

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA**

TESIS DOCTORAL

**Estructura-función en el mecanismo de acción
de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica:
Efecto modulador de la tiorredoxina**

**F. JAVIER LÓPEZ JARAMILLO
GRANADA 1995**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Estructura-función en el mecanismo de acción
de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica:
Efecto modulador de la tiorredoxina

F. JAVIER LÓPEZ JARAMILLO
GRANADA 1995

El trabajo que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Granada.

Su elaboración ha sido financiada por una Beca Predoctoral del Plan de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia y por una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron presentados al VII PAABS Congress (Itxapa, 1992), XVIII Congreso Nacional de Bioquímica (San Sebastián, 1993), 4th International Congress of Plant Molecular Biology (Amsterdam, 1994), Xth International Photosynthesis Congress (Montpellier, 1995) y 4th International Conference on thioredoxins and related proteins (Kassel, 1995) y han sido publicados en *Plant Physiol.* (1994), 105: 1021-1022 y en *Eur. J. Biochem.* (1995), 229: 675-681.

Deseo dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a los Drs. Julio López y Ana Chueca, directores de esta Tesis, por la orientación, el apoyo y los estímulos constantes a mi formación. A la Dr. M^a Dolores Suarez, ponente de la Tesis, y en general a todos mis compañeros de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín .

A Escherichia coli,
mi más fiel colaboradora

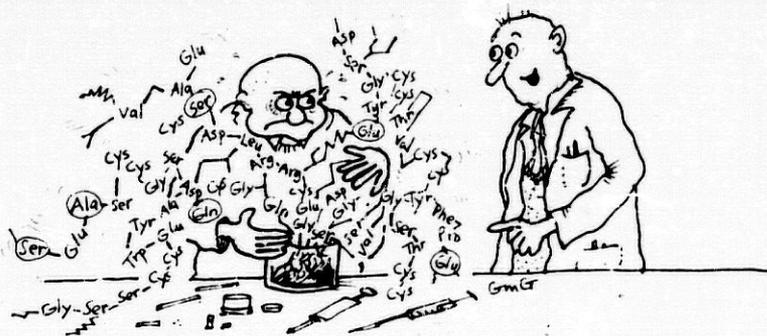
INTRODUCCIÓN	1
I. Generalidades sobre fotosíntesis	3
a. Fase lumínica	3
b. Fase oscura	4
c. Regulación del ciclo de Benson-Calvin	6
II. Estudio del sistema Ferredoxina-Tiorredoxina	8
a. Ferredoxin-tiorredoxin reductasa	8
b. Tiorredoxina	9
-Estructura	12
III. Estudio de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa	16
-Modulación de la actividad cloroplastídica	17
a. Modulación por modificaciones de interacciones no covalentes	18
b. Modulación por modificaciones de enlace covalentes	18
-Estructura	19
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
I. Genoteca y Cepas bacterianas	29
1. Genoteca	29
2. Cepas bacterianas	29
II. Medios de Cultivo	30
III. Plásmidos	31
IV. Rastreo de la genoteca con anticuerpos	33
1. Preparación de las bacterias sensibles	33
2. Expresión de antígenos y fijación a la membrana de nitrocelulosa	33
3. Inmunodetección	34
V. Aislamiento de ADN	36
1. Del bacteriófago	36
a. obtención de lisados	36
b. extracción del ADN	36
2. Plasmídico	36
a. Miniprep	37
b. Midiprep	37

VI. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	39
1. Preparación de células competentes	39
2. Transformación de las células competentes	39
VII. Manipulación del ADN	40
1. Determinación de la concentración de ADN	40
2. Restricción del ADN	40
3. Amplificación de ADN mediante PCR	41
4. Electroforesis en geles de agarosa	42
5. Recuperación de moléculas de ADN de geles de agarosa	43
6. Ligación de ADN	43
7. Secuenciación	43
a. Secuenciación manual: Kit de la Sequenase (USB) y marcaje radiactivo	44
b. Secuenciación automática: Kit <i>fmol</i> (Promega) y marcaje fluorescente	45
7.1 Estrategias de secuenciación	46
7.2 Análisis de las secuencias	47
8. Mutagénesis dirigida	47
VIII. Hibridaciones de ácidos nucleicos	49
1. Southern blotting	49
2. Northern blotting	50
IX. Expresión en <i>Escherichia coli</i>	53
1. Expresión del inserto de ADNc transportado por lambda gt11	53
2. Expresión de los plásmidos recombinantes	53
X. Purificación de las proteínas recombinantes expresadas	54
1. Purificación de la FBPasa cloroplastídica de guisante recombinante	54
2. Purificación de las tiorredoxinas recombinantes	54
XI. Análisis de las proteínas recombinantes	56
1. Cuantificación	56
2. Electroforesis	56
a. SDS-PAGE	57
b. Isoelectroenfoque	58
3. Determinación de actividades enzimáticas	59
a. Actividad de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica	59
b. Activación de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica por tiorredoxinas	60
c. Actividad de la malato deshidrogenasa	60
d. Activación de la malato deshidrogenasa por tiorredoxinas	60

e. Determinación de parámetros cinéticos y análisis de la cooperatividad	61
4. Técnicas inmunológicas	62
a. Western blotting	62
b. ELISA	63
5. Análisis de la interacción de la tiorredoxina con la Fructosa-1,6-bisfosfatasa recombinante	63
a. Mediante FPLC	63
b. Mediante ELISA	64
XII Soporte informático	65
1. GCG Sequence Analysis Software	65
1.a. SeqEd	65
1.b. PileUp	65
1.c. Map	65
1.d. Motifs	66
1.e. Stringsearch	66
1.f. Fetch	66
1.g. PeptideStats	66
2. PC-Gene	67
2.a. SOAP	67
2.b. Flexipro	67
2.c. Antigen	67
3. Servidores	68
3.a. PredictProtein E-MAIL PDH	68
3.b. Swiss-Model Server	69
RESULTADOS.	71
I. Clon de la Tiorredoxina <i>m</i> de guisante	73
1. Aislamiento del clon de la tiorredoxina <i>m</i>	73
2. Subclonación y secuenciación del clon T ₃	75
3. Análisis de la secuencia del clon T ₃	76
4. Expresión, purificación y caracterización de la tiorredoxina <i>m</i> de guisante	81
II. Clon de la tiorredoxina <i>f</i> de guisante	86
III. Clon de la FBPasa cloroplastídica de guisante	87
IV. Proteínas Quiméricas: tiorredoxinas híbridas <i>m-f</i>	92
1. Construcción del híbrido <i>f/m</i>	92
2. Construcción del híbrido <i>m/f</i>	96

V. Mutantes de la FBPasa cloroplastídica de guisante	100
1. Generación del doble mutante FBPasa [C173S,C178S]	101
2. Generación de mutantes sencillos de la FBPasa	102
VI. Efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la FBPasa y la NADP-MDH	105
1. Activación de la FBPasa por tiorredoxinas	105
1.1. Activación de la FBPasa por tiorredoxina <i>f</i>	105
1.2. Activación de la FBPasa por tiorredoxina <i>m</i>	107
1.3. Activación de la FBPasa por el híbrido <i>m/f</i>	109
1.4. Activación de la FBPasa por tiorredoxina de <i>E. coli</i>	110
2. Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxinas	113
2.1. Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxina <i>m</i>	113
2.2. Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxina <i>f</i>	115
2.3. Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxina de <i>E. coli</i>	117
2.4. Modulación de la NADP-MDH por el híbrido <i>m/f</i> y DTT	118
VII. Estudio de la interacción FBPasa-Tiorredoxinas	120
1. Mediante FPLC	120
2. Mediante ELISA	122
VIII. Propiedades fisicoquímicas e inmunológicas de las tiorredoxinas y del híbrido <i>m/f</i>	123
IX. Análisis estructurales de las tiorredoxinas	125
1. Análisis de la estructura primaria	125
1.1. Porcentaje de aminoácidos y distribución de carga	125
1.2. Aminoácidos implicados en la interacción tiorredoxina-proteína	127
1.3. Perfiles de hidropatía	127
1.4. Perfiles de flexibilidad	128
1.5. Predicciones de antigenicidad	130
2. Predicciones de estructura secundaria	132
3. Predicciones de estructuras terciaria	134
X. Modelo de la FBPasa cloroplastídica de guisante	140
DISCUSIÓN	145
Tiorredoxina <i>m</i>	147
Tiorredoxina <i>f</i>	149
Tiorredoxinas híbridas	150
Fructosa-1,6-bisfosfatasa recombinante	152

Análisis de la activación de la FBPasa y la NADP-MDH por tiorredoxinas	152
Análisis estructurales	155
Análisis de las cisteínas	158
Modelo de la FBPasa cloroplastídica de guisante	160
Interacción FBPasa-Tiorredoxina	161
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	169



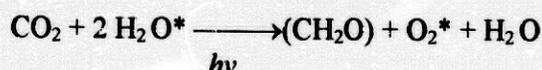
"Brilliant - now try and fold it back again!"

INTRODUCCIÓN



I. GENERALIDADES SOBRE FOTOSÍNTESIS

La vida en nuestro planeta es posible gracias a la fotosíntesis, mediante la cual se fija el 90% del carbono total de la tierra. Básicamente, el proceso consiste en la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono, agua y energía electromagnética de la luz solar:



Históricamente, la fotosíntesis se ha dividido en dos fases: fase lumínica, de naturaleza fotoquímica, y fase oscura o propiamente asimiladora. Tradicionalmente se han descrito dos diferencias fundamentales entre ambas fases; así, mientras que la fase lumínica es dependiente de la luz y tiene lugar a través de sistemas enzimáticos localizados en las membranas tilacoidales, la fase oscura es independiente de la luz y los sistemas enzimáticos están solubles en el estroma.

a. Fase lumínica

Durante la fase lumínica la energía electromagnética es empleada para originar un poder reductor (en el caso de las plantas es consecuencia del proceso de fotólisis del agua, con el consiguiente desprendimiento de oxígeno) que es transferido al NADP^+ a través de una cadena de transporte electrónico. Durante dicho transporte electrónico se genera un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal del orden de 3,5 unidades de pH, de forma que el espacio tilacoidal se hace muy ácido, con un pH cercano a 4. Como consecuencia de ello, existe una fuerza protomotriz ($\Delta G = -4,8 \text{ kcal/mol}$) que impulsa a los protones a través de la ATPsintetasa, sintetizándose ATP a partir de ADP y Pi. La ATPsintetasa tiene dos subunidades, la CF_0 , inserta en la membrana tilacoidal, y la CF_1 , en la superficie del estroma tilacoidal, por lo que el ATP recién sintetizado es liberado en el espacio del estroma.

Este transporte no cíclico de electrones dependientes de la luz a través de los fotosistemas I y II llega hasta la ferredoxina, una proteína hidrosoluble de 12 kDa, y la reduce. A continuación, los electrones de alto potencial de dos moléculas de ferredoxina se transfieren al NADP^+ para reducirlo a NADPH. Esta reacción está catalizada por la ferredoxin- NADP^+ -reductasa. Ambas reacciones tienen lugar en el lado del estroma de la membrana tilacoidal.

Otro destino del potencial redox de la ferredoxina reducida es la síntesis de ATP mediante un flujo cíclico de electrones a través del fotosistema I: el potencial

reductor de la ferredoxina no es empleado para reducir el NADP^+ , sino que, mediante un flujo cíclico de electrones a través del fotosistema I, se bombean protones a través de la membrana tilacoidal, los cuales contribuyen a engrosar el gradiente de protones, sintetizándose ATP sin formación de NADPH. No se produce fotólisis del agua y, por tanto, no se forma O_2 . A este proceso se le denomina fotofosforilación cíclica y tiene lugar cuando no se dispone de NADP^+ para aceptar electrones de la ferredoxina reducida debido a una elevada relación entre el NADPH y el NADP^+ .

b. Fase oscura

Durante la fase oscura, que es la propiamente asimiladora, el ATP y el NADPH formados durante la fase anterior (luminica), que están solubilizados en el estroma, son utilizados en la síntesis de hidratos de carbono a partir del dióxido de carbono atmosférico mediante un conjunto de reacciones que constituyen el llamado ciclo reductor de las pentosas fosfato o ciclo de Benson-Calvin.

En el ciclo de Benson-Calvin pueden distinguirse tres etapas: fijación del CO_2 atmosférico mediante la carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), reducción del carbono recién fijado y regeneración de la RuBP consumida inicialmente.

El ciclo se inicia con la carboxilación de la RuBP, en una reacción catalizada por la ribulosa-1,5-carboxilasa-oxigenasa (RUBISCO), formándose 2 moléculas de 3-fosfoglicerato, las cuales son sucesivamente fosforiladas por ATP y reducidas por NADPH en la etapa reductora del ciclo para originar gliceraldehido-3-fosfato. Ambas reacciones son catalizadas por la fosfoglicerato quinasa y la NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, la concentración de gliceraldehido-3-fosfato en el cloroplasto permanece baja como consecuencia de su transformación en dihidroxiacetona fosfato mediante una reacción catalizada por la trifosfato isomerasa.

El estado de oxidación del átomo de carbono asimilado pasa de +4 en el CO_2 a +3 en el 3-fosfoglicerato, +1 en gliceraldehido-3-fosfato y -1 en la dihidroxiacetona fosfato (Hanson, 1990). Así, en estas cuatro reacciones se consigue la completa reducción del carbono atmosférico para su posterior utilización en el metabolismo celular.

En la etapa de regeneración, mediante un conjunto de nueve reacciones enzimáticas (isomerizaciones, condensaciones e hidrólisis), se sintetiza ribulosa-5-fosfato a partir de las triosas fosfato, y su fosforilación regenera la RuBP para la asimilación de nuevo CO_2 .

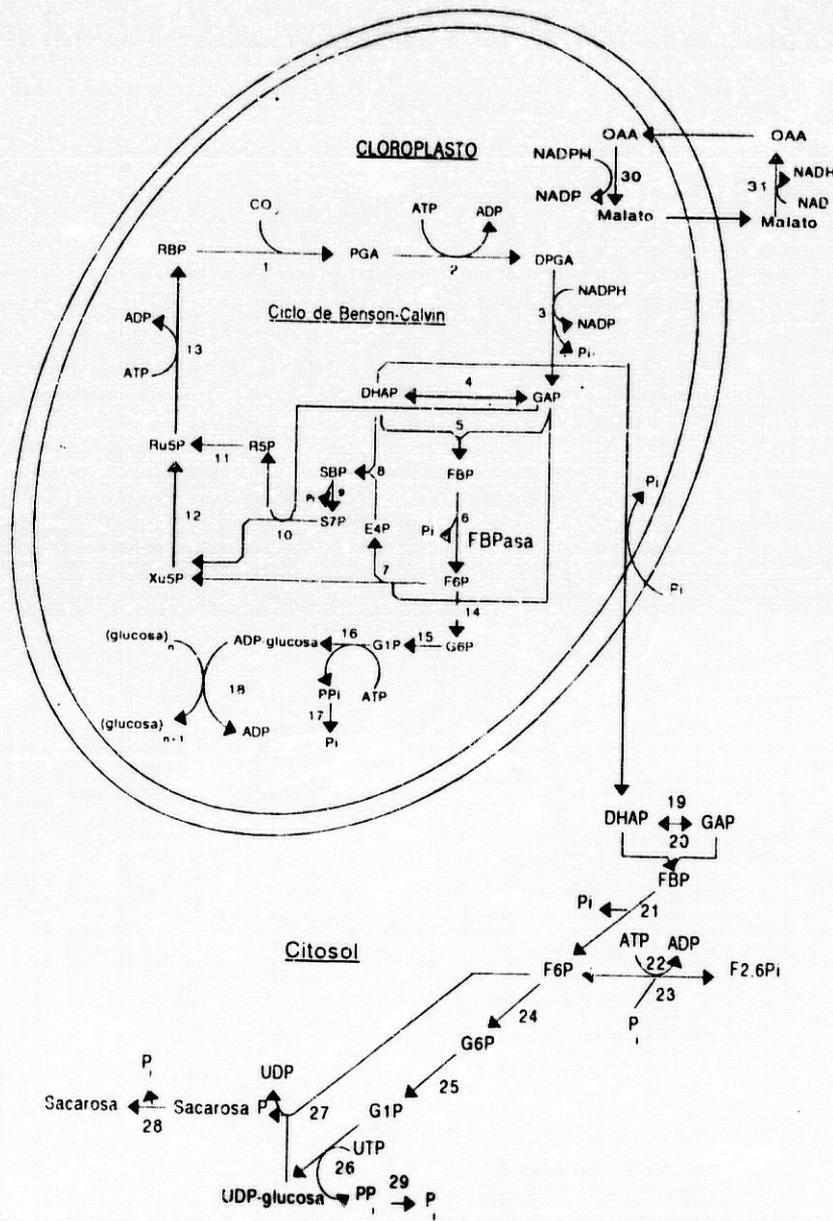


Fig. 1.- Ciclo de Benson Calvin y su relación con la síntesis de almidón y sacarosa. La numeración dentro de un círculo corresponde a las distintas etapas enzimáticas: (1) RUBISCO; (2) Fosfoglicerato quinasa; (3) NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; (4) Triosa fosfato isomerasa; (5) Aldolasa; (6) Fructosa-1,6-bisfosfatasa; (7) Transcetolasa; (8) Aldolasa; (9) Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa; (10) Transcetolasa; (11) Fosforribosa isomerasa; (12) Ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; (13) Fosforribuloquinasa; (14) Fosfoglucosa isomerasa; (15) Fosfoglucmutasa; (16) ADP-glucosa pirofosforilasa; (17) Pirofosfatasa; (18) Almidón sintetasa; (19) Triosa fosfato isomerasa; (20) Aldolasa; (21) Fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica; (22) Fructosa-6-fosfato 2-quinasa; (23) Fructosa-2,6-bisfosfatasa; (24) Fosfoglucosa isomerasa; (25) Fosfoglucmutasa; (26) UDP-glucosa pirofosforilasa; (27) Sacarosa fosfato sintetasa; (28) Sacarosa fosfato fosfatasa; (29) Pirofosfatasa.

Como consecuencia de la permeabilidad de la membrana cloroplastídica, las triosas fosfato pueden salir del cloroplasto para integrarse en el metabolismo de la hoja y sintetizar sacarosa o bien retornar a él e integrarse en el ciclo de las pentosas-fosfato para regenerar los metabolitos intermediarios del ciclo (Walker, 1976) o para la síntesis de almidón. Cuando la fotosíntesis alcanza un estado de equilibrio, 5/6 de las triosas fosfato son empleadas en la regeneración de la RuBP y 1/6 es convertido en almidón en el cloroplasto o exportado al citoplasma para la síntesis de sacarosa.

c. Regulación del ciclo de Benson-Calvin

El ciclo de Benson-Calvin está integrado por 11 sistemas enzimáticos, necesita el ATP y el NADPH originados en la fase lumínica y el destino final del carbono asimilado es variable, presentando cada uno de los procesos a los que puede destinarse (síntesis de almidón en el cloroplasto, regeneración de los intermediarios del ciclo o síntesis de sacarosa en el citosol) una estequiometría distinta. Debido a ello, la regulación del ciclo tiene que ser muy precisa.

La regulación se ejerce solo a nivel de algunos sistemas enzimáticos (Bassham y Krause, 1969) y es producto de la acción concertada del pH, la concentración de determinados iones y metabolitos (Heldt *et al.*, 1973; Werdan *et al.*, 1975; Krause, 1977; Heber *et al.*, 1982; Gardemann *et al.*, 1986) y del nivel redox del sistema (Slovacek y Vaughn, 1982).

Aunque todos estos factores dependen de la transición luz oscuridad, pues en los cloroplastos iluminados se incrementa el pH y la concentración de Mg^{2+} , hay que prestar especial atención al fenómeno de fotoactivación que dichas enzimas experimentan. Consiste en la reducción de grupos -S-S- de la molécula enzimática vía transporte electrónico fotosintético. Esta reducción introduce modificaciones estructurales esenciales para la expresión de la actividad (Buchanan, 1980) y es relativamente rápida.

Otro nivel de regulación propio de sistemas enzimáticos del cloroplasto es la fotoinducción, proceso lento por el cual la luz incide en la síntesis de proteínas cloroplastídicas, habiéndose descrito más de 40 enzimas como fotoinducibles por iluminación de plantas etioladas (Tobin y Silverthorne, 1985). Entre las enzimas cuya biosíntesis ha sido descrita como modulada por la luz destacan la subunidad pequeña de la RUBISCO (Kuhlemeier *et al.*, 1987), la NADP-malato deshidrogenasa (Vidal y Gadal, 1981), la FBPasa cloroplastídica (espinaca: Chueca *et al.*, 1984; guisante: Sahrawy *et al.*, 1988; trigo: Raines *et al.*, 1988) y la tiorredoxina *f* (Carrasco *et al.*, 1992).

Las enzimas del ciclo de Benson-Calvin que presentan baja actividad en la oscuridad y que son activadas cuando el cloroplasto es iluminado son: fructosa-1,6-bisfosfatasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y fosforribulosa quinasa (las tres forman parte de la etapa de regeneración); NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (de la etapa reductora) y, por último, la RUBISCO. Así, la luz, estimulado a estas enzimas, incrementa la concentración de metabolitos, los cuales a su vez potencian el efecto estimulante de la luz.

Paralelamente, existen enzimas que son desactivadas por la luz, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Mediante la activación de los enzimas biosintéticos del ciclo y la simultánea inactivación de los enzimas que degradan hidratos de carbono, la luz dirige al cloroplasto hacia la producción de materiales de reserva, minimizando los ciclos fútiles (Buchanan, 1991).

Como consecuencia de todo lo dicho, actualmente se considera que la imposibilidad del cloroplasto para fijar CO_2 en la oscuridad no es solo debido a la ausencia de los precursores metabólicos originados durante la fase lumínica sino también a la no activación de algunas enzimas biosintéticas durante la mal llamada fase oscura.

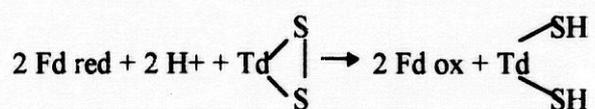
II. ESTUDIO DEL SISTEMA FERREDOXINA-TIORREDOXINA

En cloroplastos iluminados, la mayor parte de la ferredoxina reducida es empleada en la generación de NADPH, en la formación de glutamato a partir de glutamina y α -cetoglutarato y en la reducción de grupos NO^{2-} y SO_3^{2-} para la síntesis de grupos $-\text{NH}_3$ y $-\text{SH}$. Sin embargo, uno de los sustratos más interesantes para la reducción es el grupo $-\text{S}-\text{S}-$, ya que esta modificación altera drásticamente las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas.

En organismos fotosintéticos aeróbicos, la ferredoxina reduce a una proteína de bajo peso molecular, la tiorredoxina, en presencia de la ferredoxin-tiorredoxin reductasa. Estas tres proteínas estromáticas constituyen el sistema ferredoxina-tiorredoxina. Posteriormente, la tiorredoxina reducida modula la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, del azufre y del carbono, provocándoles cambios conformacionales que son consecuencia de la ruptura de puentes disulfuro (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Buchanan *et al.*, 1979, 1980; Anderson, 1986; Buchanan, 1991; Scheie, 1991).

a. Ferredoxin-tiorredoxin reductasa

En organismos fotosintéticos, en presencia de ferredoxina reducida (Fd red), la ferredoxin-tiorredoxin reductasa cataliza la reducción del grupo $-\text{S}-\text{S}-$ de la tiorredoxina (Td):



La ferredoxin-tiorredoxin reductasa ha sido purificada a homogeneidad a partir de hojas de maíz y espinaca y de la cianobacteria *Nostoc muscorum*. La masa molecular estimada es de 30 kDa y bajo condiciones desnaturalizantes se disocia en dos subunidades diferentes, una de 13 kDa, muy conservada en todos los organismos (grado de homología entre el 80% y el 90%) y donde reside el *cluster* [4Fe4S], responsable de la actividad catalítica, y otra de 17 kDa, 15 kDa y 7 kDa en espinaca, maíz y *N. muscorum* respectivamente, que es variable en función de la especie y cuya función no es conocida (Hirasawa *et al.*, 1988; Droux *et al.*, 1987).

Se ha subclonado y secuenciado la subunidad variable de la cianobacteria *Anacystis nidulans*, habiéndose encontrado un marco abierto de lectura (*open reading*

frame) que codifica 73 aminoácidos (Szekeres *et al.*, 1991). Cuando se compara con la de espinaca se comprueba que esta última presenta en la subunidad variable dos extrapéptidos de 30 y 8 residuos localizados en el extremo aminico y en el interior, a nivel de estructura primaria, respectivamente (Tsugita *et al.*, 1991; Iwadate *et al.*, 1993).

b. Tiorredoxina

Las tiorredoxinas son proteínas de masa molecular en torno a los 12 kDa universalmente distribuidas en procariotas y eucariotas. Pueden existir en estado oxidado [TdS₂] o reducido [Td(SH)₂] y tienen la capacidad de catalizar procesos redox del tipo ditiol-disulfuro (Holmgren, 1985).

Participan en procesos tales como la reducción de ribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa (Moore *et al.*, 1964), la reducción de sulfóxidos (Gonzalez-Porqué, 1970), la modulación de enzimas fotosintéticas (Buchanan, 1980, 1991; Crawford *et al.*, 1989), la asimilación del nitrógeno (Smith, 1981; Florencio *et al.*, 1993), la reducción de sulfatos (Cooper, 1983), la degradación de la insulina (Holmgren, 1985), la coagulación sanguínea (Blömbäck *et al.*, 1986), la activación de la 5'-monodesyodenasas hepática (Goswami *et al.*, 1987), la reducción de los puentes disulfuro entre cadenas de α_2 -macroglobulina (Larsson, *et al.*, 1988), la defensa frente a radicales libres (Schallreuter *et al.*, 1989; Ohira *et al.*, 1994) o la reducción de la gonadotropina coriónica humana (Holmgren, 1989).

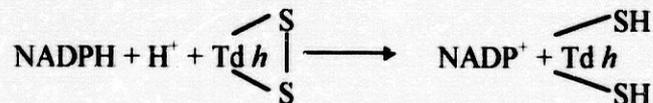
Aunque fundamentalmente las tiorredoxinas actúan como reductores de disulfuros proteicos, se ha demostrado que también juegan un importante papel estructural en numerosos sistemas. Así, se ha demostrado que para la replicación del bacteriófago T7 es necesaria la presencia de la tiorredoxina de *Escherichia coli* (*E. coli*), la cual constituye una unidad esencial de la ADN polimerasa viral (Nossal, 1983; Tabor *et al.*, 1987), y es también esencial para el ensamblaje de los fagos filamentosos M13 y f1 (Russel y Model, 1985). En ambos casos, mediante experimentos de mutagénesis dirigida, se ha comprobado que no es necesaria la transferencia del potencial redox de la tiorredoxina para cumplir su función (Russel y Model, 1986). También se ha identificado como tiorredoxina el factor que estimula la estructura del receptor de los glucocorticoides que se une al esteroide (Grippe *et al.*, 1983).

Más recientemente, se ha demostrado que la tiorredoxina puede actuar como una linfokina (Wollman *et al.*, 1988 y Tayaga *et al.*, 1989), se ha barajado la posibilidad de que sea el agente reductor fisiológico de la vitamina K (Preusch, 1992) e incluso se ha encontrado que en individuos infectados con HIV los niveles de

tiorredoxina en plasma son anormalmente altos (Nakamura, H., Herzenerg, A.L., Yodoi, J., Padilla, A. y Holmgren, A. poster nº37, 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995).

El papel de las tiorredoxinas en la fotoactivación de enzimas cloroplastídicas ha sido ampliamente estudiado (Droux *et al.*, 1984; Crawford *et al.*, 1989) y se ha comprobado, mediante mutagénesis dirigida sobre el centro activo, que son necesarias la presencia de ambas Cys capaces de oxidarse y formar un puente disulfuro (Jacquot y Decottignies, 1986; Bandres *et al.*, 1993). En las plantas superiores existen al menos tres tipos de tiorredoxinas, dos en los cloroplastos (tiorredoxina *m* y tiorredoxina *f*) y una tercera en compartimentos no fotosintéticos, mitocondrias, retículo endoplasmático y citosol (tiorredoxina *h*) (Wolosiuk *et al.*, 1979; Florencio *et al.*, 1988; Huppe *et al.*, 1990, 1991; Marcus *et al.*, 1991).

Existen evidencias que demuestran que la tiorredoxina *h* es reducida por NADPH en presencia de NADP-tiorredoxin reductasa (Holmgren, 1985):



Sin embargo, en los cloroplastos de las plantas superiores existe la ferredoxin-tiorredoxin reductasa, la cual transfiere el potencial redox de la ferredoxina reducida en la cadena de transporte electrónico a la tiorredoxina, reduciéndola. A su vez, la tiorredoxina reducida actúa sobre otras enzimas reduciendo puentes disulfuros, lo cual origina cambios estructurales que repercuten en la actividad de estas últimas (Buchanan, 1980). Al conjunto formado por la ferredoxina, la ferredoxin-tiorredoxin reductasa y la tiorredoxina se le denomina sistema ferredoxina-tiorredoxina (Fig. 2).

Llegado a este punto surge la duda sobre la finalidad de ambos sistemas de reducción de las tiorredoxinas, máxime cuando el cloroplasto tiene capacidad para producir NADPH, cuyo potencial redox es mayor que el del sistema ferredoxina-tiorredoxina (-0,32 V y -0,42 V respectivamente, según Wolosiuk *et al.*, 1993) y en él coexisten el sistema ferredoxina-tiorredoxina y el NADPH. La clave es que estos dos mecanismos de reducción de la tiorredoxina parecen estar confinados en compartimentos celulares mutuamente excluyentes al objeto de mantener el fenómeno de la fotorregulación de las enzimas cloroplastídicas, ya que el sistema ferredoxina-tiorredoxina es especialmente importante porque controla el metabolismo de los cloroplastos: las enzimas biosintéticas son activadas por la luz y las degradativas son desactivadas.

En este sentido, se ha descrito que el 70% de la tiorredoxina *m* se encuentra en estado reducido en cloroplastos iluminados de guisante y que solo el 30% lo está

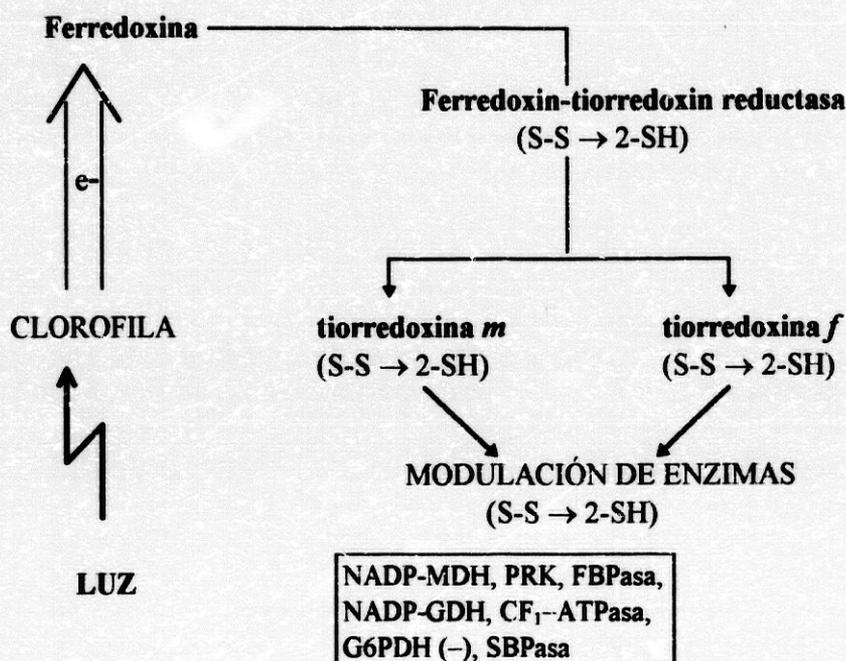


Fig. 2.- La luz, a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina, modula la actividad enzimática del cloroplasto.

en la oscuridad (Scheibe, 1981). Paralelamente, de acuerdo con Crawford *et al.* (1989), el 100% de la tiorredoxina *f* está oxidada o reducida en cloroplastos en oscuridad o iluminados, respectivamente. Estos últimos autores, en concordancia con el efecto regulador del sistema ferredoxina-tiorredoxina, encontraron que la reducción de los puentes disulfuros de la ferredoxin-tiorredoxin reductasa y de la tiorredoxina precede a la activación de las enzimas sobre las que actúa la tiorredoxina.

También surgen dudas respecto de la necesidad de al menos un tipo de tiorredoxina citosólica -en *Arabidopsis thaliana* se han descrito hasta 5 secuencias diferentes que codifican tiorredoxina *h* (Rivera-Madrid *et al.*, 1995)- y de dos cloroplasticas, estas últimas reducidas por el mismo sistema ferredoxina-tiorredoxina. Tradicionalmente se acepta que la tiorredoxina *h* está involucrada en procesos heterotróficos en el citosol (Flores *et al.*, 1988), que la tiorredoxina *m* activa preferentemente a la NADP-Malato deshidrogenasa (NADP-MDH) y que la tiorredoxina *f* actúa preferentemente sobre la Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)

(Jacquot *et al.*, 1878; Crawford *et al.*, 1986; Cséke y Buchanan., 1986; Eklund *et al.*, 1991; Aguilar *et al.*, 1992; Prado *et al.*, 1992; Hodges *et al.*, 1994), aunque en la bibliografía existen datos contradictorios sobre la especificidad FBPasa/tiorredoxina *f* y NADP-MDH/tiorredoxina *m*:

Wolosiuk *et al.* (1979) describieron que en espinaca, se pueden intercambiar las tiorredoxinas y lograr activaciones del 51% para NADP-MDH/tiorredoxina *f* y del 16% para FBPasa/tiorredoxina *m*.

De acuerdo con Schürmann *et al.*, (1981), la FBPasa de espinaca es mucho más específica, pues es activada exclusivamente por tiorredoxina *f*, mientras que la NADP-MDH es también eficazmente activada por elevadas concentraciones de tiorredoxina *f*, aunque en presencia de fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) y Ca^{2+} esa especificidad FBPasa/ tiorredoxina *f* se altera y la tiorredoxina *m* es capaz de activarla eficientemente (Schürmann *et al.*, 1985).

Según Holmgren (1985), es la tiorredoxina *f* la que activa exclusivamente a la FBPasa y la tiorredoxina *m* la que actúa sobre la NADP MDH y la FBPasa.

Häberlein *et al.* (1985), indicaron que tanto la FBPasa como la NADP-MDH son activadas por la misma fracción de tiorredoxina y que en ocasiones, la no activación de la FBPasa o la NADP-MDH por un tipo de tiorredoxina es consecuencia de que no se está trabajando con enzimas de plantas de la misma especie.

A pesar de ello, se continua manteniendo que existe especificidad FBPasa/tiorredoxina *f*. Las observaciones de activaciones cruzadas se explican indicando que para ensayar la actividad se han empleado concentración de Ca^{2+} elevadas, catión que es crítico porque elimina la especificidad.

Estructura

A nivel de estructura primaria, se han aislado ADNc que codifican tiorredoxinas a partir de numerosos organismos: *Corynebacterium nephridii* (Meng *et al.*, 1981; McFarlan, *et al.*, 1989); *Escherichia coli* (Höög, *et al.*, 1985); *Anabaena sp.* 7119 (Gleason *et al.*, 1985); *Anabaena sp.* (Lim *et al.*, 1986); *Chlorobium* (Mathews *et al.*, 1987); zanahoria (Johnson *et al.*, 1987); *Chromatium vinosum* (Johnson y Biemann, 1987); *Rhodobacter sphaeroides* Y (Clement-Metral *et al.*, 1988); *Rhodospirillum rubrum* (Johnson *et al.*, 1988); pollo (Jones y Luk, 1988); humana (Wollman *et al.*, 1988), *Anabaena sp.* PCC 7120 (Alam *et al.*, 1989); *Anacystis nidulans* (Muller *et al.*, 1989); *Chlamydomonas reihardtii* (Decottignies *et al.*, 1990, 1991; Stein *et al.*, 1995); tabaco (Marty y Meyer, 1991); espinaca (*f*) (Aguilar *et al.*, 1992); guisante (*f*) (Lepiniec *et al.*, 1992); espinaca (*m*) (Wedel *et al.*,

1992); *Dyctyostelium discoideum* (Wetterauer *et al.*, 1992); guisante (*m*) (López Jaramillo *et al.*, 1994); *Streptomyces aureofaciens* BMK (Labudová *et al.*, 1994); *Arabidopsis thaliana* (Rivera Madrid *et al.*, 1995) trigo (*h*) (Lamotte-Guéry, F., Lullien-Pellerin, V., Ihorai, T., Joudrier, P. y Gautier, M-F., comunicación a la 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995).

Todas las secuencias descritas tienen una longitud en torno a 110 aminoácidos. El grado de homología entre ellas es variable, destacando la baja homología encontrada entre las tiorredoxinas *m* y *f* en espinaca y en guisante. La secuencia característica del centro activo (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) está muy conservada, excepto en el fago T4, que es Lys-Cys-Val-Tyr-Cys (Eklund *et al.*, 1984), cuya tiorredoxina está constituida por solo 87 residuos, y en la de *Corynebacterium nephridii* C2 (McFarlan, *et al.*, 1989), que es Trp-Cys-Ala-Pro-Cys. Recientemente se ha descrito que el centro activo de las bacterias anaerobias es Gly-Cys-Val-Pro-Cys y que la mutación de la Gly por Trp origina pérdidas de actividad del orden del 95% (Harms, C., Kreimer, S., Meyer, M., Söhling, B. y Andreesen, poster nº36, 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995). La secuencia Trp-Cys-Gly-Pro-Cys se ha encontrado también en la fosfoinositol fosfolipasa (Bennett *et al.*, 1988).

En base a alineamientos de secuencias, Hartman *et al.* (1990) han construido un árbol filogenético de las tiorredoxinas que es coherente con el obtenido por comparación de secuencias del ARNr 16S (Woese, 1987). Así, las tiorredoxinas se engloban en cuatro categorías: 1) Bacterias verdes del azufre (*Clorobium*); 2) Bacterias fotosintéticas (*Chromatium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*) y bacterias heterótrofas (*Escherichia coli*, *Corynebacterium*); 3) Procariotas (cianobacterias) y eucariotas (algas) que realizan fotosíntesis oxigénica, y 4) vertebrados. De acuerdo con ésta teoría, la tiorredoxina *m* pertenece a la categoría 3), junto a los organismos fotosintéticos aeróbicos, mientras que las tiorredoxinas *h* (presentan un 45% de homología con tiorredoxinas de mamíferos) y *f* se engloban con los vertebrados en la categoría 4). Actualmente, a partir del análisis y localización de intrones, Sahrawy *et al.* (1995b), han corroborado el origen procariota de las tiorredoxinas *m* y eucariota para las tiorredoxinas *f*, así como la idea de un ancestro común para las tiorredoxinas citoplasmáticas.

Las tiorredoxinas son de codificación nuclear, pero como se indicó anteriormente, las tiorredoxinas *m* y *f* se localizan en el cloroplasto, que es donde ejercen su función. Este hecho se traduce a nivel de estructura primaria en que las tiorredoxinas *m* y *f* son sintetizadas en el citoplasma como precursores de elevado peso molecular: la proteína lleva pegada a su extremo aminico una secuencia que la vehiculiza hacia el cloroplasto (péptido de tránsito). Cuando llega al cloroplasto, el precursor es procesado por peptidasas metal-dependientes que están solubilizadas en la matriz, quedando libre el enzima funcional (proteína madura) (Ellis, 1981; Robinson y Ellis, 1984a, 1984b; Cline *et al.*, 1993). Debido a ello, las secuencias

aminoácidas de las tiorredoxinas *m* y *f* deducidas de secuencias nucleotídicas son más largas que las correspondientes a bacterias, algas, vertebrados o sus homólogos de tipo *h*.

Las tiorredoxinas *h* no tienen péptidos de tránsito (Marty y Meyer, 1991), por lo que se supone que son citoplasmáticas. Recientemente se ha encontrado que una elevada proporción de las proteínas de la savia del floema de arroz son tiorredoxina *h* (Ishiwatari *et al.*, 1995).

El diferente origen filogenético de la tiorredoxina *m* y el hecho de que las tiorredoxinas cloroplastidicas sean de codificación nuclear apoyan la teoría del origen endosimbionte del cloroplasto -y de la mitocondria- (Walsby, 1986; Ebringer y Krajcovic, 1987) según la cual el cloroplasto y la mitocondria fueron procariotas endosimbiontes que acabaron siendo controlados por la célula hospedadora, de tal manera que la mayoría de las funciones del endosimbionte quedaron encomendadas al hospedador, conservando el primero una alta especialización en la función fotosintética.

El análisis de la estructura primaria de las proteínas disulfuro isomerasas ha permitido conocer un aspecto diferente de las tiorredoxinas. Las proteínas disulfuro isomerasas son homodímeros de centro activo análogo al de las tiorredoxinas, pero con una His en lugar de la Pro: Trp-Cys-Gly-His-Cys y actúan *in vivo* catalizando la formación de puentes disulfuro merced al centro activo. Presentan una gran homología con las tiorredoxinas a nivel de estructura primaria, lo cual hace pensar que su estructura terciaria también debe ser común y que el mecanismo de acción de ambas también debe ser muy similar (Eklund *et al.*, 1991).

En este sentido, Krause *et al.* (1991) mutaron la ³⁴Pro del centro activo de la tiorredoxina de *E. coli* por His para transformarlo en un centro activo de proteína disulfuro isomerasa. Experiencias posteriores sobre este mutante demostraron que la presencia de la His en la secuencia del centro activo redox reproducía la actividad disulfuro isomerasa hasta tal punto que la isomerización de la ribonucleasa oxidada al azar era 10 veces más rápida cuando era catalizada por el mutante ³⁴Pro/His a cuando lo era por la tiorredoxina de *E. coli* (Lundstrom *et al.*, 1992).

Un aspecto aun no aclarado, porque la mayoría de los resultados hacen referencia a la tiorredoxina de *E. coli* y a proteínas disulfuro isomerasas de mamíferos, es si las tiorredoxinas vegetales, además de la actividad disulfuro reductasa, tienen actividad disulfuro isomerasa.

Se han cristalizado las tiorredoxinas de *E. coli* (Holmgren y Söderberg, 1970; Söderberg, 1974; Holmgren *et al.*, 1975; Katti *et al.*, 1990), del fago T4 (Söderberg *et al.*, 1978) y *f* de espinaca (Genovesio-Taverne *et al.*, 1991), y se ha resuelto la estructura de la humana (Quin *et al.*, 1995) y de varios mutantes de la de *E. coli*.

Más recientemente, se han estudiado las estructura de la *h* y de la *m* de *Clamydomonas reinhardtii* (Lancelin, J.-M., Mittard, V., Blackledge, M., Stein, M., Jacquot, J.-P., comunicación a la 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995) y la tiorredoxina-2 de *Anabaena* PCC 7120 (Saarinen, M., comunicación a la 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995), confirmándose la idea de Eklund *et al.* (1991) de que todas poseen similar estructura tridimensional, independientemente del grado de homología.

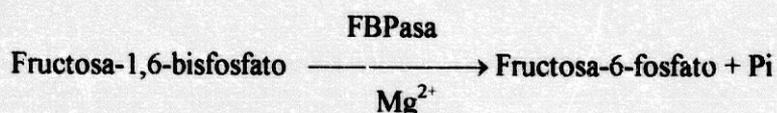
La tiorredoxina mejor estudiada es la de *E. coli*. Es una molécula de 108 aminoácidos, de los cuales, más del 75% de los residuos está implicado en la formación de estructura secundaria según la disposición $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha\alpha$. Consta de un núcleo central formado por cinco estructuras β , tres paralelas y dos antiparalelas, rodeado por cuatro hélices α . El sitio activo, donde se encuentra el puente disulfuro, está localizado en el extremo amino de $\alpha 2$, sobresaliendo y quedando accesible desde un lado de la molécula. Esta zona, donde se localiza el centro activo, es plana e hidrófoba y está constituida por ³³Gly, ³⁴Pro, ⁷⁵Ile, ⁷⁶Pro, ⁹¹Val, ⁹²Gly y ⁹³Ala, residuos que deben estar implicados en la interacción con otras proteínas. Algo más escondidos se encuentran numerosos residuos cargados (³⁰Glu, ³⁶Lys, ⁵⁷Lys) que deben participar en las reacciones redox, especialmente la ³⁶Lys (Holmgren, 1985).

Sobre la base de que las estructuras tridimensionales de las tiorredoxinas deben ser muy similares, Eklund *et al.* (1991) hicieron un estudio de la relación estructura función de tiorredoxinas de diferentes especies. De acuerdo con sus resultados, la interacción entre $\beta 2$ y $\beta 3$ es vital para el mantenimiento de la conformación del centro activo. Sobre los residuos implicados en la interacción proteína-tiorredoxina, destacan:

- 1) ⁹²Gly es fundamental para mantener el apropiado empaquetamiento entre la última estructura β y $\alpha 4$, lo cual repercute directamente sobre la interacción con otras proteínas.
- 2) la carga positiva en posición 36, inmediatamente a continuación del centro activo está muy conservada y puede afectar al pKa de la ³²Cys. La mutación ³⁶Lys/Glu afecta a la interacción con otras proteínas (Gleason *et al.*, 1990).
- 3) Existe otra región de carga positiva conservada en la estructura tridimensional que corresponde a ⁵⁷Lys (³⁹Lys para las tiorredoxinas animales).
- 4) ²⁶Asp, aunque localizado en el interior del núcleo formado por las cinco estructuras β , puede interaccionar con los residuos positivos de la reductasa (Holmgren *et al.*, 1975).

III. ESTUDIO DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (D-fructosa-1,6-bisfosfato-1-fosfohidrolasa; E.C. 3.1.3.11; FBPasa) es un enzima clave del metabolismo glucídico que cataliza la hidrólisis dependiente de magnesio de la fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato y ortofosfato:



Es un enzima ampliamente distribuida en el reino animal y vegetal. En levaduras y tejidos animales ha sido estudiada en relación con la gluconeogénesis, donde constituye un paso de regulación clave (Krebs, 1964), junto con la fosfoenolpiruvato carboxilasa, piruvato carboxilasa y glucosa-6-fosfatasa (Pontremoli y Mangiarotti, 1965; Pontremoli, 1968). La más ampliamente estudiada es la de procedencia hepática (Pontremoli y Horecker, 1971; Pontremoli, 1972; Horecker *et al.*, 1975; Piikins *et al.*, 1978; Hue, 1981; Benkovic y de Maine, 1982; Tejwani, 1983; Hers y Hue, 1983; Fischer y Thompson, 1983; El Maghrabi *et al.*, 1988).

En vegetales, la presencia de actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa asociada a la gluconeogénesis fue puesta de manifiesto por Marre *et al.* (1965) y desde entonces ha sido descrita en numerosas semillas (Marx, 1968; Surendranathan y Nair, 1972; Rao y Modi, 1976; Krunger y Beevers, 1985; Li y Ross, 1988), habiéndose observado un incremento de la actividad FBPasa en el endospermo de semillas en germinación (Thomas y Rees, 1972; Youle y Huang, 1976; Bortman *et al.*, 1981) que se ha relacionado con una movilización de la reserva lipídica. En células fotosintéticas existen dos enzimas con actividad FBPasa: una de localización cloroplastídica y otra ubicada en el citosol (Buchanan, 1980; Kelly *et al.*, 1982).

La FBPasa citosólica está implicada en la regulación y síntesis de sacarosa a partir de las triosas-fosfato exportadas desde el cloroplasto (Zimmermann *et al.*, 1978; Stitt y Heldt, 1985; Khayat y Daie, 1991; Prado *et al.*, 1991). Es regulada por alteraciones en las concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato y AMP (inhibidores), las cuales reflejan el estatus energético del cloroplasto (Krunge y Beevers, 1984; Cséke y Buchanan, 1986; Stitt y Heldt, 1985) así como por el pH, Ca^{2+} y Mg^{2+} (Stitt *et al.*, 1985; Brauer *et al.*, 1990; Prado *et al.*, 1991).

La FBPasa cloroplastídica forma parte del ciclo de Benson-Calvin, donde además juega un importante papel en su regulación. Su presencia ha sido descrita en bacterias fotosintéticas (Springgate y Stachow, 1972; Joint *et al.*, 1972), algas (App y Jagendorf, 1964; Moore y Tischer, 1965; Cséke *et al.*, 1981; Schmidt, 1981), líquenes

(Brown y Kershaw, 1986) y en plantas superiores (Racker y Schroeder, 1958; Viswanathan y Krishnan, 1962; Aiazzi y Bozzi, 1963; Satta y Sisini, 1964; Scala *et al.*, 1968, 1969; Nishizawa y Buchanan, 1981).

La FBPasa cloroplastídica estudiada con mayor profundidad hasta el momento es la procedente de hojas de espinaca (Lázaro *et al.*, 1974; Buchanan *et al.*, 1976; Zimmerman, 1976). Hasta hace poco tiempo se consideraba que este enzima, como la mayoría del ciclo de Benson-Calvin, estaba solubilizada en el estroma de los cloroplastos. Sin embargo, existen evidencias de que las enzimas cloroplastídicas forman complejos con las membranas tilacoides y con otros componentes del ciclo (Anderson y Ben-Bassat, 1981; Raghavendra *et al.*, 1981; Plá y López Gorgé 1981; Mori *et al.*, 1984; Ford *et al.*, 1987; Süss *et al.*, 1993). Rodríguez Andrés *et al.* (1987, 1990) encontraron en guisante y espinaca un significativo porcentaje de FBPasa ligada a las membranas tilacoides, dependiendo de la concentración de Mg^{2+} , K^+ o Na^+ del medio de lisis. Asimismo, observaron que la presencia de alcoholes alifáticos favorece la unión del enzima a la membrana y concluyeron que en el proceso de unión a la membrana están implicados *loci* hidrofóbicos de ambos. Más recientemente, Hermoso *et al.* (1992) han mostrado que en hojas de espinaca, la FBPasa y la tiorredoxina *f*, su activador fisiológico, se localizan tanto asociadas a membranas como solubles en el estroma.

Modulación de la actividad FBPasa cloroplastídica

La FBPasa cloroplastídica mejor estudiada es la de espinaca. Como otras enzimas del ciclo de Benson-Calvin, presenta el fenómeno de histéresis (Herting y Wolosiuk, 1983), originalmente descrito por Frieden (1970), consistente en la existencia de dos formas de propiedades cinéticas diferentes, cuya velocidad de interconversión es lenta comparada con la velocidad de catálisis. Este hecho justifica la necesidad de separar ambos procesos, modulación y catálisis, mediante un ensayo en dos pasos, de manera que la determinación de la catálisis vaya antecedida por la incubación con los moduladores, para poder determinar si una sustancia activa/desactiva la transición del enzima entre las dos formas de propiedades cinéticas diferentes y si activa/inhibe la catálisis.

Existen dos mecanismos importantes en la modulación de la actividad FBPasa cloroplastídica. En primer lugar, la actividad catalítica del enzima es dependiente de la concentración de iones y metabolitos, los cuales influyen en las interacciones no covalentes entre las subunidades. En segundo lugar, la modulación dependiente de tiorredoxina implica la destrucción y creación de nuevos enlaces covalentes. Ambos procesos se dan simultáneamente *in vivo*, contribuyendo de manera concertada a la activación del enzima (Wolosiuk *et al.*, 1993).

a. Modulación por modificaciones de interacciones no covalentes

La luz induce una transferencia de H^+ del estroma al espacio tilacoidal que va acompañado de la transferencia de Cl^- y Mg^{2+} en dirección contraria para mantener la neutralidad eléctrica. Paralelamente, el Ca^{2+} cloroplastídico aumenta en cloroplastos iluminados, con la consiguiente disminución de los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma. Estos son los iones, cuyas concentraciones son dependientes de la transición oscuridad-luz, que a nivel fisiológico regulan la actividad FBPasa cloroplastídica.

Kreimer *et al.* (1988) comprobaron que la activación de la FBPasa es paralela a la entrada de Ca^{2+} en el cloroplasto durante los dos minutos primeros de iluminación, sin embargo, *in vivo* el efecto modulador del Ca^{2+} debe estar separado espacial y temporalmente del proceso de catálisis, pues *in vitro* se ha demostrado que el Ca^{2+} es un inhibidor del proceso de catálisis (Herting y Wolosiuk, 1983).

También se ha observado que la fructosa-2,6-bisfosfato y el Ca^{2+} estimulan la conversión a la forma de mayor actividad catalítica, pero inhiben la capacidad catalítica del enzima activado (Soulie *et al.*, 1991). El significado fisiológico de este hecho no es claro, pues aparentemente no existe fructosa-2,6-bisfosfato en el cloroplasto y entra muy lentamente en él inducido por la luz (Cséke y Buchanan, 1986; Smeekens *et al.*, 1989).

El enzima es estable a pH ácido y neutro, disociándose parcialmente (el enzima es un tetrámero) en dos subunidades a pH alcalino (Lázaro *et al.*, 1974, 1975), que es el pH del cloroplasto iluminado y al que es activa el enzima. Sin embargo, cuando se preincuba con fructosa-1,6-bisfosfato y Ca^{2+} se previene la disociación a pH básico (Ballicora y Wolosiuk, 1990).

El Mg^{2+} y la fructosa-1,6-bisfosfato no son solo cofactor y sustrato respectivamente, sino que a concentraciones de Mg^{2+} superiores a 2 mM actúan también como activadores de la FBPasa. En este sentido, hay que señalar que el Fe^{2+} y el Mn^{2+} pueden reemplazar al Mg^{2+} y actuar como cofactores en la fase catalítica y que la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato, además de actuar como un activador en la fase de modulación, al igual que la glucosa-1,6-bisfosfato y la ribulosa-1,5-bisfosfato, es el único azúcar que puede reemplazar a la fructosa-1,6-bisfosfato como sustrato (Herting y Wolosiuk, 1983).

b. Modulación por modificación de enlaces covalentes

El hallazgo de que la tioredoxina modula a la FBPasa cloroplastídica activándola incrementó la importancia del mecanismo reductivo en la regulación enzimática (Wolosiuk y Buchanan, 1976). El incremento de la actividad es consecuencia de la reducción de un puente disulfuro por subunidad (Droux *et al.*,

1988; Stein *et al.*, 1989). En cualquier caso, hay que reseñar que este tipo de modulación no es independiente de la anteriormente descrita, sino que las dos se dan de manera sinérgica. Así, la acción concertada de azúcares bifosfato y cationes bivalentes disminuyen en 50 veces la concentración de tiorredoxina *f* necesaria para alcanzar la máxima estimulación de la actividad (Herting y Wolosiuk, 1983). Además, la especificidad de la tiorredoxina es alterada por moduladores que no interaccionan covalentemente con la FBPasa, como es el caso de la activación de la FBPasa por tiorredoxina *m* en presencia de Ca^{2+} y fructosa-1,6-bisfosfato (Schürmann *et al.*, 1985).

Estructura

Actualmente se conocen las secuencias aminoacídicas de las FBPasas de riñón de cerdo (Marcus *et al.*, 1982); hígado de cordero (Fisher y Thompson, 1983); hígado de rata (El-Maghrai *et al.*, 1988); citosólica de trigo (Raines *et al.*, 1988; Lloyd *et al.*, 1991); *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe* (Rogers *et al.*, 1988); *Escherichia coli* (Hamilton *et al.*, 1988); *Rhodobacter sphaeroides* (Gibson *et al.*, 1990); cloroplastídica de espinaca (Marcus y Harrsch, 1990); cloroplastídica de *Arabidopsis thaliana* (Horsnell y Raines, 1991); cloroplastídica de patata (Kossmann *et al.*, 1992); cloroplastídica de *Brassica napus* (Rodríguez-Suarez y Wolosiuk, 1993) y cloroplastídica de guisante (Carrasco *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1995). Se conoce el 90% de la secuencia de la FBPasa citosólica de espinaca (Ladror *et al.*, 1990).

Cuando se comparan las estructuras primarias de las FBPasa fotosintéticas y las gluconeogénicas se comprueba que las primeras poseen entre 50 y 60 aminoácidos en el extremo amino que presentan una baja homología y que corresponden al péptido de tránsito, pues las FBPasas cloroplastídicas son de codificación nuclear y han de ser vehiculizadas al cloroplasto. El análisis de estas secuencias pone de manifiesto que aunque existen regiones muy conservadas, destacando la que se sitúa en torno a ^{299}Lys (numeración según Carrasco *et al.*, 1994), relacionada con el centro activo del enzima (Xu *et al.*, 1981, 1982; Suda *et al.*, 1982; Marcus *et al.*, 1982; Ke *et al.*, 1990a, 1990b; Sahrawy *et al.*, 1995), el grado de homología entre las FBPasas fotosintéticas y las gluconeogénicas no supera el 50%.

Las FBPasas cloroplastídicas maduras tienen un tamaño que oscila entre los 356 aminoácidos del enzima de patata (Kossmann *et al.*, 1992) y los 359 de *Arabidopsis thaliana* (Horsnell y Raines, 1991) y la homología entre ellas es del orden del 80%, destacando la presencia de siete Cys en posiciones conservadas (Carrasco *et al.*, 1994). En este sentido, Marcus *et al.* (1988) identificaron en espinaca una región constituida por dos Cys separadas por cuatro aminoácidos que

está presente en las enzimas moduladas por la luz. Cuando alinearon la secuencia de las FBPasas citosólicas con la cloroplastídica de espinacas comprobaron que en esta última existe una zona de 12 residuos, característica de las FBPasas cloroplastídicas, que no aparece en las citoplasmáticas y que podría estar involucrada en la fotomodulación (Marcus y Harrsch, 1990). Mas recientemente, se ha demostrado que inmediatamente anterior a esta región existe otra, que es la que presenta menor homología de toda la secuencia, implicada en la interacción con la tiorredoxina (Hermoso *et al.*, 1995) y en el presente trabajo analizaremos los resultados obtenidos al mutar estas Cys en guisante, datos que ya han sido parcialmente publicados (Jacquot *et al.*, 1995).

