



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

Profesor Patrocinante
DR. JUAN C. SLEBE T.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante
DR. ALEJANDRO J. YÁÑEZ C.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

DISTRIBUCIÓN DE LAS ENZIMAS ALDOLASA A Y FRUCTOSA-1,6- BISFOSFATASA MUSCULAR EN DISTINTOS TEJIDOS DE RATA

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

CARLOS EUGENIO SPICHIGER BRUCE

**VALDIVIA – CHILE
2004**

A mis padres y Cynthia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mis profesores patrocinantes: al Dr. Juan Carlos Slebe, por el continuo respaldo brindado y por permitirme desarrollar este trabajo en el laboratorio de Enzimología Molecular, el cual él dirige, así también al Dr. Alejandro Yáñez, a quien agradezco por su apoyo, cuando el trabajo experimental no daba los frutos esperados. A la Dra. Heide Ludwig, por sus disposición, en el trabajo diario del laboratorio; a los futuros doctores Joel y Cristian por su ayuda y crítica profesional, para lograr un mejor desempeño científico. Con palabras sólo puedo decir gracias, por entregarme su amistad a Marcelo, Andrés, Marco, Rodrigo, Mauricio, Romina y René por soportarme y apoyarme. Finalmente, deseo agradecer el apoyo incondicional que recibí por parte de mi familia, y de Cynthia quien compartió cada momento difícil.

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

		Páginas
	AGRADECIMIENTOS	
	INDICE DE CONTENIDOS	i
	LISTA DE FIGURAS	iv
	LISTA DE TABLAS	vi
	LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
3	MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1	Materiales	12
3.1.1	Reactivos	12
3.1.2	Equipos	13
3.2	Métodos	14
3.2.1	Purificación de RNA total por método TRIzol	14

3.2.2	Cuantificación de RNA	15
3.2.3	Análisis electroforético del RNA en geles de agarosa/formaldehído	16
3.2.4	Síntesis de cDNA	16
3.2.5	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	17
3.2.6	Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa	17
3.2.7	Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar	18
3.2.8	Transformación de bacterias <i>E. Coli</i>	18
3.2.9	Purificación de DNA plasmidial por un kit comercial	19
3.2.10	Extracción de DNA desde geles de agarosa	19
3.2.11	Cuantificación de DNA plasmidial	20
3.2.12	Análisis de digestión con endonucleasas de restricción	20
3.2.13	Ligación del fragmento codificante de FBPasa muscular a vectores plasmidiales	21
3.2.14	Subclonamiento en vector pET-15b	21
3.2.15	Expresión y purificación de la enzima FBPasa muscular	22
3.2.16	Purificación de aldolasa A	24

3.2.17	Ensayo espectrofotométrico de determinación de actividad enzimática de aldolasa	25
3.2.18	Determinación de la concentración de proteínas	26
3.2.19	Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS	26
3.2.20	Obtención de suero anti-FBPasa muscular y aldolasa A desde conejos	27
3.2.21	Inmunodetección en transferencia Western y método de ensayo en gota (dot-blot)	28
3.2.22	Inmunohistoquímica en tejidos de rata	29
3.2.23	Cultivo celular	30
3.2.24	Transfecciones transientes	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Diseño de partidores para FBPasa de músculo y purificación de RNA total de músculo	32
4.2	Subclonamiento en pEGFP-C1 y pET-15b	34
4.3	Expresión y purificación de FBPasa de músculo de rata	36
4.4	Caracterización del anticuerpo contra FBPasa de músculo	37
4.5	Localización de FBPasa muscular fusionada a GFP en línea celular A-10	40

4.6	Purificación de aldolasa A	40
4.7	Caracterización del anticuerpo contra aldolasa A.	44
4.8	Localización de aldolasa A en tejidos de rata	44
5	DISCUSIÓN	57
6	BIBLIOGRAFÍA	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Panel A: Análisis electroforético del RNA total de músculo de rata. Panel B: Análisis electroforético del producto de amplificación de FBPasa muscular por RT-PCR.	33
Figura 2	Panel A: Análisis de restricción de los plásmidos pEGFP-C1-FBPasa de músculo, y Panel B: pET-15b FBPasa de músculo.	35
Figura 3	Análisis electroforético de las etapas de la purificación de FBPasa muscular de rata.	38
Figura 4	Caracterización del anticuerpo anti-FBPasa muscular contra FBPasa muscular de rata recombinante y de riñón de cerdo.	39
Figura 5	Localización de la proteína fusión FBPasa muscular-GFP en células A-10 incubadas bajo distintas concentraciones de glucosa.	41

células A-10 incubadas bajo distintas concentraciones de glucosa.

Figura 6	Análisis electroforético de las etapas de la purificación de aldolasa A desde músculo de rata.	43
Figura 7	Caracterización del anticuerpo de conejo contra aldolasa A.	45
Figura 8	Localización de aldolasa A en tejido de músculo esquelético.	47
Figura 9	Localización de aldolasa A en tejidos de músculo cardiaco.	48
Figura 10	Localización subcelular de aldolasa A en corte de músculo cardiaco.	49
Figura 11	Localización de aldolasa A en tejido hepático.	50
Figura 12	Localización de aldolasa A en tejido pancreático.	51
Figura 13	Localización de aldolasa A en tejido de testículo.	52
Figura 14	Localización subcelular de aldolasa A en túbulos seminíferos.	54
Figura 15	Localización de aldolasa A en tejido de intestino delgado.	55
Figura 16	Localización de aldolasa A en de estómago.	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Purificación de aldolasa de músculo de rata	42
----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	angstrom
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ATP	adenosina trifosfato
BrEt	bromuro de etidio
BSA	albúmina sérica de bovino
C	centígrado
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
cm	centímetro
DAB	diaminobencidina
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleótidos trifosfato
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiamonotetraacético
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fru-1,6-P ₂	fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-2,6-P ₂	fructosa-2,6-bisfosfato
Fru-6-P	fructosa-6-fosfato

g	gramo
G	gravedad (9,8 m/s ²)
α -GDP	α -glicerofosfato deshidrogenasa
GFP	green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)
h	hora
IgG	inmunoglobulina G
IgY	inmunoglobulina Y (aviar)
IPTG	isopropiltiogalactósido
kb	kilobase
kDA	kilodalton
l	litro
LB	medio de cultivo Luria - Bertani
M	molar
mA	mili ampere
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitros
mM	mili molar
μ g	microgramos
μ l	microlitros
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
ng	nanogramo
nm	nanometro
pb	pares de base
PCR	reacción de la DNA polimerasa en cadena
Pfu	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
pp.	precipitado
RNA	ácido ribonucleico
r.p.m.	revoluciones por minuto

s	segundos
SDS	lauril sulfato de sodio
S/N	sobrenadante
TE	Tris-HCl, EDTA
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilendiamina
TPI	triosa fosfato isomerasa
Tris	tris[hidroximetil]aminometano
U	unidad enzimática
V	volts

1. RESUMEN

La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (aldolasa) cataliza la conversión reversible de fructosa-1,6-bisfosfato en gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Aldolasa en mamíferos se presenta como tres isoenzimas: las isoformas muscular (A), hepática (B) y cerebral (C). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que aldolasa B colocaliza con fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) en los túbulos epiteliales proximales de riñón y en los hepatocitos de la zona periportal. En esta tesis se estudió la localización celular y subcelular, para la isoenzima A, en tejidos de rata.

Para determinar la localización de aldolasa A, se prepararon anticuerpos policlonales en conejo. Se encontró inmunotinción positiva en hígado, testículo, intestino delgado, estómago, páncreas, músculo esquelético y cardíaco de rata. Mediante microscopía confocal se encontró que aldolasa A tiene una localización subcelular nuclear en músculo cardíaco, espermatozonias y células de Kupffer.

Por otra parte, se clonó la FBPasa muscular de rata en el vector pEGFP C1, y se realizaron estudios de localización de esta isoenzima fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en la línea celular A-10 (derivada desde músculo liso de aorta de rata). Se encontró que la enzima fusionada se localiza en el citoplasma, tanto en ausencia, como en presencia de distintas concentraciones de (glucosa 5 mM y 25 mM).

Estos datos señalan que la localización de esta enzima es dependiente de las características metabólicas del tejido y tipo celular, además su localización subcelular podría desempeñar un papel importante en su regulación.

SUMMARY

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (aldolase) catalyses the reversible conversion of fructose-1,6-bisphosphate to glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. The mammalian aldolases has three isozymes: muscle aldolase (A), liver (B) and brain aldolase (C) isoforms. Results from our laboratory have demonstrated that aldolase B colocalizes with fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) in proximal convoluted tubules in kidney and in hepatocytes localized in the periportal region. The purpose of this study is to determine subcellular localization of aldolase A in different rat tissues.

In order to study the localization of aldolase A, rabbit polyclonal antibodies were prepared. There was positive immunoreaction in liver, testis, small intestine, stomach, pancreas, skeletal and cardiac muscle. Using confocal microscopy, we found that aldolase A has a nuclear localization in cardiac muscle, spermatogonias and Kupffer cells.

By contrast, rat muscle FBPase was cloned in the pEGFP C1 vector, and localization studies with the fusion protein GFP-FBPase were carried out in the A-10 cell (derived from rat aorta's smooth muscle). We found that the fusion protein had a cytoplasmatic localization, either in glucose absence or presence of glucose (5 mM and 25 mM glucose).

Those results show that cellular location of aldolase A depends on the metabolic features of cells and tissues, thus, the subcellular localization could play an important role in the regulation of this isoenzyme.

2. INTRODUCCIÓN

La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa [D-fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa EC 4.1.2.13] (aldolasa) cataliza la reacción de tipo escisión aldólica reversible de fructosa-1,6-bisfosfato en gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (Morse y Horecker, 1968) y, de esa manera, participa tanto en la vía glicolítica como en la vía gluconeogénica. En términos generales, se distinguen las aldolasas de vegetales y animales superiores (Clase I) y las de bacterias y hongos (Clase II). Entre las aldolasas de origen animal se han descrito tres isoenzimas, denominadas por su fuente de origen las isoformas: muscular (A), hepática (B) y cerebral (C) (Penhoet *et al.*, 1969, Lebherz y Rutter, 1969, Penhoet y Rutter, 1975). En hígado y riñón se expresa predominantemente la isoenzima B, enzima homotetramérica con una masa aparente de 40.000 Da por subunidad, valor similar al que presentan las subunidades de los homotetrameros A y C (Penhoet *et al.*, 1969). Las enzimas de mamíferos presentan características similares (Penhoet y Rutter, 1975) y las estructuras primarias, determinadas para los tres tipos de aldolasa, muestran un marcado grado de similitud, pero aldolasa B diverge levemente, con un 70% de identidad en secuencia, respecto a las secuencias de aldolasa A y C (Rottman *et al.*, 1984). Más aún, aldolasa A cataliza la hidrólisis de Fru-1,6-P₂ en forma más eficiente que aldolasa B, lo que se refleja en su valor de k_{cat} que es 20-30 veces mayor, mientras que aldolasa B tiene un valor de K_m para gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato 10 veces menor que el de aldolasa A (Pezza *et al.*, 2003). En base a las propiedades cinéticas de estas isoenzimas, se ha sugerido (Penhoet, *et al.*, 1969; Eagle e Iqbal, 1973) que aldolasa B ha evolucionado para tener un papel en gluconeogénesis, mientras aldolasa A es más efectiva participando en la vía glicolítica. Esta noción se refuerza por el hecho que en vertebrados el músculo esquelético expresa sólo aldolasa

A (Lebherz y Rutter, 1969). Sin embargo, la participación de una isoenzima de aldolasa particular en un complejo glicolítico o gluconeogénico, debe ser aún establecida. Se ha descrito que tres residuos aminoácídicos del sitio catalítico son conservados en mamíferos, estos son Lys-146, Glu-189 y Lys-229 (Maurady *et al.*, 2002). Este último residuo está relacionado con el mecanismo que involucra la formación de una base de Schiff entre el grupo ϵ -amino de la lisina 229 y el grupo ceto carbonilo del sustrato (Horecker *et al.*, 1975). Las isoenzimas A y C destacan por su marcada preferencia catalítica por Fru-1,6-P₂ sobre fructosa- 6-fosfato (Fru-6-P), mientras que la isoenzima B no muestra preferencia por ninguno de los sustratos, lo que sugiere que las tres isoenzimas de aldolasa participan en la formación de productos finales diferentes (Eagle e Iqbal, 1973).

Existen numerosos datos que indican que muchas de las enzimas del metabolismo intermediario operan *in vivo* en asociación a estructuras particuladas (Srere, 1987). La forma de organización puede comprender asociación a subestructuras citológicas y/o a la formación de complejos proteína-proteína. Con respecto a esto último, se ha postulado que la interacción entre proteínas ocurriría sólo si las enzimas provienen del mismo tejido, lo que se conoce como especificidad de órgano (Pontremoli *et al.*, 1979).

La distribución de las distintas isoenzimas ha mostrado ser diferenciada y específica, dependiendo del tejido y tipo celular. Así, en el sistema nervioso central se ha detectado que aldolasa C está distribuida en regiones bien delimitadas del sistema nervioso central, encontrándose agrupada en las franjas de la placa de células de Purkinje del cerebelo, y en las olivas inferiores y en las neuronas sensoriales de las astas posteriores de la médula espinal (Buono *et al.*, 2001). Mas aún, se conoce que la interacción subcelular de aldolasa A con la matriz miofibrilar de músculo esquelético de conejo, afecta las propiedades cinéticas de esta

isoenzima (Harris y Winzor, 1987). Por otra parte, estudios de interacción de aldolasa A con otras proteínas, han revelado una interesante relación de esta isoenzima con la isoenzima muscular de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). Los resultados muestran que aldolasa A altera las propiedades cinéticas de FBPasa muscular; disminuye la sensibilidad de esta última por AMP (Rakus y Dzugaj 2000). De igual forma, los autores muestran que aldolasa B es capaz de alterar las propiedades alostéricas de FBPasa hepática, pero no tiene influencia sobre la isoenzima muscular. De estos y otros resultados surge la interesante idea de que existiría una interacción específica entre las diferentes isoenzimas de aldolasa y FBPasa.

La enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa [D-fructosa-1,6-bisfosfato-1-fosfohidrolasa EC 3.1.3.11] cataliza una de las etapas irreversibles de la gluconeogénesis, la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato más fosfato inorgánico. Considerando sus propiedades cinéticas, hasta el momento se han descrito tres tipos de isoenzimas: de hígado, músculo y cerebro, las cuales han sido aisladas y caracterizadas. La isoenzima hepática es postulada como una de las proteínas reguladoras de la gluconeogénesis y se ha determinado su expresión en tejidos distintos a hígado y riñón. Estudios realizados mediante análisis de transferencia Western e inmunohistoquímica, han demostrado la expresión de esta isoenzima en próstata, corteza suprarrenal, estómago, corazón, glándula adrenal, pulmón, testículo y páncreas, entre otros (Mizunuma y Tashima, 1990, Yañez *et al.*, 2003b). Por ello, nuestro laboratorio ha sugerido que, además de hígado y riñón, estos órganos pueden contribuir también a la gluconeogénesis (Yañez *et al.*, 2003b).

Las diferentes isoenzimas presentan características similares en su actividad catalítica y requieren la presencia de cationes bivalentes como Mn^{2+} y Mg^{2+} (Van Schaftingen, 1987).

FBPasa responde a una variedad de señales metabólicas (Benkovic y de Maine, 1982; Tejwani, 1983). Es inhibida parcialmente por adenosina monofosfato (AMP), fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6- P₂), y por altas concentraciones del sustrato Fru-1,6-P₂. Existe además un fuerte sinergismo entre las inhibiciones causadas por Fru-2,6- P₂ y AMP, que podría ser el principal mecanismo de control del flujo de la vía gluconeogénica (Hers y Hue, 1983; Van Schaftingen, 1987). Además, la enzima es activada por algunos cationes monovalentes, como K⁺ y NH₄⁺ (Hubert *et al.*, 1970).

La FBPasa renal de cerdo se compone de 337 residuos aminoacídicos (Williams y Kantrowitz, 1992) y su estructura corresponde a un tetrámero formado por 4 subunidades idénticas con forma hexahédrica, con una masa de 36,5 kDa por subunidad. Los datos cristalográficos para la isoenzima muscular son escasos, pero existen informes sobre el cristal formado por el complejo de FBPasa muscular humana con el inhibidor AMP, con una resolución de 2,04 Å (Zhu *et al.*, 2001). No obstante, aún faltan datos sobre la estructura de esta isoenzima. Las isoenzimas muscular y hepática de rata se diferencian estructuralmente por su peso molecular: 37.000 y 40.000 Da, respectivamente. Además, los mapeamientos peptídicos unidimensionales de la enzima muscular con proteasa estafilococal V8, quimotripsina, y papaína, muestran diferentes patrones peptídicos para ambas isoenzimas. Al analizar los parámetros cinéticos de las enzimas muscular y hepática de rata, se determinó que el valor de I_{0,5} para AMP es de 0,54 μM y 85 μM, y el valor de I_{0,5} para Fru-2,6-P₂ es de 6,3 y 1,5 μM, respectivamente (Mizunuma y Tashima, 1985). Por ello, una de las principales características de la isoenzima muscular sería su sensibilidad por AMP. Además, la identidad posicional de los cDNA de FBPasa hepática y muscular de rata es de un 70% (Al-Robaiy y Eschrich, 1999). Estos datos demuestran que ambas enzimas se diferencian desde el punto de vista cinético y secuencial sugiriendo diferencias en su participación en la formación de distintos complejos.

Problemática y propósito de este estudio.

