

Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias ESCUELA DE BIOQUÍMICA

Profeosor Patrocinante
DR. ALEJANDRO J. YÁÑEZ C.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

FUNCIÓN DE LOS EXTREMOS CARBOXILO Y AMINO TERMINAL DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑÓN DE CERDO EN SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y Título profesional de *Bioquímico*.

FREDDY ANDRÉS CALDERÓN CALDERÓN VALDIVIA – CHILE 2004



AGRADECIMIENTOS

Es el momento de agradecer a las personas que de una forma u otra estuvieron presentes en este trabajo y me ayudaron a llegar a buen fin, ya sea, con su mayor experiencia o, con su amistad y apoyo. En primer lugar, gracias al doctor Juan Carlos Slebe por la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio y principalmente por su interés de ser guía de los estudiantes que conformamos su equipo de trabajo en la medida que su trabajo lo permitió. Para el doctor Alejandro Yáñez, por su confianza en el trabajo que realicé; a la doctora Heide Ludwig por su disposición a ayudar cuando recurrí a ella. Gracias a la doctora Margarita Concha por aceptar pertenecer a mi comisión y al doctor Juan Guillermo Cárcamo por su vocación como maestro.

En especial a las personas que hicieron que los momentos difíciles del trabajo no permanecieran y fueran lo que son, solo momentos, a ellos, a mis compañeros Joel, Cristian, Romina, Rodrigo, Carlos, Marco, Mauricio, René y Marcelo, muchas gracias.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Enzimología Molecular del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile y fue financiado por los proyectos FONDECYT 1010720 y DID-UACH 200178.

INDICE DE CONTENIDOS.

Agradecimientos

		Pág.
	Indíce de figuras	iii
	Indíce de Tablas	iv
	Abreviaturas	v
1.	Resumen	1
	Summary	2
2.	Introducción	3
2.1	La enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa	5
2.2	Organización celular y subcelular del metabolismo	8
2.3	La GFP en estudios de enzimas metabólicas	12
2.4	Acerca de este estudio	13
3.	Materiales y Métodos	16
3.1	Materiales	16
3.1.1	Reactivos	16
3.1.2	Equipos	17
3.2	Métodos	18
3.2.1	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	18
3.2.2	Electroforesis de DNA en gel de agarosa	19
3.2.3	Extracción de DNA desde geles de agarosa	20
3 2 4	Subclonamiento de productos de amplificación en el vector pGEM-T	20

3.2.5	Transformación de bacterias E. coli	21
3.2.6	Elaboración del medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con	22
	agar	
3.2.7	Purificación de DNA plasmidial por el método de lisis alcalina	22
3.2.8	Análisis de digestión con endonucleasas de restricción	23
3.2.9	Subclonamiento en los vectores pEGFP-N1 y pEGFP-C1	24
3.2.10	Purificación de DNA plasmidial por kit comercial	25
3.2.11	Cuantificación de DNA plasmidial	25
3.2.12	Cultivo celular	26
3.2.13	Transfecciones transientes	26
4	Resultados	28
4.1	Obtención de las proteínas mutantes FBPasa-N20 y FBPasa-C38 a	28
	través de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	
4.2	Clonación de los fragmentos obtenidos en el vector comercial pGEM-	28
	T Easy	
4.3	Subclonación de las FBPasas mutantes en los vectores pEGFP-C1 y	30
	pEGFP-N1	
4.4	Localización subcelular de las enzimas mutantes y de la proteína de	33
	tipo salvaje en la línea celular HEK-293T	
4.5	Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas de fusión	36
	en la línea celular LLC-PK1	
5	Discusión	47
6	Bibliografía	55

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1:	Análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR	29
Figura 2:	Esquema de los mapas físicos de los vectores de expresión	31
Figura 3:	Análisis de restricción de los vectores pEGFP-N1/FBPasa-N20 y	32
	pEGFP-C1/FBPasa-C38	
Figura 4:	Localización subcelular de las proteínas de fusión en la línea celular	34
	HEK 293	
Figura 5:	Localización de las proteínas de fusión en la línea celular HEK 293	35
	cultivadas en distinta concentración de glucosa	
Figura 6:	Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma	37
Figura 7:	Localización de las proteínas de fusión en la línea celular LLC-PK1	38
Figura 8:	Ejemplo de localización subcelular nuclear de la proteína de fusión en	40
	la línea celular LLC-PK1	
Figura 9:	Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma en la	41
	ubicación nuclear de las proteínas de fusión	
Figura 10:	Ejemplo de localización subcelular citoplasmática de la proteína de	42
	fusión en la línea celular LLC-PK1	
Figura 11:	Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma en la	43
	ubicación citoplasmática de las proteínas de fusión	
Figura 12:	Ejemplo de localización subcelular uniforme de las proteínas de fusión	44
	en la línea celular LLC-PK1	

Figura 13: Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma en la ubicación uniforme de las proteínas de fusión

INDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1:	Porcentaje de células de una población total que presenta una	46
	ubicación subcelular determinada, para cada proteína de fusión y cada	
	concentración de glucosa	

LISTA DE ABREVIATURAS.

Å Angstrom.

AMP adenosina 5'-monofosfato.

ATP adenosina trifosfato.

BSA albúmina sérica de bovino.

C centígrados. cm centímetro(s).

DAB diaminobencidina.

DMEM medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO dimetil sulfóxido.

DNA ácido desoxiribonucleico.
dNTPs deoxinucleotidos trifosfato.

E.coli Escherichia coli.

EDTA ácido etilendiaminotetracético.

FBPasa fructosa-1,6-bisfosfatasa.

FBPasa-C38 proteína mutante truncada en los últimos 38 aminoácidos.

FBPasa-N20 proteína mutante truncada en los primeros 20 aminoácidos.

EGFP/FBPasa-Rc proteína de fusión entre la EGFP y la FBPasa silvestre por el extremo

carboxilo de la GFP

FBPasa-Rc/EGFP proteína de fusión entre la EGFP y la FBPasa silvestre por el extremo

amino de la GFP

EGFP/FBPasa-C38 proteína de fusión entre la EGFP y la FBPasa delecionada en los últimos 38

aminoácidos.

FBPasa-N20/EGFP proteína de fusión entre la EGFP y la FBPasa delecionada en los primeros

20 aminoácidos.

Fru-1,6-P₂ fructosa-1,6-bisfosfato.

Fru-2,6-P₂ fructosa-2,6-bisfosfato.

Fru-6-P fructosa-6-fosfato.

GK enzima glucoquinasa.

GKRP proteína reguladora de glucoquinasa.

GFP green fluorescent protein (proteína verde fluorescente).

hrs horas.

LB medio de cultivo Luria - Bertani.

M molar.

mA mili Amperes.

min minuto(s).

ml mililitros.

mM mili molar.

N/C razón núcleo-citoplasma.

NES secuencia de exportación nuclear.

NLS secuencia de localización nuclear.

μg microgramos.
 μl microlitros.
 ng nanogramos.
 pb pares de base.

PCR Reacción de la polimerasa en cadena.

Pfu *Pyrococcus furiosus*.

Rc riñón de cerdo

r.p.m. revoluciones por minuto.

SDS lauril sulfato de sodio.

seg segundos.

Tampón TBE Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM, pH 8,0.

Tampón TE 20 mM Tris, 1 mM EDTA.

Tampón PBS NaCl 159 mM, NaH₂PO₄ 12 mM.

TEMED N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina.

Tris tris[hidroximetil]aminometano.

U unidad enzimática.

UV ultra violeta.

V Volts.W Watts.

wt wild type.

1. RESUMEN

La regulación de la glicólisis y la gluconeogénesis es extremadamente importante y compleja en tejido hepático y renal. Se ha demostrado que la distribución subcelular de algunas enzimas glicolíticas es dinámica y responde a las condiciones metabólicas. Nuestro laboratorio estableció que FBPasa se encuentra en el citoplasma, en un compartimento en el polo apical, e interesantemente dentro del núcleo de algunas células de hígado y riñón de rata. Esta ubicación podría explicarse por la presencia de una secuencia de localización nuclear (NLS) o de una interacción proteína-proteína que module la localización subcelular a través de un mecanismo denominado "piggy-back". En base a estos antecedentes planteamos que: "la función de la fructosa-1,6-bisfosfatasa es regulada por modulación de su localización subcelular por metabolitos intermediarios, y que dicha localización es dependiente de la presencia de señales de localización en la estructura primaria de la enzima". Para evaluar esta hipótesis clonamos dos mutantes de FBPasa de riñón de cerdo en el vector pEGFP, para obtener la proteína de fusión que fue expresada en líneas celulares renales. FBPasa-GFP fue localizada solo en el citosol de las celulas HEK-293, pero en las células LLC-PK1 la enzima fue capaz de translocar al núcleo. Esta diferente localización dependiente de las líneas celulares usadas, sugiere que la interacción proteína-proteína es un mecanismo plausible de regulación de la localización de FBPasa. También sugerimos que FBPasa contiene dos secuencias, una importante para la exportación de FBPasa desde el núcleo al citosol y otra secuencia para la importación de FBPasa al núcleo. Interesantemente, FBPasa estuvo presente principalmente en el citoplasma de LLC-PK1, pero la adición de glucosa induce la translocación a el núcleo. Estos resultados indican que la localización subcelular de FBPasa es modulada por la acción de glucosa.

SUMMARY

Regulation of glycolysis and gluconeogenesis is extremely important and complex in renal and hepatic tissues. It has been demonstrated that the subcellular distribution of some glycolitic enzymes is dynamic and responds to metabolic conditions. Our laboratory established that FBPase is found in the cytoplasm, in a compartment in the apical pole, and interestingly inside the nuclei in some cells in liver and rat kidney. This location could be attributed to a presence of a nuclear localization signal (NLS) or to a protein-protein interaction that modulate the subcellular location through a mechanism denominated "piggy-back". Based on these antecedents we outline that: "The function of the fructose-1,6-bisfosphatase is regulated by de modulation of their subcellular localization exerted by intermediary metabolites and that this location is dependent of the presence of signals of localization in the primary structure of the enzyme". To evaluate this hypothesis, we have cloned two mutants FBPase of pig kidney in the vector pEGFP to obtain the fusion proteins which was expressed in renals lines cells. We have found interesting results that point to the interaction protein-protein like mechanism of the regulation of the localization, involved at the two ends of the enzyme, one in the export to the cytosol and another in the import to the same organelle. Also, we observed that the wild type FBPase answer to the concentration changes of glucose in the medium, altering her subcellular location by the presence of the sugar.

2. INTRODUCCIÓN

Gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación de las enzimas, lo que ha permitido obtener notables avances en el estudio de su estructura y su relación con la función catalitica que ellas cumplen, es decir, el estudio de su naturaleza química, de su actividad bioquímica y de su significado biológico. En estas investigaciones destacan los estudios cinéticos realizados por Michaelis y Menten, ampliamente aplicados en esta área y en el metabolismo intermediario. De igual manera, un hallazgo de gran importancia fue la demostración que la fermentación ocurre en preparaciones acelulares, o in vitro. Con este descubrimiento se rechazó la noción que prevalecería que la fermentación estaba intimamente ligada a las células vivas. El estudio de la cinética de la acción enzimática tuvo además otra importancia. Como era extraordinariamente difícil conocer la estructura completa de la molécula de enzima, para individualizarla y caracterizarla se emplearon criterios que corresponden a las características cinéticas de la proteína. De esta forma, estudios in vitro han contribuido a la comprensión del mecanismo de la acción catalítica y han permitido generar una gran diversidad de mecanismos cinéticos y termodinámicos para la regulación de las reacciones enzimáticas. El flujo a través de las rutas metabólicas se controla mediante la regulación de la concentración de las enzimas (control de la síntesis y degradación de las enzimas), la actividad de las enzimas (a traves de las concentraciones de sustratos, productos y efectores alostéricos, y la modificación covalente de las enzimas), la compartimentación y el control hormonal. ¿Cómo se ha abordado este tipo de estudios en el laboratorio? Se ha buscado: (1) identificar los reactantes, productos y los cofactores, así como la estequiometría, de cada una de las reacciones; (2) entender cómo se controla la velocidad de cada reacción en el tejido de origen; y (3) identificar la función fisiológica de cada reacción y el mecanismo de control. Estos objetivos requieren aislar y caracterizar la enzima que cataliza cada reacción de la ruta. Esta última tarea, la extrapolación de la bioquímica del tubo de ensayo a la célula intacta, resulta especialmente difícil.