A nivel de estructura terciaria y cuaternaria, solo se han cristalizado las FBPasas de riñón de cerdo (Ke *et al.*, 1989) y la cloroplastídica de espinaca (Villeret *et al.*, 1995a). En ambos casos, el enzima está constituido por 4 subunidades idénticas, cada una de las cuales se organizan en 9 α -hélices (8 α -hélices la de riñón de cerdo) y 13 estructuras β .

La FBPasa de riñón de cerdo (gluconeogénica), es la que se ha estudiado con mayor profundidad (Ke *et al.*, 1989, 1990a, 1990b, 1991a, 1991b; Zhang, 1993; Villeret *et al.*, 1995b). Se ha descrito que el centro activo es una cavidad oval de 18 x 12 Å y 10 Å de profundidad y cerca de él se encuentra una zona de carga negativa donde se unen el Mg^{2+} y otros metales. El AMP tiene un sitio propio de unión, alejado del centro activo. Análisis de la FBPasa formando complejo con fructosa-6-fosfato (Ke *et al.*, 1991b), fructosa-2,6-bisfosfato (Liang *et al.*, 1992) y con AMP (Ke *et al.*, 1991a; Xue, *et al.*, 1994) revelan que la estructura cuaternaria puede adoptar dos conformaciones, denominadas R y T, que difieren en que los dos monómeros superiores están rotados respecto de los inferiores 15°-17°. La forma R aparece cuando la fructosa-6-fosfato o la fructosa-2,6-bisfosfato se une al enzima y la forma T cuando es el AMP el que se une.

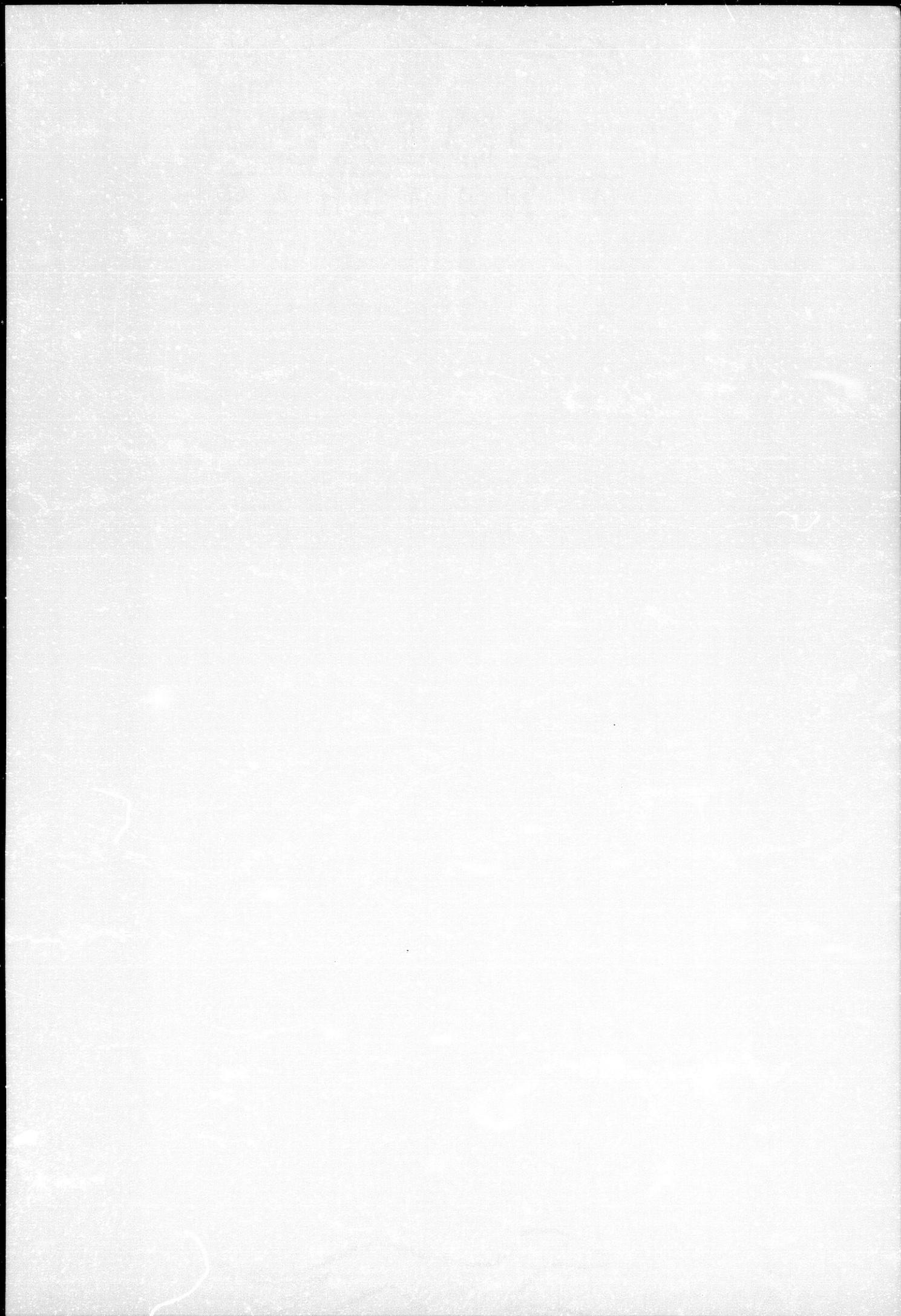
La estructura de la FBPasa cloroplastídica de espinaca (Villeret *et al.*, 1995a) es un tetrámero con simetría pseudoD₂ y los elementos de estructura secundaria son análogos a los encontrados en el enzima de riñón de cerdo. Cuando se superpone su estructura cuaternaria sobre las formas R y T correspondientes a la FBPasa de riñón de cerdo se comprueba que la de espinaca presenta una estructura cuaternaria nueva, denominada S y que equivale a una rotación de 20° de la estructura R y de 5° de la estructura T.

El AMP actúa como inhibidor de las FBPasas cloroplastídicas porque impide la unión de metales bivalentes, esenciales para la actividad enzimática (Scheffler *et al.*, 1986; Liu, Fromm, 1990). Mediante mutagénesis dirigida se ha observado que la mutación ¹²²Gly/Ala origina una disminución de la afinidad de enzima de riñón de cerdo por el AMP y se pierde toda cooperatividad para el Mg^{2+} (Zhang *et al.*, 1995). En el caso del enzima de riñón de cerdo, el AMP se une a las hélices H1, H2 y H3 y a

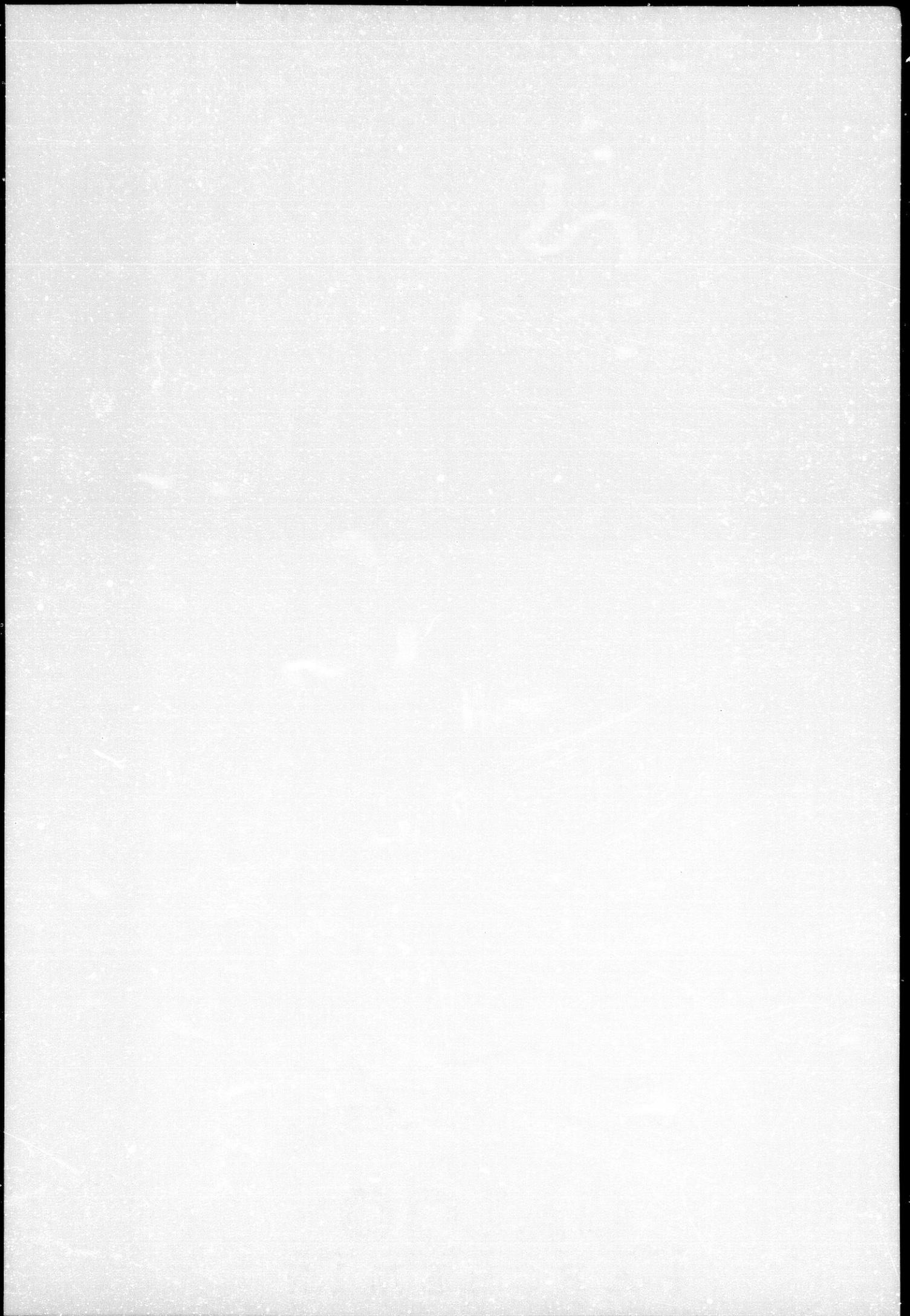
las 8 estructuras β del dominio AMP. El enzima cloroplastídica de espinaca, como todas las FBPasas cloroplastídicas, es insensible a la modulación por AMP (Preiss *et al* 1967; Morris, 1968; Buchanan, 1971) y este hecho se traduce a nivel estructural en que los residuos que interaccionan con el AMP en la FBPasa de riñón de cerdo no están conservados en la cloroplastídica de espinaca. Además, las hélices H1, H2 y H3 en la estructura S presentan diferente posición que en las estructuras R y T.

El centro activo, como en el enzima de riñón de cerdo, se localiza lejos de lo que por similitud con la enzima gluconeogéica se ha denominado dominio AMP, cerca de la superficie de unión de los monómeros sobre el eje z . Los residuos que lo definen están conservado en ambas enzimas. El centro activo puede considerarse dividido en tres regiones: región de unión del 6-fosfato, región de unión del anillo del azúcar y región de unión del 1-fosfato. Esta última está cerca del sitio de unión de los metales bivalentes. En el enzima de riñón de cerdo se ha comprobado que la hélice H4 es un elemento importante para la transmisión de cambios estructurales entre el centro activo y el dominio AMP durante la transición de la estructura R a la T (Xue *et al.*, 1994). En la forma S del enzima cloroplastídica de espinaca, la posición de H4 es diferente a la de las estructuras R y T.

Un aspecto interesante es conocer la localización de las Cys en la estructura tridimensional. Los primeros intentos fueron hecho por Li *et al.* (1994), quienes construyeron un modelo de la FBPasa cloroplastídica de trigo sobre la base de la estructura tridimensional del enzima de riñón de cerdo, con la que presenta una identidad del 45%. Concluyeron que existe un puente disulfuro interno entre las Cys localizadas en las posiciones 41 y 165 de la estructura primaria y que podría existir otro entre las Cys 147 y 154. La primera predicción es parcialmente confirmada por Villeret *et al.* (1995a), quienes indican que en espinaca la distancia es la apropiada, pero no detectan el puente disulfuro. La segunda aun no ha sido confirmada ni desmentida pues Villeret *et al.* (1995a) no logran localizar el puente disulfuro responsable de la modulación por tioredoxina porque no obtienen la suficiente resolución, pero concluyen que éste no está localizado entre ^{174}Cys y ^{179}Cys ni entre ^{179}Cys y ^{191}Cys , por no estar a la distancia apropiada. También indican que no existen puentes disulfuros entre subunidades.



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación ha estado desde siempre interesado en la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y en las diferencias existentes entre el enzima citoplasmático, gluconeogénico, y el enzima cloroplastídico, fotomodulable. A largo plazo, dos son los objetivos fundamentales de nuestra línea de investigación:

1. Estudiar a nivel molecular la unión de la FBPasa cloroplastídica a la tiorredoxina (Td) y la interacción del complejo con la membrana.
2. Profundizar en el mecanismo molecular por el cual la tiorredoxina ejerce su acción sobre la FBPasa cloroplastídica.

Existen dos tiorredoxinas cloroplastídicas, de origen filogenético diferente, pero reducidas por el mismo sistema ferredoxina-tiorredoxina, y no está del todo claro el papel fisiológico de ambas. En este sentido, aunque es ampliamente aceptado que existe una especificidad de modulación FBPasa/Td *f* y NADP-MDH/Td *m*, aparecen resultados contradictorios en la bibliografía que indican que al menos *in vitro* se dan activaciones cruzadas. Por ello, uno de los objetivos del presente trabajo es profundizar en el efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la FBPasa cloroplastídica.

Paralelamente, para comprender el efecto modulador de las tiorredoxinas, abordamos el análisis de las Cys que aparecen en la región característica de las FBPasas cloroplastídicas y que fue identificado como responsable de la modulación por tiorredoxina.

El plan de trabajo seguido para la consecución de nuestros objetivos es:

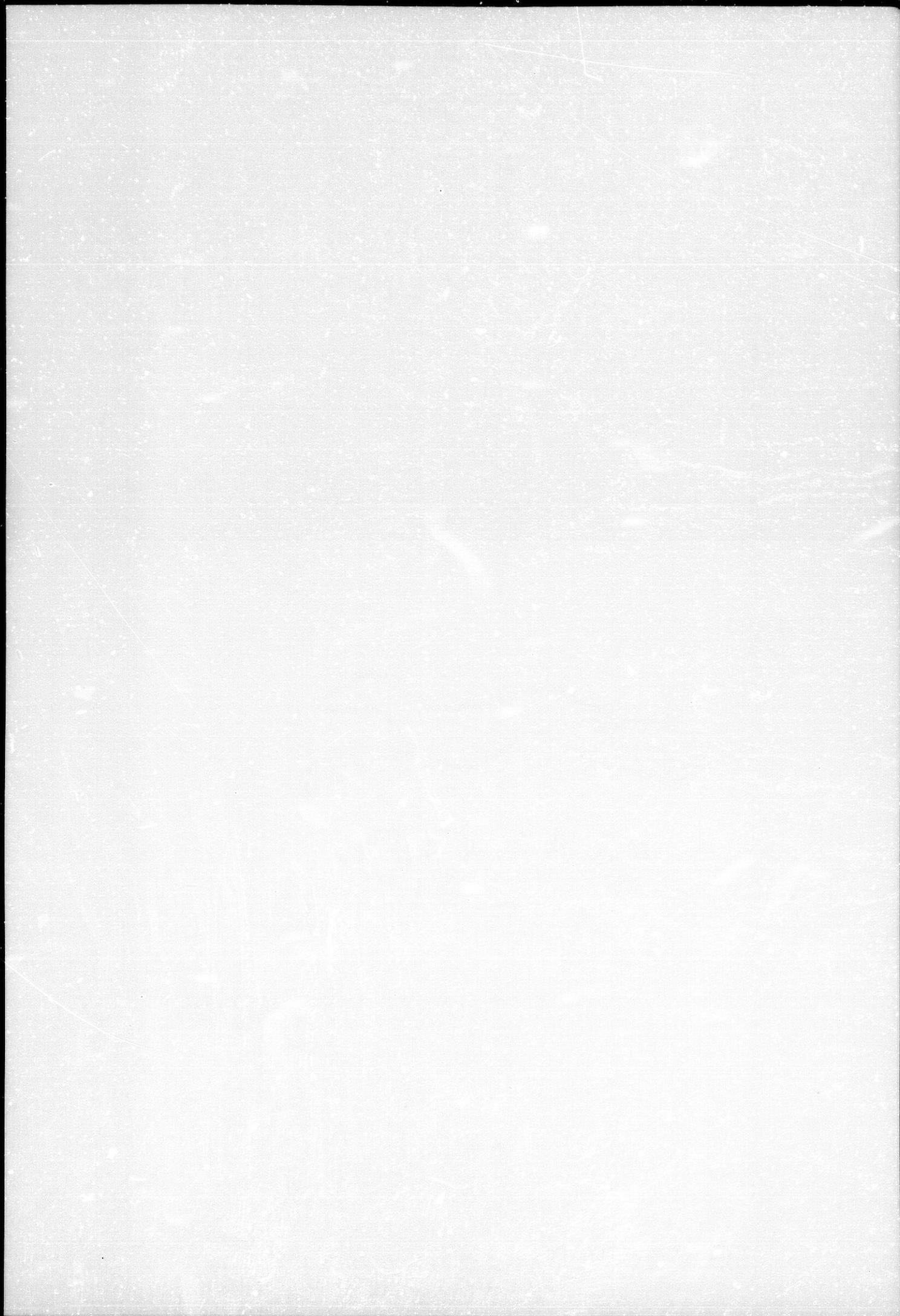
A. Obtención de clones y proteínas recombinantes:

1. Aislamiento y caracterización del clon de la tiorredoxina *m* de guisante.
2. Expresión y purificación de la tiorredoxina *m* recombinante de guisante.
3. Expresión y purificación de la tiorredoxina *f* recombinante de guisante.
4. Construcción, expresión y purificación de moléculas híbridas *m-f*.
5. Subclonación de la FBPasa cloroplastídica de guisante madura en un vector de expresión apropiado, expresión y purificación del enzima recombinante.
6. Mutación por Ser de ¹⁵³Cys, ¹⁷³Cys, ¹⁷⁸Cys y ¹⁹⁰Cys de la FBPasa cloroplastídica de guisante. Expresión y purificación de los mutantes.

OBJETIVOS

- B. Análisis del efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la FBPasa y, por extensión, sobre la NADP-MDH.
- C. Estudio diferencial de las propiedades fisicoquímicas e inmunológicas de las tiorredoxinas *m, f*, de *E. coli* y de los híbridos *m/f* y *f/m*.
- D. Estudio de la interacción de la FBPasa cloroplastídica con las tiorredoxinas *m, f*, de *E. coli* y con el híbrido *m/f*.
- E. Análisis estructural de las tiorredoxinas *m, f*, de *E. coli* y de los híbridos *m/f* y *f/m* y predicciones de estructura terciaria.
- F. Predicciones de estructura terciaria de la FBPasa cloroplastídica de guisante.

MATERIALES Y MÉTODOS



I. GENOTECA Y CEPAS BACTERIANAS

1. Genoteca

La genoteca usada en este trabajo fue elaborada por los laboratorios Clontech (USA) con el ADNc generado por retrotranscripción del ARNm obtenido de plántulas de guisante (*Pisum sativum* L. var. Alaska), de seis días de antigüedad, crecidas en presencia de luz. Está construida en el sitio Eco RI del fago lambda gt11 y el tamaño medio del inserto es de 1 Kb (oscilando entre 0.6 y 3.6 Kb). Se ha conservado a -70°C tras adición de dimetil sulfoxido al 7%, como recomienda el laboratorio.

2. Cepas bacterianas

A continuación se detallan las características más relevantes y las aplicaciones de las diferentes cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) con las que se ha trabajado:

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA	APLICACIÓN
Y1088	<i>supE supF metB trpR hsdR⁻ hsdM⁺ tonA21 strA lacU169 proC::Tn5 (pMC9)</i>	Yaung y Davis, 1983	Amplificación genoteca
Y1090	<i>ΔlacU169 proA⁺ IonΔ AraD139 strA supF [trpC22::Tn10] (pMC9)</i>	Yaung y Davis, 1983	Rastreo genoteca
71/78	<i>SupE ThiΔ(lac-proAB) F'(proAB⁺ lacI^a lacZΔM15)</i>	Messing <i>et al.</i> , 1977	Clonación y secuenciación
MC1022	<i>araD139 (ara, leu)7697 (lacZ)M15 galK strA</i>	Casadaban <i>et al.</i> , 1980	Hospedador (Host)
BL21(DE3)	<i>F ompT r_B⁻ m_B⁻ (λDE3)¹</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990	Expresión

1. El bacteriófago λDE3 lisogénico porta el gen de la T7 ARN polimerasa, bajo el control del promotor lacUV5, cuya expresión puede ser inducida por IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido).

II. MEDIOS DE CULTIVO

El medio habitual de crecimiento para todas las cepas fue el de Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982), cuya composición es la siguiente:

NaCl.	10 g
Bactotripton.	10 g
Extracto de Levadura.	5 g
H ₂ O.	c.s.p. 1 L

Para la preparación de medio sólido, se adicionó bactoagar al 1,5% (p/v). Cuando se trabajó con fagos, se suplementó con SO₄Mg 10 mM y maltosa al 0,2 % (p/v).

Para el aislamiento de fagos se empleó LBS, agar blando de composición:

NaCl.	10 g
Bactotripton.	10 g
Extracto de Levadura.	5 g
SO ₄ Mg · 7 H ₂ O. ...	2,5 g
Agarosa.	7,2 g
H ₂ O.	c.s.p. 1 L

El único antibiótico empleado fue la ampicilina, disuelta en agua destilada a una concentración de 100 mg/ml. La concentración final en los medios de cultivo fue 100 µg/ml.

La composición de todos los reactivos y medios utilizados durante la elaboración del presente trabajo se detalla en los apartados correspondientes. Los empleados para hacer crecer bacterias y para el aislamiento y manipulación del ADN y del ARN (apartados IV, V, VI, VII, VIII y IX) fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 1 atm de presión durante 30 minutos, excepto las soluciones de maltosa (al 20% (p/v) en agua destilada), de IPTG 0,1 M y de ampicilina 100 mg/ml, que lo fueron mediante filtración esterilizante a través de filtros de tamaño de poro de 0,45 µm.

III. PLÁSMIDOS

Se han empleado dos tipos diferentes de plásmidos en función de que se pretendiese clonar y secuenciar el ADNc o expresar y obtener proteína recombinante. Ambos portan el gen que codifica resistencia a la ampicilina.

pTZ18R (Zoller y Smith, 1983): Deriva del vector de clonación pUC18 (Messing *et al.*, 1983). Es un plásmido multifuncional especialmente diseñado para clonar, secuenciar, realizar mutagénesis *in vitro* y transcripción *in vitro*, todo ello en el mismo sistema. Presenta las siguientes características:

- a. Origen de replicación de plásmidos de alto número de copia.- Hace más simple la purificación y obtención del plásmido, pues en cada célula habrá más de 200 copias.
- b. Sitio de clonación (*polylinker*) con 10 sitios de restricción únicos.- Está inserto en la secuencia *lacZ'*, que codifica 99 aminoácidos de la región amino terminal de la β -galactosidasa (fragmento α) expresado desde P_{lac} . Permite la selección de los plásmidos portadores del inserto en cepas con la delección *lacZ* Δ M15 cuando se las hace crecer en un medio de cultivo suplementado con IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), que actúa como inductor de la expresión de *lacZ'*, y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), un análogo de la lactosa cuya hidrólisis por la β -D-galactosidasa produce un compuesto insoluble en el agua de color azul. La clonación de un fragmento de ADN interrumpe la transcripción del fragmento α de la β -D-galactosidasa, no habrá lisis del X-Gal y las colonias serán blancas. Las colonias serán de color azul cuando porten plásmidos en los que no se haya subclonado nada, pues expresarán β -D-galactosidasa y ésta hidrolizará el X-Gal.
- c. Origen de replicación del fago f1.- Hace posible, mediante la coinfección con un fago M13 auxiliar (*helper*), la replicación como una cadena sencilla de ADN, empaquetada y excretada al medio de cultivo.
- d. Secuencia promotora para la polimerasa del bacteriófago T7.- Localizado muy próxima al sitio de clonación, permite la transcripción *in vitro* del inserto clonado. Cuando la cepa bacteriana en la que se introduzca el plásmido porte el gen para la polimerasa del bacteriófago T7, se podrán obtener expresiones *in vivo*.

pET 3d y pET 12a (Studier *et al.*, 1990): Pertenecen a la familia de los vectores pET, plásmidos diseñados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* de

forma muy eficiente. Los genes clonados quedan bajo el control de las señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7 y la expresión es inducida cuando se los transfiere a cepas bacterianas que porten y expresen el gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Este hecho tiene especial importancia cuando los genes subclonados son tóxicos para la bacteria, pues permite mantenerlos latentes en cepas bacterianas que no porten el gen de la T7 ARN polimerasa. Además, esta polimerasa es tan selectiva y activa que casi el 50% de la proteína expresada por la bacteria puede llegar a ser la recombinante. Las características fundamentales de los plásmidos pET 3d y pET 12a se resumen en la siguiente tabla:

Vector	Promotor	Líder	Sitio ² proteasas	Sitios de clonación ³ ATG	Fusión	Secuencias ⁴ para oligos
pET 3d	T7	T7•Tag TM	ninguna	Nco I	Bam HI	Promotor T7 Terminador T7
pET 12a	T7	ompT	señal para peptidasa	Nde I	Bam HI	Promotor T7 Terminador T7

- Hace referencia a la secuencia comprendida entre el inicio de la transcripción y el comienzo del gen subclonado. Cuando codifica 11 aminoácidos del extremo amino terminal del péptido producto del gen 10 del bacteriófago T7, se simboliza por T7•TagTM. Este fragmento es reconocido por anticuerpos T7•Tag suministrados por Novagen, por lo que es posible seguir la expresión y purificación del gen subclonado. Si lo que codifica es un péptido señal que hace que la proteína recombinante se dirija al periplasma, facilitando su correcto plegamiento y evitando que aparezca como cuerpos de inclusión, se simboliza por ompT.
- Indica si existe alguna secuencia reconocida por proteasas que permita la eliminación de la secuencia líder de la proteína recombinante.
- Se puede subclonar en varios lugares del *polylinker*, pero los dos más interesantes son:
 - * En Nco I o Nde I, localizados delante del líder. El codon de iniciación (ATG) va contenido en las secuencias que reconocen Nco I (CCATGG) y Nde I (CATATG).
 - * En Bam HI I, localizado justo al final del líder. La proteína recombinante aparecerá como un producto de fusión con lo codificado por el líder.
- Indica si existen secuencias por delante (promotor T7) o por detrás (terminador T7) de la zona en la que se clona susceptibles de ser reconocidos por oligos específicos que permitan la secuenciación y amplificación del inserto de ADN clonado.

IV. RASTREO DE LA GENOTECA CON ANTICUERPOS

1. Preparación de las bacteria sensibles

Para que *E. coli* sea eficientemente infectada por los fagos, hay que hacerla crecer en un medio suplementado con maltosa y SO_4Mg (Kaiser y Murray, 1984), ya que la adsorción del fago a la bacteria requiere un receptor específico que es codificado por el operón de la maltosa, cuya expresión es inducida por la maltosa y reprimida por la glucosa. Paralelamente, los iones Mg^{2+} , a una concentración del orden de 10 mM, además de favorecer la adsorción, son esenciales para mantener la integridad del bacteriófago. Por ello, cuando se trabaja con fagos se emplea lo que se ha denominado como medio A: LB suplementado con SO_4Mg 10 mM y maltosa al 0,2%.

Se inocula una colonia aislada en 3 ml de medio A suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y se incuba a 37° C y agitación hasta alcanzar la fase estacionaria (habitualmente durante toda la noche). Este cultivo se diluye 100 veces en 10 ml de medio A con ampicilina y se continua incubando a 37° C y agitación hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento ($A_{600\text{nm}}=0,5-0,6$). Se recogen las células por centrifugación a 3.000 xg durante 10 minutos y se resuspenden en 5 ml de SO_4Mg 10 mM estéril. Estas células permanecen viables durante una semana almacenadas a 4° C, aunque los mejores resultados se obtienen cuando se usan recién preparadas.

2. Expresión de antígenos y fijación a la membrana de nitrocelulosa

La genoteca está construida en el sitio Eco RI del fago lambda gt11, localizado próximo al codon de terminación del gen *lacZ*, por lo que la expresión del ADNc será inducible por IPTG y aparecerá como una proteína de fusión con la β -galactosidasa. La inserción del ADNc en el sitio Eco RI produce un cambio fenotípico de Lac^+ a Lac^- , siendo posible la selección de los fagos que portan inserto al hacerlos crecer en presencia de X-Gal. Además, posee una mutación responsable de la producción de un represor termosensible del ciclo lítico, que se inactiva cuando se cultiva a 42° C, permitiendo controlar el paso de lisogenia a lisis con solo incrementar la temperatura.

Para el rastreo de la genoteca se empleó la cepa Y1090, que es deficiente en la proteasa lon, por lo que se reduce la degradación del antígeno expresado, y también porta la mutación supresora *supF*, que suprime la mutación *s100* del fago, responsable

de la lisis defectiva. Se siguió el protocolo recomendado por el laboratorio que construyó la genoteca (Clontech), el cual se basa en el descrito por Yaung y Davis (1983a, 1983b).

Se añaden 100 μ l de una dilución 1/10.000 de la genoteca en tampón de dilución de fagos (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM y EDTA 0,1 mM) a un tubo estéril con tapón de rosca que contiene 200 μ l de células sensibles, preparadas como se ha descrito en el apartado anterior. Se agita suavemente y se incuba a 37° C durante 15 minutos para sincronizar la infección y reducir la heterogeneidad del tamaño de calva, pues mientras que la adsorción del fago a la bacteria no es termodependiente, la inyección del ADN del fago en la bacteria sí lo es.

A continuación se adicionan 3 ml de LBS previamente fundido y enfriado a 45° C y se vierte sobre una placa ya preparada de LB-agar, agitando suavemente para que se forme una película homogénea sobre el agar de la placa, y se incuba durante 3,5 horas a 42° C. Durante este intervalo de tiempo se prepararon los discos de nitrocelulosa.

La nitrocelulosa se manipula con guantes de goma para evitar que las proteínas de los dedos y otros contaminantes se fijen a ella. Se cortan discos de un diámetro algo menor al de la placa, de tal forma que puedan ser depositadas sobre el cultivo sin que queden zonas levantadas donde la transferencia no sería óptima. Una vez cortados tantos discos como placas se estén incubando, se sumergen unos minutos en una disolución acuosa de IPTG 10 mM y se dejan secando entre dos papeles de filtro hasta el momento de ser usadas.

Después de la incubación a 42° C, se depositan los discos secos sobre las placas, procurando que contacten perfectamente, y se marca la posición del disco de nitrocelulosa sobre el agar mediante pinchazos con una aguja estéril en la zona periférica. Se dejan incubando a 37° C durante otras 3,5 horas, tras las cuales se retiran las membranas de nitrocelulosa y cada una de ellas se lava tres veces con 5 ml de TBS (Tris-HCl pH 7,9 50 mM y NaCl 150 mM) durante tres minutos cada vez.

3. Inmunodetección

Una vez fijada la proteína expresada, cada membrana de nitrocelulosa se bloquea con 10 ml de TBS suplementado con leche desnatada al 5% a temperatura ambiente y agitación suave durante 30 minutos o bien a 4° C durante toda la noche. Posteriormente, se lava con tampón TBST (TBS con Tween 20 al 0,05%) durante 6 minutos cinco veces, manteniendo siempre la agitación, y se cubre cada membrana

con 30 ml de una dilución 1/1.000 de anticuerpo en TBSTA (TBST con albúmina sérica bovina al 1%); se deja incubando 1-2 horas a temperatura ambiente y agitación.

A continuación, cada membrana se lava 6 minutos cinco veces con 5 ml de TBST y se incuba con una dilución 1/1.000 de anti-IgG peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación. Transcurrido ese tiempo, se lavan las membranas tres veces con TBST y dos con TBS como anteriormente.

Durante los lavados se va preparando la solución de revelado: se pesan 20 mg de 4-cloro-1-naftol (tóxico) y se disuelven en 4 ml de 1-propanol. Se mezclan con 20 ml de TBS y en el momento de revelar se añaden 20 μ l de H_2O_2 . Con estas cantidades hay suficiente para 3 membranas

Tras el último lavado, las membranas se cubren con 7 ml de la solución de revelado, manteniéndolas en semioscuridad para evitar la aparición de coloración de fondo. Donde aparezcan pequeñas manchas azul-grisáceas la reacción será positiva. La velocidad de aparición depende de la concentración de antígeno (proteína expresada) unida a la nitrocelulosa. Transcurrido un máximo de 50 minutos se da por finalizado el revelado y se puede considerar resultado negativo donde no hayz aparecido ninguna mancha. Se lavan bien las membranas con H_2O varias veces y se dejan secar en papel de filtro al abrigo de la luz.

Con los discos de nitrocelulosa ya secos se identifican las calvas positivas sobre la placa de agar, haciendo coincidir las marcas que se hicieron con la aguja estéril sobre el agar y las membranas. Con una pipeta Pasteur se extrae el cilindro de agar que contiene la placa de lisis positiva y se deposita en un tubo de eppendorf estéril que contiene 1 ml de tampón de dilución de fagos y una gota de Cl_3CH , se cierra y se agita enérgicamente. De esta forma se pueden conservar los fagos durante largo tiempo.

V. AISLAMIENTO DE ADN

1. Del bacteriófago

Para crecer fagos al objeto de extraerles el ADN se emplea *E. coli* Y1088 porque de acuerdo con sus características genéticas (consultar el apartado I.2) previene la restricción y la recombinación con el ADN foráneo.

a. Obtención de lisados (Davis *et. al.*, 1987).- A 200 μ l de la cepa Y1088 sensibilizadas como se describió en el apartado IV.1 se le adicionan 200 μ l de fagos y se incuban a 37° C durante 15 minutos. A continuación se pasan a un matraz con 10 ml de LB suplementado con SO_4Mg 10 mM y ampicilina y se dejan incubando al menos 6 horas (habitualmente toda la noche) a 37° C y agitación. La lisis se hace evidente por la clarificación del cultivo y la aparición de restos celulares en forma de grumos. Posteriormente se añade cloroformo hasta el 1% (v/v) y se continúa la incubación 20 minutos más, al término de los cuales se centrifuga 15 minutos a 12.000 xg y se recupera el sobrenadante, que puede ser almacenado a 4° C con cloroformo al 0,3% (v/v).

b. Extracción del ADN (Yamamoto *et. al.*, 1970).- El lisado se incuba a 37° C durante 1 hora con 30 μ l de ARNasa A de 10 mg/ml y 10 μ l de ADNasa I de 1 mg/ml. A continuación se añade NaCl hasta 0,5M y PEG 8.000 al 10% (p/v). Se agita suavemente hasta la completa disolución del PEG y se incuba 1 hora en hielo. Posteriormente se centrifuga a 12.000 xg y el precipitado se resuspende en 300 μ l de TE (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM). Se transfiere a un tubo de eppendorf y se fenoliza (Kirby, 1957) 2 veces con fenol-cloroformo y una con cloroformo-alcohol isoamílico, dejándose precipitar a -20° C con 1 volumen de isopropanol y 1/2 volumen de acetato sódico (AcNa) 3M durante 20 minutos. Se centrifuga en centrífuga de mesa en frío durante 15 minutos y se lava con etanol al 70% frío. Se seca al vacío y se resuspende en 100 μ l de TE.

2. Plasmídico

La preparación de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos en fase estacionaria (habitualmente crecidos durante toda la noche en LB con ampicilina) de la cepa portadora. En función del volumen de cultivo se habla de miniprep (3 ml),

midiprep (20-30 ml) o maxiprep (200-250 ml). A lo largo del presente trabajo se realizaron minipreps y midipreps siguiendo el procedimiento de lisis alcalina descrito por Ish-Horowicz *et al.* (1981).

Básicamente consiste en el tratamiento con una solución de NaOH y SDS para lisar las células y desnaturalizar el ADN y las proteínas y una posterior neutralización con acetato potásico (AcK) pH 4,8 que origina la precipitación del ADN cromosómico y de las proteínas. El ADN plasmídico, por su especial topología, se renaturaliza correctamente y queda soluble. Para mejorar la acción desnaturalizante de proteínas, a la solución de AcK se le ha añadido ácido fórmico, resultando un pH de 5,5. Finalmente, el ADN extraído se purifica mediante extracciones con fenol-cloroformo y cloroformo-alcohol isoamílico.

a. Miniprep.- Se centrifugan 3 ml de cultivo en fase estacionaria en la centrífuga de mesa y las células se resuspenden en 100 μ l de TE II (Tris-HCl pH 7,6 50 mM y EDTA 10 mM). Se adicionan 200 μ l de NaOH 0,2 N y SDS 1% , se agita el tubo por inversión y se incuba en hielo durante 5 minutos. El lisado se neutraliza añadiendo 150 μ l de una solución de AcK 3M y ácido fórmico 1,8M, se mezcla bien y se deja incubando en hielo 10 minutos. Los restos celulares se eliminan por centrifugación durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo de eppendorf con 200 μ l de isopropanol frío, se agita bien y se deja precipitar durante 5 minutos a -20° C. Se centrifuga 10 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70% frío y se resuspende en 100 μ l de TE (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM). A continuación se le añade ARNasa hasta una concentración de 1 μ g/ml y se incuba a 37° C durante 1 hora. Para eliminar las proteínas se adicionan 200 μ l de TE y se fenoliza 2 veces con 200 μ l de fenol-cloroformo y 1 vez con 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico. Para precipitar el ADN se añaden 150 μ l de acetato amónico (AcNH_4) 7M y 600 μ l de etanol absoluto y se deja a -20° C durante 30 minutos. Por último, se centrifuga, se lava con etanol al 70% y se resuspende en 50 μ l de TE.

Ocasionalmente, cuando se requería un ADN de gran pureza para la secuenciación, se usó el kit Magic-miniprep (actualmente denominado Wizard-miniprep) de la casa Promega. El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante.

b. Midiprep.- Se sigue un protocolo análogo al descrito anteriormente. Se parte de 25-30 ml de cultivo en fase estacionaria. Tras centrifugar a 6.000 xg las células se resuspenden de 5 ml de TE II. La lisis celular y posterior neutralización se hacen con volúmenes 50 veces superiores de los reactivos empleados para la miniprep. El sobrenadante recogido tras centrifugar a 12.000 xg durante 10 minutos se filtra a través de un embudo con lana de vidrio y se le añaden 10 ml de isopropanol frío,

MATERIALES Y MÉTODOS

dejándolo precipitar durante 10 minutos a -20°C . A continuación se centrifuga 15 minutos a 12.000 xg y se resuspende en $0,6\text{ ml}$ de TE y $0,6\text{ ml}$ de LiCl 5M . Se centrifuga de nuevo a 12.000 xg durante 20 minutos y el precipitado se lava con $2,5$ volúmenes de etanol al 70% frío. Se resuspende en $0,3\text{ ml}$ de TE y se incuba con $15\ \mu\text{l}$ de ARNasa de 1 mg/ml a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se extrae con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipita con etanol absoluto y AcNH_4 como se indicó en el apartado anterior.

VI. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli*

La transferencia de ADN plasmídico al interior de *E. coli* (transformación) fue demostrada por Cohen *et al.* (1972) a partir de las observaciones de Mandel y Higa (1970) según las cuales, la exposición de *E. coli* a CaCl_2 a una temperatura próxima a los 0°C favorecía la entrada de ADN del bacteriófago lambda (transfección). Este tratamiento con CaCl_2 en frío origina un estado especial denominado competencia y el protocolo original ha sufrido pocas modificaciones.

1. Preparación de células competentes

Se toman 10 μl de un cultivo en fase estacionaria de la cepa correspondiente de *E. coli* y se diluye 1.000 veces en LB, llevándose a incubar a 37°C y agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($A_{600\text{nm}}=0,4-0,6$). A partir de este momento se trabaja en frío, pues la supervivencia de las células competentes está limitada por la temperatura. A continuación se recogen las células por centrifugación a 3.000 xg durante 10 minutos y se resuspenden en 30 ml de una solución de CaCl_2 60 mM en PIPES 10 mM pH 7 y glicerol al 15% (v/v). Se dejan incubando en hielo 40 minutos y se vuelven a recoger por centrifugación 10 minutos a 2.100 xg. De nuevo se resuspenden en 6 ml del tampón anterior y se fraccionan en alícuotas de 200 μl . Si no se van a utilizar inmediatamente, se almacenan a -80°C .

2. Transformación de las células competentes

Se añaden 0,1-1 μg de ADN a una alícuota de 200 μl de células competentes y se deja incubando en hielo durante 1 hora. Posteriormente se las somete a un choque térmico de 2 minutos a 42°C , dejándose nuevamente en hielo durante 5-10 minutos. A continuación se adicionan 800 μl de medio LB sin ampicilina y se incuban media hora a 37°C para permitir la expresión de la resistencia a la ampicilina. Finalmente se siembran de 20 a 200 μl del cultivo en placas selectivas de LB-agar y ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se dejan crecer a 37°C toda la noche.

VII. MANIPULACIÓN DEL ADN

1. Determinación de la concentración de ADN

Para cuantificar y determinar los posibles contaminantes del ADN aislado se utiliza el método espectrofotométrico descrito por O'Hara-Mays y Capwell (1993). Consiste en determinar la absorbancia de la solución de ADN a 234 nm, 260 nm, 274 nm y 280 nm frente a un blanco de TE. La concentración de la muestra se calcula respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cadena doble. La relación A_{260}/A_{280} indica si existe contaminación con ARN, proteínas o fenol. Cuando esta relación es mayor de 1,85 existe contaminación con ARN y si es menor de 1,65 la contaminación es con proteínas o fenol. La presencia de fenol en la preparación se confirma cuando la relación A_{270}/A_{260} es mayor de 1. Cuando la relación A_{340}/A_{280} es mayor de 0,5 el ADN está contaminado con proteínas.

2. Restricción del ADN

Las endonucleasas de restricción más utilizadas en Biología Molecular son las de tipo II (Fuchs y Blakesley, 1983). Se caracterizan por poseer exclusivamente actividad nucleasa y reconocer secuencias específicas de 4 a 6 nucleótidos. Cortan ambas cadenas de la molécula de ADN dentro de la secuencia que reconocen, generando extremos romos o cohesivos.

Las digestiones con enzimas de restricción se realizan en las condiciones óptimas fijadas por el fabricante para cada enzima. Con fines analíticos, una reacción típica consiste en el corte de 0,5-1 μg de ADN con 1-2 unidades enzimáticas en un volumen final de 25 μl del tampón recomendado por el fabricante convenientemente diluido. Con fines preparativos se cortan hasta 5 μg de ADN con 10 unidades enzimáticas en un volumen final de 100-150 μl de tampón. Normalmente se incuba a 37°C durante 1 ó 2 horas, en función de la cantidad de enzima que se esté empleando y teniendo en cuenta que una unidad enzimática es la cantidad de enzima que digiere completamente 1 μg de ADN (habitualmente del fago lambda) en 1 h en las condiciones de digestión óptimas.

3. Amplificación de ADN mediante PCR

Para secuenciar ADN, introducir sitios de restricción y amplificar fragmentos de ADN que luego se van a subclonar se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988; Innis *et al.*, 1990; Arnheim, 1992; McPherson *et al.*, 1992). Consiste en el apareamiento de dos oligonucleótidos que actúan como cebadores a ambos lados del fragmento que se desea amplificar y repetir ciclos de calentamiento y enfriamiento. La reacción es posible gracias al empleo de una ADN polimerasa extraída de la bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, capaz de soportar repetidas incubaciones a temperaturas próximas a los 95° C. El aparato de PCR empleado para el desarrollo del presente trabajo ha sido el Unicycler Linus (Culter), refrigerado por agua.

Las reacciones de amplificación se hacen en 100 µl de tampón de PCR (suministrado por el proveedor de la enzima) convenientemente diluido, dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfato) 0,1 mM y Cl₂Mg 0,15 mM. Se emplean 20 µl de cada oligo 5µM, 100-150 ng de ADN molde y 2 unidades de Taq ADN polimerasa, definiéndose la unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de incorporar 10 nm de dNTP a un material ácido insoluble en 30 minutos tras 10 minutos de incubación a 74° C en unas condiciones de análisis normalizadas (Perkin Elmer Cetus, 1989). El aparato de PCR se programa según la secuencia: 1 x (ciclo 1) 30 x (ciclo 2) 1 x (ciclo 3). Los ciclos se detallan en la tabla adjunta:

ciclo	condiciones	finalidad
1	95° C / 5 minutos	desnaturalización "completa" del ADN molde
2	92° C / 2 minutos T _m ¹ -5 / 1 minuto y medio 70° C / 1 minuto ²	desnaturalización complejo molde-oligo amplificado apareamiento del oligo (cebador) y el ADN molde extensión del oligo sobre la cadena molde
3	70° C / 10 minutos	rellenar posibles huecos (opcional)

1. La T_m (*melting temperature*) viene definida por la proporción de A, C, G y T presentes en el oligo según la fórmula: $2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ y da una idea de la temperatura a la que se desnaturaliza el complejo ADN molde-cebador.

2. En las condiciones de reacción descritas, 1 minuto es suficiente para amplificar más de 1 Kb.

Habitualmente se prepara una mezcla de reacción con el tampón, el Cl₂Mg, los dNTP, los oligos y el ADN en un tubo eppendorf específico para PCR y se cubre con 30 µl de aceite de parafina para evitar evaporaciones durante el proceso. Se llevan al aparato de PCR previamente calentado a 95° C y se espera a que transcurra el ciclo 1 para adicionar las 2 U de enzima. A esta forma de comenzar el PCR se le denomina

"Hot Start PCR" y lo que persigue es evitar la aparición de productos indeseados como consecuencia de apareamientos inespecíficos cebador-molde a temperatura ambiente (Ruano *et al.*, 1991; Hosta y Flick, 1991).

Cuando termina la secuencia programada, se extrae con una pipeta la fase inferior (acuosa) -donde ha tenido lugar la reacción- del tubo de eppendorf, y se hace una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el proceso ha ido bien.

4. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar, analizar, identificar y purificar fragmentos de ADN se ha empleado la electroforesis en gel de agarosa. La técnica se basa en el hecho de que a pH próximo a la neutralidad, la relación carga/masa de una molécula de ADN es constante, independientemente de su longitud, y la migración a través del gel depende fundamentalmente del tamaño de la molécula de ADN, de su grado de enrollamiento y de la concentración del agarosa presente en el gel. Así, para moléculas con un mismo grado de enrollamiento, la tasa de migración es inversamente proporcional a su peso molecular (McDonnell *et al.*, 1977).

Rutinariamente se han preparado geles de agarosa al 0,8% (p/v) en TBE (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M y EDTA 2 mM), pero en algunos casos, cuando el tamaño de los fragmentos de ADN que se deseaba analizar eran menores de 0,3 Kb, se ha recurrido al empleo de agarosa de bajo punto de fusión NuSieve GTG (FCF corporation) al 3,5% (p/v) en TBE. Por cada 5 μ l de muestra a analizar se añade 1 μ l de tampón de carga (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,3% (p/v)) y la separación se lleva a cabo por electroforesis horizontal sumergida en TBE a un voltaje de 5-10 V/cm. Para la visualización, el gel se tiñe por inmersión en una solución de bromuro de etidio de 1 μ g/ml (p/v) durante 10-15 minutos y, tras lavar con agua, se expone a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador.

El tamaño de los fragmentos de ADN se ha estimado por interpolación en curvas del logaritmo del tamaño frente a la movilidad relativa de dos patrones de restricción comerciales:

- El genoma del fago lambda digerido con Hind III y Eco RI (Promega): fragmentos comprendidos entre 21,2 Kb y 0,5 Kb.
- Digestión de pBR322 suplementado con fragmentos de \approx 1 Kb (Marcador X de Boehringer Mannheim): fragmentos de 12,2 Kb a 0,13 Kb.

5. Recuperación de moléculas de ADN de geles de agarosa

Tras identificar el fragmento de ADN que se desea extraer, como se ha indicado en el apartado anterior, se corta con un bisturí el trozo de agarosa que lo contiene en trocitos lo más pequeños posibles y se distribuye en tubos de eppendorf con un volumen de fenol. Se agita vigorosamente hasta conseguir que se emulsione y a continuación se sumerge en nitrógeno líquido. Posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a temperatura ambiente en centrifuga de mesa y se continua fenolizando como se describió en el apartado V.2.a.

6. Ligación de ADN

La ligación de dos fragmentos de ADN consiste en la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de ambas moléculas. Esta reacción puede ser catalizada por diferentes ligasas, pero para clonar se suele emplear la ligasa del fago T7 por su eficacia y porque permite ligar extremos romos. El resultado de la reacción viene condicionado por la concentración de ADN, la temperatura de incubación y el tiempo de reacción (Dugaiczky *et al.*, 1975 y Maniatis *et al.*, 1989).

Para la ligación de moléculas de ADN se ha partido de plásmido linealizado y de fragmento de ADN, obtenidos ambos por digestión con una o varias enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación y purificados como se ha descrito anteriormente. Estas moléculas se combinaron según proporciones variables en función del tamaño del ADN a insertar y del vector, no sobrepasando la cantidad de ADN final de 300 ng. La reacción se llevó a cabo en 20 µl del tampón recomendado por el fabricante convenientemente diluido y 1 unidad de ligasa del fago T4, incubándose durante toda la noche a 12-15°C.

7. Secuenciación

Se ha utilizado el método de terminación de cadena de Sanger *et al.* (1977), también conocido como método "dideoxi" o método enzimático. Básicamente consiste en la realización de una copia complementaria del ADN de cadena sencilla cuya secuencia se desea determinar, empleando para ello una ADN polimerasa y un oligonucleótido o *primer* que actúe como cebador. El método aprovecha la capacidad de la ADN polimerasa para reconocer como sustrato a los 2',3'-

didesoxirribonucleótidos (ddNTPs), los cuales, por carecer de del grupo -OH en 3', originan el bloqueo de la reacción. Así, realizando cuatro reacciones paralelas con una mezcla adecuada de dNTPs, y en cada una de ellas uno de los ddNTP, se puede determinar la secuencia.

a. Secuenciación manual: Kit de la Sequenasa (USB) y marcaje radiactivo.- La "Sequenase" versión 2 es la ADN polimerasa del fago T7 modificada genéticamente para eliminar la actividad exonucleasa 3'→5' que presenta el enzima salvaje (Tabor y Richardson, 1987, 1989). Para el marcaje radiactivo se ha utilizado [α -³⁵S]dATP y para minimizar las compactaciones el análogo 7-deaza-dGTP, en lugar de dGTP, en la mezcla de marcaje (Mizusawa *et al.*, 1986). Los oligonucleótidos empelados fueron:

pUC/M13 Forward (5' - gtt ttc cca gtc acg ac - 3')

pUC/M13 Reverse (5' - cag gaa aca gct atg ac -3').

Se ha seguido el protocolo del kit de la "Sequenase" de USB, aunque con algunas modificaciones.

Se parte de 18 μ l de una miniprep del ADN que se pretende secuenciar y se incuba con 2 μ l de ARNasa de 1 mg/ml durante 15 minutos a 37° C. Posteriormente, el ADN es desnaturalizado por tratamiento con 5 μ l de una solución de NaOH 1N y EDTA 1 mM otros 15 minutos a 37° C y se precipita con 1 volumen de isopropanol frío y 1/10 volumen de AcNa 3M. Se centrifuga 5 minutos en una centrifuga de mesa y se resuspende en 20 μ l de TE o H₂O.

Se toman 8 μ l del ADN previamente desnaturalizado y se hibridan 15 minutos a 37° C con 1 μ l de cebador (de 10 μ g/ml) y 2 μ l del tampón que recomienda el fabricante. A continuación se distribuyen 2,5 μ l de la mezcla anterior sobre las paredes de cuatro tubos de eppendorf, con 2 μ l de una de las tres mezclas de marcaje mostradas en la tabla adjunta:

	A	B	C
Te	59 μ l	56 μ l	52 μ l
DTT 0,1 M	11 μ l	11 μ l	11 μ l
Mezcla dNTPs	2,2 μ l	4,5 μ l	9 μ l
Sequenase	3 μ l	3 μ l	3 μ l
³⁵ S-dATP	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Tampón dilución	10 μ l	10 μ l	10 μ l

A. Ideal para leer la zona próxima al cebador, pero solo se podrán leer alrededor de 250-270 bases.

B. Permite leer hasta 350 bases

C. Útil cuando se corren geles largos (80-100 cm) o al 5% de acrilamida. Bajo estas condiciones se pueden leer regiones alejadas del cebador hasta una distancia de 1 Kb.

Se centrifuga para que contacten ADN y mezcla de reacción simultáneamente en los cuatro tubos y rápidamente se adicionan, de la misma forma, 2 μ l de mezclas de dNTPs con ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP respectivamente y se incuba a 37° C durante 3 minutos. Finalmente, se para la reacción adicionando a cada tubo de reacción 4 μ l del tampón de carga de electroforesis (solución en formamida de azul de bromofenol 0,2 % (p/v), xilanilcianol 0,2 % (p/v) y EDTA 10 mM pH 8).

La separación de los oligonucleótidos -marcados y de cadena sencilla-resultantes de la reacción de secuenciación se lleva a cabo mediante electroforesis en geles (40x20 cm) de acrilamida al 6 % y urea 6 M en tampón TBE. Antes de cargar la muestra, se someten a un campo eléctrico de 31 mA en tampón TBE para aumentar la temperatura del gel hasta aproximadamente 50° C. A continuación se cargan 4 μ l de muestra previamente incubada al baño maría durante un par de minutos y se corre la electroforesis a intensidad constante de 31 mA en tampón TBE.

Tras finalizar la electroforesis, el gel se transfiere por adherencia a papel Whatman 3 MM y se lava con una solución fijadora de ácido acético glacial al 10% (v/v). Se cubre con papel de plástico transparente y se seca al vacío en un secador de geles Bio-Rad a 80° C durante 90 minutos. Posteriormente, se expone a una película Hyperfilm β -Max (Amersham) durante al menos 24 horas en oscuridad y a temperatura ambiente, tras lo cual se revela empleando métodos estándar.

b. Secuenciación automática: Kit *fmoI* (Promega) y marcaje fluorescente.- Este kit se basa en una reacción de PCR, empleando una Taq ADN polimerasa (Innis *et al.*, 1988) modificada para eliminar la actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3' y lograr mejores resultados con ADN molde de doble cadena. La reacción de PCR, al realizarse a temperatura elevada, implica numerosas ventajas, entre las que cabe destacar un incremento en la especificidad del apareamiento ADN molde-cebador y menor frecuencia de aparición de estructuras secundarias. Además se reduce la cantidad necesaria de ADN molde (del orden de femtomoles). No se ha recurrido al marcaje radiactivo porque los oligos (cebadores) estaban marcados fluorescentemente en el extremo 5'. La síntesis de los oligonucleótidos y la electroforesis se llevaron a cabo en el Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC), empleando para la lectura de los resultados el sistema Base Station DNA Sequencer de Millipore.

Se ha seguido el protocolo del kit, aunque con ligeras modificaciones: se prepara una mezcla de reacción con 4,25 μ l del tampón 5x recomendado por el fabricante, 400 ng de ADN molde (obtenido usando el Kit Magic-prep (Promega) para lograr una mayor pureza), 6 pmoles de cebador y 1 μ l de Taq ADN polimerasa. Se preparan cuatro tubitos de eppendorf para PCR, cada uno de ellos con 1 μ l de mezcla diluida al 50% de dNTPs (el dGTP se ha sustituido por 7-deaza-dGTP) y ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP respectivamente y se les adicionan 4 μ l de

la mezcla de reacción. Se centrifuga para que entren en contacto y se cubren con 20 μ l de aceite de parafina. Rápido y en baño de hielo se llevan al apartado de PCR, previamente calentado a 95° C, y se ejecuta el siguiente programa:

ciclo	condiciones
1 (1 vez)	95° C / 2 minutos
2 (30 veces)	92° C / 1 minuto T _{apareamiento} ¹ / 1 minuto 70° C / 1 minuto

1. T_{apareamiento} = T_m - 5° C

Una vez completado el programa, se elimina el aceite de parafina lavando dos veces con 200 μ l de cloroformo y se seca a 60° C y vacío durante 30 minutos. Finalmente, se resuspende en 3 μ l de tampón de carga de la electroforesis (azul dextrano al 0,5% (p/v) en formamida).

La muestra se llevaba al servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra, donde corrían la electroforesis y los resultados eran leídos automáticamente por el sistema Base Station DNA Sequencer (Millipore). Habitualmente solo había que supervisar que la lectura automática era correcta y corregir, apoyado por el software del sistema, los posibles errores.

7.1. Estrategias de secuenciación

Al principio se secuenció siguiendo el protocolo tradicional: kit de la Sequenasa y secuenciación de ambas cadenas complementarias al objeto de verificar la secuencia. Este sistema, además de tedioso, implica la manipulación de radiactividad. Además, si el fragmento de ADN es demasiado largo para secuenciarlo a partir de un sitio único de unión del cebador, hay que subclonar delecciones seriadas.

Cuando se puso a punto el protocolo de secuenciación automático se cambió de estrategia: se continuó secuenciando en ambos sentidos, pero cada reacción se realizó por triplicado y se calculó la secuencia consenso. A partir de esta secuencia consenso se fueron diseñando oligonucleótidos que actuaran como cebadores, así no hubo que recurrir a la realización de delecciones seriadas. En la tabla adjunta se muestran los oligos diseñados:

nombre	secuencia	Tm
TN2	5'-ccc aaa cta ttc agt aga g -3'	54° C
TR2	5'-caa cta cct ttg cct tgt - 3'	52° C
TN3	5'-cgc tgg tgt tgc tta tag -3'	54° C
TR3	5'-ctt gtt gca gtg ttg ag -3'	50° C

Además, como la secuencia consenso que se iba obteniendo era tan fiable (a veces se llegaron a realizar seis reacciones de una misma zona) no hubo necesidad de continuar secuenciando una vez que los resultados de la secuenciación en ambos sentidos se solaparon en la zona central.