Para comprender el funcionamiento del metabolismo celular disponemos de un número significativo de datos que aumentan día a día y que nos permiten enfocar este estudio desde diversos puntos de vista. Podemos tomar como paradigma el metabolismo de la glucosa, principal fuente de combustible en organismos superiores, para relacionar cómo se regulan los distintos procesos, desde la entrada de un sustrato a la célula, hasta la obtención de un producto final. La creencia general es que enzimas que participan en las diferentes vías metabólicas se encuentran como componentes solubles y funcionalmente en una fase acuosa. Sin embargo, esta idea ha cambiado debido a la gran cantidad de información sobre la interacción proteína-proteína y la asociación de ellas con estructuras celulares. Se ha propuesto que la distribución no homogénea de las enzimas del metabolismo, dentro de un compartimento celular, es un importante mecanismo de regulación. Por ejemplo, se ha demostrado mediante diversas técnicas la unión de enzimas glicolíticas y gluconeogénicas a proteínas del citoesqueleto, y la modulación de estas interacciones por ligandos sugiere que podrían jugar un papel en la regulación de la actividad enzimática y en la función celular. En muchas vías metabólicas, las interacciones entre enzimas secuenciales ocurren mediante la formación de complejos estáticos o dinámicos, los cuales permiten la canalización de sustrato. Este proceso tiene varias ventajas catalíticas, incluyendo la microcompartimentación de metabolitos (Ovadi y Srere, 2000; Spivey y Ovadi, 1999).

La compartimentación de vías metabólicas en organelos también contribuye a la regulación del metabolismo, separando los procesos sintéticos de los degradativos. Alternativamente, en base a estudios de microdissección se ha propuesto una compartimentación intracelular para la degradación y síntesis de glucosa en el riñón. Estos resultados, junto a los

obtenidos en nuestro laboratorio, apoyan la idea que la producción de glucosa endógena renal ocurriría principalmente en túbulos proximales, mientras los túbulos distales en el riñón contribuirían a la actividad glicolítica. Este tipo de compartimentación podría ser importante para prevenir el ciclaje de sustratos, pues la glicólisis y la gluconeogénesis ocurren en el citoplasma. En forma similar, se ha sugerido que hepatocitos localizados en la zona periportal realizan gluconeogénesis, mientras la glicólisis está restringida a los hepatocitos en la zona perivenosa.

Existen diversos ejemplos de interacciones de enzimas metabólicas a estructuras celulares, como es el caso de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de diferentes fuentes (cerebro, músculo y eritrocitos) que se une a microtúbulos (Huitorel y Pantaloni, 1985). Otro ejemplo, es el de hexoquinasa (HK) que se asocia a la membrana externa de la mitocondria (Ehsani-Zonouz *et al.*, 2001). Es interesante que HK unida a mitocondria es más activa, y que esta asociación la desensibiliza frente a la inhibición por glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) (Zasshi, 1999). Para el caso de glucosa-6-fosfatasa (Glc-6-Pasa), se ha descrito una asociación con retículo endoplásmico rugoso (Gumbhir *et al.*, 1983; Zakim y Edmondson, 1982). En este contexto, y como se mencionó anteriormente, se ha descrito que varias enzimas glicolíticas interactúan con proteínas del citoesqueleto (Lilling y Beitner 1990), por ejemplo, en el músculo existen estas asociaciones con filamentos de actina (Westrin y Backman, 1983). Así, es el caso de las isoenzimas de aldolasa humana que interactúan con filamentos de actina en forma diferenciada y tejido específica (Kusakabe *et al.*, 1997). Mas aún, estas interacciones pueden modular las propiedades de las enzimas, por ejemplo, la activación de fosfofructoquinasa por AMP y fructosa-2,6-P₂ es eliminada al asociarse la enzima con actina (Skaleki *et al.*, 1995).

In vivo, las asociaciones entre enzimas han demostrado ser dinámicas y estabilizadas por fuerzas relativamente débiles, por lo tanto, estos complejos son fácilmente disociables y difíciles

de purificar (Ovádi y Srere, 2000). El concepto de complejos multienzimáticos es apoyado fuertemente por la existencia reconocida de interacciones proteína-proteína, entre estos se incluyen el complejo de la piruvato-deshidrogenasa (Reed, 1981, Reed *et al.*, 1975, 1978), que cataliza la transformación de piruvato en acetil-CoA, y el complejo de la sintetasa de ácidos grasos (Volpe y Vangelos, 1976, Wakil y Stoops, 1983). Otro ejemplo, es el caso del complejo de *Neurospora crassa* que cataliza cinco reacciones consecutivas en la vía central de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Ricard *et al.*, 1994).

Estas asociaciones pueden ser un mecanismo crucial para la regulación de metabolismo celular, pero además existe otro factor importante: **la localización subcelular**. Cabe destacar la relación estructural en *Drosophila melanogaster* entre enzimas glicolíticas y el aparato miofibrilar contráctil, donde la ausencia de colocalización entre aldolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), al no expresarse glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH-3), produce una pérdida total de la capacidad para volar en las moscas con esta característica (Wojtas *et al.*, 1997). Esto indica que la presencia de enzimas activas en las células no basta para la función muscular; además se requiere de una organización subcelular de las enzimas glicolíticas.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la isoenzima hepática de FBPasa y aldolasa B presentan una localización compartimentalizada en los túbulos próximos del riñón y en la zona periportal en el hígado. Con una localización subcelular de estas enzimas preferentemente nuclear y perinuclear (Sáez *et al.*, 1996, 2000). En cambio, se postula que en tejido renal las enzimas glicolíticas se expresarían preferentemente en túbulos distales del nefrón y en la región perivenosa del hígado, (Lawrence *et al.*, 1986).

Sin embargo, la distribución y localización de la isoenzima muscular de FBPasa y de aldolasa A en distintos tejidos no están claramente establecidas. Es notable que, al comparar los

parámetros cinéticos de la FBPasa muscular y las concentraciones de AMP, en músculo humano en descanso y en ejercicio, la FBPasa debería estar inhibida en un 99,9%. Además, la concentración de FBPasa *in vivo* es 100 veces mayor que la concentración de Fru-1,6-P₂, y es comparable a la de su inhibidor Fru-2,6-P₂ (Skalecki *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha descrito la síntesis de glicógeno a partir de lactato en músculo de rata, lo que no es congruente con una FBPasa inhibida (Gaesser y Brooks, 1984). Estos resultados señalan claramente que deben existir mecanismos de desensibilización para la FBPasa muscular. Una explicación plausible es la modulación de sus propiedades alostéricas producida por su interacción con otras proteínas, y cambios en su localización subcelular. Por ello, fue interesante determinar la localización de aldolasa A en relación con FBPasa muscular, como un apunte para determinar otras interacciones *in vivo* y comprender la dinámica de los procesos metabólicos en el interior de la célula.

Basándose en lo expuesto anteriormente se postuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“La regulación de la expresión y la localización subcelular de las isoenzimas musculares de aldolasa y FBPasa es importante en el metabolismo de hidratos de carbono, en diferentes tejidos de rata. La localización y distribución de estas isoenzimas es específica y dependiente del estado metabólico y del tipo celular del tejido”.

Objetivos planteados. A partir de los antecedentes planteados se propuso, en primer lugar, clonar el fragmento codificante de la FBPasa muscular de rata, subclonar la enzima recombinante en el vector plasmidial de expresión pET 15b, expresar esta enzima en células *E. coli*, obtener la proteína en forma homogénea y preparar anticuerpos policlonales. Además, se propuso purificar aldolasa A de músculo de rata y preparar anticuerpos policlonales. El establecimiento de esta herramienta experimental permitiría, mediante inmunohistoquímica e

inmunofluorescencia, determinar la localización celular y subcelular de aldolasa A y FBPassa muscular, en distintos tejidos de rata, para posteriormente enfrentar los estudios de interacción proteína-proteína. En segundo lugar, se propuso generar la proteína de fusión entre la FBPassa muscular y la proteína reportera “Green Fluorescent Protein” (GFP), para determinar la localización intracelular mediante microscopía de fluorescencia, en una línea celular derivada de músculo liso de aorta de rata (A-10) y en una línea celular derivada de miocito de ratón (C2C12).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Sigma Chemical Co.: canamicina, tris[hidroximetil]aminometano (Trizma-base), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), glucosa, RNAsa A, lauril dodecilsulfato de sodio (SDS), persulfato de amonio, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), bicarbonato de sodio, diaminobencidina (DAB), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), azul de bromofenol, polilisina.

Merck, Darmstadt, Alemania: hidróxido de sodio, isopropanol, etanol, ácido fórmico, ácido acético, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Temed), dimetil sulfóxido (DMSO), fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de potasio, metanol, cloroformo, alcohol isoamílico.

Invitrogen: medio LB Broth base en polvo (Lennox L Broth base), agar en polvo, tampón de fenol saturado en agua, enzima de restricción Sal I, agarosa ultra pura, acrilamida, bisacrilamida (N,N'- metilenbisacrilamida), medio de Eagle modificado por Dulbecco 1g/l glucosa (DMEM), medio de Eagle modificado por Dulbecco sin glucosa (DMEM), solución antibiótico-antimicótico, tripsina, kit "Concert Rapid Plasmid miniprep System", albúmina sérica de bovino Fracción V liofilizada (BSA), Lipofectamina 2000, bromuro de etidio, desoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP).

Clontech: plasmidio pEGFP-C1.

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

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

Bio Labs: enzima de restricción Hind III, enzima de restricción Bam HI, enzima de restricción Nde I, albúmina sérica de bovino purificada en solución 100X (BSA), enzima de restricción Pst I.

5 Prime→3 Prime, Inc.: agua desionizada y estéril ultrapura.

Novagen: pET-15b System, *E. Coli* cepa BL21 DE3.

GibcoBRL “Life Technologies”: “CONCERT™ Rapid PlasmidMini Prep System”, “CONCERT™ Rapid PlasmidMidi Prep System” y “CONCERT™ Rapid Gel Extraction System”.

Riedel de Haen: rojo fenol.

Fluka AG: paraformaldehido.

Dako: medio de montaje "Fluorescent mounting medium", “ICQ kit LSAB plus”.

Molecular Probes: anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa, anticuerpo de cabra contra IgG de conejo Alexa Fluor 488.

W y Z: marcador de escala de DNA 1 kb y 100 kb, estándar de peso molecular para proteínas y, estándar preteñido de peso molecular para proteínas

Omega BIO-tek Inc.: “E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit” y “E.Z.N.A. Gel Extraction kit”

Bio-Rad: kit para determinar concentración de proteínas “Bio-Rad Protein Assay”.

Frigosor: suero fetal de bovino.

BioSonda: Se encargó la síntesis de los siguientes oligonucleótidos:

NH₂ratmus : 5' CT CAA gCT TCA CAT ATg Acg gAC AgA AgC AgC CCC TTT 3'

COOHrat mus : 5' ggT CCg TCg ACT ACC TgC CTg CCT ggT TTC TTT gC 3'

Animales de experimentación utilizados.

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) macho de 60 días de desarrollo y conejos (*Oryctolagus cuniculus*) que fueron adquiridos en el bioterio del Instituto de Fisiología de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2. Equipos

Balanza analítica Shimadzu (Libror AEX-120 G), espectrofotómetro Shimadzu (UV-150-02), 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 Cyclor), termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400), centrífuga Fisher Scientific (Micro V), micropipetas Gilson, horno microondas Somela (E 70 TF-7), centrífuga Heraus Sepatech (Megafuge 1.0 R), fuente de poder Life Technologies (model 500), agitador termorregulado lab-line instruments (Lab-Line Orbit Environ-Shaker), centrífuga Eppendorf (5417 R), centrifuga Sorvall (RC 5C), cámara de bioseguridad Nuair (class II type A), estufa de cultivo con inyección de CO₂ Nuair (Ir Autoflow) microscopio invertido Nikon (TMS), microscopio invertido Nova (IN 833), microscopio de fluorescencia Zeiss (Axioskop HBO 50 con cámara fotográfica MC 80), microscopio Zeiss (Axioskop 2 con cámara fotográfica MC 80 DX), 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), sistema de transferencia Bio-Rad (semy-dry transfer cell TRANS-BLOT SD), centrifuga Hettich (MIKRO 22R).

3.2 Métodos

3.2.1 Purificación de RNA total por el método TRIzol

Se extrajo una muestra de músculo de rata macho adulta, muerta por dislocación cervical, de 100 mg de peso. Se colocó la muestra en un tubo de ensayo autoclavado, se mezcló con 1 ml de TRIzol y se homogeneizó utilizando un politrón (Ultraturax), cuidando que el volumen de la muestra no excediera el 10 % del volumen de TRIzol. Luego, el homogeneizado fue incubado por 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 0,2 ml de cloroformo y se agitó en Vortex por 15 s y luego se incubó a temperatura ambiente por 3 min. La solución resultante se centrifugó a 9.000

r.p.m. por 20 min, a 4 °C, en rotor SS-34 (SORVALL). Luego, se traspasó la fase acuosa (capa superior incolora) a un tubo Eppendorf de 2 ml y se adicionaron 400 µl de solución de fenol saturado, se esperó por 10 s, y posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo, después de lo cual se agitó en Vortex por 15 s, se incubó a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó, nuevamente, bajo las mismas condiciones anteriores. La fase acuosa se transfirió a otro tubo estéril y el RNA fue precipitado agregando 500 µl de isopropanol 100 % y mezclando en Vortex a velocidad media por 5 s. Paso seguido, se incubó la muestra a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 9.000 r.p.m. por 10 min, a 4 °C, en el mismo rotor antes utilizado. El RNA precipitado luego de la centrifugación fue transparente, debido a la sedimentación tipo gel que presenta. Cuidadosamente, se extrajo el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 75 %, se mezcló por agitación en Vortex y se centrifugó a 7.500 r.p.m. por 10 min, a 4 °C, en rotor SS-34. El etanol fue extraído con cuidado y el sedimento se dejó a temperatura ambiente por 10 min, para dejar evaporar el resto de etanol remanente en el tubo. Finalmente, se disolvió el RNA en 200 µl de tampón TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 y EDTA 1mM) y se incubó a 55 °C, por 10 min, para luego ser cuantificado.

3.2.2 Cuantificación de RNA

Se realizó una dilución de mil veces de la muestra de RNA en agua libre de RNAasa y se leyó en cubetas de cuarzo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro. Para cuantificar se utilizó la equivalencia que 40 µg/ml de RNA tiene una unidad de absorbancia a 260 nm de 1. Para determinar el grado de pureza se calculó la razón A_{260}/A_{280} . Esta debe ser entre 1,6 y 1,8 para descartar la contaminación por proteínas de la muestra.

3.2.3 Análisis electroforético del RNA en geles de agarosa/formaldehído

El gel se preparó fundiendo 0,3 g de agarosa en 20 ml de agua estéril y se dejó enfriar hasta 60 °C, luego se adicionaron 3 ml de tampón MOPS 10 X (MOPS 200mM pH 7,0, acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM) y 5,4 ml de formaldehído 37%. La solución se afora a 30 ml con agua estéril y fue vertida sobre el molde. El gel fue pre-corrido por 5 min a amperaje mínimo en tampón MOPS 1X.

Las muestras se prepararon adicionado 2 µl 10X MOPS, 3,5 µl de formaldehído 37% y 10 µl de formamida desionizada. Se incubó a 65 °C, por 15 min y se dejó enfriar en hielo. Finalmente, se adicionaron 2 µl de tampón de muestra conteniendo bromuro de etidio y se cargó en el gel.

3.2.4 Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total de músculo. Se mezclaron 10 µl de RNA total de músculo, 0,5 µg/µl, más 2,5 µg de oligo dT y 1 µl de agua libre de RNAsa. Se incubó a 70 °C, por 10 min. Se enfrió en hielo y se agregó 5µl de tampón 5X para transcriptasa reversa M-MLV, 2 µl de agua libre de DNAsa y RNAsa, 5 µl de una mezcla de desoxinucléotidos trifosfato 2,5 mM y 1 µl de transcriptasa reversa M-MLV. En un termociclador se incubó a 37 °C por 1 h y luego 15 min a 70 °C.

3.2.5 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Para la obtención del cDNA específico para la FBPasa muscular se utilizó la técnica de PCR, usando los oligos NH₂ratmus y COOHratmus, específicos para el cDNA de esta enzima. Para la reacción se mezclaron 5 µl de tampón PCR Pfu 10X, 4 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfatado 2,5 mM de cada uno en la mezcla, 2 µl de solución 50 mM de MgSO₄, 100 ng de cDNA FBPasa músculo, 4 µl a una concentración de 10 pmoles/µl de cada oligo, 0,5 µl de Pfu Polimerasa y 26 µl de agua libre de RNAsa y DNAsa. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador: denaturación 2 min a 95 °C; 30 ciclos incubando por 30 s a 94 °C; 1 min a 60 °C; 2 min a 68 °C, y una etapa de extensión final a de 7 min a 68 °C.

3.2.6 Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa

El gel fue preparado a una concentración de 1,2 % fundiendo 0,48 g de agarosa en 40 ml de tampón TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM) y se dejó enfriar hasta 60 °C, luego la solución fue vertida sobre el molde (8,5 x 6,5 cm). El gel fue pre-corrído por 5 min a 10 V en tampón TBE 1X. Las muestra de DNA se prepararon 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 g/ml), se mezcló por pipeteo y se cargó con micro pipeta cada muestra en un pocillo del 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 unido al DNA.

3.2.7 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, el medio fue autoclavado inmediatamente después de su preparación.

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

3.2.8 Transformación de bacterias *E.coli*

Se prepararon bacterias *E. Coli*. Cepa JM 109 competentes 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 le agregó de 0,5 a 1,0 µl del DNA plasmidial de interés (aproximadamente 100 ng), se mezcló suavemente y se dejó una hora en hielo. Luego se incubaron las muestras a 42 °C por 90 s en agitador termorregulado (Lab-Line Orbit Environ-Shaker), y su contenido se cargó a un tubo Falcon de 15 ml estéril conteniendo 1 ml de medio LB líquido, el cual se incubó a 37 °C por 1 h con una agitación constante de 225 r.p.m. Una vez transcurrido el tiempo se sembraron dos placas LB-agar con el antibiótico correspondiente (ampicilina para bacterias transformada con el plasmidio pGem T EASY y pET 15b y canamicina para bacterias transformada con el plasmidio pEGFP c1.). Se incubaron las placas en estufa cultivo a 37 °C por toda la noche (12 h a 18 h), por la mañana se observa el crecimiento de aquellas bacterias transformadas que adquirieron la resistencia al antibiótico respectivo.

