los encontrados para transiciones de fase de lípidos en bicapas (Mabrey y Sturtevant, 1978). Así pues, los datos de entalpía aparecen como más "razonables" y están en buen acuerdo entre sí cuando van referidos a g de lípido, lo que en último extremo lleva a atribuir fundamentalmente la transición térmica del crudo a una transición de fase lipídica. No obstante, conviene no olvidar las diferencias citadas para ambas muestras de crudo a la hora de extrapolar nuestros

resultados a los del crudo 2.

Pasando pues a comentar los datos referentes al crudo utilizado en esta Memoria, puede adelantarse que hay tres razones o evidencias experimentales que apoyan la naturaleza lipídica de la transición, aunque el PLP parece a su vez jugar un cierto papel en la misma:

1.- Cuando se extraen los lípidos del crudo (Apartado III. 2.5.3) y se realiza un barrido por CDB se obtiene también una transición térmica reversible, que obviamente no puede atribuirse ahora al PLP (Figura IV. 1.2). En este caso la T_d es de $48\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por debajo de la obtenida con el crudo y, aunque la forma de la endoterma es muy parecida, la entalpía de la transición para los lípidos es de 18 J/g , inferior a la obtenida para el crudo, 28 J/g . Esta diferencia en el Δh indicaría que la presencia del PLP afecta a esta transición, haciéndola más entálpica. Este efecto es el contrario al observado para otras proteínas, cuya presencia disminuye el Δh de la transición de lípidos (Papahadjopoulos et al., 1975; Gómez-Fernández et al., 1980; Goñi, 1987), aunque en estos casos el decaimiento del Δh corresponde a transiciones de fase de lípidos puros. Una posible explicación sería que en el caso del crudo se superpusiera la transición de los lípidos con la desnaturalización del propio proteolípido; esta posibilidad se contradice, sin embargo, con los resultados de FT-IR que se comentarán posteriormente. Otra interpretación podría estar en que en la extracción de los lípidos del crudo, que nunca es una extracción total, se perdieran selectivamente ciertos lípidos que desempeñen un papel destacado en la transición del crudo; esta situación sería análoga a la encontrada en el paso de la sustancia blanca y de la mielina al crudo proteolipídico, como se comenta a continuación. La diferencia en la unidad cooperativa, 10 para el crudo y 15 para los lípidos extraídos, sí está de acuerdo con el efecto conocido de proteínas en el tamaño de la unidad cooperativa para las transiciones de fase de lípidos (Papahadjopoulos et al., 1975; Chapman et al., 1979; Goñi, 1987).

El efecto del PLP obtenido por disolventes orgánicos en las transiciones de fase de lípidos puros ha sido investigado; de hecho son mucho más abundantes los estudios por CDB de este tipo de efecto sobre los lípidos que los de la desnaturalización de las propias proteínas de membrana (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987). Así, Curatolo y colaboradores (Curatolo et al., 1977) estudiaron cómo el PLP modifica la transición térmica del DMPC, no encontrando evidencia térmica alguna de la posible desnaturalización del PLP en este lípido al calentar hasta 120 °C.

2.- Es bien conocido el efecto del colesterol en las transiciones térmicas de lípidos, disminuyendo el orden estático de éstos por debajo de la temperatura de la transición y aumentándolo por encima de ésta, así como disminuyendo la magnitud (entalpía) de la transición (Sturtevant, 1974; Mabrey et al., 1978; Mabrey y Sturtevant, 1978). Este efecto se ha encontrado, como era de esperar, en la transición térmica de los lípidos extraídos del crudo (Figura IV. 1.4, Tabla IV. 1.2); es significativo que este efecto característico del colesterol también se ha encontrado en el propio crudo, donde la presencia creciente de este lípido ocasiona un ensanchamiento y disminución notable de la entalpía de la transición (Figura IV. 1.3, Tabla IV. 1.1). Este efecto del colesterol es, no obstante, distinto para ambos sistemas, pues para una concentración dada de colesterol la disminución de entalpía (y también de T_d) es comparativamente mayor para los lípidos que para el crudo (Figuras IV. 1.5 y IV. 1.6).

Habría que indicar en este contexto que si bien los lípidos extraídos del crudo presentan transición calorimétrica, no lo hacen así los lípidos extraídos de la sustancia blanca o de la mielina (Figura IV. 1.9). Esto podría indicar que durante la preparación del crudo se perdieran ciertos componentes, como el colesterol, que "enmascaran" la transición lipídica. Efectivamente, el análisis de la composición lipídica (Tabla IV. 1.3) muestra una

desaparición casi total de colesterol y plasmalógenos, así como una menor proporción de ácidos grasos libres, fosfatidilcolina y esfingomielina, en los lípidos presentes en el crudo con respecto a la composición lipídica de la sustancia blanca o de la mielina. Un resultado de interpretación equivalente ya había sido obtenido por Chapman y colaboradores (Ladbroke et al., 1968), quienes no observaron transición térmica en los lípidos extraídos de la mielina, pero al eliminar el colesterol de dichos lípidos encontraron una transición a 50 °C con una entalpía de 12 J/g; estos valores concuerdan bien con los obtenidos aquí para los lípidos extraídos del crudo de PLP, 48 °C y 18 J/g, sobre todo teniendo en cuenta la limitada sensibilidad de los calorímetros de esos autores.

En conjunto pues, el estudio sobre el efecto del colesterol parece indicar que la transición del crudo se debe fundamentalmente a los lípidos del mismo, aunque ésta esté afectada por la presencia del PLP.

3.- Se han realizado experimentos de FT-IR del crudo proteolipídico, comprobándose que existe una transición de fase de los lípidos centrada a 49 °C, muy similar a la obtenida por CDB, mientras que en la zona de la amida I no se observa ningún cambio apreciable en el intervalo de 20 °C a 60 °C. Este resultado confirma que la transición térmica encontrada para el PLP purificado en este trabajo por disolventes orgánicos es de naturaleza lipídica, sin efecto apreciable alguno debido a la desnaturalización del PLP. Así, se ha observado que a 20 °C las cadenas hidrofóbicas de los lípidos del crudo están altamente ordenadas, presentando un máximo en el número de onda correspondiente a la vibración de tensión asimétrica del enlace C-H a $2850,2 \text{ cm}^{-1}$, valor característico de la fase gel (Jackson et al., 1989); a 80 °C este máximo aparece a $2853,6 \text{ cm}^{-1}$, característico de la fase cristal líquido (Figuras IV. 1.12 y IV. 1.13). La adición del colesterol conlleva una disminución del desplazamiento del máximo con la temperatura (Fig. IV. 1.13 y IV. 1.14) ya que a bajas

temperaturas el colesterol desordena las cadenas hidrofóbicas (aumentando el número de onda del máximo), mientras que a temperaturas altas su efecto es el inverso, lo que evita un mayor desplazamiento del máximo, con lo que la transición lipídica tiende a desaparecer (Sturtevant, 1974; Mabrey et al., 1978; Chapman et al., 1979).

Podría esperarse después de todo lo expuesto que, al igual que le ocurre a muchas otras proteínas que pierden su conformación nativa al ser tratadas con disolventes orgánicos (Helenius y Simons, 1975; Tanford y Reynolds, 1976; Scopes, 1982), al PLP del crudo le ocurriera algo parecido. Los resultados de FT-IR muestran que este PLP presenta una cierta estructura secundaria, principalmente hélice α ($1655,6 \text{ cm}^{-1}$) con fuerte contribución de estructura β ($1630,0 \text{ cm}^{-1}$) y algo de giros β ($1684,2 \text{ cm}^{-1}$) (Figura IV. 1.10); estructura que coincide con la descrita en la bibliografía para el apoproteolípido obtenido por estos disolventes (Surewicz et al., 1987a; Carmona et al., 1987) y para el propio PLP así obtenido y en presencia de octilglucósido (Ayala et al., 1987; Carmona et al., 1988). Como se ha indicado, no hay prácticamente variación en la banda amida I entre $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y $60 \text{ }^\circ\text{C}$; no obstante, al calentar hasta $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y luego enfriar hasta $20 \text{ }^\circ\text{C}$, el espectro obtenido es ligeramente distinto al del crudo a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ sin calentar (Figura IV. 1.11). La variación consiste en un aumento de la componente β a expensas de una ligera disminución de estructura hélice α ; una variación similar obtuvieron Surewicz y colaboradores (Surewicz et al., 1987a) con el apoproteolípido de mielina, aunque esta variación fue continua y gradual en el intervalo de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Del conjunto de los resultados obtenidos para el PLP purificado por disolventes orgánicos se deduce que la transición térmica reversible detectada a $52 \text{ }^\circ\text{C}$ es de naturaleza lipídica aunque afectada por la presencia del PLP ; esta proteína, por su parte, parece experimentar una transición irreversible entre $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y $80 \text{ }^\circ\text{C}$, no detectable por CDB debido posiblemente a su poca entalpía.

* * * * *

Por todo lo anterior parece desprenderse que el PLP obtenido por disolventes orgánicos no da lugar a una transición térmica (desnaturalización) detectable por CDB. Esto llevó en un momento a plantear una vía alternativa de purificación con detergentes que afectara menos a la conformación nativa del PLP. Para ello se decidió comenzar primero por el estudio de la estabilidad térmica de la propia mielina frente a diversos agentes y condiciones, dada también la evidente importancia de esta membrana dentro del sistema nervioso central de organismos superiores.

Se ha encontrado así (Apartado IV. 2) que la mielina a pH 7,0 presenta por CDB a 1 K/min una transición calorimétrica irreversible a $80,3 \pm 0,2$ °C con una entalpía de $4,7 \pm 0,6$ J/g (Figura IV. 2.1), asignable fundamentalmente como veremos a desnaturalización de proteínas. Moscarello y colaboradores (Moscarello et al., 1983) encontraron, en un estudio previo de la mielina por CDB, tres transiciones, una a 72 °C análoga a la observada aquí, otra muy pequeña a 61-62 °C y una tercera a 33 °C. Nosotros hemos detectado también a veces una muy pequeña transición sobre los 55 °C (Apartado IV. 4), y que los citados autores atribuyen a lípidos. La transición a 33 °C también ha sido detectada en algún caso, pero según nuestros resultados de análisis térmico en gel (Apartado IV. 2.6) no existe ninguna transición proteínica en el entorno de esa temperatura, por lo que nos hemos centrado fundamentalmente en la transición de los 80 °C, que sí parece deberse a cambios en las proteínas. De hecho Moscarello y colaboradores (Moscarello et al., 1983) atribuyen la transición de 33 °C a un complejo lípido-PLP que no incluye la desnaturalización del proteolípido; habría que hacer notar que esta asignación la hacen por exclusión, al no encontrar otra transición que ellos puedan asignar al PLP. Estos autores asignan también la transición de alta temperatura a un complejo PBM-lípido (por razones que se comentarán

posteriormente), mientras que en base a nuestros resultados de análisis térmico en gel (Apartado IV. 2.6) y FT-IR (Apartado IV. 2.7) se propone que dicha transición es debida fundamentalmente a la desnaturalización del PLP; precisamente esta transición se ha utilizado como "observable conformacional" para seguir la purificación y posterior reconstitución del PLP (Apartados IV. 3 y IV. 4).

Como se indicó anteriormente, se ha investigado en primer lugar la influencia del almacenamiento de la mielina (en cámara fría a 4 °C, congelada a -20 °C o liofilizada) en su estabilidad térmica. Puesto que la disminución de la entalpía de desnaturalización de proteínas es indicativo de la inestabilidad del sistema (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987), se ha concluído, como se indica en Resultados IV. 2.2, que la forma más adecuada de almacenar la mielina es a 4 °C por periodos de tiempo inferiores a una semana; realmente todos los experimentos con mielina se han realizado con muestras que no tenían más de dos días en cámara fría. Conviene señalar aquí que tanto el tiempo de congelación, como la liofilización tienden a "transformar" la transición de 80 °C en otra análoga, menos entálpica, a 70 °C (Figuras IV. 2.4 y IV. 2.5).

