



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Alejandro Yáñez C.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

CLONAMIENTO Y LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA
ISOFORMA HEPATICA DE RATA DE 6-FOSFOFRUCTO-2-
QUINASA/FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATASA

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

ZAHADY DAFNEE VELASQUEZ BOULET

VALDIVIA-CHILE

2005

*A los grandes amores de mi vida:
Mamá, Mamita, Ignacio e Iván.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mis profesores patrocinantes: Dr. Juan Carlos Slebe, por permitirme realizar la tesis en el Laboratorio de Enzimología, y además por ser una gran persona y maestro, quien me enseñó que en la vida queda mucho por aprender e investigar, y que un investigador siempre debe perfeccionar el trabajo hecho. También al Dr. Alejandro Yáñez, por su apoyo, cuando el trabajo experimental no avanzaba, así como el incentivo constante por generar nuevas líneas de investigación. Al Dr. Juan Guillermo Cárcamo, quien entre broma y broma me enseñó lo importante que es no dejarse avasallar por los problemas.

Por otro lado, quiero agradecer a mis compañeros de trabajo, de quienes aprendí algo fundamental para sobrellevar las dificultades que se presentaron en estos dos años, que es la fraternidad y el cariño en un equipo de trabajo, lo cual nos incentiva a levantarnos y solucionar los problemas que nos aquejan día a día. A Joel y Cristian, quienes dedicaron muchas horas para explicarme las cosas que no entendía, a Romina, por su constante apoyo y alegría, a los Panchos, por hacer del laboratorio una fiesta de lunes a viernes, logrando que la semana comience llena de entusiasmo, a Marcos, Cristian Delgado, Guayec y Carlos.

Quiero darle las gracias a mis amigos: Claudio, Denisse, Pamela, Alex, Támara y Claudia, por apoyarme y escucharme cada vez que necesité un buen consejo o simplemente compañía.

Finalmente, deseo agradecer el apoyo incondicional que recibí por parte de mi familia, y de Iván quien me soportó en todos los momentos de frustración y compartió mis alegrías y triunfos. A mi madre, quien con su dulce voz y la palabra "mi reinita", me hacía sentir la persona más valiente del mundo. A mi papá Richard a quien debo el no haber renunciado y de quien

heredé fortaleza para enfrentar la vida, a Francisco Javier, aunque ya no esté conmigo, fue un pilar fundamental en las cosas que hoy se de la vida. A la Tía Patty, Tío Fernando, Sylvana, Tía Pamela, Maggy, Jaime, Güeli y Mónica, pues son el motor que me impulsa a seguir esforzándome y dar lo mejor de mí en cada momento.

Gracias a todos por apoyarme y hacerme sentir siempre capaz de alcanzar las metas propuestas. Sin todos ustedes, este paso que hoy doy en mi vida no tendría el mismo sentido... les faltaría sus risas y todo el amor que me dan a diario.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Enzimología del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile y fue financiado por los proyectos FONDECYT 1051122; 1051057; DID-UACH S-200574

INDICE DE CONTENIDOS

Páginas

AGRADECIMIENTOS

INDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
3	MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1	Materiales	8
3.1.1	Reactivos	8
3.1.2	Equipos	9
3.2	Métodos	10
3.2.1	Estrategias de trabajo	10
3.2.2	Purificación de RNA total.	11

3.2.3	Cuantificación de RNA total mediante espectrofotometría.	12
3.2.4	Análisis electroforético del RNA en geles de agarosa/formaldehído.	12
3.2.5	Síntesis de cDNA total.	13
3.2.6	Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).	13
3.2.7	Purificación de DNA desde geles de agarosa.	14
3.2.8	<i>A-tailing</i> y ligación al vector pGEM-T-Easy.	14
3.2.9	Elaboración de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar	15
3.2.10	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes.	15
3.2.11	Purificación de DNA plasmidial mediante <i>Kit</i> comercial.	16
3.2.12	Cuantificación de DNA plasmidial mediante absorciometría.	17
3.2.13	Electroforesis en geles de agarosa.	17
3.2.14	Análisis mediante digestión con endonucleasas de restricción	17
3.2.15	Cultivo celular.	18
3.2.16	Transfecciones pasajeras.	18
3.2.17	Inmucitoquímica de células en monocapa.	19

3.2.18	Microscopía de fluorescencia (epifluorescencia o confocal).	20
3.2.19	Obtención de proteínas totales de líneas celulares.	20
3.2.20	Transferencia por Western Blot	21
4	RESULTADOS	23
4.1	Diseño de los partidores para PFKFBPasa2 de hígado de rata y purificación de RNA total de hígado.	22
4.2	Amplificación y clonamiento de la secuencia codificante para la isoforma hepática de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa	25
4.3	Análisis de restricción y representación del plasmidio clonado.	29
4.4	Localización mediante PCR de las enzimas fructosa-1,6-bisfosfatasa y 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa en distintas líneas celulares.	37
4.5	Transfección del vector pEGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular hepática Fto2b.	43
4.6	Transfección del plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular HepG2, correspondiente a hepatoma humano.	46
4.7	Transfección del vector pEGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular renal EBNA.	48
4.8	Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en las líneas celulares MIN6, LLCPK1 y HeLa.	50

4.9	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y fructosa-1,6-bifosfatasa endógena en las líneas celulares hepáticas HepG2 y FTO2b	52
4.10	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y fructosa-1,6-bifosfatasa endógena en las líneas celular EBNA y HeLa.	58
5	DISCUSIÓN	63
6	BIBLIOGRAFÍA	73

INDICE DE FIGURAS

Esquema 1	Esquema método de trabajo para la obtención del fragmento codificante de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa hepática.	23
Figura 1	Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído 1.2 % de la extracción de RNA total de hígado de rata por el método de Trizol.	24
Figura 2	Amplificación por PCR de cDNA de hígado de rata.	26
Esquema 2	Representación esquemática del procedimiento para obtener el plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2.	27
Figura 3	Electroforesis en gel de agarosa 1.2 % de la purificación del plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2 mediante kit comercial.	28
Figura 4	Análisis de restricción del plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2.	30
Figura 5	Representación esquemática del plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2.	31
Figura 6	Análisis de restricción del plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2.	32
Figura 7	Representación del plasmidio pEGFP/PFK2FBPasa2.	33
Figura 8	Análisis por PCR del plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2.	34
Figura 9	Análisis por secuenciación del fragmento clonado en el vector pEGFP/PFKFBPasa2.	36

Figura 10	Análisis mediante electroforesis de los RNA extraídos desde distintas líneas celulares, mediante el método de Trizol.	38
Figura 11	Análisis por PCR con partidores para PFKFBPasa2, usando como templado cDNA de distintas líneas celulares.	39
Figura 12	Análisis PCR con partidores para fructosa-1,6-bifosfatasa de hígado de rata, usando como templado cDNA de distintas líneas celulares.	40
Figura 13	Análisis por Western Blot de extractos de proteínas totales de diferentes líneas celulares, usando anticuerpo contra PFKFBPasa2.	41
Figura 14	Análisis por Western Blot de extractos de proteínas totales de diferentes líneas celulares, usando anticuerpo contra la isoforma hepática de FBPasa.	42
Figura 15	Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en células de hepatoma de rata FTO2b crecidas en distintas condiciones de glucosa.	44
Figura 16	Serie confocal de la localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular hepática FTO2b.	45
Figura 17	Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular de hepatoma humano HepG2, crecidas en distintas concentraciones de glucosa.	47
Figura 18	Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular renal EBNA en distintas concentraciones de glucosa.	49
Figura 19	Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en las líneas celulares MIN6, LLCPK1 y HeLa.	51

Figura 20	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular HepG2 en ausencia de glucosa	53
Figura 21	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular HepG2 en presencia de 5 mM glucosa.	54
Figura 22	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular HepG2 en 25 mM glucosa.	55
Figura 23	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular FTO2b en ausencia de glucosa.	56
Figura 24	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular FTO2 crecidas en alta glucosa.	57
Figura 25	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular EBNA en ausencia de glucosa.	59
Figura 26	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular EBNA en presencia de 5 mM glucosa.	60
Figura 27	Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular EBNA en condiciones	61

de alta glucosa.

Figura 28 Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la 62
proteína endógena FBPasa en la línea celular de carcinoma humano
HeLa.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	absorbancia.
Amp	ampicilina.
BSA	albúmina sérica de bovino.
°C	grados centígrados.
cAMP	adenosina monofosfato 5' monofosfato cíclico.
cDNA	ácido desoxirribonucleíco complementario.
DAB	diaminobencidina.
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
DNAsa	desoxirribonucleasa.
dNTPs	deoxinucleotidos trifosfato.
D.O.	densidad óptica.
DT	deoxitimidilato.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente aumentada).
Et Br	bromuro de etidio.
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
PFKFBPasa2	6-Fosfofructo-2-kinasa/Fructosa-2,6-bisfosfatasa.
Fru-1,6-P₂	Fructosa-1,6-bisfosfato.
GK	glucoquinasa.

Kb	kilobase.
kDa	kilodalton(s).
Km	kanamicina.
LB	medio de cultivo Luria-Bertani.
M	molar.
min	minuto(s).
mM	milimolar.
M-MLV	Virus de la leucemia Murino.
nM	nanomolar.
nt	nucleótido.
pb	pares de bases.
PCR	reacción de la polimerasa en cadena.
<i>Pfu</i>	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i> .
rpm	revoluciones por minuto.
RNA	ácido ribonucleico.
RNAsa	Ribonucleasa.
seg	segundos.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
Ser	aminoácido serina.
<i>Taq</i>	DNA polimerasa de <i>Termophylus acuaticus</i> .
Tampón PBS	NaCl 159 mM, NaH ₂ PO ₄ 12 mM
Tampón	TAE Tris-HCl 89 mM, ácido acético, EDTA 2 mM.
Tampón TBE	Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

TGE	Tris, Glucosa, EDTA.
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano.
U	unidades
UV	ultra violeta.
V	volt(s).
µg	microgramo.
µL	microlitro.

RESUMEN

Las vías glicolíticas y gluconeogénicas son reguladas por hormonas y por metabolitos de bajo peso molecular, como fructosa-2,6-bisfosfato, el cual es un activador alostérico de la enzima glicolítica 6-fosfofructo-1-quinasa, y un potente inhibidor de la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). Este metabolito es sintetizado y degradado por la acción de la enzima bifuncional 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa. Otro mecanismo propuesto para la regulación de las vías metabólicas es la compartimentación de estas a nivel subcelular. En la actualidad no existen datos acerca de la localización de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFBPasa2) y posibles cambios en la localización, moduladas por el estado metabólico. En base a estos antecedentes, propusimos determinar la localización subcelular de PFKFBPasa2 en distintas condiciones metabólicas. Para ello, utilizando partidores específicos para PFKFBPasa2 se clonó la isoforma hepática de rata en el vector pEGFP-C1. Mediante la fluorescencia de EGFP, pudimos determinar la distribución subcelular de esta proteína de fusión en líneas celulares de hígado, riñón y carcinoma. Previamente, se determinó mediante western blot la presencia de las isoformas hepáticas de FBPasa y PFKFBPasa2 en todas las líneas celulares estudiadas. Utilizando microscopía confocal, se observó, en las líneas HepG2 y EBNA, una movilización de la enzima PFKFBPasa2 desde el núcleo al citoplasma en presencia de glucosa. Al contrario, en la línea hepática FTO2b, la translocación es desde el citoplasma al núcleo en iguales condiciones. Por otro lado, FBPasa y PFKFBPasa2, en todas las líneas estudiadas, co-localizaron en el citoplasma de la célula, lo que nos permite concluir que la función de PFKFBPasa2 en el núcleo es independiente de la presencia de FBPasa.

SUMMARY

The glycolytic and gluconeogenic pathways are regulated by hormones and metabolites of low molecular weight, like fructose-2,6-bisphosphate, which is the principal inhibitor of the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). Fruc-2,6-P₂ is synthesized and degraded by the action of the bi-functional enzyme, 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFBPase2). Another mechanism proposed to regulate these pathways, is its compartmentation at subcellular level. Nevertheless, there is no information about the modulation of PFKFBPase2 and the possible changes of localization in response to metabolic state. Thus, we proposed to study the expression and subcellular localization of PFKFBPase2 in diverse cell lines under different metabolic conditions. For that, we used specific primers for PFKFBPase2 to clone the rat liver isoform, in the pEGFP-C1 vector. Through fluorescence of EGFP, we determined the subcellular localization of the fusion protein in the liver, kidney and carcinoma cell lines. Previously, we determined, by western blot assay, the localization of the hepatic isoforms of FBPase and PFKFBPase2 in the studied cell lines. Using confocal microscopy we observed the translocation of PFKFBPase2 from the nuclei to the cytoplasm in the presence of glucose in the cell lines HepG2 and EBNA. On the contrary, in the hepatoma cell line FTO2b, the translocation is from the cytoplasm to the nuclei in the same conditions. The results show that both PFKFBPase2 and FBPase in all lines studied co-localized in cell cytoplasm. This allows us to conclude that the PFKFBPase2 functions in the nuclei is independent of the presence of FBPase.

2. INTRODUCCION

La glucosa es la mayor fuente de energía en las células de mamíferos. Éstas dependen del suplemento estacionario de glucosa provisto principalmente por el torrente sanguíneo, aún cuando, sus niveles son cuidadosamente mantenidos (Mathews & Van Holde, 1998). Este equilibrio es conseguido mediante la utilización y absorción de glucosa de la dieta por el intestino, la tasa de consumo de glucosa por los tejidos periféricos, la pérdida por los túbulos renales y la regulación de la homeostasis de la glucosa por el hígado (Stryer, 2003). Este órgano es de gran importancia, ya que genera glucosa desde su forma polimérica, glicógeno, u otros compuestos de origen no glucídico como piruvato, glicerol, entre otros, a través de la gluconeogénesis. Esta vía metabólica es opuesta a la glicólisis, y posee tres pasos fisiológicamente irreversibles que son claves en la regulación de gluconeogénesis/glicólisis (Van Schaftingen, 1987). Para evitar que estas vías generen ciclos fútiles, las enzimas implicadas en ambos procesos responden a efectores alostéricos, de tal manera que un efector inhibe una vía y en las mismas condiciones activa a la otra vía metabólica (Mathews & Van Holde, 1998).

Estudios en gluconeogénesis determinaron la presencia de un potente regulador de la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), el fructosa-2,6-bisfosfato, (fru-2,6-P₂) que inhibe la interconversión de la fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato (Stryer, 2003). Este metabolito fue descubierto en 1980 en tejido hepático (Van Schaftingen et al., 1980), desde entonces su presencia ha sido demostrada en una gran variedad de organismos animales, plantas y reino fungi. Además, su rol regulador ha sido extendido a otras enzimas como es fructosa-1,6-bisfosfatasa y otras fosfofructoquinasas dependientes de pirofosfato inorgánico presentes en plantas (Van Schaftingen, 1987). Este metabolito es

sintetizado por la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFBPasa2 EC 2.7.1.105/3.1.3.46).

PFKFBPasa2 es una enzima bifuncional que cataliza la síntesis y degradación del fructosa-2,6-bisfosfato en dos sitios activos distintos. En el dominio amino y carboxilo terminal de la proteína se encuentran los sitios activos quinasa y bisfosfatasa, respectivamente. Ellos son los encargados de mantener los niveles de este compuesto dentro de la célula. Esta proteína puede ser considerada como una enzima glicolítica o gluconeogénica, pues actúa como un interruptor entre estas dos vías, transformándola así en un importante regulador del metabolismo de los carbohidratos en el hígado. Su actividad regula la concentración en el estado estacionario de la fructosa-2,6-bisfosfato, el cual corresponde a un activador alostérico de la enzima glicolítica 6-fosfofructo-1-quinasa y un inhibidor de la enzima gluconeogénica FBPasa (Simon & Pilkis, 1987).

Estructuralmente PFKFBPasa2 es una proteína homodimérica y cada subunidad está compuesta de 470 aminoácidos. La enzima presenta dos sitios catalíticos: uno, quinasa (EC 2.7.1.105), localizado en la región amino terminal, el cual sintetiza fru-2,6-P₂ desde ATP y F-6-P, y otro, un dominio bisfosfatasa (EC 3.1.3.46) que se encuentra en la región carboxilo terminal y degrada fru-2,6-P₂ a fru-6-P y P_i (Lively & Raafat, 1988)

Varias isoformas de esta enzima han sido identificadas en distintos tejidos, incluyendo músculo esquelético (Darville & Crepin, 1989), hígado, riñón, corazón, cerebro, testículo, islotes pancreáticos y placenta. Estudios recientes indican que la proteína PFKFBPasa2 es codificada por al menos cuatro genes diferentes, denominados PFKFBP1-4 (Okar & Manzano, 2001). Así mismo de acuerdo a su distribución tisular, estas isoenzimas se conocen como: L (hígado; Darville & Crepin, 1987), H (corazón; Sakata & Uyeda, 1990), M (músculo; Darville & Crepin, 1987) y T (testículo; Sakata & Abe, 1991). Las

isoformas de hígado, músculo esquelético y feto son transcritas desde el locus del gen PFKFBP1 y son producto del empalme alternativo de su primer exón (Darville & Crepin, 1989). El gen PFKFBP2 codifica para las isoformas de riñón, corazón e islotes pancreáticos. La isoforma cardíaca contiene un péptido extra en el carboxilo terminal, el cual es fosforilado por proteína quinasa A y C, lo que provoca la activación de la PFK2 sin afectar la actividad fru-2,6-Pasa bisfosfatasa (Kitamura & Kangawa, 1988). El gen PFKFBP3 codifica una isoenzima ubicua, presente en placenta, cerebro y células tumorales (Sakai et al., 1996; Hamilton et al. 1997; Manzano et al. 1998; Hirata et al., 1998). Este producto génico presenta una alta relación de actividad quinasa/bisfosfatasa. La isoforma de cerebro expresa variantes por empalme alternativo, el que afecta al amino terminal de los dominios quinasa y bisfosfatasa de la enzima (Baltrusch & Lenzen, 2001). La isoenzima de testículo, es codificada por el gen PFKFBP4. El monómero de la enzima consiste en dos dominios catalíticos independientes, uno quinasa y otro bisfosfatasa, los cuales se unen a través del dominio quinasa. Estudios relacionados con la evolución de la enzima bifuncional han determinado que el dominio quinasa está relacionado con la superfamilia de proteínas que unen mononucleótidos con una fuerte relación a las adenilato quinasa y la porción de las proteínas G que unen nucleótidos (Charles A Hasemann and Deisenhofer, 1996) . Por otro lado, se ha demostrado que el dominio fosfatasa posee gran similitud con las enzimas fosfoglicerato mutasa y con la familia de las fosfatasas ácidas (Tominaga & Tsujikawa, 1997).

Todas las variantes descritas para esta enzima difieren en su masa molecular, propiedades cinéticas e inmunológicas y en la respuesta a fosforilación mediada por una proteína quinasa dependiente de cAMP (Crepin & DeCloedt, 1992). Además, cabe destacar que la regulación de la isoforma hepática corresponde a una modificación covalente

mediante fosforilación y desfosforilación catalizada por una enzima quinasa dependiente de cAMP, la cual agrega un grupo fosfato a una serina ubicada en la posición 32 de la secuencia aminoacídica. Esto fue determinado mediante mutaciones sitio específicas de este aminoácido. Por el contrario, se ha demostrado que al carecer de los primeros 32 aminoácidos, la isoforma muscular no presentaría este tipo de regulación (Kurtland & El-Maghrabi, 1992). Sin embargo, ambas isoformas de la enzima son reguladas en su función por cambios en la cantidad de enzima, de sustratos y efectores de bajo peso molecular (Raafat El-Magharabi & Pilkis,).

Análisis de secuencia del gen PFKFBP-1 ha demostrado la presencia de un poderoso elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el primer exón del gen (Jantzen, Striible, 1987). Este elemento GRE está formado por dos palíndromos imperfectos característico del sitio de unión para receptores díméricos de glucocorticoides. Además, presenta un sitio de unión de factores de transcripción que se encuentra a una distancia de 3.5 a 8.5 kb desde el sitio de inicio de la transcripción para la isoforma hepática y muscular, respectivamente. La distancia que presenta del promotor supera lo antes visto, lo que hace pensar que estaría regulando directamente al promotor de ambas isoformas. (Lange & Espinet, 1992). Por otra parte, se ha señalado que la estimulación al nivel de mRNA de PFKFBPasa2 por glucocorticoides, es inhibida por la presencia de insulina, mediante la activación del N-terminal de c-Jun de la vía de las quinasas (De los Pino & Fernández, 2001). Además, en el hígado, la presencia de zonas y hepatocitos glicolíticos y gluconeogénicos, hace interesante estudiar la regulación de estas vías y, principalmente, estudiar la isoforma hepática de esta enzima.

En los últimos años se ha demostrado la existencia de interacciones entre la isoforma hepática de PFKFBPasa2 y la enzima glicolítica glucoquinasa (hexoquinasa tipo

IV, GK), lo cual sugiere que esta interacción puede proveer la razón para recientes observaciones de una parcial dependencia de los niveles de fru-2,6-P₂ en el encauzamiento de los intermediarios entre la glucoquinasa y las enzimas glicolíticas (Baltrusch & Lenzen, 2001). GK cataliza la primera reacción de la vía glicolítica, mediante conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato. Esta es una enzima fundamental en el control de la glucosa sanguínea debido a su alta K_M para este azúcar, pudiendo actuar como su sensor dentro de la célula. El control de su actividad en las células hepáticas es regulada por la interacción de esta enzima con una proteína denominada proteína reguladora de GK (GKRP), la cual retiene a la enzima en el compartimento nuclear, impidiendo que catalice la fosforilación de la glucosa (Chiyo Shiota 1999). De esta forma GK regula su actividad catalítica dentro de la célula.

Por otro lado, importantes hallazgos en nuestro laboratorio han demostrado que la localización subcelular de enzimas gluconeogénicas, como FBPasa, varía dependiendo de las condiciones metabólicas de los tejidos. Esto ha permitido postular que al igual que las enzimas glicolíticas, las gluconeogénicas son reguladas por metabolitos de bajo peso molecular y hormonas. Estos antecedentes nos llevan a pensar que la regulación de una enzima tan importante para la homeostasis de la glucosa como es PFKFBPasa2, podría involucrar alguno de los procesos antes mencionados para otras enzimas del metabolismo de los carbohidratos. Es debido a estos antecedentes que proponemos la siguiente hipótesis: **“6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa hepática se localiza en compartimientos subcelulares diferentes dentro de los hepatocitos, dependiendo de las condiciones metabólicas de este tejido. Esta localización, que sería importante para su función fisiológica, sería modulada por la acción de metabolitos y hormonas, constituyendo un nuevo mecanismo de regulación metabólica para esta enzima”.**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Sigma Chemical Co.: Kanamicina, Tris[hidroximetil]aminometano (Trizma-base), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), RNAsa A, lauril sulfato de sodio (SDS), persulfato de amonio, medio Eagle modificado por Dulbecco 4,5 g/l glucosa (DMEM), bicarbonato de sodio, diaminobencidina (DAB), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), azul de bromo fenol, polilisina, glucosa, Glucosa-2-fosfato deshidrogenasa, Fosfoglucosa isomerasa.

