



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOQUÍMICA

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

**ESTUDIOS ACERCA DE LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE
6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA/FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATASA
EN HIGADO DE RATA Y SU INTERACCION CON MICROTUBULOS**

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

SERGIO IGNACIO NEGRON OYARZO

VALDIVIA – CHILE

2006

*A mis padres, Norfis y Sergio,
por su constante e incondicional apoyo y
sacrificio...*

*Y por supuesto, a Andrés y Ximena,
por ser ellos la razón de mi existencia...*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Dr. Juan Carlos Slebe, primero, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de pregrado en su laboratorio, y segundo, por su apoyo brindado durante la realización de ésta. Agradezco también a la Dra. Heide Ludwig por su importante asesoría.

Considero importante agradecer a mis compañeros de laboratorio por los buenos momentos de camaradería vividos, tanto dentro como fuera de las jornadas de trabajo. Entre ellos un agradecimiento especial a Joel Asenjo, Cristian Droppelmann y Carlos Spichiger por su valioso apoyo técnico y traspaso de experiencia durante la realización de mi tesis.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Enzimología Molecular del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile y fue financiado por los proyectos FONDECYT 1010720 y 1051122, y DID-UACH 2003-02.

INDICE DE CONTENIDOS

Páginas

AGRADECIMIENTOS

INDICE DE CONTENIDOS

i

LISTA DE FIGURAS

v

LISTA DE TABLAS

vi

LISTA DE ABREVIATURAS

vii

1 RESUMEN

1

SUMMARY

3

2 INTRODUCCIÓN

5

2.1 Fructosa-2,6-bisfosfato.

5

2.2 Síntesis y degradación de Fru-2,6-P₂: la enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2.

6

2.3 Distintas isoformas para distintas necesidades.

11

2.4 Los genes de PFK-2/FBPasa-2.

13

2.5 Regulación de la actividad de PFK-2/FBPasa-2 por fosforilación.

15

2.6	La organización subcelular de enzimas como mecanismo regulador.	17
2.7	Organización subcelular de las vías de transducción de señales.	19
2.8	Fundamento del presente trabajo.	23
3	MATERIAL Y MÉTODOS	26
3.1	Materiales	26
3.1.1	Reactivos	26
3.1.2	Equipos	27
3.2	Métodos	28
3.2.1	Purificación parcial de 6-fosfofructo-1-quinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK) desde tubérculo de patata.	28
3.2.2	Determinación de la actividad enzimática de PPi-PFK.	29
3.2.3	Determinación de la concentración de solución estándar de Fru-2,6-P ₂ .	30
3.2.4	Determinación de la actividad quinasa de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2).	30
3.2.5	Determinación de la actividad fosfatasa de PFK-2/FBPasa-2.	31
3.2.6	Determinación de la actividad enzimática de 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1).	31

3.2.7	Determinación de la actividad enzimática de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (Aldolasa).	32
3.2.8	Determinación de la actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1).	32
3.2.9	Fraccionamiento subcelular de hígado de rata mediante centrifugación diferencial.	33
3.2.10	Marcadores de fracciones celulares.	34
3.2.10.1	Cuantificación de DNA.	34
3.2.10.2	Determinación de la actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH).	35
3.2.10.3	Determinación de la actividad de glucosa-6 fosfatasa (G6Pasa).	35
3.2.10.4	Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).	36
3.2.10.5	Cálculo de la presencia relativa de cada marcador en las fracciones aisladas.	36
3.2.11	Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.	37
3.2.12	Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa.	37
3.2.13	Purificación de núcleos desde hígado de rata mediante centrifugación en gradiente simple de sacarosa.	38
3.2.14	Co-precipitación de microtúbulos desde cerebro de rata mediada por taxol.	39

3.2.15	Determinación de la concentración de proteínas.	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Purificación parcial de P _{Pi} -PFK desde tubérculo de patata.	41
4.2	Determinación de la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa2.	45
4.3	Distribución subcelular de PFK-2/FBPasa-2 en hígado de rata	48
4.4	Localización nuclear de PFK-2 /FBPasa-2.	54
4.5	Asociación de PFK-2/FBPasa-2 a microtubulos en el citosol de cerebro de rata.	60
5	DISCUSIÓN	66
6	REFERENCIAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura tridimensional de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa.	9
Figura 2	Esquema de la regulación de PFK-2/FBPasa-2 hepática por fosforilación	10
Figura 3	Ejemplo de mapa de interacciones entre proteínas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	20
Figura 4	Cromatograma de purificación de PPK-PFK en DEAE celulosa.	43
Figura 5	Curva de calibración de efecto de Fru-2,6-P ₂ sobre la actividad de PPK-PFK.	46
Figura 6	Seguimiento en el tiempo de la síntesis de Fru-2,6-P ₂ por PFK-2/FBPasa-2.	47
Figura 7	Cuantificación de DNA genómico en fracciones subcelulares.	50
Figura 8	Distribución subcelular de marcadores de fracciones de hígado de rata.	52
Figura 9	Distribución subcelular de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2.	53
Figura 10	Microfotografía de núcleos aislados de hígado de rata.	56

Figura 11	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de precipitación de microtúbulos mediada por taxol.	63
Figura 12	Asociación de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 con microtúbulos en hígado de rata.	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Concentración hepática de Fru-2,6-P ₂ bajo diferentes condiciones metabólicas en rata.	8
Tabla 2	Purificación de PPI-PFK de tubérculo de patata.	44
Tabla 3	Determinación de la actividad de enzimas marcadores de fracción celular en núcleos aislados de hígado de rata.	57
Tabla 4	Determinación de las actividades quinasa y bisfosfatasa de la enzima PFK-2/FBPasa-2 en núcleos aislados de hígado de rata	58
Tabla 5	Determinación de las actividades de las enzimas PFK-1, FBPasa-1 y aldolasa en núcleos aislados de hígado de rata.	61

INDICE DE ABREVIATURAS

AKAP	proteína de anclaje de PKA
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
FBPasa-1	fructosa-1,6-bisfosfatasa
FBPasa-2	fructosa-2,6-bisfosfatasa
Fru-1,6-P ₂	fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-2,6-P ₂	fructosa-2,6-bisfosfato
Fru-6-P	fructosa-6-fosfato
G-6-Pasa	glucosa-6-fosfatasa
GAPDH	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GFP	proteína fluorescente verde
GKRP	proteína reguladora de glucoquinasa
Glu-6-P	glucosa-6-fosfato
GPD	glicerolfosfato deshidrogenasa
GRE	elemento de respuesta a glucocorticoides
HNF	factor nuclear hepático
K/B	razón quinasa/bisfosfatasa
K _a	constante de activación
K _i	constante de inhibición
K _m	constante de Michaelis-Menten
LDH	lactato deshidrogenasa

MAP-2	proteína asociada a microtúbulos
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
NLS	señal de localización nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
PEP	fosfo- <i>enol</i> -piruvato
PEPCK	fosfo- <i>enol</i> -piruvato carboxiquinasa
PFK-1	6-fosfofructo-1-quinasa
PFK-2	6-fosfofructo-2-quinasa
PI-3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA	proteína quinasa dependiente de cAMP
PKB	proteína quinasa B
PP1	proteína fosfatasa 1
PP2A	proteína fosfatasa 2A
PP2B	proteína fosfatasa 2B
PPi	pirofosfato inorgánico
PPi-PFK	6-fosfofructo-1-quinasa dependiente de pirofosfato
TPI	triosa-fosfato isomerasa
V_{\max}	velocidad máxima
Xu-5-P	xilulosa-5-fosfato

1. RESUMEN

6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2) es una enzima bifuncional clave en el mecanismo regulador del metabolismo glucídico. Esta enzima controla los niveles intracelulares de fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), metabolito que es un potente activador de la enzima glicolítica fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) e inhibidor de la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1). La síntesis y degradación de Fru-2,6-P₂ por parte de PFK-2/FBPasa-2 esta regulada por señalización hormonal y metabólica mediada por fosforilación y desfosforilación dependiente de proteína quinasa A (PKA) y de proteína fosfatasa 2A (PP2A), respectivamente, por lo que se considera a la enzima bifuncional como la conexión entre las vías de transducción de señales y el metabolismo de la glucosa.

Durante la última década se ha descrito que diferentes enzimas del metabolismo se encuentran asociadas a elementos estructurales de la célula. Sin embargo, la localización subcelular y la asociación de PFK-2/FBPasa-2 a estos elementos estructurales no ha sido estudiada. Para ello se utilizó como herramienta la centrifugación diferencial.

En hígado de rata se determinó que cerca del 85 % de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 se encuentran en la fracción citosólica. Interesantemente, un 12 % de la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 se localizó en la fracción nuclear. Este resultado fue confirmado al encontrar actividad quinásica de PFK-2/FBPasa-2 en núcleos purificados mediante gradiente de sacarosa. Estos datos nos permiten sugerir que esta enzima podría estar regulando la concentración de Fru-2,6-P₂ a nivel nuclear. Nuestro laboratorio ha demostrado que FBPasa-1 trasloca al núcleo en células hepáticas, por lo que es interesante la idea que su inhibidor (Fru-2,6-P₂) pudiera ser sintetizado en este compartimiento celular.

Por otra parte, al analizar la fracción citosólica mediante precipitación de microtúbulos mediada por taxol, se determinó que cerca del 30% de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en esta fracción se encuentra asociada a microtúbulos. Sabiendo que las enzimas PFK-1, PKA y PP2A se encuentran también asociadas a microtúbulos en el citosol, se postula que esta compartimentalización enzimática sería un importante mecanismo involucrado en mantener la especificidad y fidelidad de la transmisión de la señal hormonal, para así producir el efecto fisiológico apropiado sobre el metabolismo glucídico.

En resumen, los resultados indican que gran parte de la enzima PFK-2/FBPasa-2 se encuentra particulada en la célula hepática, apoyando el concepto de compartimentalización y organización subcelular del metabolismo.

SUMMARY

6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) is a key bifunctional enzyme involved in the regulatory mechanism of glucose metabolism. This enzyme regulates intracellular levels of fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), metabolite which is a potent activator of the glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), and inhibitor of the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase-1). Synthesis and degradation of Fru-2,6-P₂ by PFK-2/FBPase-2 is regulated by hormonal and metabolic signaling mediated by both protein kinase A (PKA) phosphorylation and protein phosphatase 2A (PP2A) desphosphorylation. Thus, PFK-2/FBPase-2 is the connection between signal transduction and glucose metabolism.

During the last decade it has been described that different metabolic enzymes are associated with structural elements in the cell. Nevertheless the PFK-2/FBPase-2 subcellular localization and its association with structural elements have not been studied. For this purpose we used as a tool differential centrifugation.

In rat liver we found about that 85% of PFK-2/FBPase-2 activity was localized in the cytosolic fraction. Interestingly, 12% of PFK-2 activity was localized in the nuclear fraction. This results was confirmed by measuring PFK-2 activity in nuclei purified by saccharose gradient centrifugation. These data suggest us that PFK-2/FBPase-2 should be regulating Fru-2,6-P₂ levels in nuclei. In view of our laboratory have demonstrated than FBPase-1 translocates into nuclei in hepatic cells, seems interesting that its inhibitor would be synthesized in this compartment.

Analysis of cytosolic fraction by taxol microtubules precipitation assays revealed that about 30% of PFK-2/FBPase-2 activity in this fraction is associated with microtubules. Knowing that

PFK-1, PKA, and PP2A are also associated with microtubules, we postulate that this enzymatic compartmentalization would be an important mechanism involved in specificity and fidelity of hormonal signal transmission, to produce the appropriate physiological effect on glucose metabolism.

In summary, our results revealed that an important fraction of PFK-2/FBPase-2 is particulated within hepatic cells, supporting the metabolic compartmentalization and subcellular organization concept.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Fructosa-2,6-bisfosfato.

En los organismos vivos el equilibrio entre consumo y síntesis de energía se encuentra altamente regulado, adaptándose de esta forma a la disponibilidad y demanda de energía. Dentro del amplio campo del metabolismo celular, uno de los procesos mayormente estudiado es el metabolismo de carbohidratos, destacándose la glicólisis o degradación de glucosa para la obtención de energía, y la gluconeogénesis o síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos.

Para evitar ciclos fútiles en los que la glucosa sea simultáneamente degradada por la glicólisis y resintetizada por la gluconeogénesis, las enzimas que catalizan reacciones irreversibles de cada una de las vías se encuentran reguladas recíprocamente por efectores alostéricos. Una de las principales etapas de regulación de la glicólisis es la reacción catalizada por la enzima 6-fosofructo-1-quinasa (PFK-1; E.C.2.7.1.11), la cual cataliza la síntesis irreversible de Fru-1,6-P₂ a partir de Fru-6-P y ATP. Por otro lado, la conversión de Fru-1,6-P₂ en Fru-6-P y Pi catalizada por la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1; E.C. 3.1.3.11) es uno de los principales puntos de regulación de la gluconeogénesis. Por lo tanto regulando la actividad de éstas dos enzimas se puede desplazar el equilibrio hacia la síntesis o degradación de glucosa.

Fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂) es una de las principales moléculas encargadas de controlar este equilibrio, la cual fue descubierta debido al efecto activador que tiene glucagón sobre la actividad de PFK-1 (Pilkis *et al*, 1982). Este metabolito se encuentra presente en todos los tejidos de mamíferos, y ha sido también detectado en levaduras, vegetales y tripanosomatidos, no así en bacterias. Fru-2,6-P₂ es un potente activador alostérico de la enzima glicolítica PFK-1, mostrando un valor de K_a bajo condiciones fisiológicas de 0,024 μM y 0,010 μM para las

isoformas hepática y muscular, respectivamente (Uyeda *et al*, 1981). Este efecto activador de Fru-2,6-P₂ sobre la actividad de PFK-1 se logra al disminuir el efecto inhibitorio de ATP y citrato, y al disminuir el valor de K_m para Fru-6-P (Kitajima *et al*; 1984). También este metabolito actúa sinérgicamente con AMP en activar a PFK-1 (Van Schaftingen *et al*; 1981c).

A su vez, Fru-2,6-P₂ es un potente inhibidor de la enzima gluconeogénica FBPasa-1, mostrando un valor de K_i de 1,5 μM para la isoforma hepática (Van Schaftingen y Hers, 1981d) Mizunuma. *et al.*, 1986). Esta inhibición ocurre al incrementar el valor de K_m para Fru-1,6-P y potenciar el efecto inhibitorio de AMP (Pilkis *et al*; 1981a). Se cree que este poder inhibitorio ocurre por efecto competitivo con su sustrato Fru-1,6-P₂ (Kitajima y Uyeda; 1983; Reyes *et al*, 1987 y 1993). De esta forma, altas concentraciones de Fru-2,6-P₂ activarían la degradación de glucosa, mientras que bajas concentraciones de éste inducirían la síntesis de glucosa en tejidos gluconeogénicos como el hígado. Por otro lado, en los tejidos en donde no se expresa FBPasa-1, y en donde por lo tanto no ocurre gluconeogénesis, Fru-2,6-P₂ actúa como estimulador de la glicólisis en situaciones en donde se requiere un mayor consumo de energía. Este concepto general de Fru-2,6-P₂ como interruptor metabólico concuerda con lo expuesto en la **tabla 1**, en donde se muestran las concentraciones de Fru-2,6-P₂ en hígado bajo distintas condiciones metabólicas.

2.2 Síntesis y degradación de Fru-2,6-P₂: la enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2.

Los niveles intracelulares de Fru-2,6-P₂ son controlados por la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa. La síntesis de Fru-2,6-P₂ a partir de Fru-6-P y ATP es catalizada en el dominio quinasa de la enzima (PFK-2, EC 2.7.1.105; Van Schaftingen y Hers, 1981b), mientras que la degradación de Fru-2,6-P₂ para generar Fru-6-P y Pi es catalizada en el dominio bisfosfatasa (FBPasa-2; E.C.3.1.3.46; Van Schaftingen *et al*, 1982a). Como se puede

apreciar se trata de una enzima bifuncional, en la cual ambas actividades catalíticas pertenecen a dominios separados en cada subunidad de la misma proteína (Van Schaftingen *et al*; 1986).

La enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2 de hígado de rata es una proteína dimérica de masa molecular 110 kDa, formada por dos subunidades idénticas de 55 kDa compuesta cada una de ellas por 470 aminoácidos (El-Maghrabi *et al*, 1982b) (Figura 1). La reacción de fosforilación es catalizada en el dominio del extremo amino-terminal, mientras que la reacción de desfosforilación es llevada a cabo en el dominio del extremo carboxilo-terminal (Lively *et al*, 1988).

La enzima hepática de rata ha sido purificada a homogeneidad y se han caracterizado sus propiedades cinéticas. La actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 muestra una V_{\max} de 113 mU/mg, y un valor de K_m para Fru-6-P y ATP de 35 y 150 μ M respectivamente (Pilkis *et al*, 1995). Es activada por fosfato inorgánico y PEP, e inhibida por α -glicerol-fosfato y citrato (Pilkis *et al*, 1983). La reacción de fosforilación involucra la formación de un complejo terciario que incluye a Fru-6-P y ATP (Kitajima *et al*, 1984). Por otro lado, la actividad fosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 muestra una V_{\max} de 45 mU/mg, y un valor de K_m para Fru-2,6-P₂ menor a 0,1 μ M (Pilkis *et al*; 1983). Es activada por α -glicerol fosfato y por fosfato inorgánico, e inhibida por Fru-6-P (Van Schaftingen *et al*, 1982a). La reacción de desfosforilación ocurre vía un intermediario fosfo-histidina covalente formado en la reacción con Fru-2,6-P₂ (Mizoguchi *et al*, 1999).

La concentración intracelular de Fru-2,6-P₂ se encuentra regulada por el balance entre las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en hígado (razón K/B), el cual está determinado por las características cinéticas de la enzima (ver más adelante) y por el estado de fosforilación de la enzima en la serina en posición 32 (Ser-32; El-Maghrabi y Pilkis, 1984). Así

Tabla 1: Concentración hepática de Fru-2,6-P₂ bajo diferentes condiciones metabólicas en rata.

Condición	Concentración de Fru-2,6-P₂ (nmol/gr)
Normal ^(a)	8,2
Ayuno 24 h ^(a)	1,5
Ayuno 72 h ^(a)	0,9
Ayuno 72 h, luego alimentada 48 h ^(a)	25,6
Diabetes ^(a)	1,4
Insulina ^(b)	15,3
Glucagón ^(c)	1,4
Glucosa ^(d)	11,4

Datos extraídos desde: ^(a), Pilkis *et al*, 1983; ^(b), Assimacopoulos-Jeannet y Jeanrenaud, 1990; ^(c), Rosa *et al*, 1998; ^(d), Nishimura *et al*, 1994.

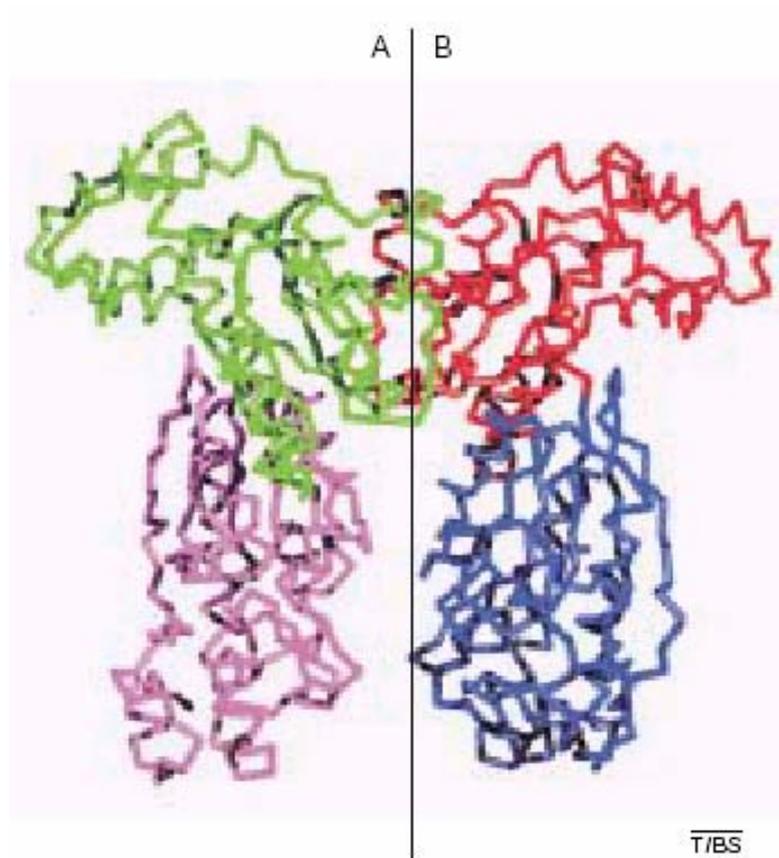


Figura 1: Estructura tridimensional de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2). La línea media divide a la proteína en sus dos subunidades denominadas A y B en la presente figura. Los dominios quinasa de ambas subunidades se representan en color rojo y verde, y los dominios bisfosfatasa en azul y violeta. Extraído desde la publicación de Okar *et al.* (2001).