La comprensión de los procesos metabólicos requiere la identificación de cada reacción de una ruta, y un conocimiento de la función y el control de la reacción. Este entendimiento requiere la experimentación a todos los niveles de organización biológica, desde el organismo vivo y las células intactas hasta preparados de células rotas y, finalmente, enzimas purificadas. Las preparaciones acelulares, o *in vitro*, tienen la ventaja de poder manipularse de formas que no son posibles con las células intactas, por ejemplo, mediante la adición de sustratos y cofactores que no atravesarían las membranas celulares. Sin embargo, los estudios in vitro, son también un ejemplo del tipo de estudio reduccionista que dominó este campo de investigación durante los últimos cuarenta años. Es así como no existen datos in vivo suficientes que demuestren que estos mecanismos operen en la célula como etapa limitante de una vía metabólica. Una de las críticas a estos estudios y una pregunta fundamental discutida desde hace muchos años es ¿cómo el ambiente celular en el que la mayoría de las enzimas del metabolismo intermediario opera in vivo, afecta los parámetros cinéticos determinados en un ambiente artificial in vitro? Desafortunadamente, aún cuando esta es una discusión antigua ha permanecido en el tiempo. No obstante, en los últimos años, debido a la incorporación de la biología molecular, se han acumulado datos importantes de secuencias nucleotídicas de enzimas y su relación con la estructura de muchas de ellas (Philips et al., 1981; Creighton, 1993) y acerca del mecanismo de regulación de la transcripción de estos genes (Runge et al., 1991; Bergot et al., 1992; Short et al., 1992; Eisenberger et al., 1992, Vaulont et al., 1989; Cuif et al., 1992, Gregori et al., 1993). Además, la existencia de órganos bi-funcionales, como hígado y riñón, que expresan enzimas específicas para la gluconeogénesis y glicólisis crea la necesidad de un sistema de control muy sensible a los requerimientos celulares. El reciclaje de sustratos y productos de estas reacciones opuestas debe ser controlado coordinadamente en forma precisa para evitar el consumo inapropiado de ATP, lo que se refleja en la formación de ciclos fútiles. Basándose en estos antecedentes, creemos que para el avance del conocimiento sobre el metabolismo de hidratos de carbono es indispensable estudiar a las enzimas no como proteínas individuales sino en su ambiente celular. Para ello, se requiere integrar la regulación del metabolismo celular con técnicas apropiadas del campo de la biología celular y molecular. En este contexto, poco se conoce acerca de la organización y dinámica del metabolismo en diferentes células, en condiciones *in vivo*. Para esto, creemos que se deben utilizar aproximaciones experimentales que permitan observar y analizar la distribución subcelular de las enzimas en diferentes tejidos en respuesta a diferentes metabolitos o condiciones fisiológicas.

2.1 La enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa

La enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (D-fructosa-1,6-bisfosfato-1-fosfohidrolasa EC 3.1.3.11) es una enzima clave del proceso conocido como gluconeogénesis que cataliza la formación de fructosa-6-fosfato desde fructosa-1,6-bisfosfato (Van Schaftingen, 1987), reacción inversa a la etapa catalizada por la enzima glicolítica fosfofructoquinasa. Se han aislado y estudiado en detalle bisfosfatasas de numerosas fuentes, entre las que se incluyen: hígado, riñón, intestino, músculo, microorganismos y plantas, entre otras (referencias en Cárcamo, 1999). Estas, a pesar de provenir de distintas fuentes mantienen muchas propiedades comunes. La FBPasa de riñón de cerdo es un tetrámero de 36,5 kDa por subunidad que requiere la presencia de iones

metálicos bivalentes, Mg^{2+} o Mn^{2+} y responde a una gran variedad de señales metabólicas (Benkovic & deMaine, 1982; Tejwani, 1983). Es regulada por inhibición a concentraciones micromolares de AMP y fructosa-2,6-bisfosfato y, separadamente por altas concentraciones de Fru-1,6-P₂. Existe además un potente sinergismo entre las inhibiciones provocadas por Fru-2,6-P₂ y AMP, efecto que se piensa es el principal mecanismo de control del flujo de la vía gluconeogénica (Hers & Hue, 1983; Van Schaftingen, 1987). Por otro lado, la enzima es activada por algunos cationes monovalentes, tales como K⁺ y NH₄⁺ (Hubert et al., 1970). Además, recientemente se ha informado de una nueva clase de inhibidores. La nueva familia de anilinoquinazolinas inhibidoras fue descubierta en la búsqueda de potenciales drogas en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina (Wright, S. W., et al 2002). Un rastreo para encontrar nuevos inhibidores de FBPasa resultó en el descubrimiento de una molécula distinta (OC252-324, desde ahora OC252) que se une al mismo sitio en FBPasa que las anilinoquinazolinas, y que es un tetrapeptido que se une a través de un puente de hidrogeno a un aspartato, el 187, altamente conservado (Choe y col., 2003). Aunque el sitio de unión a FBPasa esta identificado, el mecanismo de inhibición para esta nueva clase de inhibidores no fue informado. La cantidad de variados modelos de regulación y características particulares, relativamente conservadas entre las FBPasas de organismos superiores, ha provocado un permanente interés en el análisis de esta enzima desde un punto de vista funcional, estructural y cinético.

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las fructosa-1,6-bisfosfatasas de diversas fuentes (Ke et al., 1990b) muestra que la identidad entre las distintas isoformas es cercana a un 40%. Asimismo, las secuencias muestran regiones de alta similitud (70-80%), indicando que se han conservado ciertos elementos estructurales importantes para la actividad y

regulación de la enzima. En efecto, 14 de 18 residuos descritos en interacciones en el sitio activo son conservados (Ke et al., 1990b). También es conservada la similitud estructural de los residuos que interactúan con el inhibidor alostérico AMP (El-Maghrabi et al., 1993). Mediante difracción de rayos X se ha refinado a resoluciones entre 2,1 a 3,0 Å la estructura tridimensional de la FBPasa renal de cerdo y los complejos entre ella y el producto Fru-6-P, los inhibidores Fru-2,6-P₂ y AMP, el sustrato Fru-1,6-P₂ y dos análogos de sustrato (Ke et al., 1989, 1990a, 1990b, 1991a, 1991b; Liang et al., 1992, 1993; Zhang et al., 1993, 1994; Xue et al., 1994; Giroux et al., 1994; Villeret et al., 1995a, 1995b). La enzima mostró tener una estructura homotetramérica por lo que los 335 residuos de cada monómero de la proteína se ordenan en un único dominio que tiene una forma hexaédrica. Las dos subunidades superiores adyacentes forman una unidad dimérica asimétrica (C1-C2) que posee una forma de pirámide truncada (Figura 1). El tetrámero que se forma por sobreposición de dos dímeros (C1-C2¬C3-C4), presenta sólo dos tipos de interfases intersubunidades, la interfase C1-C2 que es exactamente la misma que C3-C4 (Intradimérica) y la interfase C1-C4 que es idéntica a C2-C3 (Interdimérica). El sustrato y sus análogos, el producto, e inhibidor Fru-2,6-P₂ y los iones metálicos se unen todos en, o cerca del sitio activo, que se encuentra adyacente a la interfase interdimérica C1-C2.

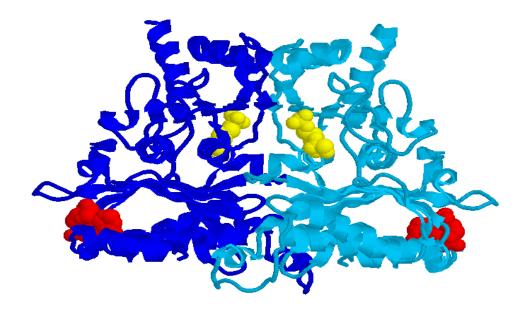


Figura 1: Estructura de la fructosa-1,6-bisfosfatasa obtenida de la difracción de rayos X, mostrando el dímero superior del tetrámero formado por las subunidades C1 y C2. En celeste, la subunidad C1 que es homologa a la C4, y en azul la subunidad C2 homologa a la C3. Se observa en amarillo el sustrato, y en rojo el inhibidor AMP.

2.2 Organización celular y subcelular del metabolismo

Se han descrito múltiples argumentos en favor de la existencia de interacciones específicas entre muchas enzimas secuenciales "solubles" de distintas vías metabólicas (para revisiones ver: *Srere*, 1987, *Ovadi & Srere*, 1996). De esta forma las enzimas estarían formando complejos multienzimáticos específicos para cada una de las vías del metabolismo. Existe amplia evidencia de que la mayoría de las enzimas del metabolismo intermediario operan *in vivo* en asociación a estructuras particuladas (*Srere*, 1987; *Uyeda*, 1992). Se ha argumentado que las interacciones heterólogas entre enzimas secuenciales proveen una ventaja cinética en cuanto al flujo de metabolitos a través de una vía metabólica (Ovádi, 1988, 1991). Este mecanismo

propuesto fue denominado como canalización de sustratos o "channeling" (Ovádi, 1991). Sin embargo, este último punto aún está sujeto a debate (Cornish-Bowden & Cárdenas, 1993; Welch & Easterby, 1994). Asimismo, existe evidencia que estos complejos operan en compartimientos subcelulares diferentes (Uyeda, 1992). Por lo tanto, la separación de las vías glicolítica y gluconeogénica dentro de la célula podría constituir un nuevo mecanismo que explica cómo el hígado y el riñón son capaces de segregar intermediarios metabólicos. Esta organización puede comprender asociación a subestructuras citológicas y/o la formación de complejos proteína-proteína. En este sentido, Ureta (1978) definió a las vías metabólicas como "reacciones secuenciales, unidireccionales, catalizadas por isoenzimas específicas asociadas en complejos poli-isoenzimáticos" y postuló que el metabolismo hidrocarbonado es el conjunto de varias vías metabólicas con muy pocos puntos de contacto entre ellas (Ureta, 1985). Para las enzimas glicolíticas existen pruebas que sugieren una organización por interacción entre enzimas secuenciales, pero no existen datos para las enzimas de la vía gluconeogénica (Ovadi, 1988). La interacción proteína-proteína cumple un papel importante en la localización de las proteínas. Wojtas et al., (1997) demostraron elegantemente que existe una relación directa entre la localización y función de una enzima. Estos investigadores determinaron que mutaciones en el gen de la isoforma I de glicerol fosfato deshidrogenasa (GPDH-I) de *Drosophila melanogaster* resultan en una mosca deficiente en vuelo. Demostraron que el fenotipo obtenido es producto de una alteración en la localización intracelular de GPDH, aldolasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Estos resultados mostraron que la glicólisis ocurre en un compartimiento celular especializado y que la ausencia de colocalización entre estas enzimas inhibe el flujo metabólico al alterar la canalización de sustratos. Inesperadamente, la sobreexpresión de la isoenzima III de GPDH demostró que la presencia de la actividad catalítica apropiada no fue suficiente para restablecer la capacidad de vuelo en estas moscas. Estos resultados sugieren que es indispensable la presencia de la isoforma específica y que ésta contiene las señales de localización e interacción con las isoenzimas de su vía metabólica (Wojtas et al., 1997). Finalmente, estos y otros resultados respaldan la idea que la localización de enzimas o complejos enzimáticos en compartimientos celulares específicos es indispensable para la regulación del metabolismo celular (Ureta, 1991; Yáñez et al., 2003).

Nuestro laboratorio ha obtenido resultados que indican que existe zonación de las enzimas del metabolismo de hidratos de carbono en órganos bifuncionales tales como hígado y riñón. Por ejemplo, se demostró que en tejido renal la FBPasa y aldolasa B se encuentran en una alta concentración en los túbulos epiteliales proximales (Sáez *et al.*, 2000), sugiriendo que los sustratos reabsorbidos por estos túbulos pueden ser usados directamente en este sitio en síntesis de glucosa. Por el contrario, se ha descrito que en tejido renal las enzimas glicolíticas se localizarían en los túbulos epiteliales distales y en el túbulo colector. En hígado de rata se ha observado una inmunotinción consistente con una zonación metabólica de las enzimas; FBPasa y aldolasa B, que se localizan preferentemente en la zona periportal, y las enzimas glicolíticas en una zona perivenosa (Lawrence *et al.*, 1986). Estos estudios nos llevan a pensar que FBPasa y aldolasa B podrían formar un complejo multienzimático, pues en hígado y riñón estas enzimas claramente muestran una distribución similar (Sáez *et al.*, 2000).