Merck, Darmstadt, Alemania: hidróxido de sodio, isopropanol, etanol, cloroformo, iisoamilalcohol, metanol, ácido fórmico, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), ácido acético, dimetilsulfoxido (DMSO), fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de sodio, sulfato de sodio.

BMA: Agarosa.

Invitrogen-Gibco BRL, Inc: Medio LB Broth base en polvo (Lennox L Broth base), agar en polvo, acrilamida, bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida), tampón de fenol saturado, solución de antibiótico-antimicótico, medio Eagle modificado por Dulbecco 1 g/l glucosa (DMEM), medio Eagle modificado por Dulbecco sin glucosa (DMEM), Tripsina, Kit “Conceret Rapid Plasmid Miniprep System”, BSA Fracción V liofilizada, Ampicilina, Enzima Taq DNA polimerasa, Trizol, LipofectAMINA 2000,

Clontech: Plásmido pEGFP-C1.

Promega: *E. coli* cepa JM109, Enzima restricción *Eco RI*, T₄ DNA Ligasa, *Pfu* DNA polimerasa.

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

Bio Labs: Enzima restricción *Hind III*, Enzima restricción *Bam HI*, Enzima restricción *Pst I*, Enzima restricción *NdeI*, Albúmina sérica de bovino purificada en solución 100X (BSA).

Invitrogen: Bromuro de etidio.

Rieden de Haen: Rojo fenol.

Fluka AG: Paraformaldehído.

Dako: Medio de montaje “Fluorescent mounting medium”.

Molecular Probes: anticuerpos de cabra contra IgG de conejo, conjugado a Alexa Fluor 488 y contra IgG de gallina, conjugado a Alexa Fluor 594.

Perkin Elmer: desoxinucleotidos (dGTP,dATP,dTTP,dCTP)

W y Z: estandar de peso molecular preteñido para proteínas.

BioSonda: síntesis de los siguientes partidores.

- NH₂ FBPasa-2: 5' CAAGCTTCGCATATGTCTCGAGAGATGGGAGAA 3'

- COOH FBPasa-2: 5' GTCGACGGTACCTCAGTAATGGGCAGGTACAGT 3'

3.1.2 Equipos

Agitador magnético 1179-ICE de Lab-Line Instruments, Inc.; agitador termorregulado Lab-Line Instruments (Orbit Environ-Shaker); autoclave de Orthman; balanza Shimadzu (LIBROR EB-3200S), balanza analítica Shimadzu (LIBROR AEX-120G); baño termorregulado C20 de MGW Lauda; cámara de flujo laminar NuAire (class II, type A); cámara digital para geles Spectroline (model CA-1000/F) con monitor e impresora Sony (UP-860); cámara de transferencia Bio-Rad (Trans-Blot SD); centrifuga clínica; espectrofotómetro UV-150-02 de Shimadzu; espectrofotómetro de arreglo de diodo Hewlett Packard, modelo 8453; fuente de poder Life technologies (BRL Modelo 500);

incubador para cultivo con inyección de CO_2 NuAire (IR Autoflow); incubador bacteriológico tipo seco Electric Company (Blue M); microcentrifuga MIKRO 22R de Hettich; horno microondas Somela (E 70, TF-7); micropipetas Wilson P-1000, P-200, P-100, P-20, P-10, P-2; microscopio invertido Nova (IN 833); microscopio de epifluorescencia Zeiss (Axioskop HBO 50); microscopio confocal (Zeiss Axiovert 100M); transiluminador TFX-20 M de Vilber Lourmat; pHmetro Radiometer Copenhagen (PHM 83 Autocal); termociclador MJ Research (Mini Cyclor).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estrategia de trabajo.

Con el fin de realizar los objetivos planteados en la presente tesis, se comenzará con el clonamiento del fragmento codificante de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFBPasa2) en el vector pGEM-T-Easy, el cual nos permitirá el posterior subclonamiento de este fragmento en el vector pEGFP-C1.

El plasmidio pGEM-T-Easy, luego de ser clonado, será examinado mediante análisis de restricción, lo que nos permitirá determinar la correcta inserción del fragmento codificante de 6PFK-2/FBPasa-2.

Posteriormente, se realizó el subclonamiento en el vector pEGFP-C1, para lo cual el plásmido pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2 será digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I, lo cual liberará el fragmento codificante, que luego será ligado al vector pEGFP-C1 mediante la acción de la enzima T_4 DNA ligasa.

Las bacterias *E. coli* cepa JM109 serán transformadas con el vector clonado. La selección de las bacterias conteniendo el plasmidio se realizó mediante el cultivo de éstas,

en medio LB-agar-kanamicina, ya que el plasmidio le confiere resistencia a este antibiótico. Con el fin de corroborar la incorporación del fragmento codificante para la enzima de interés en el vector, se purificó el DNA plasmidial desde las bacterias competentes, y a continuación se realizó diversos ensayos de restricción, con los cuales se verificó la correcta incorporación del fragmento.

Luego, para determinar que la secuencia de la enzima no presentó mutaciones, ésta fue secuenciada, mediante el uso de cuatro pares de partidores. Dos de ellos, amplifican la secuencia completa y el otro par solo 500 pb en el interior de ésta.

Se utilizará la técnica de inmunofluorescencia para conocer la localización de la proteína de fusión GFP/PFKFBPasa2 en distintas líneas celulares.

Se trabajará con cultivos de líneas celulares hepáticas como son FTO2b, HepG2, y además, en líneas celulares renales como LLCPK1 y EBNA. Estas fueron transfectadas y tratadas con distintas concentraciones de glucosa, para determinar la localización subcelular de la enzima bifuncional.

3.2.2 Purificación de RNA total

Para la extracción del RNA total se utilizó la metodología descrita por Chomczynsky y Sacchi (1987). Una muestra de hígado de rata de aproximadamente 100 mg se mezcló con 1 ml de TRIzol y se homogeneizó durante 1 min a la máxima velocidad del politrón (Ultraturax). El homogeneizado se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego de este tiempo se agregaron 200 µl de cloroformo. La solución fue agitada vigorosamente por 15 seg y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. La mezcla se centrifugó a 12000 xg durante 15 min a 4 °C, y la fase acuosa fue transferida a otro tubo estéril, donde se precipitó el RNA con isopropanol. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 10

min y luego fue centrifugada a 12000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido y el sedimento lavado con etanol 75 %. Se mezcló con vortex y se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4 °C. Finalmente, el sedimento de RNA se secó a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en tampón TE, incubando por 10 min a 55-60 °C.

3.2.3 Cuantificación RNA total mediante espectrofotometría

La cuantificación del RNA total se realizó mediante espectrofotometría, para lo cual se midió la absorbancia a 260 nm de las muestras de RNA, diluidas 100 veces en agua estéril. Además, se determinó la pureza del RNA, midiendo la absorbancia a 280 nm y calculando la razón A_{260}/A_{280} (valor que debe ser superior a 1,8). La concentración aproximada de la muestra se calculó utilizando la relación de 1 unidad de absorbancia a 260 nm que equivale a 40 µg/ml de RNA. La concentración final corresponde a la multiplicación del valor obtenido por el factor de dilución de la muestra.

3.2.4 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 200 mM pH 7,0, acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM) y 5,4 ml de formaldehído 37 %. La solución se aforó a 30 ml con agua estéril y fue vertida sobre el molde. El gel fue pre-corrído por 5 min a amperaje mínimo, en tampón MOPS 1 X.

Las muestras fueron preparadas adicionando 2 µl de tampón 10 X 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 muestra, el cual contiene bromuro de etidio. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en el gel, y sometidas a un

campo eléctrico de 40 mA. La visualización de las bandas fue realizada mediante luz ultra violeta.

3.2.5 Síntesis de cDNA total.

De acuerdo a Roth y col. (1985), en un tubo de microcentrifuga estéril se agregaron 2 µg de RNA y 1 µl de partidor Oligo dT en un volumen total de 15 µl de agua estéril. Luego, la mezcla fue calentada, usando un baño termorregulador a 70 °C durante 5 min. Posteriormente, la solución fue enfriada, colocándola en hielo por 5 min. Pasado este tiempo a la mezcla se le agregaron 5 µl de mix que contenía los dNTPs, 5 µl de tampón de transcriptasa reversa 5 X y 5 µl de enzima transcriptasa reversa. Luego la mezcla fue llevada al termociclador utilizando los siguientes pasos: 1 h a 42 °C, 15 min a 70 °C y guardar a -20 °C.

3.2.6 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

En un tubo estéril de 0,6 µl se agregó 2,5 µl de tampón *Taq polimerasa*, 1,0 µl de Mg^{+2} (50 mM), 2,0 µl de mix dNTP (2,5 mM cada uno), 2,0 µl de cada partidor (10 pmol/µl), 1,0 µl de cDNA o plásmido equivalente a 100-150 ng/µl, 14 µl de agua estéril y 0.5 µl de la enzima *Taq polimerasa* (5 U/ml). La mezcla es llevada a un termociclador, usando el siguiente programa: 95 °C por 1 min, 94 °C por 30 seg, 61 °C por 59 seg, 72 °C por 5 min, se realizaron 30 ciclos en estas condiciones, y finalmente, la extensión fue realizada a 72 °C por 7 min.

3.2.7 Purificación de DNA desde geles de agarosa.

Para esto, se utilizó un kit comercial “CONCERT™ Rapid Gel Extraction System” y se siguieron las instrucciones del comerciante. Para extraer el DNA desde un gel de agarosa al 1.2 %, en el cual, fueron cargados 50 µl del producto de PCR, se cortó la banda de interés desde este, para posteriormente ser purificada. Luego, la banda cortada fue pesada en una balanza analítica. Con este valor se pudo conocer el volumen de tampón de unión necesario para disolver la agarosa, multiplicando dicho peso por un factor de 3 o 4. Posteriormente, la mezcla fue calentada a una temperatura de 55-65 °C en baño termostático hasta que el gel se solubilizó. A continuación, se montó una columna comercial “*Hi-Binding DNA columns*” sobre un tubo eppendorf de 2 ml y en este se agregaron 750 µl como máximo de la solución recién descrita. Esta fue centrifugada a 10000 xg durante 1 min a temperatura ambiente y el líquido fue eliminado. Luego a la columna se le adicionaron 700 µl de tampón *SPW* diluido con etanol absoluto y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 min. Luego de este tiempo, se centrifugó a 10000 xg por 1 min. para lavar la columna. Después, el líquido fue descartado y el DNA fue eluido con 50 µl de tampón de elución. Para determinar la concentración del DNA extraído, se midió la absorbancia de la muestra a 260 nm.

3.2.8 A-tailing y ligación al vector pGEM-T-easy

Se mezclaron 2,5 µl de tampón de reacción 10x, 1 µl de Mg^{+2} a una concentración de 50 mM, 0,5 µl de mix de deoxinucleótidos a una concentración de 10 mM, 19,5 µl del producto del PCR, purificado desde el gel mediante kit comercial, y por último, se agregaron 1,5 µl de la enzima *Taq polimerasa*. La mezcla fue calentada en baño termostático a 70 °C durante 30 min y luego puesta en hielo. La ligación se realizó mezclando en un tubo estéril 5 µl de tampón *T4 DNA ligasa 2x*, 1 µl pGEM-T-Easy, 3 µl

producto de PCR y 1 µl de T4 DNA ligasa. A continuación se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

3.2.9 Elaboración de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y con agar.

Los medio fueron preparados a una concentración de 20 g/l de medio LB comercial y fueron autoclavados inmediatamente después de su preparación para esterilizar.

Luego, en un ambiente estéril, se esperó hasta que la mezcla alcanzó una temperatura de 50 °C, después de lo cual, se le agregó el antibiótico de interés, a una concentración de 125 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de kanamicina en cada caso, mezclando con movimiento circular y se llenaron placas Petri estériles con 10 ml de la solución.

3.2.10 Transformación de bacterias *E. coli* competentes.

Para este procedimiento se utilizaron bacterias *Escherichia coli* cepa JM 109 competentes (en tampón con CaCl₂), las cuales se mantienen alicuotadas en volúmenes de 105 µl y congeladas a -70 °C.

En un tubo de microcentrifuga estéril se agregó 1 µl de DNA plasmidial (aproximadamente 150 ng) a 105 µl de una suspensión de células competentes, manteniéndolas a 4 °C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, la solución fue calentada a 43 °C por 90 seg, tras lo cual, se dejó en hielo durante 5 min. La suspensión es agregada a 900 µl de medio LB. Esta solución fue incubada a 37 °C por 1 h con agitación constante de 250 rpm. Posteriormente, se sembraron 100 µl de la suspensión en placas de LB-agar, las que contienen antibiótico seleccionador (Ampicilina o Kanamicina) y se dejó en un incubador bacteriológico durante toda la noche a 37 °C.

3.2.11 Purificación de DNA plasmidial

Para la purificación de DNA plasmidial, se utilizó un kit comercial de Omega Bio-Tek y Gibco BRL. El protocolo utilizado, corresponde al entregado por el fabricante. Para ello, se inoculó una colonia extraída desde un cultivo en placa agar-LB, en volumen de 5 ml de medio LB comercial, el cual contiene el antibiótico seleccionador que corresponda. Se dejó en un agitador termorregulado a 37 °C por 12 h con agitación constante de 250 rpm. El medio fue centrifugado a 4500 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en 250 µl de *solución I* (lisis), a la cual se le agregó previamente RNAsa, y fue mezclado con vortex. Luego se le adicionó 250 µl de *Solución II*, mezclando por inversión aproximadamente 6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Transcurrido este tiempo, se le adicionaron 350 µl de *Solución III*, homogeneizando por inversión hasta la formación de flóculos blancos, posteriormente se centrifugó a 10000 x g por 10 min. El sobrenadante se traspaso a una columna del kit comercial, montada sobre un tubo de 2 ml y se centrifugó nuevamente a 10000 xg por 1 min. El líquido fue descartado y la columna lavada con 500 µl de tampón de unión, para ser centrifugada a 10000 xg por 1 min, y se descartó el eluato. La columna se lavó dos veces con 750 µl de tampón de lavado diluido con etanol, centrifugando después de cada lavado. Finalmente, la columna se traspasó a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml y el DNA fue eluído en dos paso sucesivos, en los que se adicionó a la columna 25 µl de tampón de elusión y luego fue centrifugada 1 min a 10000 xg cada vez.

3.2.12 Cuantificación de DNA plasmidial mediante absorciometría.

La cuantificación del DNA plasmidial se realizó mediante espectrofotometría, para lo cual se midió la absorbancia a 260 nm de las muestras de DNA diluidas 100 veces en

agua estéril. Además, se determinó la pureza del DNA, midiendo la absorbancia a 280 nm y calculando la razón A_{260}/A_{280} (valor que debe ser superior a 1,8). La concentración aproximada de la muestra se calculó utilizando la relación de 1 unidad de absorbancia a 260 nm que equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA. La concentración final corresponde a la multiplicación del valor obtenido por el factor de dilución de la muestra.

3.2.13 Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa al 1,2 %, pesando 1,2 gr de este y diluyendo en tampón *TAE* 1x. La solución fue llevada a un horno de microondas durante 30 seg aproximadamente. Luego fue colocado en una cámara de electroforesis. La solución se deja a temperatura ambiente durante 30 min para que gelifique. Pasado este tiempo las muestras de DNA son colocadas en el gel agregando 5 μl de DNA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 1 μl de tampón carga para DNA 10 X con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La electroforesis fue sometida a un campo eléctrico de 70 v por 45 min.

3.2.14 Análisis mediante digestión con endonucleasas de restricción

El plásmido a analizar fue digerido con una o dos enzimas de restricción, dependiendo del experimento. Se mezclaron en un tubo eppendorf estéril de 0,6 ml, 2,0 μl DNA plasmidial (aproximadamente 2 μg), 1,5 μl de tampón enzima de restricción, 0,6 μl de enzima de restricción (26.000-100.000 U/ml) y 11,9 μl de agua estéril. Luego, la mezcla fue colocada en un baño termorregulado a 37 °C por 2 h. En los casos en que utilizó más de una enzima se le agregó la misma cantidad anteriormente mencionada, pero escogiendo un tampón que aporte al medio la concentración salina necesaria para el buen funcionamiento de las enzimas.

La visualización de las digestiones se realizaron en geles de agarosa al 1,2% en tampón TAE 1X y sometidos a un campo eléctrico de 45 V.

3.2.15 Cultivo celular

Las distintas líneas celulares fueron cultivadas inicialmente en iguales condiciones, utilizando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado previamente 1 h a 57°C y 1% antibiótico/antimicótico. Para su crecimiento las células fueron colocadas en una cámara de cultivo celular a 37°C y 5% CO₂. Las células fueron repicadas cada 24 o 48 h, dependiendo de la línea celular, tiempo suficiente para alcanzar un 95% de confluencia, mediante el uso de tripsina-EDTA (0,25% y 1 mM EDTA en PBS) como agente disociante de células.

3.2.16 Transfecciones transitorias.

La transfección de las líneas celulares fue realizada mediante la utilización de reactivos sobre la base de liposomas como son Lipofectamina 2000 o Metafecteno, de acuerdo a las instrucciones del producto.

Se utilizaron placas de cultivo celular de 12 pocillos, en los cuales se colocó un cubreobjetos redondo. A estos se les realizó un tratamiento con polilisina al 0,01 %, lo que permite la mejor adhesión de las células al cubreobjeto. Para eliminar la polilisina, que es citotóxica, cada pocillo fue lavado 7 veces con PBS 1X.

La relación DNA/Lipofectamina o metafecteno fue de 1 µg de DNA por 2 µl del reactivo de transfección.

En primer lugar, utilizando tubos eppendorf estériles, se diluyó el reactivo de transfección en 50 µl de DMEM base no suplementado con suero, lo mismo se hizo con el

DNA; ambos se incubaron 5 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se mezclaron las dos soluciones y fueron colocadas en la placa que contiene las células a un 80 % de confluencia en medio con suplementos, cuidando de no despegarlas.

Luego de 24 h de transfección, el medio fue cambiado y la concentraciones de glucosa usadas en cada experimento fueron las siguientes: glucosa 5 mM, suero 10 %; glucosa 25 mM, suero 10 %; sin glucosa, suero 10 %.

Transcurridas 24 h, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con PBS/paraformaldehído 3%, durante 20 min. Luego, se lavan nuevamente con PBS 1X y se dejan 10 min con una solución de NH₄Cl 10 mM. Posteriormente se levantan los cubreobjetos, se secan y se montan en un portaobjetos usando medio de montaje fluorescente de Dako. Finalmente, las muestras son observadas al microscopio de epifluorescencia o confocal.

3.2.17 Inmunocitoquímica de células en mono capa.

A las 48 o 72 h después de la transfección con el vector pEGFP/PFKFBPasa2, según el procedimiento descrito en 3.2.16, se realizó la inmunocitoquímica de las células en monocapa. Para ello, las células en el cubreobjeto fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con PBS/paraformaldehído 3, % por 20 min. Luego fueron lavadas nuevamente con PBS 1X y permeabilizadas con 0,1 % Triton X-100 en PBS 1X por 4 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan tres veces las células con PBS-0,2 % gelatina, 0.5 mM azida de sodio y se incubando por 5 min cada vez.

Se diluye el anticuerpo primario en relación 1:500, en PBS-0,2 % gelatina, azida de sodio 0.5 mM, incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con PBS-0.2 % gelatina, 0,5 mM azida de sodio y se adicionó el

segundo anticuerpo diluido 1:500 en la misma solución de lavado. Se deja a temperatura ambiente por 60 min.

Finalmente se lavan los cubreobjetos y se montan en portaobjetos usando medio de montaje fluorescente de Dako, luego de lo cual se deja secar al aire por 30 min, se sellan los bordes con esmalte y se visualiza la preparación en microscopio de epifluorescencia o confocal.

3.2.18 Microscopía de fluorescencia (epifluorescencia o confocal).

La observación de las células transfectadas con el vector pEGFP/PFK2FBPasa2 fue hecha a través de un microscopio de epifluorescencia, el cual excita las muestras a 488 nm.

De igual forma se realiza en un microscopio confocal, excitando a esta misma longitud de onda con un láser de argón.

3.2.19 Obtención de proteínas totales de células.

Las células fueron crecidas en placas Petri de 90 mm de diámetro.

Se realizaron distintos tratamientos en las líneas celulares, en las cuales se varió la concentración de glucosa en el medio de cultivo: glucosa 5 mM, glucosa 25 mM y sin glucosa.

Después de 24 y 48 de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X estéril. Para despegar las células, las placas fueron raspadas mediante el uso de espátula. Estos fueron resuspendidos en una solución de PBS/inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptin 10 ng/ml, trasyolol 2 ng/ml). Luego que las células fueron resuspendidas se sonicaron y centrifugaron a 6000 rpm por 20 min, a 4 °C. Al sobrenadante se le midió al concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976) (Kit Bio-Rad).

3.2.20 Transferencia Western

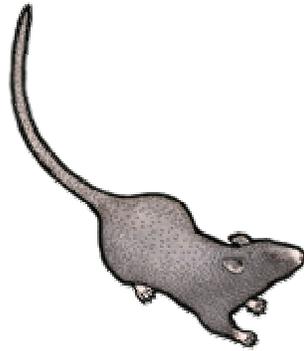
Primero se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes, usando las proteínas totales obtenidas de las células tratadas con distintas concentraciones de glucosa. En el gel se cargaron aproximadamente 40 µg de proteínas por carril. Luego el gel fue trasferido a papel de nitrocelulosa, mediante el sistema de transferencia de Bio-Rad (Trans-Blot SD) por 30 min a 20 V. Posteriormente la membrana es bloqueada usando una solución de PBS-Tween-Leche (Tween 20 0.3 % v/v, Leche descremada 5 % p/v en tampón PBS). A continuación se incubó con el primer anticuerpo (anti-FBPasa policlonal hecho en conejo) en título 1:500 durante 1 h con agitación constante. Transcurrido este tiempo la membrana de nitrocelulosa fue lavada con PBS-Tween-Leche y se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa) en título de 1:1000 por 1 h. Finalmente la marca fue observada mediante el revelado con la siguiente solución 0.15 % H₂O₂, DAB 0.5 mg/ml, Tween 20 0.3 % en PBS.