3.2.9 Purificación de DNA plasmidial por un kit comercial

Se utilizaron los kits comerciales mini prep Omega y Gibco BRL. En ambos kit se utiliza básicamente el método de lisis alcalina. Para ello, se inoculó con una colonia, extraída desde un cultivo en placa agar LB de 12 h, en un volumen de 5 ml de medio LB con el antibiótico adecuado. Se incubó en agitador termorregulado (Lab-Line Orbit Environ-Shaker) a 37 °C por 12 h con agitación constante de 225 r.p.m. en incubadora termorregulada. Luego, se centrifugó a 4.000 X g, a temperatura ambiente por 6 min, el sobrenadante fue eliminado apropiadamente. El sedimento fue resuspendido con 250 µl de la solución I de homogeneización del kit, luego se agregaron 250 µl de la solución II de lisis y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego se agregaron 350 µl la solución III de neutralización, y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 10.000 X g a 4 °C, por 10 min. El sobrenadante fue cargado en una columna del kit para la purificación del DNA plasmidial, se centrifugó a 10.000 r.p.m. a 4°C por 1 min y se eliminó el eluato, la columna se lavó 2 veces con solución de lavado, centrifugando después de cada lavado. Finalmente se eluyó el DNA adicionando 100 µl de tampón TE calentada previamente a 65 °C, y la columna fue centrifugada a 10.000 X g, por 2 min.

3.2.10 Extracción de DNA desde geles de agarosa

Se ocupó el kit comercial “CONCERT™ Rapid Gel Extraction System”. Para extraer el DNA desde un gel de agarosa al 1 %, se cortó el área del gel que contiene el DNA, se agregó la solución LI y se calentó a 50 °C por 15 min, mezclando regularmente. Luego, se carga la solución con la agarosa disuelta en una columna. Se centrifugó a 12.000 X g por 1 min y se eliminó el eluato, para lavar se adiciono la solución L1, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó nuevamente eliminando la solución que paso a través de la columna. Se agregaron 500

μl de la solución de lavado L2 y se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó 2 veces para eliminar toda la solución que pasó por la columna. Para eluir el DNA se carga la solución TE a 65 °C en la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y luego se centrifugó a 12.000 X g, por 2 min, recolectando la solución en un tubo Eppendorf estéril.

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 fue diluida 10-100 veces y la concentración aproximada de estas muestras se determinó utilizando la relación de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA doble hebra presenta una absorbancia a 260 nm de 1. La concentración final de las soluciones se obtuvieron al multiplicar el resultado anterior por la dilución de la muestra.

3.2.12 Análisis de digestión con endonucleasas de restricción

Los análisis con endonucleasas de restricción, se hicieron usando 2 μg de DNA plasmidial (alrededor de 10 μl de volumen) a los cuales se le agregó 0,5 μl de enzima (26000-100.000 U/ml) y 1,1 μl de tampón apropiado para cada enzima. Luego, esta solución se incubó a 37 °C por 3 h. En los casos de doble digestión, se le agregó la misma cantidad anteriormente indicada de cada enzima, pero se escogió un tampón en que la actividad de ambas enzimas fuera óptima (concentración de sales). La reacción se realizó con la misma concentración de enzimas en 20 μl totales de reacción. Las digestiones con endonucleasas para liberar y purificar fragmentos y obtener de DNA, se realizaron de manera similar pero con volúmenes de digestión 4-5 veces mayor, incrementado en forma proporcional la cantidad de DNA y las unidades de enzimas de restricción.

3.2.13 Ligación del fragmento codificante de FBPasa muscular a vectores plasmidiales

Las ligaciones del fragmento codificante de FBPasa muscular en los distintos vectores plasmidiales se realizaron utilizando una relación 1:10 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, posteriormente, se agregó el tampón ligasa y 0,5-1 U/g de DNA T4 DNA ligasa, y luego se incubó a temperatura ambiente por 1 h y luego a 16 °C por 12-14 h. Finalmente, esta mezcla se utilizó para transformar bacterias *E. coli* JM109 o BL21 DE3 por el método tradicional descrito anteriormente.

3.2.14 Subclonamiento en vector pET-15b

En forma general se siguió los protocolos descritos en los manuales técnicos pET System (Novagen). Una muestra de DNA proveniente de una preparación plasmidial pET 15b TM y pGEM-FBPasa se sometió a digestión doble con BamH I y Nde I (durante 3 h a 37 °C). Terminado el tiempo de incubación la muestra de DNA fue sometida a electroforesis en agarosa 1%. Las bandas correspondientes al inserto liberado de 1kb desde el vector pGEM-FBPasa y el vector cortado pET-15b fueron extraídas desde el gel de agarosa y purificadas utilizando el kit “CONCERTTM Rapid Gel Extraction System”. Una vez finalizada la extracción correspondiente al fragmento codificante de FBPasa y el vector de expresión pET-15b, se ligaron ambos fragmentos como se señala en **Métodos 3.2.13**. El resultado de la ligación fue verificado por análisis con enzimas de restricción y visualizado por electroforesis en gel de agarosa.

3.2.15 Expresión y purificación de la enzima FBPasa muscular

Para la expresión y purificación de la enzima FBPasa muscular, se siguió el protocolo establecido en pET 15b System de Promega, con algunas modificaciones. Básicamente el proceso se dividió en las siguientes etapas: Pre-cultivo de células BL21 DE3, cultivo de células BL21 DE3, expresión de enzima, lisis bacteriana, cromatografía de afinidad en columna Sefarosa níquel (Sefarosa-níquel) y diálisis.

Pre-cultivo de células BL21 DE3. Para expresar la enzima se transformaron células BL21 DE3 con el vector pET-15b-FBPasa muscular, sembrando en placas de cultivo LB más ampicilina (125 µg/ml), cultivadas a 37 °C por 12 h. Luego, se tomó una colonia y se inoculó 50 ml de medio LB más ampicilina (125 µg/ml), incubando en agitador termorregulado (Lab-Line Orbit Environ-Shaker) a 37 °C, por 8-12 h, con una agitación constante de 250 r.p.m.

Cultivo de células BL21 DE3. El precultivo se centrifugó en rotor SLA 3000 (SORVALL) a 7.000 r.p.m. a 4 °C, por 7 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 42 ml de medio LB. Posteriormente, adicionando 7 ml de esta suspensión bacteriana se inocularon 6 matraces que contienen 700 ml de medio LB y ampicilina (125 µg/ml). Estos fueron incubados con una agitación constante de 250 r.p.m. a 37 °C, hasta obtener una absorbancia a 600 nm de entre 0,6-0,8 (aproximadamente en 3,5 a 4 h).

Expresión de FBPasa muscular. Una vez finalizada la incubación los matraces fueron retirados del agitador y se incubaron en hielo para disminuir la temperatura a 20 °C. Luego se agregó el inductor IPTG a una concentración 0,4 mM final, para comenzar la expresión de la proteína y se incubó a 30 °C por 4 h, con una agitación constante de 250 r.p.m. en agitador termorregulado.

Lisis bacteriana. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación, en un rotor SLA-3000 (SORVALL) a 7.000 r.p.m. a 4 °C, por 7 min. El sedimento celular fue resuspendido en 380 ml de tampón de unión (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) conteniendo además Tritón X-100 0,4 %. La lisis celular se realizó en hielo por 4 horas con esporádicas agitaciones, y posteriormente, esta suspensión fue sonicada durante 6 min con ciclo de descanso y con una intensidad de un 60% en un Ultrasonic Homogeneizer 4710 series de COLE & PALMER. La solución post-sonicada fue calentada en bañomaría hasta 50 °C e incubada en un baño termorregulado a 56 °C, por 5 min, y luego rápidamente enfriada hasta 10 °C, en baño de agua con hielo. La solución fue centrifugada en un rotor GSA a 11.000 r.p.m. a 4 °C, por 30 min, el sedimento compuesto por restos celulares fue eliminado y el sobrenadante con el contenido citoplasmático fue utilizado en la siguiente etapa.

Cromatografía de afinidad en columna Sefarosa-niquel (His-binding resin). La purificación de la proteína fue realizada mediante una cromatografía de afinidad en una columna sepharose níquel resin (sefarosa-niquel). Para ello, el producto de la lisis bacteriana se sometió a centrifugación en un rotor GSA a 11.000 r.p.m. a 4 °C, por 40 min. El sobrenadante fue cargado a la columna de cromatografía que contenía 10 ml de resina sefarosa níquel. Esta columna fue previamente equilibrada en tampón de unión a 4 °C. Posteriormente, la columna fue lavada con 5 volúmenes de solución tampón de unión y con 60 ml de la solución tampón de lavado (tampón de unión con imidazol 60 mM). Finalmente, la enzima se eluyó con 15 ml de solución tampón de elución (tampón de unión con imidazol 200 mM y fru-1,6-P₂ 500 μM).

Diálisis. La enzima fue dializada realizando 4 cambios cada uno de 1 l de tampón que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM en una bolsa de diálisis de tamaño de poro de 4,8 Å, eliminando las sales. Finalmente, la enzima fue almacenada a -70 °C en alícuotas de 200

μ l, 1.000 μ l y 15 ml. De las distintas etapas de purificación se guardaron alícuotas representativas de la fracción para ser analizadas en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones denaturantes.

3.2.16 Purificación de aldolasa A

Se homogeneizó una porción de 80 g de músculo fresco de rata en 400 ml de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7, EDTA 1 mM; con 10 mg de PSMF en un politrón (Ultraturrax) por 2 a 3 min. El homogeneizado fue centrifugado en rotor GSA a 8.000 r.p.m., a 4 °C, por 10 min. El sobrenadante fue filtrado a través de lana de vidrio para eliminar flóculos de grasa, la solución resultante (crudo) fue calentada en baño María hasta 50 °C y luego mantenida en baño termostático a 55 °C por 5 min y luego rápidamente enfriada hasta 10 °C en baño de agua con hielo. La solución fue centrifugada en un rotor GSA a 11.000 r.p.m. a 4 °C por 30 min. Al sobrenadante (post-55 °C) se agregó lentamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta llegar a una concentración de 50 % de saturación. Luego se centrifugó en rotor GSA a 8.000 r.p.m., a 4 °C, por 10 min, y el precipitado fue resuspendido en 10 ml de una solución amortiguadora de Tris-HCl 20mM, pH 7,0, EDTA 1 mM (pp. 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Al sobrenadante (S/N pp. 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) se agregó lentamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta llegar a una concentración de 65 % de saturación, se incubó a 4 °C por 30 min. Luego se centrifuga en rotor GSA a 8.000 r.p.m. a 4 °C por 10 min, se guardó una alícuota del sobrenadante (S/N pp. 65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y el precipitado fue resuspendido en 100 ml de una solución amortiguadora de Tris-HCl 20mM, pH 7,0, EDTA 1 mM. Posteriormente la resuspensión del precipitado a 65% de saturación se dializó a 4 °C durante 24 h en una bolsa de diálisis (Dialyzer tubing) de tamaño de poro de 4,8 Å, realizando tres cambios de 2 l de solución Tris-HCl 20mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM. La solución dializada se centrifugó en rotor SS-34 a 10.000 r.p.m. por 30 min a 4° C y el sobrenadante fue aplicado a un sistema acoplado de dos

columnas; la superior de celulosa DE-52 y seguida de carboximetil-sefarosa, ambas resinas fueron previamente equilibradas con tampón Tris-HCl 20mM, pH 7,0, EDTA 1 mM. Una vez aplicada la solución a las columnas se lavan con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm del eluato fuera menor a 0,04 unidades de absorbancia. Posteriormente, aldolasa A se eluyó con un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 100 mM recolectándose en fracciones de 5 ml. Las distintas fracciones fueron analizadas según actividad y por electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes.

3.2.17 Ensayo espectrofotométrico de determinación de actividad enzimática de aldolasa

La actividad de la enzima se determinó espectrofotométricamente mediante un ensayo acoplado a las enzimas triosafosfato isomerasa (TPI) y α -glicerolfosfato deshidrogenasa (α -GPD). La reacción se realizó en tampón Tris-HCl 35 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, además de NADH 0,1 mM, MgSO₄ 5 mM, 1 U de TPI, 1 U de α -GPD y Fru-1,6-P₂ 0,6 mM. La reacción se inició al agregar aldolasa. En los ensayos enzimáticos se agregaron 20 μ l de muestra, llegando a un volumen final de reacción de 500 μ l.

Utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodo Hewlett Packard modelo 8453, se registró el decaimiento en el tiempo de la absorbancia a 340 nm. Por estequiometría, esta velocidad se puede traducir como la velocidad de aldolasa A. Se definió 1 U de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la hidrólisis de 1 μ mol de sustrato en un minuto a 30 °C.

3.2.18 Determinación de la concentración de proteínas totales y FBPasa muscular

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el sistema Bio-Rad Protein assay de Bio-Rad, el cual se basa en la determinación de proteínas por la unión del colorante azul de Coomasie G-250 (Bradford, 1976). El reactivo colorante fue diluido 5 veces en tampón Tris-HCl 20mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM, y se mezclaron 500 μ l del reactivo colorante con 125 μ l de dilución de la muestra de proteína diluida 500 ó 1000 veces. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150. La curva de calibración se realizó con una muestra de BSA de concentración conocida. Finalmente la concentración de las muestras se calculó por interpolación de la absorbancia obtenida en la curva de calibración.

La concentración de la FBPasa muscular de rata se estimó considerando que 1 mg/ml de proteína pura presenta una absorbancia de 0,68 a 280 nm con 1 cm de camino óptico (Tonder *et al*, 1985).

3.2.19 Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Para llevar a cabo la electroforesis se utilizó el sistema de Bio-Rad "Mini protean II": El gel separador contenía poliacrilamida con un porcentaje de entrecruzamiento de un 2,6 %, en amortiguador Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS 0,4% y se polimerizó adicionando persulfato de amonio 0,01% y TEMED 0,2% como agentes catalizadores redox. El gel concentrador contenía poliacrilamida al 5,5 %, con el mismo grado de entrecruzamiento que el gel separador, en amortiguador Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, con SDS 0,04% y se polimerizó en las mismas condiciones anteriores.

El amortiguador de electroforesis contenía Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %. En el gel se aplicó una corriente de 4 mA por cm de gel (7 cm) por 45 min. Posteriormente, los geles fueron fijados en una solución que contenía metanol 30 % y ácido acético 10%, con agitación suave. Para visualizar la migración de las proteínas en el gel, estas fueron teñidas con una solución de azul de Coomasie R 0,3 % en metanol 50% /ácido acético 10 %, durante 25 min, y posteriormente, fue desteñido en una solución de metanol 10%, etanol 20 % y ácido acético 10 %, por 25 min.

3.2.20 Obtención de suero anti-FBPasa muscular y aldolasa A desde conejos

El proceso de inmunización y obtención de suero anti-FBPasa muscular y anti-aldolasa A se realizó en conejos machos, los cuales fueron mantenidos con alimento y agua “*ad libitum*”, en el bioterio para animales de experimentación del Instituto de Fisiología de la Universidad Austral de Chile.

Los antígenos utilizados en conejos fueron FBPasa muscular recombinante y aldolasa A purificados obtenido según los pasos **3.2.15** y **3.2.16** respectivamente. El protocolo de inmunización fue el siguiente:

Día 1: Los conejos fueron sangrados por la oreja, para la obtención del suero pre-inmune. Luego, cada conejo fue inoculado con una mezcla de 0,5 mg de las proteínas respectivas en solución de suero fisiológico (3 ml) y coadyuvante completo de Freund (3 ml), los cuales fueron inyectados en forma subcutánea en varias zonas del lomo del conejo en dosis de 0,5 ml.

Día 15: Se inyectó 1 a cada conejo igual cantidad de antígenos que el día, pero la emulsión se realizó con coadyuvante incompleto de Freund.

Día 30: Se indujo respuesta inmune inyectando intraperitonealmente 0,5 mg de proteína disuelta en 2 ml de suero fisiológico.

Día 40: Se extrajeron 6 ml de sangre por la oreja para obtener suero. Mediante método de dot blot y inmunodetección en transferencia Western se determinó el título y la especificidad de los anticuerpos.

Para obtener el suero se incubó la sangre a 37 °C en un tubo de vidrio estéril por 30 min y luego se esperó 2 h a temperatura ambiente, para la retracción del coágulo. Los eritrocitos remanentes fueron separados del suero por centrifugación a 500 x g. por 15 min, en una centrífuga MIKRO 22R. El suero obtenido fue guardado en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

3.2.21 Inmunodetección en transferencia Western y método de ensayo en gota (dot-blot)

Se realizó, en primer lugar, una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con la muestra de proteínas a analizar. Posteriormente, el gel fue transferido a papel de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia Bio-Rad (Trans-Blot SD) por 30 min a 20 V. Luego se incubó a temperatura ambiente por 30 min con una solución de bloqueo compuesta por PBS (NaCl 159 mM, NaH₂PO₄ 12 mM.)-Tween-Leche (Tween 20 0,3%, leche descremada 5% en tampón PBS), se incubó con el primer anticuerpo diluido en la solución de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente por 1 h con agitación suave y constante. Posteriormente, se lavó la nitrocelulosa 3 veces por 10 min con la solución de bloqueo, y luego se incubó el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa en dilución 1:1000 en solución de bloqueo a temperatura ambiente por 1 h con agitación. Finalmente, la inmunorreacción se visualizó utilizando una solución reveladora (0,15% H₂O₂, DAB 0,5 mg/ml, Tween 20 0,3% en PBS).

Para el método de ensayo en gota se utilizaron cintas de papel de nitrocelulosa (3 x 1 cm) donde se sembraron distintas cantidades de proteínas, las cuales fueron tratadas de manera similar a lo descrito para la transferencia Western, con la diferencia que cada cinta era incubada con distintas diluciones del primer anticuerpo por separado.

3.2.22 Inmunohistoquímica en tejidos de rata

La inmunohistoquímica al portaobjetos con las muestras de tejidos de rata fijados e incluidos en solución Bouin se realizó con el kit “ICQ LSAB plus”. Primero, los cortes fueron deparafinados con lavados sucesivos en xilol, etanol 100%, etanol 95% y agua.