Guinovart y colaboradores han hecho interesantes avances usando la proteína verde fluorescente (GFP). Este grupo trabajó con las enzimas glucógeno sintasa (Ferrer *et al.*, 1997) y glucoquinasa (de la Iglesia *et al.*, 1999) encontrando que estas proteínas tienen una localización subcelular dependiente de las condiciones celulares presentes. Determinaron que la disminución en la concentración de glucosa del medio induce el traslado de GK y GS muscular desde el

citoplasma al núcleo, y que el aumento de ella restaura la localización citoplasmática. Estos estudios sugieren fuertemente que la localización intracelular de proteínas es compleja y que es una característica intrínseca de ellas y dependiente del estado metabólico de la célula. Es así como la formación de este complejo en el caso de GK, se asocia a una proteína reguladora que no solo modula su actividad catalítica sino que también su localización (de la Iglesia *et al.*, 1999; Shiota *et al.*, 1999). Esta proteína reguladora interacciona con la GK a bajas concentraciones de glucosa, la secuestra hacia el núcleo y luego, cuando los niveles de glucosa aumentan, la libera al citoplasma, mecanismo denominado "piggy-back". También se han descrito secuencias encargadas de la importación hacia el núcleo, las cuales se han denominado secuencias de importación nuclear (NLS). Las proteínas con señal de importación nuclear necesitan una maquinaria que las reconozca y normalmente son proteínas solubles que interaccionan con estas secuencias ricas en aminoácidos básicos.

Sorprendentemente, estudios de inmunodetección y microscopía confocal realizados en nuestro laboratorio, demostraron que en hepatocitos de rata la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa) se localiza en un compartimiento de la membrana plasmática y dentro del núcleo (Yáñez *et al.*, 2003). En FBPasa de hígado de rata se ha descrito la existencia de una secuencia NLS entre los aminoácidos 108 y 114, que también está presente en la secuencia de FBPasa de riñón de cerdo. Sin embargo, aún no se ha demostrado que ésta u otra secuencia de la FBPasa sea capaz de direccionar a esta enzima al núcleo. Tampoco se han realizado estudios que establezcan la región responsable de la localización intracelular y de la dinámica de FBPasa, en respuesta a glucosa, hormonas u otros metabolitos. En cuanto a estas posibles regiones la responsabilidad puede recaer en una secuencia o una estructura especifica. Con respecto a este último enfoque, se ha descubierto a través de estudios de mutagénesis y de localización con GFP que en la enzima 5-

lipooxigenasa, la región N-terminal (Chen & Funk, 2001), que en esta proteína es una estructura tipo barril beta, juega un rol esencial en la translocacion a la membrana nuclear desde el citoplasma o carioplasma. En FBPasa, la región N-terminal se ha sindicado como responsable de la inhibición de la enzima por AMP (Chatterjee *et al.*, 1985). Mediante estudios de proteolisis controlada de la FBPasa con tripsina, estos autores muestran que se, generan una enzima truncada en los primeros 25 aminoácidos, con un peso molecular de 34000 Da, que no responde al inhibidor alostérico AMP sino hasta concentraciones mayores a 2 mM. Ello contrasta con la enzima nativa que presenta un K_i para AMP de 14 μM, valor que disminuye en presencia de fructosa-2,6-bisfosfato siendo de 5,5 μM. Considerando que, AMP regula la formación de producto y, que la reclusión en el núcleo también, podemos pensar entonces que la región responsable del primer hecho podría tener importancia en el segundo, la dinámica subcelular de la enzima. Aunque no existen estudios que muestren al extremo C-terminal jugando algún rol en la cinética de la enzima, ni menos en su dinámica, resulta interesante estudiarla por la marcada singularidad de su estructura, una α-helice en los vértices del tetrámero.

2.3 La GFP en estudios de enzimas metabólicas

El descubrimiento de la denominada proteína verde fluorescente generó una gran herramienta para el desarrollo de la biología celular. Esta proteína con propiedades fluorescentes, obtenida principalmente de la medusa *Aequorea victoria* (Cubitt *et al.*, 1995), es usada como molécula reportera para el monitoreo de la expresión de genes y localización de proteínas *in vivo*, *in situ*, y en tiempo real (Chalfie *et al.*, 1994; Prasher *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Inouye *et al.*, 1994; Kain *et al.*, 1995). La GFP de Aequorea es una proteína de 238 aminoácidos, con 27

kDa de masa molecular. Posee un máximo de absorción a 395 nm y uno más pequeño a 475 nm. La excitación de GFP a 395 nm produce fluorescencia con un máximo de emisión a 508 nm. La **GFP** Aequorea debe absorción fluorescencia cromóforo un hidroxibencilidenimidazolinona formado por la ciclación de Ser 65, Tyr 66 y Gly 67 y una 1,2deshidrogenación de la tirosina (Cody et al., 1993; Niwa et al., 1996). Mutaciones sitio especificas de esta proteína han permitido obtener una GFP con una fluorescencia exacerbada. Esta proteína fue denominada EGFP, que significa "Enhanced green fluorescent protein" (Yang et al., 1996; Cormack et al., 1996). EGFP es una proteína que tiene solo un pico de excitación y debido a un incremento del coeficiente de extinción, tiene una emisión de fluorescencia alrededor de 35 veces más intensa que la GFP salvaje cuando es excitada a 488 nm, (Cormack et al., 1996). Además, esta proteína con nuevas características tiene ventajas para su manejo experimental (Cubitt et al., 1995) tales como: una alta estabilidad de la proteína madura purificada, la cual mantiene su fluorescencia a pH y concentraciones de detergentes elevados, además de resistir muchas proteasas por varias horas (Ward et al., 1982; Cubitt et al., 1995).

El uso de la GFP hoy en día tiene variadas aplicaciones tales como: a) gen reportero para evaluar funcionalidad de promotores; b) como proteína reportera de movimiento o migración celular en tiempo real sin la necesidad de tener que agregar agentes adicionales, fijar o matar las células; c) como proteína de fusión, que significa que se puede acoplar la GFP a una proteína de interés con lo cual ésta adquiere fluorescencia, y de este modo se puede observar su localización y función fisiológica; d) en ensayos de FRET ,transferencia de energía de fluorescencia en resonancia, para estudiar interacción entre dos proteínas (Cubitt et al., 1995).

2.4 Acerca de este estudio

De acuerdo a los antecedentes expuestos y a la línea de investigación de nuestro laboratorio, se ha propuesto la siguiente hipótesis de trabajo: "la localización subcelular de fructosa-1,6-bisfosfatasa es regulada por señales presentes en su estructura primaria y por la modulación ejercida por metabolitos intermediarios."

Pretendemos estudiar la localización subcelular de FBPasa de riñón de cerdo unida a GFP en líneas celulares renales humanas, HEK 293 T, y de cerdo, LLCPK-1. Así se realizarán estudios para determinar la función de los extremos carboxilo- y amino-terminal en la localización subcelular y en la respuesta de la proteína ante glucosa. Utilizando el fragmento codificante de esta isoenzima, se generarán las respectivas mutantes fusionadas a GFP (FBPasa-N20/EGFP y EGFP/FBPasa-C38). La primera proteína está truncada en los 20 primeros aminoácidos y la otra en los 38 últimos.

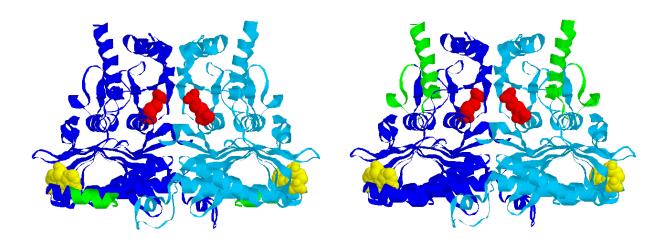


Fig.2: FBPasa-N20, en verde se observa la región truncada de la proteína nativa.

Fig.3: FBPasa-C38, en verde se observa la región truncada de la proteína nativa.

Para visualizar el comportamiento de las mutantes en respuesta a medios con distintas concentraciones de glucosa se montó un sistema de transfección y expresión de la enzima en las células eucarióticas ya mencionadas. Para esto se contemplan los siguientes objetivos específicos: a) generar las mutantes de FBPasa de riñón de cerdo correspondiente a la enzima truncada en los primeros 20 aminoácidos y otra con una deleción correspondiente a los últimos 38 aminoácidos; b) elaborar los plasmidios pEGFP-N1/FBPasa-N20 pEGFP-C1/FBPasa-C38 (que expresan las proteínas de fusión FBPasa-N20/EGFP y EGFP/FBPasa-C38, respectivamente); y c) con estas construcciones transfectar las líneas celulares HEK 293 T y LLCPK-1, para observar su localización bajo distintas concentraciones de glucosa en el medio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron los siguientes:

Sigma Chemical Co.: kanamicina, tris[hidroximetil]aminometano (Trizma-base), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), glucosa, RNasa A, lauril sulfato de sodio (SDS), bicarbonato de sodio, azul de bromofenol, polilisina.

Merck, Darmstadt, Alemania: hidróxido de sodio, isopropanol, etanol, dimetil sulfoxido (DMSO), fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de sodio.

GIBCO, Life-Techonologies: medio Eagle modificado de Dulbecco 4,5 g/l glucosa (DMEM-HG), medio de Eagle modificado por Dulbecco 1g/l glucosa (DMEM-LG), medio de Eagle modificado por Dulbecco sin glucosa (DMEM).

Invitrogen: medio LB Broth base en polvo (Lennox L Broth base), medio LB-agar Broth base en polvo (Lennox L Broth base), enzima de restricción Sal I, agarosa ultra pura, solución antibiótico-antimicótico, tripsina, kit "Concert Rapid Plasmid miniprep System", Lipofectamina 2000, bromuro de etidio, enzima de restricción EcoRI.

Clontech: plasmidios pEGFP-C1, pEGFP-N1.

Promega: *E. coli* cepa JM 109, enzima de restricción *Eco* RI, T₄ DNA polimerasa, T₄ DNA ligasa, *Pyrococcus furiosus* DNA polimerasa (pfu), pGEM-T Easy System.

J.T.Baker: ácido clorhídrico, acetato de potasio, ácido bórico, cloruro de sodio.

BioLabs: enzima de restricción *Hind* III, enzima de restricción *Bam* HI, enzima de restricción *Nde* I, enzima de restricción *Pst* I.

Perkin Elmer: desoxiribonucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP).

5 Prime→3 Prime, Inc.: agua desionizada.

Riedel de Haen: rojo fenol.

Fluka AG: paraformaldehido.

Dako: medio de montaje "Fluorescent mountaing medium".

Frigosor: suero fetal de bovino.

BioSonda: Se encargó la síntesis de los siguientes oligonucleótidos:

FBPasa riñón de cerdo-N20:

NH₂N20: 5' CAgTCgACgCATATgggCAggAAggCCCgCggCAC 3'

COOH pEGFP-N1: 5' CggTggATCCTTggCTgCTTCTgATATAT 3'

FBPasa riñón de cerdo-C38:

COOHC38: 5' TggATCCTCACTTCCCAgTggTggCCAg 3'

NH₂: 5' TCAAgCTTCgATgACggACCAggCggCC 3'

3.1.2. Equipos

Balanza analítica Shimadzu (Libror AEX-120 G), espectrofotómetro Hewlett Packard (8453), pHmetro Radiometer Copenhagen (PHM 83 autocal pH meter), estufa 37°C Bluem (dry type bacteriological incubator), balanza Shimadzu (Libror EB-3200 S), termociclador MJ Research (Mini Cycler), centrífuga Fisher Scientific (Micro V), micropipetas Gilson, horno microondas

18

Somela (E 70 TF-7), cámara para geles de secuencia Life Technologies (model S2), fuente de

poder Life Technologies (model 500), agitador termorregulado lab-line instruments (Lab-Line

Orbit Environ-Shaker), microcentrífuga mikro 22R, centrifuga Sorvall (RC 5C), cámara de

bioseguridad Nuaire (class II type A), estufa de cultivo con inyección de CO₂ Nuaire (Ir

Autoflow), microscopio invertido Nova (IN 833), microscopio de fluorescencia Zeiss (Axioskop

2 HBO 100 acoplado a cámara fotográfica digital NIKON DXM 1200), microscopio confocal

Zeiss (Micro System LSM Axiovert 135 M), baño termorregulado Kottermann, vortex Fisher

(Genie 2), cámara digital para geles de agarosa Spectroline (model CA-1000/F) con monitor,

unidad archivadora digital Spectroline (model AU-1000/F) e impresora Sony (UP-860),

Nanopure Infinity Ultrapure Water System (Barnstead).