4. RESULTADOS

4.1 Diseño de partidores para PFKFBPasa2 de hígado de rata y purificación de RNA total de hígado.

Se diseñaron los oligonucleotidos específicos a partir de la secuencia de cDNA de esta enzima de la especie *Rattus Norvegicus*, obtenida en la base de datos “Gen Bank”, localizada en el sitio web “National Center for Biotechnology Information” (GI: 56884). El fragmento codificante para esta enzima, consta de 1801 pb. Para amplificar ésta región, los oligonucléotidos fueron diseñados desde el sitio de inicio de la traducción (171) en el extremo 5’ hasta el sitio de finalización, localizado en el nucleótido 1537 en el extremo 3’. Para liberar el fragmento codificante, los partidores fueron diseñados con los sitios de restricción: Hind III, y Nde I, en el extremo 5’ y Sal I y Bam HI, en el extremo 3’.

Para obtener el cDNA de hígado, se comenzó con la extracción del mRNA total de este órgano, mediante la técnica de RT-PCR (ver materiales y métodos 3.2.2 y **esquema 1**). La integridad del RNA purificado fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1,2 %/MOPS y teñido con bromuro de etidio. Como se muestra en al **figura 1**, las bandas del rRNA 18S y 28S se encuentran en una proporción adecuada, sin observar degradación.



Extracción de mRNA total de hígado por el método de Trizol



Preparación de cDNA de Hígado usando como templado el mRNA total purificado



PCR usando como templado el cDNA sintetizado

Esquema 1: Esquema del método de trabajo para la obtención del fragmento codificante de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa. El animal usado en este experimento corresponde a una rata macho adulto normal, de la especie *Rattus Norvegicus*.

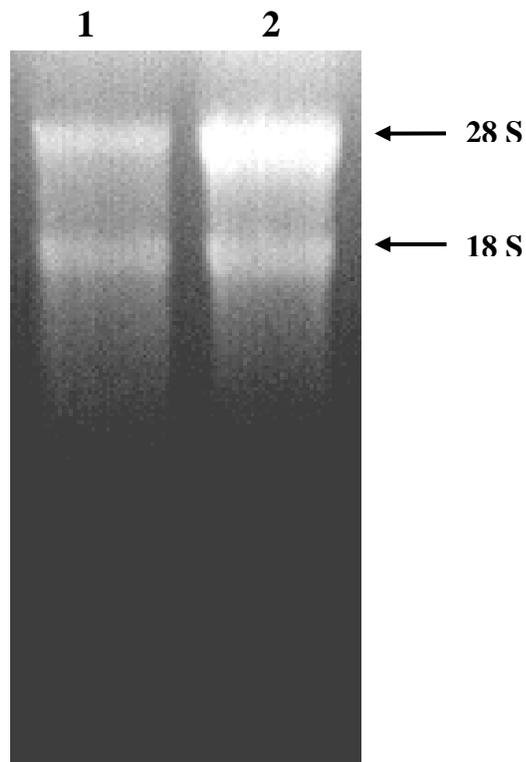
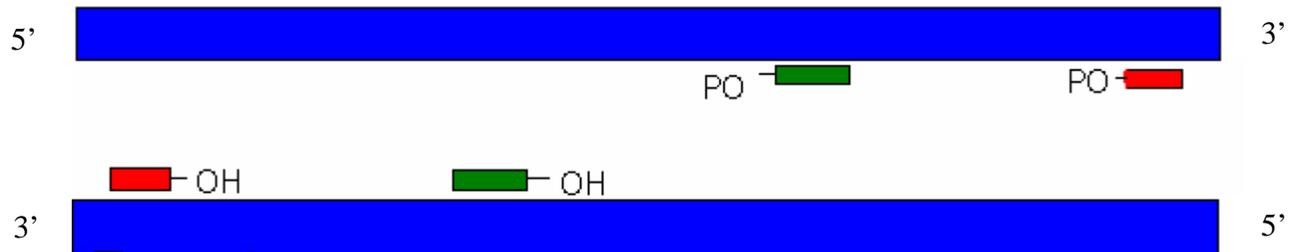


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído 1,2 % de la extracción de RNA total de hígado de rata por el método de Trizol. Las muestras de RNA (20 μ g) fueron corridas mediante electroforesis, en gel de agarosa 1,2 % en condiciones denaturantes, usando como tampón MOPS 1X, y posteriormente, teñidas con bromuro de etidio. El carril 1 y 2 corresponden a dos mRNA purificados desde hígado de rata.

4.2 Amplificación y clonamiento de la secuencia codificante para la isoforma hepática de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa.

La amplificación de la secuencia específica para la isoforma hepática de PFKFBPasa2, se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), usando los partidores descritos anteriormente (ver Materiales y Métodos 3.1.1 y **figura 2 panel A**) y la enzima *Pfu* polimerasa, ya que posee mayor procesividad que otras DNA polimerasas. El resultado de este experimento se muestra en la **figura 2, panel B**. La amplificación del fragmento esperado se confirmó por medio de electroforesis en gel de agarosa-TAE 1,2 %, (ver Materiales y Métodos 3.2.12) y el tamaño del fragmento obtenido en la reacción fue determinado mediante estándar de tamaño molecular de 1 Kb (carril 1). El tamaño del fragmento obtenido fue de 1500 pb aproximadamente (carril 2), lo cual corresponde a lo esperado para la isoforma hepática de la enzima en estudio. Este fragmento fue insertado en el vector pGEM-T-Easy mediante la digestión de ambos con las enzimas de restricción *HindIII* /*BamHI* y posteriormente, se ligó con la enzima T₄ DNA polimerasa (**ver esquema 2**). Luego se confirmó la presencia de la secuencia codificante para la enzima de interés, mediante PCR, utilizando partidores específicos para ésta; el resultado se muestra en la **figura 3**. Mediante estos resultados, podemos deducir que el vector pGEM-T-Easy fue clonado exitosamente con la secuencia codificante para la isoforma hepática de PFKFBPasa2.

A Partidores para 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa



B Amplificación

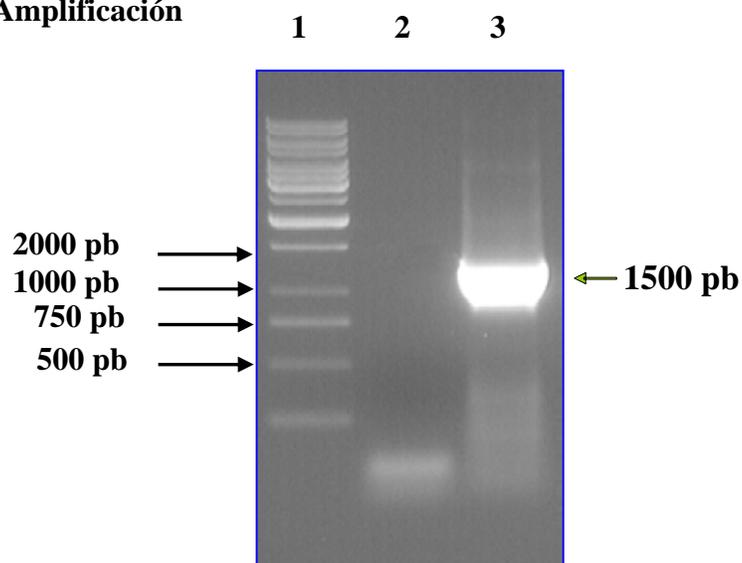
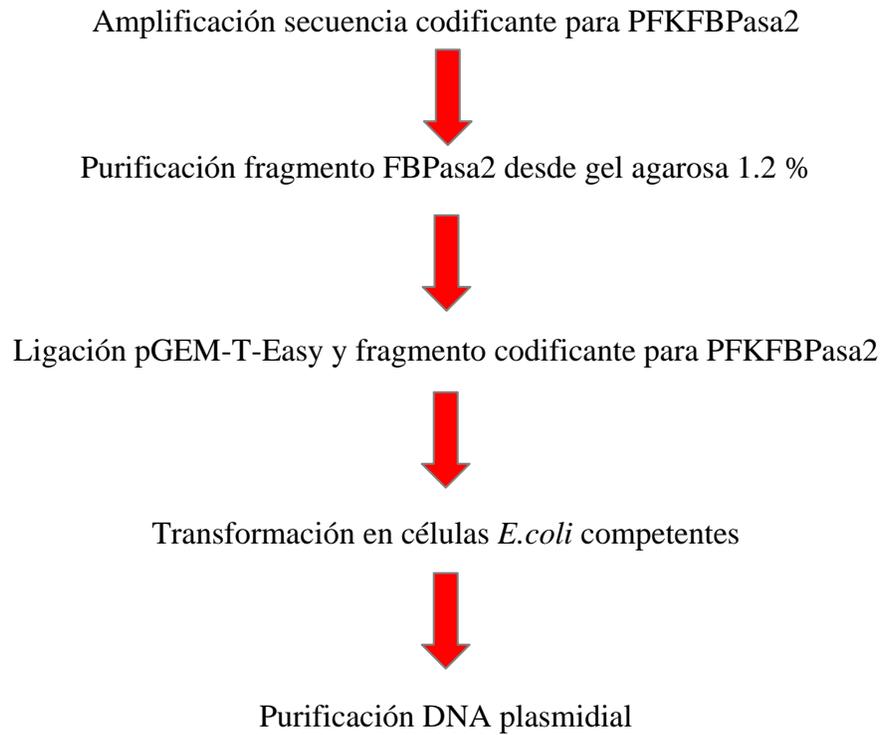


Figura 2: Amplificación por PCR de cDNA de hígado de rata.

A) Esquema de los partidores específicos para PFKFBPasa2 de hígado de rata, deducidos a partir de la secuencia de éste, publicado en Pubmed (gi:56884).

B) Fraccionamiento en gel de agarosa 1,2 % de los productos amplificados mediante PCR, usando como templado el cDNA generado a partir de RNA total de hígado de *Rattus norvegicus*, mediante el método de Trizol. Carril 1, estándar de tamaño molecular de DNA 1kb, carril 2, control negativo, carril 3 producto amplificado mediante PCR.



Esquema 2: Representación esquemática del procedimiento para obtener el plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2. Descripción de los pasos experimentales realizados para clonar la secuencia codificante para la isoforma hepática de PFKFBPasa2 en el vector pGEM-T-Easy

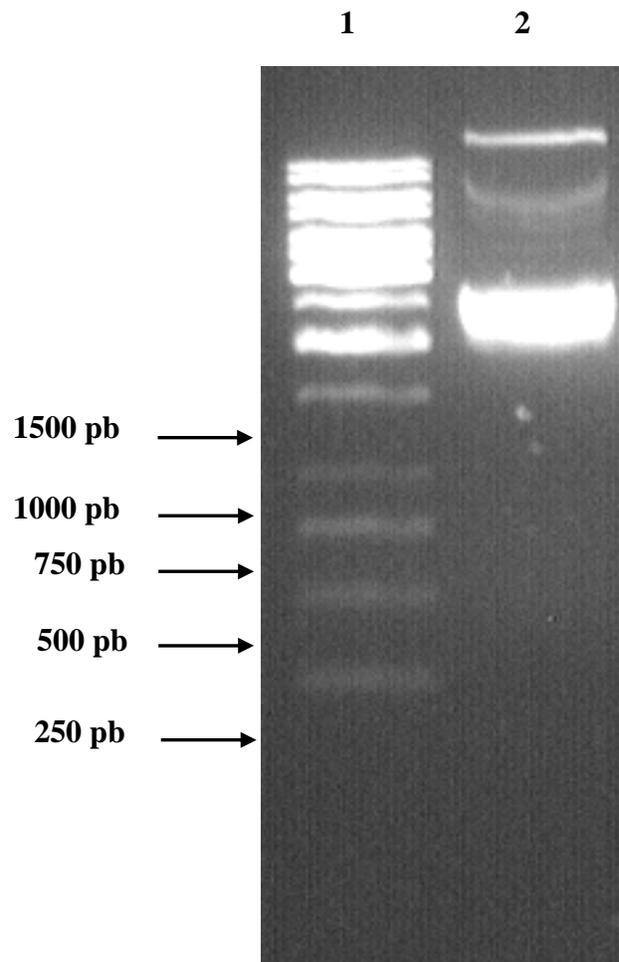


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa 1,2 % de la purificación del plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2 mediante kit comercial. Gel de Agarosa 1,2 % teñido con bromuro de etidio. El carril 1, corresponde a un estándar de tamaño molecular 1 kb, carril 2, plásmido pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2 purificado mediante kit comercial.

4.3 Análisis de restricción y representación del plasmidio clonado.

Para determinar la correcta inserción del fragmento codificante para la enzima PFKFBPasa2 en el vector pGEM-T-Easy, se determinó teóricamente los sitios de corte que existen en el vector, y en la secuencia, con esto, se logro crear un mapa de la inserción del plasmidio y además se corroboró la orientación correcta del fragmento insertado en el vector. El resultado de las digestiones realizadas se muestra en la **figura 4**. Se puede observar en el carril 3 la linearización del plasmidio y en el carril 6 la liberación de un fragmento de 1500 pb, lo cual corresponde a lo determinado teóricamente. Esto se puede observar en la **figura 5** muestra un esquema del plasmidio con el inserto de interés.

Luego de esto, el inserto fue subclonado en el vector pEGFPC1, para dar origen a la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2, la cual permitirá posteriormente conocer la localización subcelular de la enzima, mediante la excitación de la proteína fluorescente verde a 488 nm. Nuevamente se realizó el análisis de restricción al plasmidio clonado, obteniéndose la liberación de un fragmento de 1500 pb en la **figura 6**, carril 6, correspondiente a lo esperado y la linearización del plasmidio en el carril 3. En la **figura 7**, se muestra el mapa del vector pEGFP/PFKFBPasa2. Con el fin de verificar que la secuencia del fragmento clonado corresponde a la forma nativa de la isoforma hepática de PFKFBPasa2, este fue secuenciado utilizando dos pares de partidores (**figura 2A**). De esto se obtuvo como resultado una secuencia nucleotídica idéntica a la extraída de la base de datos Gen Bank, la cual se muestra en la **figura 9**, destacando en verde el sitio de inicio de la traducción y en rojo el sitio de término.

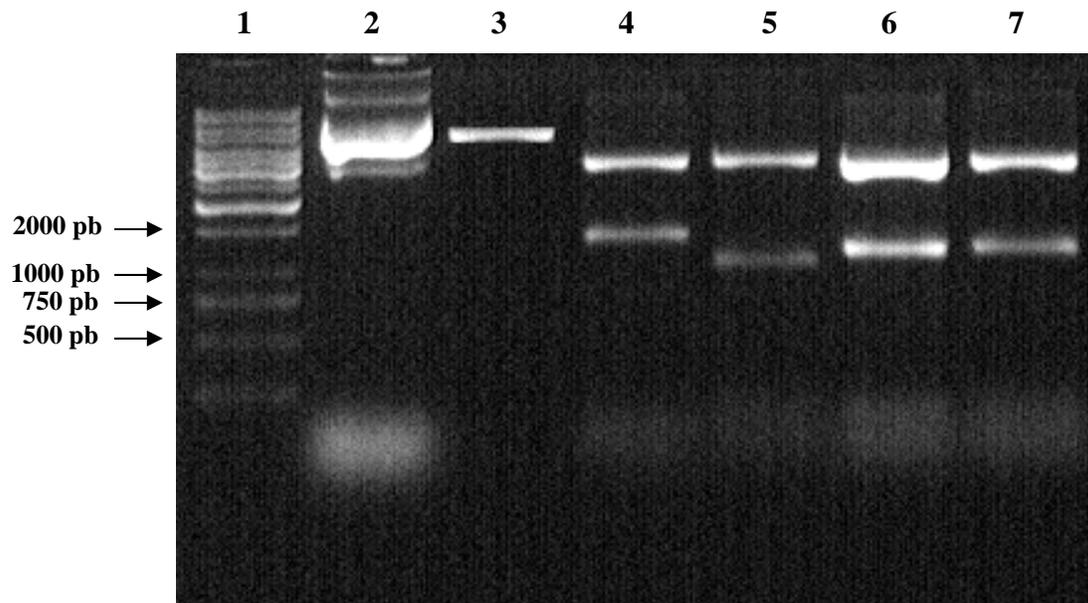


Figura 4: Análisis de restricción del plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2. El plásmidio fue purificado y posteriormente analizado mediante digestión con endonucleasas de restricción, para confirmar la presencia del inserto en el vector. Esto fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2%. Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 kb; carril 2, plasmidio sin digerir; carril 3, digestión con *Xho I*; carril 4, digestión con *Xho I/Nde I*; carril 5, digestión con *Pst I/Eco RI*; carril 6, digestión con *Eco RI/Nde I*; carril 7, digestión con *BamHI/Eco RI*.

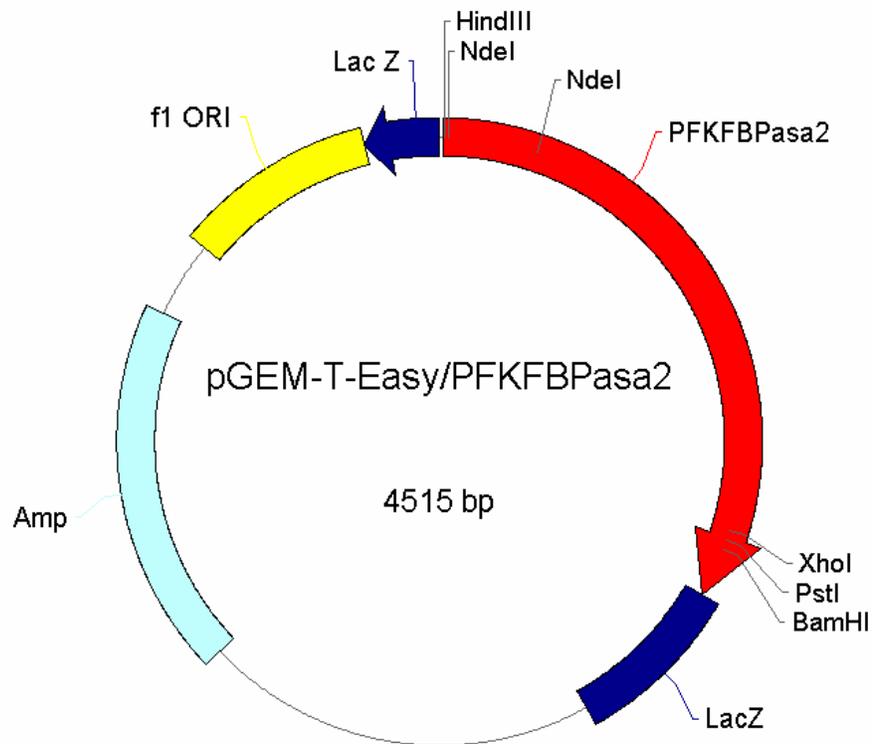


Figura 5: Representación esquemática del plasmidio pGEM-T-Easy/PFKFBPasa2.

Este esquema fue diseñado luego del análisis de restricción y nos indica la correcta inserción del fragmento codificante para la isoforma hepática de PFKFBPasa2.

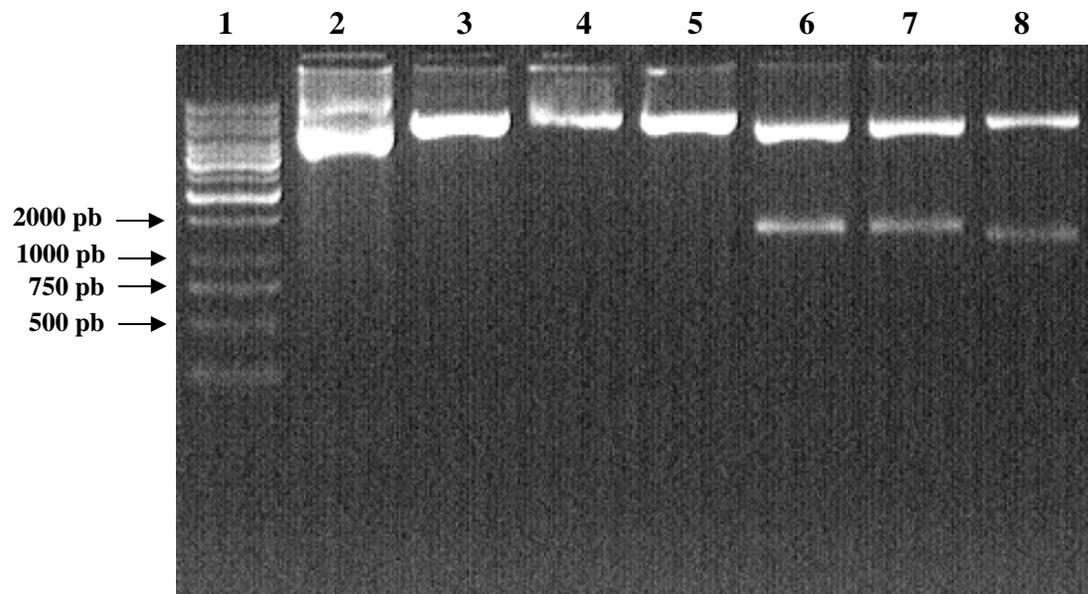


Figura 6: Análisis de restricción del plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2. Se purificó el vector pEGFP/PFKFBPasa2, y se realizó un análisis de restricción para confirmar la presencia del inserto. Esto fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2%. Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 kb; carril 2, DNA plasmidial sin digerir; carril 3, digestión con la enzima *Bam HI*; carril 4, digestión con la enzima *Hindi*; carril 5 enzimas *EcoRI*; carril 6 enzimas *HindIII/BamHI*; carril 7 enzimas *HindIII/Sall* y carril 8 enzimas *HindIII/PstI*.