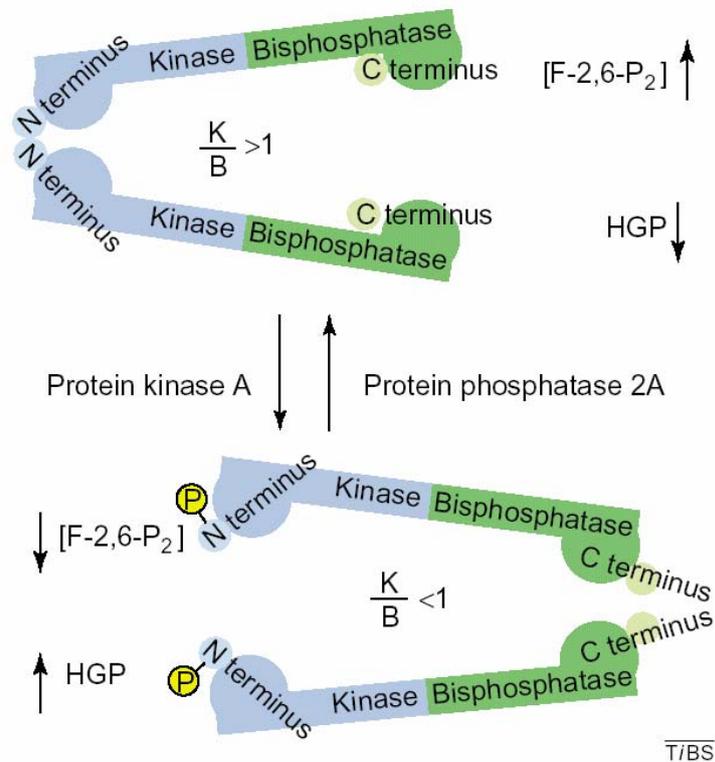


Figura 2: Esquema de la regulación de PFK-2/FBPasa-2 hepática por fosforilación. La fosforilación de PFK-2/FBPasa-2 en el residuo serina-32 (representado en amarillo) por PKA en respuesta a glucagón activa el dominio bisfosfatasa e inactiva el dominio quinasa, haciendo que la razón K/B sea menor a 1, y por lo tanto provocando la disminución de la concentración de Fru-2,6-P₂ intracelular. Por el contrario, la desfosforilación por PP2A en respuesta a glucosa activa al dominio quinasa e inactiva el bisfosfatasa, haciendo que el valor de K/B sea mayor a 1, y por lo tanto aumentando los niveles intracelulares de Fru-2,6-P₂. Esquema extraído desde la publicación de Okar *et al.* (2001).

por ejemplo, la PFK-2/FBPasa-2 hepática presenta un valor de la razón entre las actividades quinasa y bisfosfatasa (K/B) de 2,24 en estado desfosforilado, mientras que en estado fosforilado es de 0,55 (Assimacopoulos-Jeannet y Jeanrenaud, 1990). Esta fosforilación ocurre en respuesta a glucagón y es catalizada por proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), la cual incorpora 2 moles de fosfato por mol de enzima homodimérica (ver mas adelante). De esta manera Fru-2,6-P₂ se convierte en la conexión entre la vía de transducción de señales hormonales y la vía metabólica.

La fosforilación en Ser-32 en respuesta a glucagón produce la activación del dominio bisfosfatasa e inactivación del dominio quinasa, disminuyendo el valor de la razón K/B la cual llega a ser menor a 1, y por consiguiente produce un decaimiento en la concentración intracelular de Fru-2,6-P₂ (ver figura 2). Esta disminución de los niveles de Fru-2,6-P₂ inducen a disminución del consumo y aumento de la síntesis de glucosa por parte del tejido hepático. Por el contrario, insulina y glucosa producen desfosforilación de la Ser-32 por proteína fosfatasa 2A (PP2A) dependiente de xilulosa-5-P, produciendo la activación del dominio quinasa e inactivación del dominio bisfosfatasa; aumenta el valor del cociente K/B, y por ende, aumentan los niveles intracelulares de Fru-2,6-P₂ (Nishimura y Uyeda, 1995). De esta forma se estimula el consumo y se inhibe la síntesis de glucosa por parte del hígado.

2.3 Distintas isoformas para distintas necesidades.

Hasta hoy se ha descrito la existencia de varias isoformas de PFK-2/FBPasa-2, las cuales han sido aisladas e identificadas de tejidos como hígado, músculo esquelético, corazón, cerebro, testículo, tejido adiposo, y placenta, entre otros, no siendo exclusivas del tejido en el cual se expresan. Por ejemplo, en hígado se expresa mayoritariamente la isoforma hepática, pero cerca

de un 10 % del total de PFK-2/FBPasa-2 corresponde a la isoforma muscular (Colosia *et al*, 1988). Estas isoformas se diferencian por el gen que las codifica, su composición aminoacídica, el tejido donde mayoritariamente se expresan, sus características cinéticas, y por su capacidad de ser fosforiladas.

En términos generales, estructuralmente casi todas las isoformas descritas poseen un núcleo estructural similar altamente conservado. Sin embargo es en los dominios quinasa y bisfosfatasa, localizados en el extremo amino y carboxilo terminal respectivamente, donde se presentan las mayores diferencias entre estas isoformas. Mediante el análisis de alineamiento de secuencias de las isoformas de PFK-2/FBPasa-2 se ha determinado que las isoformas que comparten mayor identidad de secuencia con la isoforma hepática son la muscular (90 % de identidad), siguiendo luego la renal (82 %), la testicular (85 %) y la cardíaca (73 %). La isoforma ubicua es la que comparte menor identidad de secuencia con la isoforma hepática.

En el ámbito funcional, las diferencias más importantes entre las diversas isoformas están relacionadas con las características cinéticas de cada una de ellas, siendo importante el valor de la razón K/B . Este valor está dado por el cociente entre la V_{\max} de la actividad quinasa y el valor de V_{\max} de la actividad bisfosfatasa. Por lo tanto un valor K/B menor a 1 indicaría que esa determinada isoforma tiene mayor capacidad de degradar Fru-2,6-P₂. Esta isoforma sería importante en estimular la síntesis de glucosa, mientras que una isoforma con un valor K/B mayor a 1 estaría mayoritariamente destinada para la degradación de glucosa, existiendo por lo tanto isoformas “glicolíticas” e isoformas “gluconeogénicas”. Entre las primeras destacan la cerebral, la cardíaca, la tumoral o ubicua, y la placentaria, mientras que entre las últimas se encuentran la hepática y la testicular.

Una de las desigualdades importantes entre las diferentes isoformas está dada por la capacidad de ser fosforilada por proteínas quinasas. Como ya se ha mencionado, la isoforma hepática es fosforilada por PKA resultando en la activación del dominio bisfosfatasa (Van Schaftingen *et al*, 1981a), y desfosforilada por PP2A dando como resultado la activación del dominio quinasa (Nishimura *et al*, 1994). Sin embargo, la isoforma muscular es incapaz de ser fosforilada por PKA, debido a que en lugar de poseer la serina en la posición 32 posee una alanina, lo cual impide que el dominio bisfosfatasa sea activado (Kitamura *et al*, 1989). Por otro lado, la isoforma cardiaca es fosforilada en el extremo carboxilo terminal en respuesta a insulina por proteína quinasa B (PKB), resultando, a diferencia de la isoforma hepática, en la activación del dominio quinasa (Deprez *et al*, 2000), y por lo tanto la fosforilación activa la degradación de glucosa por parte de la célula cardiaca.

2.4 Los genes de PFK-2/FBPasa-2.

Las diferentes isoformas de PFK-2/FBPasa-2 son generadas por empalme alternativo de cuatro genes diferentes, denominados PFKFB1-4 (Darville *et al*, 1989; Darville *et al*, 1991; Navarro-Sabate *et al*, 2001; Manzano *et al*, 1999). Las isoformas hepática, muscular y fetal están codificadas por el gen 1, las isoformas cardiaca, renal y pancreática por el gen 2, la cerebral, ubicua y tumoral por el gen 3, y la testicular por el gen 4.

El gen mas estudiado es el gen PFKFB-1, el cual posee un tamaño de 60 kb, y está compuesto por 15 exones (Lange *et al*, 1989). Este gen posee tres promotores, denominados L, M y F, los cuales dan origen a tres mRNAs diferentes. Estos mRNAs difieren en su extremo 5', compartiendo los otros 12 exones (del 2 al 13), de los cuales 6 codifican para el dominio PFK-2, y los otros 6 para el dominio FBPasa-2. Un exon adicional está presente en el extremo 5' (exon 1L) en el mRNA L, el cual codifica para la isoforma hepática, y otro diferente, el exon 1M, en el

mRNA M, el cual codifica para la isoforma muscular. De esta manera la isoforma M tiene la misma secuencia que la isoforma L, excepto en el extremo amino terminal, donde los primeros 32 residuos, incluyendo la serina en posición 32 necesaria para la fosforilación mediada por PKA, están reemplazados por un péptido que no posee el sitio de fosforilación. La isoforma L es expresada mayoritariamente en tejido hepático y adiposo (Bruni *et al*, 1999), mientras que la isoforma M es expresada en músculo esquelético (Crepin *et al*, 1992). Por otro lado, el promotor F se expresa principalmente en fibroblastos, tejido fetal y en células en estado de proliferación.

Un importante mecanismo de regulación de la actividad de PFK-2/FBPasa-2 esta dado por el control sobre la expresión genética de la enzima. Nuevamente el gen mas estudiado es el gen PFKFB-1, cuya expresión es estimulada por glucocorticoides, efecto que es inhibido por insulina, glucosa y estímulo mitogénico. Los glucocorticoides e insulina controlan la expresión del gen a través del Elemento de Respuesta a Glucocorticoides (GRE) localizado en el primer intrón, (Lange *et al*, 1992). La unión del glucocorticoide a su receptor en el GRE induce la unión del factor de transcripción HNF-3 (Zimmermann *et al*, 1997). Insulina inhibe la unión del glucocorticoide a GRE vía transducción de señales que parece involucrar a la vía JNK-SAPK (De Los Pinos *et al*, 2001), pero no a las vías PI-3K o MAPK (Pierreux *et al*, 1998). Otros estudios sobre la regulación transcripcional de este gen dieron como producto el descubrimiento del factor de transcripción HNF-6 (Lemaigre *et al*, 1993), el cual estimula la expresión de proteínas de secreción, citocromo P450, y enzimas relacionadas con el metabolismo de glucosa, incluidas PFK-2/FBPasa-2, PEPCCK, glucosa-6-Pasa y glucoquinasa. Tambien esta descrito que glucosa aumenta la concentración de mRNA correspondiente a la isoforma L en líneas celulares hepáticas (Dupriez *et al*, 1997)

Por otro lado, glucagón inhibe la expresión de este gen por mecanismos pre y post-traduccionales (Rosa *et al*, 1993), los cuales implican disminución de la síntesis de mRNA y degradación de la enzima.

La expresión del gen PFKFB-3, cuyo producto es la isoforma con mayor razón K/B, es inducida por progestinas e insulina. Importante es la activación de este gen por hipoxia a través del factor de transcripción HIF-1 (Minchenko *et al*, 2002).

2.5 Regulación de la actividad de PFK-2/FBPasa-2 por fosforilación.

La actividad de la enzima bifuncional esta finamente regulada por dos grandes mecanismos: uno a largo plazo, constituido por la regulación de la expresión de las distintas isoformas, y otro a corto plazo, dado por la presencia de metabolitos inhibidores y activadores, y principalmente por fosforilación y desfosforilación dependiente de proteínas de transducción de señales.

La isoforma hepática es fosforilada por PKA en respuesta a glucagón (Van Schaftingen *et al*, 1981a). No se conoce de otra proteína quinasa que sea capaz de fosforilar a PFK-2/FBPasa-2 hepática. La fosforilación de la enzima produce una disminución de la afinidad de ésta por Fru-6-P en el dominio quinasa, e incrementa la V_{\max} para la degradación de Fru-2,6-P₂ en el dominio bisfosfatasa (Sakakibara *et al*, 1984), por lo tanto la fosforilación afecta recíprocamente ambas actividades. La regulación por PKA esta mediada por una combinación de mecanismos de control electrostáticos, conformacionales y autorregulatorios. Así, el movimiento de la serina-32 fosforilada en el dominio quinasa de PFK-2/FBPasa-2, donde podría repeler el grupo fosfato del sustrato, podría explicar el incremento de la K_m para Fru-6-P. Al mismo tiempo, un cambio conformacional transmitido hacia el dominio bisfosfatasa podría explicar la activación de este dominio por incremento de la V_{\max} .

PFK-2/FBPasa-2 es un excelente sustrato para PKA, mostrando un valor de K_m de 1-2 μM , mientras que piruvato quinasa, también un excelente sustrato, muestra un valor de K_m de 17 μM . Esta fosforilación de PFK-2/FBPasa-2 es inhibida en un 60 % por la adición de 80 μM Fru-2,6- P_2 , mientras que Fru-6-P casi no produce efecto (Pilkis *et al.*, 1983). De esta forma, en ocasiones en las cuales la concentración de Fru-2,6- P_2 es alta, como por ejemplo después de una alta ingesta de carbohidratos, Fru-2,6- P_2 inhibiría la fosforilación de la enzima de tal forma de mantener una alta tasa de glicólisis.

PFK-2/FBPasa-2 hepática es desfosforilada por proteína fosfatasa 2A (PP2A), no conociéndose otra proteína fosfatasa que cumpla esta función. Esta desfosforilación ocurre en respuesta a insulina (Assimacoupoulos-Jeannet y Jeanrenaud, 1990), o a glucosa (Nishimura y Uyeda, 1994), produciendo un incremento en la concentración hepática de Fru-2,6- P_2 vía el aumento de la razón K/B hasta un valor cercano a 5 de las actividades PFK-2/FBPasa-2, produciendo una disminución en la producción hepática de glucosa. Esta desfosforilación no es atribuida a una variación de la actividad de PKA o en los niveles de cAMP en tejido hepático, ya que ni los niveles de este nucleótido ni la actividad de PKA se ven afectados por insulina.

La desfosforilación de PFK-2/FBPasa-2 por PP2A en respuesta a glucosa es dependiente de Xu-5-P. PP2A es capaz de desfosforilar a PFK-2/FBPasa-2, fosforilasa a y piruvato quinasa, con valores de K_m de 0,8 μM , 3,7 μM y 2,2 μM , respectivamente. Sin embargo sólo la desfosforilación de la enzima bifuncional es activada por Xu-5-P, con un valor de K_a de 20 μM (Nishimura y Uyeda, 1995). El mecanismo por el cual Xu-5-P activaría a PP2A no está claro: una posibilidad sería que debido a que Xu-5-P activa sólo la desfosforilación de PFK-2/FBPasa-2, la pentosa-P podría unirse a la enzima bifuncional, y este complejo sería mejor sustrato para la fosfatasa que la enzima libre. De esta forma, al aumentar los niveles de glucosa en hígado,

aumentan también los niveles de pentosas-P, produciéndose la activación de PP2A, con la consecuente desfosforilación de PFK-2/FBPasa-2.

2.6 La organización subcelular de enzimas como mecanismo regulador.

La mayor parte de nuestro conocimiento acerca de las características de las enzimas involucradas en el metabolismo proviene de estudios realizados *in vitro*, en los cuales la información se ha obtenido a partir de experimentos desarrollados con proteínas purificadas o con extractos proteicos obtenidos de tejidos. En ambos procesos es necesaria la destrucción celular, perdiéndose así la integridad estructural de la célula. De esta manera se consideran a las vías metabólicas y las enzimas involucradas en ellas como eventos independientes, y generalmente no se considera el medio circundante en el cual estas reacciones se llevan a cabo en la célula, especialmente el efecto de macromoléculas como proteínas o estructuras celulares con las cuales comparten el medio. Es por esta razón que se ha considerado por mucho tiempo a las enzimas citoplasmáticas como proteínas solubles disueltas uniformemente en un medio acuoso. Sin embargo debido a consideraciones experimentales y teóricas se ha propuesto que estas enzimas se encontrarían de forma organizada al interior de la célula, lo cual aseguraría la compartimentalización de las vías metabólicas. Esta organización estaría físicamente conformada por complejos multienzimáticos secuenciales estabilizados por fuerzas débiles, los cuales a su vez estarían asociados a otras estructuras celulares, tales como citoesqueleto o membranas celulares (ver revisiones: Ovadi y Srere, 2000; Srere, 1987; Srere y Ovadi, 1990) Esta organización subcelular ofrecería grandes ventajas a la célula, como por ejemplo la segregación espacial de vías metabólicas diferentes u opuestas, tales como glicólisis y gluconeogénesis, las cuales ocurren ambas en el citosol celular; mediante la compartimentalización se evitarían ciclos fútiles

en los cuales se esté sintetizando y degradando glucosa simultáneamente. Otra importante ventaja sería la canalización de metabolitos al interior de las vías metabólicas, evitándose de esta forma su libre difusión al interior de la célula.

La existencia de complejos multienzimáticos está ampliamente descrita para las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs, donde se ha demostrado interacción entre seis de las ocho enzimas que conforman la vía (Morgunov y Srere, 1998). Además se ha demostrado que todas estas enzimas se encuentran asociadas a la superficie interna de la membrana mitocondrial interna.

Si bien no se ha demostrado la existencia de complejos multienzimáticos en glicólisis y gluconeogénesis, sí se han demostrado asociaciones de tipo enzima-enzima, enzima-citoesqueleto y enzima-membrana celular. Hexoquinasa, por ejemplo, se encuentra en gran parte asociada a microtúbulos en tejido cerebral (Wagner *et al.*, 2001) y a la membrana mitocondrial en tejido renal (Parry y Pedersen, 1984); en este estudio se informa que la enzima es solubilizada por glucosa-6-P y por altas concentraciones de sal. La enzima G-6-Pasa se encuentra unida a la membrana del retículo endoplasmático, siendo enzima marcadora de este organelo en ensayos de fraccionamiento celular. Por otra parte PFK-1, una de las enzimas metabólicas a la cual se ha dedicado gran cantidad de estudios relacionados a posibles asociaciones proteína-proteína, se encuentra asociada a caveolina-3 en miotubulos esqueléticos diferenciados (Scherer y Lisanti, 1997), a actina en tejido muscular (Roberts y Somero, 1989), y a microtúbulos en tejido cerebral (Vertessy *et al.*, 1997); en este último trabajo se indica que PFK-1 estaría conformando un sistema que involucraría una unión alternativa a microtúbulos junto con aldolasa. Por otro lado Stephan (1986) ha descrito la existencia de un mini-complejo enzimático unido a miofibrillas en tejido esquelético, conformado por triosa-fosfato isomerasa (TPI), aldolasa y gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa (GAPDH). Trabajos realizados en nuestro laboratorio demuestran que las enzimas FBPasa-1 (Saez *et al*, 1996; Yañez *et al.*, 2003 y 2004) y aldolasa B (Saez y Slebe, 2000; Yañez *et al*, 2005) se localizan en la periferia nuclear y en el núcleo, indicando que estas enzimas se encontrarían asociadas a elementos particulados en la célula.

2.7 Organización Subcelular de las Vías de Transducción de señales.

Varios autores proponen que esta organización subcelular no incluiría solamente al metabolismo, sino también a otros procesos celulares secuenciales, entre los cuales se incluye las cascadas de transducción de señales (ver revisiones: Walsh y Van Patten, 1994; Hunter, 2000; Alto *et al.*, 2002; Rual *et al*, 2005). Esta organización subcelular daría origen al concepto de mapa interactoma (ver figura 3), el cual se definiría como la colección de interacciones detectables entre proteínas (Rual *et al*, 2005).

La célula se encuentra sometida a varias señales simultáneamente, siendo crucial la especificidad y fidelidad de la transmisión para producir la respuesta fisiológica adecuada. Esto es especialmente importante en procesos que involucran fosforilación y desfosforilación de proteínas, pues sólo un reducido número de proteínas catalizan estas reacciones, las cuales poseen un amplio espectro de sustratos proteicos con características muy distintas. De esta forma una de las principales estrategias utilizadas por la célula para mantener esta especificidad es la compartimentalización de las enzimas de transducción de señales.