3.2 METODOS

3.2.1 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

En la obtención de los fragmentos codificantes para cada una de las mutantes se utilizó la

técnica de PCR, empleando como templado el vector pALTER/FBPasa de riñón de cerdo. Para

ello se utilizaron los siguientes oligos:

FBPasa riñón de cerdo-N20:

 $NH_2N20: 5 \\ {}^{\circ}CAgTCgACgCATATgggCAggAAggCCCgCggCAC} \\ 3 \\ {}^{\circ}$

COOH pEGFP-N1: 5' CggTggATCCTTggCTgCgTgCTTCTgATATAT 3'

FBPasa riñón de cerdo-C38:

COOHC38: 5' TggATCCTCACTTCCCAgTggTggCCAg 3'

NH₂: 5' TCAAgCTTCgATgACggACCAggCggCC 3'

Para la reacción se mezclaron 5 μl de tampón PCR 10X , 4 μl de mezcla de nucleótidos trifosfatados en una concentración de 2,5 mM de cada uno en la mezcla, 2 μl de solución de MgSO₄ 50 mM, 4 μl de vector pALTER/FBPasa de riñón de cerdo, 4 μl de cada pareja de oligos a una concentración de 10 μM, 1,25 U de Platinium Taq Polimerasa y 26 μl de agua libre de RNAsa y DNAsa. Se utilizó el termociclador con los siguientes programas, para la mutante FBPasa-C38: incubación 1 min a 94 °C; desnaturación por 45 seg a 94 °C; apareamiento 1 min a 62 °C; elongación 2 min a 68 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 68 °C, por 33 ciclos. Para la mutante FBPasa-N20 en cambio el programa fue: incubación 1 min a 94 °C; desnaturación por 45 seg a 94 °C; 1 min a 58 °C; 3 min a 70 °C, y una la etapa de extensión final de 15 min a 72 °C, por 25 ciclos.

3.2.2 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El gel se preparó a una concentración de 1,2 % fundiendo 0,48 gr de agarosa en 40 ml de tamón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, se dejó enfriar hasta 60 °C, y se virtió sobre el molde (8,5 x 6,5 cm). El gel se pre-corrió por 5 min a 10 V en tampón TBE 1X. Las muestra de DNA se preparon mezclando 10 μl del DNA (0,1μg/μl), 1 μl de tampón de carga para DNA 10X (glicerol 50%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,5% en tampón TE) y 1 μl de bromuro de etidio 0,5 gr/ml, se mezcló por pipeteo y se cargó con micro pipeta cada muestra en el gel. Luego, se realizó la corrida electroforética aplicando 5 V/cm por 30 min y se observó la migración del DNA en un

transluminador con luz ultra-violeta por fluorescencia del bromuro de etidio intercalado entre las bases del DNA.

3.2.3 Extracción de DNA desde geles de agarosa

Se ocupó el kit comercial "CONCERT TM Rapid Gel Extraction System", para extraer DNA desde un gel de agarosa al 1 %. Se cortó el area del gel que contenía el DNA, se agregó la solución LI y se calentó por 15 min a 50 °C, mezclando regularmente. Se cargó la solución con la agarosa disuelta en una columna. Se centrifugó por 1 min a 12.000 X g y se eliminó el eluato, se adicionó solución L1, para lavar, se esperó 1 min a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó eliminando la solución que pasó a través de la columna. Se agregó 500 μl de la solución de lavado L2, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 2 veces para eliminar toda la solución que pasa por la columna. Se eluyó el DNA cargando la solución TE a 65 °C en la columna, se incubó 1 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12.000 X g por 2 min recolectando la solución en un tubo Eppendorf limpio.

3.2.4 Subclonamiento de los productos de amplificación en el vector pGEM-T

El fragmento de PCR purificado de la forma descrita anteriormente fue sometido a un procedimiento para la adición de una adenosina extra en los extremos 5' terminal, esto a través de la reacción de la Taq DNA polimerasa.

Se preparó una mezcla de reacción consistente en: 7,8 µl del producto de PCR purificado; 1,0 µl de buffer de reacción, conteniendo MgCl₂. Taq DNA Polimerasa 10x, dATP en una

concentración final de 0,2 mM, 1,0 µl de Taq DNA Polimerasa para un volumen final de 10 µl. Se incubó la mezcla por 30 min a 70 °C. Por último, se utilizaron 2 µl de esta solución en una reacción de ligación usando el vector pGEM-T Easy de Promega, el cual presenta en ambos extremos 3' una timidina adicional, lo que mejora la eficiencia de la reacción de ligación por formarse una interacción por complementariedad entre la adenina y la timidina del fragmento y vector, respectivamente.

Este vector, además de poseer los genes que confieren resistencia a los antibióticos ampicilina y kanamicina, posee también el gen de la β-galactosidasa, característica que le permite al sistema poder discriminar las colonias transformadas con los vectores que autoligaron, y por ende sin interés, de las que poseen el vector que lo hicieron exitosamente. Por estar el sitio de clonamiento interrumpiendo la secuencia de la enzima señalada si se produce la reacción de ligación sin el inserto habrá una reconstitución del gen, y por lo tanto, expresión de la β-galactosidasa que hidrolizará el sustrato presente en el medio (X-Gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) para dar un producto coloreado, azul con colonias del mismo color. Las demás colonias serán blancas.

3.2.5 Transformación de bacterias E. coli

Se prepararon bacterias *E. coli* cepa JM 109 utilizando el método CaCl₂. Estas se mantienen alicuotadas en cantidades de 0,1 ml y congeladas a –70 °C. Una vez descongeladas en hielo, a las bacterias se les agregó de 0,5 a 1,0 μl del DNA plasmidial producto de la ligación (aproximadamente 100 ng); se mezcló suavemente y se dejó una hora en hielo. Luego las muestras fueron incubadas a 42 °C por 90 seg., y su contenido se cargó a un tubo Falcon de 15 ml

conteniendo 1 ml de medio LB líquido, el cual se incubó una hora a 37 °C con una agitación constante de 225 r.p.m. Transcurrida la hora se sembraron dos placas LB-agar con el antibiótico correspondiente (ampicilina para bacterias transformada con el plasmidio pGem T EASY y kanamicina para bacterias transformada con el plasmidio pEGFP-C1. Se incubaron las placas en estufa de cultivo a 37 °C por 12 horas y por la mañana se observó el crecimiento bacteriano de las bacterias que adquirieron la resistencia al antibiótico respectivo.

3.2.6 Elaboración del medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar

Los medios de cultivo líquido se hicieron utilizando una concentración de 20 g/l de medio LB, autoclavándose inmediatamente después de su preparación (el medio debe enfriarse antes de ser utilizado).

Las placas LB-agar se prepararon mezclando 20 g/l de medio LB, y 15 g/l de agar. Una vez autoclavado, se deja enfriar la mezcla hasta 50 °C y se agregó el antibiótico de interés (Ampicilina 120 μ g /ml; Kanamicina 40 μ g /ml), se mezcló por agitación circular y se procedió a adicionar 30 ml de esta solución en placas Petri estériles.

3.2.7 Purificación de DNA plasmidial por el método de lisis alcalina

En 5 ml de medio LB se crecierón por 24 h a 37 °C con agitación constante varias de las colonias blancas obtenidas anteriormente, junto al antibiótico correspondiente. Luego se centrifugó a 4.000 x g por 6 min, se eliminó el máximo posible de sobrenadante, dejando el sedimento bacteriano tan seco como fue posible. Este se resuspendió en 300 µl de una solución

fria de: 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 3 μl de Rnasa. Se dejó la solución por 5 min a temperatura ambiente, y, posteriormente, se agregaron 200 μl de una solución de NaOH 0,2 N y SDS 1 %; se mezcló por inversión y se mantuvo el tubo en hielo por 5 min. Se adicionaron 150 μl de acetato de potasio frío (3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato pH 4.8), se mezcló por inversión del tubo hasta ver la formación de un flóculo blanquecino, se mantuvo en hielo por 5 min, se centrifugó por 10 min a una valocidad sobre 12000 x g, a 4 °C, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo donde se agregó un volumen de isopropanol frío seguido de una incubación por otros 5 min en hielo. Se repitió la centrifugación, ahora por 15 min, para obtener un precipitado blanco y se eliminó el sobrenadante. Al sedimento se le agregó 500 μl de etanol al 70 %, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar de la misma forma. Luego, se eliminó el sobrenadante, se realizó un "spin down" y se dejó secar el sedimento, asegurándose de eliminar el etanol. Por último, se resuspendió el precipitado en 50 μl de agua libre de nucleasas.

3.2.8 Análisis de digestión con endonucleasas de restricción

Los análisis con endonucleasas de restricción, fueron realizados utilizando 2 μg de DNA plasmidial (alrededor de 10 μl de volumen) a los cuales se le agregó 0,5 μl de enzima (26000-100000 U/ml) y 1,1 μl de tampón apropiado para cada enzima. Luego está solución se incubó por 2 h a 37 °C. En los casos de doble digestión, se le agregó la misma cantidad anteriormente indicada de cada enzima, pero esta vez se escogió un tampón que no afectase a ninguna de las enzimas de la reacción (concentración de sales), realizando la reacción con la

misma concentración de enzimas pero en 20 µl a 50 µl finales de reacción. Las digestiones con endonucleasas para liberar y purificar fragmentos de DNA se hicieron de manera similar, pero con volúmenes de digestión 4-5 veces mayor es, incrementando en forma proporcional la cantidad de DNA y las unidades de enzima de restricción. Los resultados fueron visualizados en gel de agarosa preparado y en las condiciones descritas anteriormente.

3.2.9 Subclonamiento en los vectores pEGFP-N1 y pEGFP-C1

Muestras de DNA provenientes de preparaciones plasmidiales de pEGFP-N1 y pGEM-FBPasa-N20 se sometieron a digestión doble con BamH I y Sal I, mientras que pEGFP-C1 y pGEM-FBPasa-C38 se digirieron con BamH I y Hind III (durante 3 h a 37° C). Terminado el tiempo de incubación las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en agarosa 1%. Los insertos liberados, de aproximadamente 1kb, desde los vectores pGEM-FBPasa y los vectores cortados pEGFP-N1 y pEGFP-C1 fueron seccionados desde el gel de agarosa y purificados utilizando el kit "CONCERT TM Rapid Gel Extraction System". Una vez finalizada la extracción correspondiente a los cDNAs de las FBPasas mutantes y los plasmidios linearizados pEGFP-N1 y pEGFP-C1, se verificó su tamaño y pureza por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, el inserto se sometió a ligación con el plasmidio correspondiente utilizando una relación 1:5 de inserto versus vector (el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción). Esta mezcla se incubó a 45 °C por 5 min, luego se agregó tampón de ligasa, 0,5-1 U/µl de DNA T4 DNA ligasa, se incubó por 12-14 h a 16 °C. Finalmente, esta mezcla se utilizó para transformar bacterias E. coli JM109 o BL21 DE3 por el método tradicional descrito anteriormente. El rastreo de las colonias se realizó por purificación con el método de lisis alcalina y subsiguiente análisis de restricción. Con el DNA de las colonias positivas se transformaron bacterias *E. coli* cepa JM 109 según el procedimiento antes descrito.

3.2.10 Purificación de DNA plasmidial por kit comercial

Se utilizaron los kits comerciales "mini prep" Omega y Gibco BRL. Básicamente ambos kits utilizan el método de lisis alcalina. Para ello se crecieron 5 a 10 ml de medio LB con el antibiótico adecuado una colonia extraída de un cultivo en placa agar LB de 24 h. Se dejó crecer 24 h a 37 °C con agitación constante. Luego se centrifugó a 4.000 x g por 6 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió con 250 μl de solución de homogeneización (solución I) del kit, luego se agregaron 250 μl de la solución de lisis (solución II) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 350 μl de la solución de neutralización (solución III), se mezcló por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. El sobrenadante se aplicó en la columna del kit para la retención del DNA plasmidial en la matriz de sílice, se centrifugó 1 min a 10.000 rpm y se eliminó el eluato, la columna se lavó 2 veces con solución de lavado seguida de su correspondiente centrifugación. Finalmente se eluyó el DNA, adicionando 100 μl de solución TE (buffer Tris-EDTA pH 8.0) calentada previamente a 65 °C y, por último, centrifugando por 2 min a 10.000 r.p.m.