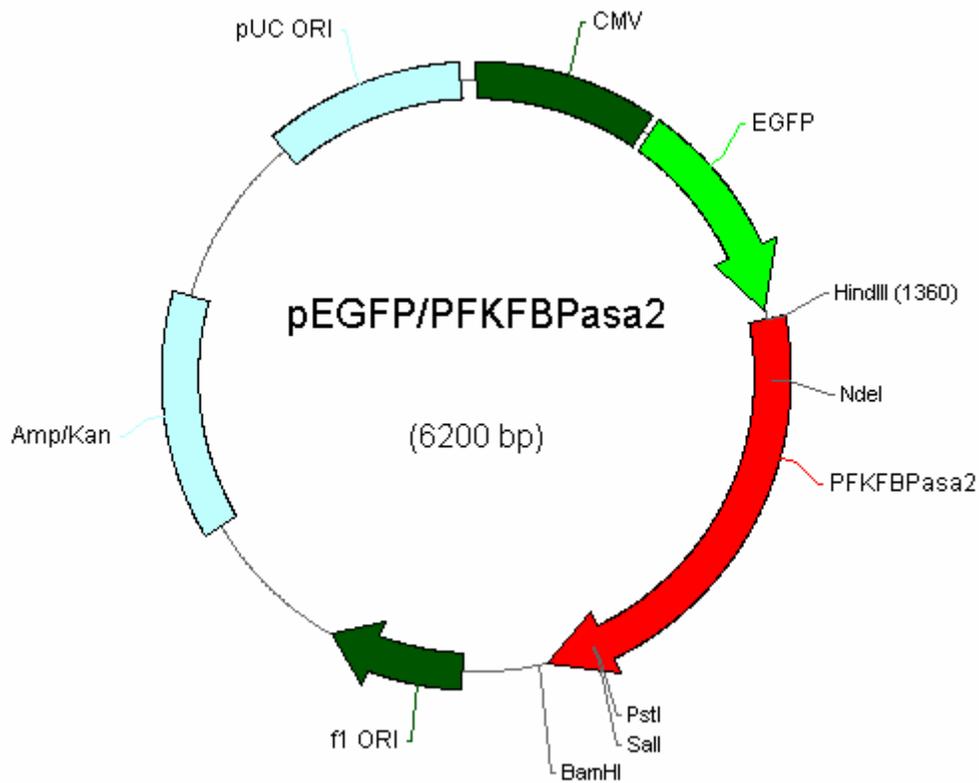


Figura 7: Representación del plasmidio pEGFP/PFK2FBPasa2. El esquema muestra la localización de la secuencia codificante para la isoforma hepática de PFKFBPasa2. Luego de la traducción se generara la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2.

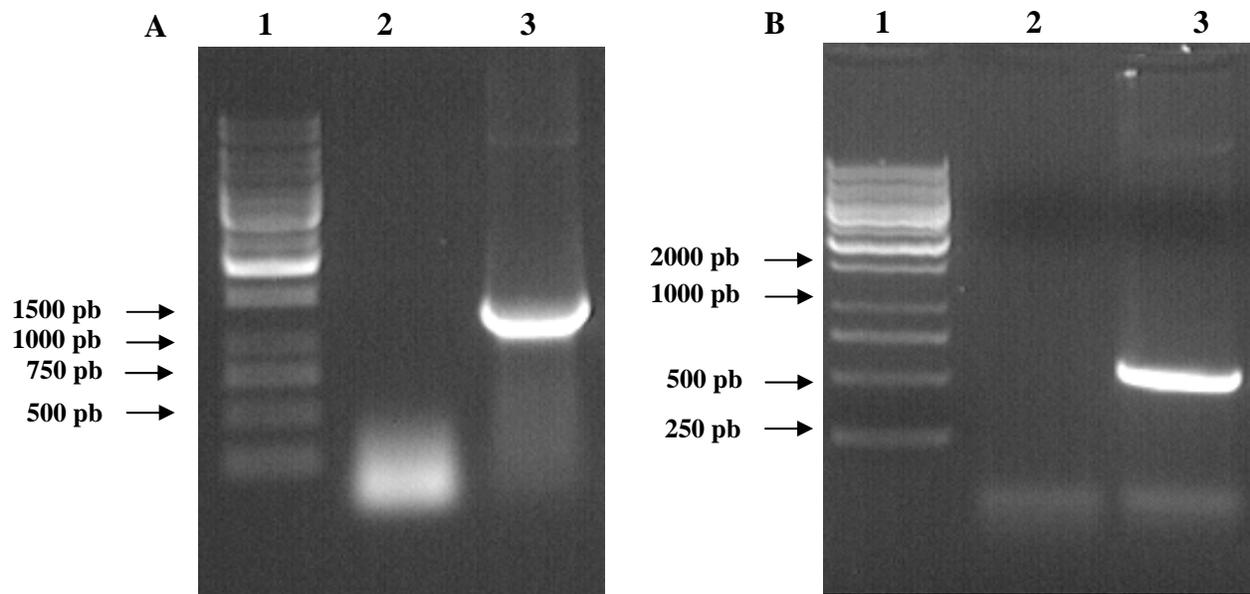


Figura 8: Análisis por PCR del plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2. En la figura A se muestra el producto amplificado mediante PCR (1500 pb), usando partidores específicos para la isoforma hepática de la enzima bifuncional. Se utilizó como templado el plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2. En la Figura B, se puede observar el producto de PCR sobre el mismo plasmidio, pero usando partidores específicos para una secuencia interna de 600 pb, la que fue utilizada para secuenciar el fragmento codificante para la isoforma hepática de PFKFBPasa2.

PFKFBPasa2_WT ATGTCTCGAGAGATGGGAGAACTCACTCAAACCAGGTTACAGAAGATCTGGATTCCACAC 60
 Clonada ATGTCTCGAGAGATGGGAGAACTCACTCAAACCAGGTTACAGAAGATCTGGATTCCACAC 60

PFKFBPasa2_WT AGCAGCAGTAGCAGCGTGTGCAACGGCGAAGGGGCTCCTCCATACCACAGTTCACATAAT 120
 Clonada AGCAGCAGTAGCAGCGTGTGCAACGGCGAAGGGGCTCCTCCATACCACAGTTCACATAAT 120

PFKFBPasa2_WT TCTCCCACGATGGTGATCATGGTGGGTTTACCAGCTCGAGGCAAGACCTACATCTCTACG 180
 Clonada TCTCCCACGATGGTGATCATGGTGGGTTTACCAGCTCGAGGCAAGACCTACATCTCTACG 180

PFKFBPasa2_WT AAGCTCACACGCTATCTCAACTGGATAGGAACACCAACTAAAGTGTTAATTTAGGTCAG 240
 Clonada AAGCTCACACGCTATCTCAACTGGATAGGAACACCAACTAAAGTGTTAATTTAGGTCAG 240

PFKFBPasa2_WT TATCGACGAGAGGCAGTGAGTTACAGGAACCTATGAATTCCTTCGCCAGACAACACAGAG 300
 Clonada TATCGACGAGAGGCAGTGAGTTACAGGAACCTATGAATTCCTTCGCCAGACAACACAGAG 300

PFKFBPasa2_WT GCCCAGCTTATCAGGAAGCAGTGTGCTCTAGCAGCCCTAAAGGATGTCCATAAGTATCTC 360
 Clonada GCCCAGCTTATCAGGAAGCAGTGTGCTCTAGCAGCCCTAAAGGATGTCCATAAGTATCTC 360

PFKFBPasa2_WT AGCCGCGAGGAAGGTCATGTTGCGGTTTTTGATGCCACCAACACTACCAGAGAACGACGA 420
 Clonada AGCCGCGAGGAAGGTCATGTTGCGGTTTTTGATGCCACCAACACTACCAGAGAACGACGA 420

PFKFBPasa2_WT TCGTTGATTCTACAGTTTGCTAAGGAACATGGTTATAAGGTCTTCTTTATTGAGTCTATT 480
 Clonada TCGTTGATTCTACAGTTTGCTAAGGAACATGGTTATAAGGTCTTCTTTATTGAGTCTATT 480

PFKFBPasa2_WT TGTAATGACCCGAAATCATTCAGAAAACATCAAGCAAGTGAACTTGGTAGTCTCTGAT 540
 Clonada TGTAATGACCCGAAATCATTCAGAAAACATCAAGCAAGTGAACTTGGTAGTCTCTGAT 540

PFKFBPasa2_WT TACATAGACTGTGACCAAGAAAAGGTTTTGGAAGACTTTCTAAAGAGAATAGAGTGCTAT 600
 Clonada TACATAGACTGTGACCAAGAAAAGGTTTTGGAAGACTTTCTAAAGAGAATAGAGTGCTAT 600

PFKFBPasa2_WT GAGATCAACTACCAACCTTTGGATGAGGAATTGGACAGCCACCTGTCTACATCAAGATC 660
 Clonada GAGATCAACTACCAACCTTTGGATGAGGAATTGGACAGCCACCTGTCTACATCAAGATC 660

PFKFBPasa2_WT TTCGACGTGGGCACACGCTACATGGTAAATCGAGTGCAGGACCACGTTCCAGAGCCGTACA 720
 Clonada TTCGACGTGGGCACACGCTACATGGTAAATCGAGTGCAGGACCACGTTCCAGAGCCGTACA 720

PFKFBPasa2_WT GCCTACTACCTCATGAACATCCATGTACACCTCGATCTATCTACCTATGCCGCCATGGT 780
 Clonada GCCTACTACCTCATGAACATCCATGTACACCTCGATCTATCTACCTATGCCGCCATGGT 780

PFKFBPasa2_WT GAGAGTGAACCTCAACCTTAGAGGCCGATGGAGGTGACTCTGGCCTCTCAGCTCGGGGC 840
 Clonada GAGAGTGAACCTCAACCTTAGAGGCCGATGGAGGTGACTCTGGCCTCTCAGCTCGGGGC 840

PFKFBPasa2_WT AAGCAGTATGCCTATGCACCTAGCCAACTTCATCCGGTCTCAAGGCATCAGCTCCCTGAAA 900
 Clonada AAGCAGTATGCCTATGCACCTAGCCAACTTCATCCGGTCTCAAGGCATCAGCTCCCTGAAA 900

PFKFBPasa2_WT GTATGGACTAGCCACATGAAGAGGACCATTTCAGACCGCTGAAGCCCTAGGTGTCCCTTAT 960
 Clonada GTATGGACTAGCCACATGAAGAGGACCATTTCAGACCGCTGAAGCCCTAGGTGTCCCTTAT 960

PFKFBPasa2_WT GAACAGTGAAGGCCCTGAATGAGATTGATGCGGGTGTCTGTGAAGAGATGACCTATGAA 1020
 Clonada GAACAGTGAAGGCCCTGAATGAGATTGATGCGGGTGTCTGTGAAGAGATGACCTATGAA 1020

PFKFBPasa2_WT GAAATTCAGGAACACTACCCTGAGGAATTTGCACTACGGGACCAGGATAAATATCGTTAC 1080
 Clonada GAAATTCAGGAACACTACCCTGAGGAATTTGCACTACGGGACCAGGATAAATATCGTTAC 1080

```

PFKFBPasa2_WT      CGCTATCCCAAGGGAGAGTCCTATGAGGATCTGGTTCAGCGTCTTGAACCAGTTATAATG 1140
Clonada            CGCTATCCCAAGGGAGAGTCCTATGAGGATCTGGTTCAGCGTCTTGAACCAGTTATAATG 1140
*****

PFKFBPasa2_WT      GAGCTAGAACGGCAAGAAAATGTACTGGTGATCTGTCACCAGGCTGTCATGCGGTGCCTC 1200
Clonada            GAGCTAGAACGGCAAGAAAATGTACTGGTGATCTGTCACCAGGCTGTCATGCGGTGCCTC 1200
*****

PFKFBPasa2_WT      CTGGCATACTTCTGGATAAAAAGTTCAGATGAGCTGCCCTATCTCAAGTGTCTCTGCAT 1260
Clonada            CTGGCATACTTCTGGATAAAAAGTTCAGATGAGCTGCCCTATCTCAAGTGTCTCTGCAT 1260
*****

PFKFBPasa2_WT      ACTGTGCTCAAACCTCACACCTGTGGCTTATGGCTGCAGAGTGGAGTCCATCTACCTGAAT 1320
Clonada            ACTGTGCTCAAACCTCACACCTGTGGCTTATGGCTGCAGAGTGGAGTCCATCTACCTGAAT 1320
*****

PFKFBPasa2_WT      GTGGAGGCTGTGAACACACACCGGGACAAGCCTGAGAATGTGGACATCACCCGTGAAGCT 1380
Clonada            GTGGAGGCTGTGAACACACACCGGGACAAGCCTGAGAATGTGGACATCACCCGTGAAGCT 1380
*****

PFKFBPasa2_WT      GAGGAAGCCTTGGACACTGTACCTGCCATTACTGA 1416
Clonada            GAGGAAGCCTTGGACACTGTACCTGCCATTACTGA 1416
*****

```

Figura 9: Análisis por secuenciación del fragmento clonado en el vector pEGFP/PFKFBPasa2. Mediante secuenciación, fue corroborado que el fragmento inserto en el vector corresponde a la isoforma hepática silvestre de la enzima bifuncional. La figura muestra un alineamiento de la secuencia de la isoforma hepática de rata para PFKFBPasa2, conseguida de Gen Bank g.i: 56884, con la obtenida por secuenciación. En verde se ve el sitio de inicio de la traducción y en rojo el codon de término.

4.4 Localización Mediante PCR de las Enzimas Fructosa-1,6-bisfosfatasa y 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa en Distintas Líneas celulares.

Para conocer las líneas celulares en las cuales se expresan PFKFBPasa2 y FBPasa, se extrajo RNA total mediante el método de Trizol, al cual se le determinó la concentración mediante absorciometría. La integridad del RNA total purificado fue determinada a través de una electroforesis en condiciones denaturantes en gel de agarosa/formaldehído al 1,2 % y teñido con bromuro de etidio (BrEt). Como se muestra en la **figura 10**, las bandas del rRNA 18S y 28S se encuentran en una proporción adecuada y no se observa degradación. Utilizando como templado el RNA extraído y mediante RT-PCR, se obtuvo cDNA, el cual fue utilizado en la reacción de PCR usando partidores específicos para la isoforma hepática de PFKFBPasa2. Los productos de la reacción fueron observados mediante electroforesis. Como se muestra en la **figura 11, panel A**, la amplificación de un fragmento de 1500 pb fue vista en todas las líneas celulares, tanto renales como hepáticas. Como control se realizó un PCR usando partidores específicos para β -actina, esto se observa en la **figura 11, panel B**. Además, se realizaron PCR usando partidores específicos para la isoforma hepática de FBPasa de rata y humano; el resultado se observa en la **figura 12, panel A**. Esta no dió positivo en la línea celular renal LLCPK1. El control con β -actina se observa en el **panel B** de la misma figura.

Paralelamente se realizaron ensayos de western blot, para determinar en que líneas celulares se encontraba cada una de las enzimas. PFKFBPasa2 se encuentra en todas las líneas estudiadas (**figura 13**), a diferencia de FBPasa que fue encontrada en todas las líneas a excepción de LLCPK1 (**figura 14**).

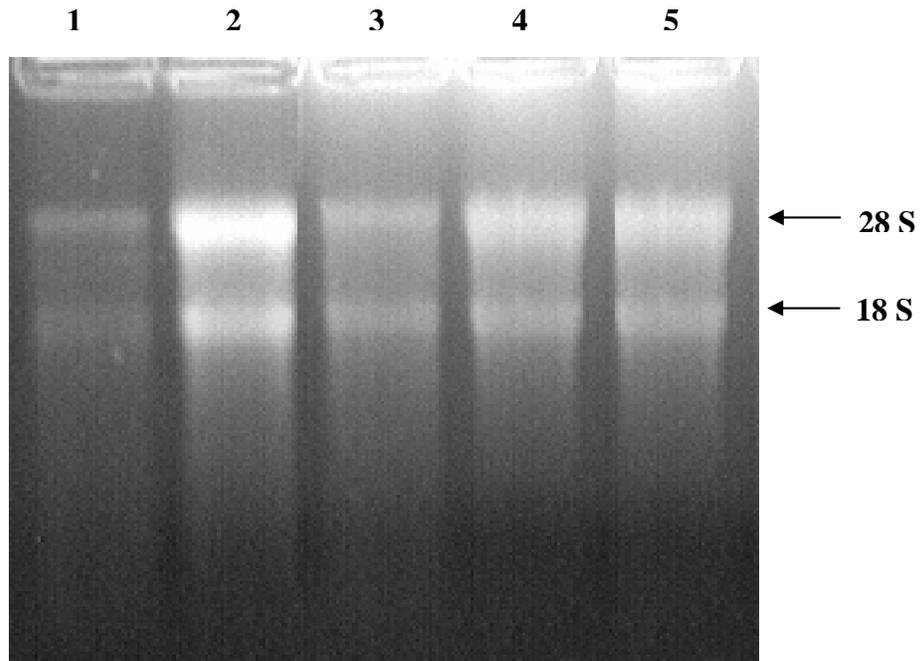


Figura 10: Análisis mediante electroforesis del RNA extraído desde distintas líneas celulares, mediante el método de Trizol. Las muestras de RNA (20 μ g) fueron corridas mediante electroforesis, en gel de agarosa al 1,2 % en condiciones denaturantes, usando como tampón, MOPS y teñidas con bromuro de etidio. La figura muestra los RNA total de las siguientes líneas celulares: carril 1, FTO2b; carril 2, HepG2; carril 3, EBNA; carril 4, LLCPK1; carril 5, HeLa.

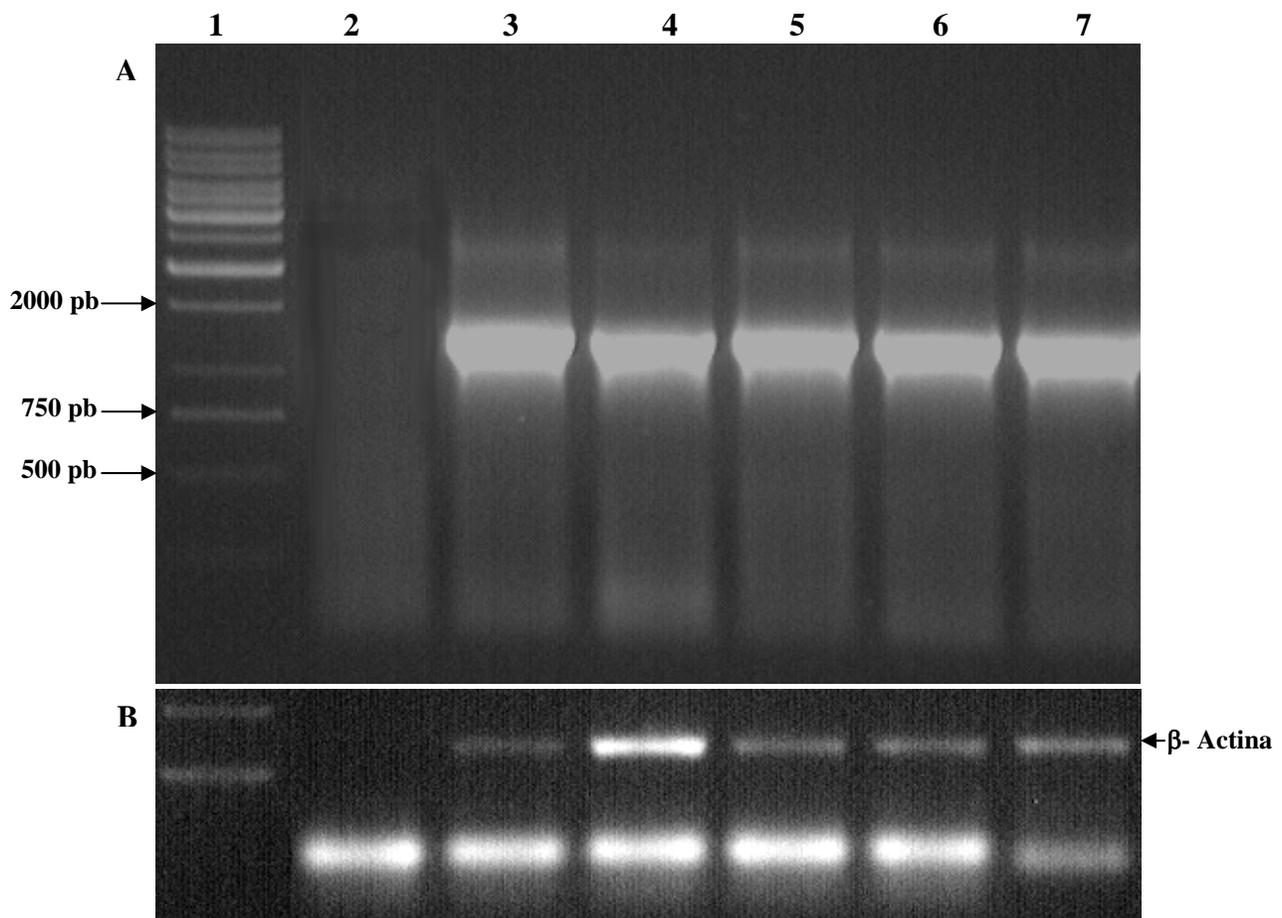


Figura 11: Análisis por PCR con partidores para PFKFBPasa2, usando como templado cDNA de distintas líneas celulares. La figura superior corresponde a la amplificación de la secuencia codificante para la isoforma hepática de la enzima PFKFBPasa2. En el panel A, el carril, 1 muestra el estándar DNA 1Kb; carril 2, control negativo; carril 3, Fto2b; carril, 4 HepG2; carril 5, EBNA; carril 6, LLCPK1 y carril 7, HeLa. El panel B, corresponde al control de los cDNA, usando PCR con partidores específicos para β -actina. Se puede observar que hubo amplificación de los cinco cDNA.