Se ha estudiado también la influencia del pH y de la fuerza iónica en esta transición; mientras la fuerza iónica no parece afectar prácticamente a la misma en el intervalo de 0 a 0,5 M de KCl, sí existe un efecto notable del pH (Figura IV. 2.7). Así, a pH 3,0 la transición desaparece casi totalmente y no se recupera después de volver la mielina a pH 7,0; a pH 5,0 la entalpía disminuye mucho, mientras que a pH 9,0 la transición aparece a 70 °C con un aumento de entalpía; los parámetros característicos de la transición se recuperan al restablecer el pH 7,0 en las muestras de mielina expuestas a pH 5,0 ó pH 9,0. El efecto notable del pH es muy complejo de interpretar puesto que puede afectar a grupos ionizables tanto de las proteínas como de las cabezas polares de los lípidos, y es conocido el efecto que esto produce sobre la estabilidad térmica de las proteínas (Privalov, 1979) y sobre la

temperatura de transición de los lípidos (Stein et al., 1969). Este efecto del pH fue también investigado por Moscarello y colaboradores (Moscarello et al., 1983) obteniendo que a pH 3,2, 5,4 ó 10,4 la transición a 72 °C desaparecía. Nosotros no tenemos datos a pH 10,4, pero los resultados a pH 3,0 y 5,0 están en buen acuerdo con los nuestros, es decir, prácticamente la transición desaparece; hay que hacer notar que los autores citados trabajaron con un calorímetro menos sensible que el nuestro y con concentraciones de mielina de 50 mg/ml. Precisamente estos autores basan la asignación de la transición de 72 °C a un complejo PBM-lípido dado que al extraer la PBM en medio ácido dicha transición desaparecía (Moscarello et al., 1983); nosotros pensamos, sin embargo, que esta asignación no es correcta ya que, como se ha comprobado, a pH ácido la transición desaparece irreversiblemente, posiblemente por desnaturalización irreversible del PLP. Este tipo de explicación, basado en el efecto del pH ácido, sería también válido para justificar que otros autores (Ladbrooke et al., 1968) no detectan por CDB esta transición calorimétrica en la mielina, ya que en los métodos de aislamiento de la membrana no tienen en cuenta el tamponar el medio en que se encuentra la mielina (Norton y Cammer, 1984); en nuestro trabajo se ha comprobado que al resuspender en agua la mielina aislada se tiene un pH de 5,0, por lo que es de esperar que sea muy difícil detectar esa transición y, más aún, con CDB de baja sensibilidad. Por otra parte el hecho de que la transición descrita por Moscarello y colaboradores lo sea a 72 °C (Moscarello et al., 1983), inferior a 80 °C como aquí se obtiene, puede estar relacionado con el control cinético de dicha transición (Apartado IV. 2.5) y el que dichos autores utilicen una velocidad de barrido de 0,5 K/min., aparte de que las condiciones no son exactamente las mismas pues ellos utilizan tampón Hepes 2 mM (pH 7,4), con 10 mM de NaCl y 0,1 mM de EDTA; conviene también recordar que nosotros hemos obtenido esa transición sobre los 70 - 73 °C bajo una serie de distintas condiciones (Apartado IV.2). Como resumen de estos estudios preliminares se decidió trabajar con

mielina en tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), y almacenada en cámara fría por un periodo de tiempo no superior a dos días.

Debido a que en los métodos tradicionales se purifican el PLP y la PBM con disolventes orgánicos (Monreal, 1975; Aguilar et al., 1983; Helynck et al., 1983; Cheifetz y Moscarello, 1985), mientras que aquí se propone para este fin el uso de detergentes, se ha investigado también el efecto de ambos tipos de sistemas en la estabilidad térmica de la mielina. Se ha comprobado así que la mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v), utilizada normalmente en la purificación del PLP, provoca la desaparición de la transición calorimétrica descrita para la mielina, aún después de eliminar dichos disolventes (Apartado IV. 2.4.1); este hecho arroja serias dudas sobre la conformación del PLP purificado por este camino. Por su parte el efecto de los detergentes colato, Chaps y octilglucósido es semejante (Apartado IV. 2.4.2); su presencia afecta claramente a la transición de 80 °C, pero al eliminarse el detergente dicha transición se recupera, aunque a 70 °C y con menor entalpía; el efecto es más acusado en el caso del colato que en el de los otros dos detergentes (transición a 68 °C y entalpía cercana a 1 J/g, mientras que la eliminación de octilglucósido y Chaps conducen a una Td de 71 °C y Δh de unos 3 J/g) debido posiblemente al carácter iónico del colato. Precisamente, los métodos de purificación que aquí se proponen para PBM y PLP están basados en el uso del Chaps y del octilglucósido (Apartado IV. 3). De nuevo surge aquí el hecho conocido, y por causas muy distintas (congelación, liofilización, pH 9,0, (Moscarello et al., 1983)), de que la transición inicialmente centrada en 80 °C, aparece sobre los 70 °C; este desplazamiento de Td podría deberse a una reorganización de las proteínas en la mielina (considerese también el hombro a 70 °C que aparece en la mielina como transición independiente de la de 80 °C).

Se ha comprobado también que la transición característica de la mielina no solo es calorimétricamente irreversible, sino que corresponde a un proceso de no equilibrio cinéticamente controlado, con un efecto característico de la velocidad de barrido (Apartado IV. 2.5). La primera consecuencia de este control cinético es la no aplicabilidad de la Termodinámica de equilibrio para el análisis de esta transición, salvo el cálculo de su entalpía. Precisamente en este Departamento se han desarrollado recientemente métodos de análisis de estos procesos irreversibles en base a modelos cinéticos plausibles. Como se indica en el Apartado IV. 2.5, la transición de la mielina no se ajusta al modelo simple de dos estados, que se ha encontrado adecuado para otras proteínas (Sánchez-Ruiz et al., 1988a, Sánchez-Ruiz et al., 1988b, Guzmán et al., 1990, Conejero et al., en prensa), lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta la complejidad del sistema. Se ha comprobado también que este modelo cinético tampoco es adecuado para describir la transición térmica centrada a 80 °C, una vez eliminado el hombro que aparece sobre los 70 °C (Apartado IV. 2.5).

Por otra parte, los experimentos de análisis térmico en gel, una técnica que permite observar la desnaturalización térmica individual de diversas proteínas incluídas en una membrana (Rigell et al., 1985; Goins y Freire, 1988), (Apartado IV. 2.6), han servido para determinar qué proteínas de la mielina podían estar involucradas en la transición térmica detectada a 80 °C por CDB. Del análisis de los experimentos realizados con mielina a pH 7,0 mantenida en cámara fría durante pocos días, se desprende que tanto el PLP como la DM-20 presentan una solubilidad diferencial en función de la temperatura según la cual puede concluirse que la desnaturalización está en el intervalo de 80 °C-82 °C, mientras que para la Fracción Wolfgram este intervalo está entre 57 °C y 64 °C. La PBM no ha podido identificarse por esta técnica y, como ya se apuntaba en Resultados, esto sería debido al carácter parcialmente hidrofóbico de esta proteína semiextrínseca de membrana; una situación

parecida se da en las subunidades Va y Vb de la citocromo c oxidasa mitocondrial bovina (Rigell y Freire, 1987), o las subunidades IV y VI de la citocromo c oxidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Morin et al., 1990). Así pues la desnaturalización del PLP y la DM-20, fundamentalmente el primero por su alta proporción en la mielina, parece ser la responsable inmediata de la transición irreversible que ocurre a 80 °C, quedando abierta la posibilidad de que la PBM pueda también intervenir en esta transición, ya que su temperatura de desnaturalización no ha podido ser identificada por ATG. En cuanto a la Fracción Wolfgram podría estar relacionada con la transición descrita por Moscarello y colaboradores (Moscarello et al., 1983) y detectada en algún caso por nosotros a 55 °C-60 °C, aunque es improbable dada la baja concentración en la mielina, lo que la haría difícilmente detectable por CDB.

Una razón adicional que confirma la relación entre la desnaturalización del PLP y la transición térmica de la mielina se encuentra en los experimentos de ATG de mielina previamente tratada con octilglucósido. Así, de las varias circunstancias en que la transición de 80 °C se desplaza a 70 °C, se ha seleccionado la de la mielina que ha estado en presencia de octilglucósido. Una vez eliminado el detergente la Td obtenida por CDB para la mielina es de 71,3 °C, mientras que la obtenida por ATG para el PLP baja también a 74,3 °C. Esta diferencia no es significativa teniendo en cuenta el error experimental en ATG y el que la desnaturalización del PLP no siga el modelo cinético de dos estado usado para el cálculo de Tm en ATG; sí es significativo que en ambos casos la Tm disminuya casi 10 °C usando dos técnicas de tan distinta naturaleza.

Los estudios de FT-IR para la banda amida I de la mielina (Apartado IV. 2.7) muestran una estructura predominante de hélice α (1655,5 cm^{-1}) con una componente importante de estructura β (1630,2 cm^{-1}). De acuerdo con los modelos existentes para la

estructura secundaria del PLP (Laursen et al., 1984; Stoffel et al., 1984; Hudson et al., 1989) y de la PBM (Stoner, 1984; Martenson, 1986), proteínas mayoritarias de la mielina, al primero se debería especialmente la componente de hélice α y a la segunda la de estructura β . Estos resultados concuerdan bastante bien con lo ya publicado en la bibliografía (Ayala et al., 1987; Carmona et al., 1987). No existen, sin embargo, estudios previos sobre la influencia de la temperatura en los espectros de FT-IR de la mielina. Nosotros hemos obtenido que no existen cambios apreciables en la banda amida I de la mielina en el intervalo de 20 °C a 60 °C, mientras que al calentar hasta 90 °C y enfriar a 20 °C se observa un aumento irreversible de la componente característica de estructura β en detrimento de la componente de hélice α ; una situación similar se ha descrito en la bibliografía para la desnaturalización térmica de diferentes proteínas (Surewicz et al., 1987a; Arrondo et al., 1988; Muga et al., 1988; Prado et al., 1990; Rial et al., 1990). Este resultado corrobora el que la transición a 80 °C obtenida por CDB se debe a la desnaturalización de una o varias de las proteínas presentes en la mielina.

Al estudiar por FT-IR la zona de 2800-3000 cm^{-1} característica de lípidos (Figura IV. 2.25), se observa que el desplazamiento del máximo de la vibración asimétrica del enlace C-H es menor que en los lípidos extraídos del PLP purificado por disolventes orgánicos (Apartado IV. 1.3). Esto indicaría que los lípidos en la mielina están más desordenados que los presentes con el PLP purificado por aquellos disolventes, posiblemente debido a la presencia de colesterol en la mielina. Resultados similares se han obtenido por FT-IR y Raman (Carmona et al., 1987) para estos sistemas. Al aumentar la temperatura los máximos de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-H se desplazan hacia mayores números de onda con un crecimiento casi continuo entre 20 °C y 70 °C (Figuras IV. 2.25 y IV. 2.26) centrado en 46 °C según el ajuste a un modelo de dos estados; este cambio es reversible al enfriar de nuevo la muestra. Esta transición es mucho menos abrupta que para los lípidos

citados del PLP y de hecho no se observa evidencia de la misma en CDB. No se observa tampoco ningún cambio espectral en el entorno de 80 °C, por lo que no es de esperar una contribución entálpica debida a cambio de fase en lípidos para la transición obtenida por CDB en la mielina, lo que está de acuerdo con la naturaleza proteínica propuesta para dicha transición calorimétrica.

* * * * *

Como se indica en el Apartado IV. 1 y previamente en esta Discusión, los resultados obtenidos con el PLP purificado por disolventes orgánicos nos decidieron a intentar nuevos métodos de purificación de esta proteína, así como de la PBM, cuya purificación se realiza también usualmente por disolventes orgánicos y disoluciones muy ácidas (Oshiro y Eylar, 1970; Deibler y Martenson, 1973; Chou et al., 1976; Cheifetz y Moscarello, 1985), por métodos no tan agresivos como parecen ser la utilización de detergentes (Helenius y Simons, 1975; Tanford y Reynolds, 1976; Scopes, 1982). A su vez el estudio previo realizado con la membrana mielínica permitió escoger las siguientes condiciones de trabajo: tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) y almacenamiento de la membrana en cámara fría a 4 °C por tiempos no superiores a dos días.