7.2 Análisis de las secuencias

Para el análisis de las secuencias, además del software del sistema Base Station DNA Sequencer (Millipore), se ha recurrido al Genetics Computer Sequence Sequence Analysis Software Package (versión 7.3), el cual permite realizar numerosos estudios sobre la secuencia nucleotídica y aminoacídica, tales como búsquedas en bancos de secuencias, mapeos de restricción, alineamientos de secuencias y cálculo de la secuencia consenso, traducción según todas las posibles pautas de lectura... (consultar apartado XII).

8. Mutagénesis dirigida

Se ha seguido el protocolo descrito por Corkmack (1991). Básicamente consiste en realizar dos PCR (ver Fig. 3). En el primero se amplifican de manera independiente las regiones comprendidas entre la zona donde se localiza la mutación y los extremos amino y carboxilo respectivamente. Los oligos complementarios a la zona donde se localiza la mutación han sido diseñados de manera que porten la mutación que se desea incluir y que sean complementarios. Para el segundo PCR se emplea como molde los fragmentos obtenidos en el anterior, previa purificación por electroforesis y extracción de la banda (consultar apartados VII.4 y VII.5) y durante él se logra la regeneración del fragmento completo ADN que codifica la proteína con la mutación deseada.

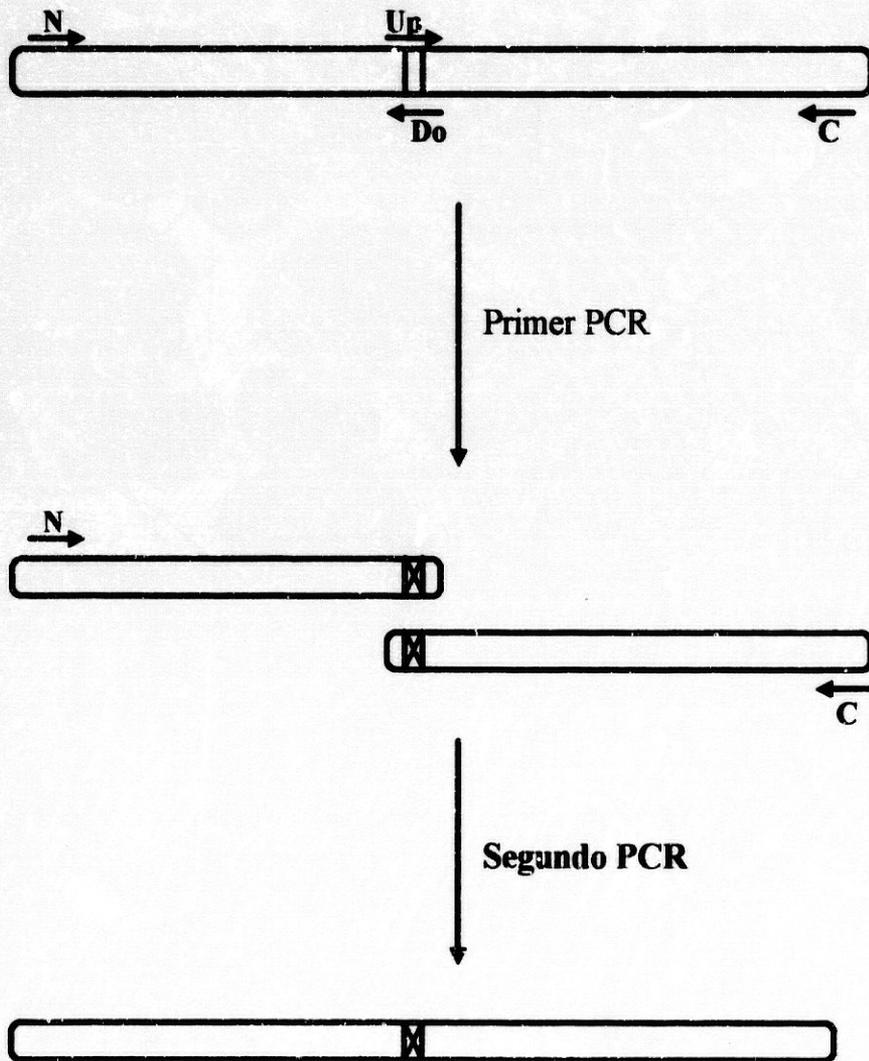


Fig. 3.- Esquema del procedimiento seguido para realizar mutagénesis dirigida. La zona comprendida entre las dos barras horizontales indican el lugar donde se pretende introducir la mutación y la X representa la mutación. Los oligos Up y Do son complementarios y portan la mutación que se desea introducir.

VIII. HIBRIDACIONES DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

1. Southern Blotting

Consiste en la transferencia de moléculas de ADN separadas por electroforesis en gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa (Southern, 1975) o de otra naturaleza. Tras la inmovilización son hibridadas con una sonda de ADN o ARN marcados. Existen diversas técnicas de transferencia, pero las más usadas son las basadas en fenómenos de capilaridad.

a. Aislamiento de ADN.- Se siguieron los protocolos descritos en el apartado V

b. Marcaje de la sonda de ADN.- Se empleó el kit DNA 5'-End Labeling System (Promega) y el protocolo seguido fue el indicado por el fabricante. Se incuban 10 pmoles de extremos 5' con 0,5 U de fosfatasa alcalina, en un volumen final de 50 μ l, durante 30 minutos a 37° C. Se repite el proceso adicionando 0,1 U más de fosfatasa alcalina. Tras fenolizar, el ADN se trata con 8-10 U de T4 polinucleótido quinasa y con [γ -³²P] ATP (de manera que quede una concentración de al menos 1 μ M en la reacción) y se incuba del orden de 10 minutos a 37° C para marcar el extremo 5'. Finalmente, se para la reacción adicionando 1 μ l de EDTA 0,5 M. La actividad específica resultante debe ser mayor o igual a 10⁸ cpm/ μ g de sonda (suficientes para, tras hibridar, detectar cantidades de ADN del orden de 0,5 pg).

c. Electroforesis y Transferencia.- Se corre una electroforesis en gel de agarosa tal y como se describió en el apartado VII.4. A continuación se incuba con un volumen suficiente de solución desnaturalizante (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M) durante 30 minutos y agitación suave. Se lava con agua destilada y se incuba en las mismas condiciones otros 30 minutos con un volumen similar de solución de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 7,5 y NaCl 3 M). Paralelamente, se corta un trozo de membrana de nylon GeneScreen Plus (NEN) de un tamaño superior al del gel y se incuba durante 15 ó 20 minutos en tampón SSC 10x (Citrato sódico 0,3 M pH 7 y NaCl 3M). Posteriormente se monta el siguiente sistema: se cortan dos tiras de papel Whatman 3MM de un ancho similar al gel y de una longitud suficiente como para alcanzar un reservorio inferior de solución de transferencia (SSC 10 x) y otras dos de tamaño similar al gel y todas ellas se humedecen en solución SSC 10 x. Se colocan las tiras mayores sobre un cristal, con los extremos sumergidos en SSC 10 x y sobre ellas el gel, en posición invertida. A continuación, sobre el gel se deposita la membrana y sobre ésta las dos tiras de papel Whatman de menor tamaño. Por último,

se coloca abundante papel absorbente y un peso de 0,25 Kg. homogéneamente distribuido. Con plástico flexible o con parafina se sellan los bordes del gel al objeto de evitar el paso marginal de la solución de SSC a la membrana, obligándola a ascender por capilaridad a través del gel. Se deja transferir durante toda la noche. A la mañana siguiente, la membrana se lava con SSC 2 x y se incuba 1 hora a 80° C para fijar el ADN transferido.

d. Hibridación y detección.- Tras fijar, la membrana se prehibrida incubándola al menos 1 hora a 68° C con 20 ml de solución de hibridación (SSC 5x, reactivo de bloqueo (Boehringer Mannheim) 2%, N-lauril sarcosina 0,1% y SDS 0,02% (p/v)) por cada 100 cm² de membrana. Posteriormente, se cambia la solución empleada en la prehibridación por 2,5 ml/100 cm² de solución de hibridación con 10 ng/ml de sonda marcada (previa desnaturalización) de actividad específica 10⁸ cpm/μg. y se incuba a 68° C durante toda la noche.

A la mañana siguiente, se lava dos veces a temperatura ambiente con 1 volumen de solución de lavado I (SSC 2x y SDS 0,1% (p/v)) durante 10 minutos y otras dos a 68° C, 15 minutos cada vez, con solución de lavado II (SSC 0,1x y SDS 0,1% (p/v)). Por último, se lava la membrana con SSC 2x a temperatura ambiente y se expone a una película Hyperfilm β-Max (Amersham) 2 horas (o toda la noche si fuese necesario), tras lo cual se revela empleando métodos estándar.

2. Northern blotting

Consiste en la transferencia de ARN fraccionado mediante electroforesis en gel de agarosa a una membrana (Alwine *et al*, 1977). Posteriormente, es hibridado con sondas de ADN o ARN marcadas. La técnica difiere del Southern blotting en los pasos iniciales pues, al trabajar con ARN, la electroforesis hay que realizarla en condiciones desnaturalizantes. Además, durante todo el proceso hay que cuidar las contaminaciones con ARNasa, por lo que se toman las siguientes precauciones:

- Se esteriliza el material de vidrio a 200° C durante toda la noche.
- El material que no resista estas condiciones, se lava con una solución de dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,05% durante 1 hora y se autoclava 30 minutos para eliminar las trazas de DEPC.
- El agua y las soluciones se suplementan con DEPC al 0,05% y se autoclavan durante 1 hora.
- Se trabaja con guantes.

a. Aislamiento de ARN.- Se empleó el método desarrollado por Summers *et al.* (1970) para obtener ARN de bacterias gram negativas de forma rápida.

Se recogen por centrifugación a 12.000 xg durante 10 minutos las bacterias de 10 ml de cultivo en fase estacionaria. Se resuspenden en 10 ml de tampón A (Tris-HCl 15 mM pH 8, sacarosa 0,45 M y EDTA 8 mM) y se adicionan 80 µl de lisozima (50 mg/ml). Se incuba 15 minutos en hielo. Los protoplastos formados se recogen por centrifugación 5 minutos a 6.000 xg y se resuspenden en 0,5 ml de tampón de lisis (Tris 30 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, EDTA 5 mM y SDS 1% (p/v)) suplementado con 100 µg/ml de proteinasa K. Se incuba 5 minutos a 37° C. A continuación, en baño de hielo, se adicionan 250 µl de una solución saturada de NaCl (40 g /100 ml) y se deja en hielo 10 minutos para que precipiten las proteínas y el ADN. Se centrifuga 10 minutos en centrifuga de mesa y se recoge el sobrenadante en dos tubos de eppendorf. Se les adiciona 1 ml de etanol absoluto frío y se deja precipitando 30 minutos a -20° C. Se centrifuga en frío y los precipitados se lavan con 500 µl de etanol al 70%. Finalmente, el ARN se resuspende en 100 µl de agua, se cuantifica y se determina su pureza tal y como se describió en el apartado VII.1.

b. Marcaje de la sonda de ADN.- Para este tipo de hibridaciones se marcó con digoxigenina por *random-primed*: se incuba ADN monocatenario con una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores y se sintetiza una copia, empleando d-UTP marcado con digoxigenina. Sobre la digoxigenina se fija un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina que reacciona con el lumigen PPD (Boehringer Mannheim) originando luminiscencia. Se ha empleado el DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradiative (Boehringer Mannheim) y el protocolo seguido fue el indicado por el fabricante.

Se desnaturaliza el ADN que va a ser marcado calentándolo 10 minutos a 95° C. Se toma 1 µg de dicho ADN y se incuba 1 hora a 37° C en presencia de la mezcla de dNTP (con Dig-dUTP), la de hexanucleótidos y 2 U de enzima Klenow. La reacción se para con 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8 y se precipita con 2,5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol absoluto a -70° C durante 30 minutos. Se lava con etanol al 70% y se resuspende en 50 µl de TE. El porcentaje de ADN marcado frente al no marcado varía en función de la cantidad de ADN inicial y de las horas de marcaje. Para 1 µg, tras una hora de reacción, el 26% del ADN estará marcado.

c. Electroforesis y transferencia.- El ARN, al ser de cadena sencilla, tiene gran tendencia a formar estructuras secundarias, por lo que la electroforesis se realiza en condiciones desnaturalizante.

Se prepara un gel al 1,2% disolviendo 1,2 g de agarosa en 72 ml de agua y se enfría hasta 60°C. A continuación se le añaden 10 ml de tampón MOPS 10x (MOPS 0,4 M pH 7, acetato sódico 0,1 M y EDTA 0,01 M) y 18 ml de formaldehído 12,3 M (la concentración final en el gel será 2,2 M). Una vez gelificado, las muestras se diluyen hasta 30 µl en 5 µl de MOPS 10x, 9 µl de formaldehído 12,3 M y 25 µl de formamida. Se mezclan bien y se adicionan 10 µl de tampón de carga (EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilanilcianol 0,25 % (p/v) y glicerol 50% (v/v)). La electroforesis se corre a un voltaje constante de 5 V/cm.

La transferencia se realizó siguiendo un esquema análogo al descrito para el Southern blotting. Se emplearon membranas de nailon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim): se lava repetidas veces el gel con agua tratada con DEPC para eliminar el formaldehído y se trata con una solución SSC 20x durante 45 minutos (opcional). Paralelamente, la membrana se equilibra en SSC 20x. Se monta un sistema análogo al descrito para el Southern blotting y se deja transfiriendo durante toda la noche. A la mañana siguiente se lava con SSC 2x y se fija como se describió para el Southern blotting.

d. Hibridación y detección.- La membrana se prehibrida con solución de hibridación (la misma descrita para el Southern blotting, pero con formamida 50%) durante 3 horas a 42°C (cuando la sonda sea de ARN, a 60°C). Se desnaturaliza la sonda de ADN y se adiciona a una solución de hibridación (con formamida al 50%) nueva. Se continua la incubación a 42°C toda la noche. A la mañana siguiente se lava según lo descrito para el Southern blotting

La detección se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el manufacturador para el empleo de Lumigen PPD (Boehringer Mannheim): La membrana se lava 5 minutos con solución de lavado (a. málico 0,1 M pH 7,5 NaCl 0,15M y Tween 20 0,3% (v/v)) y se bloquea durante 30 minutos en solución de bloqueo. Posteriormente se incuba con una dilución 1/5.000 del anticuerpo anti-digoxigenina en tampón de bloqueo durante 30 minutos y se lava con la solución de lavado. Se equilibra 5 minutos en tampón de sustrato (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 NaCl 0,1 M y MgCl₂ 50 mM) y se incuba 5 minutos en solución de sustrato (Lumigen PPD (10 mg/ml) diluido 1/100 en tampón de sustrato). A continuación se escurre la membrana, se sella en una bolsa de plástico y se incuba 5-15 minutos a 37°C. Por último, se expone a una película Hyperfilm MP (Amersham) durante 15-25 minutos a temperatura ambiente y se revela utilizando métodos estándar.

IX. EXPRESIÓN EN *Escherichia coli*

1. Expresión del inserto de ADNc transportado por lambda gt11

Tras rastrear la genoteca como se indicó en el apartado IV, se procedió a expresar en *E. coli* Y1090 los clones aislados y, tras lisar las bacterias, se midió actividad a los extractos crudos para analizar si codificaban tiorredoxina.

Se incuban 200 μ l de bacterias sensibles (consultar apartada IV.1) con 200 μ l del clon de fagos a expresar (título del orden de 10^{10}) 15 minutos a 37° C. Posteriormente se adicionan 50 ml de LB con ampicilina y se comienza a incubar a 30° C y agitación durante 3 horas. Se suplementa con IPTG 1 mM y se continua la incubación a 42° C y agitación 1 hora más. Por último, las bacterias se recogen por centrifugación 10 minutos a 6.000 xg y se resuspenden en 1 ml de tampón Tris-HCl 30 mM pH 7,9. Para liberar la proteína expresada las células fueron sonicadas (5 pulsos de 50 W y 30 segundos).

2. Expresión de los plásmidos recombinantes

Una vez que se ha aislado el fragmento de ADN que codifica una proteína y se conoce su secuencia, ésta puede ser expresada en *E. coli* si se subclona convenientemente en un vector de expresión adecuado. Como ya se indicó anteriormente, se ha subclonado en plásmidos de la familia pET y se ha expresado en la cepa BL21(DE3) (consultar los apartados I y III), de la casa Novagen.

Se parte de una colonia de BL21(DE3) transformada con el plásmido que se desea expresar y se incuba en LB suplementado con ampicilina a 37° C y agitación hasta alcanzar la fase estacionaria del crecimiento. De este cultivo se toma 1 ml y se distribuye en 2 matraces con 400 ml de LB y ampicilina cada uno. Se continua la incubación hasta fase estacionaria. A continuación se adicionan 1.200 ml de LB a cada uno y se distribuyen en diferentes matraces. Se continua con la incubación hasta que el cultivo alcanza una $DO_{600\text{ nm}} = 0,8-1$, momento en el que se induce la expresión por adición de IPTG hasta una concentración de 100 μ M y se deja a 37° C y agitación entre 4 y 6 horas. Finalizada la expresión, las células se recogen por centrifugación a 6.000 xg durante 10 minutos y se almacenan a 4° C hasta comenzar la purificación.

X. PURIFICACIONES DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS

1. Purificación de la FBPasa cloroplastídica de guisante recombinante

En colaboración con el Dr. Jean Pierre Jacquot, del Institute de Biotechnologie des Plantes (Universidad de Paris Sud), desarrollamos el siguiente protocolo (Jacquot *et al.*, 1995): las células correspondientes a 5 l de cultivo se resuspenden en 60 ml de tampón de resuspensión (Tris-HCl 30 mM pH 8, 2-mercaptoetanol 1,4 mM y EDTA 1 mM) y se pasan tres veces a través de una prensa French a 60 MPa. A partir de este momento y durante todo el proceso de purificación se trabaja en frío. El material insoluble se elimina por centrifugación 30 minutos a 50.000 xg y el sobrenadante se somete a un tratamiento térmico: 60° C 5 minutos. Las proteínas desnaturalizadas se precipitan por centrifugación 20 minutos a 50.000 xg y el sobrenadante es fraccionado con sulfato amónico al 35% y a saturación al 85% , tras lo cual, las proteínas precipitadas se resuspenden en 50 ml de tampón acetato sódico 50 mM pH 5,5 y se dejan dializando durante toda la noche frente a 5 l del mismo tampón. A continuación, la muestra es cargada en una columna de intercambio iónico DEAE Sephacel (Pharmacia) de 2,5x20 cm, equilibrada con el tampón acetato, y se eluye a un flujo de 60 ml/h y un gradiente de ClNa de 0 a 500 mM en el mismo tampón. Las fracciones que presentan actividad FBPasa son reagrupadas y concentradas para a continuación cargarlas en una columna de gel-filtración ACA 44 (LKB) , equilibrada con el tampón acetato anteriormente descrito. Tras eluir las con el tampón acetato por acción de presión hidrostática, se concentran y distribuyen en alícuotas de 1 ml. Se almacenan a -70° C.

Para purificar las FBPasas mutantes se sigue el mismo protocolo descrito para la nativa, pero como resultan ser más inestables, se evita el tratamiento térmico.

2. Purificación de las tiorredoxinas recombinantes

Se ha seguido el protocolo descrito por Hodges *et al.* (1994) para la purificación de la tiorredoxina *f* de guisante recombinante, aunque con algunas modificaciones:

Las células correspondientes a la expresión de un cultivo de 3,2 l se resuspenden en 40 ml de Tris-HCl 30 mM pH 7,9 y se pasan a través de una prensa French a 60 MPa . A continuación, se eliminan los restos celulares por centrifugación

30 minutos a 20.000 xg y se fracciona con sulfato amónico al 40% hasta saturación al 85%. Las proteínas precipitadas son resuspendidas en 7 ml de Tris-HCl 30 mM pH 7,9 NaCl 300 mM y 2-mercaptoetanol 1,4 mM y se cargan en una columna de gel-filtración Sephadex G50 de 4,5x60 cm. Se eluyen con 800 ml del mismo tampón a un flujo de 1,5 ml/minuto. Las diferentes fracciones fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (consultar el apartado XI.2) y las que contenían la tiorredoxina fueron concentradas y recromatografiadas en las mismas condiciones. Finalmente, las alícuotas que contenían tiorredoxina *f* pura, fueron concentradas y distribuidas en alícuotas de 1 ml.

La tiorredoxina *m*, a diferencia de la *f*, es bastante termorresistente (Agostino y Hatch, 1993) por eso, para purificar la tiorredoxina *m* de guisante recombinante se introduce un paso adicional: tras centrifugar el extracto celular prensado, se incubaba a 84° C durante 10 minutos. No se aprecia pérdida de actividad y sí se logra una precipitación selectiva de gran parte de las proteínas contaminantes. Esto se traduce en que con un solo pase por la columna Sephadex G50 se obtiene la proteína purificada a homogeneidad.

El híbrido *m/f* es también termorresistente, pero manifiesta una gran tendencia a la agregación. Como consecuencia de ello, se calienta el extracto a 70° C durante 10 minutos y, tras centrifugar para eliminar las proteínas desnaturalizadas, el sobrenadante se concentra por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 90%. Antes de cargar en la columna, se dializa frente a tampón Tris-HCl 30 mM pH 7,9 NaCl 500 mM y 2-mercaptoetanol 1,4 mM. Se continúa según lo descrito para la tiorredoxina *f*.

No ha sido posible purificar a homogeneidad el híbrido *f/m*. De acuerdo con consideraciones teóricas (Wilkinson *et al.*, 1991) es muy probable que aparezca formando cuerpos de inclusión, por eso se ha seguido el protocolo descrito por Aguilar *et al.* (1992): tras prensar, los cuerpos de inclusión se recoge por centrifugación a 20.000 xg durante 10 minutos. Se resuspenden suavemente durante 10 minutos en 10 ml de tampón de desnaturalización (Tris-HCl 50 mM pH 7,3 urea 1 M y EDTA 10 mM). Se centrifuga y se repite el proceso 3 veces con tampón de desnaturalización y dos veces con agua destilada fría para lavar. A continuación se solubilizan en 25 ml de tampón de solubilización ($\text{PO}_4\text{HK}_2 / \text{PO}_4\text{K}_3$ 50 mM pH 10,5 EDTA 1 mM), agitando suavemente a temperatura ambiente durante 4 horas, tras las cuales se centrifuga para eliminar el material insoluble. Finalmente, se dializa 24 horas frente a 1 l de tampón de diálisis (Trietanolamina-acetato 20 mM pH 7) a temperatura ambiente y otras 24 horas más frente a otro litro del mismo tampón a 4° C.

XI. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

1. Cuantificación

Se utiliza el kit de Bio-Rad basado en el cambio de color de un colorante en función de la concentración de proteína presente en el medio (Bradford, 1976). La sensibilidad es del orden de $1\mu\text{g}$, análoga a la del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y, aunque ésta varía para diferentes proteínas de forma más acusada que en el método de Lowry, presenta numerosas ventajas frente a él, entre las que cabe destacar:

- Mayor facilidad de uso, pues solo requiere un reactivo y cinco minutos.
- El tiempo de incubación no es crítico a la hora de medir ya que el complejo colorante-proteína es bastante estable.
- Es compatible con la mayoría de los tampones que habitualmente se emplean, siendo minoritarios los que provocan interferencia.

Siempre se ha seguido el protocolo indicado para soluciones de proteína de concentración menor a $25\mu\text{g/ml}$ (microensayo). Se prepara una solución madre de albúmina sérica bovina de 500 mg/l . A partir de esta solución madre se preparan soluciones patrón que contengan $0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10$ y $25\mu\text{g/ml}$ en el mismo tampón en el que estén las proteínas que se pretende cuantificar. A continuación, a $800\mu\text{l}$ de las soluciones patrón o de las soluciones problema convenientemente diluidas (para que la concentración de proteína sea menor de $25\mu\text{g/ml}$) se les adicionan $200\mu\text{l}$ de la solución colorante sin diluir (azul coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol) y se agitan bien. Se esperan 5 ó 10 minutos y se mide en el espectrofotómetro a 595 nm . El color es estable durante 1 hora. El ensayo se hace por triplicado y la concentración de proteína de las muestras es la media de las interpolaciones en la recta de regresión de la A_{595} frente a la concentración de proteína patrón.

2. Electroforesis

Para controlar los diferentes pasos de las purificaciones, así como para determinar los pesos moleculares y puntos isoelectrónicos, se realizaron electroforesis en geles de acrilamida.

a. SDS-PAGE

La electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Lacmmli, 1970; Starita-Geribalde *et al.*, 1993) fue la técnica empleada como control de pureza, para determinar pesos moleculares y como primer paso en el Western blotting. Se ha utilizado el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad), con el cual, a pesar del pequeño tamaño de los geles (7 x 8 cm y 0,75 mm de grosor), se obtienen buenas separaciones con un ahorro de tiempo considerable.

Los geles separadores se preparan al 12,5% cuando se trabaja con FBPasas y al 15% para las tiorredoxinas y proteínas híbridas. El concentrador, en ambos casos, al 4%. En la tabla se detallan las proporciones para la elaboración de los geles:

	concentrador		separador
	15%	12,5%	4%
Agua destilada	2,35 ml	3,35 ml	6,1 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	—
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	—	—	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
Acrilamida/Bis 30% ¹	5 ml	4 ml	1,3 ml
Persulfato amónico al 10% ²	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED ³	5 µl	5 µl	10 µl

1. Solución de acrilamida al 29,2% y N,N'-metilbisacrilamida al 0,8%

2. Extemporáneo

3. N,N,N',N'-tetrametilendiamina

La muestra se diluye 1: 4 en tampón de carga (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 glicerol 0,1% (v/v), SDS 0,5% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v), 2-mercaptoetanol 50 mM) hasta un volumen final de 25 µl. A continuación se incubó 5 minutos a 95°C y se cargan 20 µl. La electroforesis se corre en tampón Tris 25 mM Glicina 192 mM pH 8,3 y SDS 0,1% (p/v) a 200 V (voltaje constante) entre 45 minutos y 1 hora.

En función de la cantidad de proteína que se hubiese cargado y de la sensibilidad deseada, el gel se teñía con plata o con azul coomassie.

Tinción con Coomassie.- Se tiñe durante 30 minutos en una solución de azul Coomassie R-250 al 0,1% en solución fijadora (metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)). Para decolorar se incuba durante 1-3 horas en solución fijadora, con frecuentes cambios de solución para eliminar el colorante extraído (Garfin, 1990). Se detectan bandas con una concentración de proteína del orden de 0,1-1 μ g, por lo que se empleó para seguir los diferentes pasos de las purificaciones.

Tinción de plata.- Se incuba 30 minutos con solución fijadora (metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) y formaldehído al 37% 0,5 ml/l), tras los cuales se lava dos veces con etanol al 50% durante 10 minutos. Posteriormente se trata con una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,8 mM durante 1 minuto y se lava con abundante agua destilada 3 veces 20 segundos. Se incuba con la solución de impregnación (NO_3Ag 11,8 mM y formaldehído al 34% 0,75 ml/l) durante 10 minutos y se lava con agua destilada 2 veces 20 segundos. A continuación se trata con la solución de revelado (CO_3Na_2 0,723 M, formaldehído al 37% 0,5 ml/l y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 16 μ M) hasta que aparezcan las bandas. Por último, se lava con agua destilada varias veces y se para la reacción con solución de parada (metanol 50% (v/v) y ácido acético 12% (v/v)). Se detectan bandas con una concentración de proteínas del orden de 10-100 ng (Merril *et al.*, 1984; Blum *et al.*, 1987).

b. Isoelectroenfoque

Las experiencias de isoelectroenfoque para determinar el punto isoelectrónico de las proteínas recombinantes se realizaron en el sistema LKB 2117 Multiphor, diseñado para electroforesis horizontal, empleado geles de rango de pH 3,5 - 9,5. Al objeto de lograr una resultados reproducibles, los geles y todas las soluciones fueron adquiridas a la casa LKB y el protocolo seguido fue el indicado por el fabricante:

Sobre el gel, una vez eliminado del plástico protector y colocado sobre la placa refrigerante, se colocan dos tiras de papel de filtro sobre las que se aplica la solución del cátodo (NaOH 1M) y la del ánodo (H_3PO_4 1M) respectivamente. A continuación, papelitos de filtro impregnados con 10-20 μ l de muestra se depositan sobre el gel a 1-3 cm del cátodo, se conecta el sistema y se programa según lo indicado por el fabricante para el rango de pH 3,5 - 9,5: 1500 V, 50 mA, 30 W y 1,5 horas.

Tras finalizar el programa, se retiran los papeles de filtro empapados en las soluciones de electrodos y las muestras, y el gel se sumerge en solución de fijación (ácido sulfosalicílico 0,2 M y ácido tricloroacético 0,7 M) entre media y una hora. Se preincuba una hora en solución de decoloración (etanol 25 % (v/v) y a. acético 8% (v/v)) para eliminar los restos de anfolinas y ajustar el pH al de la solución de tinción (azul Coomassie al 0,115 % en solución de decoloración). Posteriormente se incuba

con solución de tinción durante 10 minutos a 60° C y se decolora lavando con solución de decoloración.

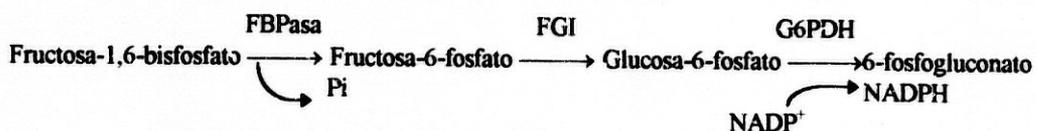
En alguna ocasión se realizó tinción de plata. El protocolo seguido es el mismo descrito para SDS-PAGE, pero hay que realizar un pretratamiento con solución de fijación descrita en el párrafo anterior durante 1 hora y lavar durante 2 horas con a. tricloroacético 0,7 M en metanol al 30% (v/v). Posteriormente se continua con el protocolo de tinción de plata lavando con etanol al 50% (v/v).

3. Determinación de actividades enzimáticas

Los valores de actividades enzimáticas se expresan en unidades internacionales (UI), definidas como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto en unas condiciones de reacción determinadas. En preparados enzimáticos no puros, la concentración de enzima puede ser expresada en términos de unidades por ml de preparado o como actividad específica (unidades por mg de proteína). La actividad se determinó como el incremento por minuto de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (modelo lambda).

a. Actividad de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica

La determinación de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cloroplastídica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lázaro *et al.* (1974), basado en la reducción de NADP^+ en exceso de Mg^{2+} (10 mM) y en presencia de las enzimas auxiliares fosfoglucoasa isomerasa (FGI) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), según la secuencia de reacciones acopladas:



Se combinan entre 10 y 20 μl del preparado enzimático con mezcla de reacción (Tris-HCl pH 8,8 EDTA, Cl_2Mg , NADP, fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), FGI y G6PDH) y se ajusta el volumen a 1 ml con agua destilada para que las concentraciones presentes en el ensayo sean: Tris-HCl 100 mM pH 8,8 EDTA 0,5 mM, Cl_2Mg 10 mM, NADP 0,3 mM, FBP 0,6 mM, FGI 1,4 UI y G6PDH 0,7 UI. Se mide la variación de la absorbancia a 340 nm por minuto.

b. Activación de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa por Tiorredoxinas

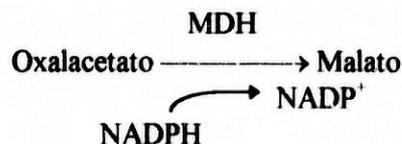
Se siguió el protocolo descrito por Prado *et al.* (1992). El ensayo se basa en que a pH 7,9 la FBPasa no es activa a no ser que previamente sea reducida por un donador de equivalentes de reducción. En este ensayo, la tiorredoxina, tras ser reducida por el DTT (Herting y Wołoskiuk, 1980), actúa como agente reductor, cediendo equivalentes de reducción a la FBPasa y activándola. Como el DTT (ditiotreitól) también puede actuar directamente sobre la FBPasa, hay que realizar un blanco sin tiorredoxina y restarlo a los valores activación obtenidos.

El ensayo se realiza en dos pasos:

1. Activación: en un volumen final de 100 μ l se incuban tiorredoxina y FBPasa en mezcla de incubación (Tris-HCl pH 7,9 100 mM, DTT 2,5 mM, FBP 0,4 mM Cl_2Ca 0,05 mM), durante 10 minutos a 20°C.
2. Catálisis: transcurridos los 10 minutos de activación, la mezcla se pasa a una cubeta con 900 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 7,9 Cl_2Mg 1 mM, FBP 0,36 mM, EGTA (ácido etilenglicol- bis(β -aminoetil éter)-N.N.N',N'-tetraacético) 0,02 mM, NADP 0,3 mM, FGI 1,4 UI y G6PDH 0,7 UI. Se mide la variación de la absorbancia por minuto a 340 nm.

c. Actividad de la Malato deshidrogenasa

La determinación de la actividad NADP-MDH se basa en la cuantificación de la oxidación del NADPH al catalizar el enzima la reducción de oxalacetato a malato (Johnson *et al.*, 1987):



Se opera de manera análoga a como se describió para la actividad de la FBPasa, pero la composición de la mezcla de reacción es Tris-HCl 100 mM pH 7,9 oxalacetato 1,7 mM, EDTA 0,5 mM, NADPH 0,3 mM.

d. Activación de la Malato deshidrogenasa por Tiorredoxinas

En este ensayo, la malato deshidrogenasa es activada por tiorredoxina, previamente reducida por DTT, pero de manera despreciable por el DTT (Johnson *et*

al., 1987). El esquema de reacción es análogo al descrito para la activación de la FBPasa por tiorredoxina, pero los reactivos cambian:

1. Activación: en un volumen final de 100 μ l, se incuban tiorredoxina y MDH en mezcla de incubación (Tris-HCl 100 mM pH 7,9 DTT 5 mM, NADPH 0,3 mM) a 20°C 10 minutos.
2. Catálisis: tras la incubación, la mezcla de activación se transfiere a una cubeta con 900 μ l de la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl 100 mM pH 7,9 oxalacetato 1,7 mM, EDTA 0,5 mM, NADPH 0,3 mM. Se mide la variación de la absorbancia por minuto a 340 nm.

e. Determinación de parámetros cinéticos y análisis de la cooperatividad

Al objeto de minimizar los errores consecuencia de la preparación de las mezclas de activación y de catálisis, cada curva se repitió completamente varias veces en el transcurso de diferentes días. Realizamos diferentes tipos de representaciones gráficas para analizar los parámetros cinéticos y la existencia de cooperatividad (I.H. Segel, 1975):

- a. La representación de la variación por minuto de absorbancia a 340 nm frente a la concentración de modulador o sustrato nos permitió determinar la velocidad máxima y la concentración de saturación de modulador/sustrato.
- b. La representación del inverso de las variaciones de absorbancia frente al inverso de la concentración de modulador/sustrato nos dio una idea de la cooperatividad. Cuando el resultado es una recta, la cinética es michaelina y no hay cooperatividad. En este caso la recta corta a los ejes de ordenadas y abscisas en los puntos $1/V_{max}$ y $-1/K_m$ respectivamente.
Si existe cooperatividad positiva, la recta tiende a la horizontalidad a medida que se aproxima al origen de coordenadas. Si la cooperatividad es negativa, la curva muestra una tendencia a la verticalidad. En estas circunstancias no se puede calcular los valores de V_{max} y K_m a partir de la representación de inversos.
- c. Una opción para hacer que los datos de una cinética se ajuste a una recta es realiza una representación de $\log [V/(V_{max}-V)]$ frente a $\log [S]$. La ecuación de la recta resultante es:

$$\log [V/(V_{max}-V)] = n_H \log [S] - \log K' \text{ (ec. de Hill en forma logarítmica)}$$

siendo: n_H el coeficiente de Hill $n_H > 1$ cooperatividad positiva,

$n_H < 1$ cooperatividad negativa

K' una constante una constante que engloba factores de interacción.

El índice de Hill está relacionado con el número mínimo de sitios de unión del modulador/sustrato al enzima y K' está relacionada con $S_{0,5}$ según $K' = [S_{0,5}]^{nH}$

- d. La representación de Scatchard permite analizar la cooperatividad. Si cuando se representa $V/[S]$ frente V el resultado es una recta, no existe cooperatividad. Cuando lo que se obtiene es una curva cóncava, la cooperatividad es negativa. Si es convexa la cooperatividad es positiva.

4. Técnicas inmunológicas

a. Western blotting

La transferencia se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Towbin *et al.* (1979) y posteriormente por Gershoni y Palade (1983), aunque con algunas modificaciones. Se empleó el equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), perfectamente compatible con el Mini-Protean (Bio-Rad).

Tras realizar la electroforesis de las muestras en SDS-PAGE en geles al 12,5%, (consultar apartado XI.2.a), se corta la membrana de nitrocelulosa y gel y membrana se incuban 15 minutos en tampón de transferencia (Tris 25 mM Glicina 192 mM pH 8,3 y Metanol 20% (v/v)). Se monta el equipo de manera que la membrana quede en el ánodo y el gel en el cátodo y se realiza la transferencia a 100 V durante 1 hora.

Una vez finalizada la transferencia se comienza con la inmunodetección: se bloquea con 5 ml de TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,9 y NaCl 150 mM) suplementado con leche desnatada al 5 % a temperatura ambiente y agitación durante 30 minutos o a 4° C toda la noche. Se continúa con el proceso tal y como se describió en el apartado IV.3.

Cuando se deseaba incrementar la sensibilidad del medio se recurría a la detección por quimioluminiscencia. El protocolo es básicamente el mismo, pero la dilución de anticuerpo secundario (anti-IgG peroxidasa) es 1/4.000 en lugar de 1/1.000. La composición del reactivo de revelado (fotosensible) es: 8 mg luminol (Boehringer Mannheim) en 20 ml Tris-HCl 50 mM pH 8,6 y NaCl 150 mM. Justo en el momento de revelar se adicionaban 200 µl de 4-yodofenol al 1% en dimetil sulfóxido y 3,2 µl de H_2O_2 . Se incubaba la membrana con esta solución durante 2 ó 3 minutos y, tras escurrirla bien, se envuelve con plástico de cocina y se expone a una película para auto-radiografía Hyperfilm MP (Amersham) en un cassette de Kodak. Si la luminiscencia es visible, con 2 ó 3 segundos de incubación es suficiente. En caso

contrario, con 15 ó 30 minutos se obtiene una buena señal. Por último, la película se revela utilizando métodos estándar.

b. ELISA

El protocolo empleado es básicamente el descrito por Hermoso *et al.* (1987). Se realizó en placas microtiter de 96 pocillos y fondo plano (Dinatech Laboratories, Inc.).

En cada pocillo, se incuban 200 μ l de diluciones seriadas de la muestra en tampón de fijación ($\text{CO}_3\text{Na}_2/\text{HCO}_3\text{Na}$ 50 mM pH 9,6 y N_3Na 0,02% (p/v)) durante 3 horas a 37° C. A continuación se realizan tres lavados de 3 minutos cada uno con 300 μ l por pocillo de PBST ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$ 20 mM pH 7,4 NaCl 154 mM, Tween 20 0,05 (v/v)) y se bloquea con 300 μ l por pocillo de PBSTA (PBST suplementado con albúmina sérica bovina al 0,1%) 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, tras eliminar el PBSTA pero sin lavar, se adicionan 200 μ l por pocillo de una dilución 1/1.000 del anticuerpo primario en PBSTA y se incuba 1 hora a 37° C. Se lava tres veces con PBST como se describió anteriormente y se incuba 1 hora a 37° C con 200 μ l por pocillo de una dilución 1/1.000 del anticuerpo secundario en PBSTA. Se lava de nuevo con PBST tres veces y se adicionan 200 μ l por pocillo de solución de sustrato (extemporánea): 10 mg de o-fenilendiamina (tóxica) en 25 ml de tampón citrato/fosfato 0,1 M pH 5, suplementado con 10 μ l de H_2O_2 justo al revelar. Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción se para adicionando 100 μ l por pocillo de SO_4H_2 4 N y se lee la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Titertek Multiskan Plus.

5. Análisis de la interacción de la Tiorredoxina con Fructosa-1,6-bisfosfatasa recombinante

Al objeto de comprobar hasta que punto había interacción entre la FBPasa y las tiorredoxinas se siguió el siguientes protocolos:

a. Mediante FPLC

En un volumen final de 120 μ l, se incuban la FBPasa y la tiorredoxina en una relación estequiométrica 1:8 durante 10 minutos a temperatura ambiente en tampón de incubación (Tris-HCl 100 mM pH 7,9 DTT 2,5 mM FBP 0,4 mM y Cl_2Ca 0,05 mM). Posteriormente, se cargan en una columna Superosa 12 (1x30 cm)

conectada a un FPLC (Pharmacia) y se eluye a un flujo de 0,4 ml/min con el tampón de incubación. Se recoge en fracciones de 100 μ l y se ensaya actividad en las siguientes dos condiciones (consultar apartados XI.3.a y XI.3.b):

- a. Medida de la actividad FBPasa a pH 8,8 y en presencia de exceso de Mg^{2+} (10 mM).
- c. Medida de actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina si adicionar tiorredoxina *m* exógena.

En experiencias previas pasamos la FBPasa y tiorredoxina solas, y localizamos las fracciones en que salen ambas enzimas midiendo actividad FBPasa dependiente de tiorredoxina al objeto de verificar que el paso por la columna no las inactiva ni origina la formación de agregados.

b. Mediana ELISA

Se preparan soluciones madre de las tiorredoxinas *m*, *f* y del híbrido *m/f* en tampón de fijación de ELISA y se fijan a la placa de ELISA 200 μ l de diluciones seriadas 1:2 de las mismas para que la concentración de tiorredoxina por pocillo sea de 60 ng a 1,875 ng. Se deja toda la noche a 4° C. Tras bloquear con PBSTA, se incuba 1 hora a 37° C con 200 μ l de diferentes soluciones de FBPasa en tampón de fijación (Tris-HCl 100 mM pH 7,9 DTT 2,5 mM FBP 0,4 mM y Cl_2Ca 0,05 mM) para que las relaciones FBPasa:Td queden como sigue: 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1/1 y 1/0,5. Se lava tres veces con PBST y se incuba 1 hora a 37° C con 200 μ l de una solución 1/1000 de anticuerpo anti-FBPasa. Se sigue la ELISA como se describió en el apartado XI.4.b

XII. SOPORTE INFORMÁTICO

La informática ha jugado un papel fundamental en el desarrollo del presente trabajo, pues con la ayuda de ella hemos analizado los resultados de las experiencias de secuenciación y hemos podido predecir el comportamiento y modelar las moléculas con las que hemos trabajado. Hemos utilizado los siguientes tres tipos de software (Bishop y Rawling, 1987; Gribskov y Devereux, 1991):

1. GCG Sequence Analysis Software Package (Universidad de Wisconsin).- Es un paquete de programas para grandes ordenadores conectados a redes. Accedimos a él a través de la cuenta que tenemos en SAMBA (Samba.cnb.uam.es) y hemos usado las siguientes opciones:

1.a. SeqEd

Es un editor interactivo que permite introducir y modificar secuencias. Las secuencias pueden ser introducidas desde el teclado de la terminal o bien empleando un Graf/Bar Digitizer.

1.b. PileUp

Crea alineamientos de hasta 300 secuencias de una longitud máxima de 5000 caracteres, empleando para ello una simplificación del método de Feng y Doolittle (1987). Comienza alineando las dos secuencias más similares, creando un *cluster* de dos secuencias alineadas. Este *cluster* es a continuación alineado con la siguiente secuencia o *cluster* más homólogo, repitiendo la operación hasta lograr agrupar todas las secuencias en un alineamiento de mayor a menor homología.

1.c. Map

Crea un mapa de restricción de una secuencia dada y la traduce según las seis posibles pautas de lectura. Se pueden seleccionar tanto las enzimas de restricción como el tipo de pauta de lectura que debe seguir para la traducción.

1.d. Motifs

Comprueba si alguna de las claves (*motifs*) definidas en el *PROSITE Dictionary of Protein Site an Patterns* (Bairoch, 1989 y 1990) está presente en la secuencia que se esté estudiando. Al final presenta una reseña bibliográfica actualizada de cada una de las claves encontradas en la secuencia.

1.e. StringSearch

Permite buscar secuencias en los bancos de datos GenBank, EMBL, SwissProt, PIR-Protein, PIR-Nucleic y VecBase. La búsqueda se puede realizar introduciendo el nombre del organismo, del gen ... y el resultado es un fichero en el que aparecen los nombres de las secuencias encontradas junto a una breve descripción de las mismas y el código de acceso.

1.f. Fetch

Copia un fichero de un banco de datos en el directorio de trabajo, haciendo posible visualizarlo en la pantalla de la terminal. Puede introducirse un nombre genérico (ej.: Hum* implica que buscará en todos los bancos de datos las secuencia que comiencen por Hum- y las copiará), o bien el código de acceso de una secuencia concreta.

1.g. PeptideStats

Da un breve resumen estadístico de la composición de una secuencia aminoacídica y calcula la masa molecular, el punto isoelectrico del péptido y ϵ_{280} . Para calcular el pK_a , asume que todos los aminoácidos ionizables (Cys, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Tyr) son accesibles al medio y que los valores de pK_a de cada uno de ellos no está alterado por los aminoácidos adyacentes. Debido a ello, el punto isoelectrico teórico puede diferir del experimental.

El cálculo del coeficiente de extinción se realiza de manera análoga al punto isoelectrico: los residuos son considerados aminoácidos individuales y el coeficiente de extinción es la suma de los coeficientes de esos residuos (Trp, Tyr, y Cys debido al puente disulfuro). Se asume el mismo principio que para el punto isoelectrico: el entorno que rodea a estos aminoácidos no afecta a su coeficiente de absorción, pero cuando se comparan los valores experimentales con las predicciones se comprueba que los errores mayores del 15% son poco frecuentes (Gill y Hippel, 1989).

2. PC-Gene (Intelligenetics Inc)

Programa para PC que recoge gran número de algoritmos comerciales. Hemos utilizado los siguientes:

2.a. SOAP

Permite evaluar la hidropatía de una secuencia aminoacídica usando el método de Kyte y Doolittle (1982), el cual se basa en la combinación de escalas establecidas de forma experimental (medida de la energía libre de transferencia de compuestos modelos desde fases acuosas a diferentes fases polares) y otras estadísticas (basadas en las preferencias de los diferentes aminoácidos por situarse en zonas expuestas u ocultas de estructuras proteicas conocidas). En cada posición se calcula la hidrofobicidad media de los aminoácidos incluidos en una ventana de extensión predeterminada (9 aminoácidos en nuestras experiencias). También puede predecir, por el método de Klein *et al.* (1985), si una proteína de membrana es periférica o integral, y en éste último caso predecir los fragmentos transmembrana.

2.b. Flexipro

Basado en el algoritmo descrito por Karplus y Schulz (1985), mide la flexibilidad de la cadena en función de factores de temperatura atómica (valores B o factores de Debye-Waller) de los átomos de carbono α . Los valores B representan una medida del desplazamiento de cada átomo de su posición media determinada en 31 proteínas de estructura tridimensional conocida con una resolución mayor o igual a 0,3 nm, de más de 30 residuos y una identidad menor del 50% entre ellas. Definen el parámetro B normalizado medio de manera que valga 1 para todas las proteínas y clasifican los aminoácidos en rígidos y flexibles en función de que el parámetro B normalizado sea menor o mayor de 1 respectivamente. Aplicando este criterio determinaron los valores B normalizados para residuos sin aminoácidos rígidos adyacentes y con uno o dos aminoácidos rígidos adyacentes. Estos valores son utilizados para predecir la flexibilidad relativa de una determinada cadena en una posición n a partir de la suma ponderada de los valores B normalizados para las posiciones $n-3$ a $n+3$.

2.c. Antigen

Los determinantes antigénicos corresponden a zonas exteriores de la molécula expuestas al medio, por lo que estarán constituidas básicamente por aminoácidos hidrófilos. Según esto, basándose en el método descrito por Hopp y Woods (1981),

el programa asigna a cada aminoácido un valor de hidrofiliidad y luego hace un promedio de la hidrofiliidad de la cadena. El punto de mayor hidrofiliidad media corresponde o está en las proximidades de un determinante antigénico. Se ha empleado un tamaño de ventana de 6 aminoácidos para hacer los cálculos de hidrofiliidad media.

3. Servidores

Los servidores son ordenadores que poseen un software que les permite recibir y responder automáticamente a los mensajes que reciban por E-mail (Smith, 1993). Hemos recurrido a los siguientes servidores:

3.a. PredictProtein E-MAIL PDH

El servidor está localizado en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg y trabaja sobre alineamientos de secuencias en lugar de sobre secuencias individuales (Rost *et al.*, 1994).

Da una predicción de estructura secundaria de la secuencia basada en tres estados: α -hélice (α -hélice, estructuras 3_{10} y π -hélice), lámina β y loop (*turns*, B (residuos aislados de estructura β), *bends* y *coil*). Se envía la secuencia del péptido cuya estructura secundaria se desea conocer al servidor PredictProtein@EMBL-Heidelberg.DE (Rost *et al.*, 1994) y se recibe vía E-mail la predicción junto a datos relativos al alineamiento y a los residuos cuya fiabilidad de predicción es del 83%. Hay que destacar que el método ha sido ideado para proteínas globulares hidrosolubles. La probabilidad de predicción correcta para α -hélice es del 72 % y del 57 % para lámina β , siendo del 72,1% la probabilidad de predicción correcta para la secuencia completa.

Durante el proceso, el servidor realiza una búsqueda de secuencias homólogas y, mediante los programas HaxHom y HSSP (Sander y Schneider, 1991) las alinea con la proteína cuya estructura va a determinar. Sobre este bloque de secuencias alineadas, mediante algoritmos, el programa PDHsec (Rost y Sander, 1993a, 1993b) realiza una predicción de estructura secundaria de acuerdo con la estructura primaria. A continuación hace una predicción de estructura secundaria en base a estructura secundaria: refina la predicción filtrando lo predicho en el paso anterior para eliminar artefactos (como un residuo en α -hélice en medio de una estructura β). Finalmente, de todas las posibles predicciones, en función de varios ajustes, selecciona la que obtiene mejor puntuación, que es la que devuelve.

3.b. Swiss-Model Server

El servidor está localizado en el GLAXO Institute for Molecular Biology (GIMB) de Ginebra y, en principio, el único requerimiento para modelar una proteína es que exista otra, cuya estructura tridimensional sea conocida, lo más parecida posible. El resultado final está directamente relacionado con el grado de identidad entre ambas. Todo el proceso se puede resumir en 7 pasos:

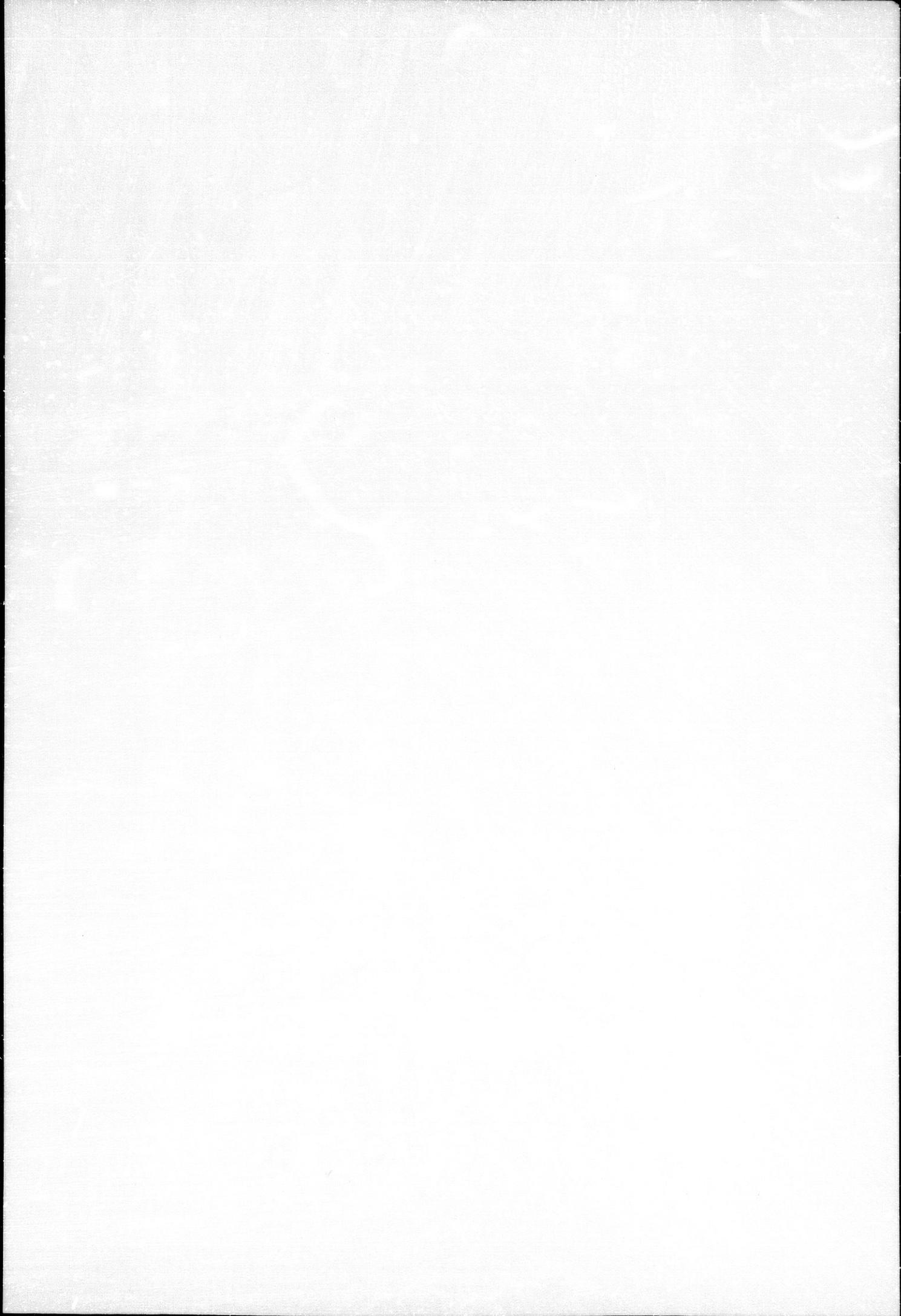
1. Superposición de las estructuras tridimensionales que presentan homología con la secuencia que se pretende modelar.
2. Alineamiento de dicha superposición con la secuencia a modelar.
3. Generación de un principio de esqueleto de la secuencia a modelar sobre la base del alineamiento del paso anterior.
4. Reconstrucción del esqueleto eliminando los *loops*.
5. Generación del esqueleto definitivo.
6. Corrección y reconstrucción de las localizaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos.
7. Verificaciones y refinamiento del modelo.

Puede trabajar a dos niveles: *First Approach mode* (se envía una secuencia que el ordenador alinea con las que aparecen en el banco de datos de proteínas y ácidos nucleicos cristalizadas PDB) y *Optimise mode* (lo que se envía es la secuencia previamente alineada con las secuencias que se consideren de interés). En ambos casos, el modelo es construido por el programa ProMod (Peitsch y Jongeneel, 1993) solo si el alineamiento es lo suficientemente bueno. Accedimos a Swiss-Model a través de Internet en la siguiente dirección: <http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html> y trabajamos en el primer nivel.

El modelo es visualizado con la ayuda del programa Rasmol Molecular Graphics Windows v 2.5, obtenido via FTP en la dirección:

<ftp://ftp.dcs.ed.ac.uk/pub/rasmol>

El programa lee ficheros de coordenadas y los transforma en diferentes tipos de representaciones de moléculas, mostrando características tales como estructura secundaria, puentes disulfuros, puentes de hidrógeno...



RESULTADOS

I. CLON DE LA TIORREDOXINA *m* DE GUISANTE

1. Aislamiento del clon de la Tiorredoxina *m*

Se rastrearon independientemente 6 alicuotas de título del orden de 10^6 ufp/ml (unidades formadoras de placas de lisis por ml) de la genoteca de ADNc de guisante (consultar Materiales y Métodos I.1 y IV) con anticuerpos policlonales anti-Td *m* de guisante. Tras resiembras sucesivas de los clones positivos, según se esquematiza en la **Tabla I**, se aislaron 5 clones que eran reconocidos por los anticuerpos anti-Td *m*.

Los numerosos intentos de separación de los insertos de ADNc del vector lambda gt11 por digestión con Eco RI resultaron infructuosos. Ésto, unido al hecho de que similar problema se le presentó al Dr. Carrasco en el aislamiento y subclonación de la FBPasa cloroplastídica de guisante, nos hizo pensar que tal vez en la construcción de la genoteca se alteró el sitio Eco RI, no siendo éste reconocido por el enzima.

Como alternativa a la digestión con Eco RI, amplificamos por PCR los insertos de ADNc, empleando para ello los cebadores lambda gt11 normal y reverso (Materiales y Métodos VII.3). En la **Fot. 1** se muestran los insertos de los clones aislados, oscilando sus tamaños entre las 0,85 Kb del T₂ y 1,1 Kb del T₅.



Fot. 1.- Insertos de ADNc que codifican péptidos reconocidos por anti-Td*m*

I. CLON DE LA TIORREDOXINA *m* DE GUISANTE

1. Aislamiento del clon de la Tiorredoxina *m*

Se rastrearon independientemente 6 alicuotas de título del orden de 10^6 ufp/ml (unidades formadoras de placas de lisis por ml) de la genoteca de ADNc de guisante (consultar Materiales y Métodos I.1 y IV) con anticuerpos policlonales anti-Td *m* de guisante. Tras resiembras sucesivas de los clones positivos, según se esquematiza en la **Tabla I**, se aislaron 5 clones que eran reconocidos por los anticuerpos anti-Td *m*.

Los numerosos intentos de separación de los insertos de ADNc del vector lambda gt11 por digestión con Eco RI resultaron infructuosos. Ésto, unido al hecho de que similar problema se le presentó al Dr. Carrasco en el aislamiento y subclonación de la FBPasa cloroplastídica de guisante, nos hizo pensar que tal vez en la construcción de la genoteca se alteró el sitio Eco RI, no siendo éste reconocido por el enzima.