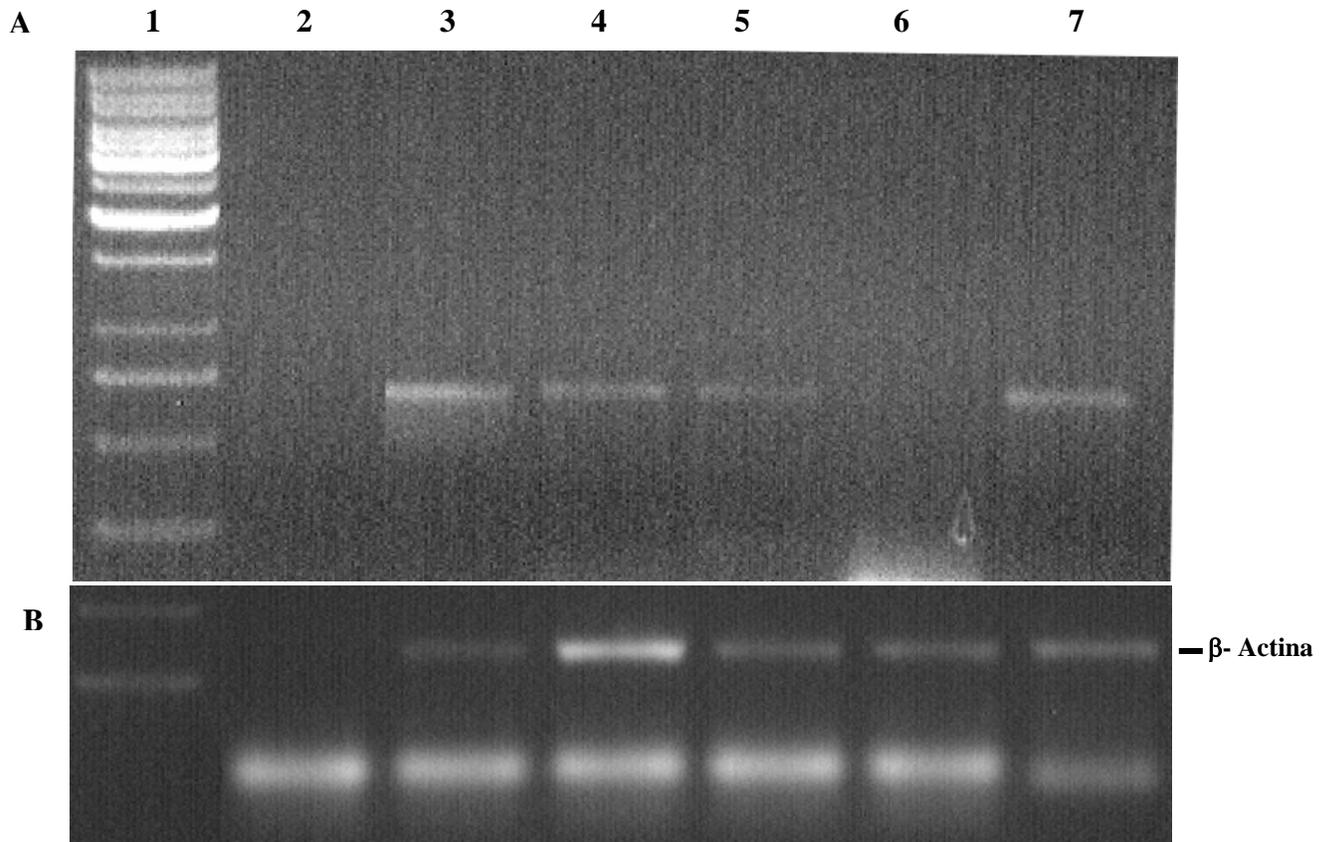


Figura 12: Análisis por PCR con partidores para fructosa-1,6-bifosfatasa de riñón de cerdo, usando como templado cDNA de distintas líneas celulares. El panel A, corresponde a la amplificación de la isoforma de riñón de cerdo de FBPasa. En el carril 1 fue cargado el estándar DNA 1Kb; carril 2, control negativo; carril 3, Fto2b; carril 4, HepG2; carril 5, EBNA; carril 6, LLCPK1 y carril 7 HeLa. El panel B, corresponde al control de los cDNA, usando PCR con partidores de β -actina.

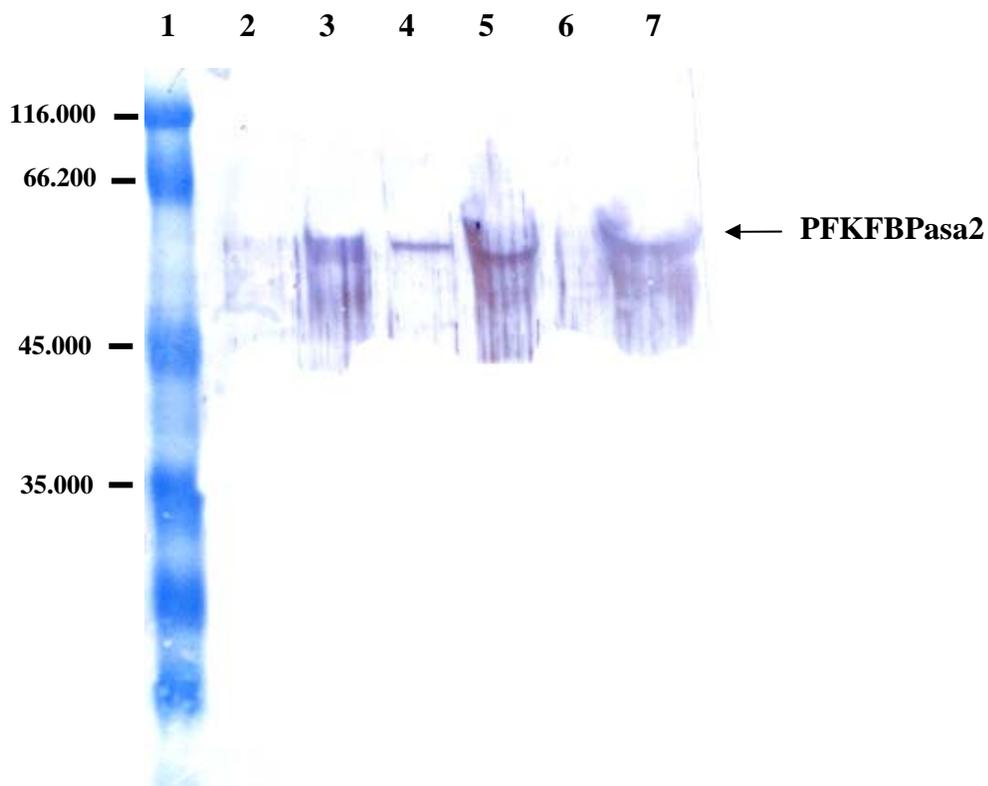


Figura 13: Análisis por Western Blot de extractos de proteínas totales de diferentes líneas celulares, usando anticuerpo contra PFKFBPasa2. El ensayo fue realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando un anticuerpo primario preparado en conejo contra la PFKFBPasa2 de hígado de rata preparados en nuestro laboratorio. En el gel fueron cargados 20 μ g de cada extracto de proteínas totales de cada línea celular. En el carril 1 fueron cargados 7 μ l de estándar de proteínas preteñido de rango amplio, carril 2 extracto de hígado de rata, carril 3, Fto2b; carril 4, HepG2; carril 5, EBNA; carril 6, LLCPK1 y carril 7, HeLa. Se observa inmunodetección en todas las líneas celulares en estudio.

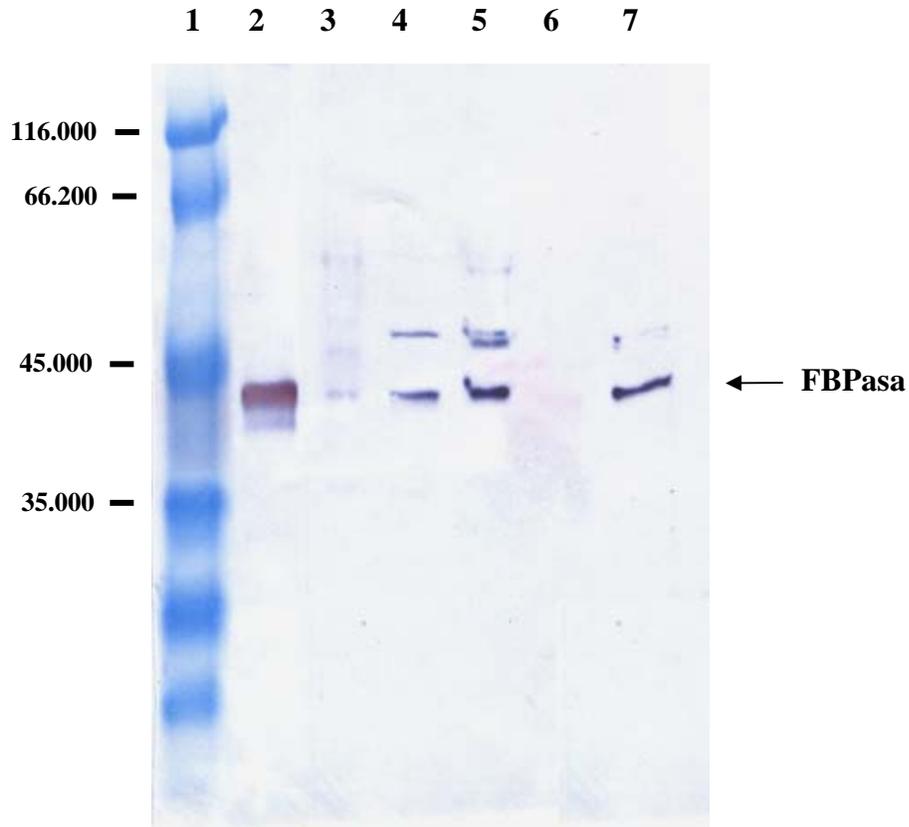


Figura 14: Análisis por Western Blot de extractos de proteínas totales de diferentes líneas celulares, usando anticuerpo contra la isoforma hepática de FBPasa. El ensayo fue realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando un anticuerpo primario preparado en conejo contra la isoforma hepática de FBPasa. En el gel fueron cargados 20 μ g de cada extracto de proteínas totales de cada línea celular. En el carril 1 fueron cargados 7 μ l de estándar de proteínas preteñido de rango amplio, carril 2 extracto de hígado de rata; carriles 3, FTO2b; carril 4, HepG2; carril 5, EBNA; carril 6, LLCPC1 y carril 7, HeLa. Sólo LLCPC1 no dio positiva para la reacción.

4.5 Transfección del vector pEGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular hepática FTO2b.

El vector clonado posee un inserto de 1500 pb aproximadamente, el cual corresponde a la isoforma hepática de la enzima PFKFBPasa2, de la cual se ha hecho mención anteriormente (ver Introducción). Debido a que esta isoforma se expresa ampliamente en hígado, primera línea en estudio fue FTO2b, la que corresponde a una línea altamente diferenciada de hepatoma de rata.

En los experimentos de transfección, se ingresa el vector clonado a la célula, a través de una cubierta de lípidos catiónicos, los cuales permiten al DNA plasmidial, ingresar al núcleo celular y ser transcrito utilizando la maquinaria celular. El tiempo esperado para la síntesis de la proteína, luego de ser transfectada, fue de 12 horas. Luego de este tiempo, los medios fueron cambiados, utilizando distintas concentraciones de glucosa (0, 5 y 25 mM). Posteriormente, con la ayuda de microscopía de epifluorescencia o confocal, se pudo visualizar la fluorescencia emitida por el GFP unido a la enzima.

Como se observa en las **figuras 15**, la localización subcelular de la enzima varió de acuerdo a la presencia o ausencia de glucosa. Se debe considerar, que todas las condiciones mostradas, variaron desde la localización observada en 5 mM glucosa (**figura 15B**). En la **figura 15A**, se observa que en ausencia de glucosa la localización de la enzima es casi en su totalidad citoplasmática. Por el contrario, en la **figura 15B** la fluorescencia es homogénea en el citoplasma y el núcleo. Si la concentración de glucosa intracelular es de 25 mM, la fluorescencia disminuye en el núcleo (**figura 15C**). Se puede descartar que lo observado es debido a la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente, ya que como se observa en la **figura 15D**, esta se localiza en toda la célula, con mayor intensidad en el núcleo, condición que se repite en todas las condiciones estudiadas.

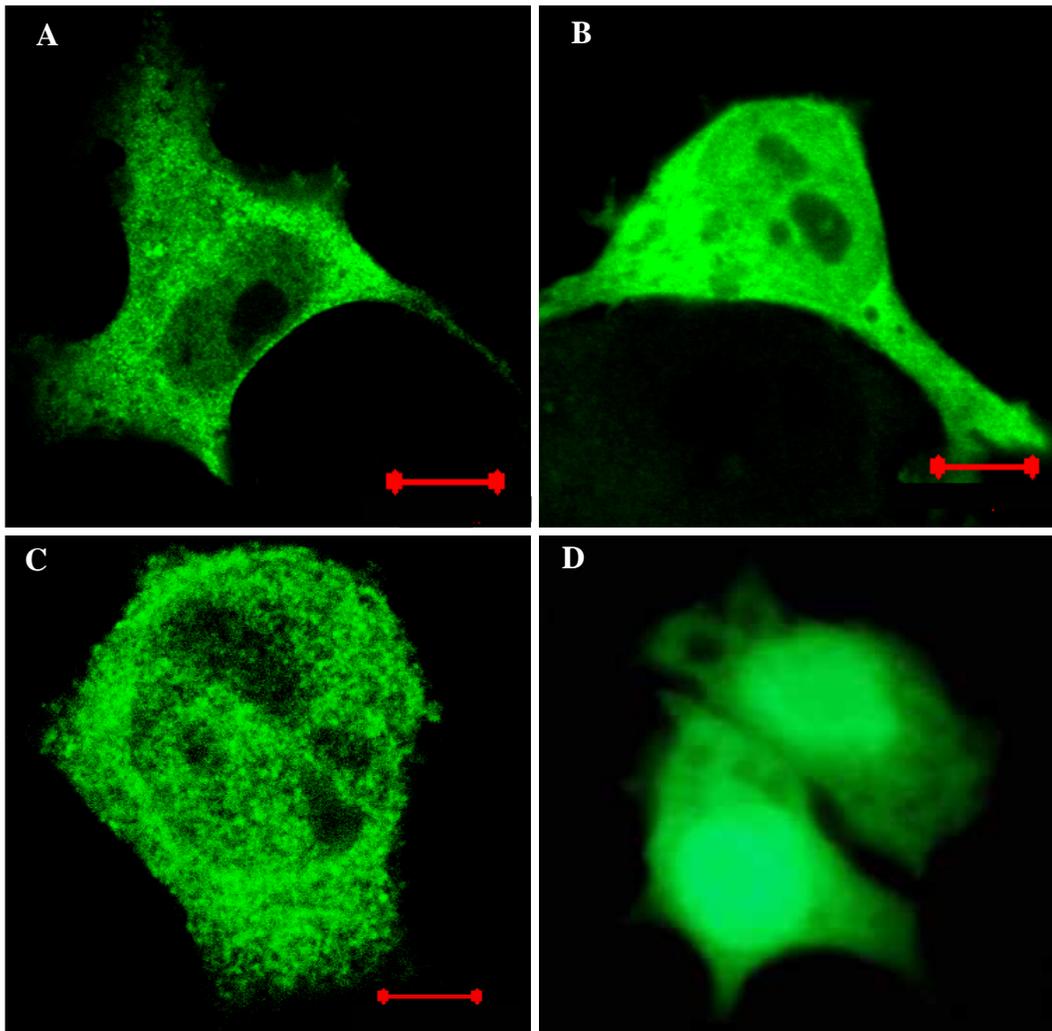


Figura 15: Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en células de hepatoma de rata FTO2b crecidas en distintas condiciones de glucosa. Esta línea fue transfectada con el plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2. Las células fueron crecidas en: (A) ausencia de glucosa durante 12 h, (B) glucosa 5 mM, (C) glucosa 25 mM y (D) control con pEGFP-C1. Podemos observar que la localización de la proteína de fusión es nuclear o citoplasma dependiendo de la concentración de glucosa utilizada. Las figuras corresponden al plano medio de una serie confocal. La barra corresponde a 10 μ m.

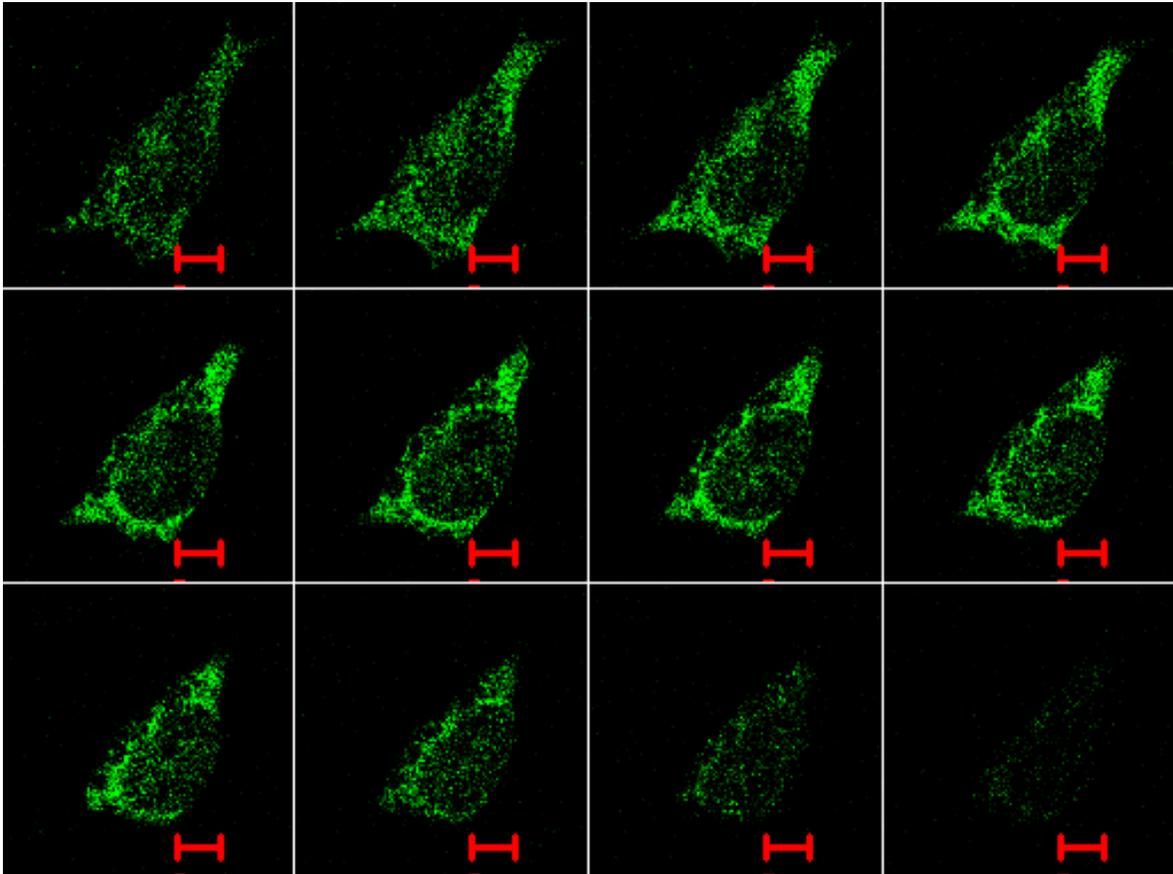


Figura 16: Serie confocal de la localización de la proteína de fusión **EGFP/PFKFBPasa2** en la línea celular hepática **FTO2b**. La figura muestra la transfección de las células con el plasmidio mencionado y, posteriormente, mantenidas 12h en ausencia de glucosa. Se puede observar que la locación de la fluorescencia se encuentra prácticamente ausente en el núcleo. Se muestran nueve cortes confocales de 1 μ m. La barra corresponde a 10 μ m.

4.6 Transfección del plasmidio EGFP/PFKFBP2 en la línea celular HepG2, correspondiente a hepatoma humano. Se realizaron transfecciones pasajeras en esta línea celular, ya que en el análisis por western blot realizado esta dio positiva para la enzima PFKFBPasa2.

Fue realizada la transfección y 12 horas después los medios fueron cambiados, variando las concentraciones de glucosa (0, 5 y 25 mM), lo que nos permitirá determinar los cambios en la localización de la enzima bifuncional provocados por la variación de este azúcar en el medio. Como podemos observar en la **figura 17A**, la localización de la proteína de fusión en ausencia de glucosa, es principalmente citoplasmática, pero con marca nuclear. Por el contrario, al mantener las células en presencia de glucosa 5 mM, la localización de la enzima cambia drásticamente, abandonando por completo el núcleo (ver **figura 17B**). Si esto lo comparamos con la localización de PFKFBPasa2 en exceso de glucosa (25 mM), se ve que nuevamente la enzima ingresa al núcleo, aún cuando la fluorescencia sigue siendo más intensa en el citoplasma (**figura 17C**).

Es importante considerar que inicialmente las células fueron transfectadas en medio con glucosa 5 mM, lo cual indica que la localización de la enzima bifuncional dentro de esta línea celular, en esta condición de glucosa es completamente citoplasmática.

Para descartar que los cambios en la localización de PFKFBPasa2 este provocado por la fusión con la proteína verde fluorescente, se realizó el mismo tratamiento en células transfectadas con el vector sin el inserto. Como podemos observar en la **figura 17D**, la localización de la proteína verde fluorescente dentro HepG2 es homogénea, con un leve aumento en el núcleo. Esta imagen se pudo observar en las tres condiciones de glucosa descritas anteriormente.

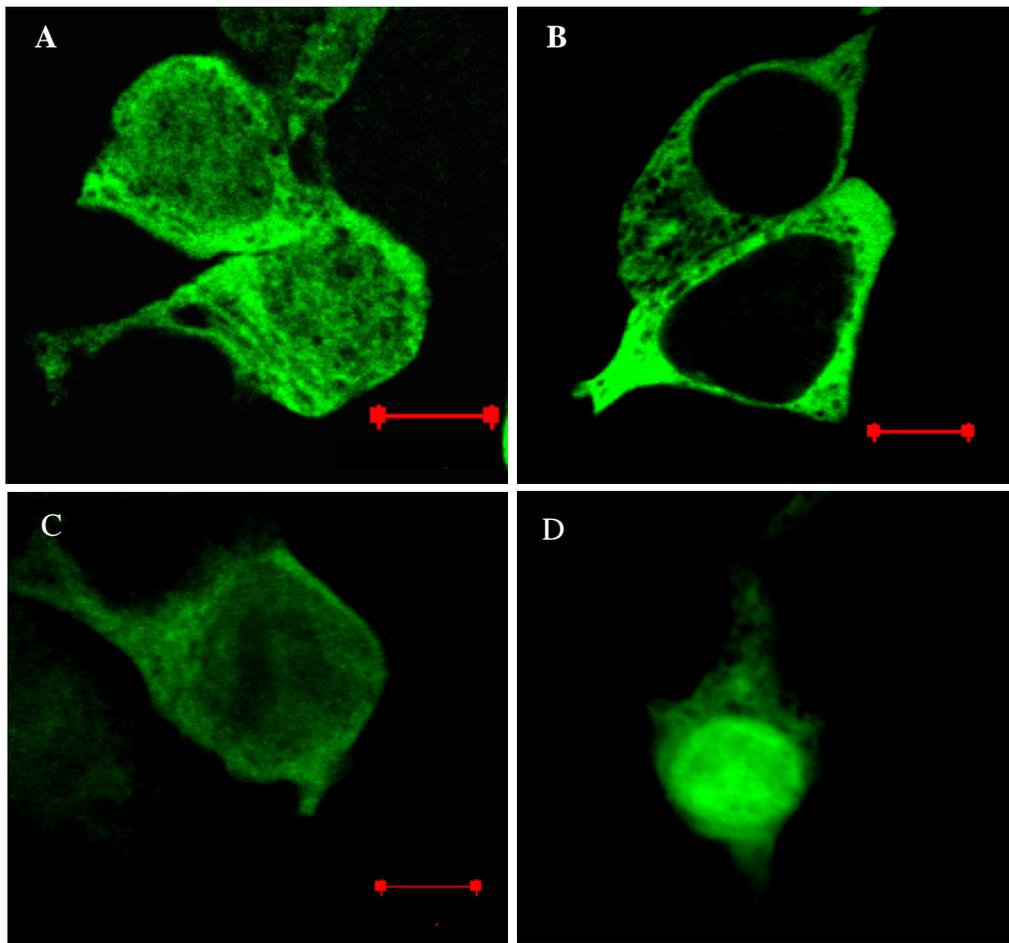


Figura 17: Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular de hepatoma humano HepG2, crecidas en distintas concentraciones de glucosa. Se puede observar que la localización de la proteína de fusión en esta línea celular, mantenida en medio suplementado con suero fetal bovino y distintas concentraciones de glucosa (A: sin glucosa, B: glucosa 5 mM, C: glucosa 25 mM y D: Control con pEGFP-C1), fue en todos los casos citoplasmática o nuclear dependiendo de las concentraciones de glucosa. La imagen corresponde al plano medio de una serie confocal. La barra corresponde a 10 μm .