Se sabe también que el citoesqueleto está involucrado de manera significativa en los mecanismos de señalización intracelular (ver revisión de Forgacs *et al*, 2004). Esto ha sido demostrado mediante experimentos en los cuales se observa que al desensamblar la compleja red del citoesqueleto, mediante la utilización de fármacos, la célula pierde la capacidad de

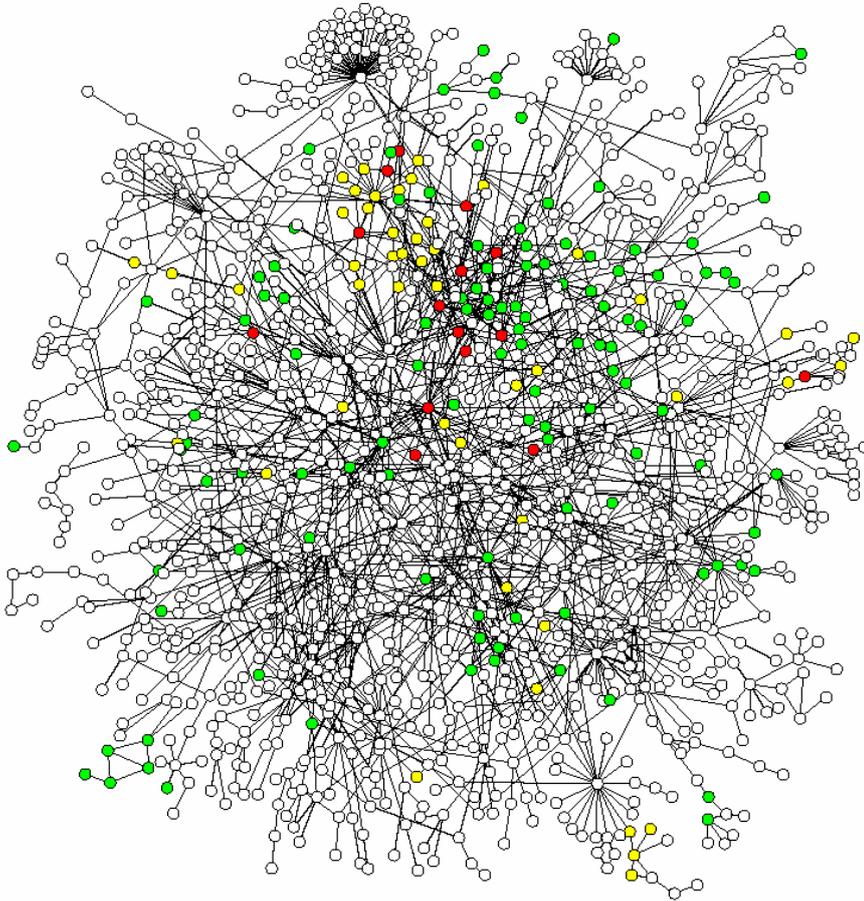


Figura 3: Ejemplo de mapa de interacciones entre proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*. El presente mapa está confeccionado a partir de una base de datos de interacciones proteína-proteína obtenida a través de la técnica de doble híbrido en levadura, y comprende la interacción de 1458 proteínas. Cada círculo en la figura representa a una proteína, y cada línea que une estos círculos representa una interacción. Los círculos en verde representan proteínas del citoesqueleto, los amarillos a proteínas de las vías de transducción de señales, y los rojos a proteínas pertenecientes a ambos grupos. Extraído desde la publicación de Forgacs *et al.* (2004).

transmisión de señalización intracelular y de respuesta hormonal. Un importante ejemplo es la significativa disminución en el efecto estimulador por parte de insulina o glucagón sobre el transporte de aminoácidos provocada por colchicina y vinblastina en hepatocitos (Prentki *et al*, 1981). Por lo tanto se postula que una de las formas más importantes involucradas en el mantenimiento de la fidelidad y especificidad de la señalización intracelular sería la unión transitoria o permanente de proteínas de transducción de señales a las redes del citoesqueleto, permitiendo de esta manera un alto grado de organización en la señalización intracelular.

PKA, al igual que PP2A, son proteínas de transducción de señales y reguladores directos de la actividad de PFK-2/FBPasa-2, y se encuentran involucradas en una amplia gama de procesos celulares, entre los cuales se incluyen señalización celular, regulación de la expresión genica, y progresión del ciclo celular, entre otros. Entre los sustratos de PKA podemos encontrar proteínas con funciones tan diversas como glicógeno sintasa (síntesis de glicógeno), acetil-CoA carboxilasa (síntesis de ácidos grasos), histona H1 (regulación de expresión génica), receptor de factor de crecimiento epidermal (carcinogénesis), o la proteína ribosomal S6. PP2A, por otra parte, tiene como función la desfosforilación de proteínas también con distintas funciones tales como piruvato quinasa (metabolismo de carbohidratos), RelA (control de transcripción genica), Cdc2 (progresión del ciclo celular), o Bcl-2 (control de la apoptosis). De esta forma, la colocación de PKA y PP2A con sus respectivos sustratos sería un potencial mecanismo que explicaría cómo estas proteínas, con amplia especificidad de sustratos, pueden mediar diferentes procesos celulares (Walsh y Van Patten, 1994; Alto *et al.*, 2002; Rual *et al*, 2005; Pawson y Scott, 1997).

PKA es una proteína mayoritariamente citosólica, aunque también se encuentra en el núcleo actuando como factor de transcripción (Montminy y Bilezikjian, 1987; Grove *et al*, 1987). Su localización subcelular no es aleatoria, encontrándose unida a otras estructuras celulares

mediante la asociación a un grupo de proteínas denominadas A-Kinase Anchoring Proteins (AKAP; ver revisiones Dell'Aqua y Scott, 1997; Diviani y Scott, 2000). Una de las principales estructuras a las cuales PKA estaría unida sería el citoesqueleto, mas específicamente microtúbulos, unión que ocurre entre la subunidad reguladora de PKA y una clase de AKAP denominada MAP-2 (Carr *et al*, 1992, Diviani y Scott, 2000). Se ha demostrado que cerca del 35 % del total de PKA de la célula se encuentra asociada indirectamente a microtúbulos (Theurkauf y Vallee, 1982)

Por otro lado, PP2A, al igual que PKA, es una proteína mayoritariamente citosólica, encontrándose pequeñas pero significativas cantidades de ella en el núcleo (Jakes *et al*, 1986). Su localización subcelular no es aleatoria, siendo importante en su localización su interacción con la subunidad B, la cual es responsable de su interacción con otras estructuras celulares (Tehrani *et al*, 1996). Se ha demostrado que entre un 50 y un 75 % del total de PP2A presente en la célula se encuentra asociada a microtúbulos a través de su subunidad B (Sotang *et al*, 1995 y 1999).

Existen en la literatura varias pruebas experimentales de la asociación y organización subcelular de proteínas de señalización con funciones opuestas. Un buen ejemplo de esta organización ocurre con el receptor NMDA en neuronas (Westphal *et al*, 1999) el cual se encuentra unido simultáneamente a PP1 y a PKA, mediando así la localización de funciones opuestas requeridas para modular la función del receptor NMDA. Por otro lado, en tejido muscular la proteína AKAP se asocia a PKA, las fosfatasas PP1 y PP2A, fosfodiesterasa y al receptor RyR. Dodge (2001) señala que la enzima fosfodiesterasa, la cual cataliza el metabolismo de cAMP, se encuentra presente en complejos de señalización junto a PKA; de esta forma se mantendría un control sobre los niveles locales de cAMP. Trabajos de Cohgan *et al* (1995)

indican que PKA y PP2B se encuentran ambas ancladas a AKAP 79 en células neuronales, asociación que sería responsable de regular la fosforilación de sus sustratos.

2.8 Fundamento del presente trabajo.

Se ha descrito que PFK-2/FBPasa-2 tendría una localización subcelular citosólica. Esto debido a las siguientes consideraciones experimentales:

a) En los procesos de purificación de la enzima desde tejido hepático de rata, PFK-2/FBPasa-2 se obtiene del sobrenadante del proceso de centrifugación a 100.000 x g por 1 hora. (El-Maghrabi *et al*, 1982a).

b) Mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos anti-PFK-2/FBPasa-2 en células FAO, se detecta señal en el citoplasma de la célula (Argaud *et al*, 1995).

c) Mediante interacción proteína-proteína PFK-2/FBPasa-2 retendría a glucoquinasa en el citoplasma de hepatocitos (Payne *et al*, 2005).

Sin embargo no existen estudios en la literatura que hayan sido dedicados exclusivamente a determinar la localización subcelular de esta enzima, y por lo tanto se desconoce si PFK-2/FBPasa-2 se encontraría en otros compartimentos subcelulares. Tampoco se sabe si esta enzima se encontraría asociada a otras estructuras celulares como citoesqueleto o membranas celulares, o si se encuentra asociada a otras proteínas. Últimos reportes señalan que esta enzima se encontraría interactuando con glucoquinasa en células pancreáticas y hepatocitos, indicando que su función sería regular la actividad enzimática de glucoquinasa (Baltrusch *et al*, 2001; Massa *et al*, 2004; Payne *et al*, 2005).

Considerando los conceptos de organización subcelular del metabolismo y de las vías de transducción de señales, resulta interesante determinar si PFK-2/FBPasa-2 se encuentra localizada en el compartimento subcelular en el que se localizan las proteínas relacionadas con su

función biológica. Sería razonable pensar que las enzimas PKA y PP2A se encontrarían en la vecindad, si no interactuando directamente, con PFK-2/FBPasa-2, de tal forma de mantener la especificidad y fidelidad de la transmisión de la señal hormonal que regule la función de PFK-2/FBPasa-2. Por otro lado, la enzima bifuncional debería estar también localizada en la vecindad de PFK-1 y FBPasa-1, de tal forma de mantener un control preciso sobre las concentraciones locales de Fru-2,6-P₂, metabolito que regula la actividad de estas dos últimas enzimas. Este concepto da origen a la siguiente hipótesis:

“La enzima PFK-2/FBPasa-2 se encuentra en forma compartimentalizada en la célula, coincidiendo su localización subcelular con la de las enzimas que participan en su regulación.”

Para demostrar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Determinar la localización subcelular de la enzima PFK-2/FBPasa-2 en tejido hepático de rata.
2. Evaluar la posible asociación de PFK-2/FBPasa-2 a otras estructuras de la célula, tales como membranas celulares o citoesqueleto.

Para el cumplimiento de estos objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Montar los ensayos enzimáticos para la determinación de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2.
2. Realizar fraccionamiento celular en tejido hepático de rata, y evaluar y cuantificar las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en las fracciones obtenidas.

3. Aislar núcleos celulares de tejido hepático de rata, y evaluar y cuantificar en ellos las actividades enzimáticas quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2.

4. Aislar microtúbulos polimerizados de tejido cerebral de rata, y evaluar y cuantificar en ellos las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Sigma Chemical Co.: tris[hidroximetil]aminometano (Trizma-base), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lauril dodecilsulfato de sodio (SDS), persulfato de amonio, bicarbonato de sodio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), azul de bromofenol, sacarosa, paclitaxel (taxol), fructosa-6-fosfato, fructosa-2,6-bisfosfato, glucosa-6-fosfato, NAD, NADH, NADPH, 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanosufónico (HEPES), piperazine-N,N-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ditioneitol (DTT), pirofosfato de sodio, poli(etilen)glicol (PEG), ATP, ADP, GTP, etilen glicolbis(b-aminoetil eter)-N,N,N,N-acido tetraacético (EGTA), glicerol, lactato, 2-oxoglutarato, fosfoglucosa isomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

Merck, Darmstadt, Alemania: hidróxido de sodio, isopropanol, etanol, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (Temed), dimetil sulfoxido (DMSO), fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de potasio.

Invitrogen: agarosa ultra pura, acrilamida, bisacrilamida (N,N'- metilenbisacrilamida), albúmina sérica de bovino Fracción V liofilizada (BSA), bromuro de etidio.

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

Bio Labs: albúmina sérica de bovino purificada en solución 100X (BSA),

W y Z: estándar de peso molecular para proteínas y, estándar preteñido de peso molecular para proteínas.

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

Whatman: resina DEAE celulosa (DE52)

Animales de experimentación utilizados.

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

3.1.2. Equipos.

Balanza analítica Shimadzu (Libror AEX-120 G), espectrofotómetro Shimadzu (UV-150-02), espectrofotómetro Hewlett Packard (8453), pHmetro radiometer Copenhagen (PHM 83 autocal pH meter), balanza Shimadzu (Libror EB-3200 S), termociclador MJ Research (Mini Cycler), termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400), centrífuga Fisher Scientific (Micro V), micropipetas Gilson, horno microondas Somela (E 70 TF-7), centrífuga Heraus Sepatech (Megafuge 1.0 R), Potter-Elvehjem, fuente de poder Life Technologies (model 500), agitador termorregulado lab-line instruments (Lab-Line Orbit Environ-Shaker), centrífuga Eppendorf (5417 R), centrifuga Sorvall (RC 5C), microscopio invertido Nova (IN 833), microscopio de fluorescencia Zeiss (Axioskop HBO 50 con cámara fotográfica MC 80), microscopio Zeiss (Axioskop 2 con cámara fotográfica MC 80 DX), baño termorregulado Kottermann, vortex Fisher (Genie 2), cámara digital para geles de agarosa Spectroline (model CA-1000/F) con monitor, unidad archivadora digital Spectroline (model AU-1000/F) e impresora Sony (UP-860), centrifuga Hettich (MIKRO 22R), ultracentrífuga Sorvall.

3.2 Métodos

3.2.1 Purificación parcial de 6-fosfofructo-1-quinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK) desde tubérculo de patata.

PPi-PFK fue purificada según el método descrito por Van Schaftingen *et al.* (1982b). El procedimiento es el siguiente: unos 350 g de patatas peladas fueron homogeneizadas en 2 volúmenes de tampón A (HEPES 20 mM pH 8,2; acetato de potasio 20 mM; DTT 2 mM) a 4°C, para luego ser filtrado en gasa. A este filtrado se le agregó pirofosfato sólido y MgCl₂ hasta alcanzar una concentración 2 mM, y se ajustó pH a 8,2 con NaOH. Se llevó la mezcla a 59°C en baño María a 70 °C con agitación constante; una vez alcanzada la temperatura deseada se mantuvo por 5 minutos en un baño María a 59°C. Luego se enfrió a 4°C, y se ajustó pH a 7,1 con NaOH. Todos los siguientes pasos fueron realizados a 4°C. Se le agregó al extracto 6 g de PEG por cada 100 ml, se agitó por 15 min, se incubó por 10 min y luego se centrifugó a 4.000 x g por 10 min. Al sobrenadante se le agregó 8 g de PEG por cada 100 ml, y se realizó el mismo procedimiento anterior. El sedimento resultante se disolvió en 40 ml de tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8,2; KCl 20 mM; DTT 2 mM) y se cargó a una columna de vidrio con DEAE-celulosa DE-52 (25 x 120 mm) equilibrada con tampón B. Luego se lavó la columna con 100 ml de tampón B (o hasta que la absorbancia a 280 nm del eluato fue menor a 0,050), y la PPi-PFK se eluyó con un gradiente lineal de KCl (20 a 400 mM en tampón B), colectándose aquellas fracciones con mayor actividad PPi-PFK. Se reunieron estas fracciones y se mezclaron con 1 volumen de glicerol, se alicuotaron en volúmenes de 500 µL, y se guardaron a -80°C. Bajo estas condiciones la enzima no mostró variaciones de actividad por lo menos durante 4 meses.

3.2.2 Determinación de la actividad enzimática de PPI-PFK.

La actividad se midió espectrofotométricamente de acuerdo a lo descrito por Van Schaftingen *et al* (1982b). El ensayo enzimático fue llevado a cabo a 25°C, y consistió en determinar la producción de Fru-1,6-P₂ en ensayo acoplado con las enzimas aldolasa, TPI y GAPDH. Entonces, en el ensayo se acopló la reacción de escisión de Fru-1,6-P₂ con las de síntesis de dihidroxiacetona fosfato y deshidrogenación de gliceraldehido-3-fosfato, en presencia de un exceso de las enzimas auxiliares. Este acoplamiento permite medir a 340 nm el consumo de NADH. Se determinó la variación de absorbancia durante el tiempo transcurrido (pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{tiempo}$) a una longitud de onda de 340 nm, la cual es directamente proporcional a la cantidad de Fru-1,6-P₂ producido, y por ende, a la actividad enzimática PPI-PFK.

Para monitorear a PPI-PFK durante la purificación se realizó el ensayo en condiciones óptimas. La mezcla de reacción estaba compuesta por Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 5 mM; Glu-6-P 17,5 mM; Fru-6-P 5 mM; PPI 2,5 mM; NADH 0,16 mM; Fru-2,6-P₂ 1 μM ; 0,2 U de aldolasa; 1,2 U de TPI; y 0,2 U GPD en un volumen final de 500 μL . La reacción se inició agregando la enzima PPI-PFK.

Para la determinación de concentración de Fru-2,6-P₂ la mezcla de reacción consistió en Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 5 mM; Glu-6-P 17,5 mM; Fru-6-P 1 mM; NADH 0,16 mM; 0,2 U de aldolasa; 1,2 U de TPI; y 0,2 U GPD para un volumen final de 500 μL . Luego a la mezcla en la cubeta se agregó la muestra de Fru-2,6-P₂ a determinar, y finalmente la PPI-PFK; se incubó por 2 minutos, y se inició la reacción agregando PPI. Para cada determinación de Fru-2,6-P₂ se realizó una curva de calibración bajo las condiciones antes descritas, en donde se graficó la concentración de Fru-2,6-P₂ versus actividad PPI-PFK, tomando las concentraciones 0, 5, 10, 30 y 50 nM con una solución estándar de concentración conocida de Fru-2,6-P₂. Una unidad

enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que consume 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones especificadas. Para determinar la cantidad de NADH consumido se utilizó el valor de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción milimolar de NADH (Horecker y Kornberg, 1948).

3.2.3 Determinación de la concentración de solución estándar de Fru-2,6-P₂.

La concentración de la solución estándar Fru-2,6-P₂ para la curva de calibración se determinó por medio de una reacción enzimática acoplada (Pilkis *et al*, 1981a). La solución de Fru-2,6-P₂ se preparó de acuerdo a la estimación por peso molecular del azúcar bisfosfato. Luego se diluyó una alícuota de la solución en HCl pH 3,0 en proporción 1:10, y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. La determinación se llevó a cabo a 30 °C. El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, MgSO₄ 5 mM, NAD⁺ 0,3 mM, 17,5 U/ml de fosfoglucoasa isomerasa (PGI) y 6 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (GPD), y se inició la reacción agregando 150 μl de la solución de Fru-2,6-P₂ a pH 3.0. Se leyó en el espectrofotómetro el cambio de absorbancia en el tiempo a una longitud de onda de 340 nm hasta que se consumió todo el sustrato, y se calculó la concentración de Fru-2,6-P₂ usando el valor de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3.2.4 Determinación de la actividad quinasa de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2).

La actividad PFK-2 se cuantificó mediante el método descrito por Bartrons *et al.* (1983), el cual consiste en un ensayo de tiempo fijo en donde se determina la cantidad de Fru-2,6-P₂ producido. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5; KCl 100 mM; MgCl₂ 7 mM;

Glu-6-P 17,5 mM; ATP 5 mM; y 5 mM Fru-6-P para un volumen final de 500 μ L. La reacción se llevó a cabo en un baño termorregulado a 25°C. La reacción se inició agregando la muestra de PFK-2, y se extrajeron alícuotas de 100 μ L desde la mezcla a los tiempos 0, 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos de iniciada la reacción. Cada alícuota extraída se mezcló con 100 μ L de NaOH 100 mM y se incubó a 80°C por 10 minutos para detener la reacción. En cada una de las alícuotas extraídas se cuantificó la concentración de Fru-2,6-P₂ producido mediante el método descrito en la sección 3.2.2. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que consume 1 μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones especificadas.

3.2.5 Determinación de la actividad fosfatasa de PFK-2/FBPasa-2.

La actividad de FBPasa-2 fue cuantificada mediante el método de ensayo acoplado con enzimas auxiliares descrito por Nishimura *et al.* (1994). La mezcla de reacción estaba compuesta por tampón HEPES 50 mM pH 7,5; MgCl₂ 2 mM; KCl 100 mM; glicerol-2-fosfato 5 mM; Fru-2,6-P₂ 20 μ M; NADP 0,15 mM; 1 U TPI y 1 U GPD en un volumen final de 500 μ L. La reacción se inició agregando la muestra de FBPasa-2 a la cubeta y se cuantificó el aumento de absorbancia por min. en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 340 nm. El ensayo fue realizado a 30°C. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que consume 1 μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones especificadas. Para el cálculo de la actividad FBPasa-2 se utilizó el valor 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3.2.6 Determinación de la actividad enzimática de 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1).