3.2.11 Cuantificación de DNA plasmidial

La cuantificación de las soluciones de DNA plasmidial se realizó mediante un procedimiento espectrofotométrico, en el cual a la muestra de DNA diluida 10-100 veces se le midió la absorbancia a 260 nm. La concentración aproximada de estas muestras se determinó

utilizando la relación siguiente: 1 unidad de absorbancia es equivalente a 50 μg/ml de DNA doble hebra. La concentración final de las soluciones se obtuvo al multiplicar el resultado anterior por la dilución de la muestra.

3.2.12 Cultivo celular

Las células HEK 293 T, A-10 y LLC-PK1 fueron descongeladas y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % suero bovino fetal y 1 % antibiótico/antimicótico (penicilina, estreptomicina, amfotericina b), en una atmósfera con 5 % CO₂ a 37°C. Las células fueron disociadas y cultivadas a distintas diluciones, manteniéndolas hasta confluencia. Después de 2-4 días, dependiendo de la tasa de división celular de cada línea, las células fueron incubadas por 0,5 a 1 min en una solución de tripsina -EDTA (tripsina 0,25 % y EDTA 1 mM en PBS 1X) para disociarlas y poder realizar siembras en placas o expandir la línea.

3.2.13 Transfecciones transientes

La transfección de las células HEK 293 T y LLC-PK1, con los plásmidos pEGFP-C1/FBPasa-C38 y pEGFP-N1/FBPasa-N20, se realizó utilizando el reactivo de transfección en base a lípidos catiónicos lipofectamina 2000, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Invitrogen). En las transfecciones con lipofectamina 2000 se usó una razón entre masa de DNA (μg) y volumen de reactivo de transfección (μl) de 2:1, para la línea HEK 293 T y de 1:1 para la línea LLC-PK1. En resumen, el protocolo de transfección establece que el DNA plasmidial (2 ó 1 μg, dependiendo de la línea) y la lipofectamina (1 μl) se diluyen en 50 μl de DMEM no suplementado;

posteriormente se mezclan ambas diluciones y se incuba por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agrega esta solución a placas de 35 mm de diámetro, conteniendo las células en cultivo a un 50-70 % de confluencia, crecidas sobre cubreobjetos esterilizados en etanol 100 % y tratados por 24h con una solución de polilisina 0,1 %. Luego, las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂, en medio DMEM completo 5 mM glucosa, durante 24 h. Posteriormente, se cambió el medio para eliminar el exceso de reactivo de transfección. Para analizar el efecto de distintas concentraciones de glucosa en el medio se utilizó DMEM completo sin glucosa, con glucosa 5 mM y con glucosa 25 mM) Luego, se fijaron las monocapas de células sobre los cubreobjetos con PBS/paraformaldehído 4% por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 1X. Después de secar los cubreobjetos, se montaron en portaobjetos con medio de montaje para muestras fluorescentes. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante microscopía de epifluorescencia.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de las proteínas mutantes FBPasa-N20 y FBPasa-C38 a través de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Para la obtención de los fragmentos codificantes de las formas mutantes de FBPasa de riñón de cerdo se diseñó un PCR mutagénico, cuya principal característica es la de utilizar partidores complementarios a una secuencia interna del cDNA, en este caso FBPasa de riñón de cerdo. Estos partidores no incorporan los primeros 20 aminoácidos de la región amino terminal ni los 38 aminoácidos de la región carboxilo terminal (ver Materiales y Métodos). En la figura 1 se muestran los productos de amplificación que poseen el tamaño esperado para las enzimas mutantes, 964 bases para FBPasa-N20 y de 909 bases para FBPasa-C38. Los fragmentos definitivos fueron amplificados usando DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (pfu) obteniéndose los mismos resultados. Debido a la formación de dímeros de timidina que provoca la visualización del DNA cuando tiene bromuro de etidio intercalado no se muestran los resultados obtenidos con esta enzima.

4.2 Clonación de los fragmentos obtenidos en el vector comercial pGEM-T Easy

Los productos de amplificación fueron extraídos desde el gel (3.2.3) y sometidos a una reacción de ligación junto al vector pGEM-T Easy (3.2.4). Los plasmidios obtenidos por el método de lisis alcalina (3.2.7) fueron sometidos a ensayos de restricción con diferentes enzimas. El tamaño esperado para los fragmentos se calculó en base al mapa físico de cada vector.

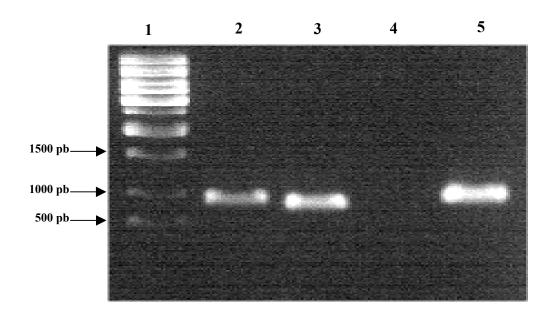


Figura 1: Análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR. Gel de agarosa al 1,2%. Carril 1: estándar de DNA de 1Kb; producto de amplificación con los partidores generadores de la mutante; carril 2: FBPasa-N20; carril 3: FBPasa-C38; carril 4: control negativo de la reacción; carril 5: control positivo de la reacción utilizando partidores para amplificar la secuencia completa de FBPasa de riñón de cerdo (Rc).

Los vectores digeridos que incorporaron los fragmentos de FBPasa y presentaron las bandas esperadas en un gel de agarosa al 1,2% fueron utilizados en la siguiente etapa experimental.

4.3 Subclonación de las FBPasas mutantes en los vectores pEGFP-C1 y pEGFP-N1

Utilizando los vectores generados anteriormente se obtuvieron los fragmentos codificantes para cada enzima a través del corte con las enzimas de restricción *Bam* HI / *Sal* I para liberar FBPasa-N20 y *Bam* HI / *Hind* III para liberar FBPasa-C38. Los fragmentos fueron purificados y ligados al vector respectivo que fue tratado con las mismas endonucleasas de restricción (3.2.9). Para construir la mutante del extremo amino (FBPasa-N20) se utilizó el plasmidio pEGFP-N1, y para la del extremo carboxilo (FBPasa-C38) se utilizó el plasmidio, pEGFP-C1. Una vez purificados los plasmidos resultantes de la reacción de ligación estos se verificaron a través de análisis de restricción, usando como guía los mapas de restricción que se muestran en la figura 2. El análisis electroforético de los productos de digestión se muestran en la figura 3, observándose los fragmentos del tamaño molecular esperado. En el carril 5 de la figura 3A se ve la banda correspondiente a 922 pb correspondiente al fragmento codificante de FBPasa-N20 liberado con las enzimas de restricción con las que se generaron los extremos cohesivos (señaladas arriba). Asimismo, en el carril 6 de la figura 3B se ve la liberación del fragmento FBPasa-C38 que muestra un tamaño aproximado de 900 bp.

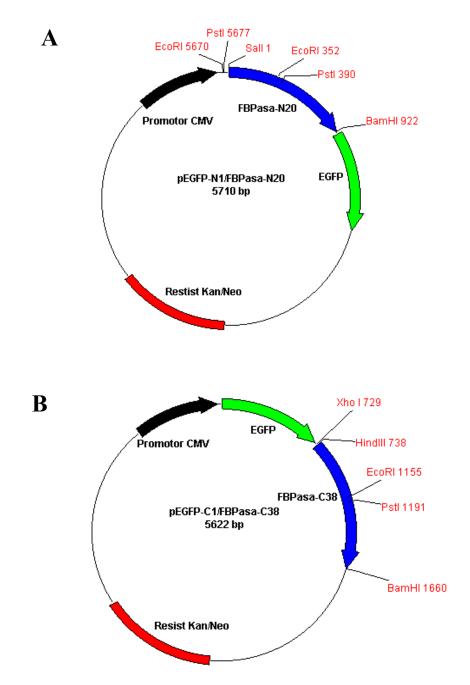


Figura 2: Esquema de los mapas físicos de los vectores de expresión. A) pEGFP-N1/FBPasa-N20; B) pEGFP-C1/FBPasa-C38. En ambos se aprecian los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas.

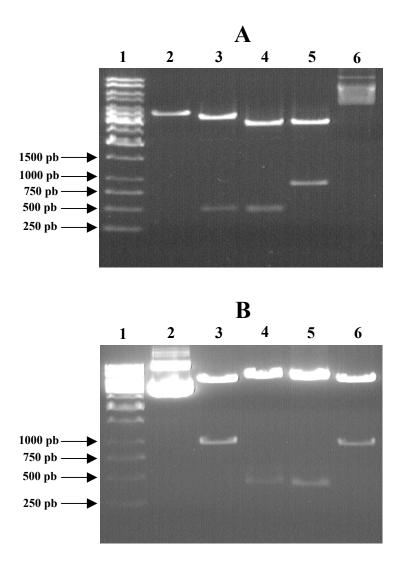


Figura 3: Análisis de restricción de los vectores pEGFP-N1/FBPasa-N20 y pEGFP-C1/FBPasa-C38. Gel de agarosa 1,2%. A) Plasmidio pEGFP-N1/FBPasa-N20 con diferentes enzimas de restricción. Carril 1: Estándar de DNA de 1 Kb; carril 2: *Bam* HI; carril 3: *Pst* I; carril 4: *Eco* RI; carril 5: *Bam* HI/*Sal* I; carril 6: constructo sin digerir. B) Plasmidio pEGFP-C1/FBPasa-C38, carril 1: Estándar de DNA de 1 Kb; carril 2: vector sin digerir; carril 3: *Xho* I/*Bam* HI; carril 4: *Xho* I/*Pst* I; carril 5: *Bam* HI/*Eco* RI; carril 6: *Bam* HI/*Hind* III.

4.4 Localización subcelular de las enzimas mutantes y de la proteína de tipo salvaje en la línea celular HEK-293T

La expresión de las enzimas salvaje y de las mutantes de FBPasa de riñón de cerdo fusionadas a EGFP en las líneas celulares usadas en este estudio fue lograda a través del método denominado transfección transiente explicado en el punto 3.2.13. Al finalizar el experimento y fijadas las muestras, se observaron por microscopía de epifluorescencia y confocal.

En esta línea celular derivada de riñón de embrión humano la fluorescencia proveniente de EGFP-C1/FBPasa-Rc, FBPasa-Rc/EGFP-N1 fue encontrada en el citoplasma de las células, no hubo variación en la localización aún ante el cambio en la concentración de glucosa (Figura 4A y 5). Lo mismo ocurrió con las mutantes, estas no presentaron diferencia en su localización con respecto a la enzima salvaje, ni se observó que traslocaran al núcleo o a algún compartimento subcelular en respuesta a las distintas concentraciones de glucosa existente en los diferentes medios. La proteína verde fluorescente por si sola, a diferencia de los resultados obtenidos con ella fusionada a cualquiera de las proteínas nombradas arriba, se encontró en los compartimentos subcelulares, núcleo y citoplasma, e incluso en el nucléolo (Figura 4B). Este último resultado no es sorprendente considerando que el tamaño de EGFP, el cual es menor al tamaño de exclusión del poro nuclear.

El análisis por microscopia confocal no mostró diferencia con lo obtenido por microscopía de epifluorescencia (Figura 5), observándose, una marcada localización citoplasmática de las proteínas de fusión con una pequeña presencia de fluorescencia en el núcleo. Esto es evidente al medir la fluorescencia a lo largo de una línea trazada a través de una célula. Este análisis resulta en un gráfico de intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, UA), *versus* la distancia recorrida por esta línea en μm, resultado que se muestra en la figura 6.

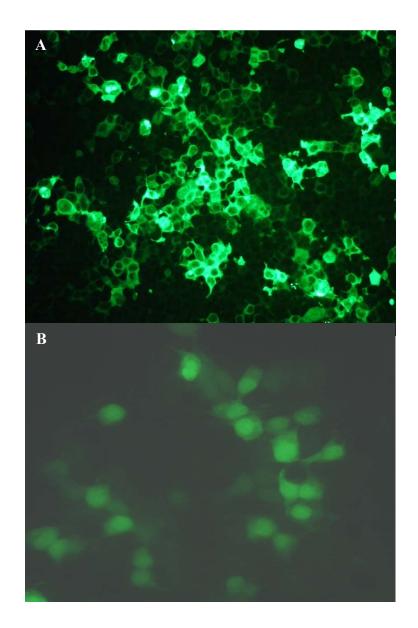


Figura 4: Localización subcelular de las proteínas de fusión en la línea HEK 293. Las imágenes mostradas son representativas de la ubicación de las proteínas de fusión EGFP /FBPasa-Rc, EGFP/FBPasa-C38, FBPasa-Rc/EGFP y FBPasa-N20/EGFP obtenidas por microscopía de epifluorescencia. Las imágenes corresponden a células en medio 5mM glucosa: A) la proteína EGFP/FBPasa-Rc, y en B) 5mM glucosa con EGFP-C1.