4.7 Transfección del vector pEGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular renal EBNA.

La línea EBNA de riñón embrionario humano, fue utilizada para conocer la localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2, ya que no se ha descrito la existencia de una isoforma específica para este órgano, por lo cual podemos pensar en la posibilidad de que aquí se exprese la isoforma hepática de la enzima bifuncional.

Los experimentos fueron realizados en iguales condiciones a las descritas anteriormente.

Como podemos observar en la **figura 18A** la localización de la proteína de fusión, en ausencia de glucosa, es homogénea tanto en el núcleo como en el citoplasma. En oposición a esto, cuando el medio fue cambiado a uno con 5 mM glucosa y la célula fue mantenida 12h en estas condiciones (ver **figura 18B**), se pudo observar que la enzima bifuncional abandona por completo el núcleo, translocándose al citoplasma de la célula.

Al analizar la **figura 18C**, podemos observar que la proteína de fusión vuelve a ingresar al núcleo, aún cuando, en muy baja intensidad, cuando estas células son crecidas en presencia de alta concentración de glucosa (25 mM). Es importante mencionar que la condición inicial (tiempo cero), corresponde a 5 mM glucosa, en donde la enzima muestra una localización prácticamente citoplasmática. Para corroborar que la movilidad de la fluorescencia no sea producto de la proteína verde fluorescente, se realizó una transfección con el vector pEGFP-C1 y se aplicó igual tratamiento que las células que poseían el vector con la proteína de fusión PFKFBPasa2. En la **figura 18D**, se puede ver que la fluorescencia se localiza en toda la célula, con mayor intensidad en el núcleo. Este resultado fue visto en las tres condiciones de glucosa.

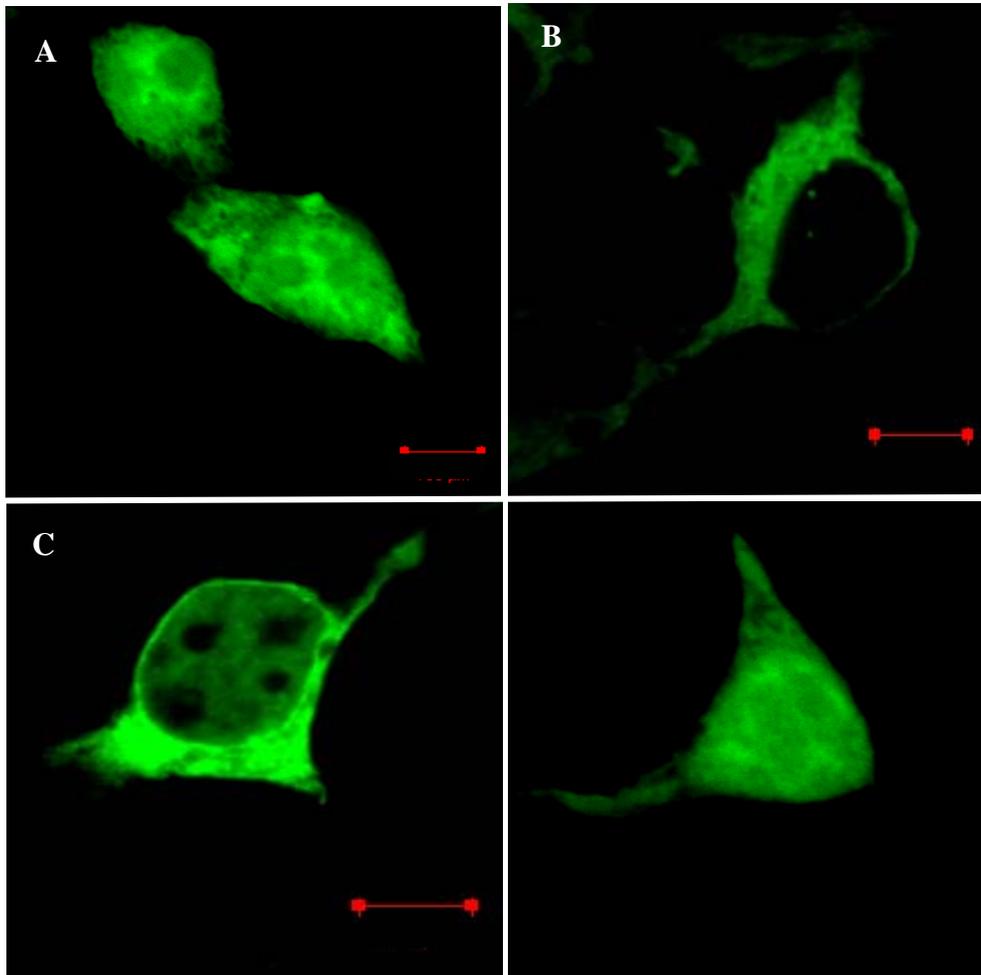


Figura 18: Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en la línea celular renal EBNA en distintas concentraciones de glucosa. 12 horas después de la transfección, el medio fue cambiado a DMEM con distintas concentraciones de glucosa (A: sin glucosa, B: glucosa 5 mM, C: glucosa 25 mM y D: Control con pEGFP-C1) y 10% suero fetal bovino, con el cual permanecieron durante 12 h. Se puede observar que la localización de la proteína de fusión se movilizó entre el núcleo y el citoplasma, de acuerdo a las condiciones de glucosa presentes en el medio. La figura corresponde al plano medio de una serie confocal. La barra corresponde a 10 μ m.

4.8 Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en las líneas celulares

MIN6, LLCPK1 y HeLa. Se decidió determinar que sucedía con la localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en las líneas celulares no hepáticas. Para esto las líneas Min-6 (β -pancreática murina), LLCPK1 (células epiteliales de túbulo contorneado proximal de riñón de cerdo) y HeLa (carcinoma humano), fueron transfectadas con el vector pEGFP/PFKFBPasa2, en las condiciones antes descritas. En todas estas líneas se ha descrito la presencia de algunas de las isoformas de la enzima bifuncional.

El patrón común en estas líneas fue que no variaron su localización dentro de la célula, en ninguna de las condiciones estudiadas.

Al observar con detalle, podemos ver que en MIN-6, la localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2, es prácticamente igual dentro de toda la célula (**figura 19 A**), aún cuando presenta una mayor intensidad de la fluorescencia dentro del núcleo. En cambio, en LLCPK1 y HeLa, esta se visualizó con mayor intensidad en el citoplasma de la célula (**figuras 19 B y 19 C**) Llama mucho la atención que en la línea celular LLCPK1 se observa mayor marca en la fluorescencia en el sector perinuclear, a diferencia de las otras dos líneas que presentan fluorescencia homogénea dentro del compartimento citoplasmático.

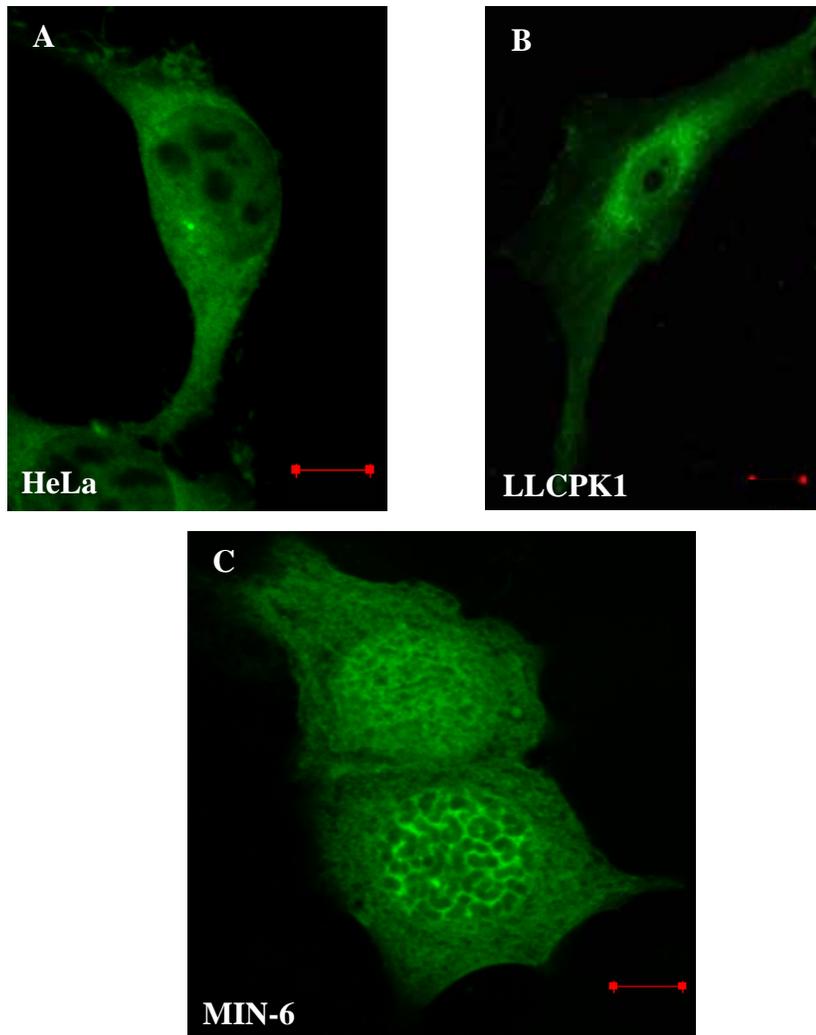


Figura 19: Localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 en las líneas celulares HeLa, LLCPK1 y MIN6. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 25 mM, luego de ser transfectadas. Como podemos observar la localización de la proteína de fusión es tanto citoplasmática, como nuclear en las tres líneas celulares. En MIN6, LLCPK1 y HeLa, la localización no varió al cambiar las concentraciones de glucosa al medio de crecimiento. La barra corresponde a 10 μm .

4.9 Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y fructosa-1,6-bifosfatasa endógena en las líneas celulares hepáticas HepG2 y FTO2b Para finalizar nuestro estudio de la localización subcelular de la enzima PFKFBPasa2, se decidió determinar la co-localización de ésta con la isoforma hepática de la enzima gluconeogénica, FBPasa. Para esto, las líneas celulares positivas al análisis mediante western blot (**figura 13 y 14**) fueron transfectadas con el plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2 y tratada como se ha descrito anteriormente. Luego se fijaron con paraformaldehído 3% y se les realizó inmunofluorescencia, usando anticuerpo específico para la isoforma hepática de rata de FBPasa.

En la **figura 20**, se puede observar que en las células HepG2, en ausencia de glucosa estas enzimas se colocalizan en el citoplasma de la célula, condición que se repite con 5 y 25 mM glucosa (**figuras 21 y 22**). Esto es debido a que FBPasa se localiza en igual compartimientos que PFKFBPasa2, en las condiciones estudiadas.

En cambio, en la línea celular FTO2b, se ve co-localización de ambas enzimas en el citoplasma de la célula, en presencia de 5 y 25 mM glucosa (**figura 23 y 24**), pero se observa que la enzima FBPasa, nunca sale del núcleo en las condiciones estudiadas, ni cambia su localización dentro de esta línea celular.

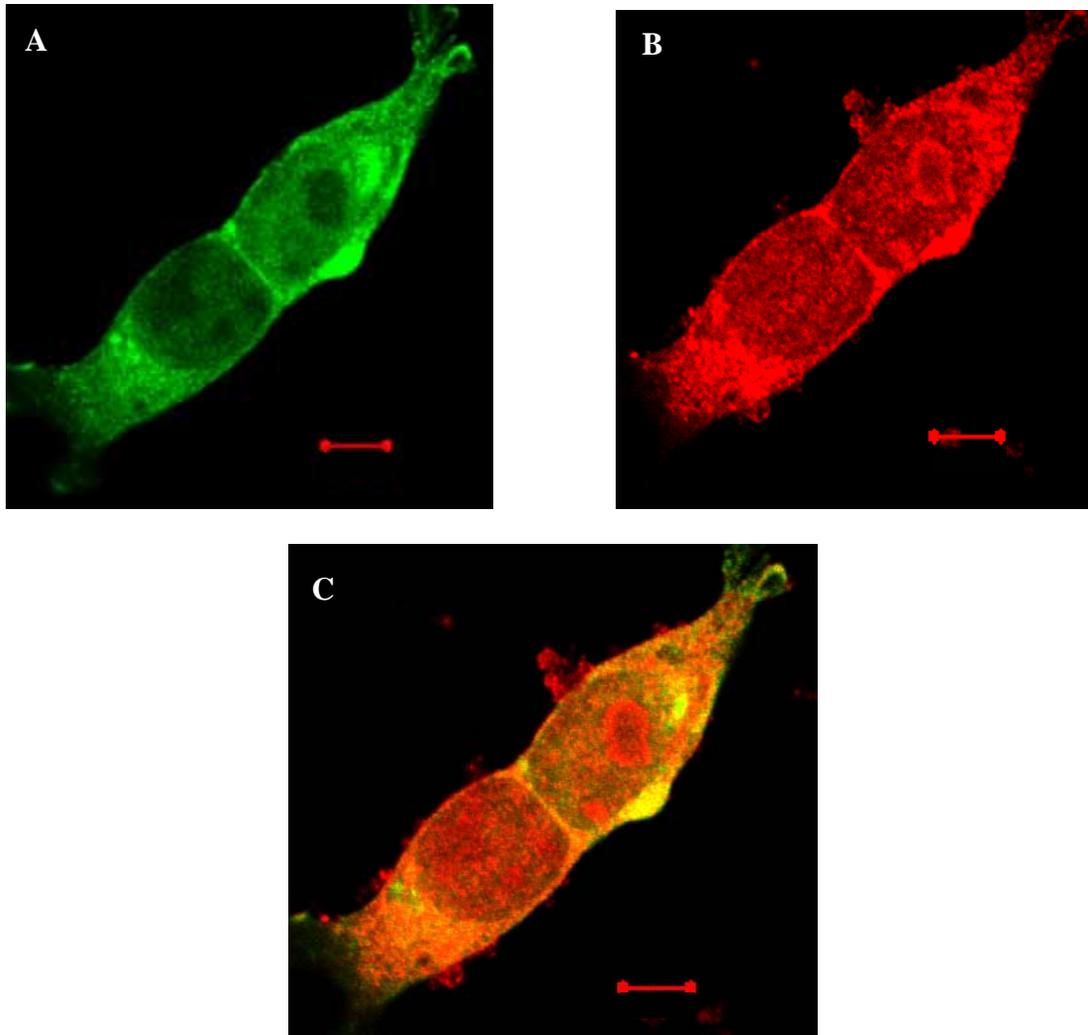


Figura 20: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular HepG2 en ausencia de glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 0 mM, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B: inmunofluorescencia contra FBPasa y C: colocación de ambas figuras. Como podemos observar la co-localización de la enzima bifuncional y FBPasa, es principalmente citoplasmática. La barra corresponde a 10 μ m.

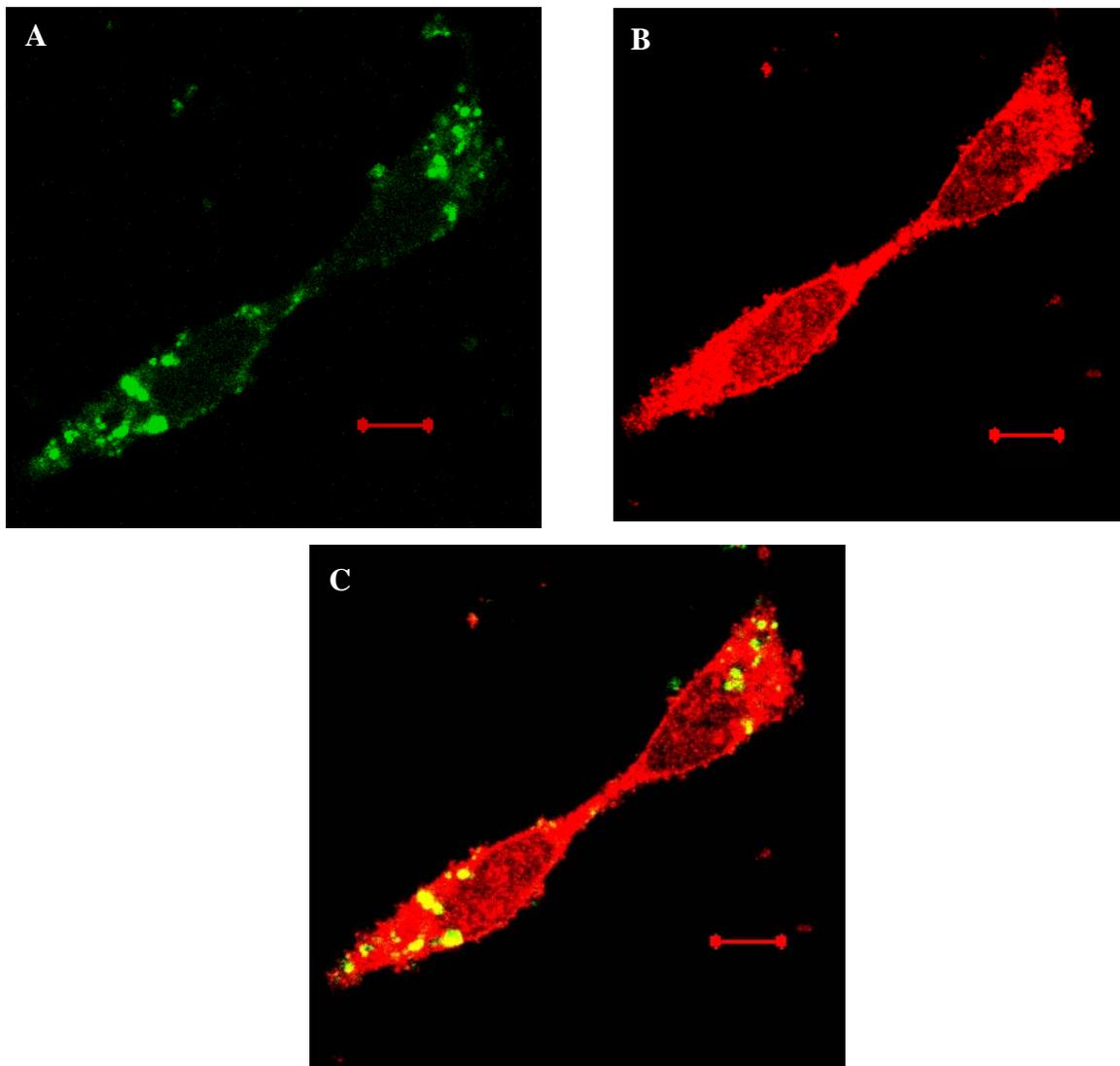


Figura 21: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular HepG2 en presencia de 5 mM glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 5 mM, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C, co-localización de ambas figuras. Como podemos observar la co-localización de la proteína de fusión con FBPasa, es mayoritariamente citoplasmática, con presencia menor en el núcleo. La barra corresponde a 10 μm

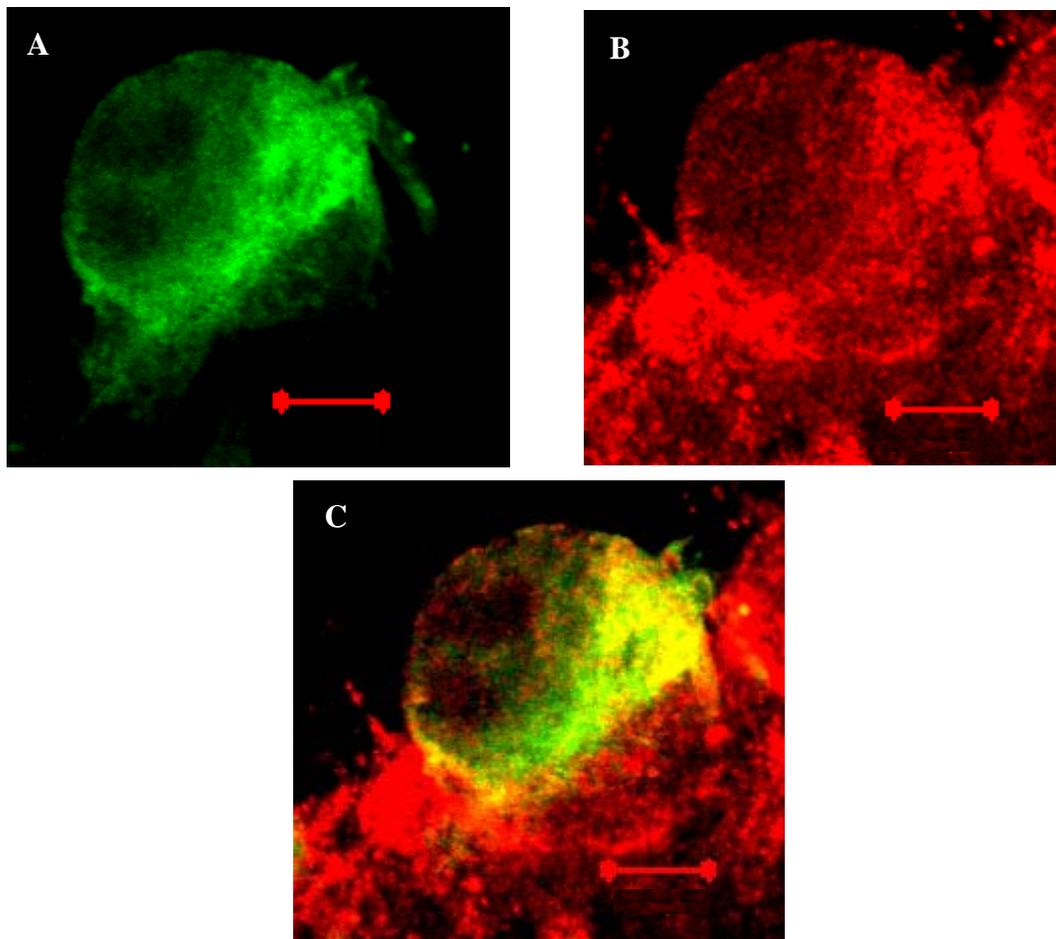


Figura 22: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular HepG2 en 25 mM glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de 25 mM glucosa, luego de ser transfectadas. La figura A: corresponde a la transfección del vector clonado, B: inmunofluorescencia contra FBPasa y C: colocación de ambas figuras. Como podemos observar la co-localización de ambas enzimas es principalmente citoplasmática. La barra corresponde a 10 μm .

