

T. Prout. 22/89

T 10/41

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIA

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 3/9/99
ENTRADA NUM. 2940

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613376512
N.º Copia 216348114

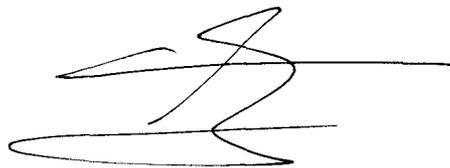
UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 JUL. 1999
COMISION DE DOCTORADO

**Análisis funcional de las isoformas cloroplastídica y
citosólica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa a través
de construcciones quiméricas de la enzima**

**ROLAND CAZALIS
GRANADA 1999**

**Análisis funcional de las isoformas cloroplastídica
y citosólica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa a través
de construcciones quiméricas de la enzima**

**Memoria que presenta el Licenciado en Bioquímica Roland Cazalis
para optar al grado de Doctor**



Fdo: Roland Cazalis

**Vº Bº
LOS DIRECTORES DEL TRABAJO**



**Fdo: Dr. Julio López Gorgé
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.**



**Fdo: Dra. Ana Chueca Sancho
Doctora en Farmacia
Profesora de Investigación del C.S.I.C.**

Granada, Julio 1999

La Memoria que se presenta ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en el X Congreso de la FESPP (Florencia, 1996), en el XX Congreso Nacional de la SEBBM (Madrid, 1997) y en la XXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (Mar de Plata, 1998).

Quiero expresar mi agradecimiento a los Dres. Julio López Gorgé y Ana Chueca Sancho, directores de esta Tesis. Al Dr. Eduardo Gracia Peregrin, ponente de la Tesis. A mis compañeros de la Estación Experimental del Zaidín.

A Jules Carles S. I.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre FBPasas	1
2. Comparación	5
3. Estructura y función	8
4. FBPasas y fotosíntesis	16
5. Tiorredoxinas	21
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	
I. Manipulación de material vegetal	27
1. Condición de cultivo de la planta	27
II. Manipulación de cepas bacterianas y vectores plasmídicos	29
1. Cepas bacterianas	29
2. Plásmidos	30
3. Medios de cultivo	32
4. Preparación de células competentes	33
5. Transformación de células competentes	33
6. Transformación en gel	34
III. Manipulación de ácidos nucleicos	34
1. Preparación de ADN genómico de tejido foliar	34
2. Preparación de ARN de tejido foliar	36
3. Preparación de ADNc por amplificación de molde (PCR)	37
4. Preparación de ADNc por RT-PCR	39
5. Aislamiento de ADN plasmídico: miniprep	42
6. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	42
7. Extracción de ADN de geles de agarosa	43
8. Medida de la concentración de ADN	44
9. Restricción de ADN	44
10. Ligación de ADN	44
11. Secuenciación de ADN	45
12. Construcción de FBPasa quimérica	45
13. Análisis de ácidos nucleicos por hibridaciones	49
14. Análisis de ADN por Southern blotting	49
IV. Manipulación de proteínas	50
1. Síntesis in vivo. Determinación de la vida media	50
2. Preparación de proteínas solubles foliares	51
3. Separación de la FBPasa citosólica de la plastídica	52
4. Expresión de plásmidos recombinantes en <i>E. coli</i>	52
5. Purificación de las proteínas recombinantes	52

6. Análisis de proteínas	55
V. Bioinformática	
1. Herramientas generales	59
2. Modelización por homología molecular	60
3. Evaluación de los modelos	60
4. Interacción molecular	60
 Capítulo I. PREDICCIÓN	
I. I. RESULTADOS	63
1. Estructura primaria	63
2. Estructura secundaria	70
3. Estructura terciaria	75
4. Estructura cuaternaria	81
5. Verificación de los modelos	85
6. Interacción	91
I. II. DISCUSIÓN	100
1. Estructura primaria	100
2. Estructura tridimensional	101
3. Evaluación de los modelos	103
4. Interacción	106
5. Conclusión	108
 Capítulo II. FBPasas QUIMÉRICAS	
II. I. RESULTADOS	109
1. Construcción	109
2. Expresión y purificación	114
3. Caracterización	117
4. Activación	127
II. II. DISCUSIÓN	136
1. Obtención de FBPasas quiméricas	136
2. Caracterización	137
3. Activación	139
4. Conclusión	140