Como alternativa a la digestión con Eco RI, amplificamos por PCR los insertos de ADNc, empleando para ello los cebadores lambda gt11 normal y reverso (Materiales y Métodos VII.3). En la **Fot. 1** se muestran los insertos de los clones aislados, oscilando sus tamaños entre las 0,85 Kb del T₂ y 1,1 Kb del T₅.



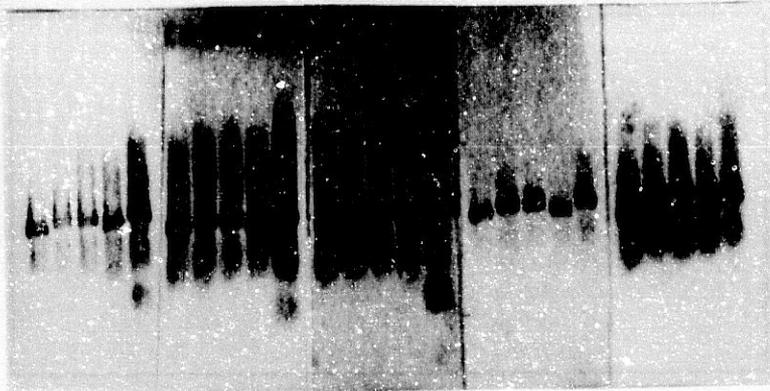
Fot. 1.- Insertos de ADNc que codifican péptidos reconocidos por anti-Td*m*

RESULTADOS

Alicuota ¹	1ª Resiembra	2ª Resiembra	3ª Resiembra	Clon ²
1 (+)	1.1 (+)	1.1.1 (+)	1.1.1.1 (++)	T ₁
	1.2 (+)	1.2.1 (++)		T ₂
		1.2.2 (+)	1.2.2.2 (++)	
2 (+)	2.1 (-)	—	—	—
	2.2 (-)	—	—	—
3 (+)	3.1 (+)	3.1.1 (+)	3.1.1.1 (++)	T ₄
	3.2 (+)	3.2.1 (+)	3.2.1.1 (++)	T ₅
4 (-)	—	—	—	—
	5.1 (+)	5.1.1 (-)	—	—
5 (+)	5.2 (-)	—	—	—
	5.3 (-)	—	—	—
6 (-)	—	—	—	—

TABLA I.- Esquema del proceso seguido para rastrear la genoteca. (1) Los pasos en los que no aparecieron calvas positivas se han señalado con (—) cuando aparecieron positivas y negativas con (+) y cuando solo aparecieron positivas con (++) (2) Denominación final de los clones aislados.

Como ya se describió en la Introducción, la mayoría de las tiorredoxinas tienen una masa molecular en torno a 12 kDa., lo que traducido a aminoácidos equivale a 109-110, es decir, el tamaño del ADNc que codifica la tiorredoxina *m* esperado era del orden de 330 pb. Por ello, tratamos de caracterizar en la medida de lo posible los clones aislados antes de iniciar la secuenciación sistemática de los mismos, hibridándolos entre ellos y expresándolos para hacerles un Western blotting. En la **Fot. 2** se muestra el resultado de hibridar cada clon marcado con ³²P con él mismo y los restantes (Materiales y Métodos VIII.1) al objeto de identificar falsos positivos o



Fot 2.- Resultado de hibridar cada clon con los demás y consigo mismo.

clones que codificasen solo parte de la tiorredoxina *m*. Se comprueba que todos reconocen a todos, o lo que es igual, que todos codifican lo mismo.

Como un paso más de caracterización, se expresaron todos ellos en *E. coli* Y1090 y se realizó un Western blotting de los lisados (Materiales y Métodos IX.1 y XI.4.a), apareciendo en todos los casos una banda reconocida por los anticuerpos anti-Td *m* a la misma altura que la correspondiente a la tiorredoxina *m* purificada de hoja de guisante.

A partir de los resultados de la caracterización, decidimos comenzar a trabajar con el clon T₃, por ser uno de los de mayor tamaño (del orden de 1 Kb) y presentar mejor reconocimiento con los anticuerpos en el Western blotting.

2. Subclonación y secuenciación del clon T₃

Se decidió subclonar en el sitio Eco RI del vector pTZ18R (Materiales y Métodos III), porque los clones no presentaban sitios de restricción para dicha enzima. Previamente a la subclonación hubo que generar un sitio Eco RI en ambos extremos del clon T₃. Para ello se ligaron los extremos romos del clon T₃ con los del adaptador Eco RI de la casa Promega. Al plásmido recombinante se le denominó pT3.

Se realizó un mapeo de restricción de pT3, apareciendo secuencias de corte para las enzimas Hind III, Nco I y Ava II. Las dos últimas son de gran interés para apoyar la identidad tiorredoxina *m* del clon T₃, puesto que los clones de las tiorredoxinas de *E. coli* y *Anabaena sp.* (Lim *et al.*, 1988), así como los de la

mayoría de las tiorredoxinas, presentan un sitio de restricción para Ava II entre la Gly y la Pro del centro activo (W-C-G-P-C), y en el de la tiorredoxina *m* de espinaca, justo delante del centro activo (P-W-C-G-P-C), aparece un punto de corte para Nco I (Wedel *et al.*, 1992).

La mayor parte de la secuenciación se realizó mediante PCR en ambos sentidos, empleando el kit *fmol* (Promega) y marcaje fluorescente (Materiales y Métodos VII.7). A partir de la secuencia obtenida, se iban sintetizando nuevos oligonucleótidos que actuaran como cebadores, permitiendo avanzar hacia el interior del clon desde ambos extremos. De esta forma se leyeron las 853 pb correspondientes al clon T₃ que se detallan en la **Tabla II**, aunque no se pudieron resolver dos ambigüedades, el nucleótido 399, que puede ser A ó T (m) y el 792, G ó T (k).

Éstos resultados se publicaron en *Plant Physiology* (López Jaramillo *et al.*, 1994) y la secuencia se envió al banco de datos EMBL Data Library, quedando registrada con el número de acceso X76269.

3. Análisis de la secuencia del clon T₃

Cuando se tradujo la secuencia del clon T₃, se encontró que contenía un marco abierto de lectura (*open reading frame*) desde el codon de iniciación ATG (52) al de parada TGA (568) (**Tabla III**).

De acuerdo con las predicciones de ordenador, la proteína codificada tenía 172 aminoácidos y 19,15 kDa de masa molecular, 7,3 de punto isoelectrico y cero de carga. Estas predicciones estaban lejos de los 12 kDa de masa molecular esperados. Por ello, mediante el programa MOTIFS, se consultó el *Prosite Dictionary of Proteins Sites and Patterns* (A. Bairoch, 1989 y 1990), quedando confirmada la naturaleza tiorredoxina del clon T₃ (**Tabla IV**). Además, nuestros resultados encajaban plenamente con los obtenidos por Wedel *et al* (1992) para la tiorredoxina *m* de espinaca con el péptido de tránsito: 181 aminoácidos y 19,8 kDa.

RESULTADOS

```

1 1 60
ctccttcatt ttCCCAAACT ATTCAGTAGA Gttacataca cagaaaataa catggccctt
                TN1 ->

61 120
gagagcttgt ttaagagtat ccacaccaag acctcattgt ctctctccat tgtcttcac

121 180
ttcaagggaa aagcttgtct tctcacctca aaaagtagga ttcaagaaa ctttgctgaa
                Hind III

181 240
ctcaacagtt tcaactCGCT GGTGTTGCTT ATAGaaaatc acgttttgtt gcatgctcgt
                TN2 ->

241 300
gaagctgtaa atgaagtcca agtagtgaat gactcaagct gggatgaact tgtgattggc

301 360
agtgaaacac ctgtgcttgt agatttttgg gcaccatggt gtggtccatg cagaatgata
                Nco I  Ava II

361 420
gcgccataa ttgatgaatt agccaaagag tatgctggma aaattaagtg ctacaagctc

421 480
aacacagatg aatctccaaa cactgcaacg aagtatggaa tcagaagcat acciaactgtt

481 540
ctgttttca agaatggaga gagaaaagac agtgtaattg gtgcagttcc taaggctact

541 600
ctgtctgaga aagtggaaaa gtatatattga tgcattgaact gagaagaaaa gtgatactct

601 660
tatgacatgc attataatat cagaaatgaa tggatggga tggagaagaat gacaatagtg

661 720
acatgctgat ttcatttacc ccattctttt ccattgttta CAAGGCAAAG GTAGTTGtat
                <- TR1

721 780
ctttatcatc actatatgta aggttatgt ttcaatctat ggattcaaca cattgaataa

781 840
tccttgata tktcttttgt ttttcatcat tttgtaaagt ttacattgga taaacaaact

841 851
tctttcaaaa aaa

```

TABLA II.- Secuencia del clon T₃. En mayúsculas, subrayado y negrita se destacan los oligonucleótidos empleados como cebadores (la flecha indica el sentido de la secuenciación) y en negrita, cursiva y subrayado los sitios de restricción para Hind III, Nco I y Ava II. Se han suprimido los nucleótidos correspondientes a los cebadores lambda gt11 normal y reverse empleados en el PCR y los correspondientes a los adaptadores Eco RI.

RESULTADOS

TN2 →

1 ctccttcattttcccaactattcagtagagttacatacacagaaaataa

51 catggccttgagagcttgtttaagagtatccacaccaagacctcattgt
M A L E S L F K S I H T K T S L S

101 cttcctccattgtcttcattctcaagggaaaagcttgctcttcacctca
S S I V F I F K G K A C I L T S

HindIII

151 aaaagtaggattcaagaagcctttgctgaactcaacagtttcacttccgt
K S R I Q E S F A E L N S F T S L

← TN3 →

201 ggtgttgcttatagaaaatcacgttttggtgcatgctcgtgaagctgtaa
V L L I E N H V L L H A R E A V N

251 atgaagttcaagtagtgaatgactcaagctgggatgaacttgatggc
E V Q V V N D S S W D E L V I G

NcoI AvaII

301 agtgaacacctgtgcttgtagattttgggcaaccatggtggtccatg
S E T P V L V D F W A F W C G P C

351 cagaatgatagcgcctataattgatgaattagccaaagagtatgctggma
R M I A P I I D E L A K E Y A G K

401 aaattaagtgcacaagclcaacacagatgaatctccaaacactgcaacg
I K C Y K L N T D E S P N T A T

451 aatctgggaatcagaagcataccaactgttctgttttcaagaatggaga
K Y G I R S I P T V L F F K N G E

501 gagaaaagacagtgtaatgggtgcagttcctaaggctactctgtctgaga
R K D S V I G A V P K A T L S E K

551 aagtggaaaagtatatttgatgcatgaactgagaagaaaagtgatactct
V E K Y I STOP

601 tatgacatgcattataatatcagaaatgaatggaatgggatggaagaat

651 gacaatagtgacatgctgatttcatttatcccattctttccatgtctta

← TR2

701 caaggcaaggtagttgtatctttatcatcactatagtaagggttatgt

751 ttcaatctatggattcaacacattgaataatccttgatatkcttttgt

801 tttcatcattttgtaaagtttacattggataaaciaaacttctttcaaaa

851 aaa *cola*
polia

TABLA III.- Traducción de la secuencia del clon T₃.

Thioredoxin: (S,T,A)X(W,G)C(A,G.V)(P,H)C
 (A)x(W)C(G)(P)C

94: LVDFW APWCGPC RMIAP

 * Thioredoxin active site *

Thioredoxin (1 to 4) are small proteins of approximately one hundred amino acid residues which participate in various redox reactions through the reversible oxidation of an active center disulfide bond. The molecule exists either in a reduced form or in an oxidized form where the two cysteines residues are linked in an intramolecular disulfide bond. Thioredoxin is present in prokaryotes and in eukaryotes and the sequence around the redox-active disulfide bond is well conserved. Bacteriophage T4 also encodes for a thioredoxin but its primary structure is not homologous with bacterial, plant and vertebrate thioredoxins. A number of eukariotic proteins contain domains evolutionary related to thioredoxin; these proteins are described below.

- Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (5,6), which catalyzes the rearrangement of disulfide bonds in various proteins is a multifunctional protein that also function as the beta-subunit of propyl 4-hydroxylase (EC 1.8.4.4), and as a thyroid hormone binding protein! The sequence of PDI contains two copies of a domain closely related to thioredoxin.
- Phosphoinositide-specific phospholipase C isozyme alpha (PI-PLC alpha) (EC 3.1.4.11) (7). PI-PLC are enzymes that play a central role in cell signal transduction by producing the second messenger molecules diacylglycerol (DAC) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). There are at least five different forms of PI-PLC, one of them, isozyme alpha, contains two copies of a domain closely related to thioredoxin.
- Bloodstream-specific protein 2 (BS2) from *Trypanosoma brucei* (8), a protein whose function is not known. BS2 also contains two copies of a thioredoxin-like domain.
- ERp72, an endoplasmic reticulum protein, of unknown function (9,11). ERp72 contains three copies of a thioredoxin-like domain.

-Consensus pattern: (STA)-x-(WG)-C-(AGV)-(PH)-C (The two C's form the redox-active bond)

-Sequences known to belong to this class detected by the pattern: ALL

-Other sequence(s) detected in SWISS-PROT: genome polyprotein from various isolates of hepatitis C virus.

-NOTE: this pattern is found three times in ERp72, twice in PDI and in PI-PLC form-I; in BS2 it is found only once, in the second thioredoxin-like domain; in the first domain the residues in positions 1, 3 and 6 of the pattern are not conserved.

- (1) Holmgren A.
Annu. Rev. Biochem. 54:237-271(1985).
- (2) Gleason F.K., Holmgren A.
FEMS Microbiol. Rev. 54:271-297(1988).
- (3) Holmgren A.
J. Biol. Chem. 264:13963-13966(1989).
- (4) Eklund H., Gleason F.K., Holmgren A.
Proteins 11:13-28(1991).
- (5) Freedman R.B., Hawkins H.C., Murrant S.J., Reid L.
Biochem. Soc. Trans. 16:96-99(1988).
- (6) Kivirikko K.I., Myllyla R., Pihlajaniemi T.
FASE J. 3:1609-1617(1989).
- (7) Bennett C.F., Balcarek J.M., Varrichio A., Crooke S.T.
Nature 334:268-270 (1988).
- (8) Hsu M.P., Muhich M.I., Boothroyo J.C.
Biochemistry 28:6440-6446(1989).
- (9) Mazzarella R.A., Srinivasan M., Haugejorden S.M., Green M.
J. Biol. Chem. 265:1094-1101 (1990).
- (10) Huang S.-H., Tomich J.M., Wu H., Jong A., Holcenberg J.S.
J. Biol. Chem. 266:5353-5353(1991).

TABLA IV.- Respuesta a la consulta del Prosite Dictionary

RESULTADOS

	1				50
Clon T ₃	MALES LFKSI HTK TSL SSSIVFIFKG KACLLTSKSR IQI. SFAELN				
Td <i>m</i> espinaca	MAIEDN CLQL STSAS VG TVA VKSHV HHLQP SSKVN VP TFR GLKRS FP PALS				
	51				100
Clon T ₃	SFTSL VLLIE NH...VLLHA REAVNE VQVV NDSSW DELVI GSETP VLVDF				
Td <i>m</i> espinaca	SSVSS SPRQ FRYSS VV CKA SEAVKE VQDV NDSSW KEFVL ESEVP VVDF				
	101				150
Clon T ₃	WAPNC GPCRM IAPII DELAK EYAGK IKCYK LNTDE SPNTA TKYGI RSIPT				
Td <i>m</i> espinaca	WAPNC G PCKL IAPVI DELAK EYSGK IAVTK LNTDE APGIA TQYNI RSIPT				
	151		183		
Clon T ₃	VLFFN GERK DSVIGAV PKA TLSEK VEKYI ...				
Td <i>m</i> espinaca	VLFFN GERK ESIIG AV PKS TLTDS IEKYL SPH				

TABLA V.- Alineamiento de la secuencia aminoacídica codificada por el clon T₃ con la secuencia de la tiorredoxina *m* de espinaca (Wedel *et al.*, 1992). En negrita se resaltan los aminoácidos idénticos y en la misma posición. Los aminoácidos correspondiente al péptido de tránsito de la tiorredoxina *m* de espinaca aparecen subrayados. El alineamiento se realizó a partir del centro activo, minimizando el número de huecos.

Al alinear la secuencia codificada por el clon T₃ y la correspondiente a la tiorredoxina *m* de espinaca con el péptido de tránsito, se observó que aunque en el extremo amino la homología es muy baja, a partir del aminoácido 70 la secuencia está muy conservada (Tabla V). Este hecho refuerza la identidad tiorredoxina *m* del clon T₃ y apoya la idea de que la hemos aislado con el péptido de tránsito.

Un aspecto crítico es conocer donde comienza exactamente la tiorredoxina *m* madura de guisante, pues cuando se expresó la secuencia completa del precursor de la tiorredoxina *f* de guisante, es decir, con el péptido de tránsito, se obtuvo un enzima inactivo (JP Jacquot, comunicación personal). En el caso de la FBPasa cloroplastídica de guisante, la expresión de una construcción que incluía parte del péptido de tránsito originó un enzima que aun siendo activa y reconocida por los anticuerpos anti-FPBasa, presentaba algunas diferencias con la purificada de hoja de guisante (Carrasco *et al.*, 1994). Estas diferencias desaparecieron cuando se expresó una nueva construcción de la que se había eliminado el fragmento de péptido de tránsito (Jacquot *et al.*, 1995).

Conocíamos parte de la secuencia aminoacídica del extremo amínico de la tiorredoxina *m* madura porque previamente habíamos enviado proteína purificada de la planta al Servicio de Secuenciación de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona para que determinasen su secuencia por degradación de Edman. La

RESULTADOS

secuencia obtenida fue muy clara hasta el aminoácido 10, pero se perdió la señal tras el ciclo 14. Comparamos la secuencia del clon T₃ con la obtenida por degradación de Edman para determinar cual es el primer aminoácido de la tiorredoxina *m* madura de guisante y encontramos una clara correlación entre los aminoácidos 65 a 74 de la secuencia codificada por pT₃ y los diez primeros aminoácidos determinados por degradación de Edman:

		1		10	11		14																					
Deg. Edman:		A	V	N	Q	V	X	N	D	X	M	D	P															
pT ₃ :	A	R	E	A	V	N	E	V	Q	V	N	S	S	W	D	E	L	V	I	G	S	E	T	P	V	L	V	
	62			65								74	75									84	85					90

Los diez primeros aminoácidos de la secuencia por degradación de Edman fueron claros y a partir del 14 se pierde la señal. Los aminoácidos comunes se resaltan en negrita y las posiciones en las que no se pudo identificar el aminoácido se han marcado con X. La numeración inferior hace referencia a la secuencia codificada por el clon T₃, comenzando por la Met inicial.

Cuando pedimos al ordenador que hiciera una predicción de las características de la secuencia de la tiorredoxina *m* madura, sin péptido de tránsito, es decir, considerando el primer aminoácido de la proteína madura la Ala 65, los resultados sí eran los esperados: 12 kDa de masa molecular y 108 aminoácidos, con un punto isoelectrónico de 4,55 y carga de -2. La predicción del valor del coeficiente de absorción molar es $\epsilon_{280} = 22370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Por último, alineamos las secuencias de las tiorredoxinas *m* y *f* maduras de espinaca y guisante y la de *E. coli* al objeto de conocer el grado de homología entre ellas (Tabla VI). Como era de esperar, la secuencia del clon T₃ es más parecida a la tiorredoxina *m* que a la *f*.

4. Expresión, purificación y caracterización de la tiorredoxina *m* de guisante

Como ya se mencionó anteriormente, un punto crítico a la hora de expresar un enzima cloroplástida es conocer donde acaba el péptido de tránsito y comienza la proteína madura. Basándonos en los datos de degradación de Edman de la tiorredoxina *m* de guisante purificada de hoja, en la homología de secuencia con el enzima de espinaca y en las predicciones de ordenador, concluimos que el primer aminoácido del enzima maduro es la Ala 65 (considerando a la metionina inicial del precursor como el aminoácido 1).

RESULTADOS

		1			40
Td <i>m</i> guisante (HARE)		AVNEVQV VN .	DSSWDEL VIG	SETPVL VDFW	APWCGP CRMI
Td <i>m</i> espinaca KASE		AVKEVQ DVN .	DSSWKE FVLE	SEVPVM VDFW	APWCGP CKLI
Td <i>E. coli</i>		.SDKIIHLTD	DSFD TDV LKA	.DGAIL VDFW	AENCGP CKMI
Td <i>f</i> espinaca MEAI		.VGKVTEV NK	DTFW PIVKAA	GDKP VVLD MF	TEWCGP CKAM
Td <i>f</i> guisante		.VGKVTEV NK	DTFW PIV NAA	GDKT VVLD MF	TRWCGP CKVI
		41			80
Td <i>m</i> guisante		APIIDEL AKE	YAGKIK CYKL	NTDES PNT.A	TKYGIR SIPT
Td <i>m</i> espinaca		APVIDEL AKE	YSGKIA VTKL	NTDEA PGI.A	TQYNIR SIPT
Td <i>E. coli</i>		APIIDEL IADE	YQGKLT VAKL	NIDQN PGT.A	PKYGIR GIPT
Td <i>f</i> espinaca		APKYEK LAE	YLDVI .FLKL	DCNQEN KTLA	KELGIR VVPT
Td <i>f</i> guisante		APLYEEL SQK	YLDVV .FLKL	DCNQDN KSLA	KELGIK VVPT
		81		115	% IDENTIDAD
Td <i>m</i> guisante		VLFFKNG ERK	DSVIGA VPKA	TLSEK VEKYI 100 %
Td <i>m</i> espinaca		VLFFKNG ERK	ESIIGA VPKA	TLTDS IEKYL	SPH.. 72 %
Td <i>E. coli</i>		LLLFKNG EVA	ATKVGAL SKG	QLKEF LDANL	A.... 47 %
Td <i>f</i> espinaca		FKILKEN SVV	GEVTGA KTDK	LLEAI QAARS	S.... 34 %
Td <i>f</i> guisante		FKILKDN KIV	KEVTGA KFDD	LVAAI DTVRS	S.... 27 %

TABLA VI.- Alineamiento de la secuencia del clon T₃ (Td *m* de guisante) con las tiorredoxinas de cloroplastídicas y con la de *E. coli*. En negrita se resaltan los aminoácidos idénticos y en la misma posición a los de la tiorredoxina *m* de guisante. Sobre la secuencia de la tiorredoxina *m* de guisante, en negrita, se destaca la identidad con la tiorredoxina *m* de espinaca. Se comienza a numerar a partir de la zona de homología. El alineamiento se realizó a partir del centro activo, minimizando el número de huecos. Se indica el porcentaje de identidad de la tiorredoxina *m* de guisante con otras tiorredoxinas. Las secuencias se tomaron de las siguientes fuentes: Wedel *et al.* (1992) para la Td *m* de espinaca, Höög *et al.* (1985) para la Td de *E. coli*, Kamo *et al.* (1989) para la Td *f* de espinaca y Lepienic *et al.* (1992) para la Td *f* de guisante. Entre paréntesis se destaca la región inmediatamente anterior al primer aminoácido de la tiorredoxina *m* de guisante, pues muestra una gran homología con los primeros aminoácidos de la *m* de espinaca.

nombre	secuencia	localización
	Nde I ↔	
Td <i>m</i> N:	5'-gct CAT ATG gct gta aat gaa gtt ca -3' M A V N E V	Extremo amino
	BamH I ↔	
Td <i>m</i> C:	5'-ttG GAT CCt caa ata tac ttt tcc ac -3'	Extremo carboxilo

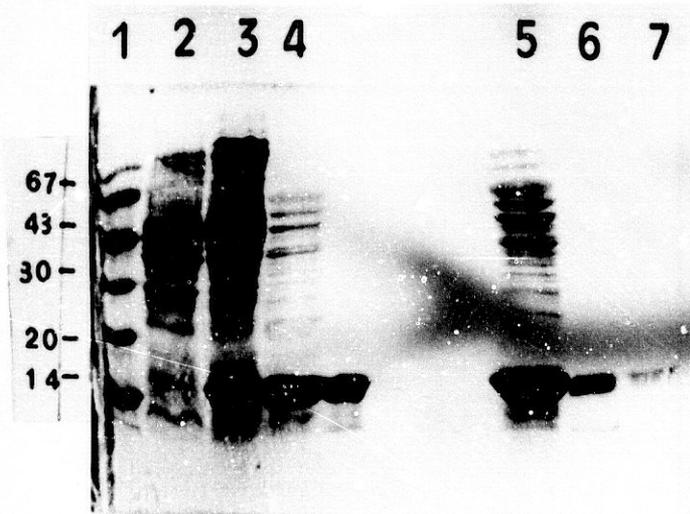
TABLA VII.- Secuencia de los oligonucleótidos empleados para subclonar la tiorredoxina *m*. En negrita y mayúscula se destacan los sitios de restricción introducidos.

RESULTADOS

Mediante PCR, amplificamos selectivamente el fragmento de ADNc que codifica al enzima madura y lo subclonamos en los sitios *Nde* I / *Bam*HI del vector de expresión pET 12a. Al plásmido resultante se le denominó pMI. Los oligos empleados se muestran en la **Tabla VII**.

Para que se inicie la síntesis de proteína hace falta una señal que marque el punto de iniciación de la traducción. Debido a ello se eligió el sitio *Nde* I, pues contiene el codon de iniciación (CATATG). Este codon de iniciación corresponde a la metionina y es traducido, por lo que nos interesaba conocer si aparecería en la proteína recombinante. De acuerdo con Hirel *et al.* (1989) el procesamiento de la Met está relacionado con el tamaño de la cadena del aminoácido siguiente a la metionina, siendo inversamente proporcional a la distancia entre el carbono alfa y el último átomo que no sea hidrógeno del segundo aminoácido. Para la Ala como segundo aminoácido predicen una probabilidad de procesamiento del 95.8 %.

Se expresó y purificó de acuerdo con el protocolo descrito por Hodges *et al.* (1994) para la tiorredoxina *f* de guisante, aunque introduciendo algunas modificaciones (Materiales y Métodos IX.2 y X.2). En la **Fot. 3** se muestran los diferentes pasos de purificación.



Fot. 3.- Purificación de la Td *m* recombinante

1. Marcador pesos moleculares.
2. Vector pET12a (blanco)
3. Esto. crudo de pMI.
4. Tras pp. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 40%.
5. Antes de Sephadex G50.
6. Td *m* purificada de guisante.
7. Td *m* recombinante.

Tras precipitar con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se pasó por una columna de filtración molecular Sephadex G50, obteniéndose un pico simétrico (**Fig. 4**) que tras electroforesis y tinción de plata resultó corresponder a la tiorredoxina *m* purificada a homogeneidad (**Fot. 4**). Se obtuvo un rendimiento de 20 mg de proteína pura por litro de cultivo.

RESULTADOS

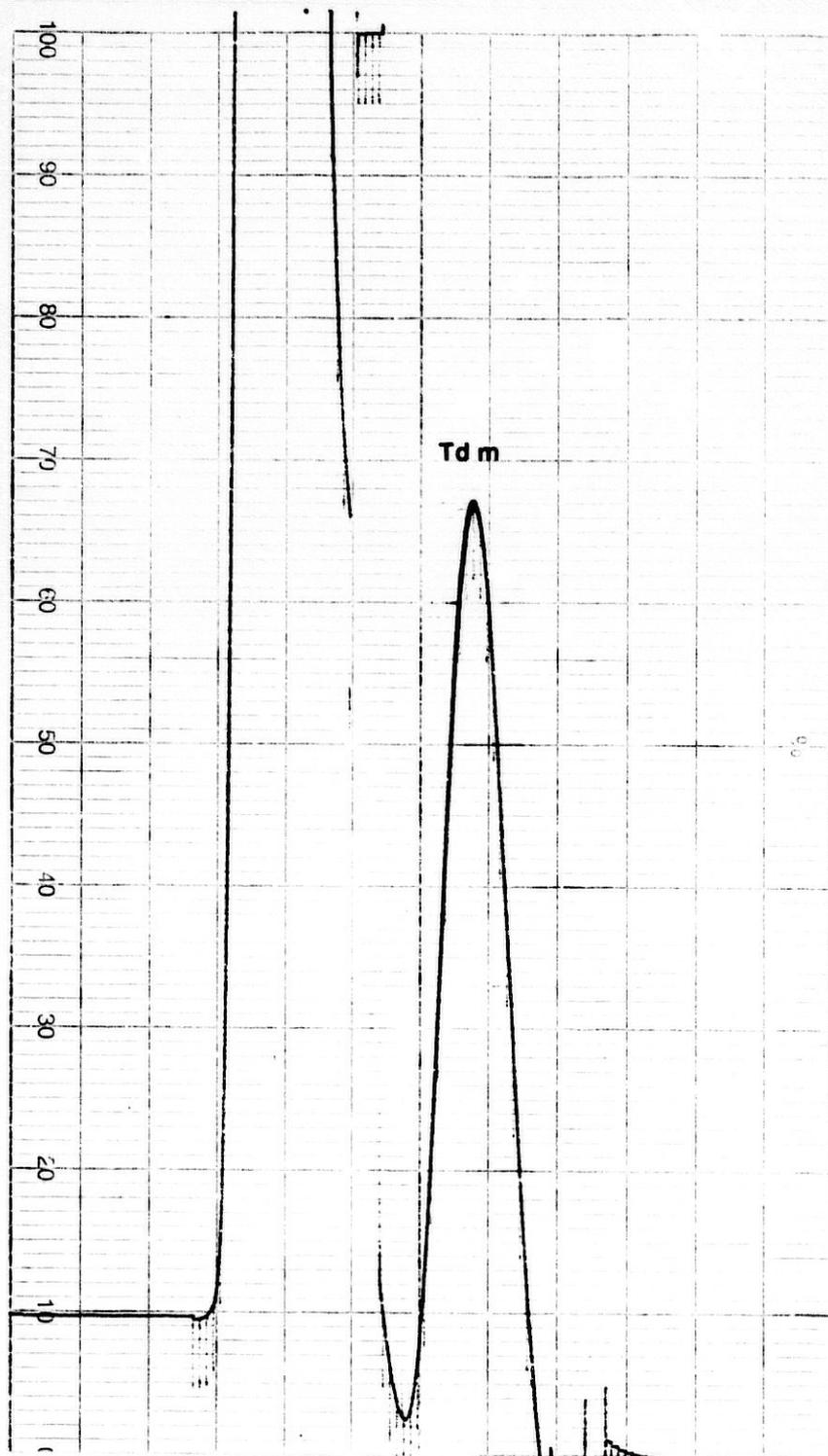
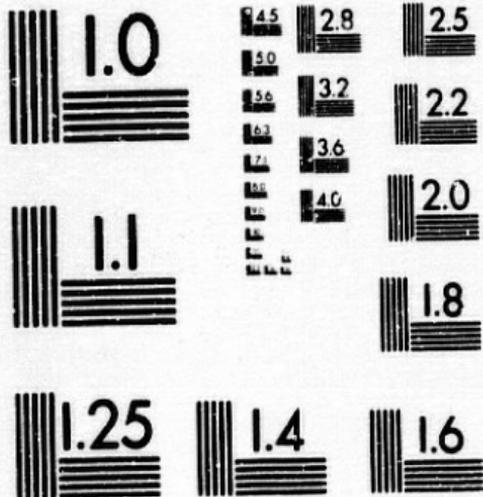


Figura 4.-- Cromatograma del paso por Sephadex G50 de la tiorredoxina *m* recombinante.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
 NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
 (ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

RESULTADOS

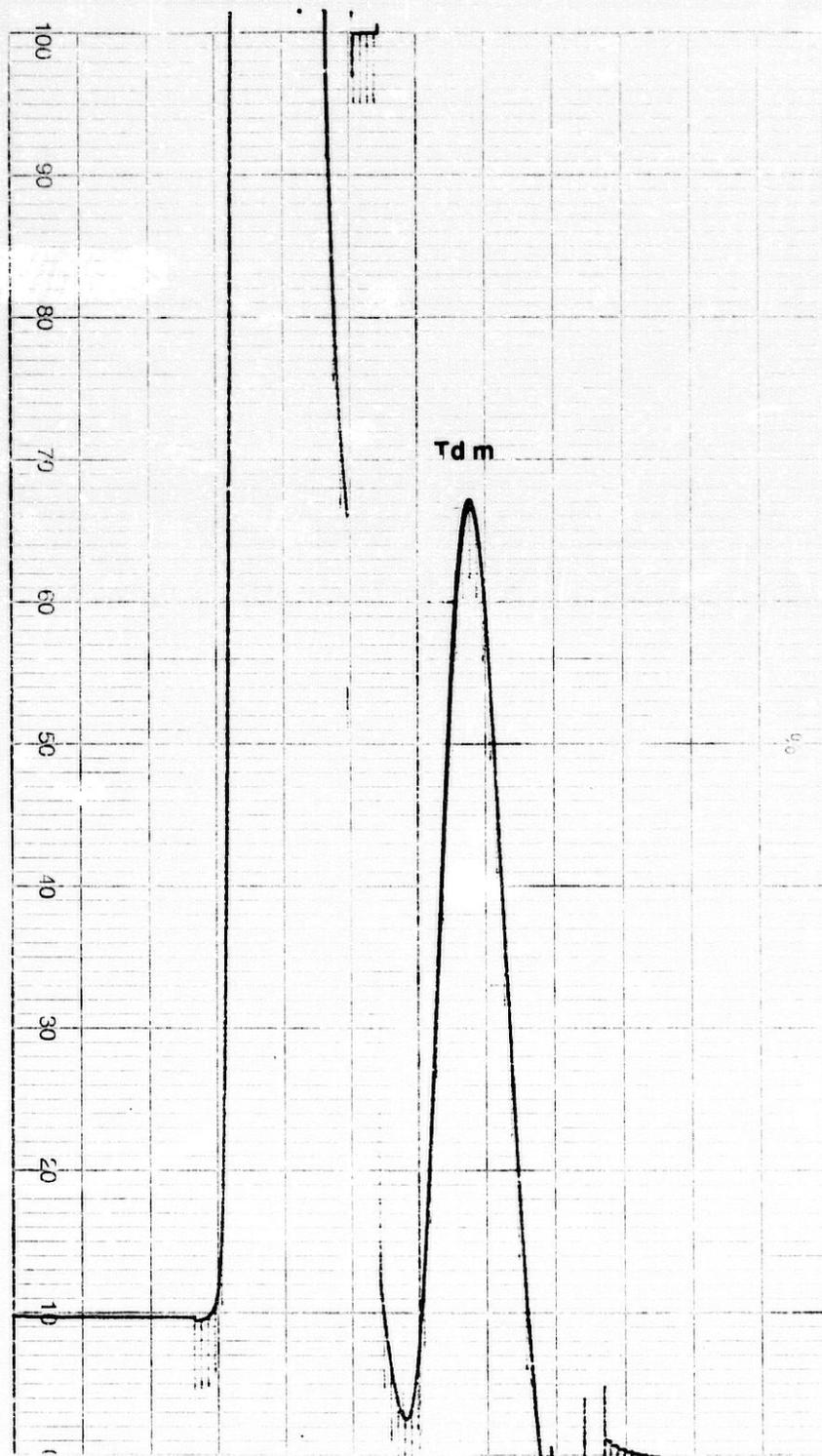
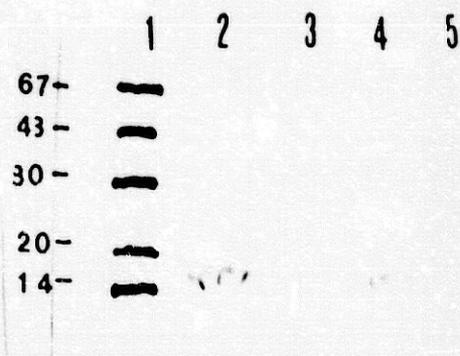


Figura 4.-- Cromatograma del paso por Sephadex G50 de la tiorredoxina *m* recombinante.



Fot. 4.- Tinción de plata.

1. Td *m* recombinante.
2. Marcador de pesos moleculares.
3. Td *m* de guisante.



Fot 5.- Western blotting de las Td *m* (2,5) y la Td *f* (3, 4) con anti-Td *m* (2,3) y anti-Td *f* (4,5).

Dado que la tiorredoxina *m* de guisante presenta un grado de identidad con la tiorredoxina de *E. coli* del 50%, una alícuota de la proteína recombinante fue enviada a la Dra. Paulette Decottignies del Institute de Biotechnologie des Plantes (CNRS), en París (Francia), para que determinase la secuencia del extremo amino por degradación de Edman y verificase que no estaba contaminada con el enzima de *E. coli*. El resultado obtenido es claro: no se detecta contaminación con tiorredoxina de *E. coli* y hay procesamiento de la Met. Así pues, la secuencia de la proteína subclonada es análoga a la tiorredoxina *m* nativa:

Sec. amino terminal deg. Edman:	AVNEVQVVNDSS
Tiorredoxina <i>m</i> de guisante:	AVNEVQVVNDSS...
Tiorredoxina de <i>E. coli</i> :	SDKIIHLTDDSF...

El enzima recombinante activa la NADP-MDH nativa y es reconocido por los anticuerpos anti-Td *m* de guisante, pero no por los anti-Td *f* de guisante (Fot. 5).

III. CLON DE LA FBPasa CLOROPLASTÍDICA DE GUISANTE

La fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica de guisante había sido aislada y caracterizada por nuestro grupo con anterioridad (Carrasco *et al.*, 1994). Como ya se describió, existe un problema en nuestra genoteca que impide extraer los insertos por digestión con EcoR I. Como consecuencia de ello, y al no disponer de un PCR, hubo que sacar el inserto de ADNc por digestión con Sac I / Kpn I. De esta forma se aisló un fragmento de ADN de 3,2 Kba que contenía las 1,2 Kba que codifican a la FBPasa cloroplastídica de guisante más dos brazos de un vector lambda gt11 de 1 Kba cada uno. Este fragmento fue subclonado en los sitios Sac I / Kpn I del vector pTZ18R. Al plásmido recombinante se le denominó pMAC100. Fue expresado en *E. coli* 71/18, obteniéndose una FBPasa con algunas características diferentes a la purificada de hoja, como se muestra en la tabla:

	FBPasa recombinante	FBPasa nativa
K_m	52 μ M	128 μ M
Coefficiente de Hill	1,5	1,0
Masa molecular	44 kDa	43 kDa
Actividad tras 60° C/30 min	42 %	100%

Datos tomados de Carrasco *et al.* (1994) Planta 193: 494-501.

Un aspecto clave para estudiar el efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la FBPasa cloroplastídica de guisante es disponer de un sistema de expresión eficiente que nos permita obtener una FBPasa recombinante de características análogas a la nativa. En colaboración con el Dr. Jean Pierre Jacquot, del Intitute de Biotechnologie des Plantes (CNRS) de la Universidad de París Sud (Francia), logramos subclonar, expresar y purificar el enzima madura.

Para conocer cual es el primer aminoácido de la FBPasa madura recurrimos a comparar las secuencia obtenida por Carrasco *et al* con las de las FBPasas cloroplastídicas conocidas hasta el momento (Tabla VIII). En el extremo amino de todas ellas encontramos una región rica en aminoácidos hidroxilados y cargados positivamente seguidos de la secuencia (I/V)-X-(A/C)↓A, descrita por Douwe de Boer y Weisbeek (1991) como el sitio consenso de procesamiento:

RESULTADOS

		↓		
Guisante:	K H V N G S G <u>V</u> R C		M A V K . E A T S E	. T
Espinaca:			M A A V G E A A T Q	. T K
Trigo:	G Q A S T P N <u>V</u> R C		M A V V . D T A S A	. P A P
Arabidopsis:	N H Q Y A S G <u>V</u> R C		M A V A A D A . S E	. T K T
Patata:	R R A F N G G <u>V</u> K C		M A I . . E T T S G	F T A T

TABLA VIII.- Alineamiento de los extremos amino de FBPasa cloroplastidicas. En negrita y subrayados se destacan los aminoácidos que se ajustan a la secuencia consenso del sitio de procesamiento. La flecha sobre la metionina indica el punto de procesamiento. La secuencias se tomaron de: Carrasco *et al.*, 1994, Dong *et al.*, 1995 (guisante); Marcus y Harrsch, 1990 (espinaca); Raines *et al.*, 1988, Lloyd *et al.*, 1991 (trigo); Horsnell y Raines, 1991 (*Arabidopsis thaliana*); Kossmann *et al.*, 1992 (patata).

Usando como molde el primitivo pAMC100, amplificamos por PCR el ADNc que codifica la FBPasa madura, considerando que el primer aminoácido es la Met 25 (marcado con una flecha en la tabla anterior) de la secuencia de la FBPasa descrita por nuestro grupo. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla IX**.

El fragmento de ADNc amplificado se subclonó en los sitios Nco I / BamH I del vector de expresión pET 3d y al plásmido resultante se le denominó pET-FBPasa. Se expresó y purificó según el protocolo descrito en los apartados IX.2 y X.1 de Materiales y Métodos, obteniéndose un rendimiento de 20 mg de enzima pura por litro de cultivo.

Al objeto de verificar la pureza e identidad del preparado se secuenció su extremo amino por degradación de Edman. La secuencia obtenida muestra que la Met es procesada, como predicen Hirel *et al.* (1989) (**Tabla X**).

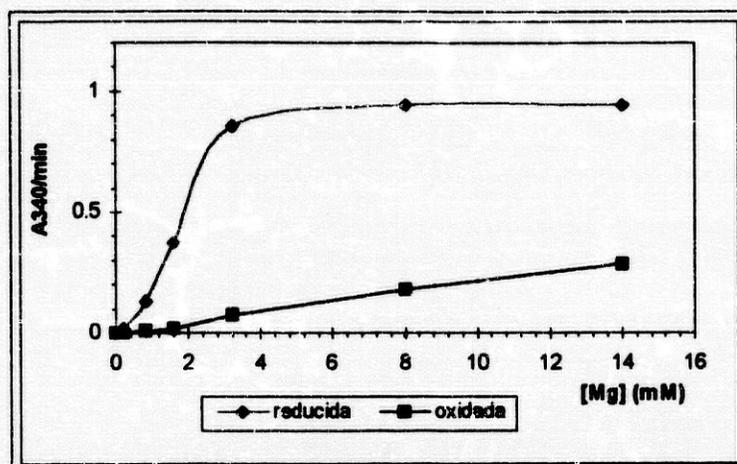
Se comprobó que las FBPasa recombinante así obtenida presenta la misma cinética de saturación con fructosa-1,6-bisfosfato que el enzima purificado de hoja (**Graf. 1**).

Los valores de Km e índice de Hill están en el mismo rango: 96 μ M y 2,06 para el enzima nativa y 116 μ M y 1,41 para la recombinante.

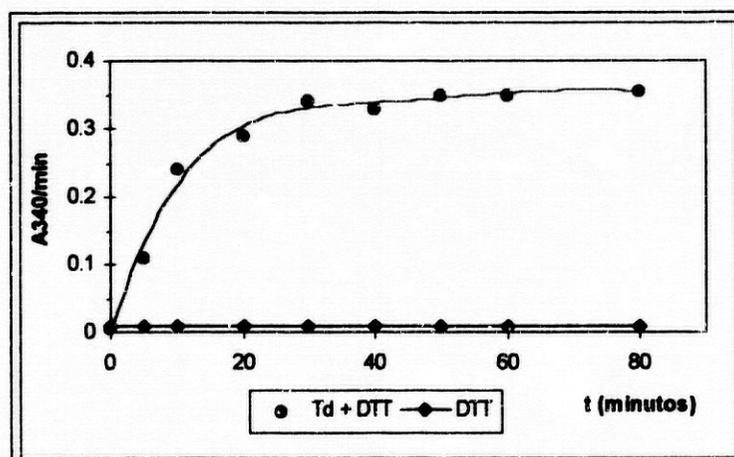
RESULTADOS

Paralelamente se estudió el comportamiento del enzima recombinante frente a concentraciones activantes de Mg^{2+} (**Graf. 2**). Cuando el ensayo de actividad se realizó a altas concentraciones de Mg^{2+} , el enzima recombinante mostró solo un 30% de la actividad que alcanza cuando es activada (reducida) con tiorredoxina/DTT, observándose en este último caso la saturación por debajo de 10 mM Mg^{2+} . A baja concentración de Mg^{2+} , la actividad del enzima recombinante es estrictamente dependiente de tiorredoxina (**Graf. 3**).

Todos estos resultados, publicados en Eur. J. Biochem. (Jacquot *et al.*, 1995), son coherentes con el comportamiento del enzima nativo.



Gráfica 2.- Dependencia de $[Mg^{2+}]$ del enzima recombinante no activado (oxidado) y activado (reducido) con DTT/ $40 \mu M$ tioredoxina de *E. coli* [D61N].



Gráfica 3.- El enzima recombinante fue activado con $40 \mu M$ de tioredoxina de *E. coli* [D61N] y $5 mM$ de DTT o con $5 mM$ de DTT solo. La actividad fue medida a $2 mM$ de Mg^{2+} .

IV. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS: TIORREDOXINAS HÍBRIDAS *m-f*

Las tiorredoxina *m* y *f* de guisante poseen entre ellas un grado de identidad del orden del 25 % y no presentan reacción cruzada con anticuerpos policlonales anti-Td *f* y anti-Td *m*. Al objeto de profundizar en el efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la FBPasa decidimos reproducir las experiencias de Lim *et al.* (1981) y construir moléculas híbridas *f/m* y *m/f*. Para ello intercambiamos entre ellas los extremos comprendidos entre el primer aminoácido y la Gly del centro activo y entre la Pro del centro activo y el último aminoácido.

1. Construcción del híbrido *f/m*

Analizamos las secuencias nucleotídicas en torno al centro activo de las tiorredoxinas *m* y *f* de guisante y comprobamos que existía un sitio Ava II (Tabla XI). Como los vectores pET en los que están subclonadas las tiorredoxina *m* y *f* poseen varios sitios para Ava II, hubo que amplificar selectivamente mediante PCR desde el extremo amino hasta el centro activo de la tiorredoxina *f* y desde el centro activo de la tiorredoxina *m* hasta su extremo carboxilo. Para ello empleamos los oligos TdfN, TdmC (consultar apartados I.4 y II), y diseñamos los mostrados en la Tabla XII.

Purificamos los fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y, tras digestión con Nco I/Ava II del fragmento de la tiorredoxina *f* y con Ava II/BamH I el del la *m*, se subclonaron en el sitio Nco I / BamH I del vector de expresión pET 3d. Al plásmido recombinante se le denominó pHFM. Se resecuenció y se verificó que codifica la proteína quimérica (Tabla XII).

De acuerdo con las predicciones de ordenador, las características de este híbrido no eran las esperadas, pues se parece más a la tiorredoxina *f*, a pesar de presentar una identidad del 48 % con la *f* y del 80 % con la *m*.

	carga	pto. isoelectrico	%Id. Td <i>f</i>	%Id. Td <i>m</i>
Td <i>f</i>	1	7,87	100	27
Td <i>m</i>	-2	4,96	27	100
Híbrido <i>f/m</i>	4	9,25	48	80

RESULTADOS

K W C G P C K

Tiorredoxina *f* : aaa tgg tgt ggt cct tgc aaa
Ava II

Tiorredoxina *m* : caa tgg tgt ggt cca tgc aga
P W C G P C R

TABLA XI.- Las secuencias nucleotídicas en torno al centro activo está muy conservada en las tiorredoxina *m* y *f* de guisante. En mayúscula aparece la secuencia aminoacídica y el sitio *Ava II* presente en ambas moléculas se resalta en negrita.

nombre	secuencia	sitio restricción
	W C G P C	
AvaN	5'- a tgg tgt ggt cca tgc a -3'	Ava II
AvaC	5'- t gca tgg acc aca cca t -3'	Ava II

TABLA XII.- Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la construcción de las tiorredoxinas híbridas. Sobre el oligo AvaN, en mayúsculas, se muestra la secuencia aminoacídica para precisar la localización de ambos oligos sobre la secuencia (AvaC es complementario a AvaN). En negrita se destaca el sitio de restricción *Ava II*.

Td *f* (31,5 %)

VGKVTEVNKD	TFWPIVNAAG	DKTVVLDMFT	KWCG↓PCRMIA
PIIDELAKEY	AGKIKCYKLN	TDESPNTATK	YGIRSIPTVL

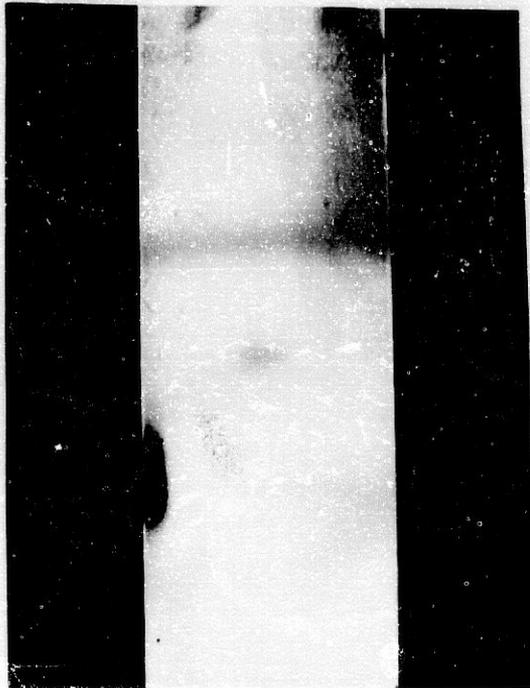
Td *m* (68,5 %)

FFKNGERKDS	VIGAVPKATL	SEKVEKYI
------------	------------	----------

TABLA XIII.- Resultado de la secuenciación del plásmido recombinante pHFM. La flecha indica donde se intercambiaron los fragmentos de las tiorredoxinas *m* y *f*. La molécula resultante posee un 31,5% de la secuencia de la tiorredoxina *f* y un 68,5% de la *m*.

RESULTADOS

Estudiamos si el clon era transcrito haciendo una expresión a pequeña escala e hibridando el ARN total aislado del cultivo bacteriano con la sonda del clon (Materiales y Métodos: VIII.2). Comprobamos que sí se transcribe:

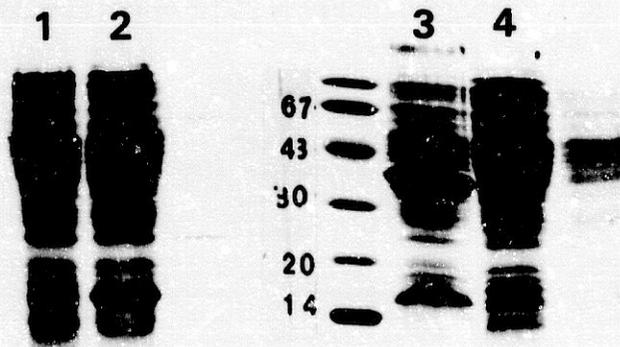


Fot. 6.- Southern blotting. Se ha hibridado el plásmido recombinante pHMF con el ARN aislado de *E. coli* BL21 transformadas con dicho plásmido.

Un aspecto a considerar era la aparición del híbrido agrupado en cuerpos de inclusión insolubles, como había sido descrito para la tiorredoxina *f* de espinaca recombinante (Aguilar *et al.*, 1992). Según Wilkinson y Harrison (1991), la aparición de una proteína recombinante como cuerpos de inclusión es función del plegamiento y de la solubilidad. El plegamiento viene condicionado por la presencia de Cys (el ambiente reductor de *E. coli* impide la formación de puentes disulfuro) y de aminoácidos formadores de hélices, mientras que la solubilidad está directamente relacionada con la carga de la molécula, su tamaño e hidrofobicidad. De acuerdo con su modelo teórico, el híbrido *f/m* aparecería como cuerpos de inclusión y la tiorredoxina de *E. coli* sería soluble, siendo la fiabilidad de ambas predicciones del mismo orden. Datos experimentales avalaron estos resultados teóricos (Fot. 7)

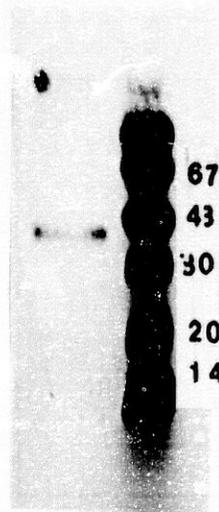
Decidimos tratar de solubilizar los cuerpos de inclusión siguiendo el protocolo descrito por Aguilar *et al.* (1991) (Materiales y Métodos X.2). Al final del proceso, la electroforesis en SDS-PAGE mostró una banda de unos 40 kDa (Fot. 8) que por

RESULTADOS



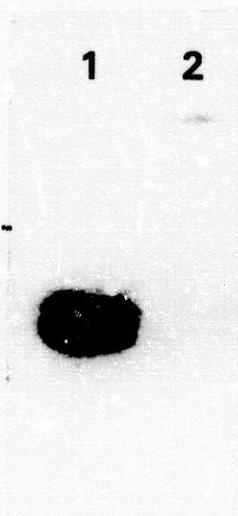
Fot. 7.- Expresión del híbrido *fm*. Tras lisar las células se analizó la fracción soluble (1, 2) y la insoluble (3, 4) de la bacteria transformada con el vector (1, 4) y con el plásmido recombinante pHF M (2, 3).

Fot 8.- Tras tratar como cuerpos de inclusión, obtuvimos una banda de unos 40 kDa.



RESULTADOS

Western blotting y revelado con quimioluminiscencia fue reconocida por los anticuerpos anti-Td*f* (Fot. 9).



Fot. 9.- Western blotting de la Td*f* (1) y del Híbrido *f/m* (2) revelado con anti-Td*f*.

2. Construcción del híbrido *m/f*

Cambiamos la estrategia en la construcción del híbrido *m/f*. Decidimos amplificar por PCR los fragmentos amino de la tiorredoxina *m* y carboxilo de la *f* empleando los oligos TdmN, AvaC, AvaN y TdfC y, puesto que el extremo 5' del fragmento correspondiente a la tiorredoxina *m* solapa con el 3' del correspondiente a la *f*, en lugar de intentar ligarlos directamente con el vector, decidimos realizar un segundo PCR empleándolos como molde con los oligos TdmN y TdfC. De esta forma conseguimos el ADN que codifica el híbrido, el cual fue subclonado en los sitios Nde I / BamH I del vector de expresión pET12a (ver Fig. 5). Al plásmido recombinante lo denominamos pHMF.

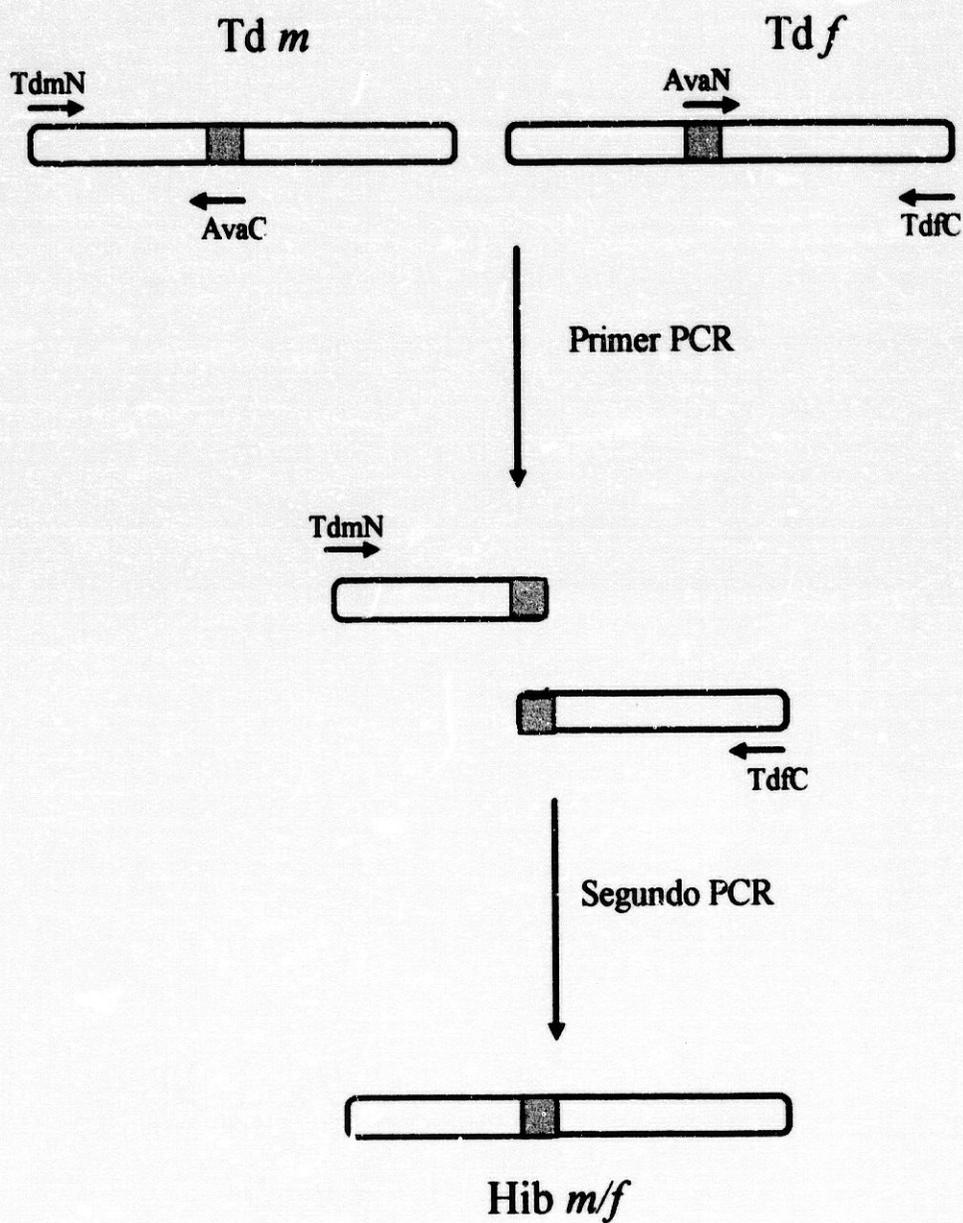


Fig 5.- Esquema de la construcción del híbrido *m/f*. La zona correspondiente al centro activo, cuya secuencia nucleotídica está muy conservada en ambas moléculas, se muestra sombreada

RESULTADOS

Td m (31,2%)			
AVNEVQVVND	SSWDELVIGS	ETPVLVDFWA	PWCG↓PCKVIA
PLYEELSQKY	LDVVFLKLDL	NQDNKSLAKE	LGIKVVPTFK
Td f (68,8%)			
ILKDNKIVKE	VTGAKFDDL	AAIDTVRSS	

TABLA XIV.- Resultado de la secuenciación del plásmido recombinante pHMF. La flecha indica donde se intercambiaron los fragmentos de las tiorredoxinas *m* y *f*. La molécula resultante posee un 31,2% de la secuencia de la tiorredoxina *m* y un 68,8% de la *f*.