Luego se incubó temperatura ambiente por 5 min en una solución de H₂O₂ 3% en PBS, se lavó con agua y se incubó con una solución de citrato de sodio 10 mM pH 6,0, calentando primero en un microondas y luego dejando incubar a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con PBS y se incubó una hora con solución de bloqueo (5% leche descremada, 1% BSA en PBS y 0,3 % Triton X-100). Después, se incubó con el primer anticuerpo (anti-aldolasa A) en una dilución de 1:1000 por una hora. Se lavó con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo proveído por el kit (anti-IgG de conejo acoplado a biotina). Finalmente, se lavó con PBS, se incubó con una solución de estreptovidina acoplada a peroxidasa y se reveló con una solución conteniendo DAB (ambas aportadas por el kit). Para las muestras tratadas con el segundo anticuerpo fluorescente y tinción nuclear con yoduro de propidio, se siguió el mismo protocolo para deparafinar las muestras y exposición de epítopes con citrato y se incubó una hora con solución de bloqueo. Luego, las muestras fueron incubadas con RNAsa 200 µg/ml a temperatura ambiente por 30 min, 2 lavados con TBS y luego se incubaron a temperatura ambiente por 5 min con yoduro de propidio 1 µg/µl. Luego, se realizaron 3 lavados con tampón TBS, se incubó con el

primer anticuerpo y luego con el segundo siguiendo los pasos antes descritos para la inmunohistoquímica tradicional.

Después de secar los portaobjetos, se montaron con medio de montaje para muestras fluorescentes DAKO.

3.2.23 Cultivo celular

Las células C2C12 y A-10 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal y 1% antibiótico/antimicótico, en una atmósfera con CO₂ 5% a 37 °C. 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) para disociarlas y ser 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 disociadas con tripsina para poder realizar las siembras sobre cubre-objetos en placas, para posteriormente realizar transfecciones, o expandir la línea, en frascos o placas.

3.2.24 Transfecciones transitorias

La transfección de las células C2C12 y A-10 con el plásmido pEGFP-C1-FBPasa muscular, se realizó utilizando el reactivo de transfección sobre la base de 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 las líneas C2C12 Y A-10. En resumen, el protocolo de transfección dice que el DNA plasmidial (2 ó 6 μg , dependiendo de la línea) y la lipofectamina (1 ó 3 μl) se diluyeron en 50 μl de DMEM no suplementado; posteriormente, se mezclaron ambas diluciones y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente, se

agregó esta solución a placas de 35 mm de diámetro, donde se encuentran las células en cultivo a un 50-60% 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, utilizando distintas concentraciones de glucosa, durante 12 h. Posteriormente, se cambió el medio para eliminar el exceso de reactivo y se incubó a 37 °C por 24 h y 5% de CO₂ en medio DMEM completo sin glucosa, con glucosa 5 mM y con glucosa 25 mM. Luego, las monocapas de células sobre los cubreobjetos se fijaron en PBS/paraformaldehído 4% a temperatura ambiente por 10 min y se lavaron con PBS. Después de secar los cubreobjetos, se montaron en portaobjetos con medio de montaje para muestras fluorescentes DAKO. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia.

4. RESULTADOS

4.1 Diseño de partidores para FBPasa de músculo y purificación de RNA total de músculo

La aproximación experimental para el clonamiento de la FBPasa de músculo de *Rattus norvegicus* fue diseñar oligos específicos de la secuencia del cDNA de esta enzima, desde la base de datos “Gen Bank” localizada en el sitio web “National Center for Biotechnology Information” (GI: 3821283). Este mRNA está compuesto por 1282 pb, incluyendo la secuencia poliadenilada. Los oligos se diseñaron para amplificar desde el sitio de inicio de la transcripción (59) en el extremo 5’ hasta el sitio de finalización localizado en el nucleótido (1078) del extremo 3’. Además, estos oligos introducen secuencias de reconocimiento, para las enzimas de restricción Nde I y Sal I o Hind III y Bam HI. El cDNA utilizado para el clonamiento de FBPasa de músculo de rata se preparó a partir de RNA total de músculo purificado por el método TRIzol (ver Material y Métodos 3.2.1). La integridad del RNA total purificado fue determinada a través de una electroforesis en condiciones denaturantes en gel de agarosa al 1,2 % y teñido con bromuro de etidio (BrEt). Como se muestra en la figura 1, panel A, las bandas del rRNA 18S y 28S se encuentran en una proporción adecuada y no se observa degradación. Para amplificar el cDNA específico de FBPasa muscular de rata se usó el método de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), utilizando los oligos descritos (NH₂ratmus y COOHratmus) y la enzima Pfu polimerasa. El resultado de esta amplificación se muestra en el panel B de la figura 2. Se determinó, por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% utilizando un estándar de DNA de 1 Kb (carril 1), que el tamaño del producto de amplificación fue un fragmento de 1050 pb (Figura 2B, carril 2). Este tamaño molecular fue el esperado para el fragmento codificante de la FBPasa muscular.

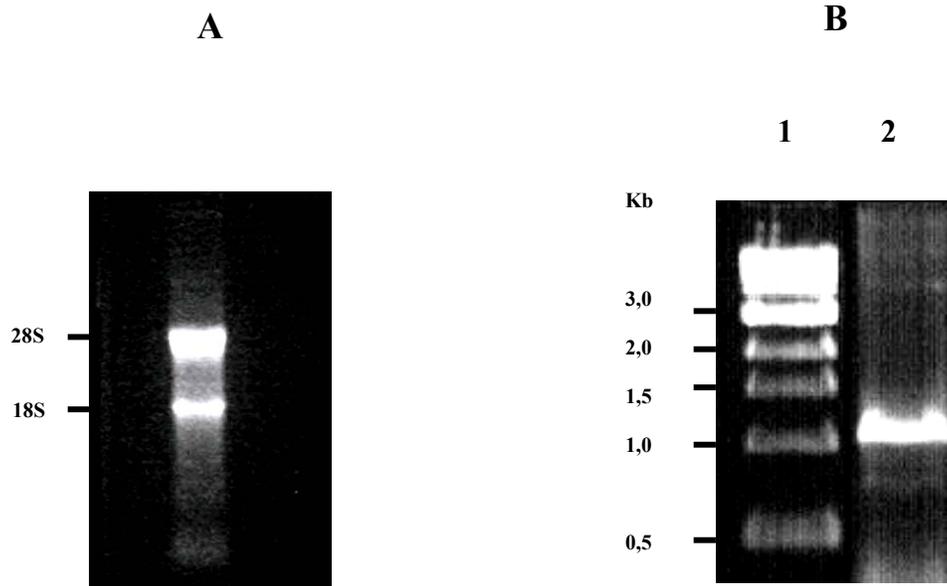


Figura 1, Panel A: Análisis electroforético del RNA total de músculo de rata. Panel B: Análisis electroforético del producto de amplificación de FBPasa muscular por RT-PCR.

Panel A: Las muestras de RNA (20 μ g) fueron corridas en un gel de agarosa al 1,2% en condiciones denaturantes y teñidas con BrEt, se observa la integridad de los rRNA 28 S y 18 S.

Panel B: En un gel de agarosa al 1,2% teñido con BrEt. Se analizó el producto de RT-PCR. Carril 1: Migración del marcador de DNA de escala de 1 Kb (0,5 μ g). Carril 2: Producto de amplificación de 1050 pb generado a partir de cDNA de músculo de rata utilizando los oligos NH₂ratmus y COOHratmus.

4.2 Subclonamiento en pEGFP-C1 y pET-15b

Una vez clonado el fragmento codificante de FBPassa muscular en el plásmido pGEM-T-Easy se liberó este con las enzimas de restricción Sal I y Hind III, y en iguales condiciones el plásmido pEGFP-C1 (Material y Métodos 3.2.12). Ambos productos de digestión fueron purificados desde el gel y ligados (Material y Métodos 3.2.10 y 3.2.13). Para subclonar el fragmento codificante de FBPassa muscular en el vector de expresión pET-15b se siguió la misma estrategia anterior, pero utilizando las endonucleasas Bam HI y Nde I.

Mediante análisis de restricción se verificó el resultado del subclonamiento del fragmento codificante en el plásmido pEGFP-C1, lo que se muestra en la figura 2, panel A. Realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% utilizando un estándar de DNA de tamaño molecular 100 pb (carril 1), se determinó el tamaño de los fragmentos liberados, producto de la digestión con las distintas endonucleasas. En el carril 2, se observa una banda con un tamaño de 5740 pb, correspondiente al DNA plasmidial sin digerir. La digestión del vector con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III libera el fragmento codificante de FBPassa muscular, el que tiene un tamaño de 1080 pb, (carril 3), la otra banda de mayor tamaño, 4660 pb, que corresponde al vector linearizado. Por otra parte, el resultado de la digestión con las enzimas Xho I y Bam HI se observa en el carril 4, la banda de tamaño 4650 pb corresponde al plásmido linearizado y la banda de menor tamaño, 1090 pb, corresponde al fragmento liberado por la digestión de estas enzimas. El vector fue linearizado con las enzimas Bam HI y Hind III, por separado, el resultado de esta linearización se muestra en los carriles 5 y 6, respectivamente, donde se obtiene el plásmido linearizado con un tamaño de 5740 pb. En último lugar, se muestra la digestión con la enzimas Nde I, ésta reconoce dos sitios en el constructo, una secuencia

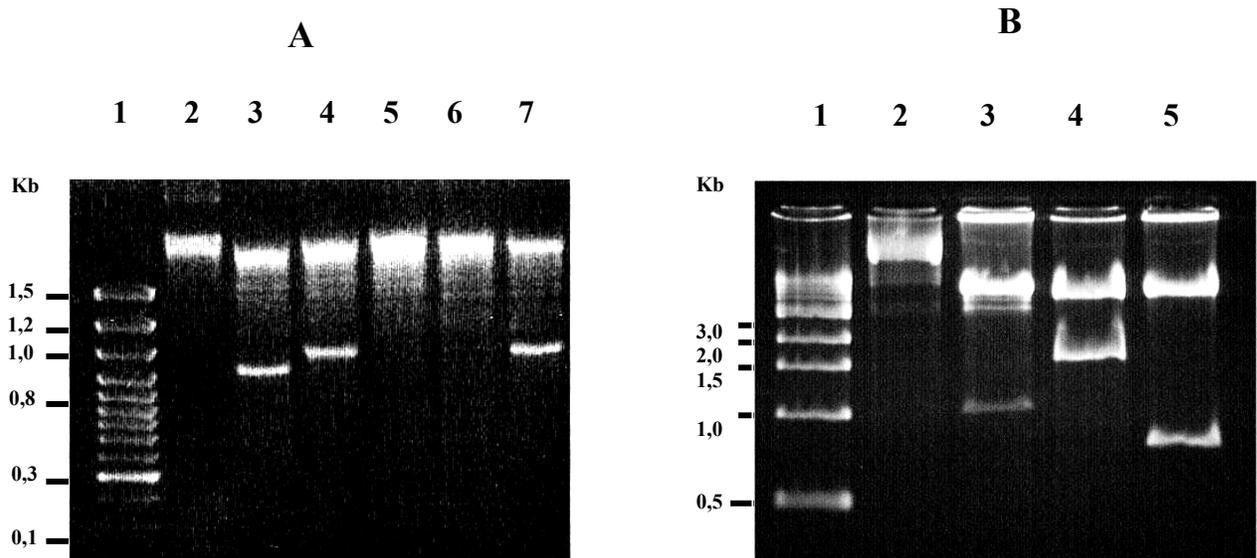


Figura 2: Análisis de restricción de los plásmidos pEGFP-C1-FBPasa de músculo y pET-15b FBPasa de músculo.

Panel A: Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con BrEt. Carril 1: Se muestra la migración del marcador de escala 0,1 Kb (0,5 μ g). Carril 2: Plásmido pEGFP-C1-FBPasa de músculo sin digerir. Carril 3: Digestión del plásmido con las enzimas Bam HI y Hind III. Carril 4: Digestión con las enzimas Xho I y Bam HI. Carril 5: Digestión con la enzima Bam HI. Carril 6: Digestión con la enzima Hind III. Carril 7: Digestión con la enzima Nde I. Todos los fragmentos liberados son del tamaño molecular esperado.

Panel B: Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con BrEt. Carril 1: Se muestra la migración del marcador de DNA de escala de 1 Kb (0,5 μ g). Carril 2: Plásmido pET-15b FBPasa de músculo sin digerir. Carril 3: Digestión con enzimas Nde I y Bam HI. Carril 4: Digestión con Pst I. Carril 5: Digestión con enzima Eco RI. Todos los fragmentos liberados son del tamaño molecular esperado.

introducida en el fragmento codificante por el oligo “NH₂ratmus” y la otra secuencia, al interior del fragmento codificante de la GFP. El fragmento de 1125 pb liberado por Nde I se muestra en el carril 7. Los datos demuestran que todos los fragmentos liberados fueron del tamaño molecular esperado.

Asimismo, se realizó el análisis de restricción al constructo pET-15b-FBPasa muscular. El resultado se muestra en la figura 2, panel B, que corresponde a una electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% teñido con BrEt. Utilizando un estándar de DNA de tamaño molecular 1 Kb (carril 1), se determinó el tamaño de los fragmentos liberados, producto de la digestión con las distintas endonucleasas. La banda correspondiente al plásmido pET-15b-FBPasa muscular sin digerir, 6780 pb, se muestra en el carril 2. La digestión doble con las enzimas de restricción Bam HI y Nde I (carril 3), muestra que la banda de menor tamaño (1080 pb) corresponde al fragmento codificante de FBPasa muscular y la banda de mayor tamaño corresponde al plásmido linearizado. La digestión con la enzima de restricción Pst I libera un fragmento de 1570 pb (carril 4) al reconocer dos sitios de restricción; uno propio de la secuencia del vector, y el otro al interior de la secuencia del fragmento codificante de la FBPasa muscular. Finalmente, la digestión con la enzima de restricción Eco RI libera un fragmento de 910 pb, al reconocer dos sitios de restricción; uno al interior de la secuencia del plásmido y otro sitio al interior del fragmento codificante de FBPasa muscular.

4.3 Expresión y purificación de FBPasa de músculo de rata

Se clonó el fragmento codificante de la enzima en el sitio de clonamiento múltiple del vector de expresión pET 15b. La enzima recombinante con el segmento de seis residuos histidina en su extremo amino terminal (His-FBPasa) fue expresada y purificada. La estrategia de

purificación de His-FBPasa consistió en; homogeneización en presencia de 0,4% de Triton X-100 y sonicación, cromatografía en His-binding resin, elución con imidazol (y sustrato), y finalmente, diálisis. Utilizando esta aproximación experimental se logró purificar alrededor 1,8 mg de enzima pura y activa (30 U/mg de proteína) por litro de cultivo. La enzima así obtenida, no presenta diferencias significativas con la enzima natural de músculo de rata, por lo que este sistema fue una excelente opción para expresar y purificar la enzima recombinante en forma soluble, rápida y eficiente. La sobre expresión y pureza de esta proteína fusión se determinó por, análisis electroforético en un gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones denaturantes (figura 3). No se observó agregación ni proteólisis y la proteína muestra una masa molecular aproximada de 37,5 kDa.

4.4 Caracterización del anticuerpo anti-FBPasa de músculo.

Una vez purificada la FBPasa muscular recombinante de rata, se inmunizó un conejo con esta proteína como se describe en Material y Métodos 3.2.21. Para conocer la dilución y especificidad del anticuerpo producido en el suero del conejo inmunizado se empleó el método de ensayo en gota, Se fijó en papel de nitrocelulosa la FBPasa de músculo de rata recombinante y como control negativo, FBPasa de riñón de cerdo y luego se incubó con distintas diluciones del suero de conejo. Se observa en la figura 4 el resultado del ensayo en gota de FBPasa muscular de rata recombinante (panel A) y de FBPasa renal de cerdo (panel B). Ambas isoenzimas fueron incubadas con distintas diluciones del suero obtenido 1:500, 1:1000 y 1:10.000 y la inmunorreacción fue revelada con DAB. Se observa inmunorreacción de FBPasa renal de cerdo con las distintas diluciones del suero de conejo, siendo esta más intensa que con la FBPasa muscular de rata, la cual no muestra inmunorreacción con la dilución de 1:10.000 con las

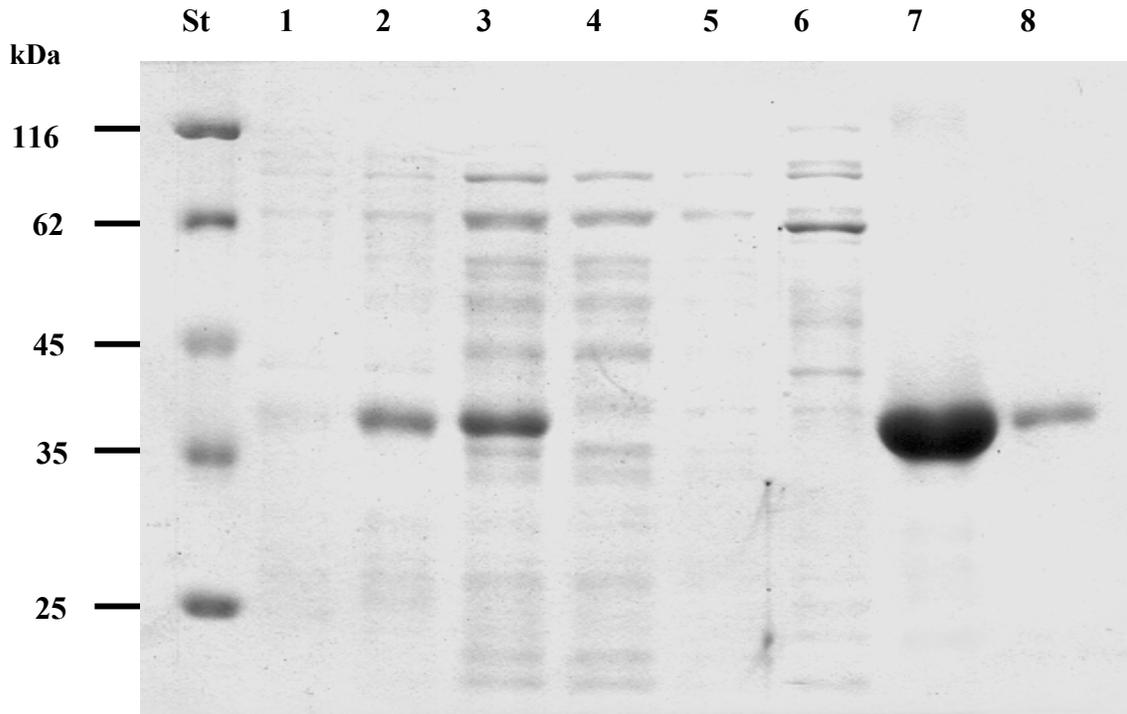


Figura 3: Análisis electroforético por SDS-PAGE de las distintas etapas de la purificación de FBPasa muscular de rata.