Como paso previo a la purificación de las proteínas mayoritarias de la mielina, mediante la utilización de detergentes, se ha procedido a realizar un estudio de la solubilización de esta membrana por diversos detergentes (Figura IV. 3.2). De este estudio se obtiene que, de los detergentes utilizados en este trabajo, el desoxicolato sódico es el que mayor poder solubilizante presenta para las proteínas de mielina, hecho también descrito en la bibliografía para otros sistemas de membrana (Moller et al., 1986; Jones et al., 1987). El

resto de los detergentes utilizados presenta un comportamiento bastante similar en cuanto a su poder solubilizante de las proteínas de mielina, siguiendo un orden de mayor a menor: octilglucósido > Triton X-100 > colato sódico \approx Chaps. Estos cinco detergentes solubilizan con igual eficacia a todas las proteínas mayoritarias de la mielina, excepto en el caso del colato sódico y del Chaps (Figura IV. 3.3). Estos dos últimos detergentes presentan una solubilización preferente por la PBM, mientras que el resto de proteínas, especialmente el PLP, no se solubilizan prácticamente nada en las condiciones utilizadas en este trabajo. Este hecho explica el que estos dos detergentes presenten el menor tanto por ciento de proteína total solubilizada, si tenemos en cuenta que el PLP constituye más del 50% de la proteína total de la mielina. Esta característica de selectividad en la solubilización supone una gran ventaja a la hora de purificar la PBM, ya que la solubilización en sí misma se convierte en un paso inicial de purificación, consiguiéndose de este modo un proceso de purificación más sencillo y eficaz. A excepción del bromuro de cetil-trimetilamónico (Riccio et al., 1986), no se han descrito más casos en la bibliografía de selectividad por la PBM en la solubilización de la membrana mielínica.

Una vez realizado el estudio de solubilización se han escogido las condiciones óptimas de solubilización para cada detergente y se ha procedido a la purificación del PLP y de la PBM.

El PLP se ha purificado utilizando tres detergentes diferentes: desoxicolato sódico, Triton X-100 y octilglucósido. En la purificación con desoxicolato sódico se ha seguido el método descrito por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984) aunque con ligeras modificaciones, como se indica en el Apartado IV. 3.2.1. La purificación obtenida con este detergente no es tan buena como la descrita por estos autores, ya que no se ha conseguido una separación en cantidades suficientes del PLP y de la PBM. Este menor rendimiento puede deberse a las modificaciones introducidas en el procedimiento de purificación: cambio

de la naturaleza del tampón de disolución, ligera variación en el pH del mismo,... Tampoco se ha querido profundizar más en la purificación con este detergente para comprobar estas diferencias, ya que el desoxicolato sódico presenta un mayor poder desnaturizante que los otros detergentes utilizados en esta Memoria (Jones et al., 1987); además se han obtenido buenos resultados de purificación con el Triton X-100 y el octilglucósido, como se explica a continuación.

La purificación del PLP con Triton X-100 se ha basado en modificaciones realizadas sobre un método previo descrito en la bibliografía (Smith et al., 1984). Los resultados obtenidos en esta Memoria dan una pureza del PLP similar o incluso mejor (más del 95%, por densitometría de los geles electroforéticos) que la obtenida por Smith y colaboradores (Smith et al., 1984). El procedimiento propuesto aquí supone además un ahorro de tiempo y evita la concentración del solubilizado de mielina, ya que durante su purificación la proteína se queda retenida en la columna de intercambio iónico (Apartado IV. 3.2.2); esto elimina pasos en los que se produce una concentración excesiva del Triton X-100 (de 20 a 30 veces superior a la nuestra), que puede ser perjudicial para la estabilidad de la proteína y supone también una mayor dificultad a la hora de eliminar el detergente para la posterior reconstitución del PLP.

También se ha logrado una purificación satisfactoria del PLP por octilglucósido, detergente no utilizado hasta la fecha para la purificación de proteínas de mielina. En este caso se ha obtenido una pureza del PLP que puede llegar hasta el 80% con una elevada presencia de DM-20. La dificultad de separar estas dos proteínas aparece en la bibliografía (Smith et al., 1984), debido a que estas proteínas tienen gran similitud tanto en su secuencia y composición aminoacídica como en sus propiedades químico físicas e inmunológicas (Trifilieff et al., 1986; Nave et al., 1987); incluso en los experimentos de ATG desarrollados en esta Memoria se observa que ambas proteínas desnaturizan en el mismo intervalo de

temperatura (Figura IV. 2.19). No deja de ser llamativa la proporción de DM-20 en este PLP purificado (un 20% aproximadamente) cuando en la bibliografía la presencia de DM-20 se considera minoritaria en la mielina. De todas formas nuestros propios análisis de la mielina arrojan una proporción similar entre DM-20 y PLP (8-9% frente a 41-42% respectivamente) como ya se indicaba en la página 268 de la Discusión. De hecho, todos los comentarios y posibilidades con las que se especulaba en dicho punto serían válidos aquí. En último extremo, la relación entre el contenido de ambas proteínas sería análoga, según nuestros resultados, en la mielina y en el PLP purificado con octilglucósido, posiblemente por la dificultad ya apuntada de su separación; esta relación mejora sensiblemente la proporción de PLP frente a DM-20 de este PLP purificado frente a la composición del crudo del PLP obtenido aquí por disolventes orgánicos.

A nuestro entender, este método de purificación, desarrollado en esta Memoria, es el óptimo para estudios posteriores del PLP por varias razones:

- El octilglucósido es un detergente con propiedades poco desnaturalizantes y muy fácilmente dializable para poder reconstituir la proteína purificada (Jones et al., 1987).

- En esta purificación no se tiene que concentrar la muestra con lo que se evita una concentración excesiva del detergente presente, lo que pudiera suponer unas condiciones nocivas para la estabilidad de la proteína; en ninguna etapa del proceso de purificación se ha sobrepasado el 2% (p/v) de octilglucósido.

La PBM se ha purificado utilizando dos detergentes no empleados hasta la fecha en su purificación, colato sódico y Chaps. Con ambos detergentes se ha podido realizar una purificación sencilla y rápida gracias a la solubilidad preferencial en ambos detergentes de la PBM con respecto al PLP, hecho descubierto en la realización de este trabajo y no descrito en la bibliografía a excepción del caso del bromuro de cetil-trimetilamonio (Riccio et al.,

1986). De los dos métodos desarrollados en esta Memoria el más adecuado es el desarrollado para el Chaps. Con colato sódico se obtienen una serie de agregados proteicos difíciles de determinar, y que pudieran ser dímeros de PBM, lo cual no es conveniente para obtener un buen protocolo de purificación (Apartado IV. 3.3.1). Con el Chaps se ha obtenido la PBM purificada en cantidades suficientes para estudios posteriores y con una pureza de al menos el 90%, tan buena o mejor que la obtenida en la bibliografía con disolventes orgánicos (Deibler y Martenson, 1973; Cheifetz y Moscarello, 1985) o con otros detergentes (Riccio et al., 1985; Riccio et al., 1986). Además la purificación de estos últimos autores es más larga y laboriosa, mientras que la desarrollada en esta Memoria sólo requiere de una cromatografía de afinidad y en ningún momento de la purificación la concentración de detergente en presencia de proteína sobrepasa el 3% (p/v). Resultados similares para la purificación de PBM con Chaps los obtiene Ruiz Cabello (Ruiz-Cabello, 1990; Ruiz-Cabello et al., enviado) utilizando una columna de intercambio iónico (ver Apartado IV. 3.3.2).

En la Figura V. 1 se presenta una electroforesis de los resultados obtenidos con los métodos de purificación de PLP y PBM más convenientes empleados en esta Memoria, que incluye también los desarrollados en la bibliografía mediante utilización de disolventes orgánicos. Así, las calles 2 y 3 representan el PLP purificado por octilglucósido y por disolventes orgánicos (Monreal, 1975) respectivamente. Se observa que la pureza en ambos es similar, siendo la utilización de detergente en contraposición a la de disolventes orgánicos menos nociva para el mantenimiento de la estructura nativa de la proteína. Para el caso de la PBM (calles 4 y 5) la pureza es mayor utilizando el Chaps que mediante el uso de disolventes orgánicos (Deibler y Martenson, 1973), posiblemente gracias a la solubilización selectiva que presenta este detergente por la PBM.

* * * * *

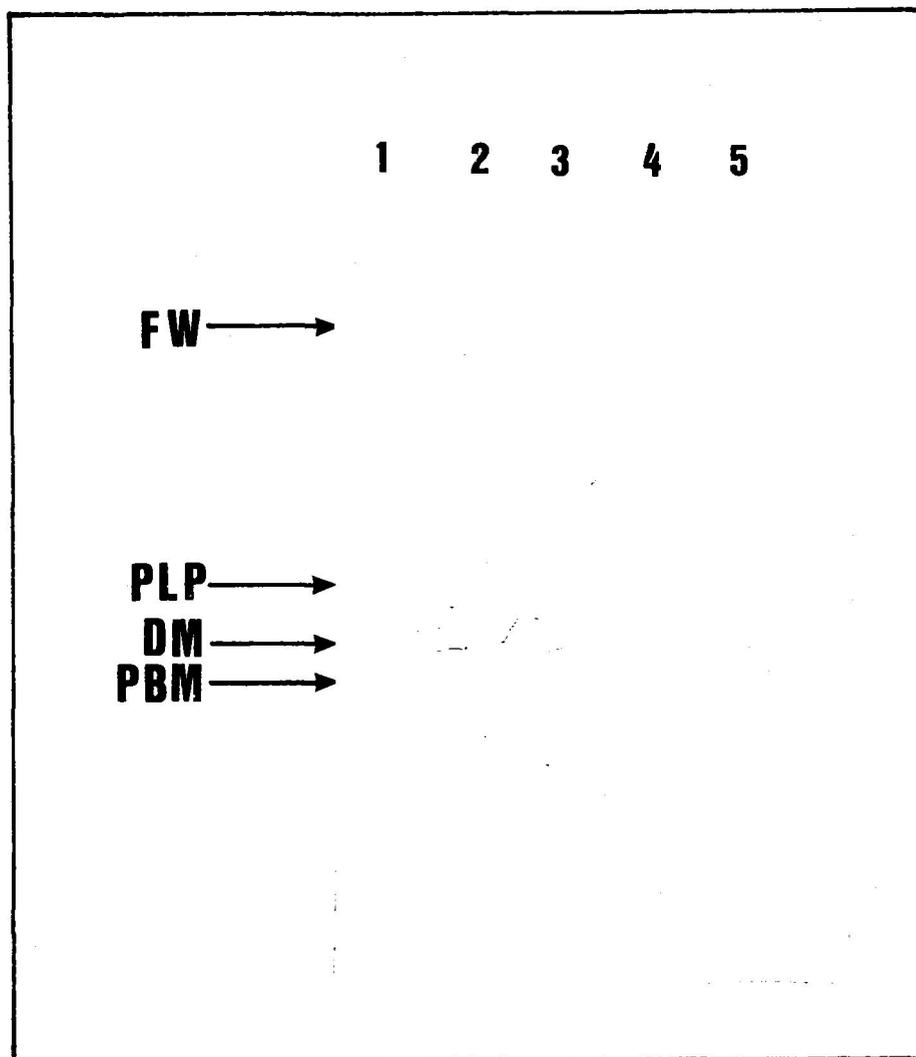


FIGURA V. 1: Electroforesis en gel PA-SDS al 12,5% de 1, mielina, 2, PLP purificado con octilglucósido en esta Memoria (Apartado IV. 3.2.3), 3, PLP purificado por disolventes orgánicos (Monreal et al., 1975), 4, PBM purificada con Chaps en esta Memoria (Apartado IV. 3.3.2), 5, PBM purificada por disolventes orgánicos (Deibler y Martenson, 1973).