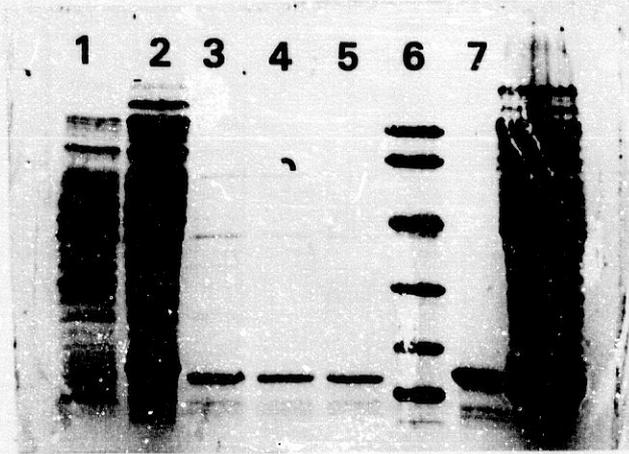
El clon fue resecuenciado al objeto de verificar la secuencia de la proteína quimérica. El resultado fue el mostrado en la **Tabla XIV**. De nuevo las predicciones de ordenador no eran la esperadas, pues el híbrido *m/f* se parece más a la tiorredoxina *m*, a pesar de presentar una identidad del 48 % con la *m* y del 80 % con la *f*:

	carga	pto. isoeléctrico	%Id. Td f	%Id. Td m
Td f	1	7,87	100	27
Td m	-2	4,96	27	100
Híbrido <i>m/f</i>	-5	4,46	80	48

Cuando aplicamos el modelo teórico de Wilkinson y Harrison (1991) a esta proteína y a la tiorredoxina de *E. coli*, en ambos casos predijo que serían proteínas solubles, siendo la fiabilidad de ambas predicciones del mismo orden. Este hecho, unido a que el punto isoeléctrico predicho es similar al de la tiorredoxina *m*, nos hizo pensar que el híbrido *m/f* resultaría más sencillo de purificar.

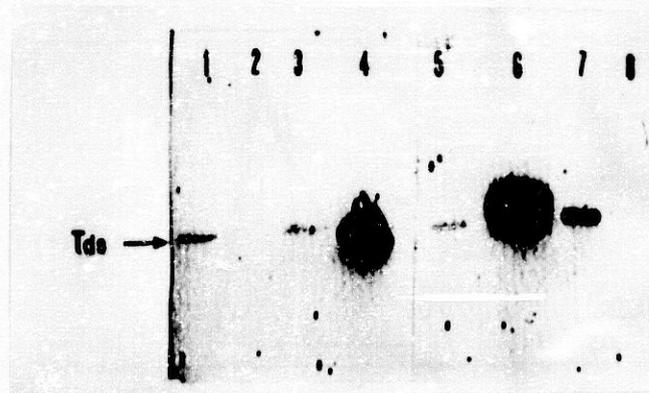
Como en principio se trata de una molécula muy cargada, decidimos incrementar la fuerza iónica de todos los tampones hasta 500 mM de NaCl para contrarrestar las interacciones y ensayar el protocolo de purificación descrito por Hodges *et al.* (1995) con algunas modificaciones (Materiales y Métodos X.2). La proteína quimérica resiste tratamientos térmicos (Fot 10) y es reconocida en Western blotting por anticuerpos policlonales anti-Td *f* y anti-Td *m* (Fot 11)

RESULTADOS



Fot. 10.- Hibrido *m/f*.

1. Exto. crudo del vector pET 12a (blanco).
2. Exto. crudo.
3. Tras calentar a 90°/5'.
- 4 y 5. Tras calentar a 70°/10'.
6. Marcador pesos moleculares.
7. Td *m*.



Fot 11.- Western blotting del Hib *m/f* (1, 5), Td *m* (2, 6), Td *E. coli* (3, 7) y Td *f* (4, 8) revelado con anti-Td *f* (1, 2, 3 y 4) y con anti-Td *m* (5, 6, 7 y 8).

V. MUTANTES DE LA FBPasa CLOROPLASTÍDICA DE GUISANTE

Al alinear las FBPasa cloroplastídicas secuenciadas hasta el momento observamos dos Cys conservadas en la vecindad de la región descrita por Marcus *et al.* (1988):

	β_4	Loop	β_5
riñón cerdo:	GIY RKNST.....	DEPSEKDAL.....	QPGRN LVAAGYALY
híg. cordero:	GIY KKISK.....	DDPSEKDAL.....	QPGRN LVAAGYALY
hígado rata:	GIY RKTSA.....	NEPSEKDAL.....	QPGRN LVAAGYALY
<i>S. cerevisiae</i> :	SIF RLLPD.....	SSGTINDVL.....	RCGKE MVAACYAMY
<i>S. pombe</i> :	GIY KLRPG.....	SQGDYSDVL.....	RPGKE MVAAGYTMY
<i>E. coli</i> :	SIY RRVT...PVG	TPTTEEDFL.....	QPGNK QVAAGYVVY
<i>R. sphaer. I</i> :	AYW PA.....	APRPNPSFL.....	RLGSE LIAAGYVIY
<i>R. sphaer. II</i> :	SIF PA.....	AAGPEASFL.....	RPGTE QYAGGYIIY
guisante:	GIY SPNDE <u>C</u> LPDFGDDSDNTLGT	EEQRC <u>I</u> VNV <u>C</u> QPGSN	LLAAGY <u>CMY</u>
espinaca:	GIY SPNDE <u>C</u> IVD.SDHDES	QLSAAEQRC <u>V</u> VNV <u>C</u> QPGDN	LLAAGY <u>CMY</u>
trigo:	GIY SPSDE <u>C</u>	HIGDDATLDEVTQM <u>C</u> I	VNV <u>C</u> QPGSN LLAAGY <u>CMY</u>
<i>Arabidopsis</i> :	GIY SPSDE <u>C</u> IVD..	DSDDISALGSEEQRC <u>I</u> VNV <u>C</u> QPGNN	LLAAGY <u>CMY</u>
patata:	GIY NPNDE <u>C</u> LAD..	HGDD.STLDNIEQK <u>C</u> I	VNV <u>C</u> QPGTN LLAAGY <u>CMY</u>
<i>B. napus</i> :	GIY SPNDE <u>C</u> LPD...SDDT	SALGSEEER <u>C</u> I	VNV <u>C</u> QPGNN LLAAGY <u>CMY</u>



El alineamiento se ha restringido a la región en torno a la región característica de las FBPasas cloroplastídicas (comprendida entre las flechas). En negra y subrayadas aparecen las cuatro Cys, destacándose con un asterisco (*) las descritas por Marcus *et al.* (1988). Sobre el alineamiento se muestra la predicción de estructura secundaria. Las secuencias fueron tomadas de: Marcus *et al.*, 1982 (riñón de cerdo); Fisher y Thompson, 1983 (hígado de cordero); El-Maghrai *et al.*, 1988 (hígado de rata); Rogers *et al.*, 1988 (*S. cerevisiae* y *S. pombe*); Hamilton *et al.*, 1988 (*E. coli*); Gibson *et al.*, 1990 (*R. sphaeroides* I y II); Carrasco *et al.*, 1994, Dong *et al.*, 1995 (guisante); Marcus y Harsch, 1990 (espinaca); Raines *et al.*, 1988, Lloyd *et al.*, 1991 (trigo); Horsnell y Raines, 1991 (*Arabidopsis thaliana*); Kossmann *et al.*, 1992 (patata); Rodriguez-Suarez y Wolosiuk, 1993 (*Brassica napus*).

RESULTADOS

tiorredoxina mutante [D61N] de *E. coli*, el doble mutante fue insensible a esta activación, presentando mayor actividad a tiempo cero que la FBPasa recombinante

2. Generación de mutantes sencillos de la FBPasa

Al objeto de profundizar en el conocimiento de los residuos implicados en la formación del puente disulfuro responsable de la regulación luminica, comenzamos la mutación sistemática de las cuatro Cys altamente conservadas que aparecen en torno a la zona descrita como responsable de dicha regulación en las FBPasas cloroplastídicas (Marcus y Harrsch, 1990):

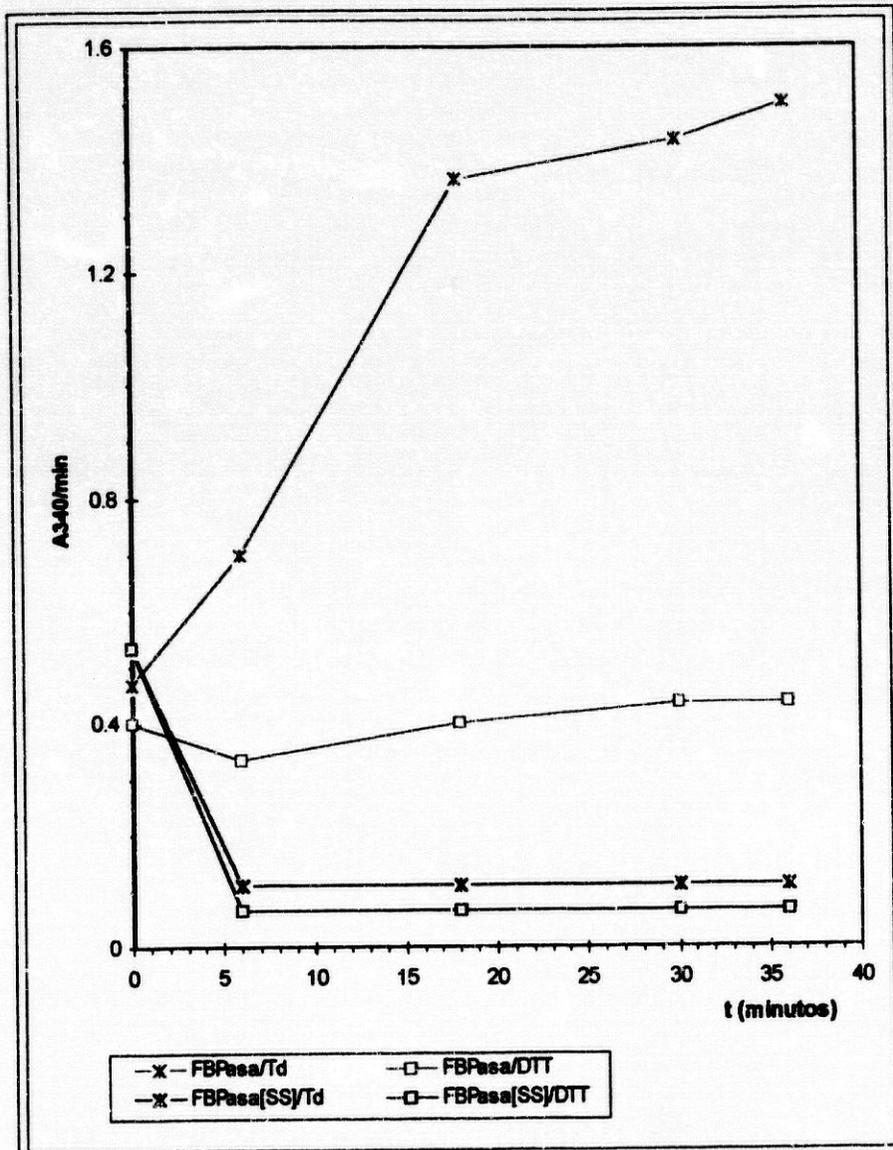
	β_4	Loop	β_5
espinaca:	GIY SPNDE <u>C</u> IVD.SDHDDSQLSAEEQR <u>C</u> VVNV <u>C</u> QPGDN		LLAAGY <u>C</u> MY
trigo:	GIY SP <u>S</u> DE <u>C</u>HIGDDATLDEV <u>T</u> Q <u>M</u> CI <u>V</u> N <u>V</u> <u>C</u> QPGSN		LLAAGY <u>C</u> MY
<i>Arabidopsis</i> :	GIY SP <u>S</u> DE <u>C</u> IVD. . .SDDDISALGSEEQR <u>C</u> IVNV <u>C</u> QPGNN		LLAAGY <u>C</u> MY
patata:	GIY NP <u>N</u> DE <u>C</u> LD. . .HGDD.STLDNIEQK <u>C</u> IVNV <u>C</u> QPGTN		LLAAGY <u>C</u> MY
<i>B. napus</i> :	GIY SPNDE <u>C</u> LPD. . .SDDTSALGSEEER <u>C</u> IVNV <u>C</u> QPGNN		LLAAGY <u>C</u> MY
guisante:	GIY SPNDE <u>C</u> LPDFGDDSDDN <u>T</u> LGTEEQ <u>R</u> CI <u>V</u> N <u>V</u> <u>C</u> QPGSN		LLAAGY <u>C</u> MY
	153	173 178	190

Alineamiento de las secuencias en torno a la inserción de las FBPasa cloroplastídicas secuenciadas hasta el momento. Subrayadas y en negrita se destacan las cuatro Cys altamente conservadas. Para el enzima de guisante, sus posiciones son: 153, 173, 178 y 190. Las secuencias fueron tomadas de las siguientes fuentes: Marcus y Harrsch, 1990 (espinaca); Raines *et al.*, 1988, Lloyd *et al.*, 1991 (trigo); Horsnell y Raines, 1991 (*Arabidopsis thaliana*); Kossmann *et al.*, 1992 (patata); Rodriguez-Suarez y Wolosiuk, 1993 (*Brassica napus*); Carrasco *et al.*, 1994, Dong *et al.*, 1998 (guisante).

Utilizamos el mismo protocolo empleado para la generación del doble mutante. Los oligos diseñados se muestran en la **Tabla XVI**

Los experimentos en curso sugieren que el mutante FBPasa [C190S] se comporta como la FBPasa recombinante, los mutantes FBPasa [C173S] y FBPasa [C178S] son activados por tiorredoxina, pero en menor grado que el enzima recombinante y el mutante FBPasa [C153S] no es regulable por tiorredoxina.

RESULTADOS



Graf. 4.- Dependencia de tiorredoxina de la FBPasa recombinante y del doble mutante: (x) FBPasa recombinante, 5 mM de DTT y Td coli [D61N]; (□) FBPasa recombinante, 5 mM DTT; (x) FBPasa [C173S,C178S], 5 mM de DTT y Td coli [D61N]; (□) FBPasa [C173S,C178S], 5mM DTT.

RESULTADOS

nombre	posición	secuencia
C 153/S-up	522-539	<p style="text-align: center;">t</p> <p>5'- t gac gag <u>agt</u> ctt cct ga -3'</p> <p style="text-align: center;">D E S* L P</p>
C153/S-do	540-523	<p style="text-align: center;">a</p> <p>5'- atcaggaagactctcgtc -3'</p>
C173/S-up	583-601	<p style="text-align: center;">t</p> <p>5'- caa agg <u>agc</u> att gtg aat g -3'</p> <p style="text-align: center;">Q R S* I V N</p>
C173/S-do	601-583	<p style="text-align: center;">a</p> <p>5'- cattcacaatgctccttg -3'</p>
C178/S-up	599-617	<p style="text-align: center;">t</p> <p>5'- at gtg <u>agt</u> caa cca gga ag -3'</p> <p style="text-align: center;">V S* Q P G</p>
C178/S-do	622-597	<p style="text-align: center;">a</p> <p>5'- ggttgcttctggtgactcacattc-3'</p>
C190/S-up	631-650	<p style="text-align: center;">t</p> <p>5'- gct ggc tac <u>agc</u> atg tat tc -3'</p> <p style="text-align: center;">A G Y S* M Y</p>
C190/S-do	650-631	<p style="text-align: center;">a</p> <p>5'- gaatacatgctgtagccagc -3'</p>

TABLA XVI.- Oligonucleótidos diseñados para generar los mutantes sencillos de la FBPassa. En **negrita** se resalta el nucleótido original reemplazado por el subrayado para generar la mutación. La secuencia aminoacídica se indica en mayúscula. Las Ser resultantes de la mutación se marcan con asterisco (*). La posición de los oligos hace referencia a su localización en la secuencia publicada por Carrasco *et al.* (1994).

VI. EFECTO MODULADOR DE LAS TIORREDOXINAS SOBRE LA FBPasa Y LA NADP-MDH

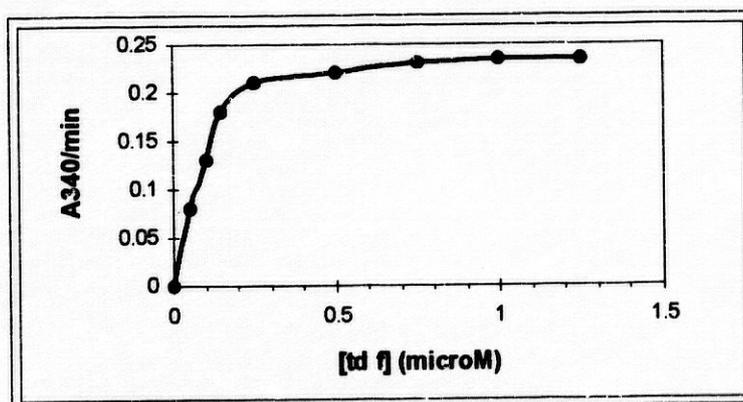
Al objeto de intentar clarificar la especificidad y eficacia del efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la FBPasa y la NADP-MDH en guisante, decidimos realizar un estudio de las cinéticas de activación y de la cooperatividad del proceso. Empleamos las tiorredoxinas de *E. coli* recombinante (cedida por el Dr. Jacquot) y la FBPasa y tiorredoxinas *m* y *f* recombinantes de guisante, así como el híbrido *m/f*. La NADP-MDH (purificada de hoja de guisante) fue cedida por la Dra. Reche.

1. Activación de la FBPasa por tiorredoxinas

El protocolo seguido fue descrito por Prado *et al.* (1992). En el paso de activación se incubaron enzima y modulador con FBP 0,4 mM y Ca^{2+} 0,5 mM (Materiales y Métodos XI.3.b). La concentración de FBPasa en la mezcla de activación fue de 0,3 μM .

1.1. Activación de FBPasa por tiorredoxina *f*

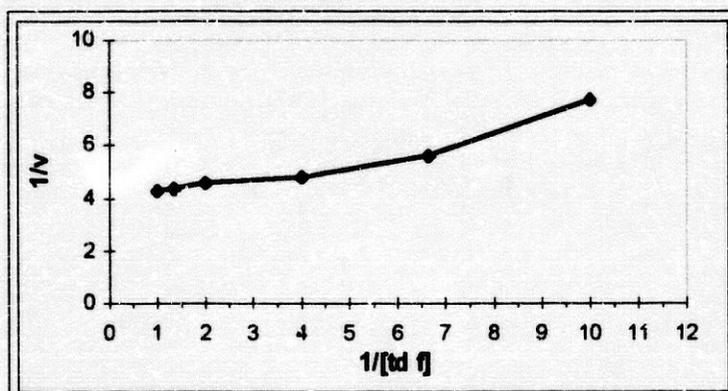
La cinética de activación de la FBPasa recombinante con cantidades crecientes de tiorredoxina *f* recombinante es la que se muestra en la **gráfica 1.1a**. La velocidad máxima fue de 0,235 $\text{A}_{340\text{ nm}} \text{ min}^{-1}$ y se alcanzó la saturación a aproximadamente 1 μM de Td *f*.



Gráfica 1.1a.- Cinética de activación de la FBPasa recombinante (0,3 μM) con Td *f* recombinante. Se alcanza la saturación en torno a 1 μM de Td *f*. La velocidad máxima es 0,235 $\text{A}_{340\text{ nm}} \text{ min}^{-1}$.

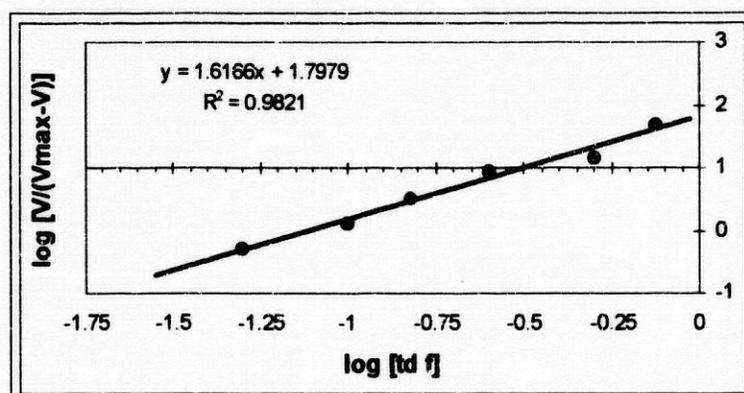
RESULTADOS

La representación de los inversos (gráfica 1.1b) presenta una curvatura que tiende a la horizontalidad. Esto es típico de enzimas alostéricas con cooperatividad positiva.



Gráfica 1.1b.- Representación de inversos. Se ha eliminado de la representación el punto 0.01 μM de Td.f.

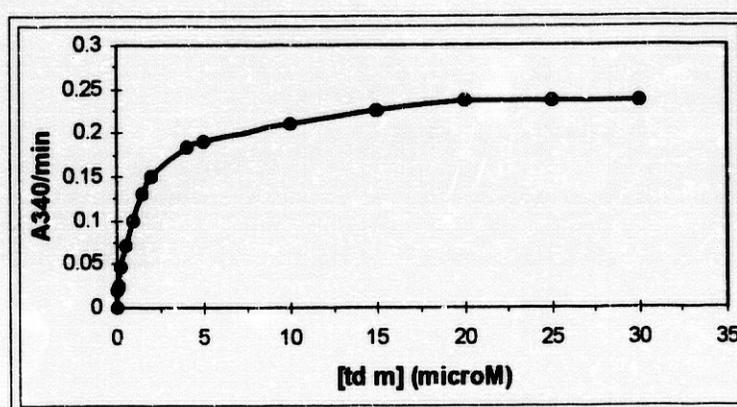
Para hacer lineal la representación de inversos (Materiales y Métodos X.3.e) recurrimos a representar la ecuación de Hill en su forma logarítmica (graf. 1.1c). Los valores obtenidos fueron: $n_H = 1,62$ y $A_{0,5} = 0,077 \mu\text{M}$.



Gráfica 1.1c.- Representación logarítmica de Hill. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).

1.2. Activación de la FBPasa por Td *m*

La FBPasa recombinante es activada por la tiorredoxina *m* hasta una velocidad máxima de $0,235 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$ (gráfica 1.2a). Aunque la activación es equiparable a la producida por la tiorredoxina *f* recombinante, es mucho menos efectiva, pues la saturación se alcanzó en torno a $20 \mu\text{M}$ de tiorredoxina *m* (del orden de 20 veces superior a la tiorredoxina *f*):



Gráfica 1.2a.- Cinética de activación de la FBPasa recombinante ($0,3 \mu\text{M}$) con Td *m* recombinante. La velocidad máxima es $0,235 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$. Se alcanza la saturación a aproximadamente $20 \mu\text{M}$ de Td *m*.

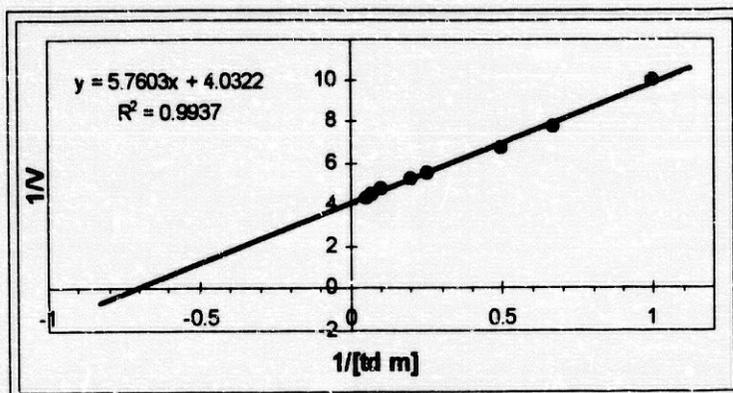
La representación de los inversos (gráfica 1.2b) se ajusta bastante bien a una recta ($R^2 = 0,994$). A partir de la ecuación de la recta se deduce:

$$V_{\text{max}} = 0,248 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1} \text{ (de acuerdo con la representación de los directos } V_{\text{max}} = 0,235 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1} \text{)}$$

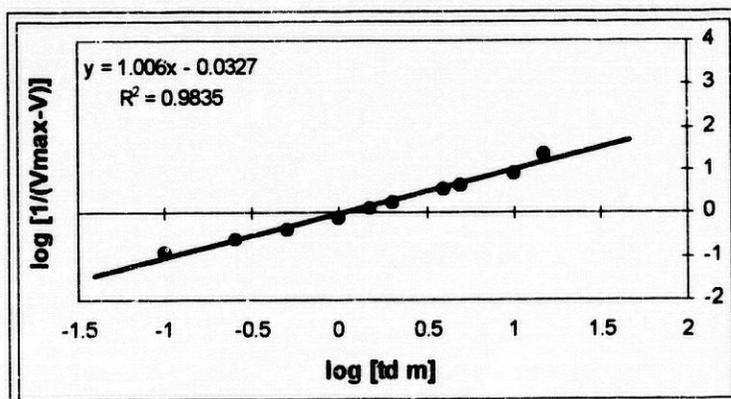
$$K_m = 1,4 \mu\text{M}.$$

Para verificar la ausencia de cooperatividad realizamos la representación logarítmica de Hill (gráfica 1.2c). Los datos se ajustaron a una recta de pendiente 1, quedando demostrado que no existe cooperatividad.

RESULTADOS



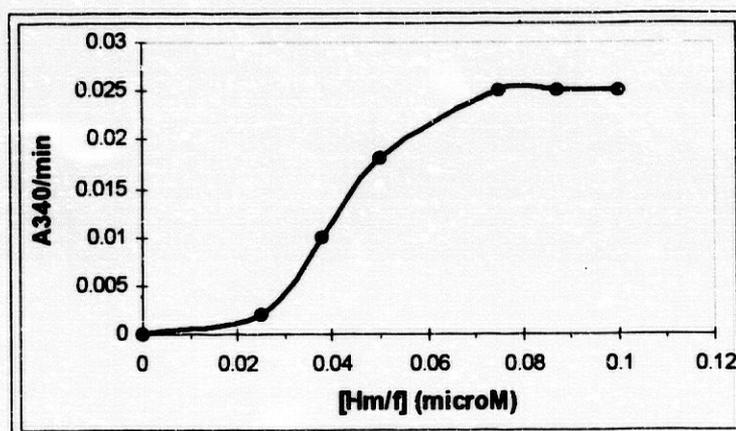
Gráfica 1.2b.- Representación de inversos. Se ha eliminado de la representación el punto 0,01 μM de $Td m$. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el valor del coeficiente de regresión y el valor del coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).



Gráfica 1.2c.- Representación logarítmica de Hill. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).

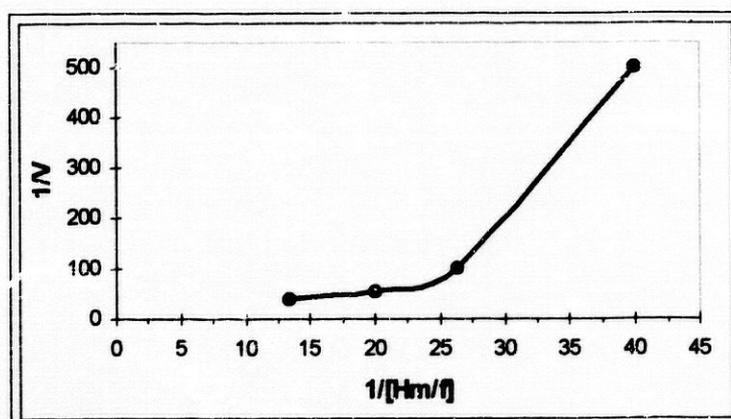
1.3. Activación de la FBPasa por el híbrido *m/f*

El híbrido *m/f* es capaz de activar a la FBPasa hasta una $V_{max} = 0,025 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$ (del orden de un 11% de la activación producida por las tiorredoxinas *m* y *f*), pero de forma más efectiva que la tiorredoxina *f*, pues la saturación se alcanzó en torno a $0,075 \mu\text{M}$, valor próximo a la $A_{0,5}$ de la tiorredoxina *f* (gráfica 1.3a):



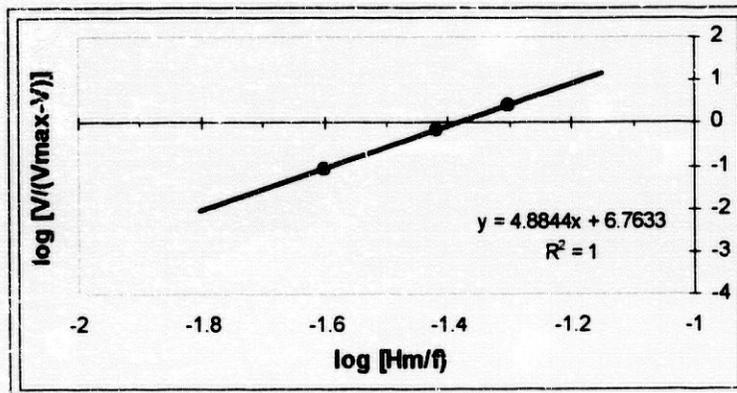
Gráfica 1.3a.- Cinética de activación de la FBPasa recombinante ($0,3 \mu\text{M}$) con el híbrido *m/f*. Se alcanza la saturación aproximadamente a $0,075 \mu\text{M}$ de *Hm/f*. La velocidad máxima es $0,025 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$.

La representación de los inversos (gráfica 1.3b) presenta una curvatura muy acusada que tiende a la horizontalidad, claro indicio de una fuerte cooperatividad positiva:



Gráfica 1.3b.- Representación de inversos.

Los puntos de la representación de Hill en su forma logarítmica (**gráfica 1.3c**) se ajustan perfectamente a una recta ($R^2 = 1$). Los valores de $A_{0,5}$ y n_H son $0,041 \mu\text{M}$ y $4,88$ respectivamente.

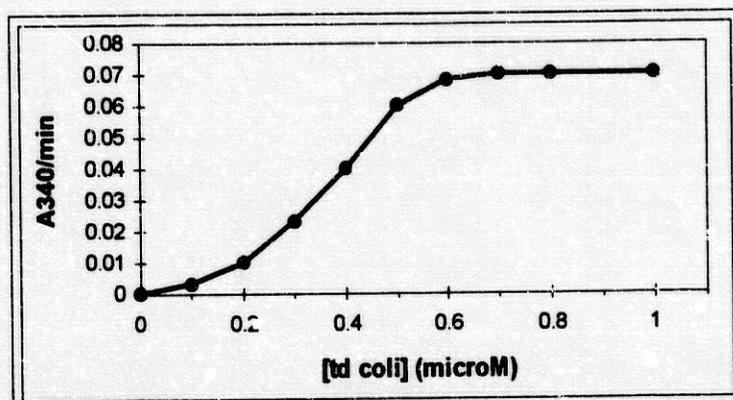


Gráfica 1.3c.- Representación logarítmica de Hill. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).

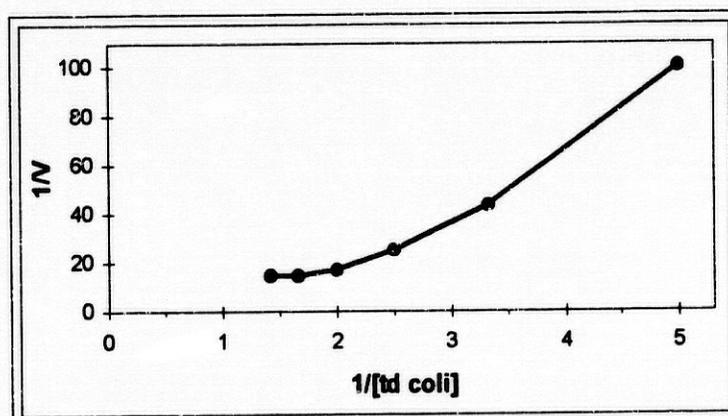
1.4. Activación de la FBPasa por Td de *E. coli*

La tiorredoxina de *E. coli* activa a la FBPasa hasta una V_{max} de $0,07 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$ (30% de la activación producida por las tiorredoxinas *m* y *f*) y con una efectividad comprendida entre la *f* y la *m*. La saturación se alcanzó aproximadamente a $0,7 \mu\text{M}$ de tiorredoxina de *E. coli* (**gráfica 1.4a**).

Los puntos de la representación de los inversos (**gráfica 1.4b**) presentan una marcada tendencia a la horizontalidad, lo cual hace pensar en una fuerte cooperatividad positiva.



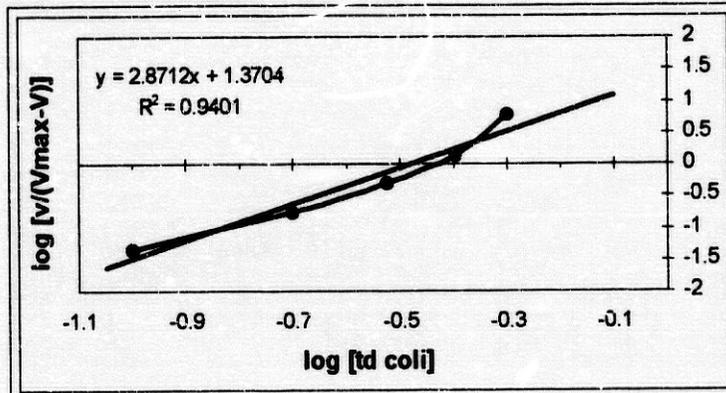
Gráfica 1.4a.- Cinética de activación de la FBPasa recombinante (0,3 μM) con Td de *E. coli*. Se alcanza la saturación en torno a 0,7 μM de Td coli. La velocidad máxima es 0,07 $\text{A}_{340 \text{ nm}} \text{min}^{-1}$.



Gráfica 1.4b.- Representación de inversos. Se ha eliminado de la representación el punto 0,1 μM de Td coli.

RESULTADOS

Los puntos de la representación de Hill en su forma logarítmica (gráfica 1.4c) se ajustan a una recta peor que en las representaciones anteriores. La $A_{0,5}$ y el índice de Hill calculados están dentro del rango de lo esperado a la vista de la gráfica 1.4a: $A_{0,5} = 0,33 \mu\text{M}$ y $n_H = 2,8$:



Gráfica 1.4c.- Representación logarítmica de Hill. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación). Se ha eliminado el punto $0,068 \mu\text{M}$ de Td coli para mejorar la regresión.

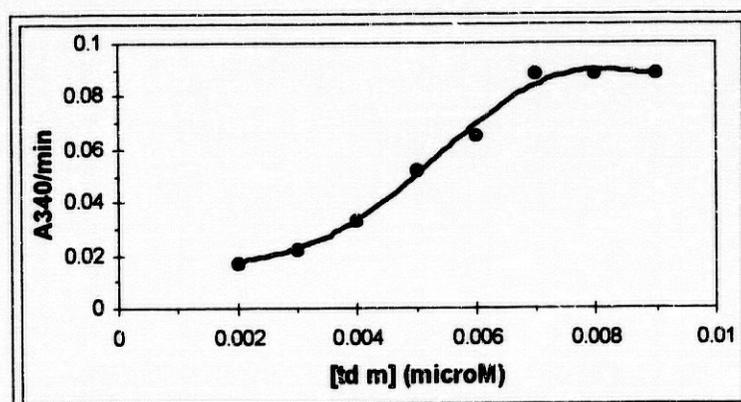
2. Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxinas

Aunque no es objeto de este trabajo, como en el laboratorio disponíamos de NADP-MDH purificada de hoja de guisante, decidimos ampliar nuestro estudio del efecto modulador de las tiorredoxinas analizando el efecto de las mismas sobre la NADP-MDH.

Los ensayos se llevaron a cabo con $0,1325 \mu\text{M}$ de NADP-MDH. En el paso de activación se incubaron enzima y modulador con 5 mM de DTT (Materiales y Métodos XI.3.d).

2.1. Activación de la NADP-MDH por tiorredoxina *m*

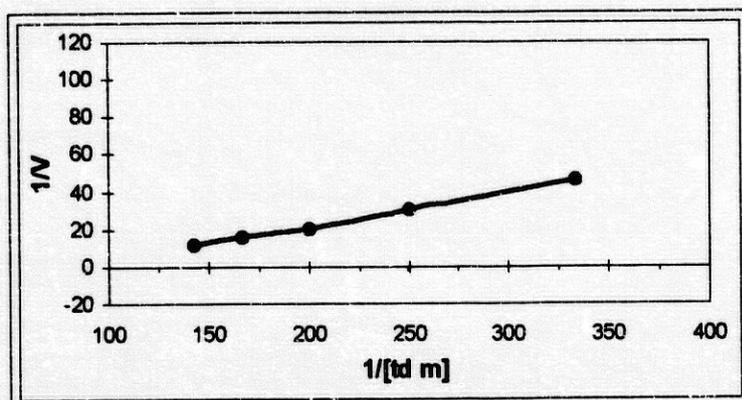
En la **gráfica 2.1a** se muestra la cinética de activación de la NADP-MDH purificada de hoja por tiorredoxina *m* recombinante. La velocidad máxima fue $0,088 \text{ A}_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$ y se alcanzó la saturación en torno a $0,007 \mu\text{M}$ de tiorredoxina *m*.



Gráfica 2.1a.- Cinética de activación de la NADP-MDH purificada de hoja ($0,1325 \mu\text{M}$) con Td *m*. Se alcanza la saturación aproximadamente a $0,007 \mu\text{M}$ de Td *m*. La velocidad máxima es $0,088 \text{ A}_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$.

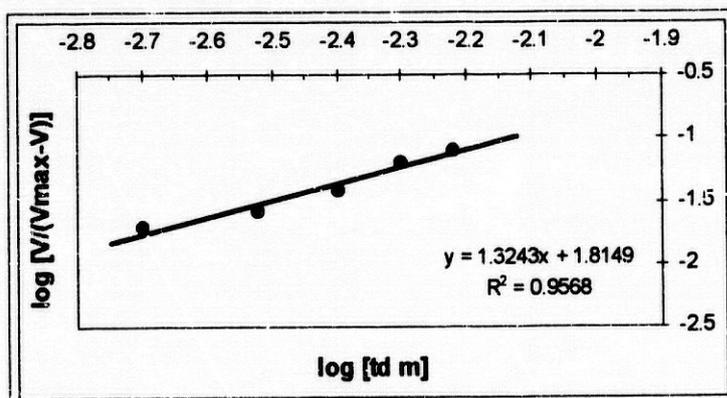
RESULTADOS

La representación de los inversos (**gráfica 2.1b**) muestra una ligera tendencia a la horizontalidad que podría significar que existe cooperatividad positiva:



Gráfica 2.1b.- Representación de inversos. Se ha eliminado de la representación el puntos $0,002\ \mu\text{M}$ de $Td\ m$.

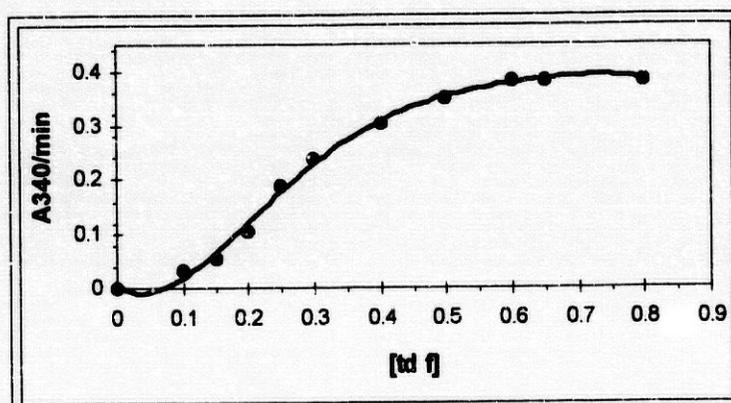
La representación de Hill en forma logarítmica confirma que existe cooperatividad positiva (**Gráfica 2.1c**). Los valores de $A_{0,5}$ y n_H calculados a partir de la ecuación de la recta son $0,0043\ \mu\text{M}$ y $1,32$ respectivamente.



Gráfica 2.1c.- Representación logarítmica de Hill. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).

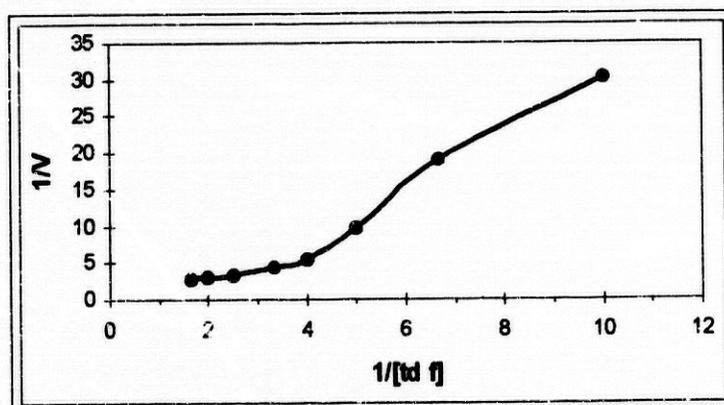
2.2. Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxina *f*

La tiorredoxina *f* activa a la NADP-MDH (gráfica 2.2a) hasta una velocidad máxima de $0,383 \text{ A}_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$, lo que equivale a cuatro veces la activación producida por la tiorredoxina *m*, pero lo hace de manera menos eficiente, pues la saturación se alcanza aproximadamente a $0,6 \text{ } \mu\text{M}$ de tiorredoxina *f* del orden de 86 veces la concentración de tiorredoxina *m*).



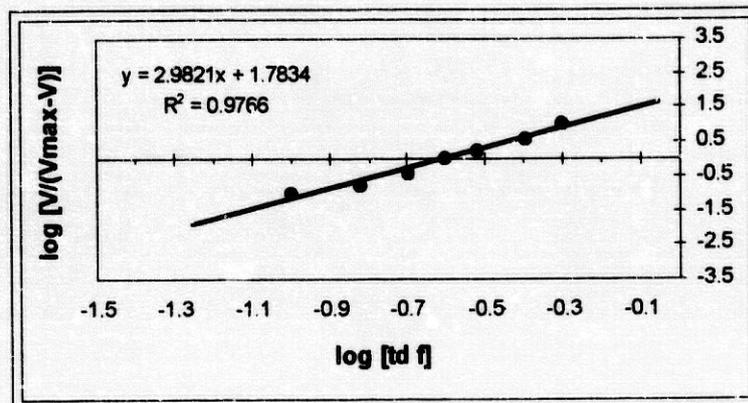
Gráfica 2.2a.- Cinética de activación de la NAD-MDH purificada de hoja ($0,1325 \text{ } \mu\text{M}$) con Td *f*. Se alcanza la saturación en torno a $0,6 \text{ } \mu\text{M}$ de Td *f*. La velocidad máxima es $0,383 \text{ A}_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$.

La representación de los inversos (gráfica 2.2b) presenta la forma típica de una cooperatividad positiva, aunque parece como si a bajas concentraciones la cooperatividad fuese negativa (en la zona de valores intermedios de $1/V$ la recta tiende a la verticalidad en lugar de a la horizontalidad).



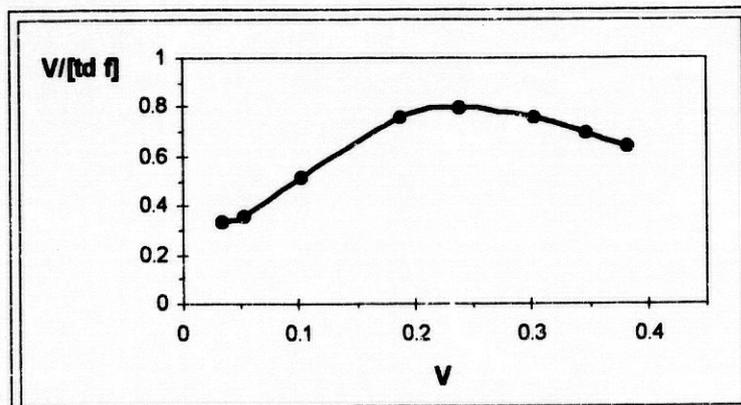
Gráfica 2.2b.- Representación de inversos.

Los puntos de la representación de Hill (gráfica 2.2c) en forma logarítmica se ajustan bien a una recta. Los valores de n_H y $A_{0,5}$ calculados a partir de la ecuación de la recta son 3 y $0,25 \mu\text{M}$.



Gráfica 2.2c.- Representación logarítmica de Hill. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).

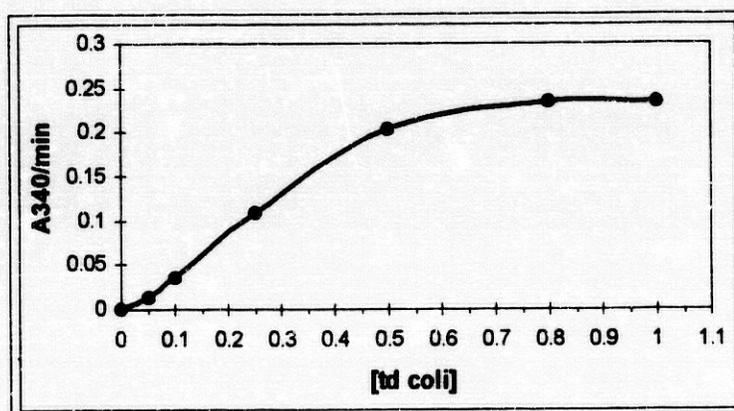
Hicimos una representación de Scatchard (gráfica 2.2d) para intentar verificar si existe una mezcla de cooperatividades, pero el resultado no es lo suficientemente claro como para afirmar la existencia de cooperatividad negativa a bajas concentraciones de modulador:



Gráfica 2.2d.- Representación de Scatchard. Parece que a bajas concentraciones de modulador (V bajas), la curva cambia de tendencia: de convexa (cooperatividad positiva) a cóncava (cooperatividad negativa).

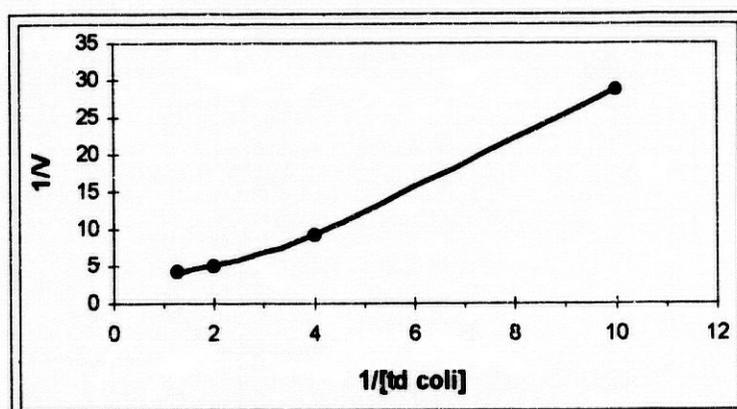
2.3 Modulación de la NADP-MDH por tiorredoxina de *E. coli*

La tiorredoxina de *E. coli* activa a la NADP-MDH (gráfica 2.3a) hasta una velocidad máxima de $0,233 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$, (dos veces y media la activación producida por la tiorredoxina *m*). La saturación se alcanza aproximadamente a $0,65 \mu\text{M}$ de tiorredoxina de *E. coli*.



Gráfica 2.3a.- Cinética de activación de la NAD-MDH purificada de hoja ($0,1325 \mu\text{M}$) con Td de *E. coli*. Se alcanza la saturación aproximadamente a $0,65 \mu\text{M}$ de Td de coli. La velocidad máxima es $0,233 A_{340 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$.

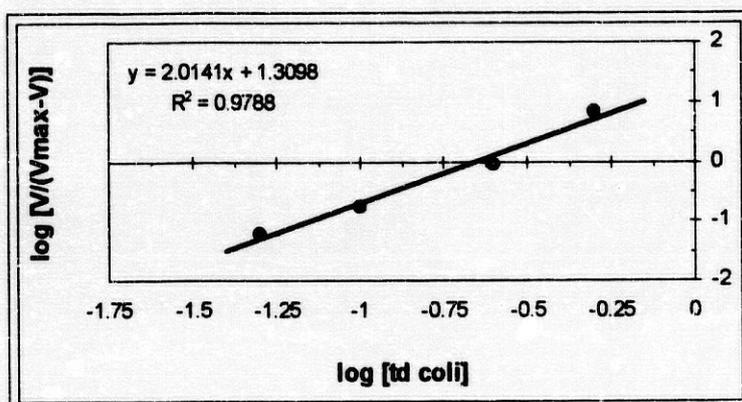
La representación de los inversos (gráfica 2.3b) muestra que existe una clara cooperatividad positiva:



Gráfica 2.3b.- Representación de inversos.

RESULTADOS

Los puntos de la representación de Hill logarítmica (gráfica 2.3c) se ajustan a una recta. Los datos calculados a partir de la ecuación de la recta son: $n_H = 2$ y $A_{0,5} = 0,22 \mu\text{M}$.



Gráfica 2.3c.- Representación de Hill logarítmica. Se muestra la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de regresión al cuadrado (coeficiente de determinación).

2.4. Modulación de la NADP-MDH por el híbrido *m/f* y DTT

El híbrido no activa a la NADP-MDH en el rango de concentraciones en el que trabajamos: 0-3 μM para el híbrido *m/f*. Hay que destacar que 3 μM es del orden de 4,5 veces la concentración de saturación con tiorredoxina de *E. coli* y más de 400 con tiorredoxina *m*.

RESULTADOS

FBPasa

NADP-MDH

	V_{max} ($ADO_{340nm} \text{ min}^{-1}$)	$A_{0,s}$	Saturación	coef. Hill	V_{max} ($ADO_{340nm} \text{ min}^{-1}$)	$A_{0,s}$	Saturación	coef. Hill
<i>Td f</i>	0,235	0,077 μM	1 μM	1,62	0,383	0,25 μM	0,6 μM	3
<i>Td m</i>	0,235	1,4 μM	20 μM	1	0,088	0,0043 μM	0,007 μM	1,32
<i>Hib m/f</i>	0,025	0,041 μM	0,075 μM	4,88	—	—	—	—
<i>Td col</i>	0,070	0,33 μM	0,7 μM	2,8	0,233	0,22 μM	0,65 μM	2

TABLA XVII.- Resumen del análisis del efecto modulador de las tiorredoxinas *m, f*, de *E. coli* y del híbrido *m/f* sobre la FBPasa cloroplastica recombinante de guisante y la NADP-MDH purificada de hoja de guisante

VII. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FBPasa-TIORREDOXINAS

Las tioredoxinas *f* y *m* activan a la FBPasa recombinante hasta la misma V_{max} , aunque si tomamos la concentración de tioredoxina necesaria para que la FBPasa alcance la velocidad máxima como medida de efectividad, la primera es del orden de 20 veces más efectiva. Nuestro grupo, a principios de los 80, describió la formación de complejos no covalentes entre la FBPasa y la tioredoxina *f* (Plá y López Gorgé, 1981). Al objeto de profundizar en el efecto modulador de las tioredoxinas sobre la FBPasa, decidimos estudiar si existía interacción entre la FBPasa y la tioredoxina *m*.

1. Mediante FPLC

Incubamos la FBPasa con tioredoxina *m* según una relación estequiométrica 1:8 en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,9, DTT 2,5 mM FBP 0,4 mM y Cl_2Ca 0,05 mM. A continuación la eluimos a través de una columna de Superosa 12 conectada a un FPLC y recogimos fracciones de 100 μ l (Materiales y Métodos XI.5.a). A estas fracciones les hicimos dos tipos de ensayos:

- a. Medida de la actividad FBPasa a pH 8,8 y exceso de Mg^{2+} para localizar en que posición sale la FBPasa.
- b. Medida de actividad FBPasa dependiente de tioredoxina sin adicionar tioredoxina *m* exógena para localizar los complejos FBPasa:Td *m*.

El resultado obtenido se muestra en el cromatograma adjunto (Fig 6). Los picos fueron detectados mediante determinaciones de actividad enzimática. En azul aparecen los picos de actividad donde habitualmente aparecen la FBPasa (el primero por la izquierda) y la tioredoxina (el segundo) cuando se pasan a través de la columna independientemente.

En verde se muestran las fracciones que en el ensayo de activación de la FBPasa en exceso de Mg^{2+} dio actividad. Esta pico corresponde a las fracciones en las que se encuentra la FBPasa cuando se pasa por la columna previa incubación con tioredoxina *m*. En rojo se ha marcado el pico que presentó actividad FBPasa dependiente de tioredoxina sin adición de tioredoxina exógena, es decir, el correspondiente a los complejos FBPasa:Td *m*. Se observa un desplazamiento de la FBPasa de su posición primitiva (en verde) hacia pesos moleculares más elevados cuando la tioredoxina *m* se fija a ella (en rojo). La masa estimada del complejo FBPasa:Td *m* es del orden de 250 kDa.

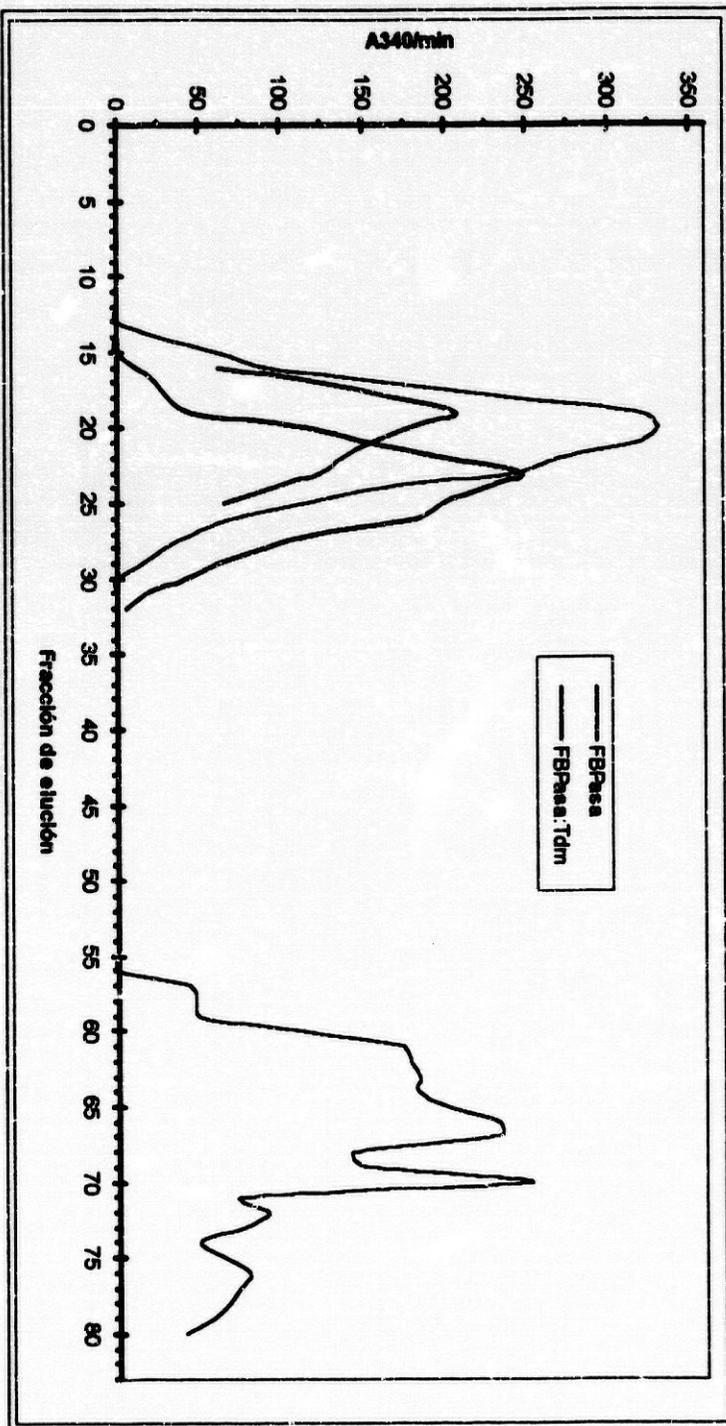


Figura 6.- Cromatograma del análisis de la interacción FB/Pasa:Tdm.

2. Mediante ELISA

Demostrada la interacción FBPasa:Tdm nos propusimos cuantificarla en la medida de lo posible, por lo que decidimos compararla con la interacción FBPasa:Td *f*. Para ello realizamos ensayos de ELISA con las tiorredoxinas *m*, *f* y el híbrido *m/f* fijadas a los pocillos. Las incubábamos con diferentes concentraciones de FBPasa para que interaccionasen y continuábamos con la ELISA detectando la FBPasa con anticuerpos anti-FBPasa (Materiales y Métodos XI.5.b). La que presenta mayor interacción con la FBPasa es la tiorredoxina *f*, seguida del híbrido. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla adjunta:

<u>% FBPasa unida a tiorredoxina:</u>				
<u>Relación FBPasa/Td</u>	<u>ng Td</u>	<u>Td <i>f</i></u>	<u>Td <i>m</i></u>	<u>Híbrido <i>m/f</i></u>
1/16	60	100	87	96
1/8	30	98	73	76
1/4	15	75	59	67
1/2	7,5	69	57	64
1/1	3,75	60	52	56
2/1	1,875	51	51	51

Consideramos 100 % al valor de absorbancia a 490 nm del pocillo de 60 ng de tiorredoxina *f*. El resto de los valores están referidos a él.