La imagen muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones denaturantes, de las distintas fracciones del proceso de purificación de la expresión de la enzima recombinante FBPasa muscular. Carril 1: cultivo de 12 h antes de agregar IPTG. Carril 2: Cultivo de 12 h, a las 4 h después de agregar IPTG. Carril 3: Sobrenadante de la lisis bacteriana. Carril 4: Eluato al cargar la columna His-binding. Carril 5: Eluato 1^{er} lavado. Carril 6: eluato 2^o lavado con imidazol 60 mM. Carril 7: Elución con imidazol 200 mM (9 µg). Carril 8: Elución con imidazol 200 mM (0,5 µg). Se observa la banda correspondiente a la FBPasa muscular sin contaminantes y con un tamaño aproximado de 37,5 kDa. Se usa como referencia estándar de masa molecular entre 25 y 116 kDa.

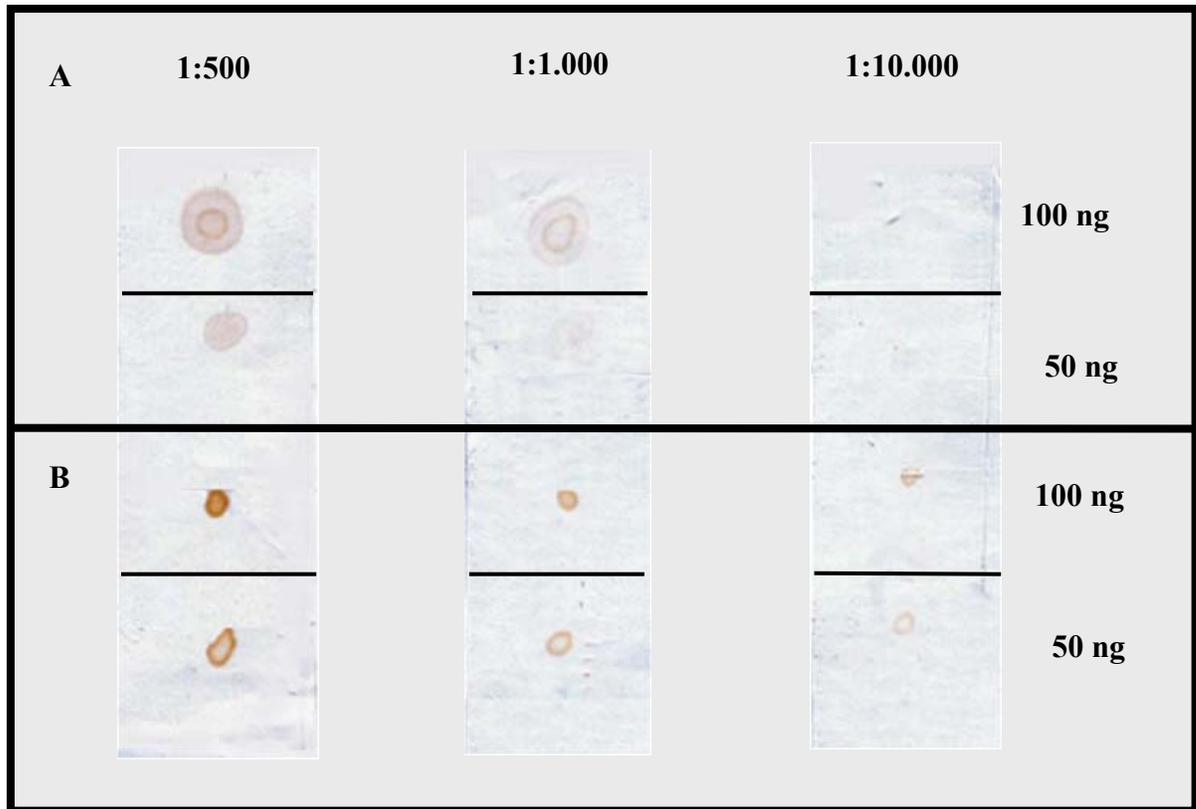


Figura 4: Caracterización del anticuerpo anti-FBPasa muscular contra FBPasa muscular de rata recombinante y de riñón de cerdo.

Mediante ensayo en gota se determinó la dilución y especificidad del anticuerpo presente en el suero del conejo inmunizado con FBPasa muscular recombinante de rata.

Panel A: De izquierda a derecha inmunodetección con distintas diluciones de suero anti-FBPasa muscular de rata (1:500, 1:1.000 y 1:10.000) contra distintas cantidades de FBPasa muscular recombinante de rata (fila superior 100 ng y fila inferior 50 ng).

Panel B: De izquierda a derecha inmunodetección con distintas diluciones de suero anti-FBPasa muscular de rata (1:500, 1:1.000 y 1:10.000) contra distintas cantidades de FBPasa de riñón de cerdo (fila superior 100 ng y fila inferior 50 ng).

cantidades de 100 y 50 ng. Esto prueba la falta de especificidad del anticuerpo que debería sólo detectar a la FBPasa muscular con la que fue inmunizado el conejo.

4.5 Localización de pEGFP-FBPasa muscular en línea celular A-10.

El estudio de la localización subcelular de pEGFP-FBPasa muscular bajo distintas concentraciones de glucosa se realizó como se indica en Material y Métodos 3.2.23. En la figura 5 se muestran imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de la localización de FBPasa muscular fusionada a GFP en células A-10 incubadas por 12 h en medio de cultivo sin glucosa, glucosa 5 mM y glucosa 25 mM. La localización en las tres condiciones es citoplasmática, no existiendo efecto de la concentración de glucosa sobre la distribución de la isoenzima.

4.6 Purificación de aldolasa A

Se purificó aldolasa de músculo de rata como se describió en Material y Métodos 3.2.16. De las distintas etapas de la purificación se tomaron alícuotas, a las cuales se midió la actividad enzimática para aldolasa (Material y Métodos 3.2.17) y se cuantificó la cantidad de proteínas totales (Material y Métodos 3.2.18). En la tabla I se muestra en detalle los resultados de la purificación de la aldolasa, donde se indica el rendimiento de los distintos pasos. Se realizó un análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes de las distintas etapas de la purificación para verificar la pureza de aldolasa A. En forma general, el procedimiento (ver Material y Métodos 3.2.16) consistió en; homogenización, tratamiento del extracto a 55 °C, por 5 min, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE celulosa (DE-52), cromatografía en carboximetil-sefarosa y elución con gradiente lineal de NaCl desde 0 a 100 mM. En tres preparaciones diferentes se obtuvo un promedio de 40 mg de enzima

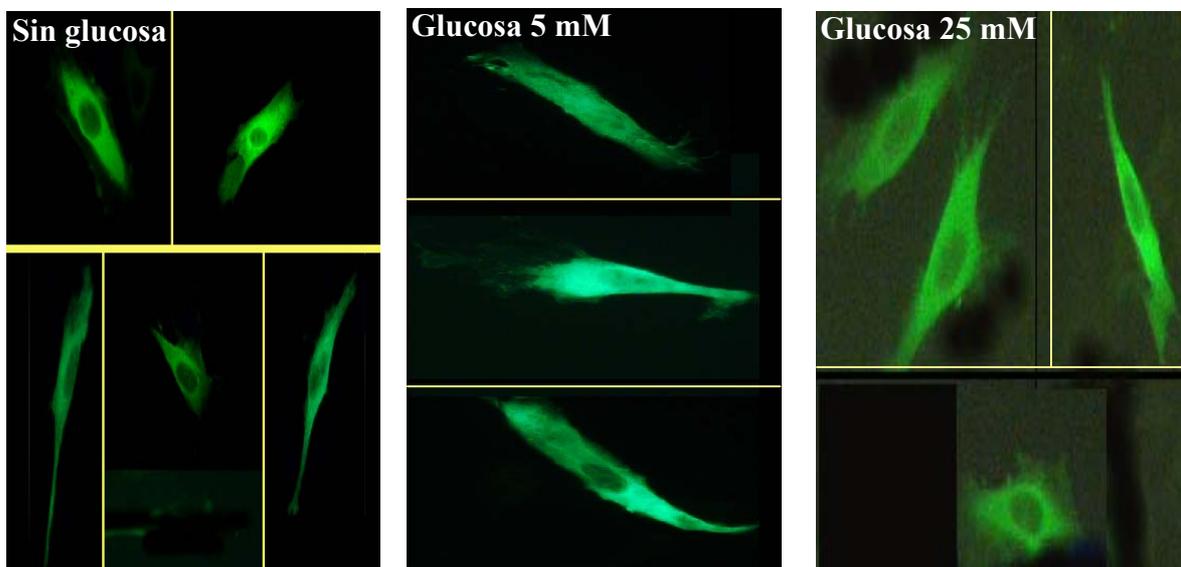


Figura 5: Localización de la proteína de fusión FBPassa muscular-GFP en células A-10 cultivadas bajo distintas concentraciones de glucosa.

Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, observándose la distribución de FBPassa muscular fusionada a GFP en células A-10 (músculo liso de aorta de rata), cultivadas por 24 horas en medio DMEM sin glucosa, glucosa 5 mM y 25 mM. (Aumento: 40X). La distribución citoplasmática se mantiene en las tres condiciones ensayadas.

Tabla I
Purificación de aldolasa de músculo de rata

Fracción	Volumen Total (ml)	Proteínas Totales (mg/ml)	U totales	U/mg	Rendimiento (%)
Crudo	400	10,14	38.000	9,36	100
Pos-55 °C	350	5,39	17.500	4,93	46,1
S/N pp. 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	350	3,22	15.575	13,82	41
pp. 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	20	7,58	480	4,45	1,3
S/N pp. 65% (NH ₄) ₂ SO ₄	400	2,35	5.200	5,53	13,7
Dializado	35	9,72	6.825	20,1	18
Eluato DE-52	35	8,42	5.023	17,0	13,2
Elución CM-sefarosa	5	7,40	1.100	29,7	2,9

Para el ensayo de actividad enzimática se utilizó una concentración de Fru-1,6-P₂ de 0,6 mM a 30 °C, como se describe en Material y Métodos 3.2.17.

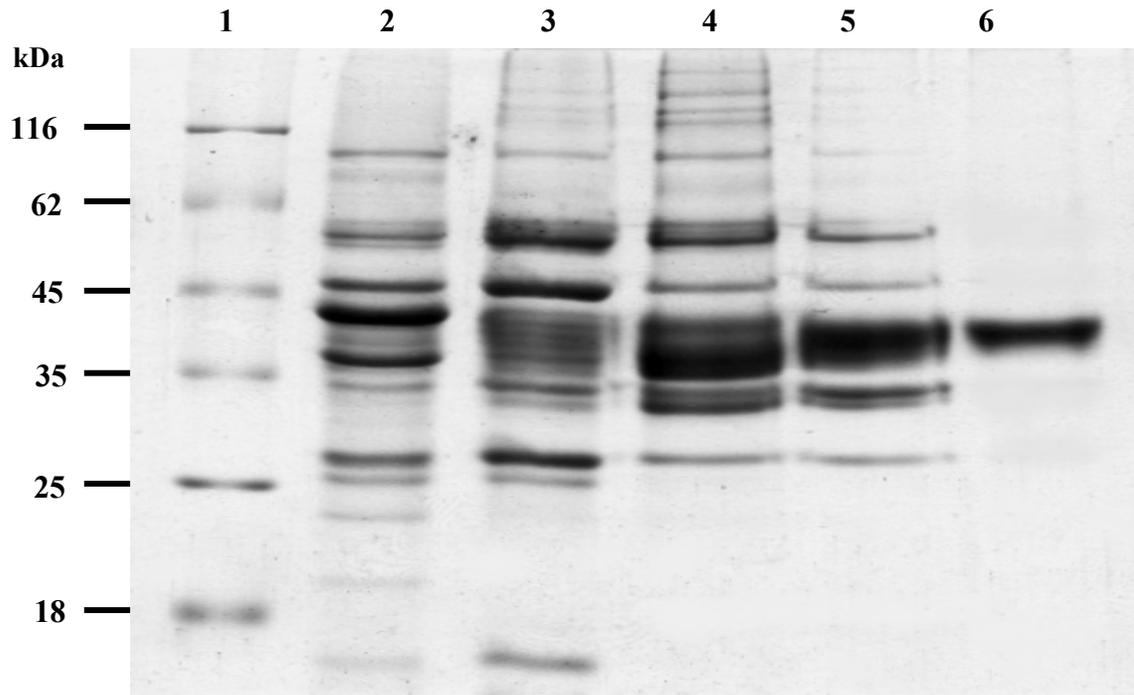


Figura 6: Análisis electroforético por PAGE-SDS de las distintas etapas de la purificación de aldolasa A desde músculo de rata.

La imagen muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes. Carril 1: Estándar de tamaño molecular para proteínas. Carril 2: Sobrenadante de la centrifugación del homogenizado de músculo. Carril 3: Sobrenadante de la centrifugación del homogeneizado tratado a 55° C por 5 min. Carril 4: Resuspensión del precipitado a 65% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Carril 5: Eluato de la columna de DE-52 (9 x 1,5 cm). Carril 6: Fracción 41 de la elución de la columna de carboximetil-sefarosa (19 x 1,5 cm) con un tampón Tri-HCl 20mM, pH 7.2, EDTA 1mM, con gradiente lineal de NaCl entre 0 y 100 mM. Se usó como referencia estándar de masa molecular entre 18 y 116 kDa.

total, con una actividad específica de 30 U/mg. La pureza de la aldolasa obtenida mediante este procedimiento se determinó por SDS-PAGE. La figura 6 muestra el análisis electroforético de las distintas etapas de la purificación. Se observa, al final de proceso (carril 6), una sola banda con una masa molecular aproximada de 40 kDa, lo que indica que no hay contaminación con otras proteínas.

4.7 Caracterización del anticuerpo contra Aldolasa A.

Para conocer la especificidad del suero de conejo anti-aldolasa de músculo se inmunodetectó en transferencia Western (Material y Métodos 3.2.21), para detectar la aldolasa A de rata. Esto se realizó utilizando distintas cantidades de aldolasa A de rata. En la figura 7, panel A se observa el resultado del análisis electroforético en un gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones denaturantes de en el carril 1 se observa la migración de estándar de tamaño molecular para proteínas y en los carriles 2, 3, 4 tres cantidades distintas de aldolasa A (0,2, 0,6, 1,2 μ g respectivamente). En el panel B se observa el resultado de la de la inmunodetección, donde en el carril 1 se observa un estándar de tamaño molecular preteñido y en los carriles 2, 3 y 4 las mismas cantidades de aldolasa A aplicadas en el gel del panel A.

4.8 Localización de Aldolasa A en tejidos de rata.

La determinación de la localización de Aldolasa A en distintos tejidos de rata, mediante inmunohistoquímica, se realizó como se indica en Material y Métodos 3.2.22. Se estudió la localización de esta isoenzima en los siguientes tejidos: músculo, corazón, hígado, páncreas, testículo, estómago e intestino delgado.

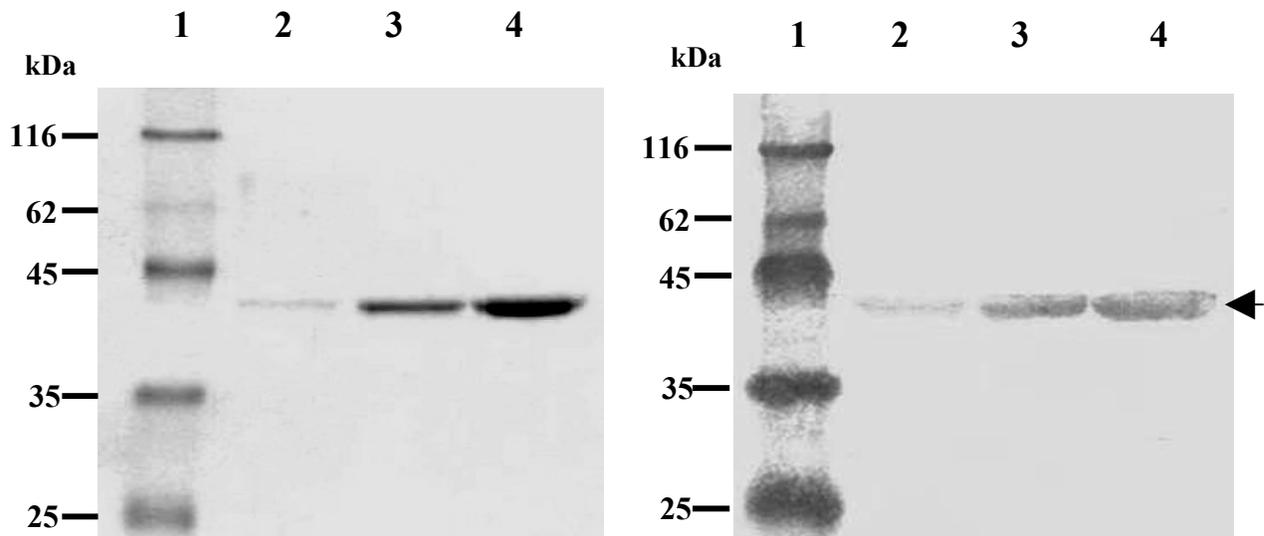


Figura 7: Caracterización del anticuerpo de conejo contra aldolasa A.