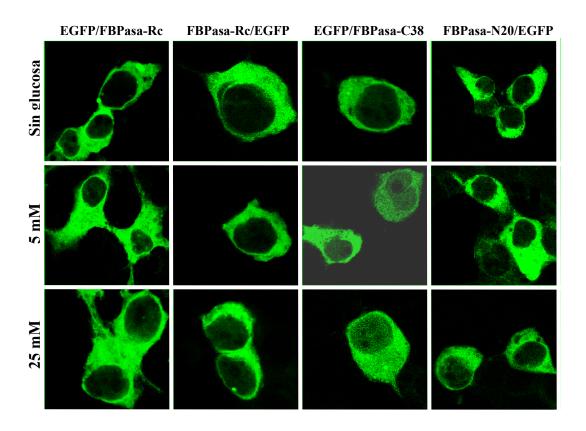


Figura 5: Localización de las proteínas de fusión en la línea celular HEK 293 cultivadas en distinta concentración de glucosa. Ubicación subcelular de las diferentes proteínas de fusión en células cultivadas en medios con distinta concentración de glucosa.

De esta forma se puede dar un valor numérico aproximado a la ubicación de las proteínas de fusión, el cual en estas células es en promedio en el citoplasma alrededor de 100 UA y en el núcleo es de 7,7 UA, dando una razón núcleo/citoplasma igual a 0,077. Estos resultados muestran cuantitativamente que la distribución de EGFP/FBPasa-C38 y FBPasa-N20/EGFP fue mayoritariamente citoplasmática en esta línea celular e independiente de las concentraciones de glucosa en el medio.

4.5 Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas de fusión en la línea celular LLC-PK1

Por microscopía de epifluorescencia la ubicación de las diferentes FBPasas fue generalmente citoplasmática para la mayoría de las células (Figura 7A, B, C, D) aunque también se observó una localización nuclear en un número menor de células en cada muestra. Las proteínas de fusión FBPasa-Rc/EGFP, EGFP/FBPasa-Rc y FBPasa-N20/EGFP fueron mayoritariamente encontradas en cada campo observado con una localización citosólica (Figura 7B, C, D). En células que expresan EGFP/FBPasa-C38 la ubicación citoplasmática también fue alta, pero subió la incidencia de las células que presentan ubicación nuclear en cada campo analizado (Figura 7A). Al igual que en HEK 293, el control se localizó en ambos compartimentos celulares a la vez, en la totalidad de las células, encontrándose incluso en el nucleolo (Figura 7E).

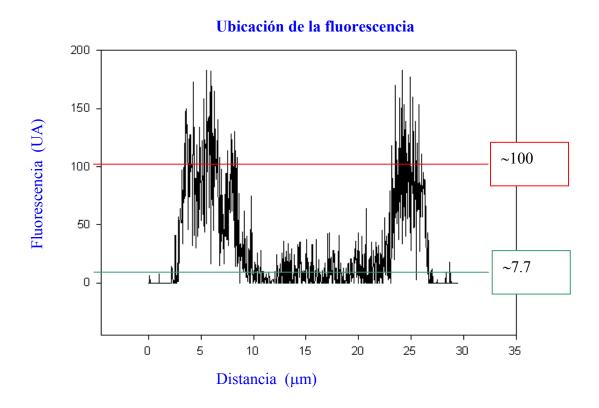


Figura 6: Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma. Fluorescencia en el curso de una línea trazada a través del plano medio de una célula. En verde el valor aproximado que toma la fluorescencia en el núcleo y en rojo los valores en el citoplasma. Razón N/C = 0,077.

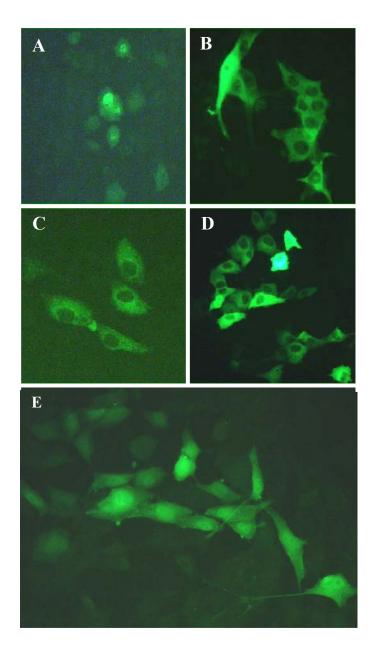


Figura 7: Localización de las proteínas de fusión en la línea LLC-PK1. Las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia muestran la ubicación de las proteínas de fusión. En: A) EGFP/FBPasa-C38; B) EGFP/FBPasa-Rc; C) FBPasa-N20/EGFP; D) FBPasa-Rc/EGFP. E) Proteína verde fluorescente.

Mediante microscopía confocal se analizaron las distintas ubicaciones de la fluorescencia en estas células reafirmándose lo encontrado con el análisis por microscopia de epifluorescencia. De esta manera, se logró cuantificar la ubicación subcelular y definir un criterio cuantitativo para comparar las distintas ubicaciones de la fluorescencia:

Nuclear: Cuando la fluorescencia es apreciable en el núcleo en una proporción dos veces mayor con respecto al citoplasma (Figura 8 y 9) y cuando la fluorescencia es de igual intensidad en el núcleo y en el citoplasma razón N/C aproximadamente 1 (Figura 10 y 11).

Citoplasmática: Cuando la fluorescencia es apreciable en el citoplasma en una proporción de al menos dos veces mayor con respecto al núcleo (figura 12 y 13).

En la línea celular LLC-PK1 se obtuvieron tres importantes datos que se resumen en la tabla 1: en primer lugar, la enzima silvestre está presente en un mayor número de células en el compartimiento citoplasmático cuando existe glucosa en el medio, y este número de células disminuye al crecer éstas en un medio sin el azúcar. Segundo, la ubicación de las proteínas mutantes fue considerablemente distinta a la de la proteína silvestre e independiente de la presencia de glucosa. La proteína EGFP-C1/FBPasa-38 está presente en un número de células en una ubicación citoplasmática igual al número de células con una ubicación nuclear. Por el contrario, la FBPasa-N20/EGFP está claramente en un mayor número de células en una ubicación citoplasmática; este porcentaje es más elevado que el de la enzima silvestre. Tercero: las proteínas de fusión mutantes, a diferencia de las proteínas de fusión teniendo la enzima silvestre, no registra ninguno de los cambios arriba citados frente a presencia de glucosa en el medio, es decir, las proteínas mutantes pierden la capacidad de respuesta a glucosa (Tabla 1).

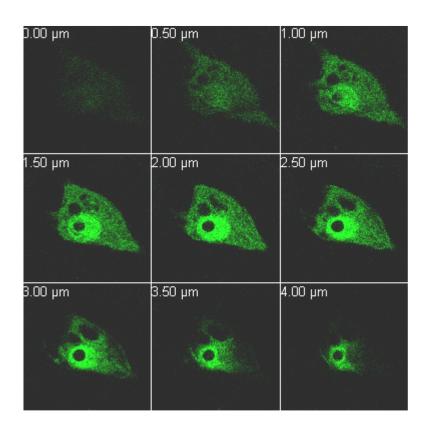


Figura 8: Ejemplo de localización subcelular nuclear de la proteína de fusión en la línea celular LLC-PK1. Plano medio de una serie confocal (2,0 μm) de 9 cortes de 0,5 μm, donde se muestra la distribución nuclear de la fluorescencia. Esta imagen corresponde a la proteína de fusión EGFP-C1/FBPasa-C38 y es representativa de esta ubicación en las demás proteínas.

Ubicación de la fluorescencia Fluorescencia ~75 ~31 Distancia (µm)

Figura 9: Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma en la ubicación nuclear de las proteínas de fusión. Fluorescencia en el curso de una línea trazada a través del plano medio de una célula. En verde el valor aproximado que toma la fluorescencia en el núcleo y en rojo los valores del citoplasma. Razón N/C = 2,42.

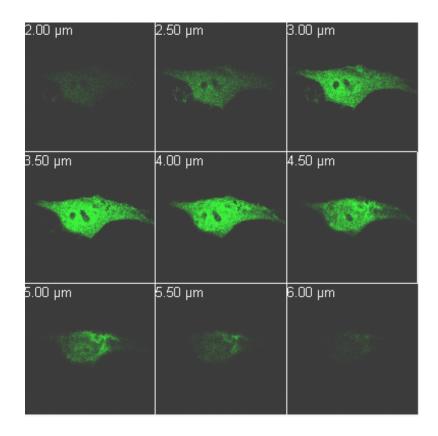


Figura 10: Ejemplo de localización subcelular uniforme de las proteínas de fusión en la línea celular LLC-PK1. Plano medio de una serie confocal (2,0 μm) de 9 cortes de 0,5 μm, donde se aprecia la distribución uniforme de la fluorescencia. Esta imagen en particular corresponde a la proteína de fusión EGFP-C1/FBPasa-Rc y es representativa de esta ubicación en las demás proteínas.

Ubicación de la fluorescencia

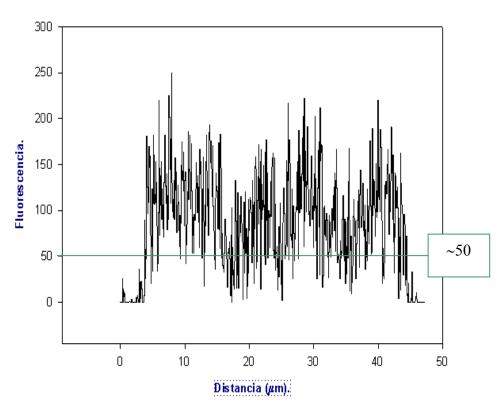


Figura 11: Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma en la ubicación uniforme de las proteínas de fusión. Intensidad de fluorescencia en el curso de la línea trazada a través del plano medio de una célula. En verde el valor aproximado que toma la fluorescencia en el núcleo y en rojo los valores del citoplasma. Razón N/C = 1.

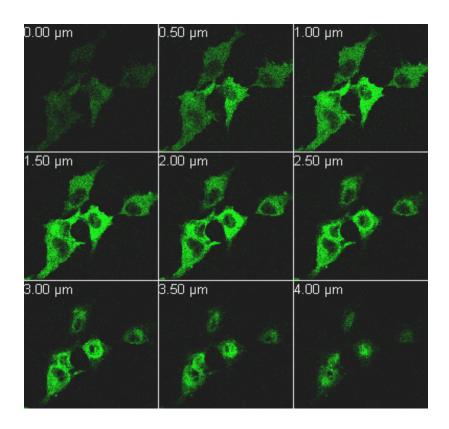


Figura 12: Ejemplo de localización subcelular citoplasmática de la proteína de fusión en la línea celular LLC-PK1. Plano medio de una serie confocal (2.0 μm) de 9 cortes de 0.5 μm, donde se aprecia la distribución citoplasmática de la fluorescencia. Esta imagen en particular corresponde a la proteína de fusión FBPasa-N20/EGFP-N1 y es representativa de esta ubicación en las demás proteínas.

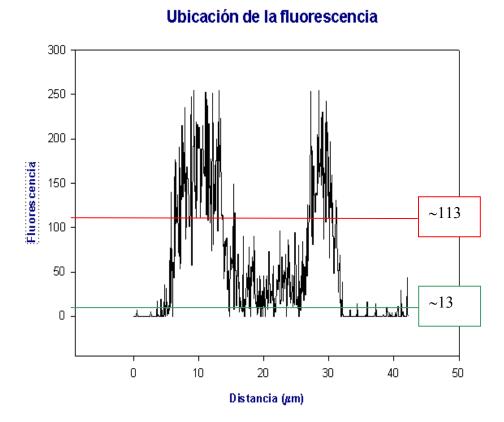


Figura 13: Análisis cuantitativo de la distribución relativa núcleo/citoplasma en la ubicación citoplasmática de las proteínas de fusión. Intensidad de fluorescencia en el curso de la línea trazada a través del plano medio de una célula. En verde el valor aproximado que toma la fluorescencia en el núcleo y en rojo los valores del citoplasma. Razón N/C = 0.115.