La actividad PFK-1 fue cuantificada como se describió previamente (Uyeda *et al.*, 1981). El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,4; EDTA 0,1 mM; MgCl₂ 5 mM; DTT 2 mM;

NADH 0,16 mM; ATP 1 mM; Fru-6-P 1 mM; 0,2 U aldolasa; 1,2 U TPI y 0,2 U GPD para un volumen final de 500 μ l. La reacción fue iniciada agregando la PFK-1, y se determinó espectrofotométricamente el cambio de absorbancia a 340 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que consume 1 μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones especificadas. Para el cálculo de la actividad PFK-1 se utilizó el valor $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3.2.7. Determinación de la actividad enzimática de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

La actividad enzimática de aldolasa se ensayó mediante el método de reacciones acopladas descrito por Alarcón *et al.* (1971). El medio de reacción contenía 35 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA; 0,6 mM Fru-1,6-P₂; 0,1 mM NADH; 5 mM MgCl₂; 1 U TPI; 1 U GPD en un volumen final de 500 μ l a una temperatura de 30 ° C. Se inició la reacción agregando la muestra de aldolasa a ensayar, y se determinó la variación de la absorbancia respecto al tiempo a 340 nm. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μ mol de Fru-1,6-P por minuto. Para los cálculos de actividad se utilizó el valor $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3.2.8. Determinación de la actividad enzimática de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1).

La actividad enzimática se ensayó mediante el método acoplado a enzimas auxiliares descrito por Kitajima y Uyeda (1983). El medio de reacción contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 30 μ M Fru-1,6-P; 0,30 mM NAD⁺; 1 U TPI; y 1 U GPD en un volumen final de 500 μ l a una temperatura de 25 °C. Se inició la reacción agregando

la muestra de enzima a ensayar, y se determinó la variación de absorbancia con respecto al tiempo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de Fru-6-P por minuto. Para los cálculos de actividad se utilizó el valor $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3.2.9 Fraccionamiento subcelular de hígado de rata mediante centrifugación diferencial.

El fraccionamiento subcelular fue llevado a cabo como se describió por Parry y Pedersen, (1984). Para ello se utilizaron ratas adultas alimentadas ad libitum, las cuales fueron sacrificadas por decapitación. Una vez sacrificadas, el hígado fue rápidamente extraído, lavado para extraer el máximo de sangre, pesado y cortado en pequeños trozos. El tejido fue luego homogeneizado en Potter-Elvehjem con émbolo de teflón en proporción 10 ml de medio de homogeneización frío por cada 1 g de tejido.

El medio de homogeneización (tampón H) consistió en tampón HEPES 50 mM pH 7,4; sacarosa 250 mM; MgCl_2 5 mM; DTT 1 mM; y PMSF 0,5 mM. El extracto obtenido de la homogeneización fue luego filtrado en gasa, y centrifugado a $480 \times g$ por 10 min a 4°C para dar un sedimento y un sobrenadante. El sobrenadante fue decantado y el sedimento lavado una vez por resuspensión en tampón H y centrifugado nuevamente para obtener el sedimento correspondiente a la fracción nuclear (N).

Los sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados a $13.000 \times g$ por 15 min a 4°C , para dar como sedimento la fracción mitocondrial (M), la cual fue lavada también una vez. El sobrenadante resultante fue centrifugado a $100.000 \times g$ por 60 minutos a 4°C para sedimentar la

fracción microsomal (P). El sobrenadante obtenido de esta última centrifugación corresponde a la fracción citosólica (C). Cada sedimento fue resuspendido en un pequeño volumen de tampón H. Cada una de las fracciones fue sonicada a 4°C con dos ciclos de 30 segundos cada uno a 50 W de potencia.

3.2.10 Marcadores de fracciones celulares.

Para conocer la pureza de las fracciones celulares obtenidas se cuantificó la presencia de marcadores específicos para cada fracción celular en relación con el total presente en la célula, los cuales se encuentran plenamente caracterizados (Parry y Pedersen, 1983). Los marcadores descritos son DNA para fracción nuclear; glutamato deshidrogenasa para fracción mitocondrial; glucosa-6 fosfatasa para fracción microsomal y lactato deshidrogenasa para fracción citosólica.

3.2.10.1 Cuantificación de DNA.

El DNA genómico fue cuantificado mediante análisis densitométrico en electroforesis de agarosa (sección 3.2.11). Se cargó en cada carril del gel 10 µg de proteína de cada una de las fracciones subcelulares aisladas, y se realizó electroforesis como se describe en la sección 3.2.11. Una vez corrida la electroforesis se obtuvo una fotografía digitalizada del gel, y se cuantificó la fluorescencia emitida por la banda correspondiente a DNA genómico mediante el software “UN-SCAN-IT gel”, obteniéndose un valor numérico arbitrario de pixeles por µg de proteína, el cual luego es expresado como porcentaje relativo de DNA en cada fracción subcelular (ver sección 3.2.10.5).

3.2.10.2 Determinación de la actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH).

La actividad de glutamato deshidrogenasa fue cuantificada mediante el método descrito por Schmidth (1974). El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 2,5 mM; NADH 0,2 mM; ADP 1 mM; NH₄Cl 100 mM; 2-oxoglutarato 7 mM; KCN 0,45 mM en un volumen final de 500 µL a una temperatura de 25 °C. Se inició la reacción agregando la muestra de glutamato deshidrogenasa, y se registró en espectrofotómetro el decaimiento de absorbancia a 340 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que consume 1 µmol de sustrato por minuto bajo las condiciones antes especificadas. Para el cálculo de la actividad GDH se utilizó el valor 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3. 2.10.3 Determinación de la actividad de glucosa-6 fosfatasa (G6Pasa).

La actividad de glucosa 6-fosfatasa fue determinada como se describe por Graham *et al* (1993). El medio de reacción contenía las siguientes soluciones (Glu-6-P 0,1 M; PIPES 35 mM pH 6,5; EDTA 10 mM) en proporción 2:5:1. Se agregó 50 µl de muestra de proteína a 450 µl de medio de reacción, y se incubó por 30 min a 37 °C. Se le agregó 2,5 ml de TCA al 8%, y se incubó en hielo por 20 min. Luego se centrifugó a 1.000 x g por 15 min a 4°C, y se removió 1 ml de sobrenadante, al cual se le agregó 1,5 ml de agua, 250 µl de molibdato de amonio al 2,5 % en 2,5 M de ácido sulfúrico, y 100 µl de reactivo de Fiske-Subarow. La mezcla fue calentada a 100 °C por 10 min, y se leyó absorbancia a 720 nm utilizando la solución de reacción como blanco. Como control negativo se reemplazó los 50 µl de muestra de proteínas por medio de reacción. Para la obtención del blanco se detuvo la reacción con TCA a tiempo 0 minutos. La absorbancia

leída es directamente proporcional a la cantidad de fosfato liberado producto de la hidrólisis de Glu-6-P catalizada por glucosa-6 fosfatasa

3.2.10.4 Determinación de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).

La actividad de lactato deshidrogenasa fue cuantificada según el método descrito por Kaplan *et al* (1996). El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,8; NAD⁺ 5 mM; y L-lactato 60 mM. Se inició la reacción agregando la muestra de lactato deshidrogenasa, y se determinó espectrofotométricamente la variación de absorbancia a 340 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que consume 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones especificadas. Para el cálculo de la actividad LDH se utilizó el valor 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de extinción milimolar del NADH.

3.2.10.5 Cálculo del la presencia relativa de cada marcador en las fracciones aisladas.

Una vez cuantificada la presencia absoluta de cada marcador subcelular en el homogeneizado inicial y en las fracciones aisladas, se calculó el porcentaje de presencia relativa respecto a la cantidad de proteínas de cada marcador en las fracciones obtenidas. Este cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación, utilizada por Parry y Padersen (1983 y 1984):

$$\%A_f = \frac{A_f \times \%P_f}{A_h}$$

Donde:

%A_f es el porcentaje de presencia relativa en la fracción subcelular, A_f es la presencia absoluta del marcador medido en la fracción subcelular (expresada en mU/mg, μU/mg o ua/μg, según corresponda), %P_f es el porcentaje de proteínas en la fracción, tomando como 100% el

total de proteínas del homogenizado inicial (en mg), A_i es la presencia del marcador medido en el homogenizado inicial (expresado en mU/mg, μ U/mg o ua/ μ g, según corresponda).

3.2.11 Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

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

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

3.2.12 Análisis electroforético de DNA en geles de agarosa

El gel fue preparado a una concentración de 1,2 % disolviendo 0,48 g de agarosa en 40 ml de tampón TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM) y se dejó enfriar hasta 60 °C, luego la solución fue vertida sobre el molde (8,5 x 6,5 cm). El gel fue pre-corrído por 5

min a 10 V en tampón TBE 1X. Las muestra de DNA se prepararon mezclando 10 μ l del DNA (0,1 μ g/ μ l), 1 μ l de tampón de carga para DNA 10X (glicerol 50%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,5% en tampón TE) y 1 μ l de bromuro de etidio (0,5 g/ml), se mezcló por pipeteo y se cargó con micro pipeta cada muestra en un pocillo del gel. Luego, se realizó la corrida electroforética aplicando 5 V/cm por 30 min y se observó la migración del DNA en un transluminador con luz ultra-violeta por fluorescencia del bromuro de etidio unido al DNA.

3.2.13 Purificación de núcleos desde hígado de rata mediante centrifugación en gradiente simple de sacarosa.

Los núcleos fueron aislados por el método descrito por Blobel y Potter (1966). Se homogeneizó 1 g de hígado de rata con Potter-Elvehjem en 5 volúmenes de tampón TKM (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; KCl 25 mM; MgCl₂ 5 mM) frío conteniendo sacarosa 250 mM. A este homogeneizado, luego de ser filtrado en gasa, se le agregó 2 volúmenes de tampón TKM conteniendo sacarosa 2,3 M, hasta alcanzar una concentración de sacarosa 1,63 M. Se transfirieron 7 ml de esta suspensión a un tubo de ultracentrífuga de 10 ml, se agregó sobre ésta 3 ml de tampón TKM sacarosa 2,3 M, y se centrifugó a 130.000 x g por 30 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante, y el sedimento resultante en el fondo del tubo se resuspendió en tampón TKM sacarosa 250 mM. Este precipitado se lavó un par de veces con tampón TKM sacarosa 250 mM mediante centrifugación a baja velocidad para eliminar posible contaminación citoplasmática. Los núcleos aislados fueron sonicados antes de realizar ensayos enzimáticos.

Para observar la integridad de los núcleos aislados estos se tiñeron con el agente intercalante yoduro de propidio: se tomó una alícuota de 5 μ l de núcleos aislados y se diluyó con 45 μ l de tampón TKM sacarosa 250 mM. Luego se les agregó 0,5 μ l de yoduro de propidio 1000

X, se cargaron 25 μ l de esta mezcla en un portaobjeto, se cubrió con cubreobjeto, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se visualizaron los núcleos bajo microscopía de campo claro y de fluorescencia. Para establecer una posible contaminación con otras fracciones celulares se determinó la presencia de los marcadores descritos en la sección 3.2.10.

3.2.14 Co-precipitación de microtubulos desde cerebro de rata mediada por taxol.

Este método fue realizado como se describió por Kovacs *et al* (2003). El cerebro recién extraído del animal fue homogeneizado en tampón PEM (Pipes 100 mM pH 6,6; EGTA 1 mM; $MgCl_2$ 1 mM; DTT 2 mM; PMSF 0,5 mM) a 4°C. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 30.000 x g por 20 minutos a 4°C para eliminar restos celulares. Se extrajo el sobrenadante, y se centrifugó a 100.000 x g por 30 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante, el cual corresponde a la fracción citosólica, y fue llevado a 37°C en baño termorregulado. La formación de microtúbulos fue iniciada al agregar GTP 1 mM y taxol 20 μ M, y se incubó a 37°C por 40 min, para luego centrifugar la solución a 100.000 x g por 30 min a 25°C. Se removió el sobrenadante, y el sedimento de microtúbulos y proteínas asociadas fue lavado y resuspendido en tampón PEM. Tanto el sobrenadante como el sedimento fueron utilizados inmediatamente para los ensayos enzimáticos o guardados a -80°C.

3.2.15 Determinación de concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el sistema “Bio-Rad Protein Assay” de Bio-Rad, el cual se basa en la determinación de proteínas por la unión del colorante azul de Coomassie G-250 (Bradford, 1976). El reactivo colorante fue diluido 5 veces en tampón Tris-HCl 20mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM, y se mezclaron 500 μ l del reactivo colorante

con 125 μ l de dilución de la muestra de proteína diluida 500 ó 1000 veces. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150. La curva de calibración se realizó con una muestra de BSA de concentración conocida. Finalmente la concentración de las muestras se calculó por interpolación de la absorbancia obtenida en la curva de calibración.

4. RESULTADOS

4.1 Purificación parcial de P_{Pi}-PFK desde tubérculo de patata.

Como primer objetivo experimental de la presente tesis se propuso el montaje del método para determinar las actividades quinasa y bisfosfatasa de la enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2.

La reacción enzimática que cataliza la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 consiste en la síntesis de Fru-2,6-P₂ a partir de Fru-6-P y ATP, por lo cual para determinar la actividad enzimática se debe cuantificar la cantidad de producto sintetizado. Para ello existen varias metodologías publicadas en la literatura. Entre estas metodologías está la publicada por Uyeda y colaboradores (1981), en la cual se aprovecha la capacidad de Fru-2,6-P₂ de incrementar la actividad enzimática de PFK-1 de músculo de conejo, o la de Hue y colaboradores (1982), donde la Fru-2,6-P₂ sintetizada por PFK-2/FBPasa-2 se separa mediante cromatografía de intercambio iónico del Fru-6-P utilizado como sustrato, para luego proceder a la hidrólisis ácida del Fru-2,6-P₂, produciéndose Fru-6-P, el cual es cuantificado mediante ensayo enzimático acoplado a las enzimas TPI y GPD. Sin embargo estas dos metodologías mencionadas presentan grandes inconvenientes técnicos: para la primera se necesita PFK-1 purificada de músculo de conejo, además de poseer el inconveniente de que la actividad de PFK-1 es fuertemente modificada por varios metabolitos presentes en la célula, tales como ATP o citrato, por lo que su utilización con homogeneizados celulares resulta poco confiable; el segundo método mencionado posee el inconveniente de ser exageradamente engorroso y de requerir mucho tiempo para cada determinación, además de presentar varias etapas en las cuales es posible perder parte importante del metabolito a determinar, resultando en un método poco reproducible.

Existe sin embargo un tercer método para determinar concentración de Fru-2,6-P₂, el cual no posee las desventajas de los antes descritos. Este método fue descrito por Van Schaftingen y

colaboradores (1982b), y consiste en la utilización de la capacidad de Fru-2,6-P₂ de activar a la enzima PPI-PFK aislada de tubérculo de patata. Entre las ventajas de este método están que la actividad enzimática de PPI-PFK no es modificada en gran medida por metabolitos celulares, además de mostrar variación de actividad casi nula bajo las mismas condiciones, y de responder fielmente a diferentes concentraciones de Fru-2,6-P₂ (ver curva de calibración, **figura 5**). Sin embargo posee el inconveniente de que es necesario purificar parcialmente esta enzima, siendo ésta la primera actividad realizada en la presente tesis.

PPI-PFK se purificó según lo descrito en Materiales y Métodos 3.2.1. En cada una de las etapas se determinó la actividad de la enzima y la concentración de proteínas totales según lo descrito en Materiales y Métodos 3.2.2 y 3.2.15, respectivamente. Las etapas de la purificación fueron: homogeneización de los tubérculos de papa en tampón a pH 8,2, golpe de calor a 59 °C, fraccionamiento a diferentes porcentajes de PEG, purificación a través de cromatografía de intercambio iónico en la resina DEAE-celulosa, y su posterior elución con KCl.

La **figura 4** corresponde a un cromatograma del lavado y elución de PPI-PFK desde una columna de vidrio conteniendo la resina DEAE-celulosa. Se observa que la cantidad de la enzima presente en el lavado fue casi nula, y que casi toda la enzima eluye entre las fracciones 24 y 26 después de aplicar gradiente de KCl. Los resultados de las etapas de purificación se muestran en la **tabla 2**. En las dos veces que se realizó la purificación se obtuvieron similares resultados: alrededor de 1,8 mg de proteína, con una actividad específica de 6,46 mU/mg, lo cual es algo mas bajo a lo publicado por Van Schaftingen (7,6 mU/mg; Van Schaftingen *et al.*, 1982b). Por medio de análisis electroforético en SDS-PAGE se observó que la enzima no se encuentra completamente pura (dato no mostrado), pero al analizar la presencia de enzimas que podrían

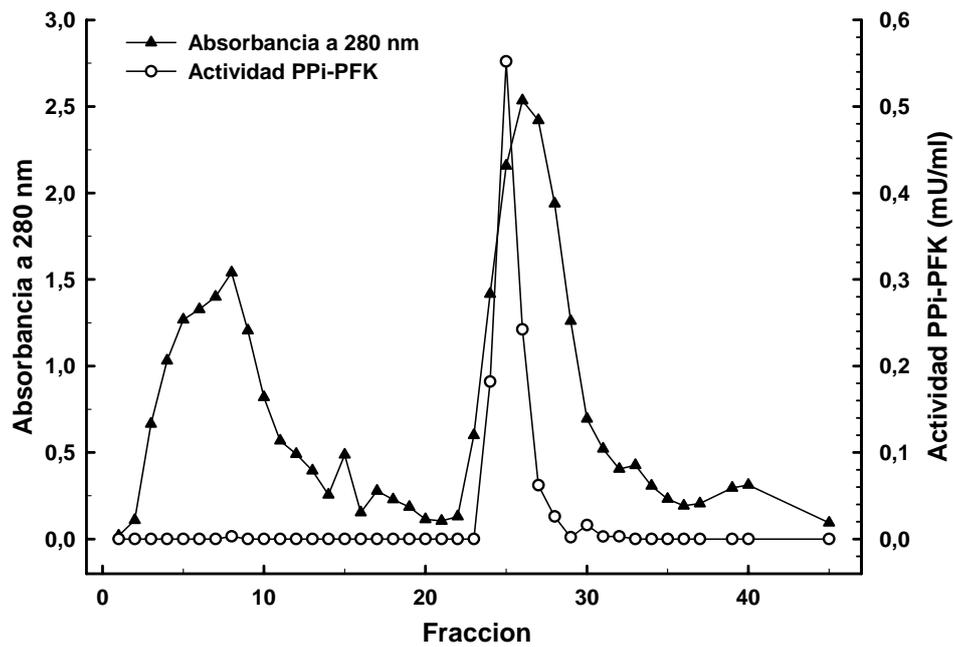


Figura 4: Cromatograma de Purificación de PPI-PFK desde DEAE-celulosa.

Cromatograma correspondiente a las etapas de lavado y elución de PPI-PFK desde la resina DEAE-celulosa DE-52. La elución con gradiente lineal de KCl se inició en la fracción N° 20. La actividad de PPI-PFK está expresada como mU/ml, y la absorbancia a 280 nm en unidades arbitrarias de absorbancia.

Tabla 2: Etapas de purificación de 6-fosfofructo-1-quinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK) desde tubérculo de patata. La enzima PPi-PFK fue parcialmente purificada desde tubérculos de patata. En cada una de las etapas de purificación se determinó la actividad PPi-PFK mediante el ensayo acoplado. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford (1976). Para mas detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

Etapa	Concentración de Proteínas (mg/ml)	Volumen Total (ml)	Cantidad de Proteínas Totales (mg)	Actividad PPi-PFK (mU/ml)	Actividad Total PPi-PFK (U)	Actividad Especifica PPi-PFK (U/mg)	Purificación
Filtrado Inicial	1,916	500	958,0	178,2	89,3	0,093	1
Sobrenadante 6% PEG	0,387	400	154,8	147,6	59,1	0,381	4,1
Sedimento 14% PEG	0,638	50	25,5	815,1	32,6	1,28	13,8
Eluato DEAE-celulosa	0,258	7	1,8	1666	11,6	6,46	69,6

interferir en el método, tales como FBPasa-1 o TPI, estas no mostraron actividad. La enzima purificada fue mezclada con glicerol al 20% v/v, alicuotada en volúmenes de 500 μ L, y guardada a -80°C . Bajo estas condiciones la enzima no mostró variaciones de actividad por lo menos durante 4 meses.