VIII. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DE LAS TIORREDOXINAS Y DEL HÍBRIDO *m/f*

Como primera aproximación para entender las cinéticas de modulación decidimos comparar las predicciones de ordenador de las propiedades fisicoquímicas de las tiorredoxinas empleadas:

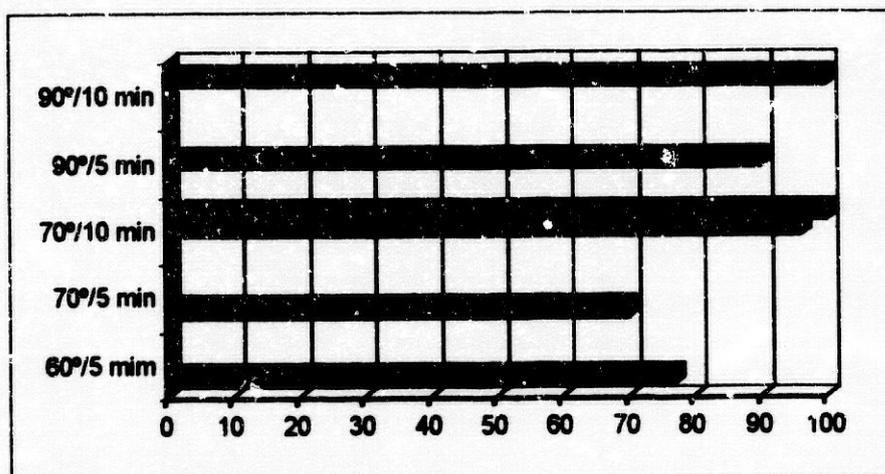
	PM	pI	carga	ϵ_{280}
Td <i>m</i>	12,1 kDa	4,96 / 5,4	-2	22370
Hib. <i>m/f</i>	12,1 kDa	4,46 / ND	-5	19810
Td <i>f</i>	12,1 kDa	7,87 / 8	1	14120
Td <i>coli</i>	11,7 kDa	4,52 / 4,4	-5	14060

PM = Peso Molecular

pI = punto Isoeléctrico teórico / experimental (ND = no determinado)

ϵ_{280} = Coeficiente de extinción ($M^{-1} cm^{-1}$)

Durante la purificación de las tiorredoxinas *m*, *f* y del híbrido observamos que presentaban diferente sensibilidad a tratamientos térmicos, siendo la más sensible la tiorredoxina *f* y la más estable la *m*:



Graf. 5.- Termosensibilidad de los extractos crudos de la tiorredoxina *m*, de la tiorredoxina *f* y del híbrido *m/f*. En abscisas se representa el porcentaje (referido al extracto crudo sin calentar) de activación de la FBPasa inducida por las tiorredoxinas tras los tratamientos térmicos indicados en ordenadas.

RESULTADOS

Al objeto de verificar la ausencia de reacciones cruzadas tiorredoxina *m*, *f* anticuerpos anti-Td *f*, anti-Td *m*; a la vez que cuantificar el grado de reconocimiento del híbrido *m/f* por ambos anticuerpos, realizamos varios ensayos de ELISA con cantidades equivalentes de todas las proteínas. El resultado obtenido fue:

	Td <i>m</i>	Hib <i>m/f</i>	Td <i>f</i>	Td <i>cr.i</i>
anti-Td <i>m</i>	100 %	15% ± 3	ND	70% ± 14
anti Td <i>f</i>	ND	21% ± 6	100 %	37%± 3

Se ha dado valor 100 % a la reacción de las tiorredoxinas *m* y *f* con sus respectivos anticuerpos. El resto de los valores están referidos a ellas. Cuando los resultados obtenidos fueron negativos ha indicado por ND (No Detectado).

IX. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS TIORREDOXINAS

Las interacciones tiorredoxina-enzima deben jugar un papel clave en el proceso de modulación. Por ello, las diferencias estructurales entre las diferentes tiorredoxinas que hemos empleado para activar a la NADP-MDH y a la FBPasa son críticas a la hora de explicar las diferentes cinéticas de modulación.

1. ANÁLISIS DE LAS ESTRUCTURAS PRIMARIAS

1.1. Porcentaje de aminoácidos y distribución de carga

En la **Tabla XVIII** se muestra la composición aminoacídica de las tiorredoxinas empleadas. La única diferencia destacable es el mayor porcentaje de aminoácidos básicos de la tiorredoxina *f*.

Cuando estudiamos la distribución de los residuos cargados a lo largo de la secuencia comprobamos que el extremo amino (desde el primer aminoácido hasta el centro activo) de todas ellas es ácido, excepto para la tiorredoxina *f*, que es neutro. Los extremos carboxilos (desde el centro activo hasta el último aminoácido) son ligeramente básicos para la de *coli*, el híbrido y la *f* y bastante más básico para la tiorredoxina *m*, que es la que presenta mayor dicotomía de carga:

	Td <i>coli</i>		Td <i>m</i>		Hib <i>m/f</i>		Td <i>f</i>	
	N	C ¹	N	C	N	C	N	C
ácidos:	8	8	6	9	6	11	4	11
básicos:	3	9	0	13	0	12	4	12

1. El extremo carboxilo (N) comprende desde el primer aminoácido hasta el centro activo. El extremo carboxilo comprende desde el centro activo hasta el último aminoácido.

RESULTADOS

	<u>Td coli</u>		<u>Td m</u>		<u>H m/f</u>		<u>Td f</u>	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Asp	11	10,2	6	5,6	10	9,2	10	9,2
Glu	5	4,6	9	8,3	7	6,4	5	4,6
Σ ácidos:	16	14,8	15	13,9	17	15,6	15	13,8
Arg	1	0,9	3	2,8	1	0,9	1	0,9
His	1	0,9	0	0	0	0	0	0
Lys	10	9,3	10	9,3	11	10	15	13,8
Σ básicos:	12	11,1	13	12,1	12	10,9	16	14,7
Ala	12	11,1	8	7,4	7	6,4	7	6,4
Gly	9	8,3	6	5,6	4	3,7	5	4,6
Ile	9	8,3	9	8,3	6	5,6	6	5,5
Leu	13	12	6	5,6	11	10,1	10	9,2
Met	1	0,9	1	0,9	0	0	1	0,9
Phe	4	3,7	3	2,8	4	3,7	5	4,6
Pro	5	4,6	7	6,5	5	4,6	4	3,7
Trp	2	1,8	3	2,8	3	2,7	2	1,8
Tyr	2	1,8	4	3,7	2	1,8	2	1,8
Val	5	4,6	11	10,2	16	14,7	15	13,8
Σ hidrofob:	62	57,4	58	53,7	58	53,2	57	52,3
Ser	3	2,8	7	6,5	7	6,4	4	3,7
Thr	6	5,6	6	5,6	4	3,7	7	6,4
Σ hidrox:	9	8,4	13	12,1	11	10,1	11	10,1
Cys	2	1,8	3	2,8	3	2,7	3	2,7
Asn	4	3,7	5	4,6	5	4,6	5	4,6
Gln	3	2,8	1	0,9	3	2,7	2	1,8
Σ aminoácidos:	108		108		109		109	
Masa molecular:	11,67 kDa		12,14 kDa		12,11 kDa		12,12 kDa	

TABLA XVIII.- Composición de las tiorredoxinas de *E. coli*, *m*, *f* y del híbrido *m/f*.

1.2. Aminoácidos implicados en la interacción tiorredoxina-proteína

Según Eklund *et al.* (1991), en la tiorredoxina de *E. coli*, los aminoácidos implicados en la interacción tiorredoxina-proteína son: K36, M37, K57, R73, G92, A93 y K96. Cuando comparamos estos residuos con los que ocupan las mismas posiciones en las moléculas de las tiorredoxinas estudiadas encontramos diferencias:

Td <i>coli</i> :	³⁰ E ¹	³⁶ K	³⁷ M	⁵⁷ K	⁷³ R	⁹² G	⁹³ A	⁹⁶ K
Td <i>m</i> :	<u>P</u>	<u>R</u>	M	K	R	G	A	<u>S</u>
H <i>m/f</i> :	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	K	<u>K</u>	G	A	<u>A</u>
Td <i>f</i> :	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	K	<u>K</u>	G	A	<u>A</u>

En rojo se muestran los aminoácidos ácidos, en azul los básicos, en verde los hidrófobos y en negrita los hidroxilados. Aparecen subrayados los aminoácidos que son diferentes a los del enzima de *E. coli*. La numeración es la que indican Eklund *et al.* (1991) (al primer aminoácido de *E. coli* le corresponde el número 1).

1. Aunque Eklund no incluye al E30 entre los aminoácidos implicados en la interacción, nosotros lo hemos incluido por ser un aminoácido cargado y por estar localizado (a nivel de estructura primaria) inmediatamente anterior al centro activo (E-W-C-G-P-C).

El análisis de la naturaleza de estos aminoácidos revela que las posiciones 36, 57, 73, 37, 92, 93 están conservadas en las cuatro moléculas: las tres primeras están ocupadas por aminoácidos básicos (carga positiva), la 37 por un aminoácido hidrófobo y las dos últimas por aminoácidos hidrófilicos. En la posición 30 (inmediatamente anterior al centro activo) aparece un aminoácido ácido (carga negativa) para la tiorredoxina de *E. coli*, para la *m* y el híbrido uno apolar (aunque sin aversión a quedar expuesto al agua) y básico (carga positiva) para la *f*. La posición 96 está ocupada por un aminoácido básico (carga positiva) en la tiorredoxina de *E. coli*, polar neutro en la *m* e hidrófilico en la tiorredoxina *f* y en el híbrido.

1.3. Perfiles de hidropatía

La hidropatía representa la inclinación hidrófila o hidrófoba de la cadena lateral de un aminoácido determinado. En términos generales, para proteínas globulares existe una clara correlación entre las regiones exteriores de su estructura y aquellas que en el perfil de hidropatía aparecen como hidrófilicas, así como entre las regiones interiores o unidas a membrana y las de naturaleza hidrófoba.

Mediante el programa SOAP (Materiales y Métodos XI.2.a), basado en la escala de hidrófobicidad de Kyte y Doolittle (1982), obtuvimos una predicción de las regiones hidrófobas e hidrófilas y una estimación de la hidrófobicidad media

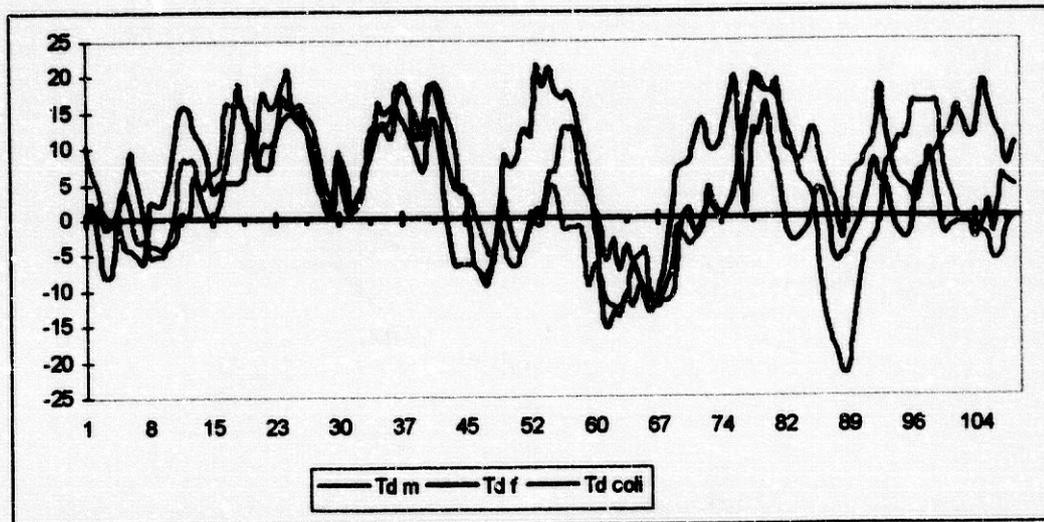
(GRAVY) de cada molécula de tiorredoxina. El valor -5 es el punto medio entre hidrofilia e hidrofobia, mayores de -5 corresponden a hidrofobia y menores de -5 a hidrofilia. En la representación gráfica (**Graf. 6**), a todos los valores predichos por el ordenador se les ha sumado $+5$ al objeto de que las regiones hidrofílicas aparezcan por debajo del eje de abscisas y las hidrofóbicas por encima de él.

Las diferencias más significativas aparecen entre los aminoácidos de las posiciones 47-60, 67-78 y en torno a la posición 89, así como en el extremo carboxilo. El perfil de hidrofobicidad del híbrido *m/f*, como cabra esperar, es análogo al de la tiorredoxina *m* hasta el centro activo y a partir de él idéntico al de la *f* (este mismo resultado aparece en los perfiles de flexibilidad y antigenicidad). A pesar de los datos de homología, la tiorredoxina *f* tiene una hidrofobicidad media análoga a la de *E. coli* (0,7 y 0,6 respectivamente) y la tiorredoxina *m* es mucho más hidrofílica ($-0,45$).

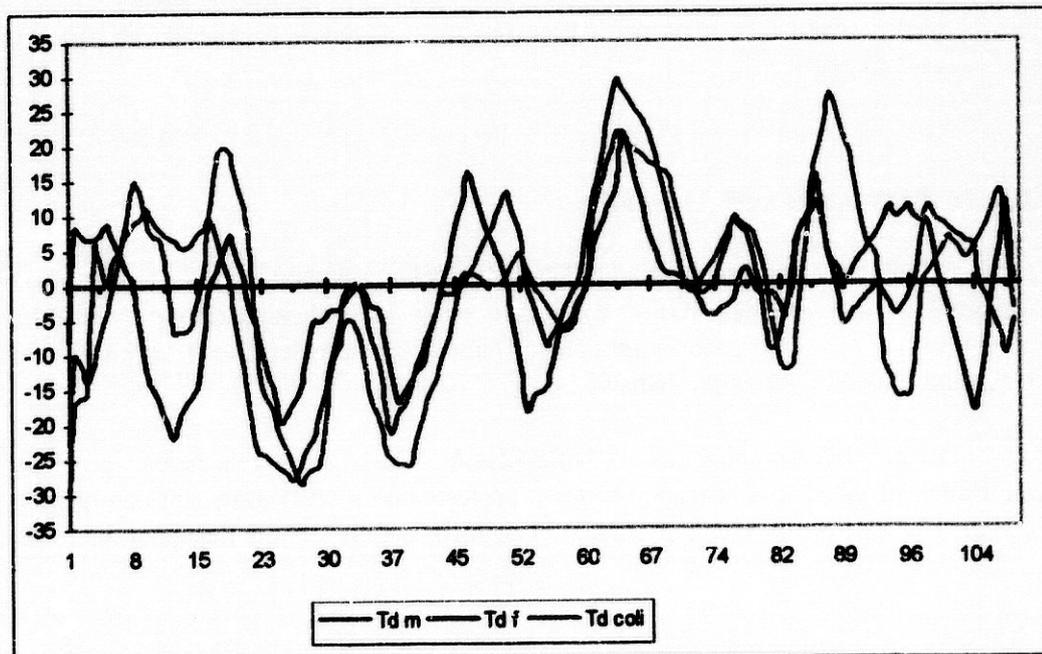
1.4. Perfiles de flexibilidad

El programa FLEXPPO (Materiales y Métodos XI.2.b) nos suministró una predicción de las regiones flexibles basada en factores de temperatura atómica (valores B o factores de Dbye-Waller) de los átomos de carbono en posición alfa de los aminoácidos (Karplus y Schulz, 1985). A todos los valores de la representación (**Graf. 7**) se les ha sumado -1 para que las regiones flexibles queden por encima del eje de abscisas y las rígidas por debajo de él.

En la **Tabla XIX** se muestran las posiciones de los cinco picos de valores más altos de flexibilidad. Se observa que aunque la tiorredoxina de *E. coli* presenta el fragmento de mayor flexibilidad, es la tiorredoxina *m* la más flexible y la *f* la más rígida.



Gráfica 6.- Perfil de hidropatía. Las zonas por encima del eje de abscisas corresponden a regiones hidrofóbicas que se localizarían hacia el interior de la molécula



Gráfica 7.- Perfil de flexibilidad. Las regiones por encima del eje de abscisas corresponden a zonas flexibles

RESULTADOS

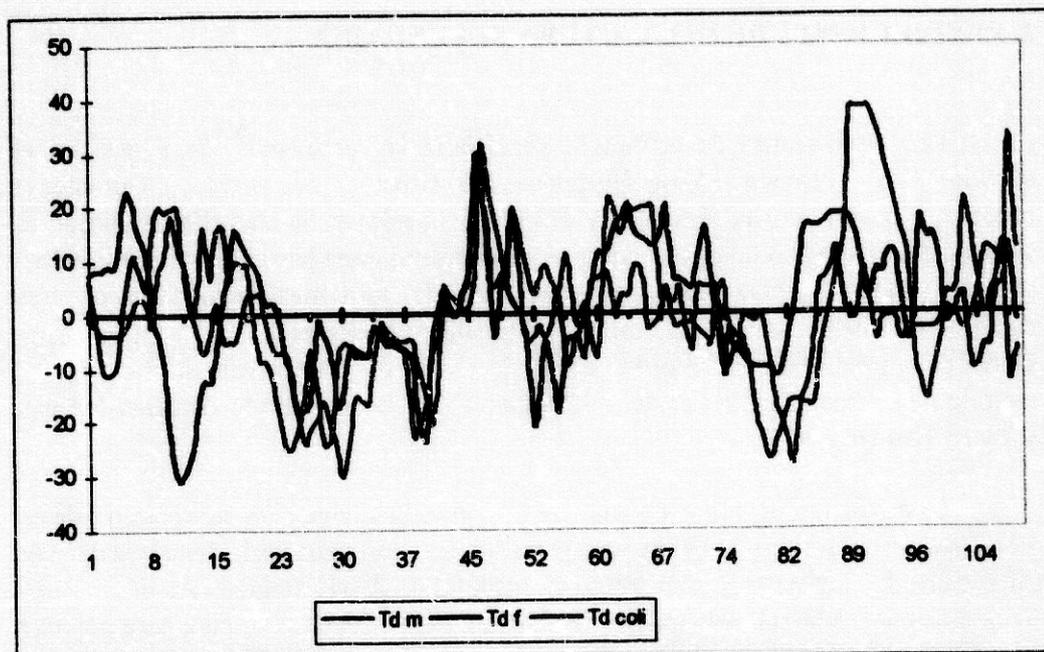
B[N]	Td coli	Td m	Hfb mf	Td f
1,103	60-66			
1,097		61-67		
1,091		83-89		
1,077			61-67	61-67
1,073		18-24	18-24	
1,063	94-100			
1,055	80-86			
1,053			45-51	45-51
1,050		8-14	8-14	
1,048		100-106		
1,045	47-54			
1,041			82-88	82-88
1,039				103-109
1,037	10-16			
1,036				89-95
<hr/>				
$\frac{\sum B[N]}{5} =$	1,061	1,071	1,059	1,049

TABLA XIX.- Valores de flexibilidad (se define la rigidez como $B[N] \leq 1$) En rojo, verde y azul se destacan el primero, segundo y tercero respectivamente. La numeración hace referencia al primer aminoácido de cada secuencia.

1.5. Predicciones de antigenicidad

Mediante el programa ANTIGEN (Materiales y Métodos XI.2.c) obtuvimos un perfil de antigenicidad (Graf. 8) basado en la hidrofiliidad (Tjopp y Woods, 1981), ya que los determinantes antigénicos deben corresponder a regiones exteriores expuestas al medio, y por ello hidrofílicas.

El programa suministra una tabla (Tabla XX) con los tres picos de mayor hidrofiliidad, pero solo el mayor de ellos corresponde a un determinante antigénico con un 100% de probabilidad de acierto. Los otros dos tienen una fiabilidad del 67%.



Gráfica 8.- Perfil de antigenicidad. Las regiones por encima del eje de abscisas corresponden a zonas hidrofílicas que pueden ser antigénicas. La predicción para el híbrido *m/f*, es como la tiorredoxina *m* hasta el centro activo y como la *f* a partir de él.

Puntuación	Td coli	Td m	Híb. <i>m/f</i>	Td f
2,05		85-90		
1,8		101-106		
1,62	43-48	44-49		
1,28			44-49	44-49
1,23	96-101			
1,22				5-11
1,17			60-70	65-70
1,15	47-52		61-66	

TABLA XX.- Predicciones de antigenicidad. Se muestra la localización de los picos de antigenicidad y la puntuación asignada a cada uno de ellos. En negrita se resaltan los de mayor puntuación, que son los que corresponden a un 100% de probabilidad de ser determinantes antigénicos.

2. PREDICCIONES DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

Las predicciones de estructura secundaria las obtuvimos vía E-mail en el servidor PredictProtein@EMBL-Heidelberg.DE (Rost *et al.*, 1994). Durante el proceso, los programas HaxHom y HSSP (Schneider y Sander, 1991) alinean la secuencia con otras homólogas y sobre el alineamiento completo el programa PDHsec (Rost y Sander, 1993) realiza la predicción de estructura secundaria en tres categorías: α -hélice, lámina β y loop (Materiales y Métodos XI.3.a). La precisión global de la predicción es del orden del 72 % (Junio de 1994) frente al 56-57 % del método de Garnier (Garnier *et al.*, 1978) y al 47-57 % del método de Chou-Fasman (Chou y Fasman, 1978).

La estructura de la tiorredoxina de *E. coli* es bien conocida: fue cristalizada en 1974 (Söderberg *et al.*, 1974) y su estructura tridimensional determinada por difracción de rayos x a una resolución de 2,8 Å (Holmgren *et al.*, 1975). Recientemente se ha refinado hasta 1,68 Å (Katti *et al.*, 1990). Por ello, para conocer la fiabilidad de nuestros resultados hicimos la predicción de la tiorredoxina de *E. coli* y la comparamos con los datos publicados por Eklund *et al.* (1991).

La predicción de estructura secundaria (Tabla XXI) para la tiorredoxina de *E. coli* se aproxima bastante a los datos cristalográficos, excepto en la región del centro activo, donde predice como loop lo que corresponde a parte de la α_2 , y las estructuras α_3 y β_5 , que las considera loops. La zona 3_{10} la predice correctamente como α -hélice porque el programa considera como tal a éste tipo de estructuras.

A nivel de estructura secundaria, las diferencias más destacables se presentan en la región comprendida entre α_3 y β_5 (que sí aparece correctamente predicha para el híbrido y la tiorredoxina *f*), pues de acuerdo con las predicciones, ni el híbrido ni las tiorredoxinas *m* y *f* presentan estructura del tipo 3_{10} . En el caso de la tiorredoxina *m*, esta zona correspondería a un loop y en el caso del híbrido y la tiorredoxina *f*, además de loop, parte de los aminoácidos solaparían con β_4 , por lo que ésta sería más larga.

	1	β_1	α_1	β_2	α_2	50	
Td coli	.SDKIIHLETD	DSFDTDVLKA	.DGA IL VDFW	AEWCGPCRMI	APILDEIADK		
Td m	AVNEVQVVN.	DSSWDELVIG	SETPVLVDFW	APWCGPCRMI	APIIDELAKE		
H m/f	AVNEVQVVN.	DSSWDELVIG	SETPVLVDFW	APWCGPCKVI	APLYEELSQK		
Td f	.VGKVTEVNR	DTFWPIVMAA	GDKTVVLDMF	TKWCGPCKVI	APLYEELSQK		
	51	β_3	α_3	β_{10}	β_4	β_5	100
Td coli	YQGKLTVAKL	NIDQNPQT.A	PKYGIRGIPT	LLLFKNGEVA	ATKVGALSSKG		
Td m	YAGKIKCYKL	NTDESPNT.A	TKYGIRSIPT	VLFFKNGERK	DSVIGAVPKA		
H m/f	YLDVV.FLKL	DCNQDNKSLA	KELGIKVVPT	FKILKDNKIV	KEVTGAKFDD		
Td f	YLDVV.FLKL	DCNQDNKSLA	KELGIKVVPT	FKILKDNKIV	KEVTGAKFDD		
	101	α_4	101	β_α	β_β	β_L	
Td coli	QLKEFLDANL	A....	32,4	22,2	45,4		
Td m	TLSEKVEKYI	27,8	27,8	44,4		
H m/f	LVAAIDTVRS	S....	28,2	35,5	36,4		
Td f	LVAAIDTVRS	S....	28,4	35,8	35,8		

TABLA XXI.- Predicción de estructura secundaria. Sobre el alineamiento se muestra en azul las regiones de α -hélice, en rojo las estructuras β y en negrita las zonas de loop. Los aminoácidos que se destacan en azul grueso, rojo grueso y verde presentan una fiabilidad de predicción de α -hélice, estructura β y loop respectivamente del 83%. Sobre la secuencia de la tiorredoxina de *E. coli* se muestra su estructura secundaria deducida a partir de la estructura tridimensional (datos cristalográficos).

3. PREDICCIONES DE ESTRUCTURAS TERCIARIAS

Los modelos de estructura terciaria los obtuvimos vía internet en el servidor SWISS-MODEL. Básicamente, el proceso consiste en realizar una búsqueda de secuencias homólogas de estructura tridimensional conocida y en base a sus coordenadas espaciales crear un modelo de esqueleto sobre el que se superpone la secuencia a modelar (Materiales y Métodos XII.3.b).

Los modelos de las tiorredoxinas se hicieron sobre la base de las estructuras de la tiorredoxina de *E. coli* archivadas en el PDB con las claves de acceso: 1TRX (Dyson *et al.* 1990), 3TRX (Forman-Kay, 1991); 2TIR y 1THO (Nikkola *et al.* 1993), y la humana 1MDJ (Quin *et al.*, 1995). En la tabla adjunta se resumen las características de los modelos:

	td <i>m</i>	td <i>f</i>	H <i>m/f</i>	td <i>coli</i>
aa modelados:	104 (96,3%)	99 (90,8%)	104 (95,4%)	108 (100%)
primer aa:	³ Asn	⁸ Asn	³ Asn	¹ Ser
último aa:	¹⁰² Glu	¹⁰⁶ Val	¹⁰⁶ Val	¹⁰⁸ Ala
α-hélices:	4	4	3	4
estructuras β:	5	4	4	5
Ptes. disulfuro:	(³³ Cys- ³⁶ Cys)	(³³ Cys- ³⁶ Cys)	(³³ Cys- ³⁶ Cys)	(³² Cys- ³⁵ Cys)
Ptes. hidrógeno:	78	71	81	89

Para la tiorredoxina de *E. coli* el modelo se ajusta perfectamente a los datos experimentales: 4 hélices α y 5 estructuras β y las Cys del centro activo está localizado en el seno de α2.

Los modelos de estructura tridimensional de las tiorredoxinas *m* y *f* resuelven respectivamente el 96% y el 91% de la secuencia y el resultado se parece mucho al de *E. coli* (Lámina I). En el caso de la tiorredoxina *f* aparecen algunas diferencias significativas: la molécula comienza con una hélice α larga, que sustituye a la estructura β1 y α1, y el centro activo no está en α2, que comienza después de ³⁶Cys.

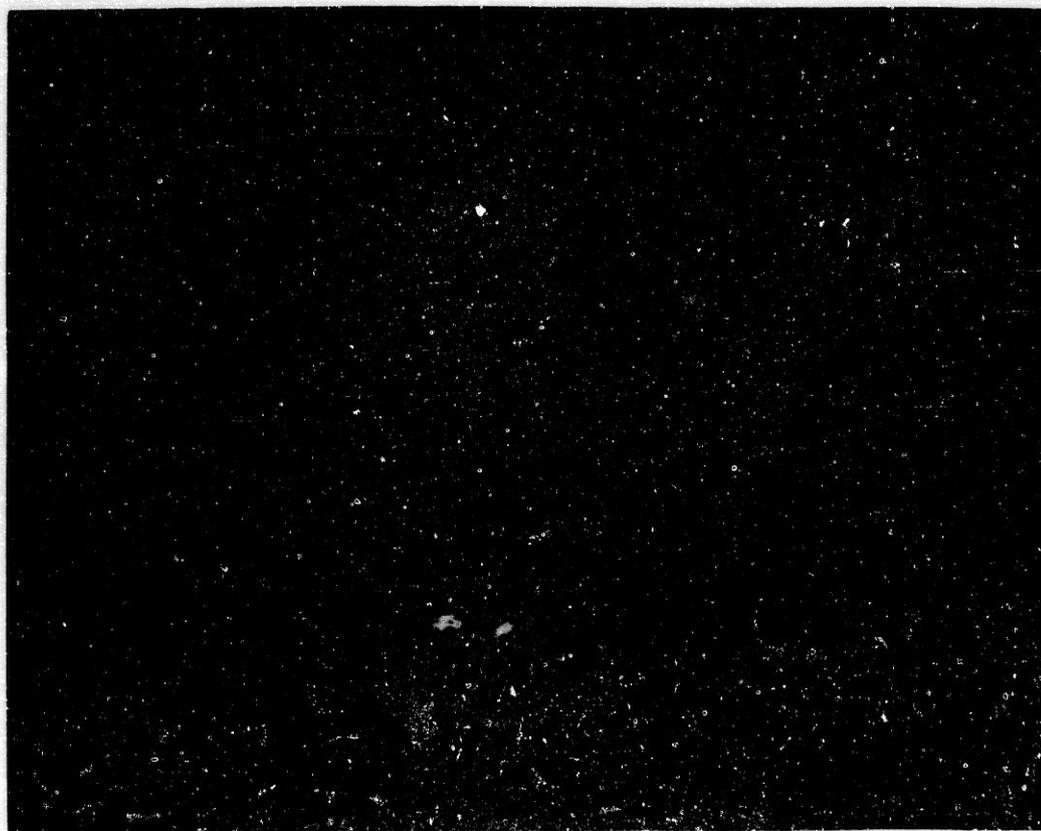


LÁMINA I. Representación esquemática de los modelos de estructura terciaria de las tiorredoxinas *m. f.* de *E. coli* y del híbrido *m/f*. Las barras verdes muestran la localización de los residuos de Cys. En azul se destacan las α -hélices y en rojo las estructuras β . Las moléculas se han orientado con el centro activo en la parte inferior izquierda.

El resultado más peculiar es el del híbrido: modelamos el 95% de la secuencia y la estructura presenta importantes variaciones: no existe $\beta 1$ y $\alpha 4$ aparece perpendicular a $\alpha 2$. Además, no existe conexión entre ^{93}Gly ($\beta 5$) y ^{94}Ala ($\alpha 4$). El centro activo, como en la tiorredoxina *f*, no está en $\alpha 2$.

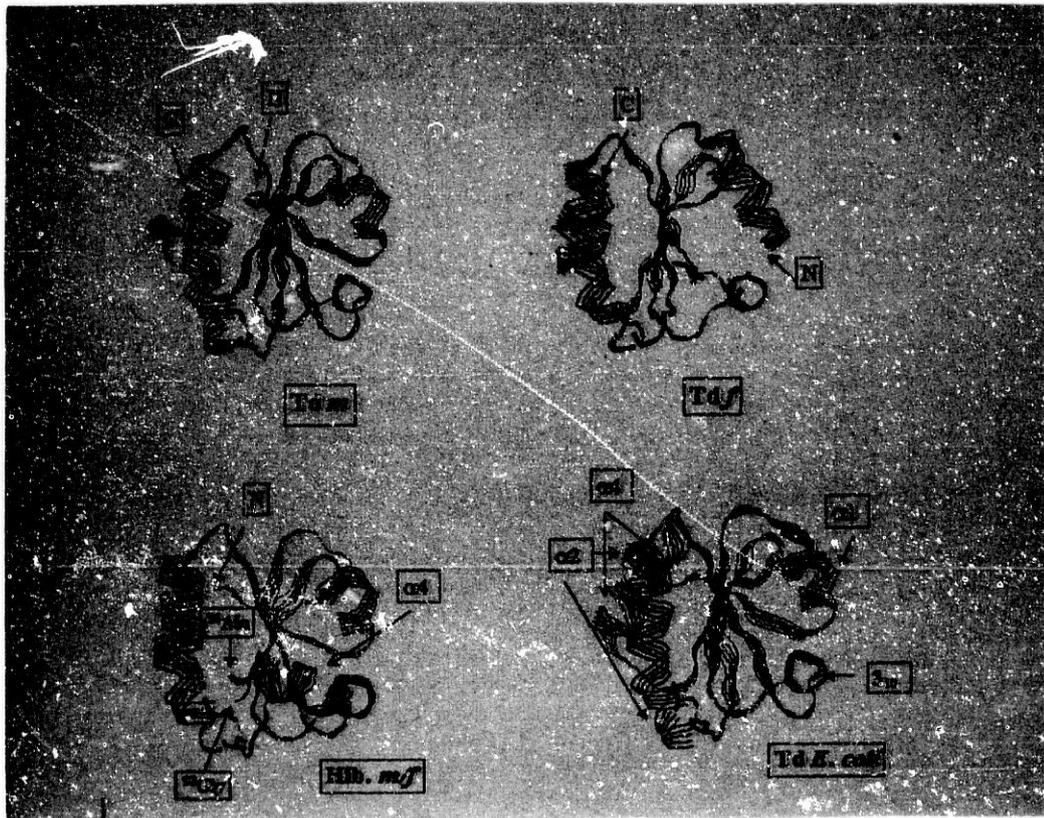
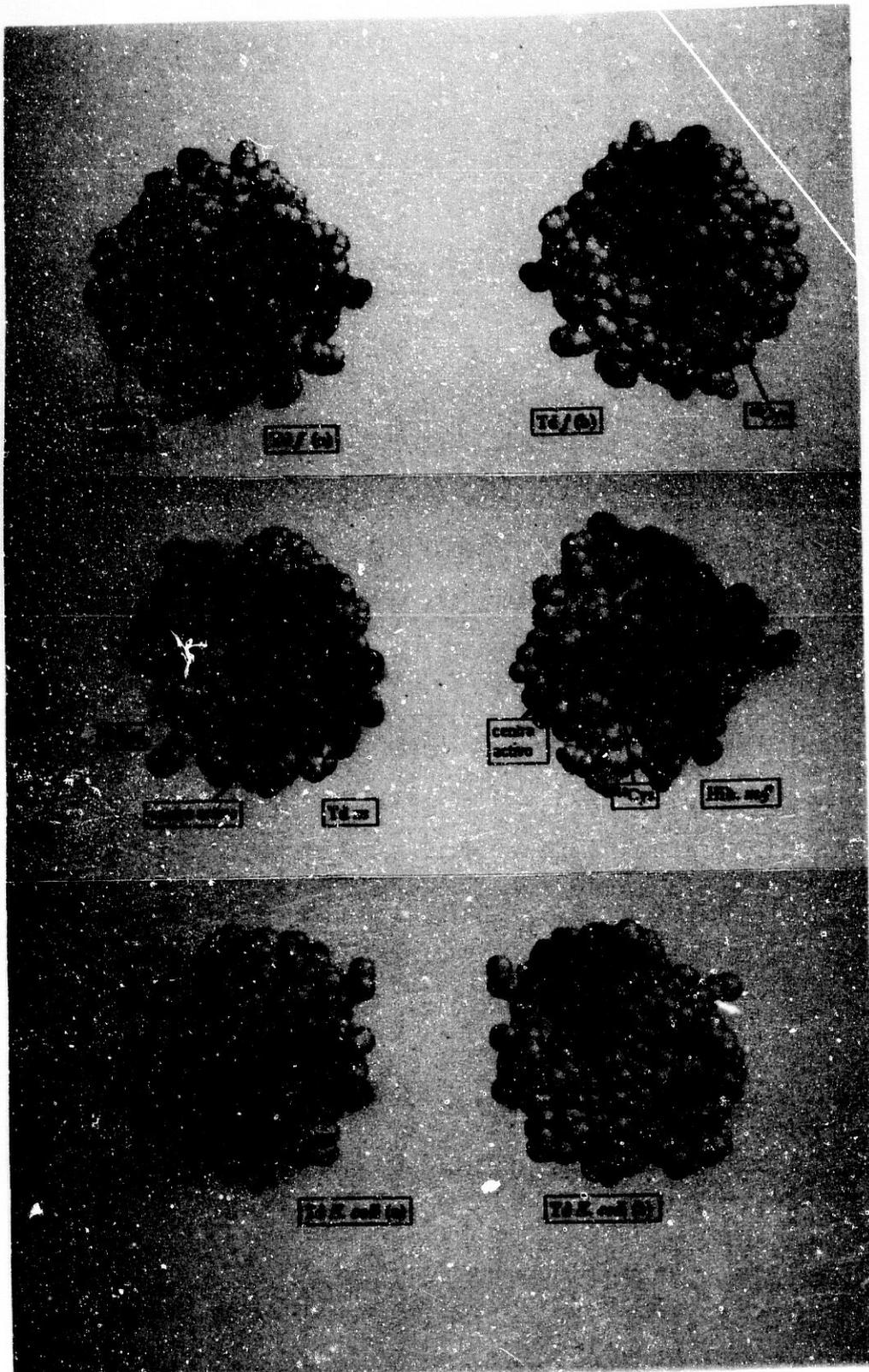


LÁMINA I.. Representación esquemática de los modelos de estructura terciaria de las tiorredoxinas *m. f.* de *E. coli* y del híbrido *m.f.* Las barras verdes muestran la localización de los residuos de Cys. En azul se destacan las α -hélices y en rojo las estructuras β . Las moléculas se han orientado con el centro activo en la parte inferior izquierda.

El resultado más peculiar es el del híbrido. modelamos el 95% de la secuencia y la estructura presenta importantes variaciones: no existe $\beta 1$ y $\alpha 4$ aparece perpendicular a $\alpha 2$. Además, no existe conexión entre ^{93}Gly ($\beta 5$) y ^{94}Ala ($\alpha 4$). El centro activo, como en la tiorredoxina *f.* no está en $\alpha 2$.



Cuando analizamos la estructura tridimensional de las moléculas observamos que todas ellas tienen un aspecto discoidal, más gruesas en la zona central, con el centro activo situado en las proximidades del borde de una de las caras.

Tratamos de ubicar en los modelos las zonas donde los perfiles de hidrofobicidad presentan diferencias (Lámina II). La región en torno al residuo 89, donde las diferencias de hidrofobicidad son más acusadas, y la región determinada por los residuos 67-78 se localizan muy cerca del centro activo, y algo más alejada, próxima a la tercera Cys de las tiorredoxina *m, f*, y del híbrido (la de *E. coli* no tiene tercera Cys), la zona determinada por los residuos 47-60.

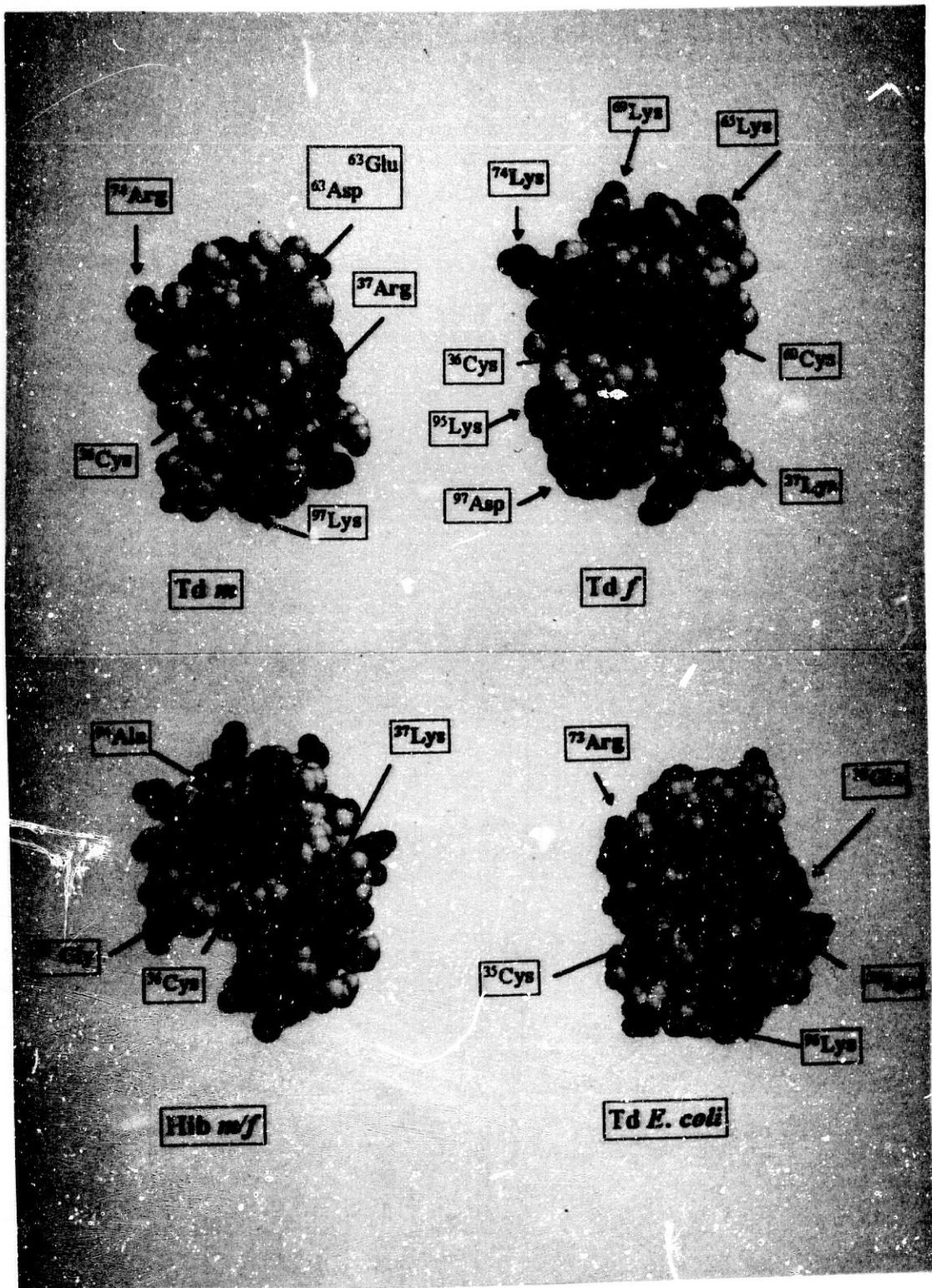
LÁMINA II.- Localización, sobre los modelos, de las zonas donde se aparecían mayores diferencias en las predicciones de hidrofobicidad. Se ha coloreado en rojo la región en torno al residuo 89, en violeta la determinada por los residuos 67-78 y en azul la correspondiente a los residuos 47-60. Las formas (b) son resultado de rotar 180° sobre el eje y las formas (a). Obsérvese la localización de la tercera Cys

Al objeto de estudiar el centro activo y las cargas en torno a él, orientamos las estructuras de tal forma que el anillo del ^{32}Trp quedase sobre el plano definido por los ejes yz (Lámina III). La ^{36}Cys aparece en el lado izquierdo de la molécula, en primer plano, apoyada sobre la ^{34}Pro y ocultando a la ^{33}Cys , la cual queda más interna. Ambas Cys están rodeadas por aminoácidos hidrófobos y aminoácidos no cargados. Aparecen dos puntos de carga negativa conservados. El primero de ellos, ocupado por ^{37}Arg (tioredoxinas *m*) o por ^{37}Lys (híbrido y tioredoxina *f* y ^{36}Lys en *E. coli*) está a la derecha del plano formado por los ejes xy , en la cara opuesta a donde se encuentra el centro activo. El segundo, a la izquierda, en la misma cara del centro activo, está ocupada por ^{74}Arg (tioredoxinas *m*) -para la de *E. coli* ^{73}Arg - o por ^{74}Lys (híbrido y tioredoxina *f*).

Al estudiar la distribución de cargas en torno al centro activo comprobamos que es característica de cada molécula. La tioredoxina *f* presenta en la parte superior una zona cargada negativamente ($^{65}\text{Lys}/^{69}\text{Lys}$) y la *m* una zona cargada positivamente ($^{62}\text{Asp}/^{63}\text{Glu}$). Dicha zona, en el enzima de *E. coli* está ocupada por aminoácidos polares no cargados. En la cara opuesta al centro activo y cerca de él aparece la tercera Cys de la tioredoxina *f*. Esta cara es muy rica en aminoácidos cargados en el caso de la molécula de *E. coli*. En las tioredoxinas *m* y de *E. coli* aparece una carga positiva en el extremo inferior del eje y (^{97}Lys y ^{96}Lys respectivamente).

El lóbulo inferior izquierdo de la tioredoxina *f* es rico en aminoácidos cargados y en el híbrido esta zona de la molécula no existe. Este hecho es consecuencia de la falta de conexión entre ^{93}Gly y ^{94}Ala , que origina la anómala posición de la estructura $\alpha 4$.

LÁMINA III.- Análisis de los aminoácidos que rodean al centro activo. En azul aparecen los aminoácidos básicos (Lys, Arg, His), en rojo los ácidos (Glu, Asp) y en celeste los hidrófobos (Phe, Val, Leu, Met, Ile, Trp, Tyr). Los nombres de los aminoácidos en **negrita** indican **cargas conservadas**.



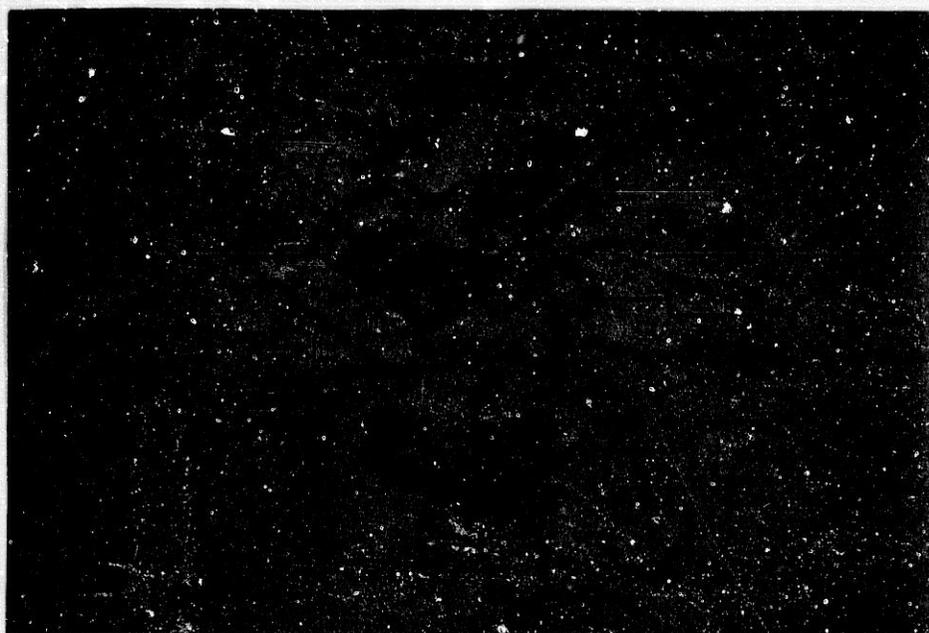


LÁMINA IV.- Distribución de estructura secundaria en el modelo de la FBPassa. Como barras verdes se muestra la localización de los residuos de Cys, en azul se destacan las α -hélices y en rojo las estructuras β . En negro aparece la ^{299}Lys descrita como esencial para la actividad catalítica (Sahrawy *et al.*, 1995).

X. MODELO DE LA FBPassa CLOROPLASTÍDICA DE GUISANTE

El modelo se basa en las estructuras de la FBPassa de riñón de cerdo y en la FBPassa cloroplastídica de espinaca registradas en el PDB con las referencias: 1FBP (Ke *et al.*, 1990), 5FBP (Ke *et al.*, 1991a), 1FBC (Zhang *et al.*, 1993), 1FRP (Xue *et al.*, 1994), 1FPD (Villeret *et al.*, 1995b) y 1SPI (Villeret *et al.*, 1995a). Hemos logrado resolver el 98% de la secuencia (desde ^8Ser hasta ^{356}Leu) y el resultado es coherente con la estructura de la cloroplastídica de espinaca (Lámina IV). Predice la aparición de un puente disulfuro entre ^{49}Cys - ^{190}Cys pero no aclara cuales de las Cys del loop están implicadas en el responsable de la modulación por tiorredoxina. La ^{92}Cys , de acuerdo con la predicción, se localiza con el grupo sulfidriilo expuesto en la base del trapecoide, donde tienen lugar las interacciones entre las subunidades. El puente disulfuro ^{49}Cys - ^{190}Cys queda en el interior de la molécula.

De acuerdo con el modelo, la subunidad tiene forma trapezoidal, quedando las Cys 153, 173 y 178 en la arista opuesta al extremo amino. La distribución de cargas es asimétrica, pues la cara donde se localiza la ^{299}Lys , descrita como esencial para la actividad FBPassa (Sahrawy *et al.*, 1995), es la de mayor densidad de carga, existiendo una elevada concentración de aminoácidos básicos en torno a ella (Lámina V).

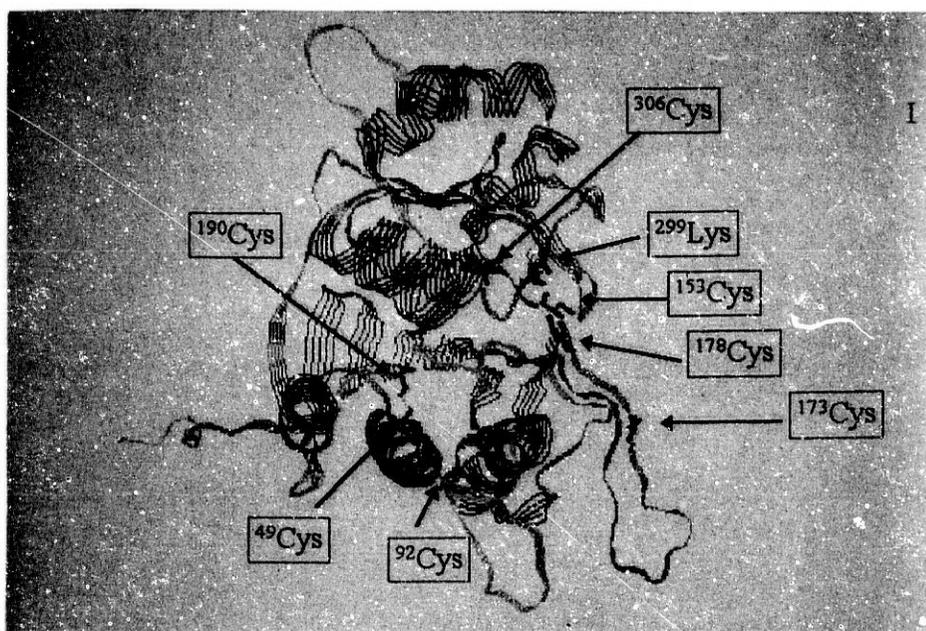


LÁMINA IV.- Distribución de estructura secundaria en el modelo de la FBPasa. Como barras verdes se muestra la localización de los residuos de Cys, en azul se destacan las α -hélices y en rojo las estructuras β . En negro aparece la ^{299}Lys descrita como esencial para la actividad catalítica (Sahrawy *et al.*, 1995).

X. MODELO DE LA FBPasa CLOROPLASTÍDICA DE GUISANTE

El modelo se basa en las estructuras de la FBPasa de riñón de cerdo y en la FBPasa cloroplastídica de espinaca registradas en el PDB con las referencias: 1FBP (Ke *et al.*, 1990), 5FBP (Ke *et al.*, 1991a), 1FBC (Zhang *et al.*, 1993), 1FRP (Xue *et al.*, 1994), 1FPD (Villeret *et al.*, 1995b) y 1SPI (Villeret *et al.*, 1995a). Hemos logrado resolver el 98% de la secuencia (desde ^8Ser hasta ^{356}Leu) y el resultado es coherente con la estructura de la cloroplastídica de espinaca (Lámina IV). Predice la aparición de un puente disulfuro entre ^{49}Cys - ^{190}Cys pero no aclara cuales de las Cys del loop están implicadas en el responsable de la modulación por tioredoxina. La ^{92}Cys , de acuerdo con la predicción, se localiza con el grupo sulfidrilo expuesto en la base del trapecoide, donde tienen lugar las interacciones entre las subunidades. El puente disulfuro ^{49}Cys - ^{190}Cys queda en el interior de la molécula.

De acuerdo con el modelo, la subunidad tiene forma trapezoidal, quedando las Cys 153, 173 y 178 en la arista opuesta al extremo amino. La distribución de cargas es asimétrica, pues la cara donde se localiza la ^{299}Lys , descrita como esencial para la actividad FBPasa (Sahrawy *et al.*, 1995), es la de mayor densidad de carga, existiendo una elevada concentración de aminoácidos básicos en torno a ella (Lámina V).

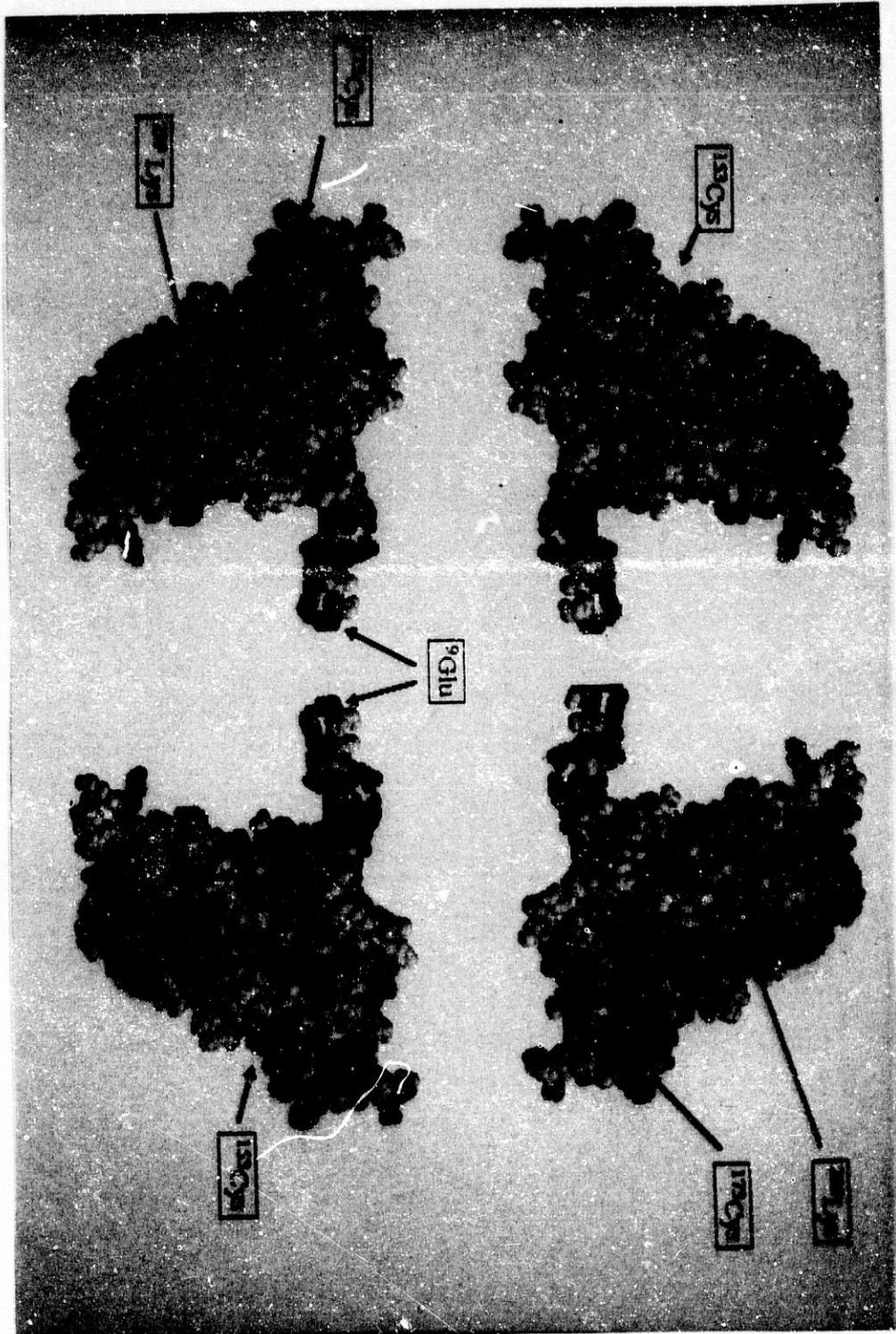


LÁMINA V.- Modelo de como se disponen los cuatro monómeros de la FBPasa cloroplastídica de guisante. En azul aparecen los aminoácidos básicos, en rojo los ácidos y en celeste los hidrófobos. En negro se destaca la ^{133}Lys , que ha sido descrita como fundamental para la actividad FBPasa (Sahrawy *et al.*, 1995a) y en amarillo el átomo de azufre de las Cys.