Una vez que se han purificado las proteínas mayoritarias de la membrana miélnica, PLP y PBM, el paso final sería su reconstitución en los lípidos de la membrana para su estudio individual. Este estudio tiene sentido e interés cuando la proteína reconstituida adopta su conformación nativa, lo cual es muy fácil de comprobar, por ejemplo, en el caso de enzimas midiendo su actividad catalítica. La dificultad en nuestro caso estriba en que no existe una función conocida para la PBM o el PLP, aunque para éste se ha propuesto recientemente una posible actividad transportadora de iones (Lin y Lees, 1982; Cózar, 1986). Sin embargo, ya se indicado a lo largo de esta Memoria que la transición a 80 °C de la mielina nativa (o a 70 °C en la mielina bajo diversas y distintas condiciones, como puede ser la incubación con detergentes y su posterior eliminación), atribuible fundamentalmente a la desnaturalización del PLP, podría utilizarse como observable adecuado para la conformación nativa del PLP. No se dispone, sin embargo, de una información análoga para la PBM. Por esta razón se ha intentado únicamente la reconstitución del PLP, ya que una señal endotérmica irreversible a 80 °C ó 70 °C podría utilizarse como evidencia de que adopta la conformación nativa. No obstante, puede añadirse que se han realizado aquí experimentos iniciales de CDB con PBM, tanto en tampón fosfato como reconstituida en lípidos de mielina, no habiéndose encontrado efecto térmico alguno. Si bien este resultado sería de esperar para la PBM en medio acuoso (por eliminación del Chaps mediante diálisis sin adición de lípidos), ya que en este medio se propone una estructura prácticamente al azar para esta proteína (Surewicz et al., 1987b; Gow y Smith, 1989), no lo es tanto para la PBM reconstituida en lípidos, ya que en este medio se supone que ésta presenta una estructura secundaria ordenada (Surewicz et al., 1987b).

La reconstitución del PLP se ha intentado usando el purificado tanto por Triton X-100 como por octilglucósido. Con el PLP purificado por Triton X-100 se ha abordado la

reconstitución por tres caminos: gradiente de sacarosa y dos resinas adsorbentes de detergentes (*Bio-Beads SM-2* y *Extracti-Gel D*) (Apartado IV. 4.2), siendo el rendimiento muy bajo en los tres casos. Los experimentos de CDB realizados con este PLP reconstituido han dado lugar a una única transición endotérmica irreversible sobre los 50 °C-55 °C (Figura IV. 4.2). Los lípidos extraídos de este reconstituido dan también una transición sobre esa temperatura, aunque reversible (Figura IV. 4.3). Por esta razón puede, en principio, atribuirse esta transición a lípidos, aunque el PLP presente debe estar jugando un papel que justifique el inesperado carácter irreversible de una transición atribuida a lípidos.

Por otra parte, uno habría esperado encontrar una transición sobre los 70 °C que pudiera asignarse a la desnaturalización de la estructura nativa del PLP. De todas formas es posible proponer causas razonables que justifiquen esta ausencia, como ya se comentó más ampliamente en Resultados IV. 4.2. Brevemente esto podría atribuirse a la posible desnaturalización del PLP provocada por la presencia de altas concentraciones de detergente durante la reconstitución, la presencia de Triton X-100 (siempre difícil de eliminar) en el reconstituido final. Resulta claro, en cualquier caso, que no se encuentra evidencia del observable calorimétrico de la conformación nativa del PLP en el reconstituido a partir del PLP purificado por Triton X-100.

Como se explica en Resultados IV. 4.3, previamente a la reconstitución del PLP purificado con octilglucósido, se realizó la "reconstitución" de la propia mielina solubilizada con octilglucósido con el fin de observar las posibles modificaciones que este proceso originaba en su comportamiento frente a la temperatura. Así, este "reconstituido" de mielina proporcionó por CDB dos transiciones irreversibles, una a 51 °C y otra a 70 °C. Los lípidos extraídos de este "reconstituido" de mielina dieron lugar a una única transición análoga a la de 51 °C, de forma similar a como ocurría con el PLP purificado con Triton

X-100. Por otra parte la transición a 70 °C posee una entalpía de 1,9 J/g de PLP. Es decir, en este caso sí se obtiene una pequeña transición sobre los 70 °C, análoga a la que se obtiene con la mielina que ha estado simplemente en presencia de detergente pero sin reconstituir (Apartado IV. 2.4.2), o con la mielina congelada (Apartado IV. 2.2.2), liofilizada (Apartado IV. 2.2.3), o a pH 9,0 (Apartado IV. 2.3). En principio podría pensarse que se obtiene evidencia de la transición asignada en general a desnaturalización de proteína y en particular a la del PLP. Esto se ha comprobado por estudios de FT-IR de este "reconstituido". Así la zona de la banda amida I muestra a 20 °C componentes de hélice α , estructura β y giros β , análogos a los de la mielina (Figura IV. 2.23); éstos no se modifican apreciablemente en el intervalo de 30 °C - 60 °C. Sin embargo al calentar hasta 80 °C y enfriar a 20 °C se observa un aumento del componente de estructura β y una disminución del de hélice α , hecho similar al observado para la desnaturalización de diversas proteínas de membrana (Surewicz et al., 1987a; Prado et al., 1990; Rial et al., 1990). Así pues, la transición irreversible a 70 °C observada por CDB parece corresponder aquí también a desnaturalización de proteína. Resultados análogos han sido obtenidos por Surewicz y colaboradores (Surewicz et al., 1987a). La zona de los 2800 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} muestra a su vez un cambio casi contínuo en el orden de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos entre 30 °C y 80 °C, centrado en 53 °C (Apartado IV. 4.3) y debido a un desplazamiento muy pequeño en el número de onda del máximo (2852,5 cm^{-1} a 30 °C y 2853,6 cm^{-1} a 80 °C). Aunque esto ocurre precisamente a la temperatura en que aparece la transición por CDB (51 °C), no resulta evidente la correlación dado el carácter reversible (se recuperan los valores de los máximos al enfriar la muestra) del cambio observado por FT-IR y la baja cooperatividad de dicho cambio, pues ésta es prácticamente gradual en el intervalo de 30 °C a 80 °C.

Los resultados obtenidos por CDB y FT-IR del PLP reconstituido, tras su purificación

con octilglucósido, son semejantes a los comentados para la mielina "reconstituida". Así, aparecen de nuevo por CDB las dos transiciones irreversibles a 51 °C y 70 °C; la primera se obtiene también, y de forma reversible, en los lípidos extraídos de este PLP reconstituido, mientras que la segunda presenta una entalpía de 2 J/g y es similar a la de 70 °C obtenida con el "reconstituido" de mielina. Los resultados de FT-IR a 30 °C en la zona de la banda amida I muestran ahora una componente de hélice α (1656,5 cm^{-1}) más pronunciada que en la mielina tanto nativa como "reconstituida", con una componente menor de estructura β (1630,5 cm^{-1}); esto parece lógico, pues el PLP es ahora prácticamente la única proteína presente y se supone que su estructura nativa es fundamentalmente hélice α (Laursen et al., 1984; Stoffel et al., 1984; Surewicz et al., 1987a; Hudson et al., 1989), mientras que la gran proporción de estructura β de la PBM (Stoner, 1984; Martenson, 1986; Surewicz et al., 1987b) explicaría que la componente de dicha estructura en el espectro de FT-IR esté más pronunciada en la mielina que en el PLP purificado y reconstituido. El efecto de la temperatura es también análogo al encontrado para la mielina "reconstituida": el espectro en la banda amida I no se altera prácticamente entre 30 °C y 60 °C, mientras que entre 60 °C y 80 °C se produce un aumento irreversible, en este caso considerable, de la componente correspondiente a estructura β con disminución de la correspondiente a hélice α . Este resultado está de acuerdo con lo obtenido por Surewicz y colaboradores (Surewicz et al., 1987a) con el apoproteolípido de mielina. Un aumento similar se ha encontrado para la desnaturalización de diversas proteínas de membrana (Prado et al., 1990; Rial et al., 1990), por lo que puede concluirse que el PLP reconstituido se desnaturaliza irreversiblemente entre 60 °C y 80 °C, lo que se corresponde con la transición irreversible de CDB a 70 °C.

En la zona de 2800 cm^{-1} -3000 cm^{-1} los números de onda de los máximos aumentan reversiblemente con la temperatura en el mismo intervalo de 30 °C a 80 °C; así, la vibración asimétrica de la tensión del enlace C-H de las cadenas hidrocarbonadas pasa de 2851,7 cm^{-1}

(30 °C) a 2853,4 cm⁻¹ (80 °C). Este desplazamiento, que es gradual y se encuentra centrado a 52 °C, no corresponde exactamente a un paso de gel a cristal líquido, como sí ocurría con la muestra de PLP purificado con disolventes orgánicos (Figura IV. 1.13), dado que el valor de los máximos a baja temperatura es superior al que sería de esperar para el estado gel. Esta situación es análoga a la ya vista para la mielina nativa y la "reconstituida", y puede deberse a la presencia de colesterol en los lípidos de la mielina. De nuevo, al igual que ocurre con el PLP purificado con Triton X-100 o con la mielina "reconstituida", parece haber una relación entre este cambio espectroscópico en los lípidos, centrado en 52 °C-53 °C con la transición térmica encontrada por CDB sobre los 51 °C, a pesar de que aquélla parece ser reversible y ésta última irreversible.

* * * * *

Algunos aspectos dentro del contenido de la presente Memoria (que, brevemente, incluye el estudio sobre el crudo de PLP, estabilidad térmica de la mielina y el intento de purificación de sus proteínas mayoritarias por detergentes y su posterior reconstitución) admiten algunos comentarios generales.

1 - Comencemos, por ejemplo, con el último punto tratado: los resultados de FT-IR referentes a la zona entre 2800 cm⁻¹ y 3000 cm⁻¹ para la mielina nativa y "reconstituida", crudo de PLP y PLP reconstituido. El diferente comportamiento de estos cuatro sistemas se visualiza en la Figura V. 2, donde se representa el valor del número de onda de los máximos para la tensión anteriormente citada en función de la temperatura. Como se observa en la figura, solo para el crudo de PLP esta transición puede entenderse como paso de estado gel a cristal líquido, mientras que los otros tres sistemas presentan valores superiores del número

de onda del máximo a baja temperatura e inferiores a alta temperatura, efecto típico debido a la presencia de varias sustancias como el colesterol. Esto está de acuerdo con el hecho de que la transición por CDB del PLP purificado por disolventes orgánicos sea mucho mayor (más entálpica) que la obtenida para la mielina o el PLP reconstituidos, o por sus lípidos una vez extraídos. El comportamiento de los lípidos presenta en conjunto dos claras cuestiones abiertas:

- ¿Por qué si los lípidos extraídos de la mielina no dan transición calorimétrica, sí aparece una transición atribuible a lípidos en CDB para la mielina y el PLP reconstituidos con dichos lípidos?

- ¿Por qué esta transición es reversible en los lípidos extraídos de ambos sistemas reconstituidos, siendo irreversible en dichos sistemas?

Respecto a la primera pregunta es posible que durante el período de diálisis de la reconstitución se pudiera perder algún componente lipídico que esté impidiendo la transición, siendo el colesterol un posible candidato. Esta explicación estaría de acuerdo con experimentos de CDB realizados, tanto con lípidos de mielina como con la mielina misma, sometidos a una diálisis análoga a la del proceso de reconstitución. Se ha observado que, para ambos sistemas, conforme avanza el tiempo y los cambios de baño en la diálisis, va apareciendo una transición centrada en los 51 °C. Conviene recordar aquí que Moscarello y colaboradores (Moscarello et al., 1983) encontraron una pequeña transición alrededor de 61 °C - 62 °C en la mielina nativa, transición que en algún caso hemos encontrado también nosotros con la mielina (aunque a menor temperatura), como se indica anteriormente.