4.2. Determinación de la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa2.

El método utilizado para determinar la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa2 fue el descrito en Materiales y Métodos 3.2.4. Este ensayo consiste en una primera etapa en donde se lleva a cabo una reacción de punto final en la cual la enzima sintetiza Fru-2,6-P₂ a partir de Fru-6-P y ATP, y una segunda etapa en que se cuantifica la cantidad producida de Fru-2,6-P₂ mediante la activación de la actividad PPi-PFK en un ensayo enzimático acoplado.

Para llevar a cabo este ensayo es necesario primero realizar una curva de calibración para cuantificar la actividad de PPi-PFK bajo distintas concentraciones conocidas de Fru-2,6-P₂, la cual se realizó tal como se describe en la sección 3.2.2. La concentración de la solución estándar de Fru-2,6-P₂ fue determinada mediante el método de hidrólisis ácida descrito en Materiales y Métodos 3.2.3. Como se demuestra en la **figura 5**, la actividad de PPi-PFK aumenta de forma lineal al aumentar la concentración de Fru-2,6-P₂ en el medio de reacción desde 0 hasta 50 nM, con un coeficiente de correlación de 0,9966, y una pendiente de 0,3984. Esta curva de calibración se realizó cada vez que se utilizó el ensayo enzimático, dando siempre similares resultados. Como se puede apreciar en la curva, la enzima es muy sensible a concentraciones de Fru-2,6-P₂ del rango nanomolar, mostrando que es perfectamente utilizable en la determinación de Fru-2,6-P₂.

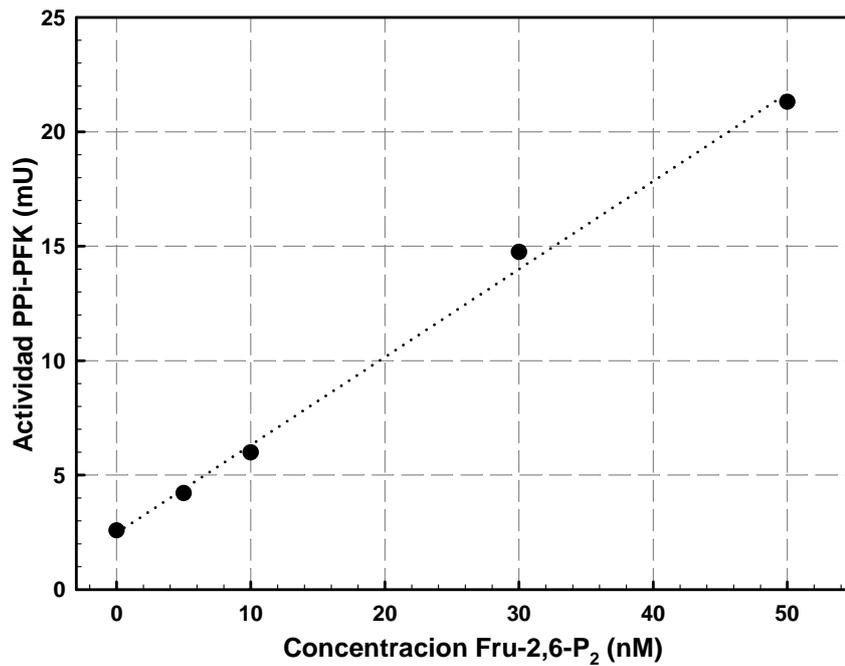


Figura 5: Curva de calibración del efecto de Fru-2,6-P₂ sobre actividad de PPI-PFK.

Se determinó la actividad enzimática PPI-PFK en función de concentraciones conocidas de Fru-2,6-P₂ tal como se describe en Materiales y Métodos. Se obtiene un valor de correlación lineal de 0,9967. Esta curva se utilizó luego para el cálculo de la concentración de Fru-2,6-P₂ en los ensayos de determinación de la actividad quinásica de PFK-2/FBPasa-2.

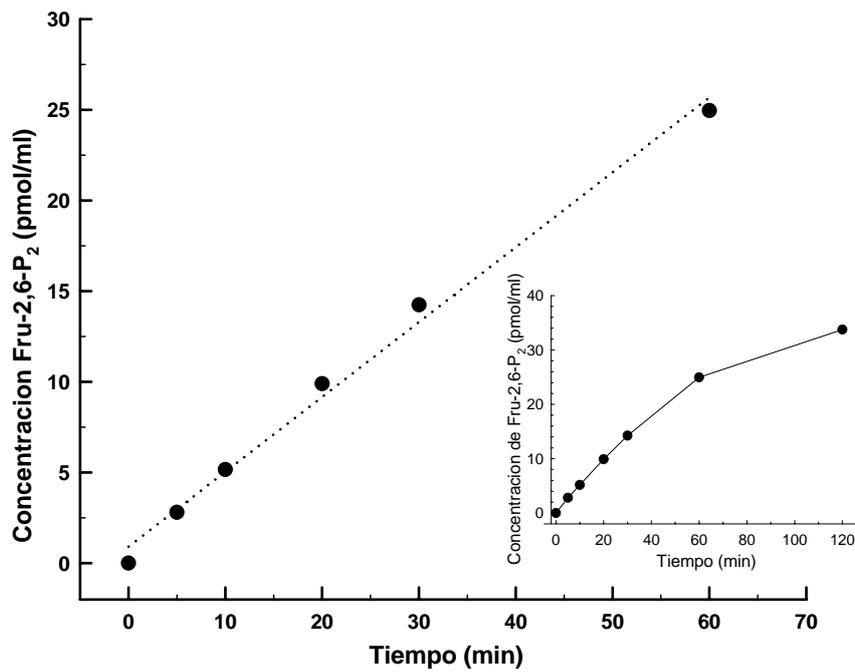


Figura 6: Seguimiento en el tiempo de la síntesis de Fru-2,6-P₂ por PFK-2/FBPasa-2.

La concentración de producto sintetizado por la enzima fue cuantificada por el ensayo de activación de P_i-PFK a los 0, 5, 10, 20, 30, 60 y 120 min de haber sido iniciada la reacción. Se aprecia que la tasa de síntesis de Fru-2,6-P₂ es lineal hasta los 60 minutos ($r^2 = 0,9932$). Para detalles experimentales ver Materiales y Métodos.

Para determinar la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa se utilizó el método descrito en la sección 3.2.4, en el cual se debe cuantificar la cantidad de Fru-2,6-P₂ producido por la enzima mediante la activación de PPi-PFK e interpolar este valor en la curva de calibración antes mencionada. Como se aprecia en el **figura 6** la síntesis de Fru-2,6-P₂ por parte de PFK-2/FBPasa-2 es lineal hasta unos 60 min de iniciada la reacción con un coeficiente de correlación de 0,9932, para luego llegar a una fase de meseta. Esto nos indica que para una correcta determinación de la actividad es necesario detener la reacción antes de 60 min luego de iniciada. En las determinaciones de actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 la reacción se detuvo a 30 minutos de haber sido iniciada.

Por otro lado el ensayo enzimático para la determinación de la actividad fosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 no mostró mayores dificultades en su montaje (sección 3.2.5), ya que consiste en un ensayo acoplado a enzimas auxiliares similar al utilizado para la determinación de actividad de FBPasa-1 (sección 3.2.8).

4.3 Distribución subcelular de PFK-2/FBPasa-2 en hígado de rata.

Una vez montados y estandarizados los métodos para determinar actividad quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 se procedió al fraccionamiento subcelular tal como se describe en la sección 3.2.9. Para la determinación de la localización de PFK-2/FBPasa-2 se eligió el fraccionamiento subcelular debido a que:

- a) Es una técnica rápida y directa, ya que se cuantifica la actividad enzimática endógena de la célula, sin necesidad de sobreexpresión.
- b) Se puede determinar la distribución subcelular de la forma catalíticamente activa de la enzima.

- c) Es posible conocer si existe presencia de la enzima asociada a un compartimento membranoso.
- d) La localización subcelular se puede expresar en términos cualitativos y cuantitativos, permitiendo obtener valores numéricos de localización (porcentaje del total celular).

Para todos los experimentos de fraccionamiento subcelular se utilizaron ratas adultas en condición metabólica de alimentadas *ad libitum*. Mediante el método descrito se aislaron las fracciones nuclear (N), mitocondrial (M), microsomal (P), y citosólica (C), y se procedió a determinar la presencia de los marcadores de las fracciones subcelulares en cada una de las fracciones obtenidas. Estos son: DNA para fracción nuclear, glutamato deshidrogenasa para fracción mitocondrial, glucosa-6 fosfatasa para fracción microsomal, y lactato deshidrogenasa para fracción citosólica (Parry y Pedersen, 1983). La determinación de cada uno de los marcadores se indica en Materiales y Métodos sección 3.2.10, y los porcentajes relativos de presencia de los marcadores y enzimas en cada fracción se calcularon con la ecuación descrita en la sección 3.2.10.5. También se determinó concentración de proteínas en cada una de las fracciones según lo descrito en la sección 3.2.15.

Para cuantificar la cantidad de DNA genómico en cada una de las fracciones se utilizó la capacidad que tiene el bromuro de etidio de teñir el DNA. En la **figura 7** se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Materiales y Métodos 3.2.12); en cada carril se cargó la misma cantidad de proteína (10 µg) correspondiente a cada fracción.



Figura 7: Detección de DNA genómico en las fracciones subcelulares. En cada carril del gel de agarosa al 1,2 % se cargaron 10 μg de proteínas de cada fracción subcelular obtenida como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de la cuantificación de DNA en unidades arbitrarias de pixeles luego de digitalizar la imagen se muestran en la tabla 3. Carril 1: fracción nuclear (N); carril 2: fracción mitocondrial (M); carril 3: fracción microsomal (P); carril 4: fracción citosólica (C).

En el carril 1, el cual corresponde a la fracción nuclear, se aprecia una intensa banda correspondiente a DNA genómico, el cual no migró en el gel debido a su gran tamaño molecular. En los otros carriles esta banda es de menor intensidad, siendo casi imperceptible, sugiriendo que el fraccionamiento subcelular fue realizado correctamente al encontrarse la gran mayoría del DNA, cerca del 80%, en la fracción nuclear (**figura 8**). La imagen de este gel fue digitalizada, y se cuantificó la intensidad de cada banda mediante el software “UN-SCAN-IT gel”, obteniéndose un valor numérico arbitrario de pixeles por μg de proteína cargada al gel. De esta forma se obtuvieron los valores de porcentaje de presencia de DNA en cada fracción (**figura 8**).

En la **figura 8** se puede apreciar también la distribución subcelular de los demás marcadores en las fracciones aisladas de homogenizado de hígado de rata. Se observa que el patrón de distribución es el típico para cada marcador, mostrando una presencia entre 50% y 100% en su correspondiente fracción. Se observa también que la fracción que mostró mayor contaminación fue la fracción citoplasmática, dada principalmente por glutamato deshidrogenasa y glucosa-6 fosfatasa, debido probablemente a la destrucción de algunos organelos celulares durante el proceso de homogenización y aislamiento de las fracciones. Sin embargo esta contaminación no excedió el 25 %.

La determinación de la distribución subcelular de PFK-2/FBPasa-2 (**figura 9**) se llevó a cabo cuantificando las actividades quinasa y bisfosfatasa de la PFK-2/FBPasa-2 en cada una de las fracciones aisladas (Materiales y Métodos, 3.2.4 y 3.2.5). El primer dato a analizar es la baja actividad específica que presentan ambas actividades enzimáticas de PFK-2/FBPasa-2, tanto en el homogeneizado inicial como en las fracciones aisladas (dato no mostrado), las cuales se encuentran en el rango de $\mu\text{U}/\text{mg}$. Estos valores de actividad

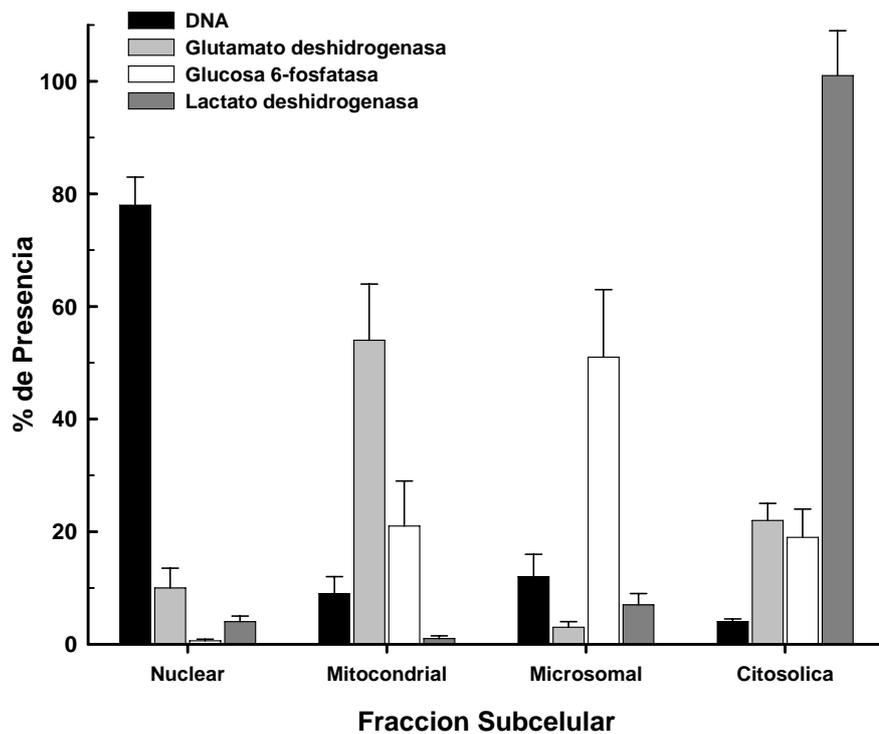


Figura 8: Distribución subcelular de los marcadores de fracciones. Este gráfico muestra el promedio y desviación estándar de los porcentajes medidos de presencia de los marcadores en cada una de las fracciones obtenidas de los cinco diferentes experimentos realizados. Los valores de porcentaje fueron calculados según la ecuación de la sección 3.2.10.5. Para mas detalle ver en Materiales y Métodos.

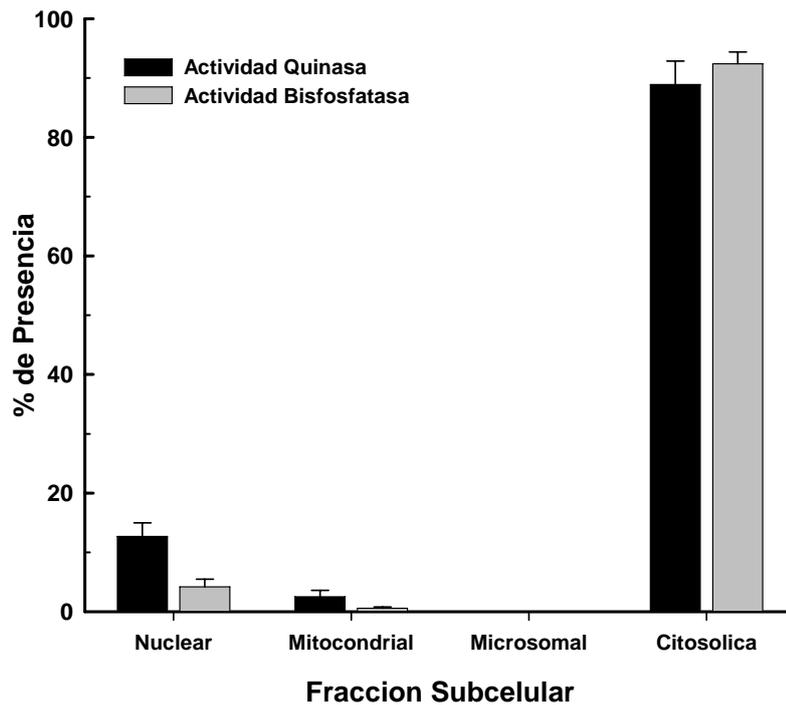


Figura 9: Distribución subcelular de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2. Este gráfico muestra el promedio y desviación estándar de los porcentajes medidos de presencia de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en cada una de las fracciones obtenidas luego de cinco experimentos realizados. Los valores de porcentaje fueron calculados según la ecuación de la sección 3.2.10.5. Para mas detalle ver en Materiales y Métodos.

específica concuerdan con los datos bibliográficos que indican que esta enzima posee muy baja actividad catalítica comparada con enzimas que catalizan reacciones similares, tales como FBPasa-1 y PFK-1 (Pilkis *et al*, 1983).

Con respecto a la distribución subcelular, al comparar en la misma **figura 9** la distribución de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 con la distribución de los marcadores de fracciones, especialmente con el marcador citosólico lactato deshidrogenasa, se aprecia que éstas se presentaron mayoritariamente en la fracción citosólica, superando el 85 % y 90 % ($n = 5$), respectivamente, de presencia en esta fracción. Esto concuerda con informes anteriores que indican que la enzima se encontraría en el citoplasma celular (Payne *et al*, 1985; El-Maghrabi *et al*; 1982a; Argaud *et al*, 1995). También estos datos de la **figura 9** indican que la enzima bifuncional no se encontraría asociada a ninguna de las membranas de organelos encontradas en el citoplasma celular, tales como mitocondrias, microsomas o peroxisomas, ya que las actividades PFK-2 y FBPasa-2 en las fracciones M y P son inferiores al 3%, lo que está dentro de lo esperable dados los niveles de contaminación cruzada.

4.4 Localización Nuclear de PFK-2/FBPasa-2.

Por otro lado los resultados experimentales de la **figura 9** muestran que cerca de un 12 % ($n = 5$) de la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 fue detectada en la fracción nuclear. Se sabe que en la fracción nuclear obtenida por fraccionamiento subcelular no sólo se obtienen núcleos celulares, sino también células completas sin homogeneizar y mitocondrias de gran tamaño, por lo tanto se podría pensar perfectamente que la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 detectada en la fracción nuclear podría deberse a contaminación citoplasmática. Para descartar esta posible contaminación se procedió al aislamiento de núcleos de células de hígado de rata por medio de la

técnica de centrifugación en gradiente simple de sacarosa, la cual se encuentra descrita en la sección 3.2.13 de Materiales y Métodos. Esta técnica permite aislar núcleos íntegros en cantidades suficientes para experimentos analíticos, sin el inconveniente de contaminación dada por otros compartimentos subcelulares.

Una vez aislados los núcleos desde hígado de rata se procedió a observar la morfología e integridad de éstos mediante microscopia de fluorescencia. Para ello se tiñeron los núcleos con el agente intercalante yoduro de propidio, el cual se une al DNA, marcando específicamente los núcleos celulares. En la **figura 10** panel C se muestra una microfotografía de fluorescencia con aumento 10X en la que se aprecia una gran cantidad de núcleos morfológicamente íntegros, sin mostrar destrucción. Lo mismo se aprecia con mayor detalle (aumento 40X) en el panel D. A modo de comparación se muestra en el panel A y B una microfotografía de fluorescencia en aumentos 10X y 40X, respectivamente, correspondiente a la fracción nuclear obtenida mediante centrifugación diferencial, donde se observa gran cantidad de restos celulares y células completas sin homogeneizar, lo cual podría ser causante de contaminación en esta fracción.

Una vez determinada la integridad morfológica de los núcleos se cuantificó en éstos la presencia de marcadores de fracciones subcelulares para registrar la existencia de contaminación. Como se muestra en la **tabla 3**, todos los marcadores citoplasmáticos dieron resultado negativo, con lo cual se confirma que los núcleos se encuentran en estado puro, sin contaminación de otros compartimentos subcelulares.