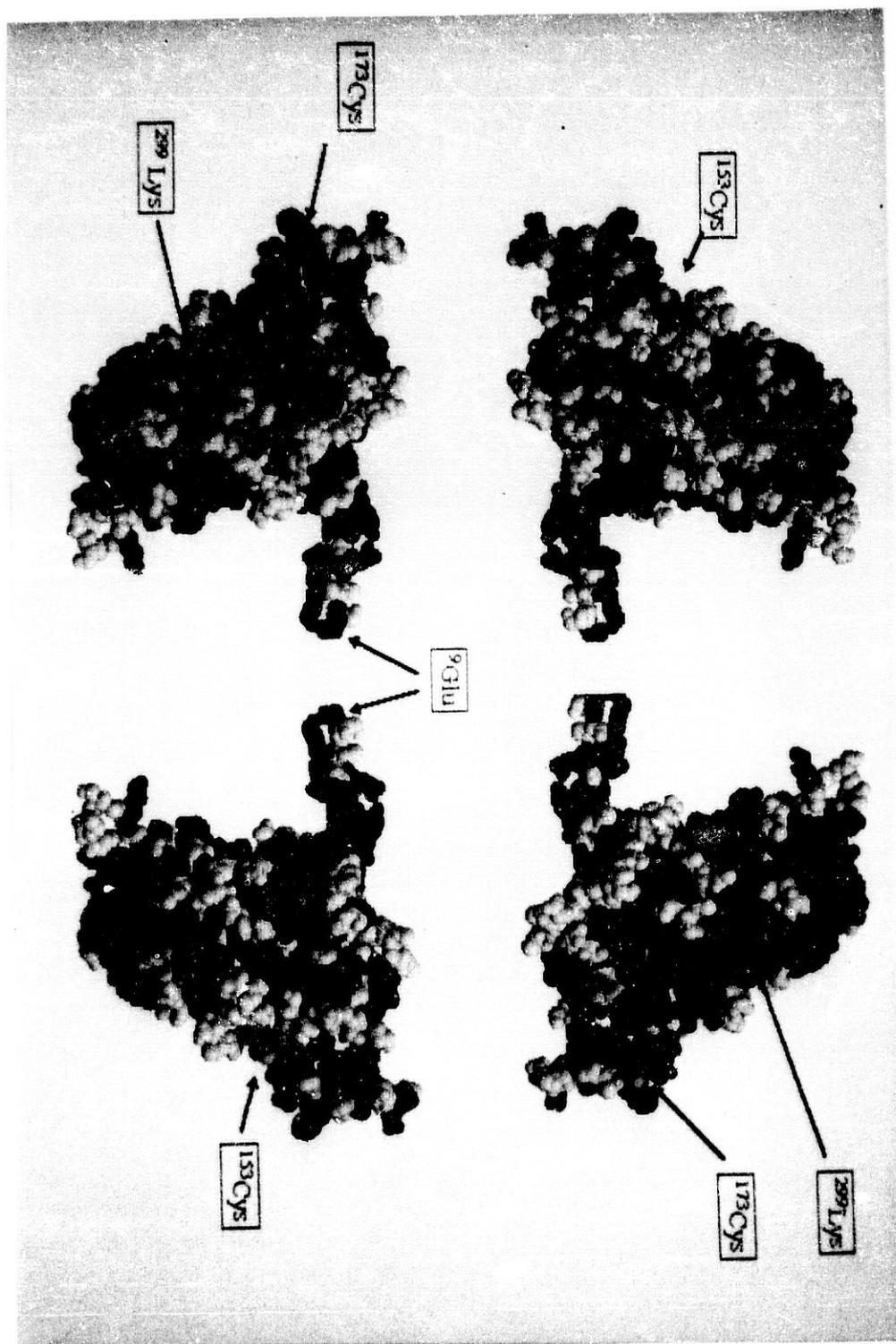


LÁMINA V.- Modelo de como se disponen los cuatro monómeros de la FBPasa cloroplastídica de guisante. En azul aparecen los aminoácidos básicos, en rojo los ácidos y en celeste los hidrófobos. En negro se destaca la ²⁹⁹Lys, que ha sido descrita como fundamental para la actividad FBPasa (Sahrawy *et al.*, 1995a) y en amarillo el átomo de azufre de las Cys.



LÁMINA VI.- Detalle de la región de baja homología y alta concentración de aminoácidos ácidos. En celeste aparece el fragmento correspondiente a ^{149}Pro - ^{167}Gly . Los aminoácidos ácidos se destacan en rojo y el azufre de las Cys en amarillo.

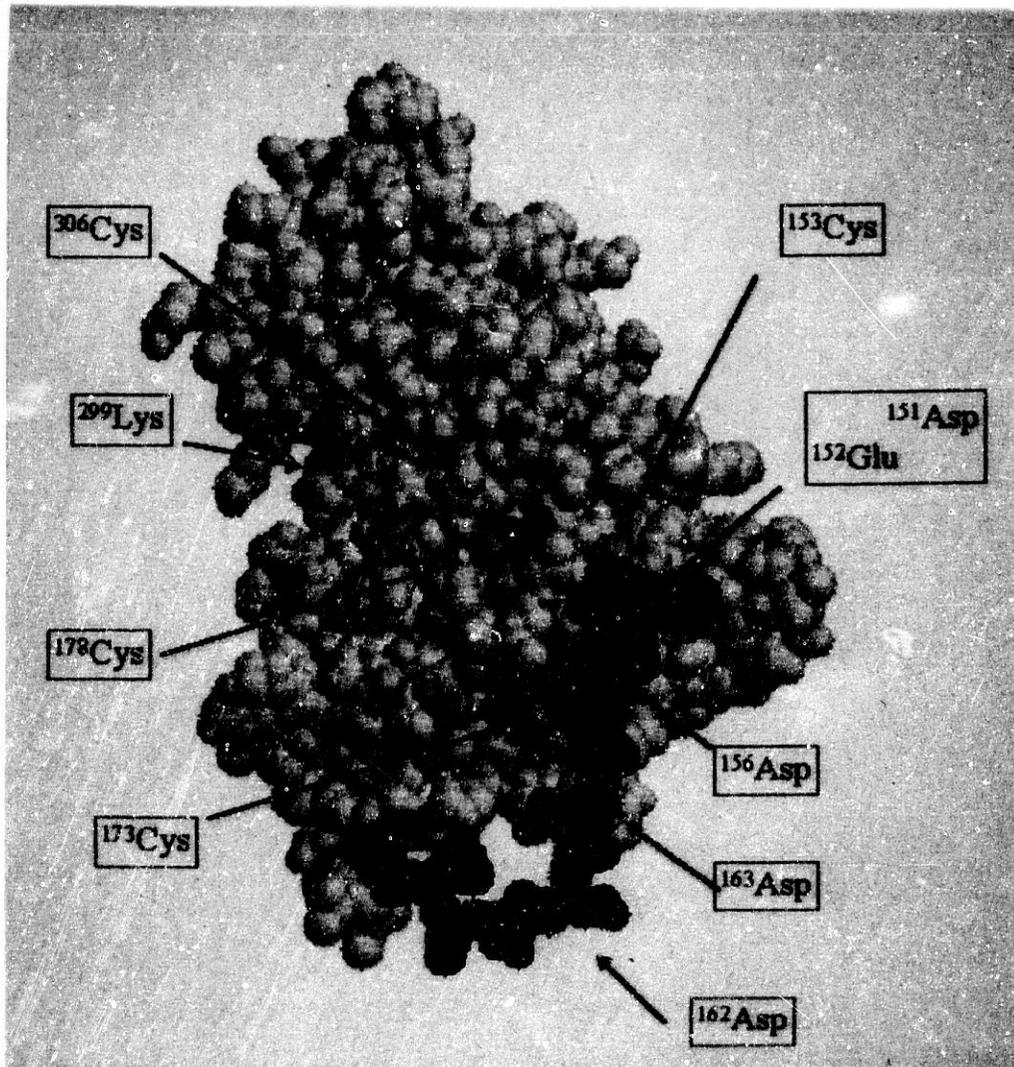
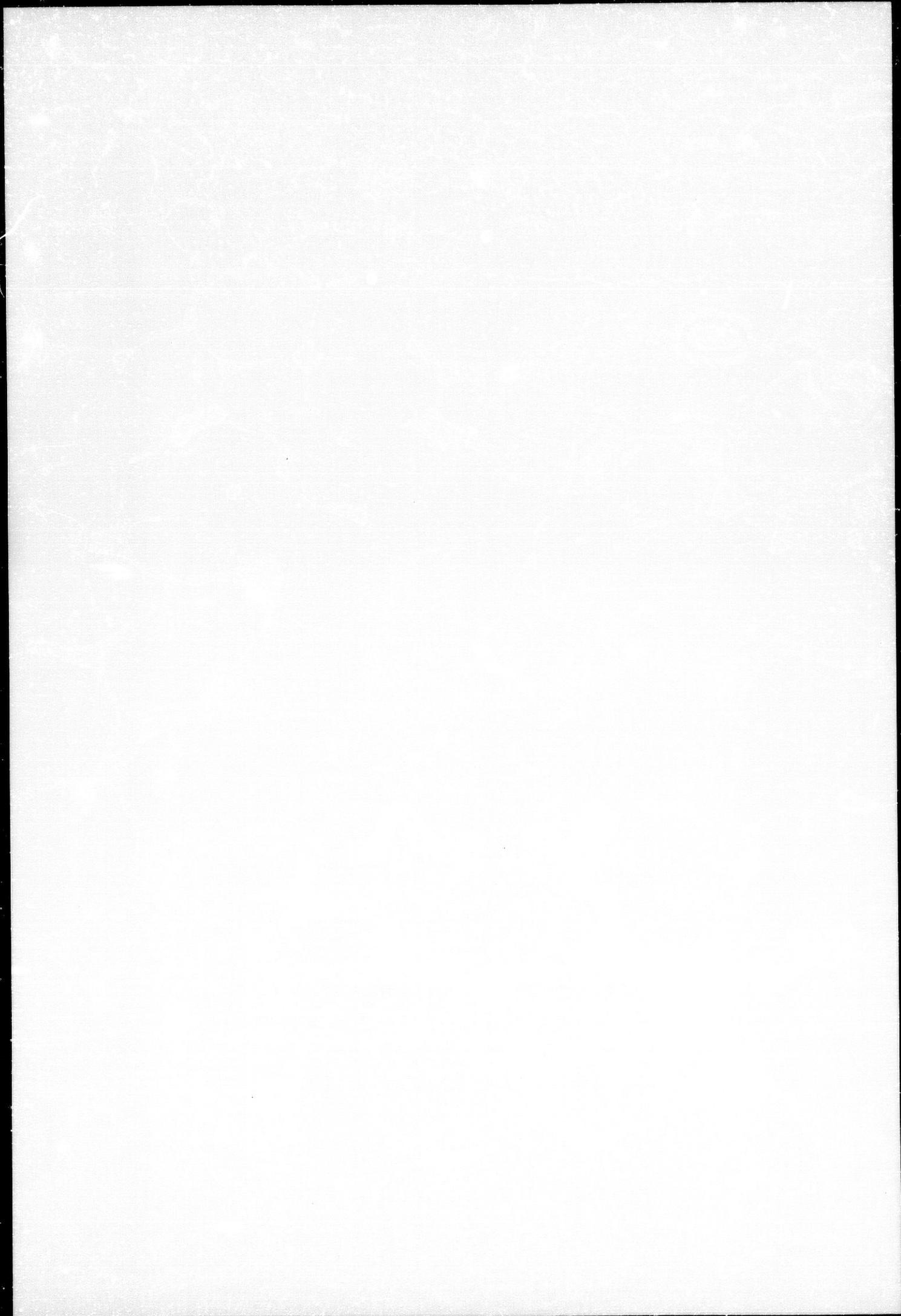


LÁMINA VI.- Detalle de la región de baja homología y alta concentración de aminoácidos ácidos. En celeste aparece el fragmento correspondiente a ¹⁴⁹Pro-¹⁶⁷Gly. Los aminoácidos ácidos se destacan en rojo y el azufre de las Cys en amarillo.

Al estudiar con más detalle la posición de las Cys comprobamos que las ^{153}Cys y ^{173}Cys están muy próximas entre si y en contacto directo con la zona rica en aminoácidos ácidos, implicada en la interacción con la tiorredoxina y donde la homología con las otras FBPasas cloroplastidicas prácticamente desaparece (Hermoso *et al.* 1995), mientras que la ^{178}Cys queda más alejada, aunque es esta última la más próxima a la ^{153}Cys (Lámina VI).



DISCUSIÓN



Tiorredoxina *m*

A partir de una genoteca de ADNc de guisante hemos aislado cinco clones que son reconocidos por anticuerpos anti-Td *m* preparados a partir de enzima purificada de hoja de guisante. Todos ellos hibridan entre sí, por lo que decidimos secuenciar al que denominamos T₃. El sistema de secuenciación empleado nos ha permitido trabajar más eficientemente (secuenciamos en ambos sentidos a la vez) y evitar la utilización de radiactividad. La secuencia obtenida es altamente fiable (cada fragmento se secuenció un mínimo de tres veces), aunque no hemos podido resolver dos ambigüedades: el nucleótido 399 puede ser A ó T y el 792 G ó T.

El nucleótido 399 forma triplete con GG. Debido a la degeneración del código genético, GG siempre codifica glicina, independientemente del nucleótido que ocupe la tercera posición, por lo que esta ambigüedad no es relevante. La ambigüedad en 792, tampoco altera el resultado final de la secuencia aminoacídica, pues está localizada por detrás del codón de parada y no se traduce.

El análisis de la secuencia (Resultados I.3 Tabla III) pone de manifiesto que hemos aislado el clon completo, hasta el comienzo de la cola de poliA, y que codifica la secuencia característica del centro activo de las tiorredoxinas (WCGPC). La longitud de la secuencia completa es de 172 aminoácidos. Al compararla con otras tiorredoxinas, comprobamos que el extremo amino de la secuencia no presenta homología con ninguna de ellas, como suele suceder con los péptidos de tránsito, y que el resto de la secuencia tiene un 72 % de identidad con la tiorredoxina *m* de espinaca; 60% con la *m* de *Chlamydomonas sp.*; 50% con la *m* de *Anacystis sp.* y solo un 34% y un 27% con las tiorredoxinas *f* de espinaca y guisante (López Jaramillo *et al.* 1994). Otro dato destacable es la presencia del motivo FWA, encontrado en tiorredoxinas bacterianas (Meng *et al.*, 1981; Höög, *et al.*, 1985; Gleason *et al.*, 1985; Mathews *et al.*, 1987; Johson *et al.*, 1987; Clement-Metral *et al.*, 1988; Johson *et al.*, 1988; McFarlan, *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1989; Alam *et al.*, 1989) y en las tiorredoxinas *m* de espinaca (Wedel *et al.*, 1992) y de *Chlamydomonas reinhardtii* (Decottignies *et al.*, 1991), y no en las de tipo *h* o *f* (Eklund *et al.*, 1991). A diferencia de la *m* de espinaca, la de guisante posee una tercera cisteína, como las *f* de espinaca (Schürmann *et al.*, 1981; Aguilar *et al.*, 1992) y guisante (Lepiniec *et al.*, 1992).

Un aspecto crítico es determinar donde comienza la proteína madura. Cuando analizamos la secuencia aminoacídica no encontramos ninguna de las características propias de la zona de transición entre péptido de tránsito y proteína madura descritas por Douwe de Boer y Weisbeek (1991). Recurrimos a los resultados de secuenciación aminoacídica del extremo amino de la tiorredoxina *m* de guisante purificada de hoja para deducir que el primer aminoácido de la tiorredoxina *m* de guisante es la Ala-65. Sin embargo, existe una elevada homología entre los

aminoácidos inmediatamente anteriores a la Ala-65 en guisante (HARE) y la secuencia descrita como comienzo de las isoenzimas de las tiorredoxinas *m* de espinaca (KASE para la *mb* y ASE para la *ma*) (Wedel *et al.* (1992). Esto nos induce a pensar que, aunque el enzima activo y funcional comienza con la Ala-65, el procesamiento del péptido de tránsito origina una proteína cuyos primeros aminoácidos son HAREA. Esta proteína, de 112 aminoácidos y 12,6 kDa, sufre modificaciones post-traduccionales y pierde los cuatro aminoácidos HARE, originando la tiorredoxina *m*, de 108 aminoácidos y 12 kDa.

El péptido de tránsito de la tiorredoxina *m* de guisante está formado por 60 aminoácidos, más corto que los 73, 68 y 67 residuos descritos para las tiorredoxinas *f* de guisante (Lepiniec *et al.*, 1992); *f* de espinaca (Aguilar *et al.*, 1992) y *m* de espinaca (Wedel *et al.*, 1992) respectivamente. No hemos encontrado ningún tipo de homología entre todos ellos a nivel de estructuras primaria y secundaria, excepto un elevado porcentaje de aminoácidos hidroxilados y bajo nivel de aminoácidos ácidos, características comunes a todos los péptidos de tránsito (von Heijne, 1991)

Al analizar las secuencias de la tiorredoxina aislada, hemos observado que la distribución de los residuos cargados es muy característica: es un dipolo con el extremo amino (hasta el centro activo) ácido, de carga -6 (6 aminoácidos ácidos y ninguno básico) y el extremo carboxilo (desde el centro activo hasta el último aminoácido) básico, con carga +4 (9 aminoácidos ácidos y 13 básicos). Estos datos son coherentes con los encontrados para la tiorredoxina de *E. coli* (-5 y +1 respectivamente).

A partir de la secuencia primaria, los ordenadores predijeron un punto isoeléctrico de 4,96, del orden de medio punto inferior al valor 5,3 determinado experimentalmente. El punto isoeléctrico experimental coincide plenamente con los valores 5,3 y 5 encontrados por Schürmann *et al.* (1981) para las tiorredoxinas *mb* y *mc* de espinaca. La predicción del coeficiente de extinción es 22370 M⁻¹ cm⁻¹, ligeramente superior a los 19300 M⁻¹ cm⁻¹ descritos para la tiorredoxina *m* de espinaca (Maeda *et al.*, 1986) porque la de guisante tiene una Tyr más en su estructura primaria.

El enzima, como todas las tiorredoxinas de tipo *m* (Agostino y Hatch, 1993; Stein *et al.*, 1995), es bastante resistente a tratamientos térmicos, no apreciándose pérdida de actividad en extractos crudos calentados a 90°C durante 10 minutos (Resultados III Graf. 5). Gracias a esta propiedad, hemos mejorado el protocolo de purificación descrito por Hodges *et al.* (1994) y con solo un choque térmico y un paso por una columna Sephadex G50 obtenemos 20 mg de proteína pura a homogeneidad (verificada por electroforesis SDS-PAGE y tinción de plata) por litro de cultivo (López Jaramillo *et al.*, 1995). Debido a la elevada identidad con la tiorredoxina de *E. coli* (del orden del 50%), para asegurarnos de la homogeneidad del preparado, secuenciamos por degradación de Edman una alícuota de la proteína

recombinante. No detectamos contaminación con proteína bacteriana y si confirmamos las predicciones de Hirel *et al.* (1994) sobre el procesamiento de la Met.

La proteína recombinante es reconocida por anticuerpos anti-Td *m* preparados a partir de enzima purificado de hoja de guisante y no hemos detectado mediante western-blotting revelando con marcaje fluorescente (Resultados I.4 Fot. 5) ni mediante ensayos de ELISA (Resultados VIII) reacción cruzada con anticuerpos anti-Td *f*. Este resultado era predecible, pues Schürmann *et al.* (1980) lo describieron para la tiorredoxina *mc* de espinaca y Hodges *et al.* (1994) para la tiorredoxina *f* de guisante recombinante y anticuerpos anti-Td *m* y anti-Td *h* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La elevada identidad del clon con las tiorredoxinas *m* y bacterianas, la presencia del motivo FWA y de un sitio de corte para NcoI (descrito para la tiorredoxina *m* de espinaca por Wedel *et al.*, 1992), los valores de punto isoeléctrico y coeficiente de extinción, la distribución de cargas, la resistencia a tratamientos térmicos, así como la fuerte reacción con anticuerpos anti-Td *m* y nula con anti-Td *f*, avalan la naturaleza tiorredoxina *m* de la proteína recombinante.

Tiorredoxina *f*

El clon de la tiorredoxina *f* de guisante nos ha permitido disponer de cantidades suficientes de enzima, sin necesidad de recurrir a la purificación a partir de la planta, proceso sumamente tedioso (paso por tres columnas diferentes) con rendimientos del orden de 1,88 mg de proteína pura por Kg de hojas (Prado *et al.*, 1992).

La predicción de ordenador de coeficiente de extinción para la tiorredoxina *f* de guisante es $14120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor inferior a los $17700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinado por Kamo *et al.* (1989) espectrofotométricamente para la tiorredoxina *f* de espinaca. Esta diferencia se explica por el hecho de que la de guisante contiene una Tyr menos.

El punto isoeléctrico teórico estimado es 7,82 y 8 el experimental, ambos alejados del valor 6,1 descrito para la tiorredoxina *f* de espinaca (Schürmann *et al.*, 1980). Este hecho es debido a que el enzima de espinaca presenta 4 aminoácidos ácidos más que la de guisante.

En SDS-PAGE, la tiorredoxina *f* migra más rápidamente que las tiorredoxinas de *E. coli* y *m*. Similar fenómeno ha sido observado en la tiorredoxina *f* de espinaca

(Schürmann *et al.*, 1981; Aguilar *et al.*, 1992; Brandes *et al.*, 1993). Esto se explica porque las proteínas con un elevado contenido de aminoácidos básicos (las tiorredoxinas *f* de espinaca y guisante tienen 16), migran de manera anómala en SDS-PAGE (Takano *et al.*, 1988).

La tiorredoxina *f* es extremadamente termosensible, pues hemos detectado en extractos crudos pérdidas de actividad del orden del 23% tras calentamientos de solo 5 minutos a 60°C (Resultados VIII Graf. 5). Como consecuencia de ello, hemos obviado el tratamiento térmico y recromatografiado el pico correspondiente a la tiorredoxina *f*. De esta forma, hemos logrado rendimientos del orden de 8 mg de enzima pura por litro de cultivo, un 33% más del descrito por Hodges *et al.* (1994).

Tiorredoxinas híbridas

Como una herramienta más para tratar de explicar las diferentes propiedades fisicoquímicas e inmunológicas de las tiorredoxinas *m* y *f*, decidimos construir dos moléculas quiméricas intercambiando los extremos amino y carboxilo de ambas tiorredoxinas de guisante.

La construcción del híbrido *f/m* las realizamos de manera análoga a como la describieron Lim *et al.* (1988) para el híbrido entre las tiorredoxina de *E. coli* y *Anabaena sp.*: corte con Ava II (ambas presentan un sitio de restricción para Ava II en la región que codifica el centro activo) e intercambio de los fragmentos. El proceso resultó complicado porque tuvimos que trabajar con fragmentos de ADN del orden de 100 pb y plantear una ligación del vector con los fragmentos amino y carboxilo simultáneamente.

Observamos que existe una elevada homología en la secuencia nucleotídica de ambas moléculas a nivel del centro activo. Este hecho lo hemos aprovechado para ligar los extremos amino de la *m* y carboxilo de la *f* mediante una segunda reacción de PCR (Resultados IV.2 Fig. 5). De esta forma hemos evitado el empleo de Ava II, con el consiguiente ahorro de ADN de partida y de tiempo en la purificación de los fragmentos digeridos, a la vez que reducir la ligación a una reacción entre el vector y un inserto de 0,32 Kb.

De acuerdo con el modelo de Wilkinson y Harrison (1991), el híbrido *f/m* aparece como cuerpos de inclusión. Las predicciones de ordenador indican que se trata de una proteína con un punto isoeléctrico de 9,25. Éste valor tan anómalo no

lo consideramos un artefacto habida cuenta de la buena correlación encontrada entre los resultados experimentales y las predicciones para las tiorredoxinas *m* y *f* de guisante y espinaca.

Pensamos que sería difícil expresar el híbrido *f/m* porque debido al fuerte carácter básico se uniría a los ácidos nucleicos de la bacteria y resultaría tóxica. Mediante Northern blotting hemos comprobado que se traduce (Resultados IV.1 Fot 6) y mediante SDS-PAGE que la proteína aparece como cuerpos de inclusión (Resultados IV.1 Fot 7). Para tratar de purificarlo hemos seguido el protocolo descrito por Aguilar *et al* (1991), y hemos aislado un péptido del orden de 42 kDa que es reconocido por anticuerpos anti-Td *f* (Resultados IV.1 Fot 9). No hemos continuado trabajando con él.

Las predicciones para el híbrido *m/f* eran más favorables: soluble, -5 de carga y 4,96 de punto isoelectrico. Analizamos la sensibilidad a tratamientos térmicos y encontramos que soporta temperaturas de 90°C durante 5 minutos con pérdidas de actividad de sólo el 10% (Resultados VIII Fig. 5). Estos resultados muestran que a pesar de presentar una identidad del orden del 80% con la tiorredoxina *f*, el híbrido presenta propiedades fisicoquímicas más parecidas a la *m*.

La resistencia a incubación a elevada temperatura ha sido muy útil de cara a la purificación, pues combinando choque térmico con incremento de la fuerza iónica de los tampones para disminuir las interacciones iónicas, hemos obtenido un rendimiento de 3 mg de proteína pura por litro de cultivo. El híbrido *m/f* reacciona débilmente con los anticuerpos anti-Td *f* y anti-Td *m* (Resultados VIII).

De lo dicho se deduce que la especial sensibilidad de la tiorredoxina *f* a la temperatura es consecuencia del extremo amino, pues cuando éste se cambia por el de la tiorredoxina *m*, el enzima resultante soporta tratamientos térmicos que inactivan a la tiorredoxina *f*. Ésto es coherente con las conclusiones de Lim *et al.* (1988), según las cuales es el extremo amino el responsable de mantener la conformación de la proteína. Por otro lado, el bajo reconocimiento del híbrido *m/f* por los anticuerpos anti-Td *f* sugiere que los determinantes antigénicos de la tiorredoxina *f* están localizados fundamentalmente en el extremo amino, pues los dos tercios *f* de la molécula híbrida son reconocidos sólo un 20% por los anticuerpos anti-Td *f*.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa recombinante

El sistema de expresión de la FBPasa cloroplastídica de guisante diseñado por Carrasco *et al.* (1992) no es eficaz: obtiene un rendimiento del orden de 0,5 mg de enzima pura por litro de cultivo y la purificación implica el uso de tres columnas. Además, el plásmido recombinante porta 2 Kb de brazo de fago, uno a cada lado del inserto, y codifica parte del péptido de tránsito. Ésto hace que la proteína recombinante presente importantes diferencias cinéticas con el enzima purificada de hoja (Carrasco *et al.*, 1992). Por ello abordamos la tarea de subclonarla de nuevo.

Consideramos que el primer aminoácido de la FBPasa madura es la metionina englobada en la secuencia VRCMA, identificada por Carrasco *et al.* (1992) como secuencia consenso de procesamiento para peptidasas por tratarse de una zona de tránsito de estructura β a hélice α . Mediante PCR amplificamos selectivamente el fragmento de ADN que codifica a la FBPasa y lo subclonamos en el vector de expresión pET 3d, mucho más eficiente que el empleado originalmente por Carrasco *et al.* (1992).

Este nuevo sistema de expresión nos ha permitido expresar y purificar una FBPasa que sí es análoga al enzima purificado de la planta, como demuestra el hecho de que los parámetros cinéticos determinados (K_m , índice de Hill, activación por tiorredoxina y dependencia de Mg^{2+}) (Resultados V.1 Graf. 1, Graf. 2, Graf. 3) estén en el rango de los del enzima purificado de hojas de guisante (Jacquot *et al.*, 1995). El rendimiento obtenido es 20 mg de enzima por litro de cultivo, del orden de 40 veces el rendimiento obtenido por Carrasco *et al.* (1992).

Análisis de la activación de la FBPasa y la NADP-MDH por tiorredoxinas

Existe una cierta controversia sobre la especificidad FBPasa/tiorredoxina. Tradicionalmente, en espinaca se ha descrito que la NADP-MDH es activada preferentemente por la tiorredoxina *m* y la FBPasa por tiorredoxina *f*, aunque se pueden intercambiar las tiorredoxinas y lograr activaciones del 51% para NADP-MDH/tiorredoxina *f* y del 16% para FBPasa/tiorredoxina *m* (Wolosiuk *et al.*, 1979). De acuerdo con Schürmann *et al.*, (1981), la FBPasa es mucho más específica, pues es activada exclusivamente por tiorredoxina *j*, mientras que la NADP-MDH es también eficazmente activada por elevadas concentraciones de tiorredoxina *f*. Según Holmgren (1985), es la tiorredoxina *f* la que activa exclusivamente a la FBPasa y la tiorredoxina *m* la que actúa sobre la NADP-MDH y FBPasa.

Ya en 1985, Häerlein *et al.* indicaron que tanto la FBPasa como la NADP-MDH son activadas por la misma fracción de tiorredoxina y que en ocasiones, la no activación de la FBPasa o la NADP-MDH por un tipo de tiorredoxina es consecuencia de que no se está trabajando con enzimas de plantas de la misma especie. En esas mismas fechas, Schürmann *et al.* (1985) indicaron que en espinaca, la especificidad FBPasa/ tiorredoxina *f* se ve alterada en presencia de FBP y Ca^{2+} , pudiendo las tiorredoxinas *m* y de *E. coli* activar a la FBPasa eficientemente.

Debido a esta cierta polémica y a que contábamos con el sistema de tiorredoxinas y FBPasa de guisante, así como con el híbrido *m/f* y la tiorredoxina de *E. coli*, nos propusimos estudiar las diferentes cinéticas de modulación. Llegado este punto, hay que aclarar que la mezcla de activación del ensayo de la FBPasa contenía 0,05 mM Ca^{2+} porque es el medio empleado rutinariamente en nuestro laboratorio y porque experiencias preliminares demostraron que la tiorredoxina *m* de guisante activa a la FBPasa de guisante, ambas recombinantes, en ausencia de Ca^{2+} y FBP. Esta observación ha sido recientemente confirmada en espinaca por el grupo del Dr. Hartman (comunicación personal).

De acuerdo con nuestros datos (ver Tabla XVII pg. 154), todas las tiorredoxinas ensayadas activan a la FBPasa. La tiorredoxina *m*, a pesar de presentar un grado de identidad con la *f* de solo el 25%, es capaz de activar a la FBPasa hasta igual V_{max} que la tiorredoxina *f*, pero necesita concentraciones del orden de 20 veces superiores, mientras que la tiorredoxina de *E. coli* (70 % de identidad con la tiorredoxina *m*) y el híbrido (identidad 80 % *f* y 48 % *m*) consiguen activaciones del 30% y del 11% respectivamente. De esto se deduce que el efecto modulador no es consecuencia de homología a nivel de estructura primaria, sino que probablemente deben existir regiones de la moléculas críticas para dicha modulación.

En todos los casos, el fenómeno de activación presenta cooperatividad positiva, excepto con la tiorredoxina *m*, donde no se observa cooperatividad. Es destacable el hecho de que las tiorredoxinas no cloroplastídicas (la de *E. coli* y el híbrido) son las de mayor valor del coeficiente de Hill, especialmente el híbrido, que además de ser el más efectivo, considerando como efectividad el inverso de $A_{0.5}$, presentaría más de un lugar de unión por subunidad de FBPasa, si bien es verdad que el valor del coeficiente de Hill determinado para el híbrido no es excesivamente fiable pues, aunque los puntos de la representación logarítmica de Hill se ajustan perfectamente a una recta ($R^2 = 1$) (Resultados VI.1.3 Graf. 1.3c), la curva de saturación no tiene demasiada resolución, a pesar de los numerosos intentos para tratar de incrementar el número de puntos.

Ya se ha mencionado anteriormente que no es objeto del presente trabajo analizar el efecto modulador de las tiorredoxinas sobre la NADP-MDH, pero la disponibilidad de esta última nos animó a ensayar nuestras tiorredoxinas sobre ella

NADP⁺-MDH

FBPasa

	V_{max} ($\Delta DO_{340nm} \text{ min}^{-1}$)	$A_{0.5}$	Saturación	coef. Hill	V_{max} ($\Delta DO_{340nm} \text{ min}^{-1}$)	$A_{0.5}$	Saturación	coef. Hill
Td <i>f</i>	0,235	0,077 μM	1 μM	1,62	0,383	0,25 μM	0,6 μM	3
Td <i>m</i>	0,235	1,4 μM	20 μM	1	0,088	0,0043 μM	0,007 μM	1,32
Hib <i>m/f</i>	0,025	0,041 μM	0,075 μM	4,88	—	—	—	—
Td <i>col</i>	0,070	0,33 μM	0,7 μM	2,8	0,233	0,22 μM	0,65 μM	2

TABLA XVII.- Resumen del análisis del efecto modulador de las tioredoxinas *m, f*, de *E. coli* y del híbrido *m/f* sobre la FBPasa cloroplastídica recombinante de guisante y la NADP-MDH purificada de hoja de guisante

(ver tabla XVII adjunta). Comprobamos que la NADP-MDH es activada por las tiorredoxinas *m*, *f* y de *E. coli*, pero no por el híbrido. Es sorprendente comprobar que la tiorredoxina *f* la activa cuatro veces que más que la tiorredoxina *m*, pero empleando concentraciones 86 veces mayores.

Resulta paradójico que exista solo una ligera cooperatividad positiva con la tiorredoxina *m*, el activador fisiológico, y que el índice de Hill sea de 3 con la *f* (se ha descrito que la NADP-MDH de guisante es un tetrámero (Fickenscher y Scheibe, 1983) y no un dímero). Estas observaciones han sido corroboradas por otros investigadores (Braun, H., Lichter, A., König, A. y Häberlein, I., poster nº62, 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995).

A la vista de las cinéticas cabría preguntarse si todos estos efectos moduladores son solo un fenómeno *in vitro* o si en el caso de las tiorredoxinas *m* y *f*, localizadas ambas en el cloroplasto, podrían tener alguna significación fisiológica, máxime cuando hemos comprobado que en las condiciones de nuestro ensayo sí existe interacción entre la tiorredoxina *m* y la FBPasa (Resultados VII.1 Fig. 6 y VII.2) (López Jaramillo *et al.*, 1995), aunque menor que entre la FBPasa y la tiorredoxina *f*. En cualquier caso, no hay que perder de vista que las concentraciones a las que se obtiene la máxima activación es siempre muy inferior cuando se emplean los moduladores descritos en la bibliografía como fisiológicos a cuando se intercambian los moduladores (del orden de 20 veces para la FBPasa/Td *m* y 86 veces para la NADP-MDH/Td *f*), por lo que parece razonable pensar que *in vivo* estas modulaciones cruzadas no tengan relevancia alguna.

Análisis estructurales

Con el objeto de explicar las diferencias en las propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y cinéticas encontradas, realizamos un estudio a nivel estructural de las tiorredoxinas empleadas. Hay que reseñar que todos los datos obtenidos son predicciones de ordenador, aunque este hecho no debe ser obstáculo para que sean tomados en serio pues, como hemos demostrado anteriormente, existe una clara correlación entre los datos experimentales y las predicciones. Además, siempre hemos empleado la molécula de *E. coli*, cuya estructura es perfectamente conocida (Söderberg *et al.*, 1974; Holmgren *et al.*, 1975; Katti *et al.*, 1985; Dyson *et al.*, 1990) como control para conocer la fiabilidad de las predicciones.

A nivel de estructura primaria hemos encontrado diferencias significativas en la distribución de carga y en los perfiles de hidropatía y antigenicidad. Hemos observado que las tiorredoxinas *m* y de *E. coli*, así como el híbrido, presentan un marcado carácter dipolar, con el extremo aminico fuertemente ácido y el carboxílico básico. Este hecho explica los puntos isoelectrónicos ácidos (experimentales y teóricos) y el carácter aniónico de las moléculas. La molécula de la tiorredoxina *f* tiene una distribución de carga mucho más homogénea, lo cual se traduce en un extremo aminico neutro, el carboxílico ligeramente ácido y carácter catiónico.

Los perfiles de hidropatía (Resultados IX.1.3 Graf. 6) ponen de manifiesto que el extremo aminico de todas ellas es bastante similar y que el centro activo, aunque rodeado (a nivel de estructura primaria) por aminoácidos hidrófobos, está en el límite entre la hidrofobia y la hidrofilia. Las diferencias aparecen en el extremo carboxilo, fundamentalmente entre los aminoácidos 47-50, 67-78 y en torno al 89. Nótese que todo esto es coherente con los residuos descritos por Eklund *et al.* (1991) como implicados en la interacción tiorredoxina-proteína: ⁵⁷Lys, ⁷³Arg, ⁹²Gly y ⁹³Ala, entre otros. En general, y al contrario de lo que cabría esperar, la hidrofobicidad media del enzima de *E. coli* y de la *f*, son análogos, mientras que *m* es considerablemente más hidrofílica.

De acuerdo con el perfil de antigenicidad (Resultados IX.1.5 Graf. 8), la tiorredoxina *f* es menos antigénica que la tiorredoxina *m*. En el caso de la *f*, aparece con una probabilidad del 100% un determinante antigénico principal entre los aminoácidos 44-49 (extremo carboxílico) y un segundo pico (probabilidad del 67%) entre los aminoácidos 5-11 (extremo aminico). Para la tiorredoxina *m*, ambos se localizan en el extremo carboxílico (algo similar ya fue sugerido por Holmgren *et al.* (1981) para la tiorredoxina de *E. coli* y Lim *et al.* (1987) lo hicieron extensible a la de *Anabaena* PCC7119), el principal entre 85-90 y el secundario entre 101-106, ambos con mayor puntuación que el principal de la *f*. De acuerdo con esto, las tiorredoxinas *m* y *f* no deben presentar reacción cruzada con los anticuerpos anti-Td *f* y anti-Td *m* y el híbrido *m/f* será reconocido muy débilmente por los anti-Td *m* porque no porta el determinante antigénico principal de la *m* y más intensamente por los anti-Td *f*, aunque no demasiado porque la tiorredoxina *f* es poco antigénica. Estas predicciones coinciden plenamente con los resultados experimentales (Resultados VIII)

La predicción de estructura secundaria que hemos empleado es muy superior a los tradicionales métodos de Garnier (Garnier *et al.*, 1978, 1990) y de Chou-Fasman (Chou y Fasman, 1978) y es fiable, como demuestra el hecho de que la predicción para la tiorredoxina de *E. coli* encaje bastante bien con los datos cristalográficos. Los datos de predicción de estructura secundaria indican que básicamente se mantienen los elementos estructurales en todas las moléculas (Resultados IX.2 Tabla XXI). Sin embargo, encontramos que a nivel de $\alpha 2$ y de $\beta 3$ aparecen algunas diferencias, aunque bien es verdad que en esta región la predicción para la molécula de *E. coli* se aleja de los resultados experimentales.

A nivel de estructura terciaria existen numerosos estudios (Holmgren *et al.*, 1975; Södererg *et al.*, 1978; Katti *et al.*, 1990; Genovesio-Taverne *et al.*, 1991; Quin *et al.*, 1995) que confirman la idea de Eklund *et al.* (1991) de que todas poseen similar estructura tridimensional, independientemente del grado de homología. A pesar de ello, hemos considerado de utilidad modelar las tiorredoxinas con las que hemos trabajado al objeto de buscar diferencias que explicasen las características propias de cada una de ellas.

Todos los modelos, excepto el del híbrido, son muy parecidos a la estructura de *E. coli* (Resultados IX.3 Lámina I) y, aunque podría objetarse que ésto resulta obvio porque han sido generados sobre la estructura de numerosos mutantes de *E. coli*, no hay que olvidar que ésto es coherente con los estudios estructurales realizados hasta el momento. Además, un punto a favor de las predicciones es que la estructura del híbrido, cuyos 75 últimos aminoácidos (el 68,5%) son tiorredoxina *f*, presente una falta de continuidad entre los aminoácidos ⁹⁴Ala y ⁹³Gly (zona carboxilica de la tiorredoxina *f*) que no existe en el modelo de la *f*.

Al identificar sobre nuestros modelos los residuos localizados en las proximidades del centro activo que podrían estar implicados en las interacciones con otras proteínas (Resultados IX.3 Lámina III), encontramos que siempre aparecen en las mismas zonas dos aminoácidos básicos que a nivel de estructura primaria ocupan las posiciones 37 y el 74 (36 y 73 para *E. coli*) y que, en términos generales, existe una zona rica en aminoácidos básicos en la tiorredoxina *f* (⁶⁵Lys / ⁶⁹Lys) en una localización próxima a donde aparecen aminoácidos ácidos en el modelo de la *m* (⁶²Asp / ⁶³Glu). En el enzima de *E. coli* esta zona está ocupada por aminoácidos polares no cargados. Esta observación es coherente con los resultados de Hermoso *et al.* (1995) según los cuales, el fragmento de la FBPasa de guisante comprendido entre los aminoácidos 149 y 157, que posee una elevada concentración de residuos ácidos (cargas negativas) y una homología prácticamente nula con las secuencias de espinaca (Marcus y Harrsch, 1990), trigo (Raines *et al.*, 1988; Lloyd *et al.*, 1991), *Arabidopsis thaliana* (Horsnell y Raines, 1991) y patata (Kossmann *et al.*, 1992), está implicado en la interacción con la tiorredoxina.

De acuerdo con esta idea, la tiorredoxina *m* presentaría menos afinidad que la *f* porque cerca del centro activo tiene una región formada por aminoácidos ácidos que no podrían interaccionar bien con la zona de la FBPasa descrita por Hermoso *et al.* (1995). Para el enzima de *E. coli*, la afinidad sería intermedia entre la *f* y la *m*. Esta hipótesis es avalada por nuestros resultados de activación de la FBPasa por las tiorredoxinas *m*, *f* y de *E. coli*.

El modelo del híbrido presenta una peculiaridad: el esqueleto de la molécula está roto entre ⁹⁴Ala y ⁹³Gly. Este hecho origina que la posición en el espacio de $\alpha 4$ esté alterada y que el aspecto de la molécula tenga la singularidad de no poseer lóbulo inferior izquierdo. Estos datos sugieren que la estructura de la molécula está muy

distorsionada, por lo que su estructura terciaria debería de presentar diferencias significativas con las de las otras tiorredoxinas, aunque es difícil aventurar un hipótesis sobre su estructura real

Análisis de las Cisteínas

Cuando comparamos las secuencias de las FBPasa gluconeogénicas con las cloroplastídicas de diferentes especies, comprobamos que estas últimas presentan, además de las dos cisteínas separadas por cuatro aminoácidos descritas por Marcus *et al.* (1988) como características de las enzimas moduladas por la luz, otras dos, una a cada lado de las primeras (Resultados V). En guisante, las posición de éstas cisteínas son: 153, 173, 178 y 190.

Como un primer paso para identificar las cisteínas responsables de la formación del puente disulfuro sobre el que actúa la tiorredoxina, decidimos mutar por serinas las localizadas en las posiciones 173 y 178, pues al estar separadas por cuatro aminoácidos eran firmes candidatos para la formación del puente disulfuro implicado en la regulación por tiorredoxina (Marcus *et al.*, 1990).

El doble mutante fue expresado y purificado a homogeneidad con un rendimiento del orden de 10 mg por litro de cultivo. Resultó ser mucho menos estable que la proteína recombinante, pues se hidroliza en pequeños péptidos al congelarla y descongelarla y se inactiva rápidamente a pH 8.

Un análisis de los fragmentos producto de la hidrólisis puso de manifiesto que el segundo mayoritario es: Gln-Arg-¹⁷³Ser-Ile-Val-Asn-Val-¹⁷⁸Ser. Este hecho, además de confirmar que se logró introducir correctamente la doble mutación, pone de manifiesto que, muy probablemente, el doble mutante es hidrolizado por una zona próxima a la secuencia modificada. Esta inestabilidad es coherente con la idea de que se ha originado un cambio estructural a nivel del *loop* como consecuencia de que se ha destruido el puente disulfuro.

Al inactivarse a pH 8, todos los ensayos de actividad hubo que realizarlos a pH 7,2, y aun así es muy inestable. En estas condiciones, comprobamos que no es susceptible de activación con DTT, elevadas concentraciones de Mg^{2+} o DTT/tiorredoxina y que se comporta como si estuviese ya activado (Resultados V.2 Graf. 4), señal inequívoca de que se ha destruido el puente disulfuro.

Li *et al.* (1994) modelaron la FBPasa cloroplastídica de trigo y aunque no pudieron resolver la zona correspondiente a la inserción, indicaron que las ^{147}Cys y ^{154}Cys (equivalentes a ^{153}Cys y ^{178}Cys en guisante) están lo suficientemente cerca como para formar un puente disulfuro. Con posterioridad a la publicación de nuestro trabajo sobre el doble mutante (Jacquot *et al.*, 1995), Villeret *et al.* (1995a) cristalizaron la FBPasa cloroplastídica de espinaca y concluyeron que no puede existir un puente disulfuro entre ^{174}Cys y ^{179}Cys (equivalen a ^{173}Cys y ^{178}Cys de guisante) porque están separadas por 13 Å.

Por ello, al objeto de profundizar en el conocimiento de los residuos implicados en la formación del puente disulfuro, decidimos generar mutantes sencillos de las cuatro cisteínas en torno a la inserción descrita por Marcus *et al.* (1988): $^{153}\text{Cys/Ser}$, $^{173}\text{Cys/Ser}$, $^{178}\text{Cys/Ser}$ y $^{190}\text{Cys/Ser}$.

Aunque las experiencias aun no han concluido, es claro que el mutante C153S no es en absoluto modulado por tiorredoxinas, comportándose como si estuviera activado. El C190S se comporta como la FBPasa recombinante y los mutantes C173S y C178S son activados por tiorredoxina, aunque en menor grado que el enzima recombinante no mutada.

Estos datos confirman las ideas originales basadas en la comparación de secuencias, según las cuales, el inserto que aparece en las secuencias de las FBPasas cloroplastídicas es el responsable de la regulación redox (Marcus *et al.*, 1988; Raines *et al.*, 1988), ya que la manipulación de las cisteínas localizadas en dicha región originan modificaciones en la modulación redox del enzima.

Los datos de activación por tiorredoxina *f* no dejan lugar a dudas sobre el papel fundamental de la ^{153}Cys : el mutante C153S no es regulable en absoluto por tiorredoxina/DTT, se comporta como si el enzima hubiese sido previamente activado (reducido). Por ello, parece obvio que ^{153}Cys es una de las cisteínas implicadas en la formación del puente disulfuro.

La mutación de ^{190}Cys por Ser no parece afectar a la regulación por tiorredoxina del enzima, pero sí debe de introducir algún tipo de modificación estructural, pues dicho mutante es activado por la tiorredoxina *h*, (Jacquot, J.P., Riviera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Maréchal, P., Miginiac-Maslow, M. y Meyer, Y., comunicación al 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995).

El doble mutante no es activado por tiorredoxina (Resultados V.2 Graf. 4); por ello, resulta claro que la segunda cisteína implicada en la formación del puente disulfuro es la ^{173}Cys o la ^{178}Cys . Sin embargo, los mutante C173S y C178S son activados por tiorredoxina, por lo que, sobre la base de las experiencias de activación, no se puede especificar cual de las dos es la que interacciona con ^{153}Cys .

En cualquier caso, lo que si parece probable es que independientemente de cual de las dos sea la formadora del puente disulfuro con ^{153}Cys , la otra también puede hacerlo, manteniendo la regulación redox del enzima, como demuestra el hecho de que tanto C173S como C178S sean dependientes de tiorredoxina.

Modelo de la FBPasa cloroplastídica de guisante

Li *et al* (1994) han modelado la FBPasa de trigo, por lo que se podría pensar que no tiene demasiado interés modelar la FBPasa de guisante, máxime cuando la identidad entre ambas enzimas es del 82% (Carrasco *et al.*, 1994). Sin embargo, hay que destacar que el modelo de Li *et al* (1994) se basa únicamente en la estructura del enzima de riñón de cerdo, que es gluconeogénica, con la que presenta una identidad del 45% y que como consecuencia de esto no resuelve la región correspondiente al inserto.

Nuestro modelo, además de en el enzima de riñón de cerdo, está basado en los datos de la FBPasa cloroplastídica de espinaca (Villeret *et al.*, 1995a), que tiene una homología con el enzima de guisante del 87% (Carrasco *et al.*, 1994). Por ello, si resuelve la zona correspondiente al inserto (Resultados X Lámina IV) y es una herramienta valiosa para estudiar la localización de las ^{173}Cys y ^{178}Cys al objeto de tratar de determinar cual de ellas forma el puente disulfuro con la ^{153}Cys .

De acuerdo con nuestro modelo (Resultados X Lámina VI), ^{173}Cys y ^{178}Cys aparecen próximos a ^{153}Cys , con el átomo Sy accesible, pero la ^{173}Cys queda más alejada de la ^{153}Cys y algo oculta, por lo que parece más probable que en el enzima salvaje el enlace se establezca entre ^{153}Cys y ^{178}Cys . Por otra parte, si realmente el enlace está localizado entre ^{153}Cys - ^{178}Cys , el mutante C178S es activado por tiorredoxina porque ^{173}Cys está sobre el loop, que no es nada rígido, pudiendo enlazar con ^{153}Cys sin provocar grandes cambios estructurales.

Nuestro modelo también predice la existencia del puente disulfuro interno entre ^{46}Cys - ^{190}Cys , que tendría un papel eminentemente estructural, no estando implicado en la modulación redox (Resultados X Lámina IV). Ésto es coherente con el modelo de Li *et al.* (1994) para la FBPasa de trigo y los datos cristalográficos de la FBPasa de espinaca (Villeret *et al.*, 1995a), pues en ambos casos predicen la existencia de un puente disulfuro entre las ^{41}Cys - ^{165}Cys y ^{51}Cys - ^{191}Cys respectivamente (equivalentes a ^{49}Cys - ^{190}Cys en guisante) que, de acuerdo con Villeret *et al.* (1995a) estaría localizado en la región que en el enzima de riñón de

cerdo corresponde al sitio de unión del AMP responsable del comportamiento alostérico del enzima.

Esta predicción es confirmada por el hecho de que el mutante C190S, que no puede formarlos, es activado por tiorredoxina *f*, demostrando que no se ha alterado la zona responsable de la modulación, y también por tiorredoxina *h*, que es citosólica e incapaz de actuar sobre la FBPasa salvaje. Esto último nos induce a pensar que al destruir el puente disulfuro ^{49}Cys - ^{190}Cys , el enzima sufre un cambio a nivel conformacional que hace que la activación sea muy inespecífica, quedando la estructura global de la proteína distorsionada y hasta cierto punto pre-activada, de modo que la tiorredoxina *h* sí es capaz de activarla.

En nuestro modelo, la ^{92}Cys se localiza en la base de la subunidad, que es una de las zonas responsables de la interacción con las otras subunidades, con el átomo S_y accesible. Esta ubicación haría plausible la existencia de un puente disulfuro entre las subunidades dos a dos, de forma que el tetrámero estaría constituido por dos dímeros, formados por dos monómeros unidos por el puente disulfuro formado entre las ^{92}Cys de cada subunidad. Los dímeros estarían unidos entre ellos por fuerzas de carácter fundamentalmente iónico.

Esta hipótesis es coherente con el hecho de que el enzima se disocia parcialmente a pH alcalino (Lázaro *et al.* 1974, 1975; Zimmermann *et al.*, 1976; Buchanan *et al.*, 1976; Buc, *et al.*, 1980; Gontero *et al.*, 1985) y que el producto de dicha disociación parcial es el dímero (Zimmermann *et al.*, 1976), pero choca frontalmente con la afirmación de Villeret *et al.* (1995) de que no pueden formarse puentes disulfuros entre cisteínas de diferentes monómeros.

En cualquier caso, hay que aclarar que aunque nuestro modelo no es más que una predicción y las conclusiones de Villeret *et al.* (1995) se basan en datos cristalográficos, estos últimos solo predicen el puente disulfuro 51Cys-191Cys (equivalente a 49Cys-190Cys en guisante) en base a la distancia, mientras que la predicción de nuestro modelo se ve confirmada por datos experimentales.

Interacción FBPasa-Tiorredoxina

Parece claro que la interacción FBPasa-Td tiene un fuerte componente de carácter iónico como se intuye a partir de nuestros modelos por la presencia de aminoácidos básicos en la cara del centro activo de las tiorredoxinas (Resultados IX. Lámina III) y de aminoácidos ácidos en la región inmediatamente posterior a la ^{153}Cys

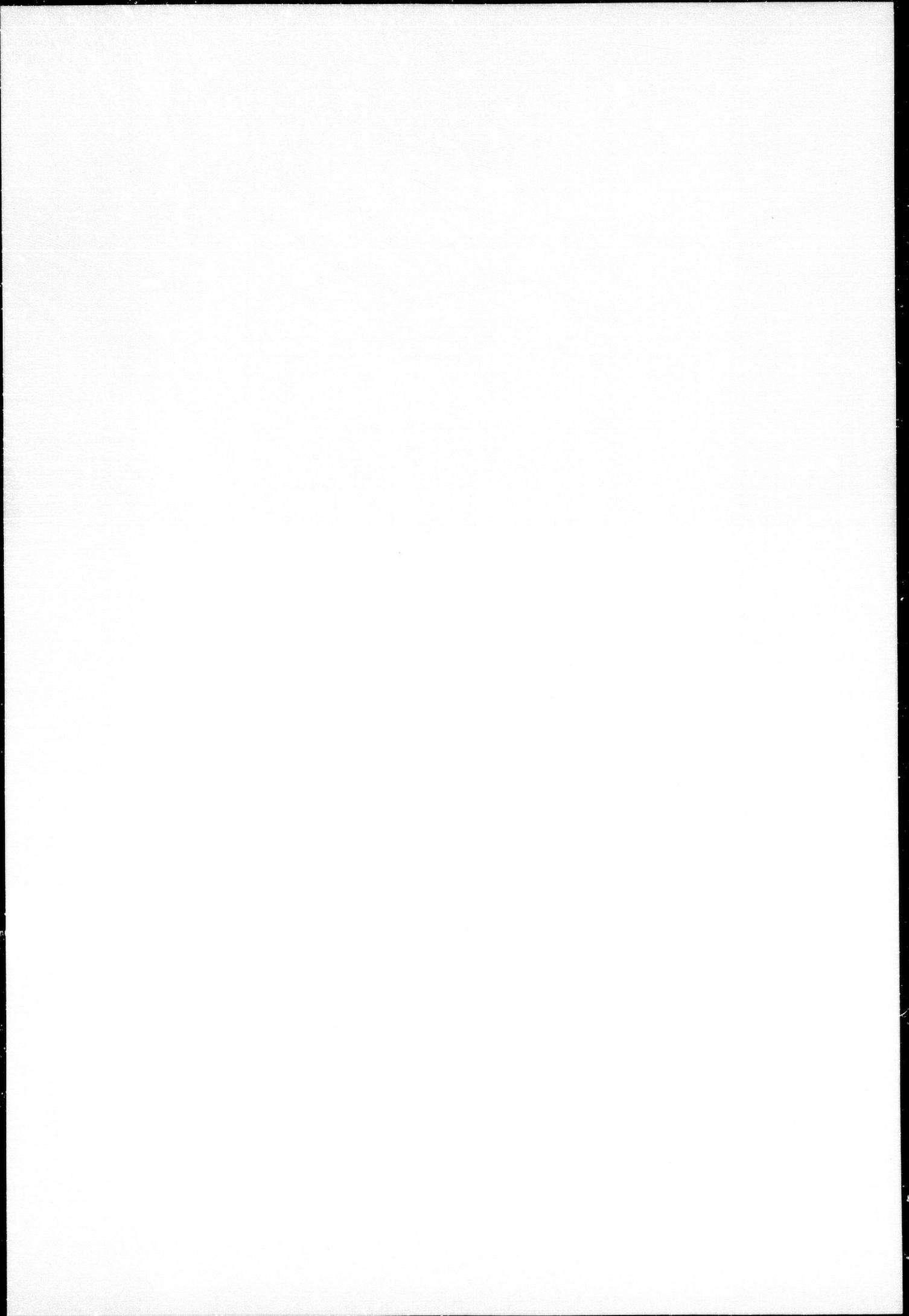
(Resultados X Lámina VI), además de por el hecho de ser esta interacción dependiente de pH ligeramente básico: Hermoso *et al.*, (1995) encuentran interacción entre la FBPasa y la tiorredoxina *m* de guisante a pH 7,9 y no a pH 7.

Esta idea es coherente con los resultados de Lamotte-Guery *et al.* (1991) y del grupo del Dr. Hartman (Brande, H.K., Greck, M.K., Larimer, F.W. y Hartman, F.C., comunicación a la 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995). De acuerdo con los primeros, la tiorredoxina de *E. coli* D61N (mutación de una carga negativa por neutra) presenta una afinidad doble (inverso de $A_{0,5}$) por la FBPasa que el enzima no mutado. En las tiorredoxinas *m* y *f* de guisante, la posición 61 está ocupada (a nivel de estructura primaria) por ^{62}Asp (carga negativa) y ^{62}Asn (neutro) respectivamente. En nuestros modelos de estructura terciaria, ambos residuos están localizados próximos al centro activo.

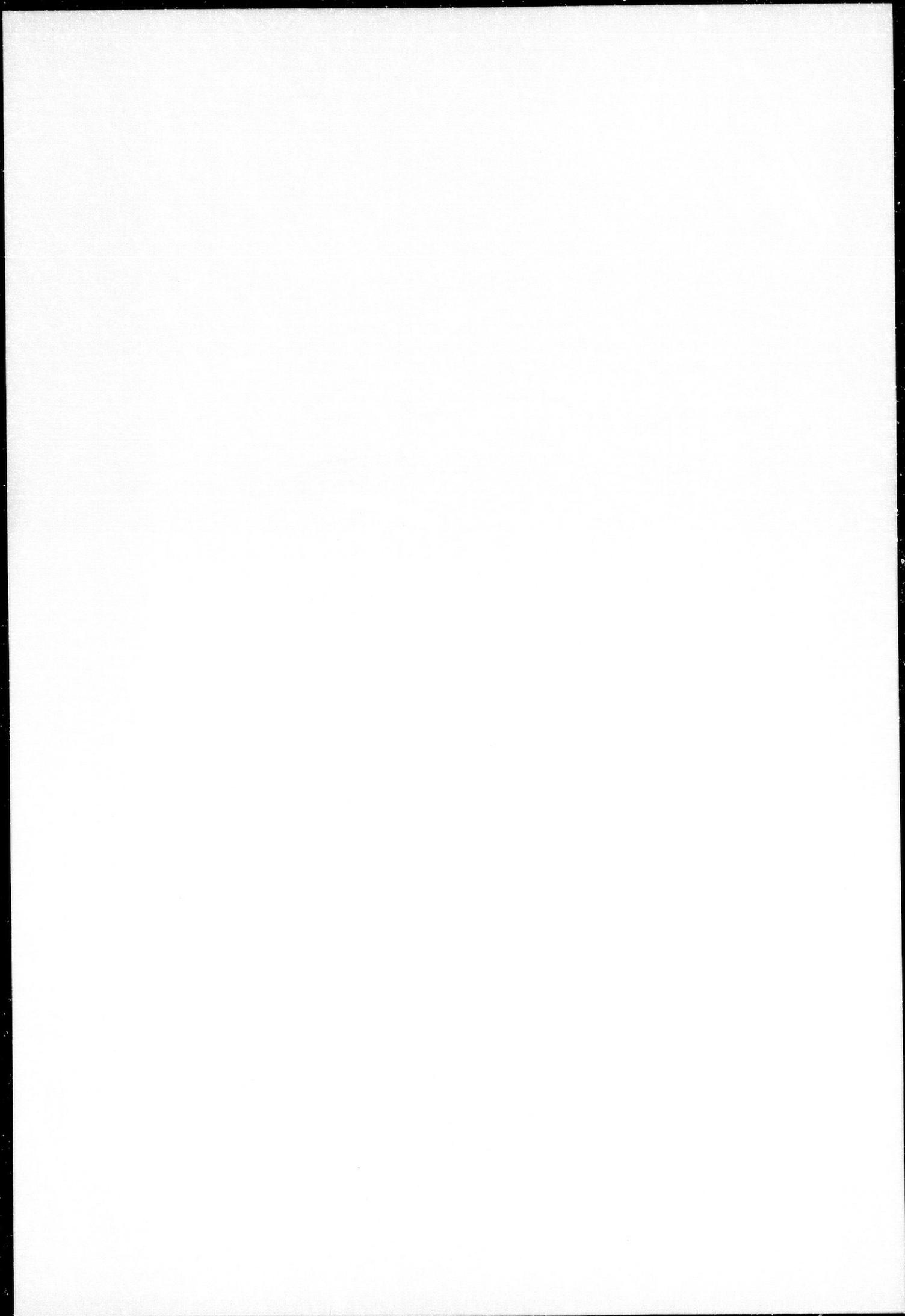
De acuerdo con los segundos, la mutación K58E (carga positiva por carga negativa) en la tiorredoxina *f* de espinaca origina una disminución de la afinidad por la FBPasa hasta la mitad respecto del enzima salvaje. En cualquier caso, la interacción debe ser consecuencia de numerosos tipos de enlaces, como han puesto de manifiesto Quin *et al.* (1995) para la tiorredoxina humana.