Capítulo III. FBPasa CITOSÓLICA de *Pisum sativum*

III. I. RESULTADOS	142
1. Aislamiento del gen de la FBPasa citosólica de <i>Pisum sativum</i>	142
2. Comparación con otras FBPasas citosólicas	149
3. Efecto de la luz sobre la expresión de la FBPasa	153
4. Efecto del DTT y de la tiorredoxina	153
5. Síntesis <i>in vivo</i> . Determinación de la vida media	157
III. II. DISCUSIÓN	159
1. Aislamiento del gen de la FBPasa citosólica de <i>Pisum sativum</i>	159
2. Efecto de los reductores	160
3. Efecto de la luz en la expresión de la FBPasa citosólica	161
4. Vida media de la FBPasa citosólica de <i>Pisum sativum</i>	162
5. Conclusión	163
CONCLUSIONES GENERALES	164
BIBLIOGRAFÍA	165



Drawn for TiBS by Francis Haroux

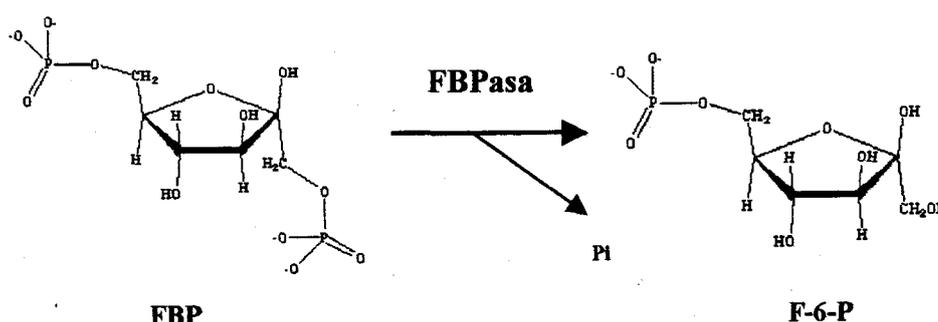
God said, "let there be a molecular machinery to remove the 3'-end of the mRNA and to replace it by the sequence AAAAAA.....A"; and God saw that it was good.



INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES SOBRE LA FBPasa.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (D-fructosa-1,6-bisfosfato-1-fosfohidrolasa, E.C. 3.1.3.11, FBPasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) a fructosa-6-fosfato (F-6-P) y ortofosfato:



La reacción enzimática es dependiente de iones divalentes metálicos (Mg^{++} , Mn^{++} , Hg^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Zn^{++}), aunque todas las FBPasas estudiadas operen fisiológicamente con Mg^{++} como cofactor.

La enzima se encuentra tanto en procariotas como en todos los tejidos de eucariotas, donde aparece asociada a la glicolisis/gluconeogénesis (Pontremoli 1972; Horeker *et al.*, 1975; Pilkis *et al.*, 1978; Hue 1981; Benkovic *et al.*, 1982; Tejwani, 1983; Hers *et al.*, 1983; Fischer *et al.*, 1983; El-Maghrabi *et al.*, 1988). Es regulada por adenosina monofosfato (AMP) y fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-P). El AMP actúa como inhibidor de la enzima gluconeogénica porque impide la unión de metales bivalentes, esenciales para la actividad enzimática (Scheffer *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1990; Fromm *et al.*, 1990). Además, el AMP, que tiene un sitio propio de unión alejado del centro activo, induce cambios conformacionales en el monómero, así como una rotación R-T con respecto a los dímeros.