Para determinar si PFK-2/FBPasa-2 se encuentra localizada en núcleos celulares se cuantificaron las actividades quinasa y bisfosfatasa de la enzima en los núcleos aislados. Como se puede apreciar en la **tabla 4**, se encontró actividad quinasa (cerca de 21 μ U; $n=3$), pero no fue

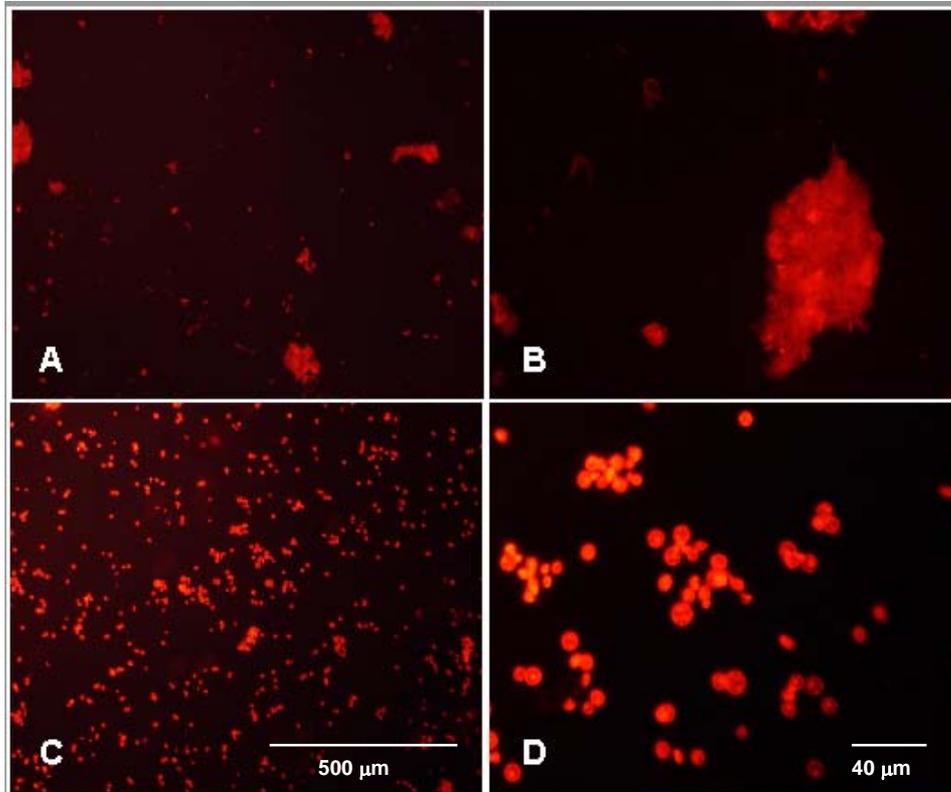


Figura 10: Microfotografía de núcleos aislados de hígado de rata. Los núcleos fueron aislados mediante centrifugación en gradiente simple de sacarosa. Una vez aislados fueron teñidos con el agente intercalante yoduro de propidio, para luego ser visualizados mediante microscopía de fluorescencia.

Panel A: fracción nuclear obtenida mediante centrifugación diferencial vista por microscopía de fluorescencia en aumento 10 X, y en panel B, en aumento 40 X.

Panel C: núcleos aislados obtenidos mediante centrifugación en gradiente simple de sacarosa vistos por microscopía de fluorescencia en aumento 10 X, y en panel D, vistos en aumento 40 X.

Tabla 3: Presencia de marcadores de fracciones subcelulares en núcleos aislados de hígado de rata. Las actividades de los marcadores de fracciones subcelulares fueron cuantificadas en el precipitado de núcleos aislados y en el sobrenadante resultante de la centrifugación en gradiente simple de sacarosa como se describe en Materiales y Métodos. Valores expresados como promedio de tres determinaciones independientes \pm desviación estándar.

Enzima	Actividad Especifica (mU/mg)	
	Sedimento	Sobrenadante
Glutamato deshidrogenasa	0,0 \pm 0.0	30,4 \pm 5,3
Glucosa-6-fosfatasa	0,0 \pm 0.0	157,4 \pm 16,5
Lactato deshidrogenasa	0,0 \pm 0.0	896,4 \pm 32,3

Tabla 4: Determinación de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en núcleos aislados de hígado de rata. Se cuantificó la actividad específica quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en el sedimento de núcleos aislados y en el sobrenadante resultante de la ultracentrifugación. Valores expresados como promedio de tres determinaciones independientes \pm desviación estándar.

Actividad de PFK-2/FBPasa-2	Actividad Especifica (μ U/mg)	
	Sedimento	Sobrenadante
Quinasa	21,4 \pm 5,2	31,72 \pm 54,3
Bisfosfatasa	0,0 \pm 0.0	11,32 \pm 2,7

posible detectar actividad bisfosfatasa, lo que concuerda con los datos de los experimentos de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial donde la actividad relativa de FBPassa-2 fue menor al 5% (ver **figura 9**). Estos resultados nos indicarían que la enzima PFK-2/FBPassa-2 se encuentra localizada en núcleos celulares aislados, pero en una cantidad mucho menor que en el citosol celular, y solo se encontraría activa la actividad catalítica quinasa. Cada determinación de actividad quinasa de PFK-2/FBPassa-2 incluye un control negativo en ausencia del sustrato Fru-6-P, lo que permite cuantificar Fru-2,6-P₂ en la muestra analizada; al analizar los nucleos aislados no fue posible detectar Fru-2,6-P₂ (dato no mostrado).

También se analizó la presencia de las actividades de las enzimas PFK-1, FBPassa-1, y aldolasa en núcleos aislados de hígado de rata. Como se muestra en la **tabla 5**, las tres enzimas ensayadas presentan actividad en el sobrenadante de la ultracentrifugación, indicando presencia de estas enzimas en el citoplasma celular. Sin embargo al ensayar la actividad de estas enzimas en el precipitado de núcleos aislados sólo se presenta actividad de las enzimas PFK-1 y aldolasa, no así de FBPassa-1, indicando que PFK-1 y aldolasa se encontrarían presentes en núcleos. La baja actividad de FBPassa-1 no implica necesariamente que la enzima se encuentre ausente en este organelo, ya que esta enzima perfectamente se podría encontrar inhibida en núcleo. Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Saez y Slebe, 2000) muestran resultados similares la medir actividad FBPassa-1 en fracción nuclear de células hepáticas; sin embargo la actividad de FBPassa-1 se ve incrementada al tratar las fracciones particuladas con el detergente Triton X-100 (Saez *et al*, 1996), sugiriendo algún tipo de interacción sensible a detergente entre FBPassa-1 y otra estructura no conocida, interacción que inhibiría la actividad de FBPassa-1.

4.5. Asociación de PFK-2/FBPasa-2 a microtúbulos en el citosol de cerebro de rata.

Como se menciona en la introducción, numerosas investigaciones han sugerido que varias de las enzimas metabólicas citoplasmáticas se encontrarían asociadas a elementos estructurales de la célula, tales como microtúbulos, fibras de actina o membranas de organelos citoplasmáticos (Lehotzky *et al*, 1993; Liliom *et al*, 1999). Debido a que dichos elementos estructurales se encuentran localizados en el citosol de la célula, al igual que la mayor parte de la actividad PFK-2/FBPasa-2 (**figura 9**), nos pareció interesante investigar si esta enzima se encuentra asociada al citoesqueleto, mas precisamente interaccionando con microtúbulos. La razón por la cual se decidió evaluar la interacción de PFK-2/FBPasa-2 con microtúbulos y no a otra estructura del citoesqueleto es por la documentación existente en la literatura que indica que PKA y PP2A, ambas reguladores directas de la actividad de PFK-2/FBPasa-2, se encuentran asociadas a microtúbulos en un porcentaje importante del total intracelular (ver Introducción, sección 2.7). Por lo tanto, de acuerdo al concepto de compartimentalización del metabolismo y de las vías de transducción de señales, es posible que PFK-2/FBPasa-2 se encuentre compartiendo la localización intracelular con PKA y PP2A.

Para evaluar la posible asociación de PFK-2/FBPasa-2 a microtúbulos se utilizó la técnica de precipitación de microtúbulos mediada por taxol (Ver Materiales y Métodos; 3.2.14). Inicialmente se obtiene un extracto citosólico de cerebro de rata, el cual contiene las proteínas citosólicas, incluidas las microtubulares, y luego se induce polimerización de la tubulina endógena, para mas tarde precipitar los microtúbulos polimerizados junto con sus proteínas asociadas mediante ultracentrifugación. En este experimento se utilizó cerebro de rata y no hígado debido a la dificultad que presenta éste último para el aislamiento de microtúbulos a causa del gran contenido de glicógeno que este órgano posee.

Tabla 5: Determinación de las actividades de PFK-1, FBPasa-1 y aldolasa en núcleos aislados desde hígado de rata. Se cuantificó la actividad específica de PFK-1, FBPasa-1 y aldolasa en el sedimento de núcleos aislados y en el sobrenadante resultante de la ultracentrifugación. Valores expresados como promedio de tres determinaciones independientes \pm desviación estándar.

Enzima	Actividad Especifica (mU/mg)	
	Sedimento	Sobrenadante
6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1)	39,23 \pm 7,8	47,61 \pm 8,5
Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1)	0,0 \pm 0,0	91,53 \pm 11,2
Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	25,74 \pm 3,4	32,99 \pm 9,3

La asociación entre una determinada proteína y microtúbulos se obtiene cuantificando la cantidad de dicha proteína presente en el sedimento comparándola con un control negativo en el cual no se induce polimerización de microtúbulos. De esta forma se obtuvo un sedimento de microtúbulos polimerizados, y se ensayaron las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en el extracto citosólico inicial, en el sedimento de microtúbulos y en el sobrenadante sin microtúbulos.

En la **figura 11** se muestra una electroforesis de proteínas SDS-PAGE en condiciones desnaturantes (Materiales y Métodos 3.2.11), en la cual se comparan las proteínas de las fracciones obtenidas mediante co-precipitación de microtúbulos mediada por taxol. El carril 1 corresponde al extracto citosólico, el carril 2 al sobrenadante obtenido luego de la polimerización y posterior co-precipitación de microtúbulos, y los carriles 3 al 6 al precipitado de microtúbulos junto con sus proteínas asociadas. En los carriles 3 al 6 se observa una intensa banda de tamaño molecular aproximada de 55 kDa, la cual correspondería a tubulina (Ren *et al*, 2003). Se aprecia también que esta banda se encuentra acompañada por una serie de bandas menos intensas de diferentes tamaños moleculares, las cuales corresponderían a las proteínas que se encontrarían asociadas a microtúbulos. Se comparó lo observado en estos carriles con el carril 2, el cual corresponde al sobrenadante luego de la polimerización y precipitación de microtúbulos; no se aprecia la banda de 55 kDa, lo cual nos indica que esta fracción carecería virtualmente de tubulina. Por el contrario, al analizar electroforéticamente las fracciones obtenidas al centrifugar sin la presencia de taxol en el medio de reacción, la banda de 55 kDa si se muestra en el sobrenadante obtenido, y no en el sedimento, indicando que no hubo precipitación de microtúbulos (dato no mostrado).

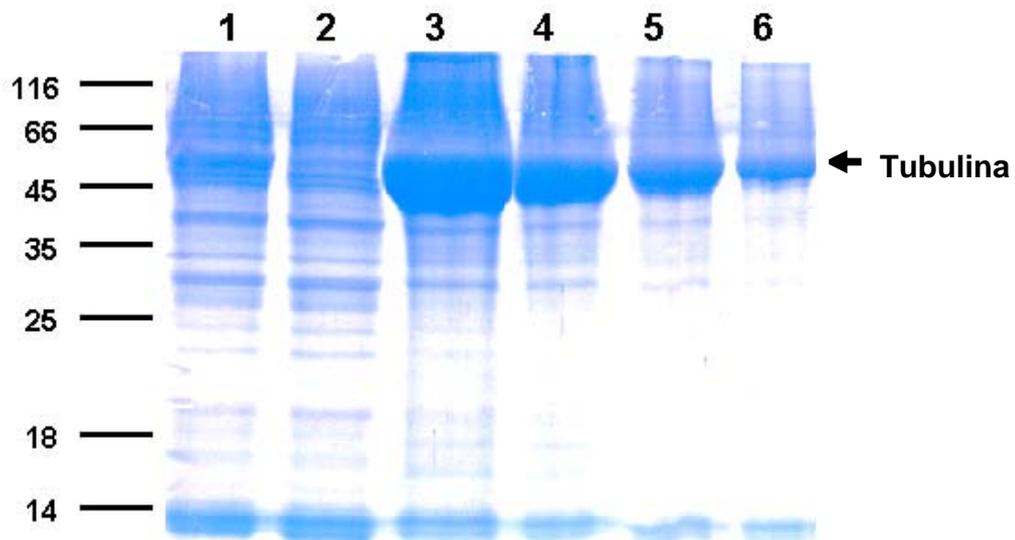


Figura 11: SDS-PAGE en condiciones desnaturalantes de las fracciones obtenidas por precipitación de microtúbulos mediada por taxol desde cerebro de rata. Se indujo polimerización de microtúbulos a 37°C en presencia de GTP 1 mM y taxol 20 μ M, para mas tarde precipitar los microtúbulos mediante ultracentrifugación (ver Materiales y Métodos). Carril 1, fracción citosólica inicial; carril 2, sobrenadante resultante de la ultracentrifugación después de inducir polimerización; y carriles 3 al 6, sedimento resultante luego de la polimerización y posterior ultracentrifugación. En los carriles 1 al 3 se cargaron 100 μ g de proteínas, 70 μ g en el carril 4, 50 μ g en el carril 5 y 30 μ g en el carril 6.

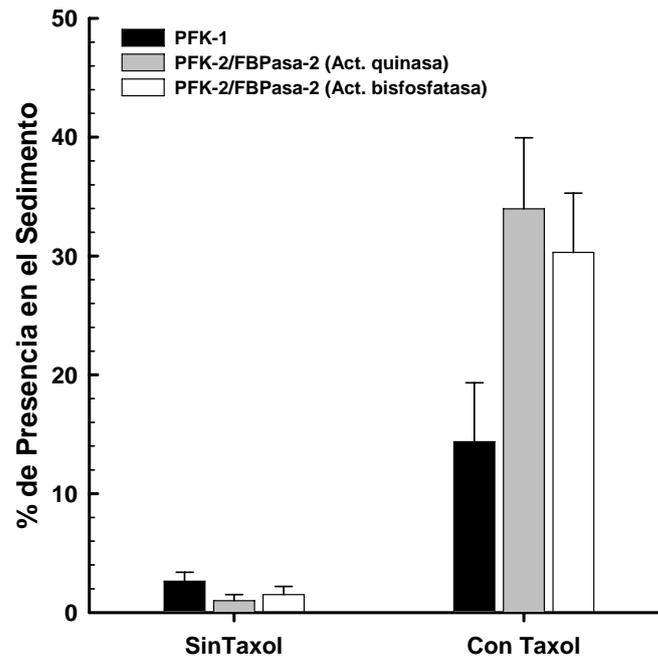


Figura 12: Asociación de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 con microtúbulos en hígado de rata. Gráfico que representa el promedio \pm desviación estándar de los porcentajes de actividad enzimática en el sedimento obtenido en presencia o ausencia de taxol. Para mas detalle ver Materiales y Métodos.

En la **figura 12** se muestran los valores de porcentaje de actividad relativa de las enzimas ensayadas en cada una de las fracciones obtenidas de la precipitación de microtúbulos. Como control positivo de la interacción con microtúbulos se cuantificó la actividad enzimática de PFK-1 en las fracciones obtenidas (Materiales y Métodos 3.2.6), ya que la unión de esta enzima con microtúbulos está ampliamente descrita en la literatura (Lehotzky *et al*, 1993; Liliom *et al*, 1999). En la **figura 12** se observa que al realizar el experimento de precipitación en ausencia de taxol en el medio de reacción casi la totalidad de las actividades de las enzimas ensayadas se detectaron en el sobrenadante, siendo éstas casi nulas en el precipitado obtenido (actividad quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 cercanas al 2%, y actividad PFK-1 cercana al 3 %, $n=3$), lo cual indica que estas enzimas no sedimentan espontáneamente al ser centrifugadas a 100.000 x g por 30 min.

Al evaluar las actividades de las enzimas ensayadas en las fracciones obtenidas en la polimerización de microtúbulos en presencia de taxol (**figura 12**), se observa que el control positivo, PFK-1, muestra un porcentaje de actividad enzimática relativa en el precipitado de cercana al 14% ($n=3$), lo cual confirma la unión de esta enzima a microtúbulos, pero mostrando un porcentaje relativo de unión a microtúbulos inferior al publicado en la bibliografía (26 %; Liliom *et al*, 1999). Al analizar las actividades de PFK-2/FBPasa-2 en el precipitado obtenido mediante polimerización de microtúbulos mediada por taxol se observa que éstas mostraron porcentajes de actividades relativas cercanas al 32% y 30% para las actividades quinasa y bisfosfatasa, respectivamente. Estos datos nos indican que cerca del 30% de la enzima PFK-2/FBPasa-2 se encontraría asociada directa o indirectamente a microtúbulos en el citosol celular.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la localización subcelular de PFK-2/FBPasa-2 en hígado de rata mediante la técnica de centrifugación diferencial. Para ello fue necesario primero montar los ensayos enzimáticos para medir las actividades quinasa y bisfosfatasa de la enzima.

Para el montaje del ensayo de actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 se purificó parcialmente la enzima P_{Pi}-PFK, la que se utilizó para determinar los niveles de Fru-2,6-P₂ sintetizado por PFK-2/FBPasa-2 en los ensayos de actividad. La P_{Pi}-PFK purificada mostró ser sensible a concentraciones de Fru-2,6-P₂ del rango 1-50 pmol/ml, lo que queda demostrado en la **figura 5**. En esta misma figura se muestra la excelente linealidad de respuesta a concentraciones crecientes de Fru-2,6-P₂, linealidad que concuerda con los datos de Van Schaftingen y colaboradores (1982a). Sin embargo la sensibilidad expresada por Van Schaftingen es superior, detectando concentraciones de Fru-2,6-P₂ inferiores a 5 pmol/ml. Esta diferencia en la sensibilidad podría deberse a la superior actividad específica y mayor purificación obtenida por Van Schaftingen (7,6 U/mg, comparado con 6,5 obtenido en la presente tesis; y 154 veces de purificación, comparado con las 69 veces de purificación obtenidas en el presente trabajo). Debido a la inferior sensibilidad de la enzima purificada, los ensayos de determinación de actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 se debieron realizar por un periodo de tiempo de 30 minutos (**figura 6**), el cual es superior al descrito (10 minutos; Bartrons *et al*, 1983). A pesar de la sensibilidad inferior de la enzima purificada, esta sensibilidad es suficiente para la cuantificación de actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 realizadas en la presente tesis, lo que se ve expresado en las **figuras 5 y 6**.

Localización Subcelular de PFK-2/FBPasa-2:

Para la determinación de la localización subcelular de PFK-2/FBPasa-2 se utilizó la técnica de centrifugación diferencial, debido a las razones expresadas en la sección 4.3. Los resultados expresados en la **figura 9** confirman los reportes bibliográficos en los cuales se indica que la enzima bifuncional tendría una localización principalmente citosólica (El-Maghrabi *et al*, 1982; Argaud *et al*, 1995; Payne *et al*, 2005) al detectarse cerca de un 90% de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en la fracción citosólica en hígado de rata (**figura 9**). Esto queda confirmado al comparar el patrón de distribución de las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 con el patrón de distribución de lactato deshidrogenasa (**figura 8**), enzima descrita como marcador de fracción citosólica en experimentos de fraccionamiento subcelular (Parry y Pedersen, 1983). La localización citoplasmática de PFK-2/FBPasa-2 queda también confirmada por otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio, ya que mediante transfección y sobreexpresión de la proteína de fusión GFP-PFK-2/FBPasa-2 en líneas celulares hepáticas y posterior observación mediante microscopía confocal se observó marcaje mayoritariamente en el citoplasma celular (Velasquez, 2005). Esta localización subcelular de PFK-2/FBPasa-2 es esperable considerando que las enzimas PFK-1 y FBPasa-1, enzimas bajo el control directo de PFK-2/FBPasa-2, y PKA y PP2A, proteínas que controlan la actividad de PFK-2/FBPasa-2, se encuentran también localizadas mayoritariamente en el citosol celular (ver Introducción de la presente Tesis, sección 2.7).

Se analizó también la estructura primaria de PFK-2/FBPasa-2 de hígado de rata mediante el programa computacional *PSORT* (www.psort.org), el cual predice la localización subcelular de una proteína a partir de su secuencia aminoacídica. Este análisis indicó, concordando con los

datos aquí expuestos, que PFK-2/FBPasa-2 de hígado de rata mostraría una localización mayoritariamente citoplasmática (56 % de probabilidad).

También en la **figura 9** se observa que la presencia de las actividades de PFK-2/FBPasa-2 en las demás fracciones citoplasmáticas (fracciones M y P) es casi nula, sugiriendo la inexistencia de la enzima bifuncional en el interior de organelos como mitocondrias, retículo endoplásmico o Golgi, y la ausencia de asociación de esta enzima a las membranas de estos organelos. Sin embargo la carencia de actividad en estas fracciones no implica necesariamente que la enzima esta ausente, puesto que una determinada enzima, al estar asociada a otra estructura, podría perder actividad catalítica y por lo tanto sería indetectable mediante los métodos aquí utilizados. Un ejemplo de este tipo es lo que sucede con TPI, enzima que al interactuar con membrana celular o microtúbulos pierde su actividad (Orosz *et al*, 2000).