Un aspecto interesante a considerar es la presencia de una tercera cisteína en las tiorredoxinas *m* y *f* de guisante y el papel que podrían jugar en la activación de la FBPasa. De acuerdo con nuestros modelos (Resultados IX Láminas I y II), la posición de la tercera cisteína, aunque superficial y por ello susceptible de formar puentes disulfuros, no es en absoluto constante y las tiorredoxinas de *E. coli* y *m* de espinaca no la tienen, por lo que nos inclinamos a pensar que no debe ser crítica para la modulación, a pesar de que parece que disminuye la afinidad tiorredoxina *f*/FBPasa en el enzima de espinaca cuando se muta la tercera cisteína (Del Val, G., Morris, M. y Schürmann, P., poster nº 63, 4th International Conference on thioredoxins and related proteins, Kassel, Agosto 1995).

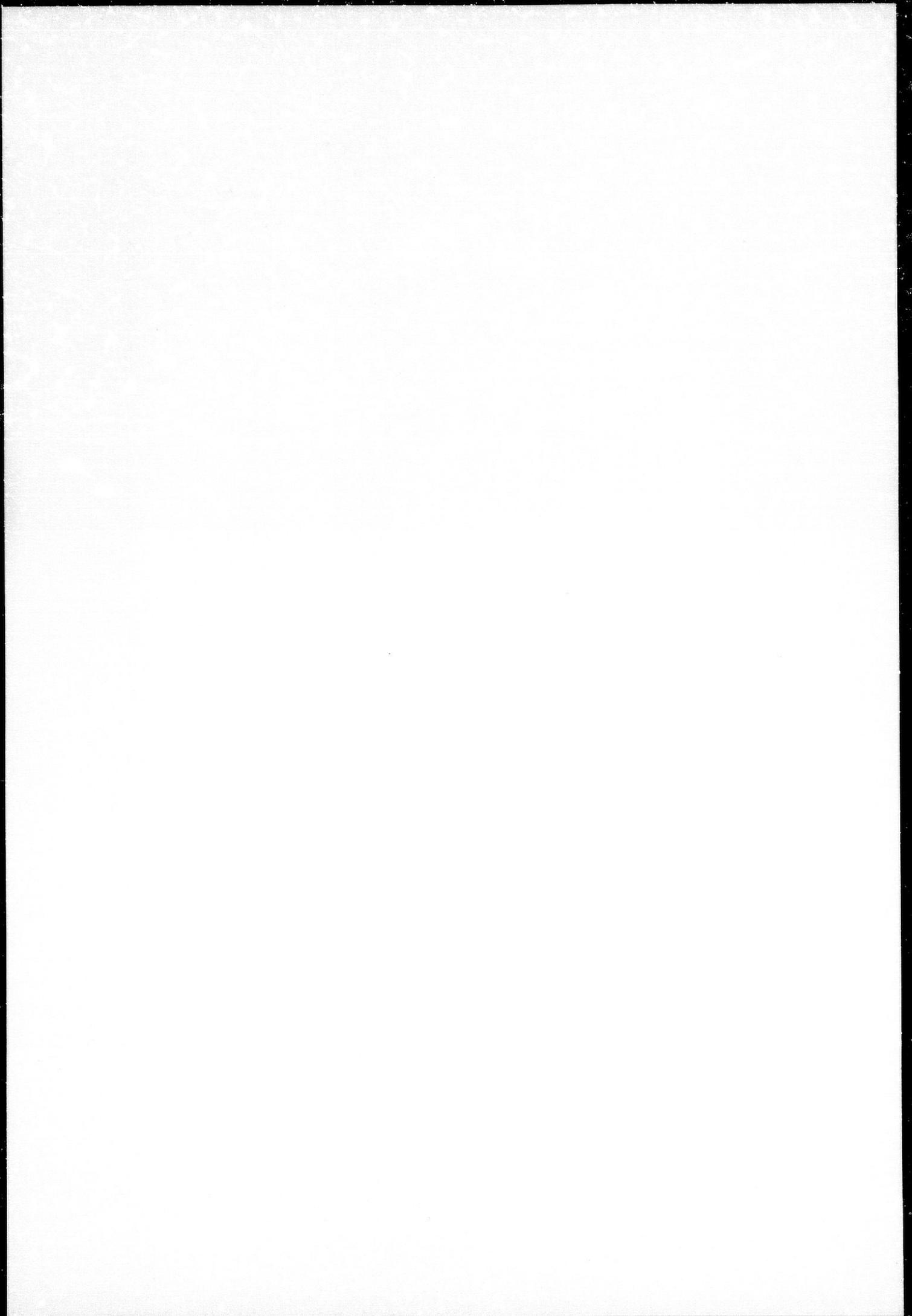
CONCLUSIONES



1. A partir de una *genoteca* de ADNc hemos aislado un clon que codifica la tiorredoxina *m* de guisante y que incluye la secuencia codificante de su péptido procesador. La secuencia aminoacídica deducida presenta una identidad del 70% con la tiorredoxina *m* de espinaca, y solo del 34% y 27% con las tiorredoxinas *f* de espinaca y guisante respectivamente.
2. El procesamiento del péptido de tránsito en el cloroplasto origina una forma precursora de la tiorredoxina *m*, de 112 aminoácidos y 12,6 kDa de masa molecular. Ésta experimenta modificaciones post-traduccionales, perdiendo los cuatro primeros aminoácidos del extremo amino y originando la tiorredoxina *m* madura, de 108 aminoácidos y 12 kDa.
3. El análisis de las tiorredoxinas *m* y *f* de guisante recombinantes así como del híbrido *m/f* pone de manifiesto que los determinantes antigénicos se localizan fundamentalmente en el extremo carboxilo de la tiorredoxina *m* y en el extremo amino de la *f*. Es el extremo amino el responsable de la sensibilidad o tolerancia a los tratamientos térmicos.
4. El puente disulfuro de la FBPasa reducido por la tiorredoxina durante la fotoactivación de la primera no está localizado, como hasta ahora se creía, entre las ^{173}Cys - ^{178}Cys , sino entre la ^{153}Cys y la ^{173}Cys o ^{178}Cys .
5. La existencia de una unión proteína-proteína en la interacción FBPasa-tiorredoxina constituye un paso previo a la reducción del puente disulfuro de la enzima necesario para la modulación redox de la misma. En este sentido, la elevada concentración de aminoácidos ácidos en la región del loop de la FBPasa y de aminoácidos básicos en la cara donde se localiza el centro activo de las tiorredoxinas inducen a pensar que la interacción FBPasa-tiorredoxina presenta un fuerte componente de carácter iónico.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Agostino, A. y Hatch, M.D. (1993). A procedure for the purification of thioredoxin *m* from leaves of the C₄ plant *Zea mays*. *Protein Expression and Purification*, **4**: 434-437.
- Aguilar, F., Brunner, B., Gardet-Salvi, L., Stutz, E. y Schürmann, P. (1992). Biosynthesis of active spinach chloroplast thioredoxin *f* in transformed *Escherichia coli*. *Plant. Mol. Biol.* **20**: 301-306.
- Aiazzi, M. y Bozzi, M.L. (1963). Fructose-1,6-bisphosphatase in *Echinopsis* species. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **39**: 1200-1201.
- Alam, J., Curtis, S.E., Gleason, F.K., Gerami-Nejad, M. y Fuchs, J.A. (1989). Isolation, sequence and expression in *Escherichia coli* of an unusual thioredoxin gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **171**: 162-171.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. y Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5350-5354.
- Anderson, L.E. y Ben-Bassat, D. (1981). Membrane-bound metabolism enzymes in pea leaf chloroplast. *Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism*. Akoyunoglou, G. Ed. pp. 373-378. Balaban Intern.Sci. Services. Philadelphia.
- Anderson, L.E. (1986). Light/dark modulation of enzyme activity in plants. In *Advances in Botanical Research*, Vol 12. J.A. Callow (ed). Academic Press, New York, 1-46.
- App, A.A. y Jagendorf, A.T. (1964). Purification of alkaline fructose diphosphatase from *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **85**: 427-434.
- Arnheim, N. (1992). Polimerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 131-156.
- Bairoch, A. PROSITE: a dictionary of protein sites and patterns. *EMBL Biocomputing Technical Document 4*. EMBL, Heidelberg, Germany, 1989.
- Bairoch, A. (1990). PROSITE: a dictionary of protein sites and patterns. Universidad de Ginebra.
- Ballicora, M.A. y Wolosiuk, R.A. (1990). Effect of alkaline pH on the activity and the structure of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Sci.* **70**: 35-41.

BIBLIOGRAFÍA

- Bassham, J.A. y Krause, G.H. (1969). Free energy changes and metabolic regulation in steady-state photosynthetic carbon reduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **189**: 207-221.
- Bennett, C.F., Balcark, J.M., Varrichio, A. y Crooke, S.T. (1988). Molecular cloning and complete sequence of from I phosphoinositide-specific phospholipase C. *Nature*, **334**: 268-270.
- Benkovic, S.J. y De Maine, M. (1982). Mechanism of action of fructose-1,6-bisphosphatase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **53**: 45-82.
- Bishop, M.J. y Rawlings, C.J. (1987). Nucleic acid and protein sequence analysis: a practical approach. IRLPRESS, 397 pp.
- Blombäck, B., Adamson, L., Hessel, B., Holmgren, A., Hogg, D. y Procyk, R. (1986). Thioredoxin and glutaredoxin systems: structure and function. Holmgren, A., Brädén, C.I., Jörnvall, H., Sjöerg, B.M. (ed). pp. 357-367. Raven Press, New York
- Blum, H., Beier, H. y Gross, R.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.
- Bortman, S.J., Trelease, R.N. y Miernyk, J.A. (1981). Enzyme development and glyoxyme characterization in cotyledons of cotton seeds. *Plant Physiol.* **68**: 82-86.
- Bradford, 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**: 248-254.
- Brandes, H.K., Larimer, F.W., Greck, M., Stringer, C.D., Schürmann, P. y Hartman, F.C. (1993). Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin *f.* *J. Bio. Chem.* **268** (25): 18411-18411.
- Brauer, M., Sanders, D. y Stitt, M. (1990). Regulation of photosynthetic sucrose synthesis: a role for calcium? *Planta*, **182**: 236-243.
- Brow, D. y Kershaw, K.A. (1986). Isolation and characterization of two enzymes capable of hydrolyzing fructose-1,6-bisphosphatase from the lichen *Peltigera rufescens*. *Plant Physiol.* **82**: 462-467.
- Brown, T.A. (ed). (1991). Essential Molecular Biology. A practical approach. Vol I. IRLPRESS, 300 pp.

BIBLIOGRAFÍA

- Buc, J., Pradel, J., Meunier, J.-C., Soulie, J.M., Ricard, J. (1980). The pH-induced dissociation of fructose-1,6-bisphosphatase of spinach chloroplast. *FEBS Lett.* **113**: 285-288.
- Buchanan, B.B., Schürmann, P., Kalberer, P.P. (1971). Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplast. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *J. Biol. Chem.* **246**: 5952-5959.
- Buchanan, B.B., Schürmann, P. y Wolosiuk, R.A. (1976). Appearance of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity on conversion of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from dimer to monomer form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 970-978.
- Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. y Schürmann, P. (1979). Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends Biochem. Sci.* **4**: 93-96.
- Buchanan, B.B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 341-374.
- Buchanan, B.B. (1991). Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. Perspectives on its discovery, present status and future development. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 1-9.
- Cárdenas, J., Fernández, E., Muñoz, J. y Pineda, M. (1994). Glosario de Biología Molecular. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 255 pp.
- Carrasco, J.L., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1992). Role of light in the *in vivo* and *in vitro* synthesis of spinach thioredoxin *f. Physiol. Plant.* **84**: 236-242.
- Carrasco, J.L., Chueca, A., Prado, F.E., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Ramos, J.L., Sahrawy, M. y López Gorgé, J. (1994). Cloning, structure and expression of a *lea* cDNA clone coding for a photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase with some different features from those of the leaf chloroplast enzyme. *Planta*, **193**: 494-501.
- Casadaban, M.J. y Cohen, S.N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**: 179-207.
- Clement-Metral, J.D., Holmgren, A., Cambillau, C., Jörnvall, H., Eklund, H., Thomas, D. y Lederer, F. (1988). Amino acid sequence-determination and three-dimensional modelling of thioredoxin from the photosynthetic bacterium *Rhodospira rubra*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 413-419.

BIBLIOGRAFÍA

- Cline, K., Henry, R., Li, C. y Yuan, J. (1993). Multiple pathway for protein import into or across the thylakoide membrane. *EMBO J.* **12**(11): 4105-4114.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. y Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2110-2117.
- Cooper, A.J.L. (1983). Biochemistry of sulfur containing aminoacids. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 187-222.
- Corkmack, B. (1991) en *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley and Sons (ed), pp. 8.5.7.- 8.5.9.
- Crawford, N.A., Droux, M., Kosower, N.S. y Buchanan, B.B. (1989). Evidence for function of the ferredoxin/thioredoxin system in the reductive action of target enzymes of isolated intact chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**: 223-239.
- Cséke, C., Balogh, A. y Farkas, G.L. (1981). Redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anacystis nidulans* and its uncoupling by phage infection. *FEBS Lett.* **126**: 85-88.
- Cséke, C. y Buchanan, E.B. (1986). Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **853**: 43-63.
- Chou, P.Y. y Fasman, G.D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology*, **47**: 45-147.
- Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1984). Light induced nuclear synthesis of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* **75**: 539-541.
- Davis, A.A. y Braun, M.H. (1987) en *Lymphocytes: a practical approach*. G. B.B., Klaus (ed). IRL Press, Oxford, pp. 229-253.
- Decottignies P., Schmitter, J.M., Jacquot, J.P., Dutka, S., Picaud, A. y Gadal, P. (1990). Purification, characterization and complete amino acid sequence of a thioredoxin from a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**: 112-121.
- Decottignies, P., Schmitter, J.M., Dutka, S., Jacquot, J.P. y Miginiac-Maslow, M. (1991). Characterization and primary structure of a second thioredoxin from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* **198**: 505-512.
- Dong, S.-M., Hwan, J. y Hahn, T.-R. (1995). Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding chloroplastic FBPase from pea. *Plant Physiol.* **107**: 313-314.

BIBLIOGRAFÍA

- Douwe de Boer, A. y Weisbeek, P.J. (1991). Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**: 221-253.
- Droux, M., Jacquot, J.P., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J.C., Crawford, N.A., Yee, B.C. y Buchanan, B.B. (1987). Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: Purification and properties of the enzyme from C₄, C₃ and cyanobacterial species. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**: 426-439.
- Droux, M., Crawford, N.A. y Buchanan, B.B. (1988). Mechanism of thioredoxin-linked activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **305**: 335-342.
- Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. y Goodman, H.M. (1975). Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* **96**: 171-184.
- Dyson, H.J., Gippert, G.P., Case, D.A. y Holmgren. (1990). Three dimensional solution structure of the reduced form of *Escherichia coli* thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **29**: 4129.
- Eklund, H., Gleason, F.K. y Holmgren, A. (1991). Structure and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **11**:13-28.
- El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., Marker, A.J., Colosia, A.D., d'Angelo, G., Fraser, B.A. y Pilch, S.J. (1988). cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down regulation of its mRNA by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 8430-8434.
- Ellis, R.J. (1981). Chloroplast proteins: Synthesis, transport and assembly. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**:111-137.
- Eringer, L. y Krajcovic, J. (1987). Prokariotic character of chloroplasts and mitochondria. The present knowledge. *Folia Microbiol.* **32**: 244-282.
- Feng, D.F. y Doolittle, R. (1987). Progressive multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **25**: 352-360.
- Fickenscher, K. y Scheibe, R. (1983). Purification and properties of NADP-dependent malate dehydrogenase from pea leaves. *Biochem. Biophys. Acta*, **749**: 249-254.

BIBLIOGRAFÍA

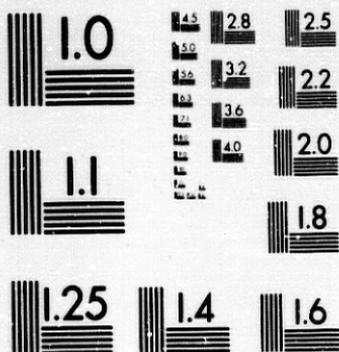
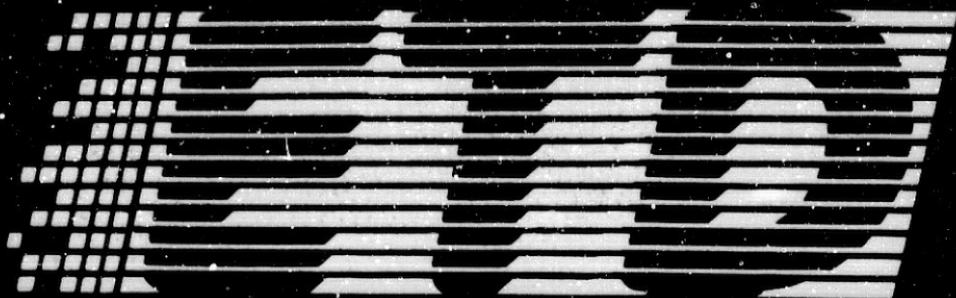
- Fisher, W.K. y Thompson, E.O.P. (1983). Amino acid sequence studies on sheep liver fructose-bisphosphatase II. The complete sequence. *Aust. J. Biol. Sci.* **36**: 235-250.
- Florencio, F.J., Yee, B.C., Johnson, T.C. y Buchanan, B.B. (1988). An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin *h* from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* **266**: 496-507.
- Florencio, F., Gadal, P. y Buchanan, B.B. (1993). Thioredoxin-linked activation of the chloroplast and cytosolic forms of *Chlamydomonas reinhardtii* glutamine synthetase. *Plant. Physiol. Biochem.* **31**: 644-655.
- Ford, D.M., Jablonski, P.P. Mohamed, A.H. y Anderson, L.E. (1987). Protein modulase appears to be a complex of ferredoxin, ferredoxin/thioredoxin reductase and thioredoxin. *Plant Physiol.* **83**: 628-632.
- Forman-Kay, J.D., Clore, G.M., Wingfield, P.T. y Gronenborn, A.M. (1991). High resolution 3D structure of reduced recombinant human thioredoxin in solution. *Biochemistry*, **30**: 2685.
- Frieden, C. (1970). Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The histeretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.* **245**: 5788-5799.
- Fuchs, R. y Blakesley, R. (1983). Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Meth. Enzymol.* **100**: 3-38.
- Gardemann, A., Schimkat, D. y Heldt, H.W. (1986). Control of CO₂ fixation. Regulation of stromal fructose-1,6-bisphosphatase in spinach by pH and Mg²⁺ concentration. *Planta*, **168**: 536-545.
- Garfin, D.E. (1990). One-dimensional gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* **182**: 425-441.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robinson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**: 97-120.
- Garnier, J. (1990). Protein structure prediction. *Biochimie*, **72**: 513-524.
- Genovesio-Taverne, J., Jetzer, Y., Sauder, U., Hohenester, E., Huguet, C., Jansonius, J.N., Gardet-Salvi, L. y Schürmann, P. (1991). Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of the spinach chloroplast thioredoxin *f*. *J. Mol. Bio.* **222**: 459-461.

BIBLIOGRAFÍA

- Gershoni, J.M. y Palade, G.E. (1983). Protein Blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**: 1-15
- Gibson, J.L., Chen, J.H., Tower, P.A. y Tabita, F.R. (1990). The form II fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase genes form part of a large operon in *Rhodobacter sphaeroides*: primary structure and insertional mutagenesis. *Biochemistry*, **29**: 8085-8093.
- Gill, S.C. y von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- Gleason, F.K., Whittaker, M.M., Holmgren, A. y Jörnvall, H. (1985). The primary structure of thioredoxin from the filamentous cyanobacterium *Anabaena sp.* 7119. *J. Biol. Chem.* **260**: 9567-9573.
- Gleason, F.K. y Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and related proteins in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**: 271-298.
- Gleason, F.K., Lim, C.-J., Gerami-Nejad, M. y Fuchs, J.A. (1990). Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin with altered active site residues. *Biochemistry* **29**: 3701-3709.
- Gontero, B., Meunier, J.-C., Sauve, P. y Ricard, J. (1985). Analytical ultracentrifugation studies on chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Sci.* **38**: 17-22.
- González-Porqué, P., Baldestein A. y Reichard, P. (1970). Purification of a thioredoxin system from yeast. *J. Biol. Chem.* **245**: 2363-2370.
- Goswami, A., y Rosenberg, I.N. (1987). Thioredoxin stimulates enzymatic outer ring monodeiodination of reverse triiodo-thyronine. *Endocrinology*, **121**: 1937-1945.
- Gribskow, M y Devereux, J. (1991). Sequence Analysis Primer. M Stockton Press, 280 pp.
- Gripo, J.F., Tienrungroj, W., Dahmer, M.K., Housley, P.R. y Pratt, W.B. (1983). Evidence that the endogenous heat stable glucocorticoid receptor activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **258**: 13658-13664.
- Häberlein, I., Schimpff-Weiland, G. y Follman, H. (1985). Unexpected specificity in the thioredoxin activation of fructose-1,6-bis-phosphatase from different plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**(2): 401-406.

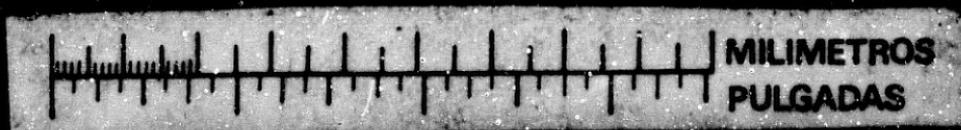
BIBLIOGRAFÍA

- Hamilton, W.D.O., Harrison, D.A. y Dyer, T.A. (1988). Sequence of the *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8707.
- Hanson, R.W. (1990). Oxidation states of carbon as aids to understanding oxidative pathways in metabolism. *Biochem. Educ.* **18**: 194-196.
- Hartman, H., Syvanen, M. y Buchanan, B.B. (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxin *f* and *m*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 247-254.
- Hawltischek, F., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U. y Neupert, W. (1988). *Cell*, **53**: 795-806
- Heber, U.; Takahama, U.; Neimanis, S. y Shimizu-Takahama, M. (1982). Levels of some photosynthetic intermediates and activation of light regulated enzymes during photosynthesis of chloroplasts and green leaf protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **679**: 287-299.
- von Heijne, G. y Nishikawa, K. (1991). Chloroplast transit peptides. The perfect random coil?. *FEBS Lett.* **278** (1): 1-3.
- Heldt, H.W.; Werdan, K.; Milovancev, M. y Geller, G. (1973). Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 224-241.
- Hermoso, R., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1987). An immunological method for quantitative determination of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in leaf crude extracts. *Photosynth. Res.*, **14**: 269-278.
- Hermoso, R., Fonolla, J., de Felipe, M.R., Vivó, A., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1992). Double immunogold localization of thioredoxin *f* and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. *Plant. Physiol. Biochem.* **30**(1): 39-46.
- Hermoso, R. Castillo, M., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1995), Fructose-1,6-bisphosphatase binding site involved in the interaction of pea chloroplast enzyme with thioredoxin. *En prensa*.
- Hers, H.G. y Hue, L. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* **258**: 984-988.
- Herting, C. y Wolosiuk, R.A. (1980). A dual effect of Ca^{2+} on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**: 325-333.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

1 : 24



BIBLIOGRAFÍA

- Hamilton, W.D.O., Harrison, D.A. y Dyer, T.A. (1988). Sequence of the *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8707.
- Hanson, R.W. (1990). Oxidation states of carbon as aids to understanding oxidative pathways in metabolism. *Biochem. Educ.* **18**: 194-196.
- Hartman, H., Syvanen, M. y Buchanan, B.B. (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxin *f* and *m*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 247-254.
- Hawltischek, F., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U. y Neupert, W. (1988). *Cell*, **55**: 795-806
- Heber, U.; Takahama, U.; Neimanis, S. y Shimizu-Takahama, M. (1982). Levels of some photosynthetic intermediates and activation of light regulated enzymes during photosynthesis of chloroplasts and green leaf protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **679**: 287-299.
- von Heijne, G. y Nishikawa, K. (1991). Chloroplast transit peptides. The perfect random coil?. *FEBS Lett.* **278** (1): 1-3.
- Heldt, H.W.; Werdan, K.; Milovancev, M. y Geller, G. (1973). Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 224-241.
- Hermoso, R., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1987). An immunological method for quantitative determination of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in leaf crude extracts. *Photosynth. Res.*, **14**: 269-278.
- Hermoso, R., Fonolla, J., de Felipe, M.R., Vivó, A., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1992). Double immunogold localization of thioredoxin *f* and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. *Plant. Physiol. Biochem.* **30**(1): 39-46.
- Hermoso, R. Castillo, M., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1995), Fructose-1,6-bisphosphatase binding site involved in the interaction of pea chloroplast enzyme with thioredoxin. *En prensa*.
- Hers, H.G. y Hue, L. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* **258**: 984-988.
- Herting, C. y Wolosiuk, R.A. (1980). A dual effect of Ca²⁺ on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**: 325-333.

BIBLIOGRAFÍA

- Herting, C.M. y Wolosiuk, R.A. (1983). Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **258**: 984-988.
- Hirasawa, M.; Droux, M., Gray, K.A., Boyer, J.M., Davis, D.J., Buchanan, B.B. y Knaff, D.B. (1988). Ferredoxin-thioredoxin reductase: properties of its complex with ferredoxin. *Biochem. Biophys. Acta*, **935**: 1-8.
- Hirel, Ph.H., Schmitter, J.M., Dessen, P., Fayat, G. y Blanquet, S. (1989). Extent of N-terminal methionine excision from *E. coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 8247-8251.
- Hodges, M., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Stein, M., Lepiniec, L., Cretin, C. y Gadal, P. (1994). Purification and characterization of pea thioredoxin *f* expressed in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* **26**: 225-234.
- Holmgren, A. y Sodererg, B.-O. (1970). Crystallization and preliminary crystallographic data for thioredoxin from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **54**: 387-390.
- Holmgren, A., Söderberg, B.-O., Eklund, H. y Bräden, C.I. (1975). Three dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S₂ to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 2305-2309.
- Holmgren, A., Kallis, G.-B. y Nordström, B. (1981). A mutant of thioredoxin from *Escherichia coli* tsnC7007 that is non-functional as a subunit of phage T7 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **256**: 3118-3124.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 237-271.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-13966.
- Höög, J.-O., vonBahr-Lindström, H., Josephson, S., Wallace, B., Kushner, S.R., Jörnvall, H. y Holmgren, A. (1985). Nucleotide sequence of the thioredoxin gene from *Escherichia coli*. *Biosci. Rep.* **4**: 917-923.
- Hopp, T.P. y Wood, K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3824-3828.
- Horecker, B.L., Melloni, E., y Pontremolli, S. (1975). Fructose-1,6-bisphosphatase. properties of the enzyme and its modification by proteolytic enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **49**: 193-226.

BIBLIOGRAFÍA

- Horsnell, P.R. y Raines, C.A. (1991). Nucleotidic sequence of a cDNA clone encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* **17**:185-186.
- Hosta, L. y Flick, P. (1991). Enhancement of specificity and yield in PCR. *Comments*, **18**(3):1-8.
- Hue, L. (1981). The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **52**: 247-331.
- Huppe, H.C. de Lamotte-Guery, F., Jacquot, J.P. y Buchanan, B.B. (1990). The ferredoxin-thioredoxin system of a green alga *Clamydomonas reinhardtii*. Purification and characterization of thioredoxin and ferredoxin-thioredoxin reductase components. *Planta*, **180**: 341-351.
- Huppe, H.C., Picaud, A., Buchanan, B.B. y Miginiac-Maslow, M. (1991). Identification of an NADP/thioredoxin system in *Clamydomonas reinhardtii*. *Planta*, **186**: 115-121.
- Innis, M.A., Myamo, K.B., Gelfand, D.H. y Brow, M.A.D. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 9436-9440.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. (ed). (1990). En *PCR PROTOCOLS: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc. 482 pp.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2989-2998.
- Ishiwari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., Hayashi, H. y Chino, M. (1995). Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta*, **195**: 456-463.
- Iwadate, H. Yano, K. Aso, A. Kamo, M., Gardet-Salvi, L. Schurmann, P. y Tsugita, A. (1993). A structure of spinach ferredoxin-thioredoxin reductase. In *Research in Photosynthesis*. N. Murata (Ed). Kluwer Academic Publishers B.V., Dordrecht, The Netherlands.
- Jacquot, J.P. y Decctignies, P. (1986). Further evidence for a role of sulfhydryls in the thioredoxin dependent activation of corn NADP-malate deshydrogenase. Use of a cysteine free mutant of *E. coli* thioredoxin. *FEBS Lett.*, **209**: 87-91.

BIBLIOGRAFÍA

- Jacquot, J.P., López Jaramillo, J., Chueca, A., Cherfils, J., Lemaire, S., Chedozeau, Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Wolosiuk, R. y López Gorgé, J. (1995). High-level of recominant pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *Eur. J. Biochem.* **229**: 675-681.
- Johnson, R.S., Biemann, K. (1987). The primary structure of thioredoxin from *Chromatium vinosum* determined by high performance mass spectrometry. *Biochemistry* **26**: 1209-1214.
- Johnson, T.C., Quiang, R.Q., Kung, J.F. y Buchanan, B.B. (1987). Thioredoxin and NADP-thioredoxin reductase from carrot cells. *Plant*, **171**: 321-331.
- Johnson, T.C., Yee, B.C., Carlson, D.E., Buchanan, B., Johnson, R.S., Mathews, W.R. y Biemann, K. (1988). Thioredoxin from *Rhodospirillum rubrum*: Primary structure and relation to thioredoxins from other photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* **170**: 2406-2408.
- Joint, I.R., Morris, I. y Fuller, R.C. (1972). Purification of a complex of alkaline fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **247**: 4833-4838.
- Jones, S.W. y Luk, K.C. (1988). Isolation of chicken thioredoxin cDNA clones. *J. Biol. Chem.* **263**: 9607-9611.
- Kaiser, K. y Murray, N.E. (1984) en *DNA Cloning Volume I: a practical approach*. Glover, D.M. (ed.). IRL Press Oxford-Washington DC. p 24.
- Kamo, M., Tsugita, A., Wiessner, C., Wedel, N., Barling, D., Herrmann, R.G., Aguilar, F., Gardet-Salvi, L., Schürmann, P. (1989). Primary structure of spinach chloroplast thioredoxin f. *Eur. J. Biochem.* **182**: 315-322.
- Karplus, P.A. y Schultz, G.E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften*, **72**: 212-213.
- Katti, S.K., LeMaster, D.M. y Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**: 167-184.
- Ke, H., Thorpe, Ch.M., Seaton, B.A., Marcus, F. y Lipscomb, W.N. (1989). Molecular structure of FBPase at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1475-1479.
- Ke, H., Zhang, Y. y Lipscomb, W.N. (1990a). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose-6-phosphate, AMP and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5253.

BIBLIOGRAFÍA

- Ke, H., Thorpe, Ch.M., Seaton, B.A., Lipscomb, W.N. y Marcus, F. (1990b). Structure refinement of fructose-1,6-bisphosphatase and its fructose-2,6-bisphosphate complex at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**:513-539.
- Ke, H., Liang, J.-Y., Zhang, Y. y Lipscomb, W.N. (1991a). Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form). *Biochemistry*, **30**(18): 4412-4420.
- Ke, H., Liang, J-Y, Zhang, Y. y Lipscomb, W.N. (1991b). Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose-6-phosphate at 2.1 angstroms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **88**: 2989-2993.
- Kelly, C.J., Zimmermann, G. y Latzko, E. (1976). Light induced activation of fructose-1,6-bisphosphatase in isolated intact chloroplast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**: 193-199.
- Khayat, E. y Daie, J. (1991). Purification of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and immunological analysis of light/dark modulation in sugarbeet leaves. *Suplemento Plant Physiol.* **96**: 84.
- Kirbi, K.S. (1957). A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* **66**: 495-505.
- Klein, P., Kanehisa, M. y Delisi, C. (1985). The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **815**: 468-476.
- Knippers, R. (1975). *Genética Molecular*. Ed. Omega. 310 pp.
- Kossmann, J., Müller-Röber, B., Dyer, T.A., Raines, C.A., Sonnewald, U. y Willmitzer, L. (1992). Cloning and expression analysis of the plastidic fructose-1,6-bisphosphatase coding sequence from potato: circumstantial evidence for the import of hexoses into chloroplasts. *Planta*, **188**: 7-12.
- Krause, G.H. (1977). Light-induced movement of magnesium ions in intact chloroplasts. Spectroscopic determination with Eriochrome blue SE. *Biochim. Biophys. Acta*, **460**: 500-510.
- Krause, G., Lundstrom, J., López Bares, J., Pueyo de la Cuesta, C. y Holmgren, A. (1991). Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **266**: 9494-9500.

BIBLIOGRAFÍA

- Krebs, H.A. (1964). Gluconeogenesis. *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser B, 159, 545-564.
- Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, J.A.M. y Latzko, E. (1988). Stromal free calcium concentration and light-mediated activation of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* **86**: 423-428.
- Kruger, N.J. y Beevers, H. (1958). Synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate in endosperm of castor bean seedlings. *Plant Physiol.* **77**: 358-364.
- Kruger, N.J. y Beevers, H. (1984). Effect of fructose-2,6-bisphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* **76**: 49-54.
- Kuhlemeier, C., Green, P.J. y Chua, N.-H. (1987). Regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 221-257.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Labudová, O., Némethová, M., Ján Turňa y Kallárová, M. (1994). PCR cloning and sequencing of the coding portion of the thioredoxin-encoding gene from *Streptomyces aureofaciens* BMK. *Gene*, **138**: 263-264.
- Ladror, U.S., Latshaw, S.P. y Marcus, F. (1990). Spinach cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase. Purification, enzyme properties and structural comparisons. *Eur. J. Biochem.* **189**: 89-94.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamotte-Guery, F., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Stein, M., Minard, P. y Jacquot, J.P. (1991). Mutation of a negatively charged amino acid in thioredoxin modifies its reactivity with chloroplastic enzymes. *Eur. J. Biochem.* **196**: 287-294.
- Lázaro, J.J., Chueca, A., López Gorgé, J. y Mayor, F. (1974). Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts: purification and heterogeneity. *Phytochemistry*, **13**: 2455-2461.
- Lázaro J.J., Chueca, A., López Gorgé, J. y Mayor Zaragoza, F. (1975). Properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Phytochemistry*, **14**: 2579-2583.

BIBLIOGRAFÍA

- Lepienic, L., Hodges, M., Gadal, P. y Crépin, C. (1992). Isolation, characterization and nucleotide sequence of a full-length pea cDNA encoding thioredoxin-f. *Plant. Mol. Biol.* **18**: 1023-1025.
- Li, L. y Ross, J.D. (1988). Fructose-1,6-bisphosphatase in seeds of *Corylus avellana*. *Phytochemistry*, **27**: 1977-1980.
- Li, D., Stevens, F.J., Schiffer, M. y Anderson, L.E. (1994). Mechanism of light modulation: identification of potential redox-sensitive cysteines distal to catalytic site in light-activated chloroplast enzymes. *Biophys. J.* **67**: 29-35.
- Liang, J.-Y., Zhang, Y., Ke, H. y Lipscomb, W.N. (1992). Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase with regulatory inhibitor fructose-2,6-bisphosphate at 2.6 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**(6): 2404-2408.
- Lim, C.J., Gleason, F.K. y Fuchs, J.A. (1986). Cloning, expression and characterization of the *Anabaena* thioredoxin gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 1258-1264.
- Lim, C.J., Gleason, F.K., Jacobson, B.A. y Fuchs, J.A. (1988). Characterization of *Escherichia coli* *Anabaena* sp. hybrid thioredoxins. *Biochemistry* **27**: 1401-1408.
- López Jaramillo, J., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Prado, F.E. y López Gorgé, J. (1994). Cloning and sequencing of pea cDNA fragment coding for thioredoxin *m*. *Plant Physiol.* **105**: 1021-1022.
- López Jaramillo, J., Chueca, A., López Gorgé, J. (1995). Purification and properties of pea thioredoxin *m* expressed in *E. coli*. *Proceeding of the Xth International Photosynthesis Congress*. P. Mathis (Ed.). Kluwer Academic Publishers.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 256-275.
- Lundstrom, J., Krause, G. y Holmgren, A. (1992). A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. New refolding system for reduced or randomly oxidized ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **267**: 9041-9052.
- Lloyd, J.C., Raines, C.A., John, U.P. y Dyer, T.A. (1991). The chloroplast FBPase gene of wheat: structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants. *Mol. & Gen. Genet.* **225**: 209-216.

BIBLIOGRAFÍA

- Maeda, K., Tsugita, A., Dalzoppo, D., Villoboís, F. y Schürmann, P. (1986). Further characterization and amino acid sequence of m-type thioredoxin from spinach chloroplast. *Eur. J. Biochem.* **154**: 197-203.
- Mandel, M. y Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Marcus, F., Edelstein, I., Reardon, L. y Hienrikson, R.L. (1982). Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7161-7165.
- Marcus, F., Moberly, L. y Latshaw, S.P. (1988). Comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatase: identification of a region unique to the light regulated chloroplast enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 5379-5383.
- Marcus, F. y Harrsch, P.B. (1990). Amino acid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **273**: 151-157.
- Marcus, F., Chamberlain, S.H., Chu, C., Masiarz, F.R., Shin, S., Yee, B.C. y Buchanan, B.B. (1991). Plant thioredoxin *h*: an animal-like thioredoxin occurring in multiple cell compartments. *Arch. Biochem. Biophys.* **287**: 195-198.
- Marre, E., Cornaggia, M.P., Alberghina, F., Bianchetti, R. (1965). Substrate level as a regulation factor of the synthesis of fructokinase, hexokinase and other carbohydrate-metabolizing enzymes in higher plants. *Biochem. J.* **97**, 20P.
- Marty, I. y Meyer, Y. (1991). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a tobacco thioredoxin. *Plant Mol. Biol.* **11**: 143-417.
- Marx, J.W. (1968). Fructose-1,6-diphosphatase in germinating seedlings. *Diss. Abstr.* B 28, 2718-2719.
- Mathews, W.R., Johnson, R.S., Cornwell, K.L., Johnson, T.C., Buchanan, B.B. y Biermann, K. (1987). Mass spectrophotometrically derived amino acid sequence of thioredoxin from *Chlorobium*, an evolutionary prominent photosynthetic bacterium. *J. Biol. Chem.* **262**: 7537-7545.
- McDonell, M.W., Simon, M.N. y Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* **110**: 119-146.

BIBLIOGRAFÍA

- McFarlan, S. y Hogenkamp, H.P.C. (1989). Purification, characterization and revised amino acid sequence of a second thioredoxin from *Corynebacterium nephridii*. *Eur. J. Biochem.* **179**: 389-398.
- McPherson, M.J, Quirke, P. y Taylor, G.R. (ed). (1992). En *PCR. A practical approach*. IRLPRESS, 253 pp.
- Meng, M. y Hogenkamp, H.P.C. (1981). Purification, characterization and amino acid sequence of thioredoxin from *Corynebacterium nephridii*. *J. Biol. Chem.* **262**: 12114-12119.
- Merill, C.R., Goldman, D. y vanKeuren, M.L. (1984). Gel Protein stains: silver stain. *Meth. Enzymol.* **104**: 441-447.
- Messing, J., Gronengorn, B., Mulier-Hill, B. y Hofschneider, P.H. (1977). Filamentosus coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a Hind III fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3642-3646.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101**: 20-78.
- Mizusawa, S., Nishimura, S. y Seela, F. (1986). Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucl. Acids, Res.*, **14**: 1319-1324.
- Moore, E.C., Reichard, P. y Thelander, L. (1964). Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **239**: 3445-3452.
- Moore, B.G. y Tischer, R.G. (1965). Biosynthesis of extracellular polysaccharides by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Can. J. Microbiol.* **11**: 877-885.
- Mori, H. Tekabe, T. y Azakawa, T. (1984). Loose association of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase with chloroplast thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* **5**: 17-28.
- Morris, I. (1968). Inhibition of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by magnesium ATP²⁻, magnesium ADP⁻ and magnesium pyrophosphate (MgP₂O₇²⁻). *Biochim. Biophys. Acta*, **162**: 462-464.
- Muller, E.G.D. y Buchanan, B.B. (1989) Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin gene of *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.* **264**: 4008-4014.

BIBLIOGRAFÍA

- Nikkola, M., Gleason, F.K., Fuchs, J.A. y Ecklund, H. (1993). *Escherichia coli* thioredoxin in which lysine 36 is replaced by glutamic acid. *Biochemistry*, **32**: 5093.
- Nishizawa, A.N. y Buchanan, B.B. (1981). Enzyme regulation in C-4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin linked fructose diphosphate and sedoheptulose bisphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.* **256**: 6119-6126.
- Nossal, N.G. (1983). Prokaryotic DNA replication systems. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 581-615.
- Oblong, J.E., Berggren, M., Gasdaska, P.Y. y Powis, G. (1994). Site-directed mutagenesis of active site Cys in human thioredoxin produces competitive inhibitors of human thioredoxin reductase and elimination of mitogenic properties of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **269** (16): 11714-11720.
- O'Hara-Mays, E.E. y Capwell, J.C. (1993). Miniprep for chloroplast DNA isolation. *Microchemical Journal*, **47**: 245-250.
- Ohira, A., Honda, O., Gauntt, C.D., Yamamoto, M., Hori, K., Masutani, H., Yodoi, J. y Honda, Y. (1994). Oxidative stress induces adult T cell leukemia derived factor/thioredoxin in the rat retina. *Laboratory Investigation*, **70**: 279-285.
- Peitsch, M.C. y Jongeneel, C.V. (1993). A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int. Immunol.* **5**: 233-238.
- Pilkins, S.J., Park, C.R. y Claus, T.H. (1978). Hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Vitam. Horm.* **36**: 383-460.
- Plá, A. y López Gorgé, J. (1981). Thioredoxin/fructose-1,6-bisphosphatase affinity in the enzyme activation by the ferredoxin-thioredoxin system. *Biochim. Biophys. Acta*, **636**: 113-118.
- Pontremoli, S. y Mangiarotti, G. (1968). Fructose-1,6-diphosphatase as a metabolic regulator of gluconeogenesis. *Minerva Med.* **59**: 2133-2134.
- Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1971). Fructose-1,6-diphosphatase. En *Enzymes*. P.D. Boyer (Ed.). Vol IV. pp 611-646. Academic Press, New York.
- Pontremoli, S. (1972). Structure and function of liver fructose-1,6-diphosphatase. *Biochem. J.* **130**, 1P.
- Prado, F.E., Lázaro, J.J., Hermoso, R., Chueca, A y López Gorgé, J. (1992). Purification and properties of pea (*Pisum sativum* L.) thioredoxin f, a plant

BIBLIOGRAFÍA

thioredoxin with unique features in the activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Planta*, **188**: 345-353.

Preiss, J., Biggs, M. y Greenberg, E. (1967). The effect of magnesium ion concentration on the pH optimum of spinach leaf alkaline fructose diphosphatase. *J. Biol. Chem.* **242**: 2292-2294.

Preusch, P.C. (1993). Is thioredoxin the physiological vitamin K epoxide reducing agent?. *FEBS Lett.* **305** (3): 257-259.

Quin, J., Clore, G.M., Kennedy, W.M.P. y Gronenborn, A.M. (1995). Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF κ B. *Structures*, **3** (3): 289-297.

Racker, E. y Schroeder, E.A.R. 1958. Reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1 phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and sedoheptulose-1,7-diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **74**: 326-344.

Raghavendra, A.S., Carrillo, N. y Vallejos, R.H. (1981). The pattern and characteristics of membrane bound ribulose bisphosphate carboxylase in spinach chloroplasts. En *Photosynthesis IV. Regulation of Carbon Metabolism*. G. Akoyunoglou (ed). pp 31-38. Balaban International Science Services, Philadelphia

Raines, C.A., Lloyd, J.C., Longstaff, M., Bradley, D. y Dyer, T. (1988). Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene. *Nucleic Acid Res.* **16**: 7931-7942.

Raines, C.A., Lloyd, J.C., Willingham, N.M., Potts, S. y Dyer, T.A. (1992). cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase reveals similarity with fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* **205**: 1053-1059.

Rao, N.N y Modi, V.V (1976) Fructose-1,6-diphosphatase from *Mangifera indica*. *Phytochemistry*, **15**: 1437-1439.

Rivera-Madrid, R., Maestres, D., Marinho, P. Jacquot, J.P., Decottingines, M., Miginiac-Maslow, M. y Meyer, Y. (1995). Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5620-5624.

Robinson, C. y Ellis, R.J. (1984a). Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.*, **142**: 337-342.

BIBLIOGRAFÍA

- Robinson, C. y Ellis, R.J. (1984b). Transport of proteins into chloroplasts. The precursor of small subunit of RUBISCO is processed to the mature size in two steps. *Eur. J. Biochem.*, **142**: 343-346.
- Rodriguez Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, A., Hermoso, R. y López Gorgé, J. (1987). Binding of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to chloroplast membrane. *Plant Science*, **52**: 41-48.
- Rodriguez Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, A., Hermoso, R. y López Gorgé, J. (1990). Effects of alcohols on the association of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to thylakoids membranes. *Physiol. Plant.* **78**: 409-413.
- Rodriguez-Suarez R.J. y Wolosiuk, R.A. (1993). Sequence of a cDNA encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapessed. *Plant Physiol.* **103**: 1453-1454.
- Rogers, D.T., Hiller, E., Mitsock, L. y Orr, E. (1988). Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **263**: 6051-6057.
- Rost, B. y Sander, C. (1993a). Prediction of protein secondary structure at better than 70% of accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**: 584-599.
- Rost, B. y Sander, C. (1993b). Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 7558-7562.
- Rost, B., Sander, C. y Schneider, R. (1994). PHD – a mail server for protein secondary structure predictions. *CAMBIOS*, **10**: 53-60.
- Ruano, G., Brash, D.E. y Kidd, K.K. (1991). PCR: the first few cycles. *Amplifications*, **7**: 1-4.
- Russel, M. y Model, P. (1985). Thioredoxin is requerided for filamentous phage assembly. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 29-33.
- Russel, M. y Model, P. (1986). The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation and characterization of mutant thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **261**: 14997-15005.
- Sahrawy, M., Chueca, A., Hermoso, R., Lázaro, J.J. y López Gorgé, J. (1988). Effect of lighth quality and intensity on the biosynthesis of photosyntetic fructose-1,6-bisphosphatase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **7**: 55-59.

BIBLIOGRAFÍA

- Sahrawy, M., Chueca, A. y López Gorgé, J. (1995a). Site-directed mutagenesis shows that lysine-299 is essential for activity of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Sci.* **106**: 81-89.
- Sahrawy, M., Hetcht, V., López Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y. y Meyer, Y. (1995b). Intron position as evolutionary markers of thioredoxin and thioredoxin domains. *J. Mol. Evol.* *En prensa*.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- Sander, C. y Schneider, R. (1991). Database of homology-derived structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*, **9**: 56-68.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- Satta, M.A. y Sisini, A. (1964). Glucose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphatase of navy bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**: 111-113.
- Scala J., Patrick, C. y Macbeth, G. (1968). Fructose-diphosphatase (fructose-1,6-diphosphatase) of castor bean endosperm and leaf: properties and partial purification. *Arch. Biochem. Biophys.* **127**: 576-584.
- Schallreuter, K.U., Pitteikow, M.R., Wogd, J.M. (1989). EF-hands calcium binding regulates the thioredoxin reductase/thioredoxin electron transfer in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 1311-1316.
- Scheie, R. (1981). Thioredoxin *m* in pea chloroplasts: concentration and redox state under light and dark condition. *FEBS Lett.* **133**: 301-304.
- Scheibe, R. (1991). Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiol.* **96**: 1-3.
- Schmidt, A. (1981). A thioredoxin activated fructose-1,6-bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *Planta*, **152**: 101-104.
- Schürmann, P., Maeda, K. y Tsugita, A. (1981). Isomers in thioredoxins of spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **116**: 37-45.

BIBLIOGRAFÍA

Schürmann, P., Roux, J. y Salvi, L. (1985). Modification of thioredoxin specificity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by substrate and Ca^{2+} . *Physiol. Vég.* **23** (5): 813-818.

Segel, I.H. (1975). *ENZYME KINETICS Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme System*, 2ª ed. John Wiley & Sons Inc. Cap. II (pp 18-99) y VII (pp 346-403).

Slovacek, R.E. y Vaughn, S. (1982). Chloroplast sulfhydryl groups and the light activation of fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.*, **70**: 978-981.

Smeeckens, S., Macdonald, F.D. y Buchanan, B.B. (1989). Studies on the entry of fructose-2,6-bisphosphate into chloroplasts. *Plant Physiol.* **89**: 1270-1274.

Smith, U.R. (1993). A Biologist's Guide to Internet Resources (ver 1.7). *Smith-Una@yale.edu*.

Söderberg, B.-O., Holmgren, A. y Bräden, C.-I. (1974). Structure of oxidized thioredoxin to 4.5 Å. *J. Mol. Biol.* **90**: 143-152.

Söderberg, B.-O., Sjöberg, B.-M., Sonnerstam, U., Bräden, C.-I. (1978). Three dimensional structure of thioredoxin induced by bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 5827-30.

Soulie, J.M., Riviere, M., Baldet, P. y Ricard, J. (1991). Kinetics of the conformational transition of the spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase induced by fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **195**: 671-178.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517.

Springgate, C.F. y Stachow, C.S. (1972). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. I. Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**: 1-12.

Starita-Geribaldi, M., Houri, A. y Sudaka, P. (1993). Lane distortion in gel electrophoresis patterns. *Electrophoresis*, **14**: 773-781.

Stein, M., Lázaro, J.J. y Wolosiuk, R.A. (1989). Concerted action of cosolvents, chaotropic anions and thioredoxin on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Reactivity to iodoacetamide. *Eur. J. Biochem.* **185**: 425-431.

Stein, M., Jacquot, J.-P., Jeannette, E., Decottignies, P., Hodges, M., Lancelin, J.-M., Mittard, V., Schmitter, J.-M. y Miginiac-Maslow, M. (1995). *Chlamydomonas*

BIBLIOGRAFÍA

reinhardtii thioredoxins: structure of the gene coding for the chloroplastic *m* and cytosolic *h* isoforms; expression in *Escherichia coli* of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. *Plant. Mol. Biol.* **28**: 487-503.

Stent, G.S. (1973). *Genética Molecular*. Ed. Omega. 700 pp.

Stitt, M. y Heldt, H.W. (1985). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. Intracellular metabolite distribution and properties of the cytosolic fructose-bisphosphatase in leaves of *Zea mays* L. *Planta*, **164**: 178-188.

Stitt, M., Herzog, B. y Heldt, H.W. (1985). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphatase. Modulation of the spinach leaf cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase activity *in vitro* by substrate, products, pH, magnesium, fructose-2,6-bisphosphatase, adenosine monophosphate and dihydroxyacetone phosphate. *Plant Physiol.* **79**: 590-598.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. y Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 10-89.

Suda, H., Xu, G.J., Kutny, R.M., Natalini, S., Pontremoli, S. y Horecher, B.B.L. (1982). Location of Lysine residues at the allosteric site of fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**: 10-14.

Summer, W.C. (1970). A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethylpyrocarbonate. *Anal. Biochem.*, **33**: 459-463.

Surendrahathan, K.K y Nair, P.M. (1972). Properties of acidic and alkaline fructose-1,6-bisphosphatase from irradiated banana. *Phytochemistry*, **11**: 119-166.

Süss, K.M., Arkona, C., Monteuffel, R. y Adler, K. (1993). Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes at higher plants *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 5514-5518.

Szekeres, M., Droux, M. y Buchanan, B.B. (1991). The ferredoxin-thioredoxin reductase variable subunit gene from *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **173**: 1821-1823.

Tabor, S., Hubert, H.E. y Richardson, C.C. (1987). *Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. *Biol. Chem.* **262**: 16212-16223.

Tabor, S. y Richardson, C.C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4767-4771.

BIBLIOGRAFÍA

- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1989). Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.* **264**: 6447-6458.
- Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kond, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K-1, Yokota, T., Wakasugi, H. y Yodoi, J. (1989). ALT-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* **8**: 757-764.
- Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, N., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T. y Murachi, T. (1988). Fig heart calpastatin: Identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, **27**: 1964-1972.
- Tejwani, G.A. (1983). Regulation of fructose-bisphosphatase activity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **54**: 121-194.
- Thomas, S.M. y Rees, T. (1972). Gluconeogenesis during the germination of *Curcubita pepo*. *Phytochemistry*, **11**: 2177-2185.
- Towin, E.M. y Siverthorne, J. (1985). Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 569-593.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.
- Tsugita, A., Yano, K., Gardet-Salvi, L. y Schürmann, P. (1991). Characterization of spinach ferredoxin-thioredoxin reductase. *Protein Seq. Dat Anal.* **4**: 9-13.
- Vicente, M. y Renart, J. (coordinadores). (1987). Ingeniería Genética. Ed. C.S.I.C. (Col. Nuevas Tendencias). 250 pp.
- Vidal, J. y Gadal, P. (1981). Evidence for the *de novo* synthesis of nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate malate dehydrogenase during greening of corn leaves. *Physiol. Vég.* **19**: 483-489.
- Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y. y Lipscomb, W.N. (1995a). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, **34**: 4229-4306.
- Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Lipscomb, W.N. (1995b). Structural aspects of the allosteric inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by AMP: the binding of both the substrate analogue 2,5-anhydro-D-glucitol-1,6-bisphosphate and catalic metal ions monitored by X-ray crystallography. *Biochemistry*, **34**(13): 4307-4315.

BIBLIOGRAFÍA

- Viswanathan, P.N. y Krishnan, P.S. (1962). Role of alkaline fructose-1,6-bisphosphatase in plants. *Nature*, **193**: 166-167.
- Walker, D.A. (1973). Photosynthetic induction phenomena and the light activation of ribulose diphosphate carboxylase. *New Phytol.* **72**: 209-235.
- Walker, D.A. (1976). Regulatory mechanisms in photosynthetic carbon assimilation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **11**: 204-241.
- Walsby, A.E. (1986). Origins of chloroplasts. *Nature*, **320**: 212
- Wedel, N., Clausmeyer, S., Herrmann, R.G., Gardet-Salvi, L. y Schürmann, P. Nucleotide sequence of cDNAs encoding the entire precursor polypeptide for thioredoxin *m* from spinach chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **18**: 527-533.
- Werdan, K.; Heldt, H.W. y Milovancev, M. (1975). The role of pH in regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. *Biochim. Biophys. Acta*, **396**: 276-292.
- Wetterauer, B., Jacquot, J.P. y Veron, M. (1992). Thioredoxins from *Dictyostelium discoideum* are a developmentally regulated multigene family. *J. Biol. Chem.* **14**: 9895-9904.
- Wilkinson, D.L. y Harrison, R.G. (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, **9**: 443-448.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271
- Wollman, E.E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A. Jacquot, J.P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Rober, P., Galibert, F., Bertoglio, J. y Fradelici, D. (1988). Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol.Chem.* **263**: 15506-15512.
- Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1976). Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature (London)*, **266**: 565-567
- Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C. y Buchanan, B.B. (1979). Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* **254** (5): 1627-1632.
- Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A. y Hagelin, K. (1993). The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.*, **7**: 622-637.

BIBLIOGRAFÍA

- Xu, G.-H., Datta, A.G., Singh, V.N., Suda, H., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1981). Rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase; labelling of the active and allosteric sites with piridoxal-5-phosphate and sequence of a nonapeptide from the active site. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**: 98-103.
- Xu, G.J., Natalini, P., Suda, H., Tsolas, O., Dzugaj, A., Sun, S.C., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1982). Rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase; location of an active site Lysyl residue in the COOH-terminal fragment generated by a lysosomal proteinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**: 688-694.
- Xue, Y., Huang, S., Liang, J.Y., Zhang, Y. (1994). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose-2,6-bisphosphate, AMP and Zn^{2+} at 2.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(26): 12482-12486.
- Yamamoto K.R., Alberts, B.M., Benzinger R., Lawhorne L. y Treiber G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of PEG and its application to large-scale virus purification. *Virology*, **40**: 734-744.
- Youle, R.J. y Haung, A.H.C. (1976). Development and properties of fructose-1,6-bisphosphatase in the endosperm of castor-bean seedlings. *Biochem. J.* **154**: 647-652.
- Young, A. y Davis, R.W. (1983a). Efficient isolation of genes using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 1194-1198.
- Young, A. y Davis, R.W. (1983b). Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science*, **222**: 778-782.
- Zhang, Y., Liang J.-Y., Huang, S., Ke, H. y Lipscomb, W.N. (1993). Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry*, **32**: 1844-1857.
- Zhang, R., Chen, L., Villeret, V y Fromm. (1995). Glycine 122 is essential for cooperativity and binding of Mg^{2+} to porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **270**: 54-58.
- Zimmermann, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. (1976). Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* **70**: 361-367.
- Zimmermann, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. (1978). Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **253**: 5952-5956.

BIBLIOGRAFÍA

Zoller, M.J. y Smith, M. (1983). Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Meth. Enzymol.* **100**: 468-500.