En este contexto hay que indicar que la FBPasa, sea cual fuere su origen y función fisiológica, tiene una estructura homotetramérica, con cuatro subunidades de unos 40 kDa, unidas dos a dos en una configuración uni planar (configuración R) en la enzima gluconeogénica soportando al sustrato FBP. Cuando el modulador AMP se une a la enzima, el plano de dos subunidades rote 15° respecto al de los otros dos (configuración T). (Ke *et al.*, 1991a, 1991b; Liang *et al.*, 1992; Xue *et al.*, 1994; Gigh-Jain *et al.*, 1994; Iversen *et al.*, 1997; Kurbanov *et al.*, 1998). El giro es de 20° para la FBPasa reducida fotosintética (configuración S), que no modula el AMP (Villeret *et al.*, 1995).

La actividad FBPasa en vegetales en relación con la gluconeogénesis se ha puesto de manifiesto en una gran variedad de semillas (Surendranathan et al., 1972; Rao et al., 1976; Kruger et al., 1985; Li et al., 1988), observándose un incremento de la actividad durante la germinación (Thomas et al., 1972; Youle et al., 1976; Bortman et al., 1981), lo cual se ha relacionado con una movilización de las reservas lipídicas. Por otro lado, en la célula fotosintética hay una enzima localizada en el citosol, implicada en la síntesis de sacarosa a partir de las triosas fosfato exportadas desde el cloroplasto (Zimmermann et al., 1978; Stitt et al., 1983; Krugel et al., 1984; Stitt et al., 1985; Brauer et al., 1990; Khayat et al., 1991; Prado et al., 1991). Al igual que la enzima de mamífero, está regulada por AMP y F-2,6-P.

Una segunda FBPasa se encuentra implicada en la fotosíntesis, habiendo sido descrita en bacterias fotosintéticas (Springgate et al., 1972a; Joint et al., 1972), y en cloroplastos de algas (Cséke et al., 1981; Schmidt, 1981), líquenes (Brown et al., 1986) y plantas superiores (Scala et al., 1968b; Nishizawa et al., 1981).

La FBPasa cloroplastídica es una enzima clave del ciclo de Benson-Calvin, donde está implicada en la fase de regeneración de la ribulosa fosfato. Tiene la particularidad, como varias otras enzimas del ciclo, de estar regulada por la luz. La activación de esa enzima se debe a una transferencia electrónica del ditiol de la tiorredoxina *f* (Trx *f*) al disulfuro del sitio regulador. El sitio activo de la Trx *f* contiene dos cisteínas reguladoras (cisteínas 46 y 49 en espinaca) que reducidas por el sistema ferredoxina-tiorredoxina, activan enzimas dianas reduciéndolas (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Buchanan et al., 1994). Otros acontecimientos contribuyen a la activación de la enzima, como el aumento de pH (aproximadamente de 7 a 8) y de iones Mg^{2+} (alrededor de 2 a 5 mM) que proporciona la transición oscuridad/luz (Pradel et al., 1981; Hertig et al., 1983; Soulié et al., 1988, 1991; Ballicora et al., 1990; Lador et al., 1990).

La FBPasa es de codificación nuclear, poseyendo la enzima cloroplastídica un péptido de tránsito de 50 a 60 aminoácidos para su importación en el cloroplasto. Como hemos apuntado, la forma nativa de la FBPasa es homotetramérica (Zimmermann et al., 1976; Trianello et al., 1971, 1972; Villeret et al., 1995), con un peso molecular oscilando entre 120 y 160 kDa. La comparación de las estructuras primarias enseña que las FBPasas están muy conservadas, con un 80 % de homología entre las gluconeogénicas, y del mismo orden entre las cloroplastídicas. Sin embargo, la homología no supera el 50 % cuando se compara la enzima cloroplastídica con la gluconeogénica (Lámina 1). Además, la enzima cloroplastídica se destaca de la citosólica por poseer en la mitad de la molécula, una secuencia propia de 17-20 aminoácidos que forma, en la estructura terciaria, un bucle llamado "lazo 170", expuesto al solvente. Esta secuencia posee tres cisteínas muy conservadas (cisteínas 153, 173 y 178 para la FBPasa de guisante) (Marcus et al., 1988), siendo también rica en aminoácidos cargados negativamente (Hermoso et al., 1995), probablemente implicados en la interacción con la tiorredoxina. Mutaciones dirigidas a nivel del lazo de la enzima de *Pisum sativum*, sugieren que se forman enlaces disulfuros, bien entre las cisteínas 153 y 173, bien entre las 153 y 178 (Jacquot et al., 1995, 1997). La rotura de este puente disulfuro por la tiorredoxina provocaría un cambio conformacional de la enzima, activándola.