Proteínas de fusión	Concentración de glucosa en el medio					
	0		5 mM		25 mM	
	Núcleo (%)	Citoplasma (%)	Nuclear (%)	Citoplasma (%)	Nuclear (%)	Citoplasma (%)
EGFPC1/ FBPasa-Rc	$34,7 \pm 7,5$	$65,3 \pm 7,5$	$15,2 \pm 3,4$	84.8 ± 3.4	$20,1 \pm 11,3$	$78,2 \pm 14,1$
FBPasa-N20/ EGFP-N1	$14,2 \pm 5,8$	86,1 ± 4,8	$15,9 \pm 5,9$	84,1 ± 5,9	11,1 ± 5,9	88.9 ± 5.9
EGFP-C1/ FBPasa-C38	$56,3 \pm 5,2$	43.8 ± 5.2	$50,1 \pm 17,2$	$46,4 \pm 14,0$	$50,6 \pm 6,7$	$49,7 \pm 6,4$

Tabla 1: Porcentaje de células de una población total que presenta una ubicación subcelular determinada, para cada proteína de fusión y cada concentración de glucosa. Los valores tabulados corresponden al promedio ± la desviación estándar de tres experimentos distintos. Las células contabilizadas fueron entre 100 y 150.

5. DISCUSIÓN

La regulación de las enzimas del metabolismo ha incorporado una nueva aproximación a los mecanismos clásicos ya descritos, la compartimentación celular de las vías metabólicas. La separación de estas vías en regiones particulares de la célula como forma de modular y estimular el acceso de las enzimas a sus sustratos ha sido postulada por Ovadi y col., (2000). Este grupo de investigación además ha descrito la formación de complejos enzimáticos específicos para cada vía metabólica, lo que asegura la canalización de sus sustratos. Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron, por primera vez, la localización subcelular de dos enzimas de la gluconeogénesis, la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Sáez y col., 1996; Yáñez y col., 2003) y aldolasa B (Sáez y Slebe 2000). Se demostró que en hígado y riñón de rata esta enzima se encuentra en el núcleo de algunas células y además en un compartimento de la membrana apical de las células de riñón y de la membrana de los hepatocitos (Yáñez y col., 2003). Secuencias de localización han sido encontradas en enzimas glicolíticas y gluconeogénicas, como glucoquinasa (GK) (Shiota y col., 1999) y glicógeno sintasa muscular (GS) (Ferrer y col., 1997) respectivamente en las cuales se ha observado que la localización subcelular de estas enzimas es dinámica y responde a la variación en la concentración de glucosa. Así, GK y GS muscular se localizan en el citoplasma cuando la célula se encuentra en un medio de alta concentración de glucosa y se trasladan al núcleo en ausencia de este metabolito (De la Iglesia y col., 1999; Ferrer y col., 1997). Más aún, se ha determinado que GK no se traslada al núcleo por la presencia de una NLS sino que, su proteína reguladora es capaz de unirse a la enzima y llevarla al núcleo en condiciones de alta glucosa, mecanismo denominado "piggy-back" (De la Iglesia et al., 1999). Sin embargo, este mecanismo es dependiente del tipo celular en que se expresa la proteína. Asimismo cabe destacar que la formación de este complejo GK-proteína reguladora inhibe la actividad de esta enzima (Van Schaftingen., 1994). Shiota y colaboradores (1999) determinaron que la porción de la proteína involucrada en esta interacción proteína-proteína correspondería aproximadamente al 70 % de la estructura total de la enzima. Además, encontraron que GK, al contrario de lo propuesto, contiene una señal de exportación nuclear (NES). El descubrimiento de estas señales en el transporte de proteínas hacia y fuera del núcleo ha permitido proponer un interesante mecanismo de regulación de las enzimas relacionado con la localización de las vías metabólicas en distintos compartimientos subcelulares. Por lo tanto, se pensó que la FBPasa hepática posee señales en su estructura primaria responsables de su localización subcelular. Reconociendo la importancia de este nuevo mecanismo de regulación y la ausencia de este tipo de datos en enzimas de la gluconeogénesis, se propuso como objetivo central de esta tesis encontrar la región de la proteína responsable de su ubicación subcelular.

Estructuralmente, FBPasa hepática presenta dos regiones particularmente expuestas al medio que serían candidatas a secuencias de señalización subcelular y para interactuar con otras proteínas. Estas son, la región carboxilo terminal y la región amino terminal. El entorno de esta última cambia en respuesta a la unión de AMP (Liang et al., 1992). Este inhibidor alostérico induce un cambio conformacional de un estado R a T que se traduce en una rotación de 17º del dímero superior con respecto al inferior. Por lo que se decidió analizar el efecto que causa en la ubicación de la enzima la deleción de los 20 residuos aminoacídicos de la región amino terminal.

El lado carboxilo terminal en cambio es una alfa hélice que se proyecta desde los vértices de cada monómero; esta ubicación estructural determina que el entorno de esta región no varíe manteniéndose siempre expuesta al medio. Por esta razón pareció probable encontrar en esta estructura una señal involucrada en la localización subcelular de la enzima. Al igual que en el

extremo amino, se decidió investigar el efecto de la deleción de los últimos 38 residuos aminoacidicos.

Los primeros resultados dados a conocer son los obtenidos en la línea celular de riñón de embrión humano, HEK 293, en donde FBPasa tipo salvaje de riñón de cerdo (FBPasa-wt) mostró una ubicación subcelular citoplasmática al igual que las proteínas de fusión mutantes (figura 4A y 5). En el análisis de la figura 6 se determinó que la fluorescencia relativa de las EGFP/FBPasas fue muy baja dentro del núcleo, sugiriendo que en esta línea celular las proteínas de fusión no son capaces de translocar hacia este organelo. Al utilizar el programa **PSORT II** (http://psort.nibb.ac.jp/form2.html) se obtiene que la probabilidad de que FBPasa sea una enzima citoplasmática es de 69,6 % y que sea nuclear es de 21,7 %. Este último porcentaje podría deberse a la NLS encontrada en la secuencia de esta isoenzima. Si esto fuera así ¿por qué en HEK-293 no se encuentra la enzima en el núcleo? Considerando que todas las células presentan importinas, proteínas encargadas de llevar al núcleo proteínas que posean una NLS (histonas, factores de transcripción y replicación, etc) (Stewart et al., 2001), es factible pensar que esta secuencia no es funcional.

Al contrario, utilizando la línea celular LLC-PK1 observamos que la GFP/FBPasa-wt fue capaz de translocar al núcleo (figura 8), lo que permite junto al resultado anterior la siguiente conclusión: "la ubicación subcelular de FBPasa de riñón de cerdo depende del tipo celular en que se exprese". Esto ya había sido descrito para GK (de la Iglesia et al., 1999). Cuando esta enzima es fusionada a BFP (blue fluorescent protein) y expresada en hepatocitos aislados esta es capaz de translocar en respuesta a glucosa, pero al expresar esta proteína de fusión en la línea de riñón de mono verde COS-1, la proteína es incapaz de ubicarse en el núcleo sin importar la concentración de glucosa en el medio de cultivo, en forma análoga a lo encontrado con FBPasa en HEK-293.

Además, en la misma publicación (de la Iglesia et al., 1999) se informa que al co-transfectar GK con su proteína reguladora (GKRP) fusionada a GFP, la enzima es capaz de translocar al núcleo en determinadas condiciones metabólicas. Por tanto, es posible postular que la FBPasa de riñón de cerdo al interaccionar con un factor proteico que la reconoce, la traslada al núcleo de las células. Aunque la localización de FBPasa sea regulada por una NLS o un factor proteico, al eliminar esta región la proteína debería ser encontrada mayoritariamente en el citoplasma de las células. De las enzimas mutantes, FBPasa-N20 presenta una ubicación subcelular preferentemente citoplasmática, en comparación con la enzima silvestre (tabla 1). A través de estos resultados se deduce que el extremo amino terminal de FBPasa de riñón de cerdo estaría involucrado en la localización subcelular de la enzima permitiendo que ésta se encuentre en el núcleo de las células LLC-PK1. Este extremo, como se señaló previamente, cambia de posición con el cambio conformacional de la enzima inducido por la unión del inhibidor AMP y, posiblemente, queda menos expuesto al solvente. Asimismo, podría cambiar también su entorno estructural, lo que dificultaría una interacción proteína-proteína, en el caso que exista ésta. Este puede ser un nuevo mecanismo por el cual este tipo de regulación se lleve a cabo.

Con respecto al lado carboxilo terminal, que es una alfa hélice que se proyecta hacia el medio desde los vértices de cada monómero, los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo (p < 0,05) en la ubicación nuclear de la enzima cuando son escindidos los 38 últimos aminoácidos (tablas 1), es decir, que este lado estaría involucrado en la exportación hacia el citoplasma desde el núcleo. Se han caracterizado secuencias que tienen una función contraria a las NLS. Estas corresponden a las señales para exportar proteínas del núcleo, NES. Estas son regiones ricas en leucina, isoleucina u otros aminoácidos hidrofóbicos, las cuales, presentan la secuencia consenso Lx_{2,3}(F/I/L/V/M)x_{1,2,3}Lx(I/V/L), que es la clásica NES. Esta

secuencia se encontró en la proteína inhibidora de protein quinasa A (Fisher, U., 1995), en la proteína Rev del VIH (Fukuda, M., 1996) y en una docena de proteínas más. También existen secuencias inusuales, como en el caso del factor de transcripción N-FAT (Klemm, J. D., 1997), que son de la forma IxxxIxxLxT o WxKIxLxP y muchas otras que no han sido debidamente caracterizadas por ser más largas que las clásicas NES (Macara., 2001). Buscando estas secuencias dentro de la región carboxilo terminal de FBPasa de riñón de cerdo no se encontró ninguna de las aquí señaladas. Sin embargo, al recurrir a una base de datos (http://www.cbs.dtu.dk/databases/NESbase/) que muestra los aminoácidos verificados experimentalmente y que son indispensables para el funcionamiento de NESs informadas en diferentes publicaciones, se observa que el extremo carboxilo terminal FBPasa de riñón de cerdo posee dos veces la secuencia de residuos, LxI, una entre los residuos 303-305 y la misma entre los residuos 329-331. Esta secuencia está en la proteína ubiquitina ligasa humana, enzima que se encuentra en el núcleo de células HeLa (Hamilton y col., 2001). La translocación de enzimas a compartimientos celulares donde no tengan acceso a su sustrato, en respuesta a alguna señal metabólica, ya ha sido descrita para varias proteínas, como la glucoquinasa y la glicógeno sintasa muscular (Ferrer y col., 1997). La glucoquinasa, a la forma de una proteína de fusión con EGFP, se localiza en el núcleo de las células en ausencia de glucosa, y en presencia del azúcar se encuentra esencialmente en el citoplasma en las C2C12 (mioblasto de ratón) y en COS-1 sin que sea necesaria insulina para la translocación. Aunque EGFP/FBPasa-Rc se puede encontrar en el núcleo de las células LLC-PK1, claramente posee una ubicación preferencialmente citoplasmática independiente de la concentración de glucosa en el medio. Sin embargo, esta enzima presenta una clara tendencia a regresar al citoplasma cuando la concentración del azúcar aumenta. La modulación de la localización subcelular de FBPasa no fue la esperada. Nosotros

pensábamos que FBPasa se trasladaría al núcleo en presencia de glucosa, como mecanismo inhibitorio. No obstante, la ubicación en el citoplasma de las células, ya sea de las LLC-PK1 o de los hepatocitos de hígado de rata, se puede explicar por la participación de FBPasa en las vías gluconeogénica y gliconeogénica en el hígado. Este órgano presenta un gran almacenamiento de glucógeno durante el período de absorción postprandial. Este hecho es favorecido por un incremento parcial en la incorporación de glucosa por el hígado, un aumento de los metabolitos y señales hormonales en la vena porta, y lo más importante, un aumento parcial en la formación de glucosa-6-fosfato para favorecer la biosíntesis de glicógeno (Radziuk J, 2001). La evidencia presentada por estos autores también apunta a que la formación de glicógeno directamente desde glucosa y el formado a través de la vía gluconeogénica están interrelacionados. Por esto, es plausible pensar que el movimiento de FBPasa en respuesta a glucosa sería para participar en la síntesis indirecta de glucógeno. Así, el aumento de la concentración de glucosa en el medio celular y su metabolización, induce un aumento de los precursores gluconeogénicos, y por ende, este aumento puede estimular la síntesis indirecta de glucógeno.