Panel A: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes. En el carril 1 se observa la migración de estándar de tamaño molecular para proteínas. En los carriles 2, 3 y 4 del gel, fueron aplicadas 0,2, 0,6 y 1,2 µg de aldolasa A purificada, respectivamente, y separadas

Panel B: Inmunodetección de aldolasa A, las proteínas separadas en una corrida electroforética realizada en las mismas condiciones que la señalada en panel A y luego electrótransferida a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpo anti-aldolasa A (1:1000) y revelada la inmunorreacción mediante el uso de DAB. La flecha señala el tamaño aproximado de 40 kDa.

En la figura 8 se observa la inmunotinción obtenida en tejido de músculo esquelético, donde la localización de aldolasa A se muestra preferentemente en la banda Z y con menor intensidad en el sarcoplasma de las fibras musculares. En la figura 9, se muestra la inmunotinción para un corte de músculo cardíaco, en el cual se observa un marcaje en el citoplasma y núcleos de los cardiomiocitos, siendo la marca nuclear más intensa que la observada en el citoplasma. En la figura 10 se observa la inmunotinción en tejido de músculo cardíaco, utilizando un segundo anticuerpo fluorescente y analizado por microscopía confocal. La imagen corresponde al plano medio (2,8 μm) de una serie confocal de 9 cortes de 0,7 μm , observándose la señal para aldolasa A al interior de los núcleos. También se logra apreciar el marcaje en la banda Z de los cardiomiocitos. En la figura 11 se muestra la inmunotinción obtenida en un corte de hígado; se observa marcaje en los núcleos de las células que recubren los sinusoides, posiblemente las células de Kupffer. En la figura 12, panel A se muestra la inmunotinción en el páncreas endocrino, en los islotes de Langerhans, tanto en el citoplasma como en núcleos. En el panel B se muestra inmunotinción en tejido pancreático, utilizando un segundo anticuerpo fluorescente y tinción nuclear con yoduro de propidio. La imagen obtenida por microscopía confocal no muestra marcaje en los núcleos, al no existir colocación con el marcaje nuclear (en rojo) y la señal para aldolasa A (en verde). La aldolasa A se mantiene en el citoplasma de las células. En la figura 13 se muestra la inmunotinción obtenida de un corte de testículo, destacando el marcaje en el citoplasma de las células de Sertoli, espermatogonias y espermatocitos. El análisis mediante microscopía confocal, se observa inmunotinción para aldolasa A con el segundo anticuerpo fluorescente (verde) y tinción nuclear con yoduro de propidio (rojo), muestra la colocación el marcaje nuclear y de aldolasa A en las espermatogonias (flecha blanca) y en el citoplasma de las células de Sertoli que se proyecta desde la membrana basal hasta el lumen del túbulo

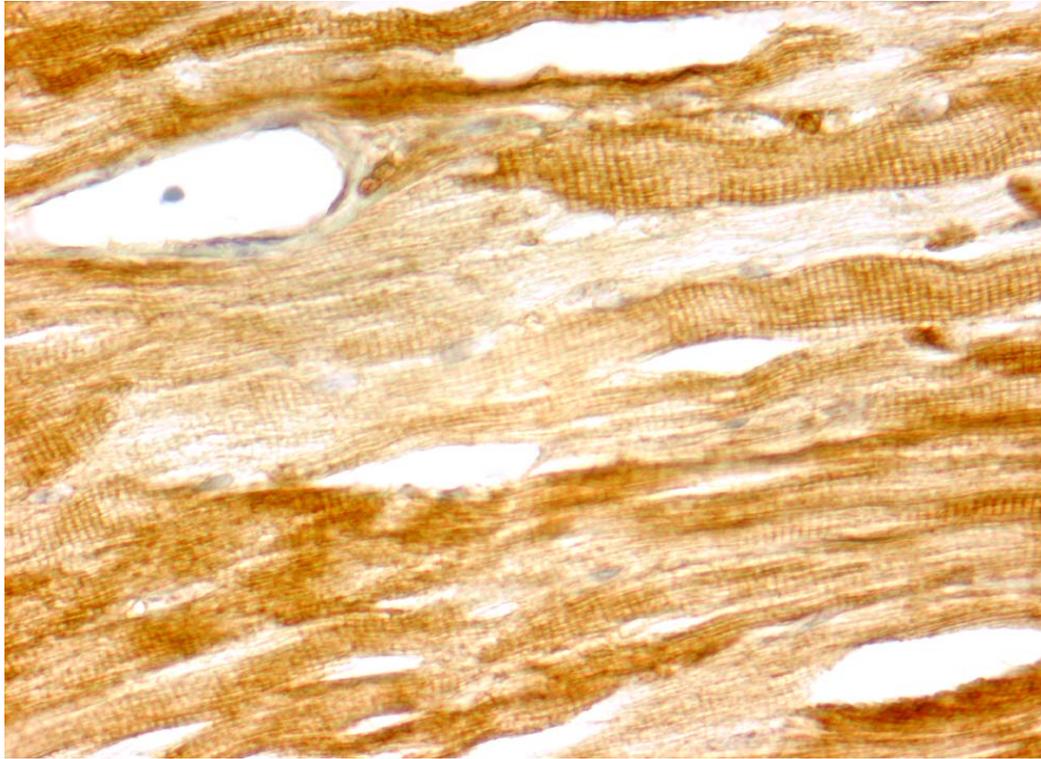


Figura 8: Localización de aldolasa A en tejido de músculo esquelético.

Muestras de músculo esquelético de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la marcada inmunotinción en las fibras de musculares esqueléticas, destacándose la localización de aldolasa A en la banda Z en estas células. (Aumento: 40X)

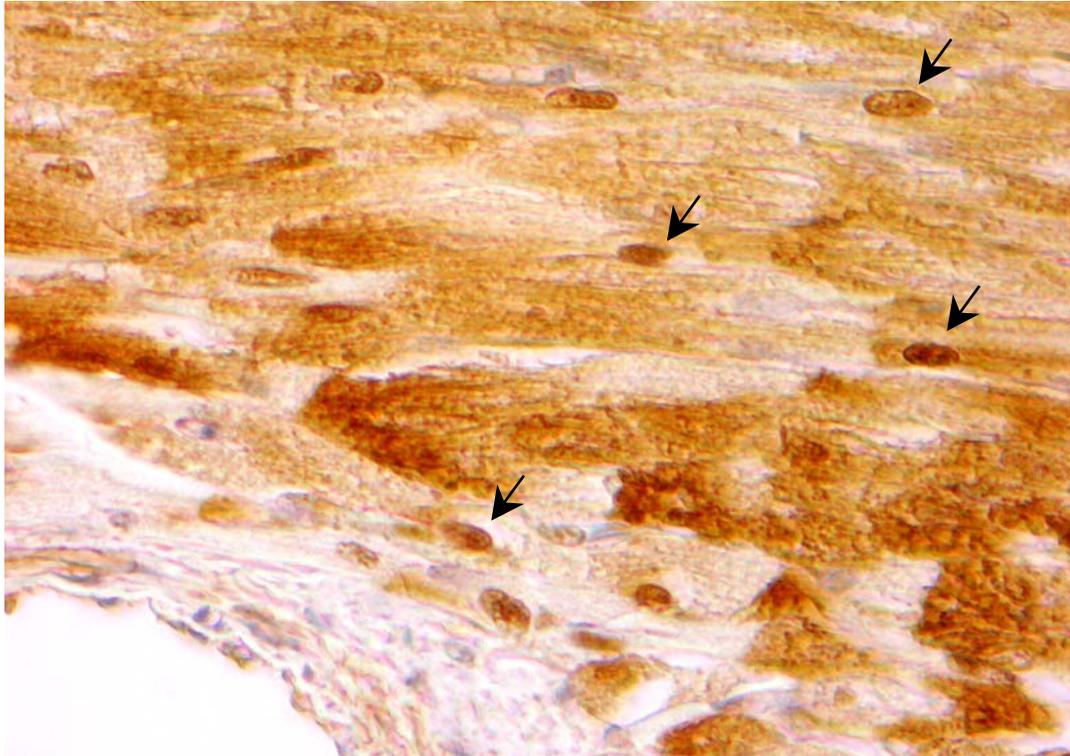


Figura 9: Localización de aldolasa A en tejidos de músculo cardiaco.

Muestras de corazón de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra inmunotinción positiva en los cardiomiocitos de músculo cardiaco, encontrando una marcada localización nuclear de aldolasa A en estas células (flechas). (Aumento: 40X)

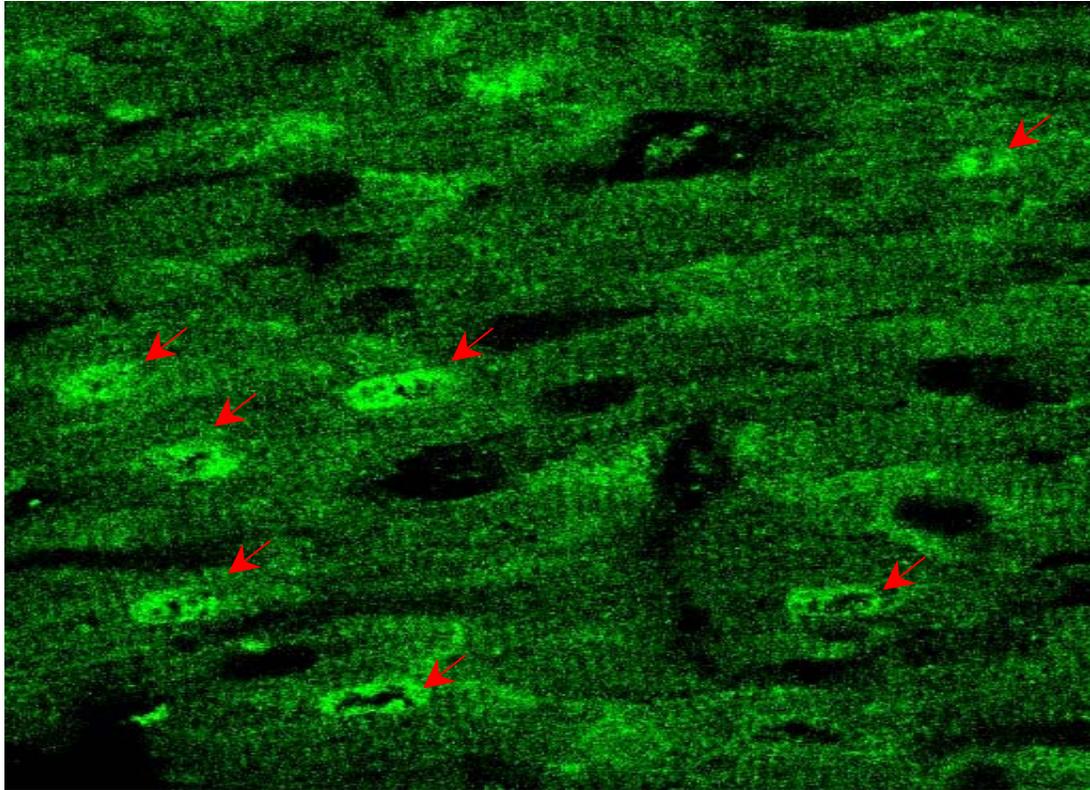


Figura 10: Localización subcelular de aldolasa A en corte de músculo cardíaco.

Localización subcelular de aldolasa A mediante inmunofluorescencia y por microscopia confocal de músculo cardíaco. En la inmunodetección se utilizó anticuerpo anti-aldolasa A y un anticuerpo fluorescente anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 488, verde. Esta imagen corresponde al plano medio de una serie confocal a través de cardiomiocitos, destacándose con flechas rojas, la localización nuclear de aldolasa A. (Aumento: 63X)

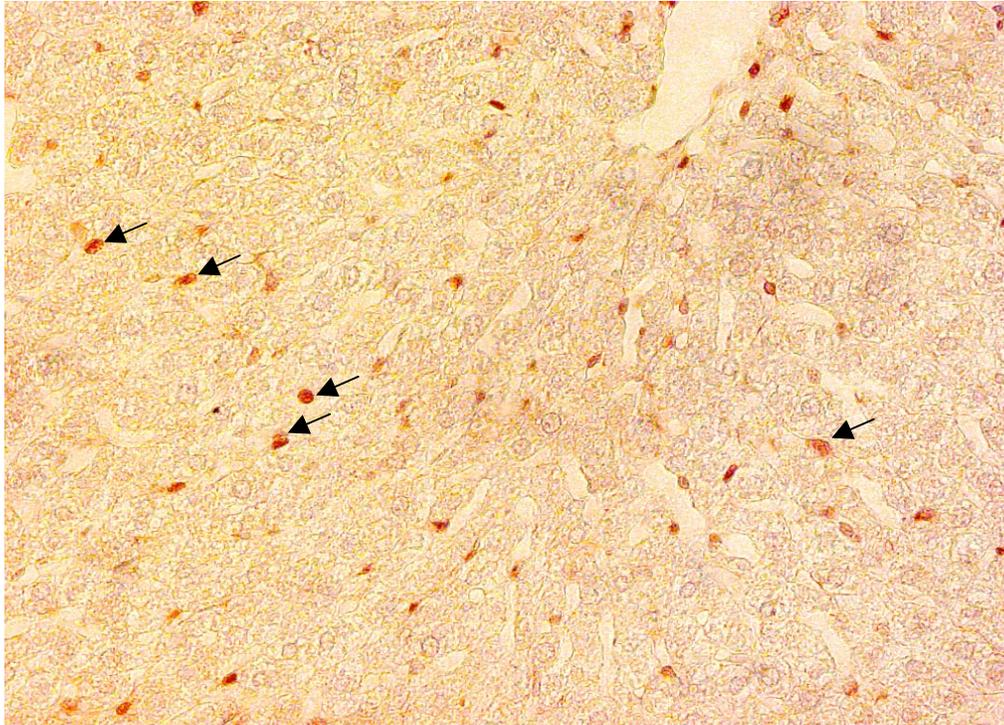


Figura 11: Localización de aldolasa A en tejido hepático.

Muestras de hígado de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la inmunotinción positiva obtenida en las células de Kupffer, destacándose con las flechas la marca de algunos de los núcleos en estas células que recubren los sinusoides.

(Aumento: 20X)

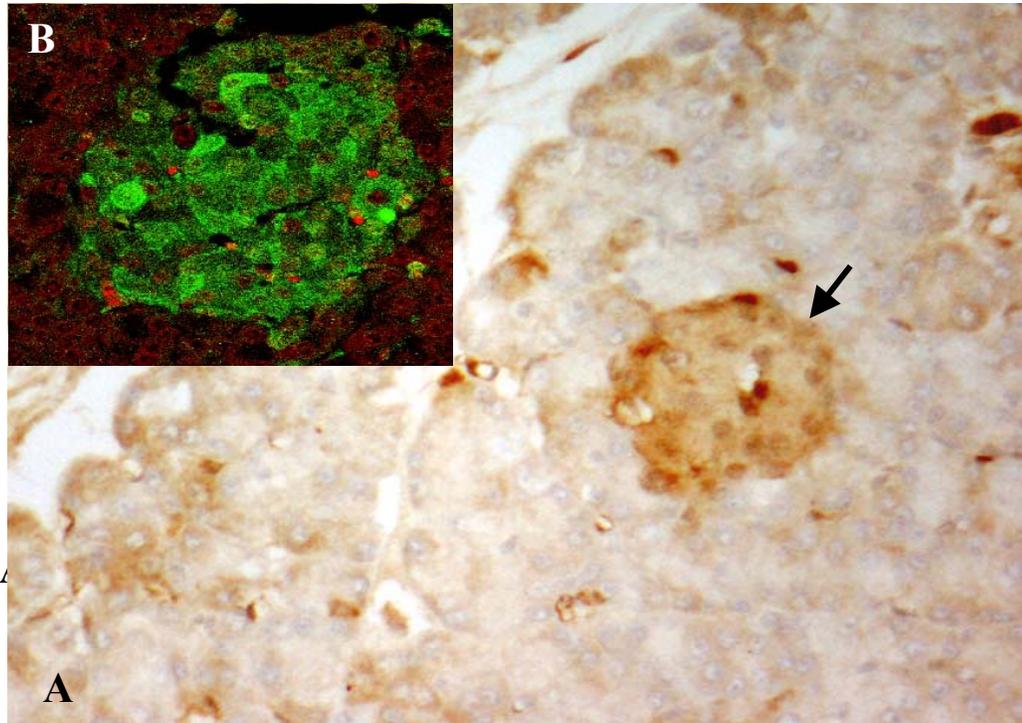


Figura 12: Localización de aldolasa A en tejido pancreático.