La FBPasa cloroplastídica, como otras enzimas del ciclo de Benson-Calvin, presenta el fenómeno de histéresis (Hertig y Wolosiuk, 1983), motivado por la

	10	20	30	40	50	60	
1	GUISANTE	MAVK-EATSETK----	KRSGYEIITLTSWLLQOE	-QKGIIDAEITIVLSSISMACKQIAS			54
2	ESPINACA	MAAVGEAATETK--	ARTRSKYETETLITGWLKQE	-MAGVIDAEITIVLSSISIACKQIAS			57
3	TRIGO	MAVVDIASAPAPAAARKR	SSYDMIITLTTWLLKQE	-QEGVIDNEMTIVLSSISTACKQIAS			59
4	ARABIDOPSIS	MAVAADAS-ETKTAARKKSGYELQ	TLTGWLLRQE	-MKGEIDAEITIVMSSISIACKQIAS			58
5	COLZA	MAVAADATAETKPAAKKSGYELQ	TLTGWLLRQE	-MKGEIDTEITIVMSSIAMACKQIAS			59
6	RIÑÓN CERDO	-TDQA-AFDDT-----	NIVTLTRFVM	-EEGRKARGTGEMTQLLNSLCTAVKAI	ST		46
7	HÍGADO HUMA	MADQA-PFDDT-----	DVNTLTRFVM	-EEGRKARGTGELTQLLNSLCTAVKAI	SS		47
8	RATÓN	MTDRS-PFET-----	DMLTLTRFVM	-EKGRQARGTGELTQLLNSMUTAIAKAI	SS		47
9	RATA	MVDHA-PFET-----	DISTLTRFVL	-EEGRKAGGTGEMTQLLNSLCTAIAKAI	SS		47
10	OVEJA	-TDEA-PFDDT-----	NIVTVTRFVM	-EEGRKARGTGEMTQLLNSLCTAVKAI	ST		46
11	ESPINACA	MDHAGDAMRT-----	DIMTITRIVLNEQ	SKRPESRGDFTILLSHIVLGCKFVCS			49
12	REMOLACHA	M-----	TITRIVLNEQ	SKRPESRGDFTIIMSHIVLGCKFVCS			37
13	PATATA	MDHAADRRRT-----	DIMTITRIVLNEQ	TKHPESRGDFSILLSHIVLGCKFVCT			49
14	COLZA	MDHEADAFR-----	DIMTITRIVLNEQ	SKYPESRGDFTILLSNIVLGCKFVCS			48
15	CAÑA AZUCAR	M-----	TITRIVLNEQ	SRNPESRGDFTILLSHIVLGCKFVAS			37
	70	80	90	100	110	120	
1	GUISANTE	LVQRANISNLTG	TQGAVNIQGEDQKKLDVI	SNEVFSNCLRSSGRTGI	IASEEEEDVAVAVE		114
2	ESPINACA	LVQRAGISNLTG	IQGAVNIQGEDQKKLDVV	SNEVFSNCLRSSGRTGI	IASEEEEDVAVAVE		117
3	TRIGO	LVQRAPISNLTG	VQGAIVQGEDQKKLDVI	SNEVFSNCLRWSGRTGV	IASEEEEDVAVAVE		119
4	ARABIDOPSIS	LVQRAGISNLTG	VQGAIVQGEDQKKLDVI	SNEVFSNCLRSSGRTGI	IASEEEEDVAVAVE		118
5	COLZA	LVQRAGISNLTG	VQGAIVQGEDQKKLDVV	SNEVFSNCLRSSGRTGI	IASEEEEDVAVAVE		119
6	RIÑÓN CERDO	AVRKAGIAHLYG	IAGSTNVITGDQVKKLDV	LSNDLVINVLKSSFATC	VLVSEEDKNAIIVE		106