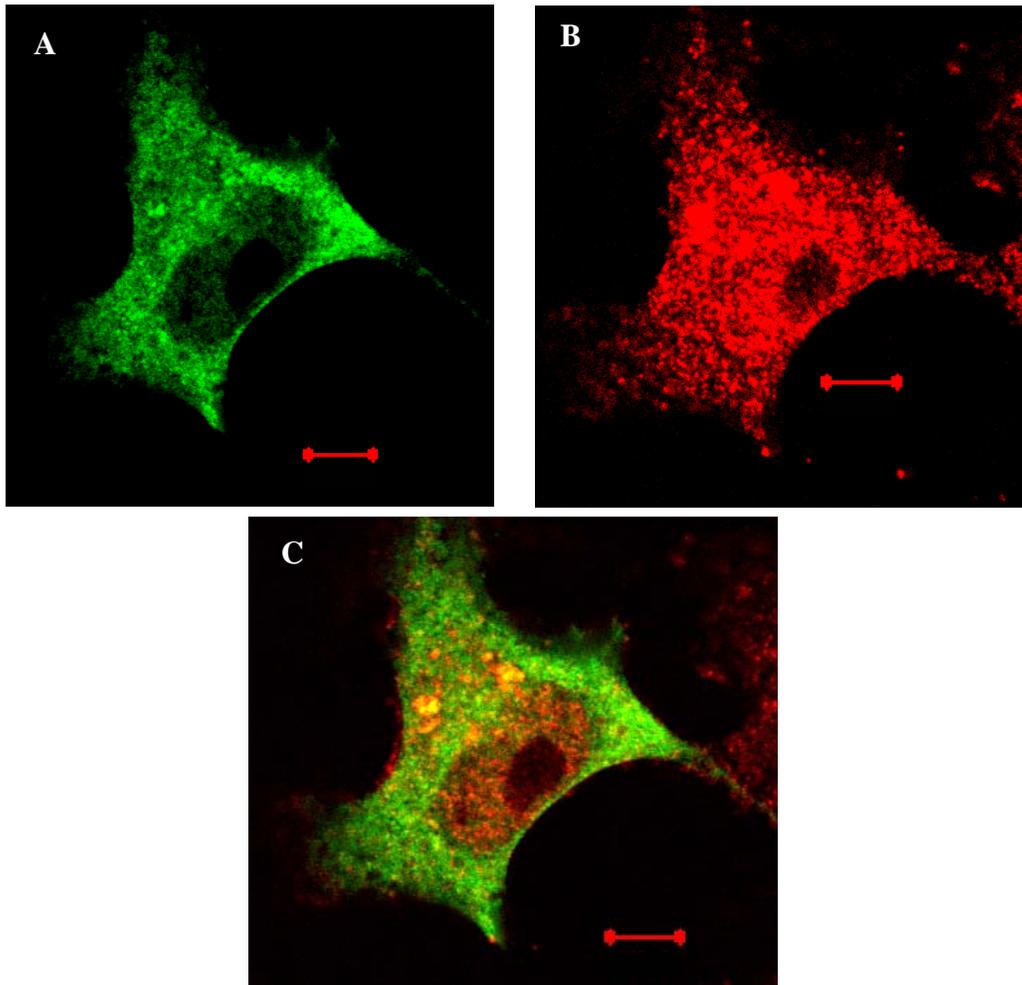


Figura 23: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular FTO2b en ausencia de glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de 0 mM glucosa, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C co-localización de ambas figuras. Se puede ver que la co-localización de ambas enzimas es principalmente en el citoplasma de la célula. La barra corresponde a 10 μm .

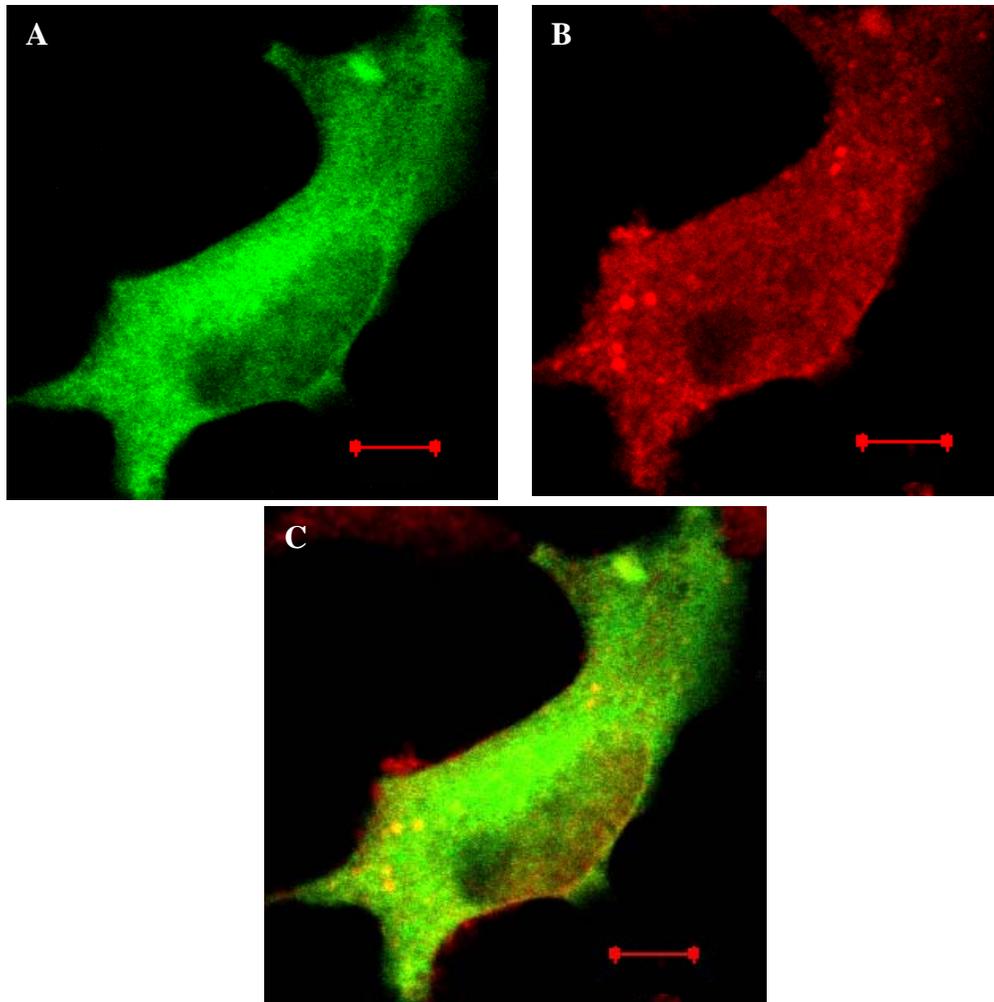


Figura 24: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular FTO2 crecidas en alta glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de 25 mM glucosa, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C colocación de ambas figuras. Como podemos observar la co-localización de ambas proteínas es tanto nuclear como citoplasmática, aún cuando es mayor en el citoplasma. La barra corresponde a 10 μm .

4.10 Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y Fructosa-1,6-bifosfatasa endógena en las líneas celular EBNA y HeLa. Al observar la inmunodetección por western blot, usando anticuerpos específicos para la isoforma hepática de FBPasa, mostrada en la **figura 14**, se puede ver su presencia en líneas celulares distinta a la hepática, como son EBNA y HeLa. Es por esta razón que se realizaron co-localizaciones de las isoformas hepáticas de PFKFBPasa2 y FBPasa en estas dos líneas celulares, las que corresponden a riñón embrionario humano y carcinoma humano.

En la **figura 25, 26 y 27**, podemos ver que la localización de la proteína FBPasa no varió con las diferentes condiciones de glucosa. Esta fue claramente citoplasmática. Contrario es el caso de PFKFBPasa2, la cual sale completamente del núcleo en presencia de 5 mM y 25 mM glucosa (**figura 26 y 27**). A diferencia de su expresión en ausencia de glucosa en donde presenta una localización homogénea tanto en el núcleo, como en el citoplasma. Debido a esto, la co-localización de estas dos enzimas, en la línea celular renal EBNA fue siempre en el citoplasma.

En la **figura 28**, se puede ver que la localización de FBPasa en la línea de carcinoma humano HeLa, es tanto nuclear como citoplasmática. A diferencia de PFKFBPasa2, que se localiza predominantemente en el citoplasma de estas células.

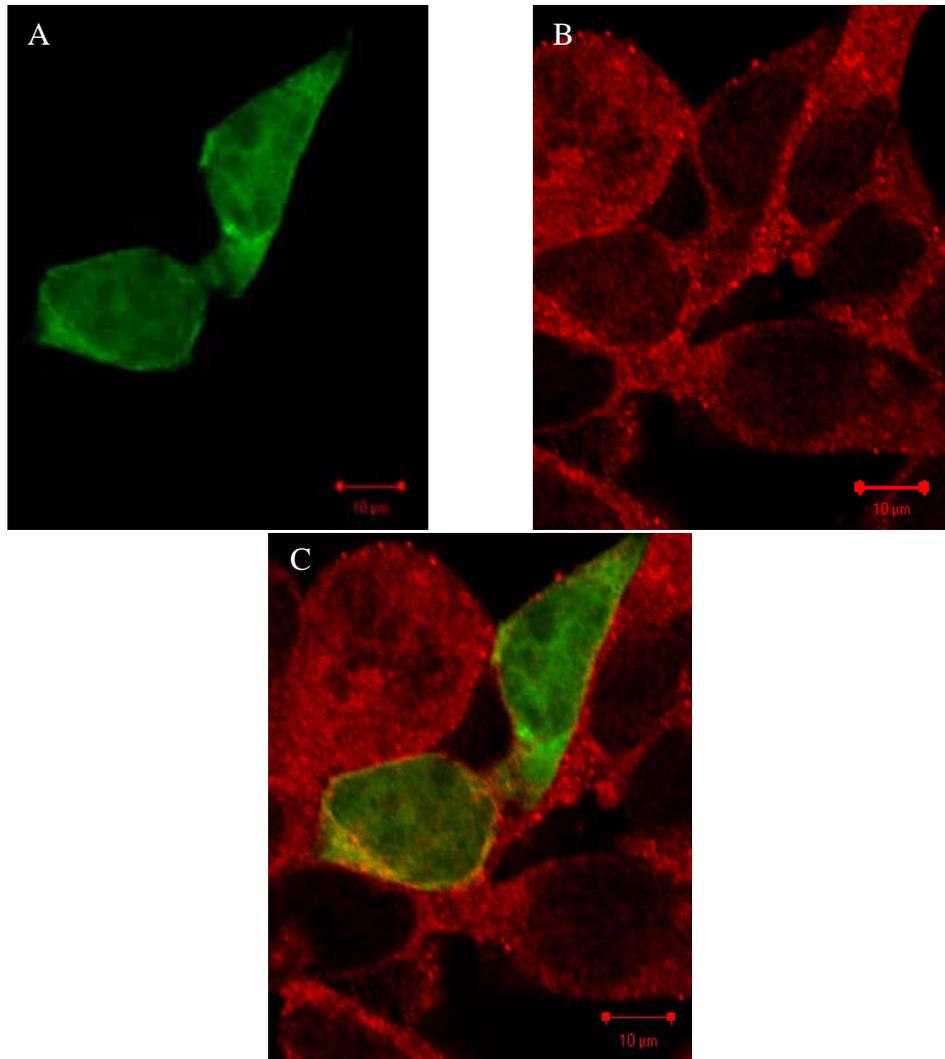


Figura 25: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular EBNA en ausencia de glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 0 mM, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C colocación de ambas figuras. Como podemos observar la localización de ambas proteínas es en el citoplasma de la célula, ya que FBPasa, solo presentó localización citoplasmática. La barra corresponde a 10 μm .

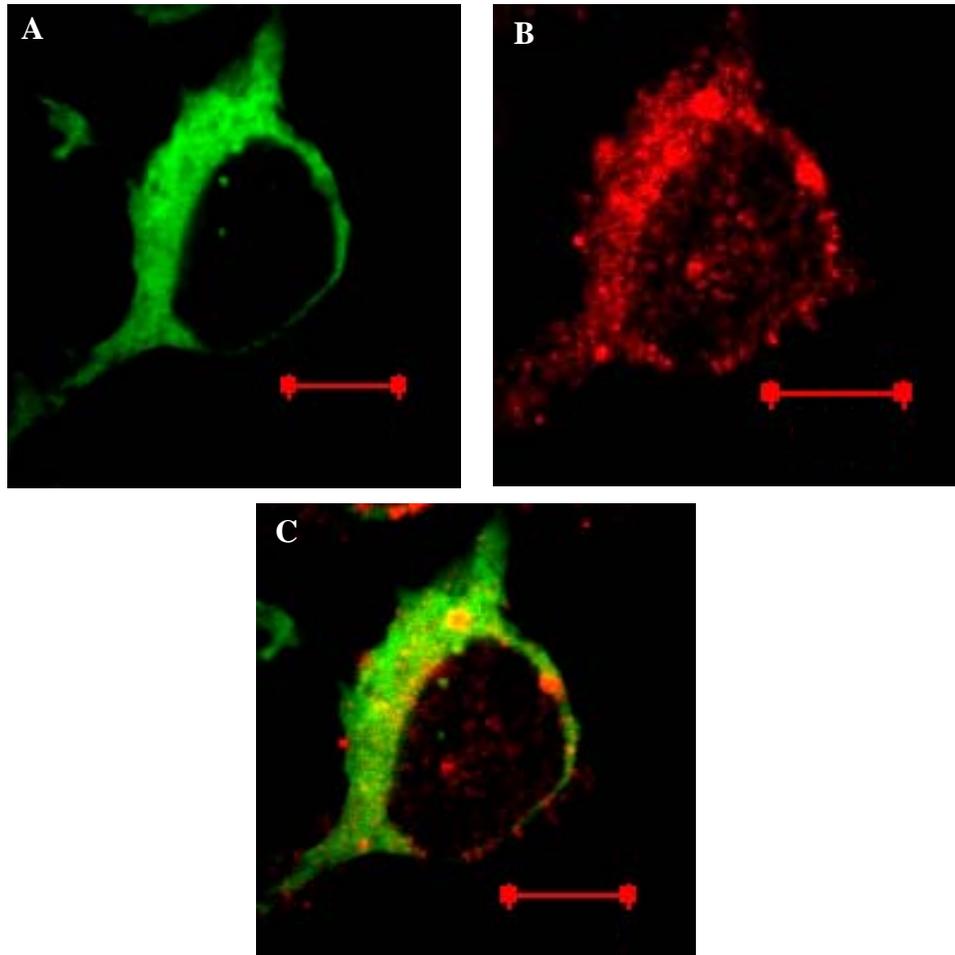


Figura 26: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular EBNA en presencia de 5 mM glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 5 mM, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C colocalización de ambas figuras. Se puede observar que la enzima bifuncional y FBPasa, co-localizan solamente en el citoplasma de la célula. La barra corresponde a 10 μm .

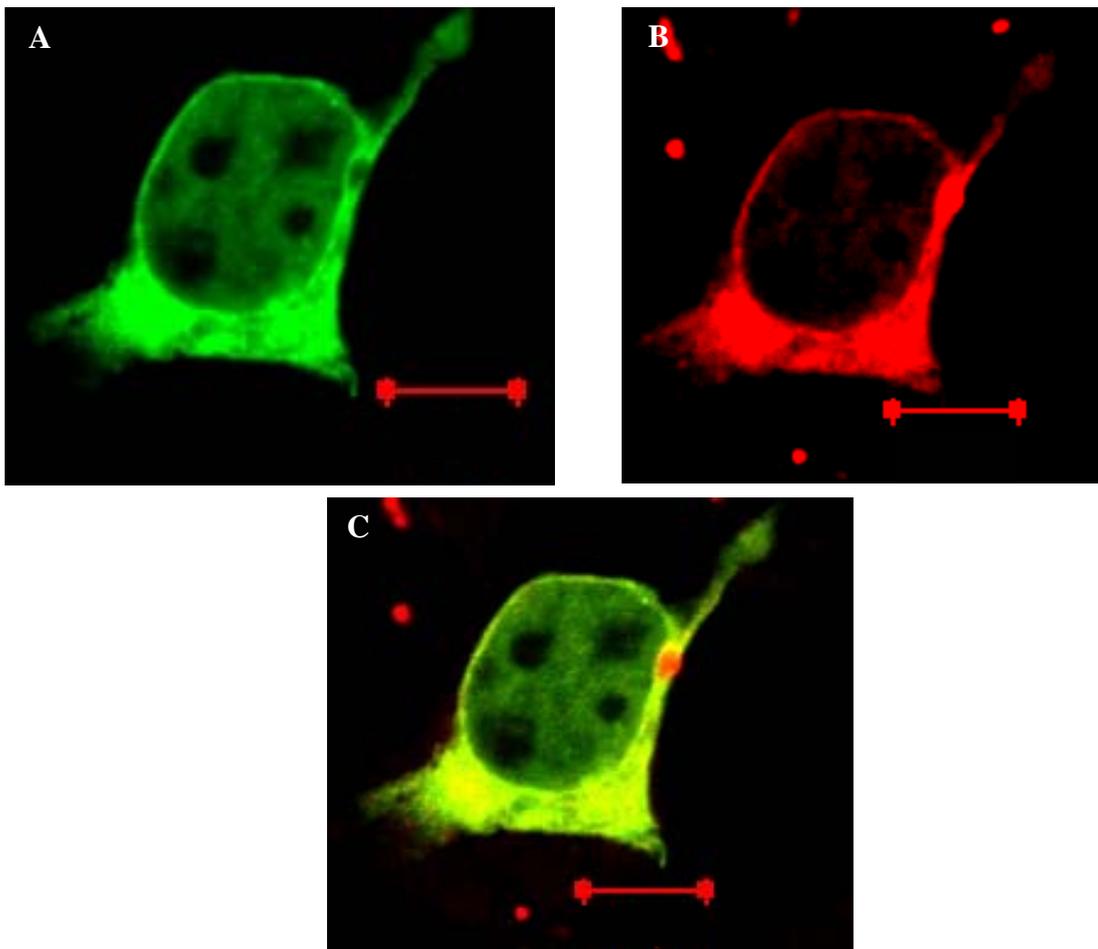


Figura 27: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFKFBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular EBNA en condiciones de alta glucosa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 25 mM, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C co-localización de ambas figuras. Se puede observar, que la co-localización de ambas proteínas es en el citoplasma de la célula, aún cuando ambas están presentes en el núcleo, pero en muy baja intensidad. La barra corresponde a 10 μm .

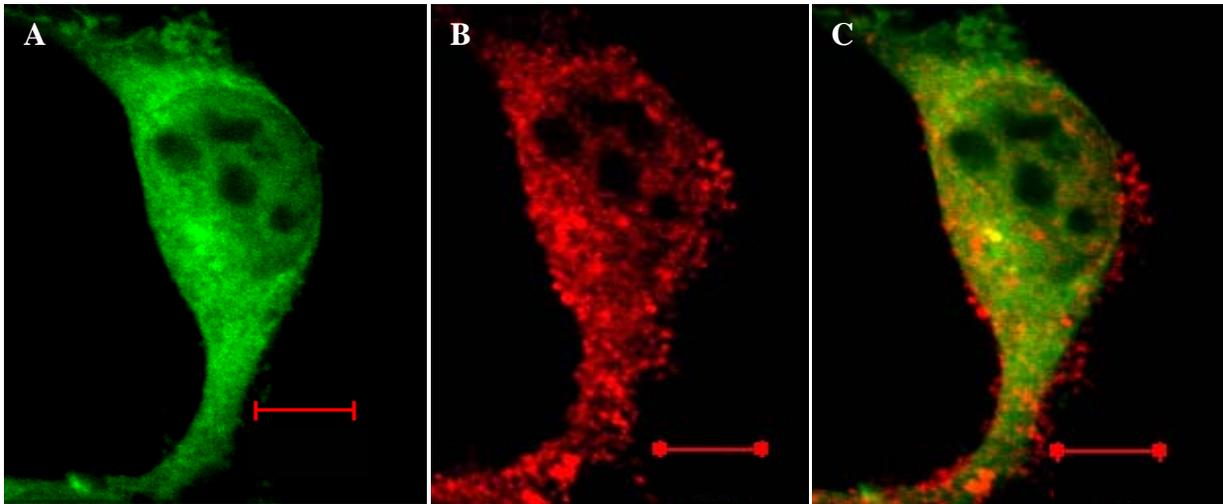


Figura 28: Co-localización de la proteína de fusión EGFP/PFK2FBPasa2 y la proteína endógena FBPasa en la línea celular de carcinoma humano HeLa. Estas imágenes corresponden al plano medio de una serie confocal. Las células permanecieron 12 horas en presencia de glucosa 25 mM, luego de ser transfectadas. La figura A corresponde a la transfección del vector clonado, B inmunofluorescencia contra FBPasa y C colocación de ambas figuras. Como podemos observar la localización de la proteína de fusión es tanto citoplasmática, como nuclear en las tres líneas celulares. La barra corresponde a 10 μm .

5. DISCUSIÓN

La glicólisis y gluconeogénesis son dos vías metabólicas opuestas, pero que en conjunto regulan la homeostasis de la glucosa en el organismo. Una etapa clave de regulación corresponde a la reacción catalizada por la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). Esta enzima tiene como su más potente inhibidor el fructosa-2,6-bisfosfato, azúcar que es sintetizado y degradado por la enzima bifuncional PFKFBPasa2.

En nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente la isoforma hepática de FBPasa de rata y se ha determinado que diferencias en las condiciones metabólicas del animal provoca cambios en la distribución celular y subcelular de esta enzima en hígado (Yáñez y col., 2004). Resultados similares, se han encontrado en órganos como riñón, donde se pudo observar claramente una zonación en la localización de esta enzima, como también de otras que participan en las vías antes descritas (Yáñez y col., 2004). Es por esta razón que fue atrayente estudiar la localización de la enzima encargada de sintetizar el fructosa-2,6-bisfosfato, y de esta forma determinar si existe relación en la distribución de las isoformas hepáticas de ambas enzimas al variar las condiciones metabólicas.

Debido al interés en la isoforma hepática de PFKFBPasa2 y a la ausencia de anticuerpos específicos capaces de reconocerla en tejidos o células, su secuencia fue clonada en el vector pEGFP-C1, el cual nos permite generar una proteína de fusión entre la enzima de nuestro interés y la proteína fluorescente verde, dejando en el extremo carboxilo de esta última, la secuencia de la enzima PFKFBPasa2. La detección de la proteína de fusión es realizada mediante la excitación de GFP a 488 nm, pudiendo captar la emisión de fluorescencia en el rango verde del espectro, lo cual indica la localización de la enzima bifuncional (Gerdes y Kaether, 1996).