En cuanto a la segunda pregunta una posibilidad sería que la irreversibilidad de la transición a 51 °C se debiera al efecto de la transición posterior a 70 °C, atribuida fundamentalmente a desnaturalización de proteína y, en particular, del PLP. Sin embargo,

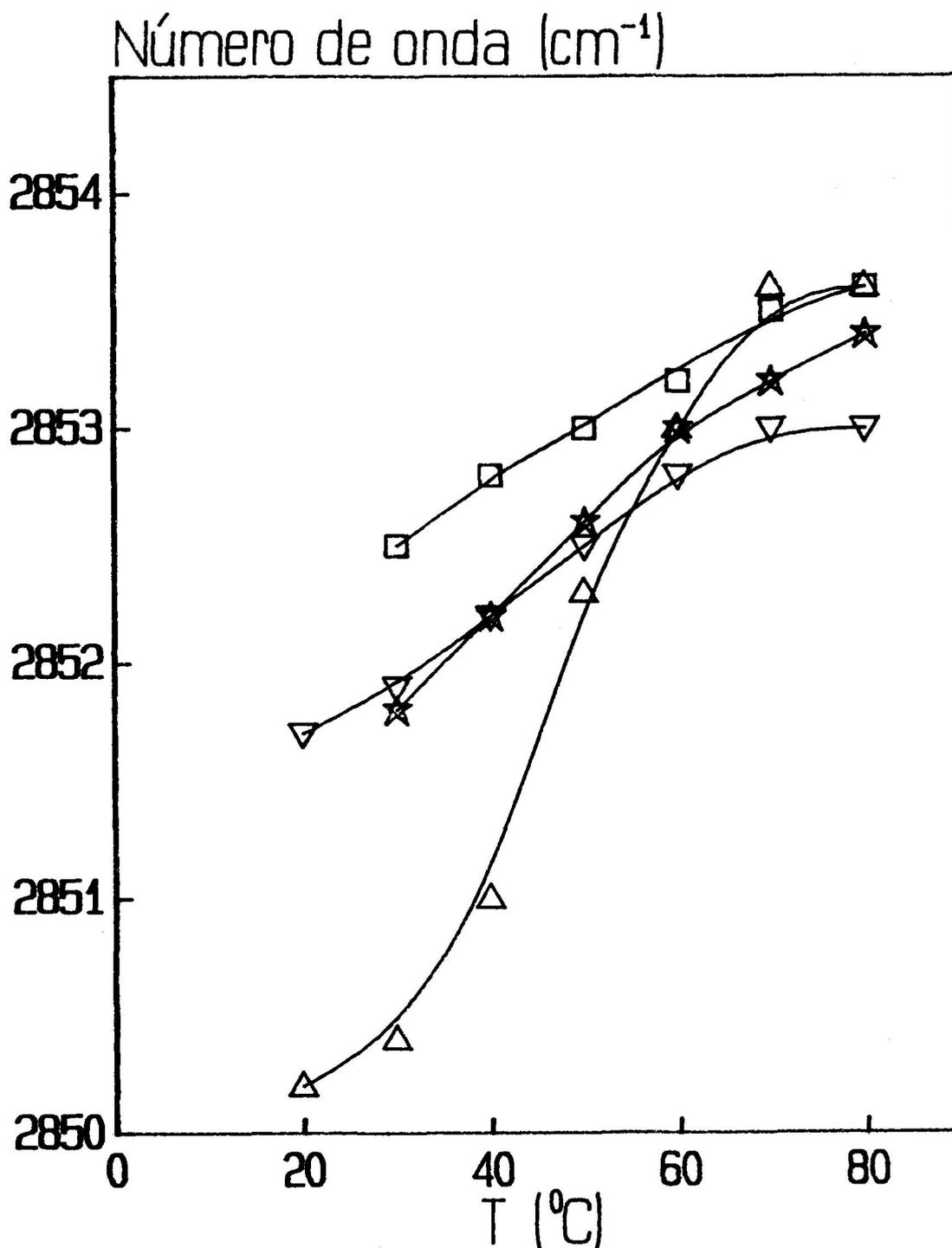


FIGURA V. 2: Representación del número de onda del máximo de la vibración asimétrica del enlace C-H de las cadenas hidrocarbonadas del componente lipídico de (Δ) PLP purificado por disolventes orgánicos (crudo de PLP), (∇) mielina nativa, (\square) mielina "reconstituida", (\star) PLP purificado con octilglucósido y posteriormente reconstituido. Las líneas continuas corresponden a ajustes no lineales por mínimos cuadrados siguiendo un modelo reversible de dos estados.

al realizar barridos de la mielina "reconstituida" por CDB hasta 60 °C, enfriar y repetir el barrido, dicha transición no apareció, mostrándose también como irreversible. Debido a que una transición muy similar aparece también en los lípidos extraídos de ambos reconstituidos y a los resultados de FT-IR, esta transición se correlaciona con un proceso de lípidos en el que también puede intervenir el PLP. Uno podría usar aquí el eufemismo frecuente en la bibliografía de que la transición se debe a un "complejo lípido-proteína" (pues es lógico pensar que en este caso efectivamente ambos componentes intervienen en la transición), para indicar que uno no sabe exactamente cual es el proceso físico concreto responsable de dicha transición.

2 - Ya se ha indicado el papel de observable de conformación nativa del PLP dado a la transición de CDB detectada a 80 °C ó 70 °C (sobre el por qué de estas temperaturas volveremos posteriormente), interpretado en base a los experimentos de ATG y FT-IR. Precisamente, aún siendo un poco reiterativos, convendría comentar en su conjunto los datos de FT-IR para la zona de la banda amida I del PLP y la mielina reconstituidos, la mielina nativa y el PLP purificado por disolventes orgánicos (crudo). Así en la Figura V. 3 se observa la gran componente de hélice α y la pequeña de estructura β para el PLP reconstituido, en comparación con las otras muestras. Esto es lógico en relación con la mielina nativa y "reconstituida", dado el alto contenido en hélice α atribuido al PLP (Laursen et al., 1984; Stoffel et al., 1984; Surewicz et al., 1987a; Hudson et al., 1989) y de estructura β atribuida a la PBM en medio lipídico (Stoner, 1984; Martenson, 1986; Surewicz et al., 1987b). En el crudo la situación no es tan clara al no poseer prácticamente PBM, siendo su contenido en proteína PLP y algo de DM-20 (Figura V. 1).

De acuerdo ahora con las Figuras V. 3 y V. 4, al calentar se observa un ensanchamiento importante en la banda amida I excepto en el caso del crudo. La explicación

para las otras tres muestras es que hay proteínas que se desnaturalizan al llegar a 80 °C (90 °C para la mielina nativa), produciéndose el ensanchamiento de la banda y observándose una disminución de la componente hélice α (1656 cm^{-1}) y un aumento aparente de la estructura β (1630 cm^{-1}). Este aumento del máximo a 1630 cm^{-1} se atribuye a desnaturalización de la proteína ya que en la bibliografía se describe un hecho similar para la desnaturalización térmica de otras proteínas en medios deuterados, donde se observa un aumento de intensidad sobre 1620 cm^{-1} (Arrondo et al., 1988; Muga et al., 1988; Prado et al., 1990; Rial et al., 1990), que se atribuye a la interacción de cadenas polipeptídicas desplegadas con las cadenas laterales de aminoácidos y que denominan como estructura de borde β (Arrondo et al., 1988; Prado et al., 1990). La diferencia entre el número de onda descrito en la bibliografía (1620 cm^{-1}) y el obtenido en esta Memoria (1630 cm^{-1}) se podría atribuir al desplazamiento de bandas producido por el intercambio de deuterio por hidrógeno; precisamente se han obtenido máximos cercanos a 1630 cm^{-1} en la desnaturalización térmica de algunas proteínas en medios con H_2O (comunicación personal del Dr. J.L.R. Arrondo). Se observa que este cambio ocurre además por encima de los 60 °C, y recordando las transiciones de CDB (y experimentos de ATG) se puede concluir que ésta se debe a desnaturalización de proteína, fundamentalmente PLP.

Este cambio de la banda amida I con la temperatura no es tan apreciable en el caso del crudo, lo cual se debe a la gran componente de estructura β (y pequeña componente de hélice α) que presenta a 20 °C, como se comenta más arriba. Si se tiene en cuenta además la ausencia de transición por CDB del crudo por encima de 60 °C, es muy probable que el PLP obtenido por disolventes orgánicos se encuentre ya, al menos en gran parte, desnaturalizado.

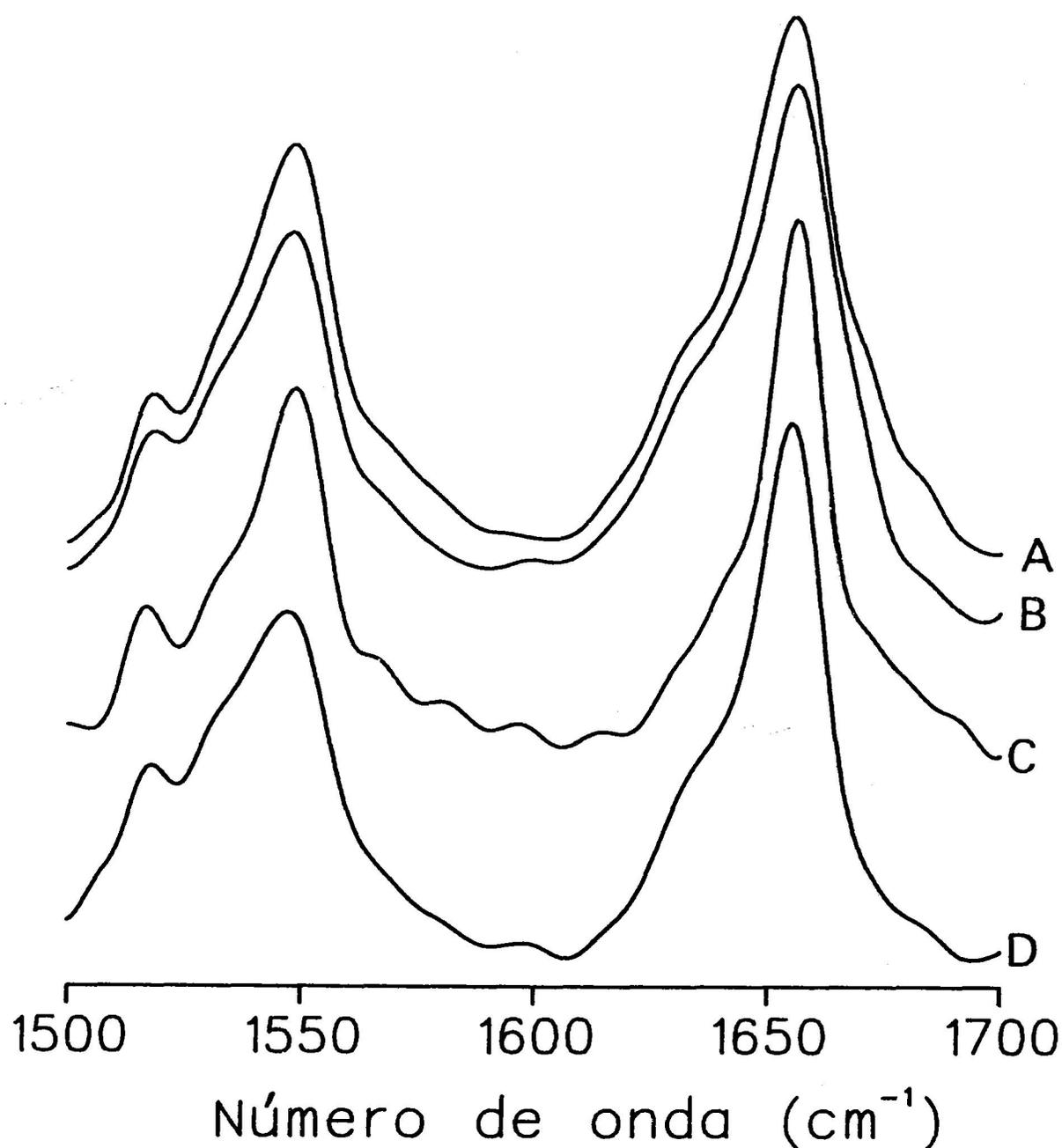


FIGURA V. 3: Autodeconvolución de Fourier de los espectros de FT-IR en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 30 °C de (A) mielina nativa, (B) mielina "reconstituida", (C) PLP purificado con octilglucósido y reconstituido y (D) PLP purificado por disolventes orgánicos (crudo de PLP).