Panel A: Muestras de páncreas de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la tinción obtenida de un corte de páncreas, la flecha marca la inmunotinción en las células que conforman los islotes de Langerhans. (Aumento: 20X)

Panel B: Imagen obtenida por inmunofluorescencia y microscopía confocal de tejido pancreático. Se utilizó el anticuerpo primario anti-aldolasa A y el anticuerpo secundario fluorescente anti-IgG de conejo. Se observa la contra-tinción nuclear utilizando yoduro de propidio, se observa que la señal para aldolasa A es citoplasmática. (Aumento: 40X)

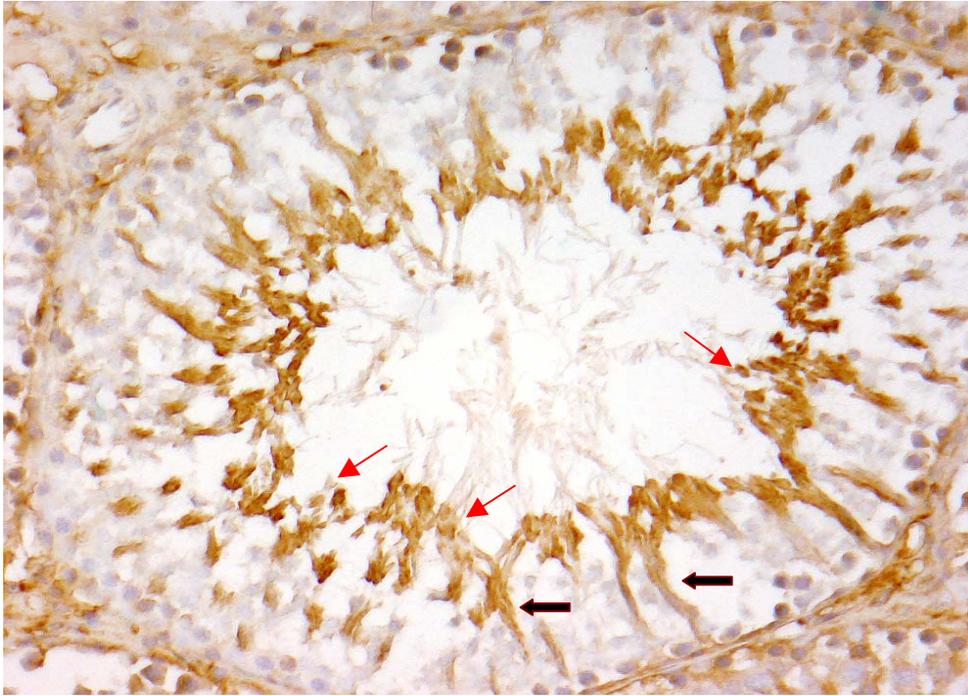


Figura 13: Localización de aldolasa A en tejido de testículo.

Muestras de testículo de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la inmunotinción obtenida en un túbulo seminífero. Las células germinales muestran diferente inmunotinción destacando la fuerte reacción en las espermatidas (flechas rojas). También se observa inmunorreacción en las células de Sertoli (flechas negras), las que se proyectan desde la membrana basal asía el lumen del túbulo. (Aumento: 40X)

seminífero (figura 14). También se observan los núcleos con finos filamentos de cromatina en rojo (flecha amarilla), correspondientes a los espermatoцитos. En intestino delgado se observa inmunotinción en mucosa epitelial y glándulas de Brunner (figura 15) y en estómago en la mucosa epitelial y en las glándulas gástricas, especialmente en las células del cuello y parietales (figura 16).



Figura 14: Localización subcelular de aldolasa A en túbulos seminíferos.

Localización subcelular de aldolasa A mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal de testículo. En la inmunodetección se utilizó anticuerpo anti-aldolasa A y un anticuerpo secundario fluorescente anti-IgG de conejo acoplado a Alexa Fluor 488, verde. Se realizó contra-tinción nuclear con yoduro de propidio (rojo). Esta imagen corresponde al plano medio de una serie confocal a través de un túbulo seminífero, destacándose la localización nuclear en aquellas células con núcleo amarillo (flechas blancas), en los núcleos rojos no hay detección de aldolasa A (flechas amarillas). También las células de Sertoli presentan inmunofluorescencia, observándose su maraca desde la membrana basal hasta el lumen del túbulo. (Aumento: 63X)

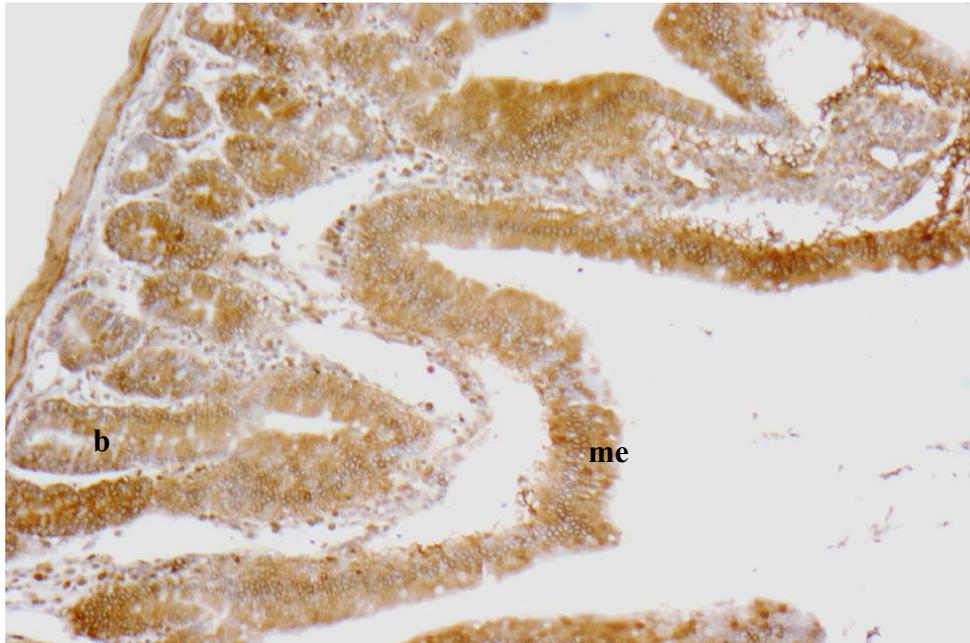


Figura 15: Localización de aldolasa A en tejido de Intestino delgado.

Muestras de tejido de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la tinción obtenida en un corte de intestino delgado en la mucosa epitelial (**me**) y las glándulas de Brunner (**b**) muestran una intensa marca. (Aumento: 20X)

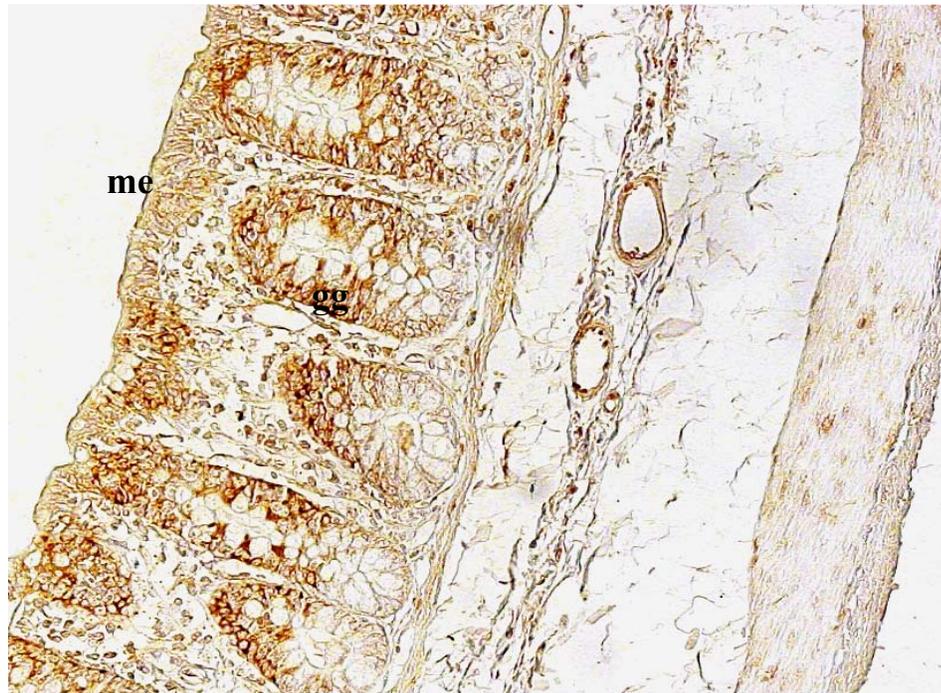


Figura 16: Localización de aldolasa A en de estómago.

Muestras de estómago de rata fijadas en Bouin e incluidas en parafina fueron sometidas a inmunocitoquímica utilizando el “kit” ICQ LSAB plus, como se describe en Materiales y Métodos. La inmunotición muestra una marca intensa en las glándulas gástricas (**gg**) de la mucosa estomacal y en la mucosa epitelial (**me**). (Aumento: 20X)

5. DISCUSIÓN

Los estudios de localización de enzimas que participan y regulan la homeostasis de la glucosa se han intensificado durante los últimos años. En estos se relacionan los conceptos de función, regulación y localización. Un ejemplo es el estudio de la localización de las enzimas glicolíticas en tejido muscular, donde se han descrito interesantes asociaciones de estas enzimas a elementos del citoesqueleto. Estos resultados permiten ampliar nuestra visión para comprender mejor la regulación de estos procesos en la célula. Al respecto, nuestro laboratorio ha aportado importantes datos de la localización celular y subcelular de enzimas gluconeogénicas como FBPasa hepática y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Saez *et al.*, 1996; Yañez *et al.*, 2003a, 2003b) y de enzimas como aldolasa B que catalizan reacciones reversibles de la glicólisis-gluconeogénesis (Saez *et al.*, 2000).

Continuando con esta línea de estudio, se decidió analizar la localización de las enzimas FBPasa muscular y aldolasa A, ambas expresadas mayoritariamente en músculo, para estudiar que relación existe entre su localización y la interacción entre enzimas de una misma vía metabólica.

Para determinar la distribución de FBPasa muscular en los distintos tejidos de rata se clonó y expresó esta proteína y se logró purificar a homogeneidad. La FBPasa muscular así obtenida fue utilizada para producir anticuerpos contra esta isoenzima en conejo. Mediante ensayo en gota e inmunodetección en transferencia Western, se detectó inmurreacción positiva, utilizando el anticuerpo anti-FBPasa muscular producido en conejo en extractos de proteínas totales de músculo, riñón, hígado y cerebro, detectando bandas de alrededor de 37 kDa para el

extracto de músculo y de 40 kDa para los otros extractos utilizados. Asimismo, el anticuerpo mostró inmunoreacción positiva con una preparación de FBPasa purificada de riñón de cerdo, incluso en diluciones de 1:10.000 del suero anti-FBPasa muscular. Existen datos de la expresión del mRNA de FBPasa muscular en diversos tejidos, el que estaría presente en corazón, músculo esquelético y riñón, pero no en hígado y cerebro (Al-Robaiy y Eschrich, 1999), difiriendo con nuestros resultados obtenidos con el anticuerpo anti-FBPasa muscular producido en conejo. Experimentos de inmunodetección utilizando FBPasa renal de cerdo fueron también positivos, incluso en diluciones de 1:10.000 del suero anti-FBPasa muscular. No obstante esta diferencia, nuestros resultados demuestran que el anticuerpo es capaz de detectar sólo las isoenzimas muscular y hepática de FBPasa, en los extractos totales de proteínas de los tejidos estudiados, pero no es específico para la isoenzima muscular. Así, el anticuerpo obtenido reconoce epítopes que son comunes para las isoenzimas hepática y muscular. Por ello, el estudio de localización de FBPasa muscular en distintos tejidos, deberá realizarse con un anticuerpo anti-FBPasa muscular que tenga una mayor especificidad.

Para poder estudiar la localización en forma dinámica de FBPasa muscular, se utilizaron líneas celulares y la proteína de fusión FBPasa-GFP (FBPasa y Green Fluorescent Protein), para ser observada por microscopía de fluorescencia. Los resultados de las transfecciones transitorias en la línea celular C2C12 (derivada de mioblastos de ratón) no fueron óptimos, por lo que no se pudo determinar la localización de esta isoenzima en esta línea celular. Sin embargo, estudios realizados en la línea celular A-10 (derivada de músculo liso de aorta de rata) mostraron una localización citoplasmática de la FBPasa-GFP, la que no varió en presencia de distintas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo: sin glucosa, glucosa 5mM y 25 mM. Estos resultados concuerdan con los datos que existen sobre localización de FBPasa muscular, en

músculo esquelético humano, que presenta una localización en el citoplasma, con una localización subcelular en ambos lados de la banda Z (Gizak *et al.*, 2003). Por otra parte, estudios de localización en músculo cardiaco de cerdo, han sugerido que FBPasa muscular se encontraría en el citoplasma y en el núcleo (Gizak y Dzugaj, 2003). Es importante continuar con los estudios de localización de esta isoenzima, pues la falta de datos en músculo liso y en otros tejidos, no permiten utilizar los datos obtenidos en la línea A-10 para tener una mayor comprensión sobre la relación entre la localización y la función de esta isoenzima. Si bien es cierto que el funcionamiento simultáneo de FBPasa y fosfofructoquinasa (PFK) constituiría un ciclo de sustrato energéticamente inútil, ya que conduciría a la hidrólisis innecesaria de ATP, hay pruebas de que este ciclo existe y que la regulación del metabolismo de los glúcidos a este nivel dependería de la relación entre las actividades de estas dos enzimas.

Es evidente que las actividades de FBPasa y PFK deben ser controladas a través de mecanismos sensibles que permitan mantener su nivel normal de funcionamiento y disminuir la formación del ciclo del sustrato. Así, AMP tiene un efecto inverso en las actividades de las dos enzimas involucradas. En esta misma línea, Newsholme y Start, en 1976, postularon que la FBPasa muscular participaría en la regulación de la glicólisis mediante la formación de un ciclo de sustrato. La principal característica que diferencia a la isoenzima hepática de la muscular es que esta última es muy sensible a la inhibición por AMP (Mizunuma y Tashima, 1986). Además, en presencia de concentraciones fisiológicas de este inhibidor, FBPasa muscular debería estar inhibida en un 99,9% (Skalecki *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha demostrado que hay síntesis de glucógeno en músculo estriado desde precursores no glucídicos (McLane y Holloszy, 1979; Ryan y Radziuk, 1995), por lo que FBPasa muscular debería estar catalíticamente activa. Por otro lado, los datos que señalan que aldolasa A desensibiliza a esta isoenzima a la inhibición por AMP, en

ensayos *in vitro* (Rakus y Dzugaj, 2000; Rakus *et al.*, 2003), hacen suponer que esta interacción debe existir *in vivo*. Por lo tanto, seguir investigando la localización y las asociaciones a otras macromoléculas en los distintos tejidos donde se distribuye la FBPasa muscular, es una interesante aproximación a esta problemática.

Para estudiar la distribución de aldolasa A, se analizó primero el anticuerpo anti-aldolasa A producido en conejo. Este anticuerpo mostró ser específico, al ser probado mediante inmunodetección en transferencia Western, no existiendo reacción cruzada con aldolasa B. La distribución de aldolasa A en riñón de rata, estudiada por inmunohistoquímica, muestra una localización diferenciada con respecto a aldolasa B, siendo encontrada en los túbulos distales y colectores. Estos resultados de localización en riñón, concuerdan con lo publicado por Wachsmuth y colaboradores en 1975, que suponen una preponderancia del metabolismo glicolítico en los túbulos distales, para el apoyo de las funciones de secreción y reabsorción.

La localización de aldolasa A en músculo fue mayoritariamente citoplasmática; también se observó inmunorreacción en la banda Z. Este último resultado concuerda con lo señalado por Wojtas y colaboradores (1997), los cuales encontraron que glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) se localiza en la banda Z y M en músculos encargados del vuelo de *Drosophila*, y que aldolasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se localizan también entre los sarcómeros con un patrón regular, indistinguible del de GPDH. Es notable que la localización de aldolasa y GAPDH requiere de la colocalización simultánea con GPDH, pues aldolasa y GAPDH no colocalizan entre los sarcómeros en fibras de músculo donde GPDH no se expresa. Los datos sobre la interacción entre enzimas glicolíticas, entre ellas aldolasa A, y miofibrillas son numerosos (Kuter *et al.*, 1983; Westrin y Backman, 1983; Harris y Winzor, 1987; Ronai, 1993; Schindler *et al.*, 2001). Al respecto, recientemente se ha demostrado la colocalización de FBPasa

muscular y aldolasa de músculo en ambos lados de la línea Z (Rakus *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la presencia de enzimas activas no es suficiente para la función muscular, pues la colocación de las enzimas es también requerida como elemento regulador de estos mecanismos.

La localización de aldolasa A en tejido de músculo cardíaco mantiene una distribución citoplasmática, al igual que lo observado en músculo esquelético. Además, se observó inmunorreacción en los núcleos de las células musculares. Esta localización nuclear se encontró también en hígado, en las células que recubren los sinusoides, y en espermatogonias en testículo. Mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal se pudo determinar que la localización es endonuclear. Estos resultados generan interesantes preguntas: ¿Cómo transloca al núcleo? ¿Qué función estaría cumpliendo esta isoenzima en núcleo?

Está ampliamente descrito que la actividad glicolítica se realiza en el citoplasma, pero existe evidencia de enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa que presentan una localización nuclear y citoplasmática, tales como, GAPDH (Singh y Green, 1993), aldolasa B (Sáez y Slebe, 2000), FBPasa hepática (Yáñez *et al.*, 2003a), glucoquinasa (Miwa *et al.*, 1990). Interesantemente, esta última es capaz de translocar al núcleo en respuesta a glucosa, constituyendo un mecanismo regulatorio adicional de su actividad (De la Iglesia *et al.*, 1999). También se ha encontrado que FBPasa muscular localiza en los núcleos de cardiomiocitos (Gizak y Dzugaj, 2003), y que esta isoenzima podría colocalizar con aldolasa A (localización descrita en esta tesis), por lo que podría repetirse el patrón encontrado para estas dos isoenzimas en músculo esquelético (Rakus *et al.*, 2003). El mecanismo para esta translocación podría ser una secuencia de importación nuclear (NLS), que estaría presente en la FBPasa muscular. Al analizar la secuencia aminoacídica de aldolasa A no se encontraron señales NLS, sin embargo, FBPasa

hepática, que no tiene este tipo de señal, también presenta la capacidad localizarse en el núcleo (Yáñez *et al.*, 2003), lo que sugiere que debe existir otra señal que regule el traslado de la enzima. Existen otros mecanismos que dirigen a las proteínas al interior del núcleo, como es la fosforilación. Al respecto, existe evidencia de esta capacidad de fosforilación para FBPasa muscular (Rakus *et al.*, 2003) y FBPasa hepática (Rittenhouse *et al.*, 1983), fenómeno también descrito para aldolasas A y B (Sygusch *et al.*, 1990).