Localización Nuclear de PFK-2/FBPasa-2:

En la **figura 9** se muestra también que cerca de un 12% del total de la actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2 se encuentra en la fracción nuclear. Se ha informado en la literatura la presencia en el núcleo celular de enzimas metabólicas consideradas comúnmente como citosólicas. Este es el caso de enzimas como glucoquinasa (Miwa *et al*, 1990), FBPasa-1 (Yañez *et al*, 2003 y 2004), aldolasa (Yañez *et al*, 2005) lactato deshidrogenasa, y fosfoglicerato quinasa, entre otras (ver revisión: Ronai, 1993). Resultados similares se obtuvieron en los núcleos aislados desde hígado de rata (**tabla 5**), en los cuales se detectó actividad de PFK-1 y de aldolasa, pero no de FBPasa-1. La ausencia de marcadores citoplasmáticos en los núcleos aislados (**tabla 3**) descarta que la presencia de estas actividades se deba a contaminación citoplasmática. La presencia de un pequeño porcentaje de PFK-2/FBPasa-2 en la fracción nuclear, y la confirmación de la presencia

de esta enzima en núcleos aislados (**tabla 4**) lleva inevitablemente a la interrogante de la función y mecanismo por el cual esta proteína se encuentra en dicho organelo.

Si bien los resultados experimentales expuestos nos indican que la enzima se encuentra presente en los núcleos aislados, no indican que necesariamente se encuentre al interior de dicho organelo. Se sabe que existen proteínas que se encuentran unidas a la membrana externa del núcleo, como por ejemplo NUANCE (Zen *et al*, 2002), y que por lo tanto, a pesar de estar unidas al núcleo, son proteínas consideradas con localización citosólica, ya que ejercen su función biológica en este último compartimento. Esta localización subcelular e interacción con núcleo concordaría con la localización citoplasmática de PFK-2/FBPasa-2. Si esto fuese así, indicaría la existencia de algún tipo de interacción, ya sea directa o indirecta, entre PFK-2/FBPasa-2 y la membrana nuclear externa. Este concepto sería también aplicable a las otras actividades enzimáticas detectadas en núcleos aislados (PFK-1 y aldolasa; **tabla 5**).

Es también posible que PFK-2/FBPasa-2 se encuentre en el interior del núcleo, ya que los núcleos aislados en el presente trabajo fueron sometidos a sonicación antes de realizar en ellos los ensayos enzimáticos, y por lo tanto la determinación de actividad no discrimina entre las proteínas unidas a membrana nuclear de las localizadas en el interior del núcleo. Mediante diversas técnicas se ha informado la existencia de varias enzimas del metabolismo de la glucosa en el interior del núcleo de células hepáticas, incluida FBPasa-1 (Yañez *et al*, 2004), lo cual nos lleva a sugerir la existencia de metabolismo glucídico dentro de este organelo (ver mas adelante). Por lo tanto, si una de las enzimas controladas por PFK-2/FBPasa-2, como lo es FBPasa-1 se encuentra al interior del núcleo, sería también plausible que exista un control de la actividad catalítica de FBPasa-1 por parte de PFK-2/FBPasa-2.

Existen varios mecanismos mediante los cuales una determinada proteína ingresa al núcleo. Uno de ellos consiste en que la proteína posea un tamaño molecular inferior a 45 kDa, el cual corresponde al tamaño de exclusión de los poros ubicados en la membrana nuclear. Si una proteína posee un tamaño molecular inferior al tamaño de exclusión del poro nuclear la proteína difunde libremente al interior del núcleo (Alberts, 1994). La enzima PFK-2/FBPasa-2 de hígado de rata posee un tamaño molecular de 110 kDa (El-Maghrabi *et al.*, 1982b), por lo que difícilmente podría difundir libremente al interior del núcleo.

Un segundo mecanismo consiste en que una determinada proteína, a pesar de poseer un tamaño molecular superior a 45 kDa, ingrese al núcleo mediante un proceso activo. Para ello la proteína debe poseer en su estructura primaria una Señal de Localización Nuclear (NLS), la cual consiste en una secuencia aminoacídica conservada de tipo PKKKRKV o KRPAATKKAGQAKKKK (Harreman *et al.*, 2004). Existen en la actualidad *softwares* que son capaces de indicar si una determinada secuencia aminoacídica posee algún tipo de NLS. Al analizar la secuencia aminoacídica de PFK-2/FBPasa-2 de hígado de rata (secuencia en Lively *et al.*, 1988) mediante dos de éstos *softwares* se encontró que la enzima carece de algún tipo de NLS en su estructura primaria, descartando de esta forma el ingreso de PFK-2/FBPasa-2 al núcleo mediante este mecanismo. Sin embargo es también posible que PFK-2/FBPasa-2 posea algún tipo de NLS aun no descrita, la cual podría ser responsable de la localización nuclear de la enzima.

Un tercer mecanismo es el denominado “piggy-back”, el cual consiste en que una proteína de tamaño molecular superior a 45 kDa y carente de NLS es capaz de interactuar específicamente con otra proteína que sí posea NLS en su estructura primaria, y por lo tanto el complejo formado entre estas proteínas es capaz de ingresar al núcleo. Este mecanismo de traslocación ha sido descrito para la enzima glucoquinasa, la cual, para ingresar al núcleo en respuesta a bajos niveles

de glucosa, se une a la proteína GGRP que si posee NLS (Proteína Reguladora de Glucoquinasa; Shiota *et al*, 1999). Este mecanismo no se puede descartar para la localización nuclear de PFK-2/FBPasa-2, ya que no hay estudios dedicados a estudiar la posible asociación de PFK-2/FBPasa-2 a alguna proteína que promueva su traslocación al núcleo.

Existe sin embargo un cuarto mecanismo mediante el cual una determinada proteína podría localizarse en el interior del núcleo. Se ha descrito que el proceso de traducción o síntesis de proteínas, el cual generalmente se considera exclusivamente citoplasmático, ocurre también dentro del núcleo, y que cerca del 10% del total de la síntesis de proteínas en la célula ocurre al interior de este organelo (Iborra *et al*, 2001). Por lo tanto se podría postular que en el núcleo se sintetizan las proteínas necesarias para llevar a cabo los procesos que en él ocurren. Según esta hipótesis, la presencia de enzimas metabólicas al interior del núcleo obedecería a la necesidad de sintetizar energía al interior de este organelo para abastecer de ella a otros procesos que se llevan a cabo en el núcleo, y por lo tanto la presencia de PFK-2/FBPasa-2 sería necesaria para controlar esta síntesis de energía. Además, PKA y PP2A se encuentran también presentes dentro del núcleo (Montminy y Bilezikjian, 1987; Grove *et al*, 1987; Jakes *et al*, 1986), las cuales podrían ser parte de todo un sistema que involucraría vías metabólicas y transducción de señales.

Como se indicó anteriormente, las actividades enzimáticas de PFK-1 y aldolasa también fueron detectadas en núcleos aislados, no así la de FBPasa-1 (**tabla 5**). FBPasa-1 es una enzima principalmente citosólica, mostrando unión a elementos particulados en hígado (Saez *et al*, 1996; Bertinat, 2003). Sin embargo varios laboratorios han descrito mediante técnicas inmunológicas a FBPasa-1 localizada en el núcleo de cardiomiocitos (Gizak y Dzugaj, 2003) y de células hepáticas (Yañez *et al*, 2003 y 2004; Bertinat, 2003). En este último trabajo se indica que la localización subcelular de FBPasa-1 es dinámica, ya que la enzima se localiza en citoplasma en

respuesta a ayuno prolongado y en el núcleo en respuesta a glucosa, lo cual sugiere que la localización nuclear de FBPasa-1 sería un mecanismo de control de la gluconeogenesis. Gizak y Dzugaj (2003) detectan actividad FBPasa-1 en núcleos aislados de cardiomiocitos, pero indican que su actividad enzimática, la cual es detectada sólo cuando los núcleos son pretratados con el detergente Triton X-100, es extremadamente baja (cerca del 1% del total celular) teniendo en cuenta que la concentración de esta enzima en núcleo es cuatro a cinco veces mayor que en citosol, compartimento en el cual si se detecta su actividad. Esto concuerda con los datos expuestos en la **tabla 5** y con los trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio (Saez *et al*, 1996) en los cuales la actividad FBPasa-1 es muy baja o no se detecta en los núcleos aislados. Nuestro laboratorio ha demostrado que al tratar fracciones particuladas de hígado de rata con Triton X-100 se detecta actividad FBPasa-1 en la fracción nuclear (Saez *et al*, 1996). Estos datos sugieren la unión no covalente de FBPasa-1 a estructuras nucleares, la cual probablemente cause inhibición de la actividad catalítica de esta enzima al inducir algún tipo de cambio conformacional en su estructura tridimensional.

Otra explicación a la carencia de actividad de FBPasa-1 en núcleo sería el alto nivel de Fru-2,6-P₂ que podrían existir en este organelo. Si bien no se detecto Fru-2,6-P₂ en los núcleos aislados, el hecho de detectar actividad quinasa de PFK-2/FBPasa-2, y la nula actividad bisfosfatasa en los núcleos aislados (**tabla 4 y figura 9**) indicaría que se sintetiza pero no se degrada Fru-2,6-P₂, lo que nos permite sugerir que este azúcar estaría inhibiendo a FBPasa-1, razón de la carencia de actividad FBPasa-1 en núcleos. Sin embargo queda la interrogante del motivo por el cual PFK-2/FBPasa-2 no presenta actividad bisfosfatasa en núcleo; se podría postular que la posible unión de PFK-2/FBPasa-2 a otras estructuras nucleares inhibiría la actividad bisfosfatasa de la enzima bifuncional.

Si bien no se analizó la localización nuclear de PFK-2/FBPasa-2 en respuesta al estado metabólico del organismo, parece poco probable que su traslocación al núcleo sea un mecanismo de regulación de su actividad, ya que la enzima es funcional independiente de la condición metabólica del organismo. Además el mecanismo más importante para su regulación a corto plazo es la activación e inhibición de sus actividades catalíticas mediante fosforilación y desfosforilación dependiente de proteínas de transducción de señales, por lo que parecería innecesario reclutar a la enzima bifuncional al interior del núcleo en respuesta a algún estímulo hormonal o metabólico.

Una de las hipótesis más interesantes que explicaría la función de enzimas del metabolismo de la glucosa en núcleo indica que estas enzimas estarían involucradas en el metabolismo del DNA y en mecanismos de control de la expresión genica a través de la estabilización de la matriz nuclear. Se ha demostrado, por ejemplo, que LDH participa en la reparación del DNA (Popanda, 1998), y que GAPDH estaría involucrada en la transcripción, junto con ser capaz de reconocer secuencias y estructuras de RNA (Sirover, 1997). Por lo tanto sería plausible que la localización nuclear de PFK-2/FBPasa-2, FBPasa-1 y aldolasa estén también relacionadas con mecanismos de regulación de expresión genica.

PFK-2/FBPasa-2 y su Interacción con Microtúbulos.

Como se muestra en la **figura 12**, mediante experimentos de co-sedimentación se encontró que cerca del 30% de la actividad de PFK-2/FBPasa-2 estaría unida a microtubulos en cerebro de rata. En este experimento se utilizó cerebro de rata y no hígado debido a la dificultad que presenta éste último para el aislamiento de microtubulos a causa del gran contenido de glicógeno que posee, el cual interfiere en la precipitación de microtubulos, y debido también a la ventaja que presenta el tejido cerebral de poseer gran cantidad de tubulina.

Como se observa en la electroforesis en condiciones desnaturalantes (**figura 11**), en las fracciones de sedimento aislado se observa una intensa banda de tamaño molecular 55 kDa, probablemente correspondiente a tubulina, la cual no aparece en el carril correspondiente al sobrenadante, lo cual nos sugiere, pero no asegura, que ocurrió polimerización y posterior sedimentación de microtubulos mediada por taxol. El mismo experimento realizado en ausencia de taxol genera una despreciable cantidad de precipitado, y no muestra la banda a 55 kDa, la que si aparece en el sobrenadante, indicando que en ausencia de taxol la polimerización de microtubulos no ocurre.

Al comparar las actividades quinasa y bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa-2 en sobrenadante y precipitado obtenidos por precipitación de microtubulos (**figura 12**), se observa que cerca del 30% del total de ambas actividades del extracto citosólico de cerebro de rata precipitan junto a los microtúbulos polimerizados, al igual que un 16% del total de la actividad PFK-1, la cual se utilizó como control positivo de unión a microtúbulos, debido a que se ha descrito como una enzima unida a microtúbulos en cerebro de rata (Lehotzky *et al*, 1993). Estos datos nos indican que una importante fracción de PFK-2/FBPasa-2 se encontraria unida a microtubulos en cerebro de rata. Sin embargo es necesario tener en cuenta que la presencia de actividad enzimatica de PFK-2/FBPasa-2 en los microtubulos sedimentados puede deberse tambien a arrastre inespecifico de la enzima.

Experimentos de localización subcelular de PFK-2/FBPasa-2 realizados en nuestro laboratorio mediante transfección y sobreexpresion de la proteína de fusión GFP-PFK-2/FBPasa-2 en líneas celulares hepáticas (Velasquez, 2005) muestran que la localización de la proteína de fusión no es uniforme en el citosol, sugiriendo que esta proteína se encuentra particulada y

compartimentalizada al interior de la célula, lo cual podría deberse a su interacción con microtubulos.

Se ha descrito la unión a citoesqueleto en cerebro de rata de varias enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa, como es el caso de hexoquinasa (Wagner *et al*, 2001), PFK-1 (Lehotzky *et al*, 1993), aldolasa (Vertessy *et al*, 1997), gliceraldehido-3-P deshidrogenasa (Huitorel y Pantolini, 1985), y piruvato quinasa (Kovacs *et al*, 2003). Se ha demostrado que esta unión en varios de estos casos es transitoria, y que depende, entre otros factores, de la presencia de iones y/o de metabolitos en el medio, como es el caso de la modulación por parte de PEP a la unión de piruvato quinasa a microtúbulos (Kovacs *et al*, 2003). También se ha demostrado que algunas de estas enzimas controlan el ensamblaje y empaquetamiento de la red microtubular, como es el caso de GAPDH (Huitorel y Pantolini, 1985). Por otro lado, experimentos desarrollados por Liliom y colaboradores (1999) han demostrado que la asociación de enzimas glicolíticas a microtubulos en tejido cerebral aumenta la tasa de glicólisis en un 80% comparado con un control en ausencia de microtúbulos, y que esta asociación protege al tejido cerebral de la toxicidad causada por cobre, lo cual demuestra la importancia fisiológica de la asociación de enzimas metabólicas a la red microtubular. Vertessy y colaboradores (1997) proponen un sistema dinámico conformado por las enzimas glicolíticas secuenciales aldolasa y PFK-1, el cual se encontraría estabilizado por microtúbulos.

Debido a consideraciones teóricas y experimentales han surgido varias hipótesis sobre las razones por las cuales enzimas metabólicas se asociarían a componentes del citoesqueleto. Se ha sugerido que la compartimentalización de las vías metabólicas es un importante mecanismo regulatorio (Srere, 1987; Srere y Ovadi, 1990; Ovadi, y Srere, 2000). De esta forma la unión de enzimas al citoesqueleto permitiría una organización espacial y temporal de los procesos que

ocurren en el citosol. Así por ejemplo, permitiría mantener espacialmente separadas a vías metabólicas opuestas, como lo son la glicólisis y gluconeogénesis, evitando de esta manera la formación de ciclos fútiles en los cuales se degrade y se sintetice simultáneamente un determinado metabolito. Otro importante fundamento para la asociación de enzimas al citoesqueleto sería la función que cumpliría este último como estructura de andamiaje para la formación de complejos multienzimáticos que permitirían la canalización de metabolitos. Es importante considerar que cerca del 80% de los intermediarios sintetizados en la célula tienen solo un destino enzimático, por lo que la difusión de estos metabolitos al medio celular resultaría poco ventajosa, especialmente para vías altamente procesivas. Mediante la formación de complejos multienzimáticos se permitiría que un metabolito sintetizado por una enzima sea transferido directamente a la siguiente, incrementando así el flujo metabólico. De esta forma se podría postular que la unión de PFK-2/FBPasa-2 a microtúbulos sería una manera de controlar los niveles locales de Fru-2,6-P₂, para así regular las actividades de FBPasa-1 y PFK-1, las cuales se encontrarían localizadas en la vecindad de la enzima bifuncional conformando una especie de micro-complejo. Este concepto se hace más evidente considerando que la única utilidad descrita hasta la fecha para Fru-2,6-P₂ en mamíferos es el control de las actividades de PFK-1 y FBPasa-1.

Si bien la unión de PFK-1 a microtúbulos está ampliamente estudiada (Lehotzky *et al*, 1993), no se ha descrito la unión de FBPasa-1 a esta estructura. Se ha demostrado que la localización subcelular de FBPasa-1 en el citosol no es uniforme (Saez *et al*, 1996), sugiriendo que esta enzima se encuentra en forma particulada en el citoplasma de la célula. Sin embargo no se ha determinado la estructura citosólica en la cual se encuentra particulada, lo que nos hace aventurarnos a sugerir un rol importante de los microtubulos en esta compartimentalización

Otra consideración importante de la unión de PFK-2/FBPasa-2 a microtúbulos está relacionada con las vías de transducción de señales. Numerosas publicaciones indican que la compartimentalización de enzimas de señalización sería de vital importancia para la especificidad de la transmisión de señales intracelulares, especialmente para proteínas quinasas y fosfatasas (Walsh y Van Patten, 1994; Hunter, 2000; Alto *et al*, 2002). La localización de estas enzimas en la vecindad de sus sustratos sería uno de los mecanismos mediante el cual una determinada señal controlaría específicamente a las proteínas blanco, y la manera de regular la localización de las proteínas de señalización sería mediante su unión a elementos particulados como citoesqueleto (Forgacs *et al*, 2004; Pawson y Scott, 1999).

Una gran cantidad de estudios han sido dedicados a dilucidar el mecanismo de especificidad de sustrato de PKA, proteína involucrada en la fosforilación de PFK-2/FBPasa-2 en respuesta a glucagón. Esta proteína se encuentra asociada en gran proporción a microtubulos y a otras estructuras celulares mediante proteínas de anclaje llamadas AKAP (Dell'Acqua y Scott, 1997; Diviani y Scott, 2000). Se han descrito varias isoformas de AKAP, las cuales se diferencian principalmente por su estructura primaria y por su localización subcelular, existiendo por lo tanto diferentes patrones de localización particulada de PKA (Diviani y Scott, 2000). Una importante característica de estas AKAP es que no sólo unen a PKA, sino que también son capaces de unir a otras proteínas, conformando complejos multienzimáticos de señalización (Dell'aqua y Scott, 1997). Por ejemplo, se ha descrito la existencia de AKAPs que unen simultáneamente a las enzimas PKA, PP2A y fosfodiesterasa, manteniendo de esta forma un estricto control sobre las proteínas vecinas a las cuales se controla su actividad (Dodge *et al*, 2001; Davare *et al*, 2000). También se ha descrito que la enzima PP2A, proteína que desfosforila a PFK-2/FBPasa-2 en respuesta a glucosa, no se encuentra localizada de forma uniforme en el

citoplasma, siendo la subunidad B la responsable de determinar diferentes patrones de localización subcelular (Tehrani *et al*, 1996). Sontag y colaboradores (1995) indican que un gran porcentaje de PP2A en la célula se encuentra unida directamente a microtúbulos. Por otro lado Nishimura y Uyeda (1995) indican que el hecho que PP2A sea capaz de desfosforilar a fosforilasa *a*, piruvato quinasa y PFK-2/FBPasa-2, pero sólo a esta última vía Xu-5-P se debería a diferencias en la localización subcelular de PP2A y sus sustratos antes mencionados. Por lo tanto integrando el concepto de compartimentalización de la señalización subcelular y la interacción de PKA y PP2A a microtúbulos, sería razonable pensar en la existencia de un complejo multienzimático que involucre proteínas de señalización y enzimas metabólicas, dado esto último por la unión de PFK-2/FBPasa-2 a microtubulos. Además PFK-1 y aldolasa se encuentran también unidas a microtúbulos (Vertessy *et al*, 1997), y si bien no se ha descrito la unión de FBPasa-1 a esta estructura subcelular, si se sabe que se encuentra de forma particulada y compartimentalizada en el citosol. Por lo tanto se puede postular la existencia de complejos conformados por las enzimas metabólicas y de señalización antes descritas, las cuales utilizarían a microtúbulos como estructura de andamiaje, donde PKA y PP2A determinarían el estado de fosforilación de PFK-2/FBPasa-2 localizada en las cercanías de las enzimas de señalización. PFK-2/FBPasa-2 a su vez controlaría los niveles locales de Fru-2,6-P₂, regulando así las actividades de PFK-1 y FBPasa-1, las cuales se encontrarían localizadas también en este complejo. De esta manera se mantendría la especificidad y fidelidad de la transmisión de la señal, generando la respuesta fisiológica correcta ante un determinado estímulo hormonal o metabólico.