Es posible que en el núcleo FBPasa realice su función catalítica clásica o una función diferente a la conocida. Existen numerosos estudios que han demostrado la presencia de enzimas glicolíticas en el núcleo de algunos sistemas celulares. Entre ellas estan lactato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, aldolasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. En algunos casos, estas enzimas glicolíticas son encontradas en el núcleo en una forma modificada con respecto a su contraparte citoplasmática (por ejemplo fosforilación). En estos casos, la forma nuclear de estas enzimas se encuentra unida al DNA, aunque ninguna de ellas interactúa con una secuencia específica. Se ha postulado que estas enzimas juegan un rol en la transcripción y replicación a través de una estabilización general de la matriz nuclear o la estructura de la cromatina (Ronai,

1993). Por lo tanto, es factible pensar que FBPasa también puede estar participando en el metabolismo del DNA y también en la regulación génica.

El porcentaje total de enzima existente en el citoplasma y núcleo de la célula fue sometido a la prueba de error estadístico ($p \ge 0.05$). Al analizar los datos obtenidos se observó que hay significancia estadística en la diferencia entre los medios sin glucosa y 5 mM glucosa, al igual que entre el primero y el medio 25 mM glucosa. Mientras que, la diferencia de localización de las células entre 5mM y 25mM no son significativas estadísticamente. Este análisis corrobora la capacidad de FBPasa de riñón de cerdo de ser subcelularmente modulada por glucosa. Aunque, al delecionar cualquiera de los dos extremos de la proteína, el amino o el carboxilo, la FBPasa presenta cambios en su localización subcelular, en ninguna de las dos proteínas mutantes se observó diferencia en su ubicación en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa. De esto se puede deducir que estas regiones de la FBPasa podrían participar en la respuesta a glucosa. También podemos sugerir que estas regiones podrían ser reconocidas por otros factores que serían los responsables de su localización.

Ciertamente la respuesta a la hipótesis de trabajo es parcial. De que forma influyen los extremos amino y carboxilo terminal de FBPasa en su compartimentación, es una nueva interrogante. ¿Es éste un mecanismo dependiente de una NLS, NES o de una proteína con la que interacciona? En base a los resultados obtenidos en esta tesis no es posible contestar a esta pregunta. No obstante, cabe destacar que este trabajo ha abierto líneas futuras de investigación, las cuales también deberán tomar en cuenta la distinta ubicación de la FBPasa y la función que esta desempeña en los distintos compartimientos entre los cuales es capaz de localizarse. El estudio de nuevas funciones para enzimas de la gluconeogénesis es un tema atrayente, pues puede

representar una forma de optimización de los recursos por parte de la célula. Así, las enzimas podrían desempeñar diferentes papeles dependiendo del compartimiento en el que se encuentre.

BIBLIOGRAFÍA

Benkovic SJ, deMaine MM (1982): Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 53:45-82.

Bergot MO, Diaz-Guerra MJ, Puzenat N, Raymondjean M, Kahn A (1992): Cis-regulation of the L-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic Acids Res* 20:1871-1877.

Cárcamo, J. G (1999). Mecanismos de inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP: Estudios de mutagénesis sitio dirigida. Tesis doctoral, Fac. de Ciencias Univ. Austral de Chile.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.

Chatterjee T, Reardon I, Heinrikson RL, Marcus F (1985): Des-1-25-fructose-1,6-bisphosphatase, a nonallosteric derivative produced by trypsin treatment of the native protein. *J Biol Chem* 260:13553-13559.

Chen XS, Funk CD (2001): The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* 276:811-818.

Choe, JY., Nelson, S. W., Arienti, K. L., Axe, F. U., Collins, T. L., Jones, T. K., Kimmich, R. D., Newman, M.J., Norvell, K., Ripka, W. C., Romano, S. J., Short, K. M., Slee, D. H., Fromm, H. J., Honzatko, R. B., (2003): Inhibition of Fructose-1,6-bisphosphatase by a New Class of Allosteric Effectors. *J Biol Chem* 278: 51176-51183.

Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32:1212-1218.

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.

Cornish-Bowden A, Cardenas ML (1993): Channelling can affect concentrations of metabolic intermediates at constant net flux: artefact or reality? *Eur J Biochem* 213:87-92.

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20:448-455.

Cuif MH, Cognet M, Boquet D, Tremp G, Kahn A, Vaulont S (1992): Elements responsible for hormonal control and tissue specificity of L-type pyruvate kinase gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:4852-4861.

De la Iglesia N, Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E, Guinovart JJ, Ferrer JC (1999): Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett* 456:332-338.

Eisenberger CL, Nechushtan H, Cohen H, Shani M, Reshef L (1992): Differential regulation of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in several tissues of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:1396-1403.

el-Maghrabi MR, Gidh-Jain M, Austin LR, Pilkis SJ (1993): Isolation of a human liver fructose-1,6-bisphosphatase cDNA and expression of the protein in Escherichia coli. Role of ASP-118 and ASP-121 in catalysis. *J Biol Chem* 268:9466-9472.

Ferrer JC, Baque S, Guinovart JJ (1997): Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cystosol in response to glucose. *FEBS Lett* 415:249-252.

Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R (1995): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82:475-483.

Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E (1996): Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH2-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 271:20024-20028.

Giroux E, Williams MK, Kantrowitz ER (1994): Shared active sites of fructose-1,6-bisphosphatase. Arginine 243 mediates substrate binding and fructose 2,6-bisphosphate inhibition. *J Biol Chem* 269:31404-31409.

Gregori C, Kahn A, Pichard AL (1993): Competition between transcription factors HNF1 and HNF3, and alternative cell-specific activation by DBP and C/EBP contribute to the regulation of the liver-specific aldolase B promoter. *Nucleic Acids Res* 21:897-903.

Hamilton MH, Tcherepanova I, Huibregtse JM, McDonnell DP (2001): Nuclear import/export of hRPF1/Nedd4 regulates the ubiquitin-dependent degradation of its nuclear substrates. *J Biol Chem* 276:26324-26331.

Hers HG, Hue L (1983): Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem* 52:617-653.

Hubert E, Villanueva J, Gonzalez AM, Marcus F (1970): Univalent cation activation of fructose 1,6-diphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 138:590-597.

Inouye S, Tsuji FI (1994): Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 341:277-280.

Kain SR, Adams M, Kondepudi A, Yang TT, Ward WW, Kitts P (1995): Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19:650-655.

Ke H, Thorpe CM, Seaton BA, Marcus F, Lipscomb WN (1989): Molecular structure of fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1475-1479.

Ke HM, Thorpe CM, Seaton B, Lipscomb WN, Marcus F (1990a): Structure refinement of fructose-1,6-bisphosphatase and its fructose 2,6-bisphosphate complex at 2.8 A resolution. *J Mol Biol* 212:513-539.

Ke HM, Zhang YP, Lipscomb WN (1990b): Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5243-5247.

Ke HM, Liang JY, Zhang YP, Lipscomb WN (1991a): Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form). *Biochemistry* 30:4412-4420.

Ke HM, Zhang YP, Liang JY, Lipscomb WN (1991b): Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose 6-phosphate at 2.1-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2989-2993.

Klemm JD, Beals CR, Crabtree GR (1997): Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol* 7:638-644.

Lawrence GM, Jepson MA, Trayer IP, Walker DG (1986): The compartmentation of glycolytic and gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver and its significance to renal and hepatic metabolism. *Histochem J* 18:45-53.

Liang JY, Huang S, Zhang Y, Ke H, Lipscomb WN (1992): Crystal structure of the neutral form of fructose 1,6-bisphosphatase complexed with regulatory inhibitor fructose 2,6-bisphosphate at 2.6-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2404-2408.

Liang JY, Zhang Y, Huang S, Lipscomb WN (1993): Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2132-2136.

Macara IG (2001): Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:570-594. Niwa H, Inouye S, Hirano T, Matsuno T, Kojima S, Kubota M, Ohashi M, Tsuji FI (1996): Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13617-13622.

Ovadi J (1988): Old pathway--new concept: control of glycolysis by metabolite-modulated dynamic enzyme associations. *Trends Biochem Sci* 13:486-490.

Ovadi J (1991): Physiological significance of metabolic channelling. J Theor Biol 152:1-22.

Ovadi J, Srere PA (1996): Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell Biochem Funct* 14:249-258.

Ovadi J, Srere PA (2000): Macromolecular compartmentation and channeling. *Int Rev Cytol* 192:255-280.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992): Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.

Radojkovic J, Ureta T (1987): Hexokinase isoenzymes from the Novikoff hepatoma. Purification, kinetic and structural characterization, with emphasis on hexokinase C. *Biochem J* 242:895-903.

Radziuk J, Pye S (2001): Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev* 17:250-272.

Ronai Z (1993): Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem* 25:1073-1076.

Runge D, Schmidt H, Christ B, Jungermann K (1991): Mechanism of the permissive action of dexamethasone on the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 198:641-649.

Saez DE, Slebe JC (2000): Subcellular localization of aldolase B. J Cell Biochem 78:62-72.

Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA (1999): Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274:37125-130.

Short MK, Clouthier DE, Schaefer IM, Hammer RE, Magnuson MA, Beale EG (1992): Tissue-specific, developmental, hormonal, and dietary regulation of rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-human growth hormone fusion genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:1007-1020.

Srere PA (1987): Complexes of sequential metabolic enzymes. Annu Rev Biochem 56:89-124.

Stewart M, Baker RP, Bayliss R, Clayton L, Grant RP, Littlewood T, Matsuura Y (2001): Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett* 498:145-149.

Tejwani GA (1983): Regulation of fructose-bisphosphatase activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 54:121-194.

Ureta T (1978): The role of isozymes in metabolism: a model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. *Curr Top Cell Regul* 13:233-258.

Ureta T (1985): [The organization of metabolism : subcellular localization of glycolytic enzymes]. *Arch Biol Med Exp* (Santiago) 18:9-31.

Ureta T (1991): The role of isozymes in metabolite channelling. *J Theor Biol* 152:81-84.

Uyeda K (1992): Interactions of glycolytic enzymes with cellular membranes. *Curr Top Cell Regul* 33:31-46.

Uyeda K, Luby LJ (1974): Studies on the effect of fructose diphosphatase on phosphofructokinase. *J Biol Chem* 249:4562-4570.

Van Schaftingen E, Detheux M, Veiga Da Cunha M (1994): Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J* 8: 414-419.

Vaulont S, Puzenat N, Levrat F, Cognet M, Kahn A, Raymondjean M (1989): Proteins binding to the liver-specific pyruvate kinase gene promoter. A unique combination of known factors. *J Mol Biol* 209:205-219.

Villeret V, Huang S, Fromm HJ, Lipscomb WN (1995a): Crystallographic evidence for the action of potassium, thallium, and lithium ions on fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8916-8920.

Villeret V, Huang S, Zhang Y, Lipscomb WN (1995b): Structural aspects of the allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by AMP: the binding of both the substrate analogue 2,5-anhydro-D-glucitol 1,6-bisphosphate and catalytic metal ions monitored by X-ray crystallography. *Biochemistry* 34:4307-4315.

Wang S, Hazelrigg T (1994): Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis. *Nature* 369:400-403.

Ward WW, Bokman SH (1982): Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* 21:4535-4540.

Welch GR, Easterby JS (1994): Metabolic channeling versus free diffusion: transition-time analysis. *Trends Biochem Sci* 19:193-197.

Wojtas K, Slepecky N, von Kalm L, Sullivan D (1997): Flight muscle function in Drosophila requires colocalization of glycolytic enzymes. *Mol Biol Cell* 8:1665-1675.

Wright, S. W., Carlo, A. A., Carty, M. D., Danley, D. E., Hageman, D. L., Karaman, G. A., Levy, C. B., Mansour, M. N., Mathiowetz, A. M., McClure, L. D., Nestor, N. B., McPherson, R. K., Xue Y, Huang S, Liang JY, Zhang Y, Lipscomb WN (1994): Crystal structure of fructose-1,6-

bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP, and Zn2+ at 2.0-A resolution: aspects of synergism between inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* U S A 91:12482-12486.

Yáñez AJ, Bertinat R, Concha, II, Slebe JC (2003): Nuclear localization of liver FBPase isoenzyme in kidney and liver. *FEBS Lett* 550:35-40.

Yang TT, Cheng L, Kain SR (1996): Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 24:4592-4593.

Zhang Y, Liang JY, Huang S, Ke H, Lipscomb WN (1993): Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 32:1844-1857.

Zhang Y, Liang J. Y, Huang S, Lipscomb WN (1994): Toward a mechanism for the allosteric transition of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *J Mol Biol* 244:609-624.