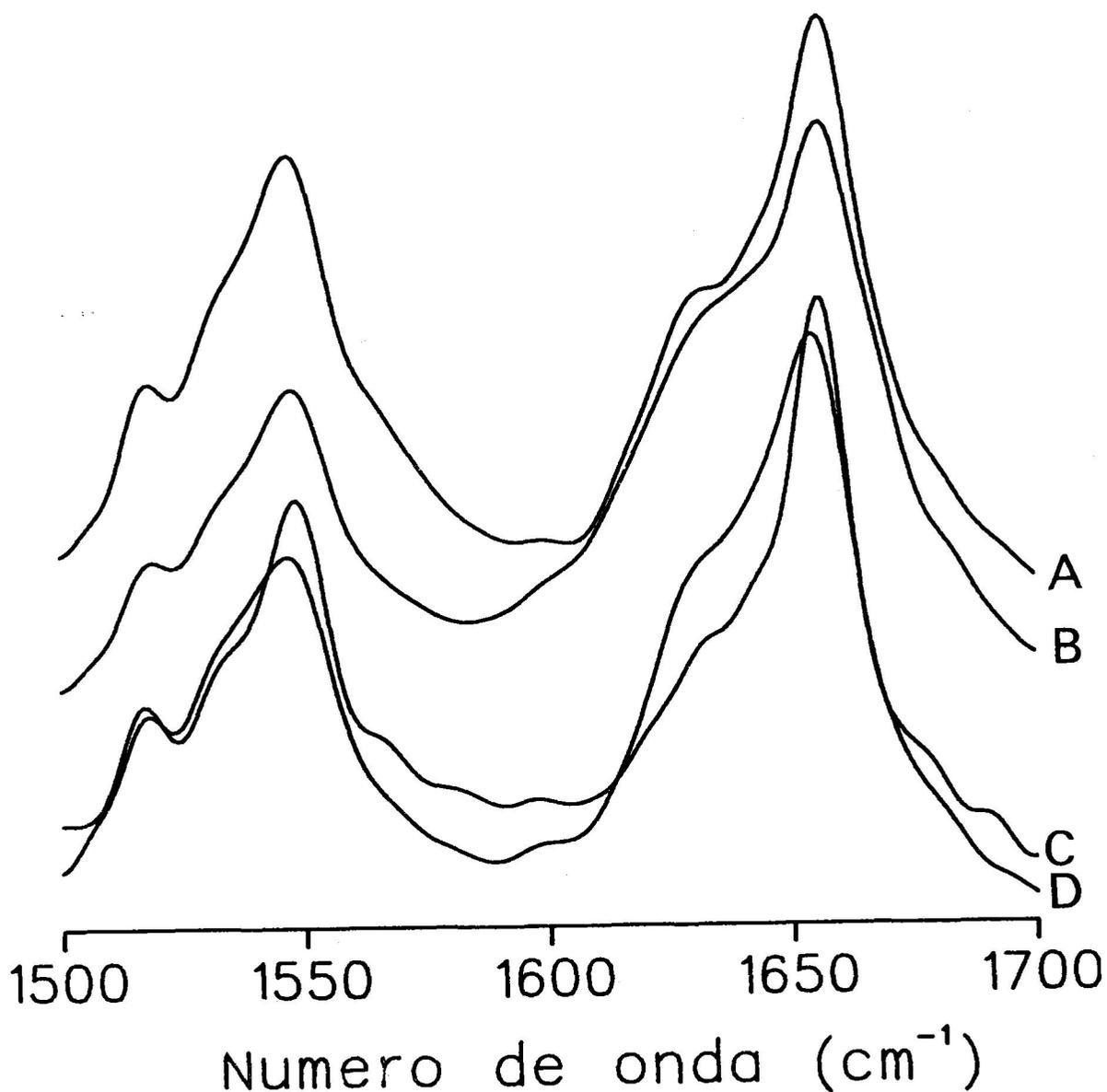


FIGURA V.4: Autodeconvolución de Fourier de los espectros de FT-IR en tampón 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0) a 30 °C después de haber calentado la muestra hasta 80 °C (90 °C para la mielina nativa) de (A) mielina nativa, (B) mielina "reconstituida", (C) PLP purificado con octilglucósido y reconstituido y (D) PLP purificado por disolventes orgánicos (crudo de PLP).

3 - Un punto final a comentar es el hecho de que la transición de proteína por CDB aparezca a 80 °C en la mielina nativa y a 70 °C para la mielina liofilizada, congelada durante largo tiempo, tratada con detergentes, o para el reconstituido de PLP o de la propia mielina. Recuérdese también, a este respecto, que Moscarello y colaboradores (Moscarello et al., 1983) encuentran una transición irreversible en la mielina a 72 °C y no a 80 °C.

Puesto que la entalpía de la transición a 80 °C es aproximadamente 4,5 J/g y la de 70 °C está, según los casos, sobre 2 J/g - 3 J/g, se podría pensar en un efecto debido al ΔC_p de desnaturalización de 0,15 a 0,25 J/K g (o aproximadamente de 0,04 a 0,06 cal/K g), valor ligeramente inferior a los ya conocidos para proteínas globulares hidrosolubles (0,08 a 0,16 cal/K·g) (Privalov, 1979). Aunque, poco se sabe de este ΔC_p para proteínas de membrana es lógico pensar que sea menor que el de las globulares, siempre que la proteína desnaturalizada permanezca embebida en la bicapa (Sánchez-Ruiz y Mateo, 1987). Sin embargo, puesto que los experimentos de CDB con la mielina (ya sea cuando su T_d es 70 °C u 80 °C) están realizados a las mismas condiciones de pH y fuerza iónica, no parece ésta una explicación plausible, ya que la T_d depende aparentemente de las manipulaciones de la muestra.

Una explicación posible sería que la proteína o más concretamente el PLP, pueda presentar dos conformaciones más o menos definidas con diferente estabilidad térmica, según la "historia" de la muestra. Esto justificaría así el hombro centrado a 70 °C, como transición irreversible independiente que acompaña a la de 80 °C en la mielina nativa, cuyo tamaño relativo dependería un poco de una muestra a otra, y que indicaría la existencia de dos "poblaciones" para el PLP con diferente conformación.

En cualquier caso, el uso de la transición como debida a proteína y como "observable conformacional" adecuado viene justificado no solo por los experimentos de CDB, sino por

los de FT-IR y en especial por los de ATG, en donde la transición a 80 °C se correlaciona con la del PLP (y la DM-20), y cuando ésta aparece a 70 °C (por ejemplo, por efecto del octilglucósido tras su eliminación) también se observa este efecto en ATG. No se puede decir nada, sin embargo, del posible efecto de la PBM, no detectada como sabemos por ATG.

* * * * *

No querríamos finalizar esta Discusión sin reconocer la importancia de lo "no hecho". Esto quiere decir que cuando uno finaliza un trabajo de investigación al que se le espera colocar la etiqueta de "Tesis Doctoral", suponiéndole una entidad académica adecuada, es cuando uno se plantea lo que se haría de empezar de nuevo. Aparte de no "perder el tiempo" en tantos y tantos experimentos que "no salieron" o que fueron necesarios para que "algo saliera", lo que ahora resulta evidente es la cantidad de experimentos y estudios que se podían (o debían) haber realizado, o que uno haría de empezar de nuevo. En cierto modo uno tiene la sensación de que ahora existen muchas más preguntas a responder que al principio del trabajo, y reconoce que quizás alguna de estas preguntas (experimentos por realizar) debieron haberse intentado responder en el contexto de este trabajo. Esto es naturalmente un juicio de valor, ya que este tipo de preguntas han ido surgiendo a lo largo de la realización de este trabajo y, como vulgarmente se dice, en algún punto había que cortar. Valgan al menos estas disquisiciones como autocrítica constructiva y labor de distanciamiento del esfuerzo realizado. Como se decía al final de la Introducción, si este esfuerzo de abordar por primera vez ciertos sistemas complejos, o de poner a punto nuevas técnicas y métodos de trabajo, sirve como experiencia a futuras investigaciones en el grupo de trabajo, se darán por más que bien empleados la energía y el tiempo utilizados.

VI. CONCLUSIONES

1 - En base a experimentos de CDB y de FT-IR del PLP purificado por disolventes orgánicos se concluye que la transición térmica reversible existente en este sistema se debe a una transición de fase lipídica (gel-cristal líquido) y no a la desnaturalización del proteolípido, como estaba previamente descrito en la bibliografía. Esta transición de lípidos, que no aparece en los lípidos extraídos de la mielina, se debe a la ausencia de colesterol en los lípidos del PLP purificado por disolventes orgánicos.

Por otra parte, no se ha encontrado evidencia alguna de desnaturalización de proteína en estos experimentos, entendiéndose que el PLP se encuentra ya, al menos en gran parte, desnaturalizado en el crudo proteolipídico de mielina.

2 - Se ha detectado por CDB una transición térmica irreversible en la mielina a pH 7,0 centrada a 80 °C y con una entalpía de $4,7 \pm 0,6$ J/g. Esta transición está cinéticamente controlada, no sigue el modelo cinético de dos estados, y se desplaza a 70 °C dependiendo del tratamiento previo de la muestra.

Por medidas de ATG y FT-IR, esta transición se asigna fundamentalmente a la desnaturalización térmica del PLP.

3 - Del estudio de la solubilización de la mielina por diversos detergentes y condiciones se establecen y proponen métodos adecuados de purificación para el PLP con Triton X-100 y con octilglucósido, y para la PBM con Chaps. En estos métodos, en los que se evita la presencia de altas concentraciones de detergente en las muestras, se alcanza una pureza igual

o mayor a la descrita para estas proteínas obtenidas por disolventes orgánicos y/o disoluciones muy ácidas.

4 - Se ha abordado la reconstitución del PLP purificado por Triton X-100 y por octilglucósido, así como la de las proteínas de la mielina (solubilizado de mielina con octilglucósido). Tanto el PLP reconstituido tras su purificación como el del solubilizado de mielina, muestran una transición irreversible a 70 °C en CDB. Estos resultados, conjuntamente con los paralelos de FT-IR para ambos sistemas, permiten concluir que dicha transición se debe básicamente a la desnaturalización del PLP reconstituido. Se propone así utilizar la presencia de esta transición térmica como un observable adecuado y característico de la conformación no desnaturalizada del PLP.

