

## CARACTERIZACIÓN DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+\text{-H}^+$ EN EL ÓVULO: REGULACIÓN POR EL CITOESQUELETO Y UNA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEPENDIENTE DE RhoGTPasa/Rho-CINASA.

García-Soto, J.

Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Col. Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto., México 36050. Tel. 473- 7320006 ext. 8106. Fax: ext. 8153. garciaajs@quijote.ugto.mx

Los gametos de erizo de mar son modelos apropiados para estudiar las bases moleculares y celulares de la fecundación, entre otros procesos fundamentales de la biología. El óvulo, al ser fecundado, exhibe un aumento del pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) mediado por un intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ , el cual acelera la velocidad de síntesis de proteínas. Este intercambiador no se ha caracterizado. En células somáticas de mamíferos, se han descrito 9 isoformas del intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (NHE1-NHE9). Algunas de éstas se localizan en la membrana plasmática y otras en organelos celulares. La región carboxilo terminal es la más variable entre las distintas isoformas y determina cómo se regula su función. Hemos considerado que en el óvulo de erizo de mar pudieran encontrarse proteínas relacionadas a NHE1 y NHE3. Con anticuerpos contra las regiones carboxilo terminal de NHE1 y NHE3, observamos una proteína de ~81 kDa sólo reconocida por el anticuerpo anti-NHE3. Un análisis de la distribución celular de esta proteína indicó su presencia en la membrana plasmática y, en mayor grado, en los gránulos corticales (GC). Los GC son vesículas secretoras unidas a la cara interna de la membrana plasmática del óvulo y, segundos después de la fecundación, sufren una exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . De aquí que una forma de regulación de la actividad del intercambiador consistiría en aumentar el número de copias en la membrana plasmática a través de la exocitosis de los GC, contribuyendo al incremento del  $\text{pH}_i$  asociado con la activación del óvulo. También estudiamos si existen factores que pudieran modular la actividad intrínseca del intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ . La citocalasina D (despolimeriza microfilamentos de actina), la toxina C3 (inactiva a RhoGTPasas por ADP-ribosilación) y Y-27632 (inhibe la actividad catalítica de Rho-cinasa o ROCK) bloquean el aumento del  $\text{pH}_i$ . Hemos concluido que la alcalinización intracelular obedece a la actividad de un intercambiador cuya regulación se basa no solamente en la inserción de más copias en la membrana plasmática sino también a la influencia del citoesqueleto de actina, Rho y ROCK. Por otro lado, en el genoma del erizo de mar hay secuencias que tienen homología con todos los intercambiadores de mamíferos, con lo que podremos confirmar o descartar la posible existencia de un intercambiador relacionado a NHE3. Con el fin de ampliar el conocimiento de esta vía, estamos estudiando en base a un enfoque bioquímico y de biología molecular dos proteínas claves para la operación de esta vía: RhoGDI, una proteína reguladora de Rho, y ROCK, una cinasa efectora de Rho. Experimentos de hibridización *in situ* muestran que RhoGDI se expresa desde las etapas finales de la ovogénesis y en el desarrollo temprano del embrión. ROCK tiene una alta identidad con su contraparte en mamíferos y hemos comprobado su expresión por métodos inmunológicos. (Este trabajo es financiado por el Conacyt y la Universidad de Guanajuato).