Conclusiones y Perspectivas:

Se puede concluir finalmente que la localización subcelular de PFK-2/FBPasa-2 es mayoritariamente citosólica, y que parte importante de la enzima bifuncional encontrada en esta

fracción se encuentra asociada a microtúbulos. Los datos obtenidos en el presente trabajo indican también que PFK-2/FBPasa-2 no se encontraría localizada en organelos citoplasmáticos como mitocondrias o retículo endoplásmico, ni tampoco interactuando con membranas de estos organelos. Por otro lado, un pequeño pero significativo porcentaje de PFK-2/FBPasa-2 se encuentra localizada en el núcleo. Estos resultados nos permiten concluir que PFK-2/FBPasa-2 se encuentra compartiendo la localización subcelular con las proteínas relacionadas con su función biológica, PKA, PP2A, PFK-1 y FBPasa-1, ratificando el concepto de compartimentalización y organización subcelular del metabolismo de la glucosa.

No obstante sería importante confirmar los resultados aquí expuestos mediante algún tipo de técnica que permitiera detectar a PFK-2/FBPasa-2 de manera independiente de su actividad catalítica. La utilización de anticuerpos específicos anti-PFK-2/FBPasa-2 se presenta como la herramienta más indicada para ello, tanto para estudiar su localización subcelular como para el análisis de su unión a microtúbulos.

Por otro lado se ve importante determinar la localización precisa de PFK-2/FBPasa-2 en los núcleos aislados, es decir, determinar si se encuentra unida a la membrana o en el interior de este organelo, y si fuese esta última, a qué estructura nuclear se encuentra asociada. También se ve importante estudiar las condiciones metabólicas y el mecanismo molecular que gobierna la presencia de la enzima bifuncional en núcleo, y determinar la función y significado fisiológico de esta localización.

Por último y no menos relevante es analizar la posible unión de PFK-2/FBPasa-2 a microtúbulos a través de metodologías experimentales más concluyentes, como por ejemplo aislamiento *in vivo* de la red microtubular, descartando de esta forma el posible arrastre inespecífico de PFK-2/FBPasa-2 por microtúbulos. Una vez confirmada la unión de la enzima

bifuncional a microtubulos sería interesante determinar los factores que estarían involucrados en la unión de PFK-2/FBPasa-2 a microtúbulos, tales como estado metabólico o presencia de metabolitos. También resulta atrayente estudiar las posibles estructuras a las cuales PFK-2/FBPasa-2 se encuentra asociada, junto con sus posibles interacciones proteína-proteína con PKA, PP2A, FBPasa-1 y PFK-1, de tal forma de esclarecer el significado fisiológico de esta compartimentalización.

6. REFERENCIAS

- Alarcón, O., Gonzales, F., Flores, H., Marcus, F. (1971) Isolation of pig kidney aldolase B. *Biochem. Biophys. Acta.* 277: 460-3
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J, Raff, M., Roberts, K. Watson, J., (1994) Molecular biology of the cell. 3° edition, Garland Publishing, New York.
- Alto N., Carlisle Michel J.J, Dodge K.L., Langeberg L.K., Scott J.D. (2002) Intracellular targeting of protein kinases and phosphatases. *Diabetes*, 51:385-8.
- Argaud D., Lange A.J., Becker T.C., Okar D.A., el-Maghrabi M.R., Newgard C.B., Pilkis S.J. (1995) Adenovirus-mediated overexpression of liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in gluconeogenic rat hepatoma cells. Paradoxical effect on Fru-2,6-P2 levels. *J. Biol. Chem.*, 270: 24229-36.
- Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. (1990) Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 265: 7202-6.
- Baltrusch S., Lenzen S., Okar D.A., Lange A.J., Tiedge M. (2001) 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.*, 276: 43915-23.
- Bartrons R., Hue L., Van Schaftingen E., Hers HG. (1983) Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.*, 214: 829-37.
- Bertinat, R. (2003). Expresión de la fructosa 1,6-bisfosfatasa en tejido de rata y determinación del efecto de metabolitos sobre la localización subcelular. Tesis de Pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Blobel G., Potter V.R. (1966) Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*, 154: 1662-5.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54.
- Bruni, P., Vandoolaeghe, P., Rousseau, G.G., Hue, L., Rider, M.H (1999) Expression and regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose- 2,6-bisphosphatase isozymes in white adipose tissue. *Eur. J. Biochem.*, 259: 756-61.
- Carr, D.W., Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D., Cone, R.D., Scott, J.D. (1992) Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *J. Biol. Chem.*, 267, 16816-23.

- Coghlan, V., Perrino, B., Howard, M., Langeberg, L., Hicks, J., Gallatin, M., y Scott, J., (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*, 267: 108-11.
- Colosia, A.D., Marker, A.J., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R., Granner, D.K., Tauler, A., Pilkis, J., Pilkis, S.J. (1988) Induction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. *J. Biol. Chem.*, 263: 18669-77.
- Crepin, K.M., De Cloedt, M., Vertommen, D., Foret, D., Michel, A., Rider, M.H., Rousseau, G.G., Hue, L. (1992) Molecular forms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase expressed in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 267: 21698-704.
- Darville, M., Chikti, M., Lebeau, E., Hue, L., Rousseau, G (1991) A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.*, 288: 91-4.
- Darville, M., Crepin, K., Hue, L., Rousseau, G. (1989) 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6543-7.
- Davare, M., Horne, M., Hell, J. (2000.) Protein Phosphatase 2A Is Associated with Class C L-type Calcium Channels (Cav1.2) and Antagonizes Channel Phosphorylation by cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem*, 275: 39710-39717.
- De Los Pinos, E., Fernandez De Mattos, S., Joaquin, M., Tauler, A. (2001) Insulin inhibits glucocorticoid-stimulated L-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Biochem. J.*, 353: 267-73.
- Dell'Acqua, M., Scott, J. (1997) Protein Kinase A Anchoring. *J. Biol. Chem*, 272: 12881-12884.
- Deprez, J., Bertrand, L., Alessi, D.R., Krause, U., Hue, L., Rider, M.H. (2000) Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem. J.*, 347: 305.
- Diviani, D., Scott, J. (2000). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J. Cell. Sci*; 114: 1431-1437.
- Dodge, K.L., Khouangsathiene, S., Kapiloff, M.S., Mouton, R., Hill, E.V., Houslay, M.D., Langeberg L.K., Scott, J.D. (2001) mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO. J.*, 20: 1921-30.
- Dupriez, V.J., Rousseau, G.G. (1997) Glucose response elements in a gene that codes for 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *DNA Cell. Biol.*, 16: 1075-85.

- El-Maghrabi, M.R., Claus, T.H., Pilkis, J., Fox, E., Pilkis, S.J. (1982a) Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257: 7603-7.
- El-Maghrabi, M.R., Fox, E., Pilkis, J., Pilkis, J. (1982b) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106: 794-802.
- El-Maghrabi, M.R., Pilkis S.J. (1984) Rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a review of relationships between the two activities of the enzyme. *J. Cell. Biochem.*, 26: 1-17.
- Forgacs, G., Yook, S.H., Janmey, P.A., Jeong, H., Burd, C.G. (2004) Role of the cytoskeleton in signaling networks. *J. Cell. Sci.*, 117: 2769-75.
- Graham, J.M. (1993) In Biomembrane Protocols; Methods in Molecular Biology **19** (ed Graham, J.M. & Higgins, J.A.) Humana Press, Totowa, NJ, USA pp 1-28.
- Grove, J.R., Price, D.J., Goodman, H.M., Avruch, J. (1987) Recombinant fragment of protein kinase inhibitor blocks cyclic AMP-dependent gene transcription. *Science*, 238: 530-3.
- Harreman, M., Kline, T., Milfors, H., Harben, B., Hodel, A., Corbett, A (2004) Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signal. *J Biol. Chem.*, 279: 20613-21.
- Horecker, B., Kornberg, A. (1948) The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 175: 385-90.
- Hue, L., Blackmore, P.F., Shikama, H., Robinson-Steiner, A., Exton, J.H. (1982) Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs. *J. Biol. Chem.*, 257: 4308-13.
- Huitorel, P., Pantaloni, D., (1985), Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur. J. Biochem*, 150: 265.
- Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell*, 100: 113-27
- Iborra, F., Jackson, D., Cook, P. (2001), Coupled Transcription and Translation Within Nuclei of Mammalian Cells. *Science*; 293: 1141.
- Jakes, S., Mellgren, R.L., Schlender, K.K. (1986) Isolation and characterization of an inhibitor-sensitive and a polycation-stimulated protein phosphatase from rat liver nuclei. *Biochim. Biophys. Acta.*, 888: 135-42.
- Kaplan, L., Pesce, A. (1996) Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation. 3^o edition,

St Louis, Mosby.

- Kitajima, S., Uyeda, K., (1983) A binding study of the interaction of beta-D-fructose 2,6-bisphosphate with phosphofructokinase and fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 258: 7352-7.
- Kitajima, S., Sakakibara, R., Uyeda, K. (1984) Kinetic studies of fructose 6-phosphate,2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 259: 6896-903.
- Kitamura, K., Uyeda, K., Kangawa, K., Matsuo, H. (1989) Purification and characterization of rat skeletal muscle fructose-6-phosphate,2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 264. 9799-806
- Kovacs, J., Low, P., Pacz, A., Horvath, I., Olah, J., Ovadi, J. (2003) Phosphoenolpyruvate-dependent tubulin-pyruvate kinase interaction at different organizational levels. *J. Biol. Chem.*, 278: 7126-30.
- Lange, A.J., Kummel, L., El-Maghrabi, M.R., Tauler, A., Colosia, A., Marker, A., Pilkis, J. (1989) Sequence of the 5'-flanking region of the rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene: regulation by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162: 753-60.
- Lange, A.J., Espinet, C., Hall, R., El-Maghrabi, M.R., Vargas, A.M., Miksicek, R.J., Granner, D.K., Pilkis, S.J. (1992) 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.*, 267: 15673-80.
- Lehotzky, A., Telegdi, M., Liliom, K., Ovadi, J. (1993) Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects. *J. Biol. Chem.*, 268: 10888-94.
- Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M., Rousseau, G.G. (1993) Liver-specific factor binding to the liver promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *J. Biol. Chem.*, 268: 19896-905.
- Liliom, K., Wagner, G., Kovacs, J., Comin, B., Cascante, M., Orosz, F., Ovadi, J. (1999) Combined enhancement of microtubule assembly and glucose metabolism in neuronal systems in vitro: decreased sensitivity to copper toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 605-10
- Lively, M.O., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., D'Angelo, G., Colosia, A.D., Ciavola, J.A., Fraser, B.A., Pilkis, S. J. (1988) Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 263: 839-49.
- Manzano, A., Perez, J., Nadal, M., Estivill, X., Lange, A., Bartrons, R. (1999) Cloning,

expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene*, 229: 83-9.

- Massa, L., Baltrusch, S., Okar, D.A., Lange, A.J., Lenzen, S., Tiedge, M. (2004) Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes*. 53: 1020-9.
- Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., y Caro J. (2002) Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* 277, 6183-7.
- Mizuguchi, H., Cook, P.F., Tai, C.H., Hasemann, C.A., Uyeda, K. (1999) Reaction mechanism of fructose-2,6-bisphosphatase. A mutation of nucleophilic catalyst, histidine 256, induces an alteration in the reaction pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 2166-75.
- Montminy, M.R., Bilezikjian, L.M. (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 328: 175-8.
- Morgunov, I., Srere, P.A. (1998) Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate. *J. Biol. Chem.* 273: 29540-4.
- Morita, T., Niwata, Y., Ohgi, K., Ogawa, M., Irie, M. (1986) Distribution of two urinary ribonuclease-like enzymes in human organs and body fluids. *J Biochem (Tokyo)*, 99: 17-25.
- Navarro-Sabate, A., Manzano, A., Riera, L., Rosa, J., Ventura, F., Bartrons, R. (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB-3): promoter characterization and genomic structure. *Gene*, 264: 131-8.
- Nishimura, M., Fedorov, S., Uyeda, K. (1994) Glucose-stimulated synthesis of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver. Dephosphorylation of fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase and activation by a sugar phosphate. *J. Biol. Chem.*, 269: 26100-6.
- Nishimura, M., Uyeda, K. (1995) Purification and characterization of a novel xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase catalyzing dephosphorylation of fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 270: 26341-6.
- Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Riera, L., Bartrons, R., Lange, A.J. (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 30-5.
- Orosz, F., Wagner, G., Liliom, K., Kovacs, J., Baroti, K., Horányi, Farkas, T., Hollán, S.,

- Ovádi, J. (2000) Enhanced association of mutant triosephosphate isomerase to red cell membranes and to brain microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 1026-31.
- Ovadi, J., Srere, P.A. (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* ,192: 255-80.
- Parry, D.M., Pedersen, P.L. (1983) Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. Evidence for an outer mitochondrial membrane location. *J. Biol. Chem.*, 258: 10904-12.
- Parry, D.M., Pedersen, P.L. (1984) Intracellular localization of rat kidney hexokinase. Evidence for an association with low density mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 259: 8917-23.
- Pawson, T., Scott, J.(1997) Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science*, 278: 2075-80.
- Payne, V.A., Arden, C., Wu, C., Lange, A.J., Agius, L. (2005) Dual role of phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes.*, 54:1949-57.
- Pierreux, C.E., Urso, B., De Meyts, P., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P. (1998) Inhibition by insulin of glucocorticoid-induced gene transcription: involvement of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor and independence from the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Endocrinol.*, 12: 1343-54.
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., McGrane, M.M. Pilkis, J., Claus, T.H. (1981a) The role of fructose 2,6-bisphosphate in regulation of fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 256: 11489-95.
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., Claus, T.H., Cumming, D.A. (1981b) Fructose 2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3171-4.
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., McGrane, M., Pilkis, J., Fox, E., Claus, T.H. (1982) Fructose 2,6-bisphosphate: a mediator of hormone action at the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate substrate cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 25: 245-66.
- Pilkis, S.J., Chrisman, T., Burgess, B., McGrane, M., Colosia, A., Pilkis, J., Claus, T.H., El-Maghrabi, M.R. (1983) Rat hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a unique bifunctional enzyme. *Adv. Enzyme. Regul.* 21: 147-73.
- Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J., Lange, A.J. (1995) 6-Phosphofructo-2-

- kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 799-835.
- Popanda, O., G. Fox, y H.W. Thielmann. (1998) Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1397: 102-17
- Prentki, M., Crettaz, M., Jeanrenaud, B. (1981) Role of microtubules in insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256: 4336-40.
- Ren, Y, Zhao, J., Feng, J. (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci.*, 23: 3316-24.
- Reyes, A., Burgos, ME., Hubert, E., Slebe, JC. (1987) Selective thiol group modifications renders fructose 1,6-bisphosphatase insensitive to fructose-2,6-bisphosphate inhibition. *J. Biol. Chem.* 262: 8451-4.
- Reyes, A., Bravo, N., Ludwig, H., Iriarte, A., Slebe, JC. (1993) Modification of cys/28 of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase with different thiol reagents: size dependent effect on the substrate and fructose-2,6-bisphosphate interaction. *J. Prot. Chem.* 2: 159-68.
- Roberts, S.J., Somero, G.N. (1989) Properties of the interaction between phosphofructokinase and actin. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 284-94.
- Ronai, Z., (1993), Glycolytic Enzymes as DNA Binding Proteins. *Int. J. Biochem.* 25: 1073.
- Rosa, J.L., Ventura, F., Tauler, A., Bartrons, R. (1993) Regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression by glucagon. *J. Biol. Chem.*, 268: 22540-5.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot., A, Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamosas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P., Vidal, M. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature.* 437: 1173-8.
- Saez, D.E., (1996). Localización subcelular y asociación entre fructosa-1,6-bisfosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Saez, D.E., Figueroa, C.D., Concha, II., Slebe, J.C. (1996) Localization of the fructose 1,6-

- bisphosphatase at the nuclear periphery. *J. Cell. Biochem.* 63: 453-62.
- Saez, D.E., Slebe, J.C. (2000) Subcellular localization of aldolase B. *J. Cell. Biochem.* 78: 62-72.
- Sakakibara, R., Kitajima, S., Uyeda, K. (1984) Differences in kinetic properties of phospho and dephospho forms of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 259: 41-6.
- Scherer, P.E., Lisanti, M.P.(1997) Association of phosphofructokinase-M with caveolin-3 in differentiated skeletal myotubes. Dynamic regulation by extracellular glucose and intracellular metabolites. *J. Biol. Chem.* 272: 20698-705.
- Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J., Magnuson, M. (1999), Nuclear import of glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase, *J. Biol. Chem.*, 274: 37125-30.
- Sirover, M. A. (1997) Role of glycolytic protein, glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase in normal cell function and in cell pathology. *J. Cell Biochem.* 66: 133-40.
- Smidth, E. (1974) Methods of enzymatic analysis. Pag 650.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Bloom, G.S., Mumby, M.C. (1995) A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J. Cell. Biol.* 128: 1131-44.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White, C.L. 3rd, Mumby, M.C., Bloom, G.S. (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J. Biol, Chem.* 274: 25490-8.
- Srere, P.A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*,56: 89-124.
- Srere, P.A., Ovadi, J. (1990) Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett.*, 268: 360-4.
- Stephan, P., Clarke, F., Morton, D. (1986) The indirect binding of triose-phosphate isomerase to myofibrils to form a glycolytic enzyme mini-complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 873: 127-35.
- Teherani, M., Munby, M., Kamibayashi, C. (1996) Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J. Biol. Chem.*, 271: 5164-70.

- Theurkauf, W.E., Vallee, R.B. (1982) Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 257: 3284-90.
- Uyeda, K., Furuya, E., Luby, L.J. (1981) The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J. Biol. Chem.* 256: 8394-9.
- Van Schaftingen, E., Davies, D.R., Hers, H.G. (1981a) Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic AMP - dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 362-8.
- Van Schaftingen, E., Hers, H.G. (1981b) Phosphofructokinase 2: the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose 6-phosphate and ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 1078-84.
- Van Schaftingen, E., Jett, M.F., Hue, L., Hers, H.G. (1981c) Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 78: 3483-6.
- Van Schaftingen, E., Hers, H. (1981d) Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 1861-3.
- Van Schaftingen, E., Davies, D.R., Hers, H.G. (1982a) Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 124: 143-9.
- Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R., Hers, H.G. (1982b) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 129: 191-5.
- Van Schaftingen, E., Coulie, P.G., Van Snick, J., Hers, H.G. (1986) Reaction of phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase with monoclonal antibodies. A proof of the bifunctionality of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 159: 367-73.
- Velásquez, Z. (2005) Clonamiento y localización subcelular de la isoforma hepática de rata de 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa. Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Vertessy, B.G., Orosz, F., Kovacs, J., Ovadi, J. (1997) Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *J. Biol. Chem.* 272: 25542-6.
- Wagner, G., Kovacs, J., Low, P., Orosz, F., Ovadi, J. (2001) Tubulin and microtubule are potential targets for brain hexokinase binding. *FEBS. Lett.* 509: 81-4.
- Walsh, D.A., Van Patten, S.M. (1994) Multiple pathway signal transduction by the cAMP-

dependent protein kinase. *FASEB. J.* 8: 1227-36.

Westphal, R.S., Tavalin, S.J., Lin, J.W., Alto, N.M., Fraser, I.D., Langeberg, L.K., Sheng, M., Scott, J.D. (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science.* 285: 93-6.

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

Yañez, A., Garcia-Rocha, M., Bertinat, R., Droppelmann, C., Concha, I., Guinovart, J., y Slebe, J. (2004) Subcellular localization of liver FBPase is modulated by metabolic conditions. *FEBS Lett.*, 577: 154-8.

Yañez, A., Bertinat, R., Spichiger, C., Carcamo, J., de Los Angeles Garcia, M., concha, I., Nualart, F., y Slebe, J.(2005) Novel expression of liver FBPase in Langerhans islets of human and rat pancreas. *J. Cell. Physiol.*, 205:19-24.

Zen, Y., Libbotte, T., Munck, M., Noegel, A., Korenbaum, E., (2002) NUANCE, a Giant Protein Connecting Nuclei and Actin Cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 115: 3207.

Zimmermann, P.L., Pierreux, C.E., Rigaud, G., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P. (1997) In vivo protein-DNA interactions on a glucocorticoid response unit of a liver-specific gene: hormone-induced transcription factor binding to constitutively open chromatin. *DNA. Cell. Biol.*, 16: 713-23.