VII. BIBLIOGRAFIA

- * Agrawal, H.C., Burton, R.M., Fishman, A.M., Mitchell, R.F. y Prensky, A.L. (1972) **J.Neurochem.** 19, 2083

- * Aguilar, J.M., de Cózar, M., Criado, M. y Monreal, J. (1983) **J.Neurochem.** 40, 585

- * Allain, C.C., Poon, L.S. y Chan, C.S. (1974) **Clin.Chem.** 22, 470

- * Artigues, A., Villar, M.T., Farragut, J.A. y González-Ros, J.M. (1987) **Arch.Biochem.Biophys.** 258, 33

- * Arrondo, J.L.R., Mantsch, H.H., Mullner, N., Pikula, S. y Martonosi, A. (1987) **J.Biol.Chem.** 262, 9037

- * Arrondo, J.L.R., Young, N.M. y Mantsch, H.H. (1988) **Biochim.Biophys.Acta** 952, 261

- * Ayala, G., Carmona, P., de Cózar, M. y Monreal, J. (1987) **Eur.Biophys.J.** 14, 219

- * Banerjee, R.K. y Datta, A.G. (1983) **Mol.Cell.Biochem.**, 3

- * Barbarese, E, Braun, P.E. y Carson, J.H. (1977) **Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.** 74, 3360

- * Baron, C. y Thompson, T.E. (1975) **Biochim.Biophys.Acta** 382, 276

- * Barón, C., González, J.F., Mateo, P.L. y Cortijo, M. (1989) **J.Biol.Chem.** 264, 12872

- * Bartlett, G.R. (1959) **J.Biol.Chem.** 234, 466

- * Berman, H.A., Yguerabide, J. y Taylor, P. (1985) **Biochemistry** 24, 7140

- * Bizzozero, O.A., McGarry, J.F. y Lees, M.B. (1986) **J.Neurochem.** 47, 772

- * Boggs, J.M., Moscarello, M.A. y Papahadjopoulos, D. (1982a) en "Lipid-Protein Interactions" (eds. Jost, P.C. y Griffith, D.M.) John Wiley & Sons, New York, Vol.2, pp. 1-51

- * Boggs, J.M., Stamp, D. y Moscarello, M.A. (1982b) **Biochemistry** 21, 1208

- * Braiman, M.S. y Rothschild, K.J. (1988) **Ann.Rev.Biophys.Chem.** 17, 541

- * Brauner, J.W. y Mendelson, R. (1986) **Biochim.Biophys.Acta** 861, 16

- * Brostoff, S.W., Reuter, W., Hichens, M. y Eylar, E.H. (1974) **J.Biol.Chem.** 249, 559

- * Burnier, R.C. y Low, P.S. (1985) **Arch.Biochem.Biophys.** 240, 60

- * Cameron, D.G. y Mantsch, H.H. (1978) **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 83,

- * Cameron, D.G. y Moffat, D.J. (1987) **Appl.Spectrosc.** 41, 539

- * Carmona, P., Ramos, J.M., de Cózar, M. y Monreal, J. (1987) **J.Raman Spectroscopy**

18, 473

* Carmona, P., de Cózar, García-Segura, L.M. y Monreal, J. (1988) **Eur.Biophys.J.** 16, 169

* Cladera, J., Galisteo, M.L., Duñach, M., Mateo, P.L. y Padrós, E. (1988) **Biochim.Biophys. Acta** 943, 148

* Cockle, S.A., Epanand, R.M. y Moscarello, M.A. (1978) **J.Biol.Chem.** 253, 8019

* Conejero-Lara, F. (1988) Tesis de Licenciatura, Universidad de Granada, Granada

* Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Avilés, F.X. y Sánchez-Ruiz, J.M. (en prensa en **Biochemistry**)

* Cortijo, M. y Chapman, D. (1981) **FEBS Lett.** 131, 245

* Cortijo, M., Barón, C., Jiménez, J.S. y Mateo, P.L. (1982) **J.Biol.Chem.** 257, 1121

* Cózar, M. (1986) Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid

* Curatolo, W., Sakura, J.D., Small, D.M. y Shipley, G.G. (1977) **Biochemistry** 16, 2313

* Chapman, D., Gómez-Fernández, J.C. y Goñi, F.M. (1979) **FEBS Lett.** 98, 211

VII. BIBLIOGRAFIA

- * Cheetham, P.S.J. (1979) **Anal.Biochem.** 92, 447

- * Cheifetz, S. y Moscarello, M.A. (1985) **Biochemistry** 24, 1909

- * Chou, F.C-H., Chou, C-H.J., Shapira, R. y Kibler, R.F. (1976) **J.Biol.Chem.** 251, 2671

- * Chou, P.Y. y Fasman, G.D. (1977) **Trends Biochem.Sci.** 2, 128

- * Chou, P.Y y Fasman, G.D. (1978) **Adv.Enzymol.** 47, 45

- * Christensen, J.J., Hansen, L.D. e Izatt, R.D. (1976) en "Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities" John Wiley & Sons, Nueva York, Londres

- * Darszon, A. (1983) **J.Bioenerg.Biomemb.** 15, 321

- * Deibler, G.E. y Martenson, R.E. (1973) **J.Biol.Chem.** 248, 2392

- * Dong, A., Huang, P y Caughey, W.S. (1990) **Biochemistry** 29, 3303

- * Drummond, R.J. y Dean, G. (1980) **J.Neurochem.** 35, 1155

- * Eylar, E.H., Brostoff, S.W., Hashim, G., Caccam, J. y Burnett, P. (1971) **J.Biol.Chem.** 246, 3418

- * Eylar, E.H. (1980) en "The Suppression of Experimental Allergic Encephalomyelitis and

Multiple Sclerosis" (eds. Davison, A.N. y Cuzner, M.L.) Academic Press, Londres; pp. 59-78

* Finean, J.B. (1960) **J.Biochem.Biophys.** 8, 13

* Folch, J. y Lees, M. (1951) **J.Biol.Chem.** 191, 807

* Franks, N.P. y Levine, Y.K. (1981) en "Membrane Spectroscopy" (ed. Grell, E.), Springer-Verlag, New York; Vol. 31, pp. 437

* Franks, N.P., Melchior, V., Kirschner, D.A. y Caspar, D.L.D. (1982) **J.Mol.Biol.** 155, 133

* Freire, E. y Biltonen, R.L. (1978) **Biopolymers** 17, 463

* Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) **Annu.Rev.Biophys.Chem.** 19, 159

* Gagnon, J., Finch, P.R., Wood, D.D. y Moscarello, M.A. (1971) **Biochemistry** 10, 4756

* Galisteo, M.L. (1990) Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada

* Galisteo, M., Mateo, P.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (en prensa en **Biochemistry**)

* Gibson, B.W., Gillion, R.D., Whitaker, J.N. y Bieman, K. (1984) **J.Biol.Chem.** 259,

5028

- * Goins, B. y Freire, E. (1988) **Biochemistry** 27, 2046

- * Golds, E.E. y Braun, P.E. (1978) **J.Biol.Chem.** 253, 8171

- * Gómez-Fernández, J.C., Goñi, F.M., Bach, D., Restall, C.J. y Chapman, D. (1980) **Biochim.Biophys.Acta** 598, 502

- * Goñi, F.M., Urbaneja, M.A., Arrondo, J.L.R., Alonso, A., Durrani, A.A. y Chapman, D. (1986) **Eur.J.Biochem.** 160, 659

- * Goñi, F.M. (1987) **Cell Biol.Rev.** 11, 3

- * Goñi, F.M., de Cózar, M., Alonso, A., Durrani, A.A., García-Segura, L.M., Lee, D.C., Monreal, J. y Chapman, D. (1988) **Eur.J.Biochem.** 174, 641

- * Gow, A. y Smith, R. (1989) **Biochem.J.** 257, 535

- * Greenfield, S., Weise, M.J., Gantt, G., Hogan, E.L. y Brostoff, S.W. (1982) **J.Neurochem.** 39, 1278

- * Gregson, N.A. (1983) en "Multiple Sclerosis, Pathology, Diagnosis and Management" (eds. Hallpike, J.F., Adamy, C.W.M. y Tourtellote, W.) Chapman and Hall, Londres; pp. 1-27

- * Griffith, O.H., Dehlinger, P.J. y Van, S.P. (1974) **J.Membr.Biol.** 15, 159
- * Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, P.L. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) **Eur.J.Biochem.** 188, 181
- * Hartley, G.S. (1977) en "Micellization, Solubilization and Microemulsions" (ed. Mittal, K.L.) Plenum Press, New York, Vol. 1, pp. 23-43
- * Helenius, A. y Simons, K. (1975) **Biochim.Biophys.Acta** 415, 29
- * Helynck, G., Luu, B., Nussbaum, J.L., Picken, D., Skadilis, G., Trifilieff, E., Dorselaer, A.V., Seta, P., Sandeaux, R., Garach, C., Heitz, F., Simon, D. y Spach, G. (1983) **Eur.J.Biochem.** 133, 689
- * Hirata, H. (1986) en "Techniques for the Analysis of Membrane Proteins" (Eds. Ragan, C.I. y Cherry, R.J.) Chapman and Hall, Londres, Nueva York; pp. 77-96
- * Hjelmeland, L.M. y Chrambach (1984) en "Methods in Enzymology" (Ed. Jakoby, W.B.) Academic Press, Nueva York, Londres; Vol. 104; pp. 305
- * Holloway, P.W. (1973) **Anal.Biochem.** 53, 304
- * Horigome, T. y Sugano, H. (1983) **Anal.Biochem.** 130, 393
- * Hudson, L.D., Friedrich, V.L., Behar, T., Dubois-Dalcq, M. y Lazzarini, R.A. (1989)

J.Cell Biol. 109, 717

* Jackson, M.L. y Litman, B.J. (1982) **Biochemistry** 21, 5601

* Jackson, M.L. y Litman, B.J. (1985) **Biochim.Biophys. Acta** 812, 369

* Jackson, M., Haris, P.I. y Chapman, D. (1989) **J.Mol.Struct.** 329

* Jones, O.T., Earnest, J.P. y McNamee, M.G. (1987) en "Biological Membranes. A practical Approach" (eds. Findlay, J.B.C. y Evans, W.H.) IRL Press, Oxford, pp. 139-177

* Kirschner, D.A., Hollingshead, C.J., Thaxton, C., Caspar, D.L.D. y Goodenough, D.A. (1979) **J.Cell Biol.** 82, 140

* Kirschner, D.A. y Ganser, A.L. (1982) **J.Mol.Biol.** 157, 635

* Kirschner, D.A., Ganser, A.L. y Caspar, D.L.D. (1984) en "Myelin" (ed. Morell, P.) Plenum Press, Nueva York, Londres; pp. 51-95

* Klibanov, A.M. y Ahern, T.J. (1987) en "Protein Engineering" (Eds. Oxenberg, C.F. y Fox, C.F.) Liss, Nueva York; pp. 213

* Krämer, R. y Heberger, C. (1986) **Biochim.Biophys.Acta** 863, 289

* Krimm, S. y Bandekar, J. (1986) **Adv.Protein Chem.** 38, 181

- * Kushwaha, S.C. y Kates, M. (1981) **Lipids** 16, 372

- * Ladbrooke, T.J., Jenkinson, V.B. y Chapman, D. (1968) **Biochim.Biophys.Acta** 164, 101

- * Laemmli, U.K. y Farre, M. (1973) **J.Mol.Biol.** 80, 575

- * Laursen, R.A., Samiullah, M. y Lees, M.B. (1984) **Proc.Natl.Acad.Sci. USA** 81, 2912

- * Lee, D.C., Hayward, J.A., Restall, C.J. y Chapman, D. (1985) **Biochemistry** 24, 4364

- * Lees, M.B. y Paxman, S.A. (1973) **J.Neurochem.** 21, 1031

- * Lees, M.B. y Sakura, J.B. (1978) en "Research Methods in Neurochemistry" (eds. Marks, N. y Rodnight, R.) Plenum Press, New York, Vol. 4, pp. 354-370

- * Lees, M.B., Chao, B., Lin, L.H., Samiullah, M. y Laursen, R. (1983) **Arch.Biochim.Biophys.** 226, 643

- * Lees, M.B. y Brostoff, S.W. (1984) en "Myelin" (ed. Morell, P.) Plenum Press, New York, pp. 197-224

- * Lehninger, A.L. (1986) "Principios de Bioquímica" Ediciones Omega, S.A., Barcelona

- * Lin, L.-F.H. y Lees, M.B. (1982) **Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.** 79, 941

* López-Lacomba, J.L., Mateo, P.L., Cortijo, M., Vilanova, M., Muñoz, A. y Avilés, F.X. (1985) **Biochem.Soc.Trans.** 13, 343

* López-Lacomba, J.L. (1987) Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada

* López-Lacomba, J.L., Guzmán, M., Cortijo, M., Mateo, P.L., Aguirre, R., Harvey, S.C. y Cheung, H.C. (1989) **Biopolymers** 28, 2143

* López-Mayorga, O. (1983) Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada

* Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.S. y Randall, R.J. (1951) **J.Biol.Chem.** 193, 265

* Ludwig, B., Downer, N.W. y Capaldi, R.A. (1979) **Biochemistry** 18, 1401

* Lysko, K.A., Carlson, R., Taverna, R., Snow, J. y Brandts, J.F. (1981) **Biochemistry** 20, 5570

* Mabrey, S y Sturtevant, J.M. (1978) **Meth.Membr.Biol.** 9, 237

* Mabrey, S., Mateo, P.L. y Sturtevant, J.M. (1978) **Biochemistry** 17, 2464

* Macklin, W.B., Braun, P.E. y Lees, M.B. (1982) **J.Neurosci.Res.** 7, 1

* Madden, T.D. (1986) **Chem.Phys.Lipids** 40, 207

- * Martenson, R.E. (1986) **J.Neurochem.** 46, 1612

- * Mateo, P.L. (1984) en "Thermochemistry and its Applications to Chemical and Biochemical Systems" (ed. Silva, M.R.) Reidel, Holanda; pp. 541-568