La función que cumplirían estas enzimas en el núcleo es desconocida y sólo existen algunas hipótesis al respecto. Se ha encontrado que aldolasa A interacciona con DNA en células de sarcoma de ratón SEWA, al ser eluida desde una columna de cromatografía de afinidad a DNA (Ronai *et al.*, 1992), lo que sugiere que esta isoenzima puede interactuar con el DNA. Esta interpretación es discutible, si tomamos en cuenta que aldolasa presenta sitios de unión a nucleótidos (Kasprzak y Kochman, 1981); la interacción con DNA podría ser inespecífica. Sin embargo, los estudios de Ronai demuestran que aldolasa A puede interactuar con algunas, pero no con todas las secuencias de DNA estudiadas, lo que implica que existe una conformación o secuencia mínima para esta interacción. Por otro lado, existe la posibilidad de otras funciones para esta isoenzima, además de su función glicolítica. Por ejemplo, se ha descrito su participación en la asociación dinámica de vesículas del transportador de glucosa, GLUT4, estimulado por insulina, con F-actina (Kao *et al.*, 1999). En este caso la presencia de aldolasa es requerida para el traslado de GLUT4. También, se ha descrito la doble función de enzimas, como es el caso de lactato deshidrogenasa y 3-fosfoglicerato quinasa, que pueden encontrarse en el núcleo y ejercer funciones en la replicación, reparación y transcripción de DNA, además de su rol catalítico en el citoplasma (Sirover, 1997; Ronai, 1993). Otro aspecto interesante es el efecto de la fosforilación sobre estas enzimas, ya que altera su capacidad para llevar a cabo las funciones descritas en el

núcleo (Popanda *et al.*, 1998). Otra posibilidad, es que aldolasa A se acumule en el núcleo como respuesta a un mecanismo de regulación de su actividad catalítica, al variar la cantidad de enzima activa e inactiva disponible.

El hígado es un órgano principalmente gluconeogénico, y en acuerdo con este punto de ha descrito que expresa en forma casi exclusiva la aldolasa B (Sáez y Slebe, 2000). Sin embargo, nuestros resultados señalan que aldolasa A se localiza en una muy pequeña cantidad en el núcleo de células que recubren los sinusoides. Le Provost y colaboradores(1980), describen la inmunolocalización de aldolasa A y C en hígados de ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono, en estas condiciones, las isoenzimas se localizan en las células de Kupffer y endoteliales. También se conoce que los niveles de mRNA para aldolasa A aumentan 10 veces en hígado humano con carcinoma celular hepático, considerando que este mRNA se expresa en condiciones normales sólo en hígado fetal (Castaldo *et al.*, 2000). La función fagocitaria de las células de Kupffer, principalmente la eliminación de eritrocitos viejos, requiere una alta cantidad de energía. Existen datos que muestran que en macrófagos peritoneales la respiración y la actividad de las enzimas glicolíticas aumenta durante la fagocitosis (Ogel *et al.*, 1975, Guminska *et al.*, 1975). Por lo tanto, es entendible que en las células de Kupffer deban estar presentes las enzimas de la vía glicolítica, entre ellas aldolasa A, para poder llevar a cabo esta importante tarea.

Como se describió en resultados, en páncreas, aldolasa A está localizada en los acinos y en los islotes de Langerhans. Los datos sobre la presencia de aldolasa en páncreas son en la mayoría estudios de factores de transcripción de genes que participan en el metabolismo de la glucosa, en los cuales se menciona también la expresión de aldolasa B (Leclerc *et al.*, 2001; Shih *et al.*, 2002; Stoffel y Duncan, 1997). Otros resultados demuestran que Fru-1,6-P₂, en islotes aislados de páncreas de rata, tiene la habilidad de potenciar la secreción de insulina inducida por

glucosa, por la vía independiente del canal de potasio sensible a ATP (Miwa y Taniguchi, 2002). Por otro lado, Fru-1,6-P₂ inhibe la serina/treonina proteína fosfatasa específica y aumenta la exocitosis de insulina (Sjoholm *et al.*, 2002). Existen publicaciones en las cuales se ha medido la actividad de aldolasa y determinado que Fru-1,6-P₂ es rápidamente degradado a triosas fosfato (MacDonald *et al.*, 1997). Estos datos permiten vislumbrar la importancia de controlar la fluctuación de la concentración Fru-1,6-P₂, y el papel clave de la aldolasa A en las señales que regulan el metabolismo de la principal fuente energía en el organismo.

Nuestros estudios de localización de aldolasa A en testículo muestran a la enzima en el citoplasma de las células de Sertoli, en espermátidas y en el núcleo de espermatogonias. Los datos existentes respecto a la presencia de aldolasa A no eran directos, pues en los estudios realizados se midió la actividad enzimática de aldolasa, sin especificar cual de las isoenzimas estaría involucrada. De esta manera, nuestros estudios de localización son muy importantes. Se sabe que en espermátidas redondas la utilización de glucosa es limitada por la actividad de aldolasa, siendo glucosa una mala fuente para generar ATP (Mita y Hall, 1982). Estos investigadores sugieren que las células de Sertoli podrían proveer grandes cantidades de lactato, como sustrato para la producción de energía, requerida por las espermátidas redondas. Posteriormente, Nakamura y colaboradores (1982) describieron que en espermátidas redondas, glucosa es rápidamente incorporada a las células y transformada en lactato. Sin embargo, hay que tener presente que los productos de la reacción catalizada por aldolasa, Fru-1,6-P₂, dihidroxiacetona-3-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato, son acumulados. Además, los autores mencionan que gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, enzima encargada de oxidar uno de los productos de la reacción enzimática de aldolasa, es inhibida competitivamente por nucleótidos de

adenina, particularmente por AMP y ADP, siendo probable que esta enzima regule la vía glicolítica en este tipo celular.

En estómago la aldolasa A se encontró principalmente en la mucosa epitelial, observándose inmunotinción en las glándulas gástricas, especialmente en las células del cuello y parietales. Saito en 1975 ya describe la presencia de esta isoenzima en la mucosa estomacal humana, mediante estudios de especificidad a sustrato y electroforesis. En intestino, también se observa la isoenzima en la mucosa epitelial y en las glándulas de Brunner. Los datos publicados con respecto a la localización de aldolasa A en intestino delgado humano concuerdan con lo resultados obtenidos en rata (Wachsmuth, 1976; Rehbein-Thoner y Pfliedere, 1977). Esta localización podría darse por la función de estos tejidos en la absorción de nutrientes y en el transporte de vesículas de secreción de enzimas proteolíticas. Es interesante que en el metabolismo de glucosa, fructosa y otros carbohidratos, los cuales son absorbidos en el estómago y en el intestino, se necesita un “pool” activo de enzimas tanto del metabolismo gluconeogénico como del glicolítico.

Analizando los resultados, se puede afirmar que la localización de aldolasa A no es uniforme en los tejidos, si no que es dependiente de las características metabólicas del tejido y del tipo celular. Además, al comparar los datos obtenidos en músculo de la localización subcelular de aldolasa A, con los datos de otras enzimas glicolíticas, se hace evidente la idea que existe una compartimentalización de las enzimas de la vía glicolítica. Existen otros órganos donde también se observa una distribución común para enzimas de una vía metabólica, como es el caso de intestino, probablemente por los procesos simultáneos que en ese órgano ocurren. Estos resultados sugieren que la localización de aldolasa A podría estar jugando un papel importante en la regulación de su actividad. Asimismo, es plausible pensar que su interacción con otras

macromoléculas podrían constituir nuevos mecanismos que regulan el delicado balance del metabolismo intermediario.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Robaiy, S., y K. Eschrich. (1999) Rat muscle fructose-1,6-bisphosphatase: cloning of the cDNA, expression of the recombinant enzyme, and expression analysis in different tissues. *Biol Chem.* 380:1079-85.
- Benkovic, S.J., y M.M. deMaine. (1982) Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 53:45-82.
- Buono, P., F.P. D'Armiento, G. Terzi, A. Alfieri, y F. Salvatore. (2001) Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system. *J Neurocytol.* 30:957-65.
- Castaldo, G., G. Calcagno, R. Sibillo, R. Cuomo, G. Nardone, L. Castellano, C. Del Vecchio Blanco, G. Budillon, y F. Salvatore. (2000) Quantitative analysis of aldolase A mRNA in liver discriminates between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Clin Chem.* 46:901-6.
- De la Iglesia, N., M. Veiga-da-Cunha, E. Van Schaftingen, J.J. Guinovart, y J.C. Ferrer. (1999) Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett.* 456:332-8.
- Ehsani-Zonouz, A., A. Golestani, y M. Nemat-Gorgani. (2001) Interaction of hexokinase with the outer mitochondrial membrane and a hydrophobic matrix. *Mol Cell Biochem.* 223:81-7.
- Gaesser, G.A., y G.A. Brooks. (1984) Metabolic bases of excess post-exercise oxygen consumption: a review. *Med Sci Sports Exerc.* 16:29-43.
- Gizak, A., y A. Dzugaj. (2003) FBPase is in the nuclei of cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 539:51-5.
- Gizak, A., D. Rakus, y A. Dzugaj. (2003) Immunohistochemical localization of human fructose-1,6-bisphosphatase in subcellular structures of myocytes. *Histol Histopathol.* 18:135-42.

- Gumbhir, K., S.N. Sanyal, R. Minocha, A. Wali, y S. Majumdar. (1989) Glucose-6-phosphate phosphohydrolase activity in guinea pig liver microsomes is influenced by phosphatidylcholine. Interaction with cholesterol-enriched membranes. *Biochim Biophys Acta*. 981:77-84.
- Guminska, M., W. Ptak, y M. Zembala. (1975) Macrophage metabolism during phagocytosis and digestion of normal and IgG antibody-coated sheep erythrocytes. *Enzyme*. 19:24-37.
- Harris, S.J., y D.J. Winzor. (1987) Enzyme kinetic evidence of active-site involvement in the interaction between aldolase and muscle myofibrils. *Biochim Biophys Acta*. 911:121-6.
- Hers, H.G., y L. Hue. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem*. 52:617-53.
- Horecker, B.L., E. Melloni, y S. Pontremoli. (1975) Fructose 1,6-bisphosphatase: properties of the neutral enzyme and its modification by proteolytic enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 42:193-226.
- Hubert, E., J. Villanueva, A.M. Gonzalez, y F. Marcus. (1970) Univalent cation activation of fructose 1,6-diphosphatase. *Arch Biochem Biophys*. 138:590-7.
- Huitorel, P., y D. Pantaloni. 1985. Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem*. 150:265-9.
- Kao, A.W., Y. Noda, J.H. Johnson, J.E. Pessin, y A.R. Saltiel. (1999) Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem*. 274:17742-7.
- Kusakabe, T., K. Motoki, y K. Hori. (1997) Mode of interactions of human aldolase isozymes with cytoskeletons. *Arch Biochem Biophys*. 344:184-93.
- Kuter, M.R., C.J. Masters, y D.J. Winzor. (1983) Equilibrium partition studies of the interaction between aldolase and myofibrils. *Arch Biochem Biophys*. 225:384-9.

Lawrence, G.M., M.A. Jepson, I.P. Trayer, y D.G. Walker. (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.

Le Provost, E., A. Weber, F. Schapira, M. Boissard-Rissel, y A. Guillouzo. (1980) Immunolocalization of fetal aldolase isoenzymes in rat regenerating liver after carbon tetrachloride intoxication. *Oncotdev Biol Med.* 1:263-72.

Leberherz, H.G., y W.J. Rutter. (1969) Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems. *Biochemistry.* 8:109-21.

Leclerc, I., C. Lenzner, L. Gourdon, S. Vaulont, A. Kahn, y B. Viollet. (2001) Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. *Diabetes.* 50:1515-21.

Lilling, G., y R. Beitner. (1990) Decrease in cytoskeleton-bound phosphofructokinase in muscle induced by high intracellular calcium, serotonin and phospholipase A2 in vivo. *Int J Biochem.* 22:857-63.

MacDonald, M.J., H. Al-Masri, M. Jumelle-Laclau, y M.O. Cruz. (1997) Oscillations in activities of enzymes in pancreatic islet subcellular fractions induced by physiological concentrations of effectors. *Diabetes.* 46:1996-2001.

McLane, J.A., y J.O. Holloszy. (1979) Glycogen synthesis from lactate in the three types of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 254:6548-53.

Mita, M., y P.F. Hall. 1982. Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol Reprod.* 26:445-55.

- Miwa, I., S. Mitsuyama, Y. Toyoda, T. Nonogaki, S. Aoki, y J. Okuda. (1990) Evidence for the presence of rat liver glucokinase in the nucleus as well as in the cytoplasm. *Biochem Int.* 22:759-67.
- Miwa, I., y S. Taniguchi. (2002) Acceleration by fructose of the ATP-sensitive K(+) channel-independent pathway of glucose-induced insulin secretion. *Horm Metab Res.* 34:450-4.
- Mizunuma, H., y Y. Tashima. (1986) Characterization of rat muscle fructose 1,6-bisphosphatase. *J Biochem (Tokyo)* 99:1781-8.
- Mizunuma, H., y Y. Tashima. (1990) Survey of fructose 1,6-bisphosphatase isoenzyme in rat organs and ontogenic expression of the enzyme in rat fetus. *Int J Biochem.* 22:883-7.
- Morse, D.E., y B.L. Horecker. (1968) The mechanism of action of aldolases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 31:125-81.
- Nakamura, M., A. Fujiwara, I. Yasumasu, S. Okinaga, y K. Arai. (1982) Regulation of glucose metabolism by adenine nucleotides in round spermatids from rat testes. *J Biol Chem.* 257:13945-50.
- Orgel, M., L.V. Parkhomenko, y M.A. Elshina. (1975) Comparison of the physiological and biochemical indices of the phagocytosis of ram erythrocytes by macro- and microphages. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol:*81-5.
- Ovadi, J., y P.A. Srere. (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int Rev Cytol.* 192:255-80.
- Penhoet, E.E., M. Kochman, y W.J. Rutter. (1969) Ioslotion of fructose diphosphate aldolases A, B, and C. *Biochemistry.* 8:4391-5.
- Penhoet, E.E., y W.J. Rutter. (1975) Detection and isolation of mammalian fructose-diphosphate aldolases. *Methods Enzymol.* 42:240-9.

Popanda, O., G. Fox, y H.W. Thielmann. (1998) Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1397:102-17.

Rakus, D., y A. Dzugaj. (2000) Muscle aldolase decreases muscle FBPase sensitivity toward AMP inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 275:611-6.

Rakus, D., P. Mamczur, A. Gizak, D. Dus, y A. Dzugaj. (2003a) Colocalization of muscle FBPase and muscle aldolase on both sides of the Z-line. *Biochem Biophys Res Commun*. 311:294-9.

Rakus, D., M. Pasek, H. Krotkiewski, y A. Dzugaj. (2003b) Muscle FBPase in a complex with muscle aldolase is insensitive to AMP inhibition. *FEBS Lett*. 547:11-4.

Reed, L.J. (1981) Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by a phosphorylation-dephosphorylation cycle. *Curr Top Cell Regul*. 18:95-106.

Reed, L.J., F.H. Pettit, M.H. Eley, L. Hamilton, J.H. Collins, y R.M. Oliver. (1975) Reconstitution of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:3068-72.

Rehbein-Thoner, M., y G. Pfeleiderer. (1977) The changes in aldolase isoenzyme pattern during development of the human kidney and small intestine demonstrated in organ extracts and tissue sections. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 358:169-80.

Ricard, J., M.T. Giudici-Ortoni, y B. Gontero. (1994) The modulation of enzyme reaction rates within multi-enzyme complexes. 1. Statistical thermodynamics of information transfer through multi-enzyme complexes. *Eur J Biochem*. 226:993-8.

- Rittenhouse, J., T. Chatterjee, F. Marcus, I. Reardon, y R.L. Henrikson. (1983) Amino acid sequence of the COOH-terminal region of fructose-1,6-bisphosphatases in relation to cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 258:7648-52.
- Ronai, Z. (1993) Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem.* 25:1073-6.
- Ronai, Z., R. Robinson, S. Rutberg, P. Lazarus, y M. Sardana. (1992) Aldolase-DNA interactions in a SEWA cell system. *Biochim Biophys Acta.* 1130:20-8.
- Rottmann WH, Tolan DR, Penhoet EE. 1984. Complete amino acid sequence for human aldolase B derived from cDNA and genomic clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 2738-42
- Ryan, C., y J. Radziuk. (1995) Distinguishable substrate pools for muscle glyconeogenesis in lactate-supplemented recovery from exercise. *Am J Physiol.* 269:E538-50.
- Saez, D.E., Figueroa, C.D., Concha, II, y Slebe J.C. (1996) Localization of the fructose 1,6-bisphosphatase at the nuclear periphery. *J Cell Biochem.* 63:453-62. Wakil, S.J., J.K.
- Stoops, y V.C. Joshi. (1983) Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem.* 52:537-79.
- Tonder, A., Terblanche, S. y Oelofsen, W. (1985) Isolation and partial characterization of rat muscle fructose bisphosphatase. *Biochim Biophys Acta.* 831:186-191
- Westrin, H., y L. Backman. (1983) Association of rabbit muscle glycolytic enzymes with filamentous actin. A counter-current distribution study at high ionic strength. *Eur J Biochem.* 136:407-11
- Williams, M.K., y E.R. Kantrowitz. (1992) Isolation and sequence analysis of the cDNA for pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3080-2.
- Wojtas, K., N. Slepecky, L. von Kalm, y D. Sullivan. (1997) Flight muscle function in *Drosophila* requires colocalization of glycolytic enzymes. *Mol Biol Cell.* 8:1665-75.

Yanez, A.J., R. Bertinat, Concha, II, y J.C. Slebe.(2003a) Nuclear localization of liver FBPase isoenzyme in kidney and liver. *FEBS Lett.* 550:35-40.

Yanez, A.J., F. Nualart, C. Droppelmann, R. Bertinat, M. Brito, Concha, II, y J.C. Slebe. (2003b) Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney. *J Cell Physiol.* 197:189-97.

Zakim, D., y D.E. Edmondson. (1982) The role of the membrane in the regulation of activity of microsomal glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem.* 257:1145-8.

Zhu, D.W., G.J. Xu, P.H. Rehse, R. Shi, F.K. Zhao, y S.X. Lin. (2001) Crystallization and preliminary crystallographic data of fructose-1,6-bisphosphatase from human muscle. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57:847-9.