El PCR realizado a los cDNA de cada línea celular usando partidores específicos para la isoforma hepática de PFKFBPasa2 (**figura 11**) dio positivo para FTO2b, HepG2, EBNA, LLCPK1 y HeLa, lo cual nos permite pensar que en las condiciones estudiadas la enzima bifuncional se expresa en todas las líneas celulares. Estos resultados difieren de aquellos obtenidos por Dupriez y Darville (1993), los cuales demostraban que la isoforma hepática de PFK2FBPasa2 no se encontraba presente en la línea celular FTO2B, pues mRNA solamente hibridizaba con el exon 1_M y no con el 1_L que se localiza río arriba del exón mencionado anteriormente. Debido a que la isoforma muscular se genera por empalme alternativo del exon 1 del gen PFKFB1, los partidores diseñados para la isoforma hepática reconocen la posición 173-190 por el extremo amino terminal y 1571-1576 en el carboxilo terminal, por lo tanto estos no son capaces de reconocer la isoforma muscular de la enzima bifuncional.

De igual manera se procedió con partidores específicos para la isoforma hepática de FBPasa, diseñados para reconocer esta enzima en tejido de rata y humano. Como podemos observar en la **figura 12**, todos los cDNAs dieron positivos a esta reacción a excepción de LLCPK1, lo que concuerda con datos obtenidos en nuestro laboratorio (Droppelmann, 2000).

Para determinar la presencia de las enzimas PFKFBPasa2 y FBPasa en las líneas celulares en estudio se realizó inmunodetección por western blot, usando anticuerpos generados en conejo, contra la proteína nativa de rata de ambas enzimas.

La expresión de FBPasa y PFKFBPasa2 fue observada en las líneas hepáticas, renales y HeLa (**figura 13**) excepto que, no se observó expresión de FBPasa en LLCPK1 (**figura 14**). Estos datos nos permiten suponer que ambas enzimas pueden colocalizar en todas las líneas celulares estudiadas a excepción de LLCPK1, debido a la ausencia de

FBPasa. Por este motivo se comenzó con la transfección de la línea hepática FTO2b, usando el plasmidio pEGFP/PFKFBPasa2.

Los resultados presentados en la **figura 15** muestran la dinámica en la localización de la enzima PFKFBPasa2. En las células FTO2b transfectadas y tratadas con distintas concentraciones de glucosa, se puede observar que la enzima mostró un patrón de distribución claramente citoplasmático en ausencia de glucosa. Al cultivar las células en presencia de glucosa (5 ó 25 mM), la enzima bifuncional se distribuyó en forma uniforme dentro de la célula. Como control se realizó la transfección pasajera del vector pEGFP-C1 mostrando señal uniforme tanto en el núcleo como en el citoplasma en todas las condiciones estudiadas, por lo cual se supone que GFP no posee secuencias específicas de localización. Además, esta distribución uniforme radica en el tamaño de la proteína verde fluorescente (27 kDa), que al ser menor que el límite de exclusión permite una difusión pasiva a través del poro de la membrana nuclear (45 kDa), y así es capaz de moverse libremente a favor del gradiente de concentración (De la Iglesia et al., 1999).

Se ha descrito que la línea celular FTO2B corresponde a un modelo relativamente bien diferenciado de las células hepáticas, ya que mantiene la capacidad de expresar muchos rasgos hepáticos (Patrick B. Iynedjian 1996). Por otro lado, existen trabajos que establecen la ausencia de enzimas gluconeogénicas en hepatomas, noción que es claramente descartada por los resultados obtenidos en los análisis de PCR y western blot realizados a las líneas celulares en estudio (**figura 12 y 14**) y discutidos previamente. En relación al estado de fosforilación de la enzima bifuncional en ausencia de glucosa, podemos suponer la presencia de PFKFBPasa2 fosforilada en la ser 32, lo que provocaría la inactivación del dominio quinasa de la enzima y la activación del dominio fosfatasa (Pilkis, 1995). Esto tendría como consecuencia la degradación de Fru-2,6-P₂ y desinhibición de la enzima

FBPasa, estimulando la vía gluconeogénica, lo que sería apoyado por la localización citoplasmática de la enzima bifuncional en ausencia de glucosa, observada en la **figura 15A**, la que sería citoplasmática. Este dato nos permite hipotetizar que la presencia de glucosa en el medio induciría la translocación de la enzima al núcleo, como se ha visto anteriormente con la localización de aldolasa A (Spichiger, 2004).

Hasta la década del 80, se consideraba imposible que una enzima del metabolismo intermediario pudiera presentar en algún momento localización nuclear, ya que su función conocida hasta ese momento era solamente citoplasmática. Actualmente, se sabe que la localización nuclear es posible y es una característica común de varias enzimas del metabolismo de la glucosa, que viajan al núcleo a realizar funciones distintas a las del metabolismo energético. Este es el caso de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que se ha demostrado es capaz de unirse a DNA o RNA. Cabe considerar que esta actividad, solo es posible cuando la enzima se encuentra en forma de monómero, lo cual implica la inactivación de su actividad glicolítica (Perucho 1980; Nagy 2000). GAPG, junto con otra enzima glicolítica, la lactato deshidrogenasa, se une a Oct-1, un co-activador del complejo OCA-S (Co-activador en fase S de Oct-1), cuya función es actuar como transactivador dependiente de la fase S del ciclo celular, que estimula la expresión del gen de la histona H2B (Zheng 2003). Esta unión de OCA-S al DNA esta fuertemente regulada por la presencia de NAD^+ y NADH , aumentando o inhibiendo la unión del complejo al promotor H2B. Además GAPD participa en la reparación del DNA, presumiblemente uniéndose al DNA telomérico (Sundararaj 2004).

Por otro lado, tenemos otra enzima glicolítica, la glucoquinasa, que también transloca al núcleo pero por razones diferentes. Se ha determinado que GK en condiciones basales de glucosa (hasta 5.5 mM) esta unida a la proteína reguladora de glucoquinasa

encontrándose en el núcleo del hepatocito. Si la concentración de glucosa o fructosa aumenta a 10-30 mM y 50 μ M respectivamente, GK es liberada del complejo GKRP y abandona el núcleo (Agius L 1993; Agius L. 1995). Estudios recientes han determinado que GK es incapaz de entrar al núcleo por si sola, necesita de la unión con la proteína reguladora, presumiblemente por un mecanismo de piggy-back (Jans, 1997; Mizuno, 1996). Además, la identificación de una secuencia de exportación nuclear dentro de la secuencia de GK sugiere que al presentarse las condiciones metabólicas que separan a la enzima de su proteína reguladora, esta es exportada desde el núcleo al citoplasma vía proceso activo (Chiyo Shiota 1999).

Al analizar los datos obtenidos con las transfecciones realizadas a las cinco líneas celulares en estudio, se puede observar que solo en FTO2B, HepG2 y EBNA hubo translocación de la proteína de fusión desde el citoplasma al núcleo de la célula. Estos resultados nos sugieren que la translocación de PFKFBPasa2 hacia el núcleo obedece a un transporte activo, dependiente de la interacción con una o más proteínas y que no es producto de una señal de importación nuclear propia de la enzima. De lo contrario, la proteína de fusión hubiese translocado al núcleo en todas las líneas celulares por igual. Para corroborar la ausencia de una secuencia de exportación nuclear, la secuencia aminoacídica de la enzima bifuncional fue analizada mediante dos programas computacionales, los que identifican señales de importación o exportación al núcleo, PSORTII y NESbase 1.0. El resultado obtenido indica que la secuencia de la enzima no posee ninguna de las señales clásicas identificadas por estos programas, lo cual apoya la teoría de la ausencia de secuencias que permitan la translocación de la proteína al núcleo. Sin embargo, también es plausible que la enzima presente secuencias de importación y/o exportación nuclear no

consenso, o bien, este proceso ocurra mediante la unión de PFKFBPasa2 a otra/s proteína/s que funcionen como chaperona y posean dicha secuencia, permitiéndole a la enzima translocar desde el núcleo al citoplasma, y viceversa.

Con respecto a la función que esta enzima cumpliría en el núcleo, no existen datos en la literatura, pero una de las hipótesis que planteamos con respecto al motivo de su translocación al compartimento nuclear, sería el secuestro de la enzima para disminuir la concentración de ésta en el citoplasma y regular indirectamente las vías en que ella participa. Otra posible función, sería regular la expresión de su propio gen (PFKFB1) o tal vez formando complejos reguladores de la transcripción, como es el caso de GAPD. También se podría relacionar su actividad en el núcleo con la de GK en este compartimento. Esta función nuclear de PFKFBPasa2 es poco probable, ya que esta puede sintetizar y degradar el Fru-2,6-P₂, metabolito esencial para la regulación del flujo de carbonos en las vías glicolíticas y gluconeogénicas. Por este motivo, ella debe estar siempre presente en el citoplasma de la célula, contrariamente a lo que sucede con GK, que es secuestrada en el núcleo de la célula para disminuir su actividad en el citoplasma. Apoyando estos datos, se ha determinado que en cultivo de células β pancreáticas, GK se uniría a PFKFBPasa2 en ausencia de glucosa, interacción que aumenta su actividad y da a conocer otra función citoplasmática de la enzima bifuncional (Massa 2004). Este tipo de interacción no puede ser observada en las células FTO2b, ya que se ha determinado experimentalmente que GK no se expresa en estas células (Bosch 1994). Este dato permite concluir que la unión de PFKFBPasa2 y GK no es determinante para la translocación al núcleo de la enzima bifuncional.

Distinto es el caso de la célula hepática HepG2, pues en ellas se ha determinado la expresión a nivel de mRNA y proteína de GK. Si consideramos la hipótesis es que la unión de la isoforma hepática de la enzima bifuncional a GK propicia la translocación de ambas al núcleo, se esperaría que la transfección del plasmidio con la enzima PFKFBPasa2 en estas líneas celulares, muestre una localización nuclear a bajos niveles de glucosa. Al observar la **figura 17**, se aprecia que en esta condición la fluorescencia se localiza casi completamente en el núcleo de la célula, lo cual descartaría completamente esta hipótesis. Baltrusch y col. (2001), demostraron que en las células pancreáticas, GK se une al dominio fosfatasa de PFKFBPasa2, lo que aumenta su actividad catalítica. Es por este motivo que decidimos determinar la localización de la enzima bifuncional en la línea celular MIN6 (célula β -pancreática murina), ya que en esta línea se expresa GK. La **figura 19** muestra que no hubo variación en localización de la enzima bifuncional. Esto mismo sucede con GK, ya que en este tipo celular no existe su proteína reguladora, por lo cual no puede realizar la entrada al núcleo. Esto nos lleva a pensar que en las células pancreáticas la translocación de PFKFBPasa2 no está determinada por la unión con glucoquinasa.

Lo que sucede en la línea celular EBNA, en la cual se ha demostrado la ausencia de GK, es consistente con la teoría de que la translocación de la enzima bifuncional al núcleo no es dependiente de su unión con GK, ya que a pesar de no estar presente en estas células, PFKFBPasa2 es movilizada al compartimento nuclear.

Como se ha mencionado anteriormente el fructosa-2,6-bisfosfato es un potente inhibidor de la enzima gluconeogénica FBPasa, razón por la que decidimos determinar la localización de esta enzima en las condiciones metabólicas en que PFKFBPasa2 se mueve entre el núcleo y el citoplasma. Al observar las líneas celulares en las que se determinó que estaban ambas enzimas, su co-localización fue siempre en el citoplasma de la célula

(**figuras 20-28**). Estos resultados permiten sugerir que la translocación de PFKFBPasa2 no esta relacionada con FBPasa, la cual se ha visto que varia su localización dependiendo de las condiciones metabólicas de distintos tejidos, como es el caso del hígado donde la enzima se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos en ausencia de glucosa y transloca al núcleo al agregar este azúcar al medio (Yáñez y García-Rocha, 2004).

Como muestran las **figuras 23 y 24**, en las células FTO2B, FBPasa posee una localización uniforme en el núcleo y citoplasma, la cual no varió al cambiar las concentraciones de glucosa del medio de cultivo, lo que diverge de lo observado en hepatocitos (Yáñez, 2005), donde la enzima muestra cambios marcados en su distribución subcelular en respuesta a diferentes efectores. Esto puede sugerir que las células FTO2B carecen de algunas proteínas importantes para la regulación de la localización subcelular de FBPasa. Por el contrario, en HepG2 y EBNA (**figuras 25, 26 y 27**), la localización de esta enzima fue siempre citoplasmática. Se ha determinado que FBPasa posee una secuencia de importación nuclear no convencional, lo que podría ayudar en su entrada al núcleo, pero aún no se ha demostrado que sea funcional. Por esto podemos considerar que la vía que permite el ingreso al núcleo de FBPasa es a través de un mecanismo de piggy-back. Esto nos permite concluir que en las líneas celulares HepG2 y EBNA esta ausente la proteína de unión a FBPasa que le permite moverse al núcleo.

En conclusión, podemos decir que la enzima PFKFBPasa2, en líneas celulares hepáticas y renales, presenta una modulación en la localización subcelular inducida por las condiciones metabólicas de la célula. Como se ha expresado anteriormente, la localización nuclear de las enzimas del metabolismo intermediario es algo que se descubrió solo hace algunos años, por lo tanto, existe una gran cantidad de hipótesis que involucran la actividad de estas enzimas en la regulación de la expresión génica de ellas mismas o de otras

enzimas, así como también, de la participación en la división celular, en la inhibición de la apoptosis entre otras. Todas las funciones antes mencionadas han sido determinadas solo en algunas enzimas, por lo cual, se generan muchas preguntas sobre el rol que cumplirían todas las enzimas que conocemos y de la manera en que ellas estarían interactuando dentro de la célula.

Debemos mencionar que los resultados obtenidos en esta tesis, corresponden a un modelo aproximado de lo que estaría sucediendo en el hígado en similares condiciones de glucosa. Sería de gran interés repetir los experimentos realizados en esta tesis, utilizando hepatocitos en cultivo primario, lo que nos proporcionaría un mayor acercamiento a lo que sucede *in vivo* con la regulación de la enzima PFKFBPasa y su relación con la enzima gluconeogénica FBPasa. En 2003, Boess y col. describieron que el cultivo primario de hepatocitos y las líneas celulares hepáticas difieren mucho en cuanto a su capacidad de representar lo que ocurre en el hígado *in vivo*. Estos autores demostraron que las líneas celulares inmortalizadas no se comportan en la forma esperada, y por tanto, el modelo de hepatocitos en cultivo primario sería la opción más acertada, cuando no se puede trabajar con tejidos. Así mismo, es importante considerar que la localización de la enzima bifuncional fue realizada mediante su sobreexpresión, lo cual induce a error por efectos colaterales provocados por el exceso de proteína, con respecto a la concentración basal de esta en la célula.

En las proyecciones de este trabajo, será importante para avanzar en la determinación de la regulación de la enzima bifuncional, realizar el clonamiento de la enzima en el vector pET15b, lo que nos permitiría generar anticuerpos contra la proteína nativa. Esta es una herramienta clave para realizar estudios de inmunohistoquímica en distintos tejidos.

Por último, es importante resaltar la importancia de los datos obtenidos en el trabajo de tesis que se ha presentado, ya que en los veinte años de estudios de esta enzima fundamental en el metabolismo de los carbohidratos, solamente se había considerado su caracterización cinética. Los estudios de localización y regulación dentro de la célula, correspondiente al tema central de esta tesis, viene a complementar los datos existentes de manera significativa. Cabe destacar, que el hecho de estar en presencia de una enzima bifuncional, capaz de realizar los procesos de síntesis y degradación de su sustrato, hacía prácticamente imposible pensar en que esta requiera moverse al compartimento nuclear para regular su actividad, ya que su ausencia en el citoplasma implica el descontrol del flujo a través de las vías glicolítica y gluconeogénicas. Estos datos aportan una importante discusión sobre el rol que cumpliría PFKFBPasa2 en el núcleo y de que manera se regularían las enzimas que su sustrato controla, cuando ella abandona el citoplasma.

BIBLIOGRAFÍA

- Agius L, P.M., Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem. J.*, 1993. 296: p. 785-796.
- Agius L., P.M.a.V.S.E., The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. *Biochem. J.*, 1995. 309: p. 711-713.
- Alex J. Lange, C.E., Robert Hall., Regulation of gene expression of rat skeletal muscle/liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Isolation and characterization of a glucocorticoid response element in the first intron of the gene. *J.Biol.Chem.*, 1992. 267: p. 15673-15680.
- Aurea Navarro-Sabaté, A.M., The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene*, 2001. 264: p. 131-138.
- Baltrusch S, L.S., Okar DA, Lange AJ, Tiedge M, Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *J. Biol. Chem.*, 2001. 276(47): p. 43915-43923.
- Berg, J.M.T., John L.; and Stryer, Lubert. , 2002.
- Bosch, A.V.a.F., Glucokinase expression in rat hepatoma cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization *Eur J Biochem* 1994. 222: p. 541-549.
- C. Nordlie, J.F., A. Lange, *Annu.Rev.Nutr.*, 1999. 19: p. 379-406.

- Chiyo Shiota, J.C.a.M.A.M., Nuclear Import of Glucokinase Depends upon Glucokinase Regulatory Protein, whereas Export Is Due to a Nuclear Export Signal Sequence in Glucokinase. *J. Biol. Chem.*, 1999. 274(52): p. 37125-37130.
- Colosia, A.D., Lively, M. O., El-Maghrabi *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 1987. 142: p. 1092-1098.
- Crepin KM, D.C.M., Vertommen D, Foret D, Michel A, Rider MH, Rousseau GG, Hue L., Molecular forms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expressed in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 1992. 267(30): p. 21698-21704.
- Darville, M.I., Crepin, K. M., Vandekerckhove, J., *FEBS Lett*, 1987. 224: p. 317-321.
- Darville, M.I., Crepin, K. M., Hue, L., and Rousseau, G. G., *Proc.NatL Acad. Sci. U. S. A*, 1989. 86: p. 6543-6547.
- David Okar, A.M., *TRENDS in Biochem. Sci.*, 2001. 26: p. 30-35.
- Droppelmann C. Tesis pregrado (2000)
- Fornerod M, O.M., Yoshida M, Mattaj I W., CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, 1997. 90: p. 1051-1060.
- Fusao Watanabe, E.F., *FEBS Letters*, 1999. 458: p. 304-308.
- Fusao Watanabe, E.F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 2001. 282: p. 803-810.
- Ganong, W.F.F.M., *Fisiología Médica*. 16ª Ed. El manual moderno, 1998.
- Grosse, F.e.a., Lactato Dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-strand DNA-binding proteins taht affect the DNA-polymerase-a-primase complex. *Eur. J. Biochem.*, 1986. 160: p. 459-467.

- Holde, C.K.M.a.K.E.V., Bioquímica. segunda ed. 1998: McGraw-Hill. Interamericana.
- Jantzen, H.-M., Strihle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, and M. M., R., and Schutz, G., Cell, 1987. 49: p. 29-38.
- Kitamura K, K.K., Matsuo H, Uyeda K., Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate,2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. J. Biol. Chem., 1988. 263(32): p. 16796-16801.
- Lin, K., Li, L., Correia, J. J., and Pilks, S. J. , J. Biol. Chem., 1992. 267(19163-19171).
- Lin Lig, K.L., Jo Pilkis J. Biol. Chem., 1990. 267: p. 21588-21594.
- Lively MO, E.-M.M., Pilkis J, D'Angelo G, Colosia AD, Ciavola and F.B. JA, Pilkis SJ., Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphata. J. Biol. Chem., 1988. 263: p. 839-849.
- Massa, L., Baltrusch, S, Okar, D., Lange, A.J., Lenzen, S. and Tiedge, M, Interaction of PFK-2/FBPase-2 with Glucokinase activates Glucose Phosphorylation and Glucose Metabolism in Insulin-producing Cells. Diabetes, 2004. 53: p. 1020-1029.
- Nagy, E.e.a., Identification of the NAD(C)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. 275: p. 253-260.

- Okar DA, M.A., Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ., PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. Trends Biochem Sci., 2001. 26(1): p. 30-35.
- Patrick B. Iynedjian, S.M., Haiyan Wang, Asllan Gjinovci, and Karen Nazaryan, Liver-specific Enhancer of the Glucokinase Gene. J. Biol. Chem., 1996. 271(46): p. 29113-29120.
- Perucho, M.e.a., Study of the interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with DNA. Biochem. Biophys. Acta, 1980. 606: p. 181-195.
- Pilkis, S.J., Walderhaug, M., Murray J. Biol. Chem., 1983. 258: p. 6135-6141.
- Pilkis, S.J., Lively, M. O., and El-Maghrabi, M. R. , J. Biol. Chem., 1987. 262(16669-16675).
- Sakata, J., and Uyeda, K. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1990. 87: p. 4951-4955.
- Sakata, J., A b , Y., and Uyeda, K., J. Biol.Chem, 1991. 266: p. 15764-15770.
- Schaftingen, E.V., Adv.Enzymol.Relat.Mol.Biol., 1987. 59: p. 315-395.
- Simon J. Pilkis, M.L., y M. Raafat El-Maghrabi, J. Biol.Chem, 1987. 262: p. 12672-12675.
- Spichiger C. Tesis de pregrado (2004). Distribución de las enzimas Aldolsa A y Fructosa-1,6-bisfosfatasa muscular en distintos tejidos de rata.
- Stewart, H.B., El-Maghrabi J. Biol. Chem., 1985. 260: p. 12935-12941.
- Sundararaj, K.P.e.a., (2004) Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 2004. 279: p. 6152–6162.

- Tauler, A., , Lin, K., and Pilgis, S. J. , J. Biol. Chem., 1990. 265: p. 6556-6562.
- Tominaga N, T.T., Minami Y, Wu RF, Watanabe F, Sakakibara R, Uyeda K., Effect of replacement of the amino and the carboxyl termini of rat testis fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase with those of the liver and heart isozymes. Arch Biochem Biophys., 1997. 347(2): p. 275-281.
- Van Schaftingen, E., Fructose-2,6-bisphosphate. Adv. Enzymol, 1987. 59: p. 315-395.
- VJ Dupriez, M.D., IV Antoine, A Gegonne, J Ghysdael and GG Rousseau Characterization of a Hepatoma mRNA Transcribed from a Third Promoter of a 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase-Encoding Gene and Controlled by ets Oncogene-Related Products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. 90: p. 8224-8228.
- Yanez AJ, G.-R.M., Bertinat R, Droppelmann C, Concha II, Guinovart JJ, Slebe JC, Subcellular localization of liver FBPase is modulated by metabolic conditions. FEBS Lett, 2004. 577(1-2): p. 154-158.
- Zheng, L.e.a., S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. Cell, 2003. 114: p. 255–266.