- * Mateo, P.L., Barón, C., López-Mayorga, O., Jiménez, J.S. y Cortijo, M. (1984) **J.Biol.Chem.** 259, 9384

- * Mateo, P.L., López-Lacomba, J.L., Moreno, M.C., de Cózar, M., Cortijo, M. y Monreal, J. (1986) **FEBS Lett.** 197, 221

- * Maxfield, F.R. y Scheraga, H.A. (1976) **Biochemistry** 15, 5138

- * McElhaney, R. (1986) **Biochim.Biophys. Acta** 864, 361

- * McIntosh, T.J. (1980) **Biophys.J.** 29, 237

- * Mimms, L.T., Zampighi, G., Nozaki, Y., Tanford, C. y Reynolds, J.A. (1981) **Biochemistry** 20, 833

- * Moller, J.V., le Mairer, M. y Andersen, J.P. (1986) en "Progress in protein-lipid interactions" Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 147

- * Monreal, J. (1975) **J.Neurochem.** 25, 539

- * Moore, W.J., Nygaard, E., Mendz, G.L. y Martenson, R.E. (1983) **Trans.Am.Soc.Neurochem.** 14, 163
- * Morell, P. (1984) en "Myelin" Plenum Press, Nueva York
- * Morin, P., Diggs, D. y Freire, E. (1990) **Biochemistry** 29, 781
- * Moscarello, M.A., Neumann, A.W. y Wood, D.D. (1983) **Biochim.Biophys.Acta** 728, 201
- * Muga, A., Castresana, J. y Arrondo, J.L.R. (1988) **J.Mol.Struct.** 175, 67
- * Nagano, K. (1977) **J.Mol.Biol.** 109, 251
- * Nave, K.A., Lai, C., Bloom, F.E. y Milner, J. (1987) **Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.** 84, 5665
- * Necessary, P.C., Humphrey, P.A., Mahajan, P.B. y Ebner, K.E. (1984) **J.Biol.Chem.** 259, 6942
- * Neskovic, N.M. y Kostic, D.M. (1968) **J.Chromatog.** 35, 297
- * Nicot, C., Nguyen Le, T., Leprêtre, M. y Alfsen, A. (1973) **Biochim.Biophys.Acta** 322, 109

- * Norton, W.T. y Cammer, W. (1984) en "Myelin" (ed. Morell, P.) Plenum Press, New York, pp. 147-195

- * Novokhatny, V.V., Kudinov, S.A. y Privalov, P.L. (1984) **J.Mol.Biol.** 179, 215

- * Ornstein, L. (1964) **Annals N.Y.Acad.Sci.** 121, 321

- * Oshiro, Y. y Eylar, E.H. (1970) **Arch.Biochem.Biophys.** 138, 392

- * Oxtoby, D.W. (1981) **Annu.Rev.Phys.Chem.** 32, 77

- * Padrón, R. y Mateu, L. (1981) **J.Neurosci.Res.** 6, 251

- * Palmer, F.B. y Dawson, R.M.C. (1969) **Biochem.J.** 111, 637

- * Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E.H. e Isac, T. (1975) **Biochim.Biophys.Acta** 401, 317

- * Potekhin, S.A. y Privalov, P.L. (1982) **J.Mol.Biol.** 159, 519

- * Prado, A., Muga, A., Castresana, J., Goñi, F.M. y Arrondo, J.L.R. (1990) **FEBS Lett.** 269, 324

- * Privalov, P.L. y Khechinashvili, N.N. (1974) **J.Mol.Biol.** 86, 665

- * Privalov, P.L. (1979) **Adv. Protein Chem.** 33, 167

- * Privalov, P.L. (1980) **Pure & Appl. Chem.** 52, 479

- * Privalov, P.L., Mateo, P.L., Khechinashvili, N.N., Stepanov, V.M. y Revina, L.P. (1981) **J. Mol. Biol.** 152, 445

- * Privalov, P.L. (1982) **Adv. Protein Chem.** 35, 1

- * Privalov, P.L. y Medved, L.V. (1982) **J. Mol. Biol.** 159, 665

- * Privalov, P.L. y Pothekin, S.A. (1986) **Meth. Enzymol.** 131, 4

- * Quarles, R.H. (1980) en "Myelin: Chemistry and Biology" (ed. Hashim, G.), Alan R. Liss, New York, pp. 55-77

- * Quarles, R.H., Barbarash, G.R., Figlewicz, D.A. y McIntyre, L.J. (1983) **Biochim. Biophys. Acta** 757, 140

- * Raine, C.S. (1984) en "Myelin" (ed. Morell, P.) Plenum Press, Nueva York; pp. 1-50

- * Rand, R.P. (1981) **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.** 10, 277

- * Ranvier, M.L. (1878) en "Lecons sur l'Histologie du Systeme Nerveux" Librairie F. Savy, Paris

- * Reiber, H. (1978) **Biochim.Biophys. Acta** 512, 72

- * Reig, J.A., Ramos, J.M., de Cózar, M., Aguilar, J.S., Criado, M. y Monreal, J. (1982) **J.Neurochem.** 39, 507

- * Reynolds, J.A. (1982) en "Lipid-Protein Interactions" (eds. Jost, P.C. y Griffith, O.H.) Wiley, New York, Vol. 2, pp. 193

- * Rial, E., Muga, A., Valpuesta, J.M., Arrondo, J.L.R. y Goñi, F.M. (1990) **Eur.J.Biochem.** 188, 83

- * Riccio, P., Rosenbusch, J.P. y Quagliariello, E. (1985) **FEBS Lett.** 177, 236

- * Riccio, P., Masotti, L., Cavatorta, P., De Santis, A., Juretic, D., Bobba, A., Pasquali-Bonchetti, I. y Quagliariello, E. (1986) **Biochem.Biophys.Res.Comm.** 134, 313

- * Rigaud, J.-L., Paternostre, M.-T. y Bluzat, A. (1988) **Biochemistry** 27, 2677

- * Rigell, C.W., de Saussure, C. y Freire, E. (1985) **Biochemistry** 24, 5638

- * Rigell, C.W. y Freire, E. (1987) **Biochemistry** 26, 4366

- * Ritchie, J.M. (1984) en "Myelin" (ed. Morell, P.) Plenum Press, New York, pp. 117-145

- * Rivnay, B. y Metzger, H. (1982) **J.Biol.Chem.** 257, 12800

- * Robson, B. y Suzuki, E. (1976) **J.Mol.Biol.** 107, 327

- * Ross, N.W. y Braun, P.E. (1988) **J.Neurosc.Res.** 21, 35

- * Rouser, G., Felischer, S. y Yamamoto, A. (1970) **Lipids** 5, 494

- * Ruiz-Cabello, J. (1990) Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid

- * Ruiz-Cabello, J., Ruiz, J., Mateo, P.L. y Cortijo, M. (enviado a **Biochim.Biophys.Acta**)

- * Sánchez-Ruiz, J.M. y Mateo, P.L. (1987) en "Cell Biology Reviews" (ed. Barberá-Guillem, E.) Springer International, España, Vol. 11, pp. 15-45

- * Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. y Mateo, P.L. (1988a) **Biochemistry** 27, 1648

- * Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Mateo, P.L., Vilanova, M., Serra, M.A. y Avilés, F.X. (1988b) **Eur.J.Biochem.** 176, 225

- * Sánchez-Ruiz, J.M. (enviado a **Biochemistry**)

- * Santiago, E., Mule, S., Redman, M., Hokin, M.R. y Hokin, L.E. (1964) **Biochim.Biophys.Acta** 84, 550

- * Scopes, R. (1982) en "Protein Purification: Principles and Practice", Springer-Verlag,

Nueva York; pp. 52-55

- * Sebald, W. y Hoppe, J. (1981) **Curr.Top.Bioenerg.** 12, 1

- * See, Y.P. y Jackowski, G. (1989) en "Protein Structure. A Practical Approach" (ed. Creighton, T.E.) Irlpress, Oxford, pp. 1-21

- * Shaw, S-Y, Laursen, R.A. y Lees, M.B. (1989) **FEBS Lett.** 250, 306

- * Siedel, J., Hägele, E.O., Ziegenhorn, J. y Wahlefeld, A.W. (1983) **Clin.Chem.** 29, 1075

- * Smith, R. (1977) **Biochim.Biopys.Acta** 491, 581

- * Smith, R., Cook, J. y Dickens, A. (1984) **J.Neurochem.** 42, 306

- * Soler, G., Mattingly, J.R. y Martínez-Carrión, M. (1984) **Biochemistry** 23, 4630

- * Sprinkle, T.J., Wells, M.R., Garver, F.A. y Smith, D.B. (1980) **J.Neurochem.** 35, 1200

- * Sprinkle, T.J. (1989) **Crit.Rev.Neurobiol.** 4, 235

- * Stein, J.M., Tourtellote, M.E., Reinert, J.C., McElhaney, R.N. y Rader, R.L. (1969) **Proc.Natl.Acad.Sci. USA** 63, 104

- * Stoffel, W., Schroder, W., Hillen, H. y Deutzmann, R. (1983) **Hoppe-Seyler**

Z.Physiol.Chem. 364, 1455

* Stoffel, W., Hillen, H. y Giersiefen, H. (1984) **Proc.Natl.Acad.Sci. USA** 81, 5012

* Stoffyn, P. y Folch-Pi, J. (1971) **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 44, 157

* Stoner, G.L. (1984) **J.Neurochem.** 43, 433

* Sturtevant, J.M. (1974) en "Quantum Statistical Mechanics in the Natural Sciences" (eds. Kursunoglu, B. Mintz, S. y Widmayer, S.) Plenum Press, New York; pp. 63-86.

* Surewicz, W.K., Moscarello, M.A. y Mantsch, H.H. (1987a) **J.Biol.Chem.** 262, 8598

* Surewicz, W.K., Mocarello, M.A. y Mantsch, H.H. (1987b) **Biochemistry** 26, 3881

* Surewicz, W.K y Mantsch, H.H. (1988) **Biochim.Biophys.Acta** 952, 115

* Surewicz, W.K., Leddy, J.J. y Mantsch, H.H. (1990) **Biochemistry** 29, 8106

* Susi, H. y Byler, D.M. (1983) **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 115, 391

* Takahashi, T. y Sturtevant, J.M. (1981) **Biochemistry** 20, 6185

* Tanford, C. (1973) en "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes" (ed. Tanford, C.) John Wiley & Sons, Nueva York, Londres; pp. 12-15

- * Tanford, C. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 71, 1811

- * Tanford, C. y Reynolds, J.A. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* 457, 133

- * Thompson, L.K., Blaylock, R., Sturtevant, J.M. y Brudvig, G.W. (1989) *Biochemistry* 28, 6686

- * Toews, A.D., Horrocks, L.A. y King, J.S. (1976) *J.Neurochem.* 27, 25

- * Trifilieff, E., Naussbaum, J.L., Roussel, G., Espinosa de los Monteros, A., Sabatier, J.M. y Van Rietschoten, J. (1986) *FEBS Lett.*198, 235

- * Tsalkova, T.N. y Privalov, P.L. (1985) *J.Mol.Biol.* 181, 533

- * Vacher, M., Waks, M. y Nicot, C. (1984) *Biochem.J.* 218, 197

- * Valpuesta, J.M. (1985) Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco, Bilbao

- * Villalaín, J.V., Ortiz, A. y Gómez-Fernández, J.C. (1988) *Biochim.Biophys.Acta* 941, 55

- * Virchow, R. (1854) *Virchows Arch.Pathol.Anat.* 6, 562

- * Wang, C.-S. y Smith, R.L. (1975) *Anal.Biochem.* 63, 414

VII. BIBLIOGRAFIA

* Winter, J. (1982) **Nature** 298, 471

* Wolfgram, F. (1966) **J.Neurochem.** 13, 461

* Zalc, B., Monge, M., Dupouey, P., Hauw, J.J. y Baumann, N.A. (1981) **Brain Res.** 211, 341