7	HÍGADO HUMA	AVRKAGIAHLYG	IAGSTNVITGDQVKKLDV	LSNDLVINMLKSSFATC	VLVSEEDKNAIIVE		107
8	RATÓN	AVRKAGLANLYG	ISGSNVITGDEVKLLDVL	NSLVINMLQSSYSTCVL	VSEENKEAVITA		107
9	RATA	AVRQAGIAHLYG	IAGSTNVITGDQVKKLDV	LSNDLVINMLKSSYATC	VLVSEEDTHALIE		107
10	OVEJA	AVRKAGIAHLYG	IAGTINVITGDQVKKLDV	LSNDLVINVLKSSFATC	VLVSEEDKNAIIVE		106
11	ESPINACA	AVNKAGLAKLIG	IAGETNIQGEFQKKLDV	LSNEVFKALTSRGRTC	ILVSEEDDEAATFIE		109
12	REMOLACHA	AVNKAGLAKLIG	IAGETNIQGEFQKKLDV	LSNEVFKALISSGRTC	ILVSEEDDEAATFIE		97
13	PATATA	AVNKAGLAKLIG	IAGETNVQGEDQKKLDV	LSNEVFKALVSSNRTC	ILVSEEDDEAATFVR		109
14	COLZA	AVNKAGLAKLIG	IAGETNIQGEFQKKLDV	LSNDVFKALVSSGRTS	VLVSEEDDEAATFVE		108
15	CAÑA AZUCAR	AVNKAGLAQLIG	IAGETNVQGEFQKKLDV	LSNEVFKALVSSGRTC	VLVSEEDDEETTFVD		97
	130	140	150	160	170	180	
1	GUISANTE	ESYSGNYIVV	FDPLDGSNNLDA	AVSTGSIFGIYSPN	DECLPDFGDDSD	-NILGTEEQRC	173
2	ESPINA	ESYSGNYIVV	FDPLDGSNNIDA	AVSTGSIFGIYSPN	DECLIVD--SD	HDESQLSAEEQRC	175
3	TRIGO	ESYSGNYIVV	FDPLDGSNNIDA	AVSTGSIFGIYSP	SDDEC--HIGD	----AILDEVQMC	173
4	ARABIDOPSIS	ESYSGNYIVV	FDPLDGSNNIDA	AVSTGSIFGIYSP	DECLIVD---D	SDDISALGSEEQRC	175
5	COLZA	ESYSGNYIVV	FDPLDGSNNIDA	AVSTGSIFGIYSP	DECLPD---S	DDTSALGSEEERC	175
6	RIÑÓN CERDO	PEKRGKYVVC	FDPLDGSNNIDC	IVSIGTIFGIYR	KNST-----	DEPSEKDAL	153
7	HÍGADO HUMA	PEKRGKYVVC	FDPLDGSNNIDC	IVSVGTIFGIYR	KKST-----	DEPSEKDAL	154
8	RATÓN	QEKRGKYVVC	FDPLDGSNNIDC	IASIGTIFAIYR	KKTE-----	DEPSEKDAL	154
9	RATA	PEKRGKYVVC	FDPLDGSNNIDC	IASIGTIFGIYR	KKSA-----	NEPSEKDAL	154
10	OVEJA	PEKRGKYVVC	FDPLDGSNNIDC	IVSIGTIFGIYK	KISK-----	DDPSEKDAL	153
11	ESPINACA	PSIRGKYCVV	FDPLDGSNNIDC	GVSIGTIFGIYM	VKDF-----	ETATLEDVL	156
12	REMOLACHA	PSIRGKYCVV	FDPLDGSNNIDC	GVSIGTIFGIYM	VKDL-----	NNATLDDVL	144
13	PATATA	PANRGKYCVV	FDPLDGSNNIDC	GVSIGTIFGIYM	IKDG-----	HEPFLDDVL	156
14	COLZA	SSKCGKYCVV	FDPLDGSNNIDC	GVSIGTIFGIY	TMEHS-----	DEPTTKDVL	155
15	CAÑA AZUCAR	PKIRGKYCVV	FDPLDGSNNIDC	GVSIGTIFGIY	MIKDK-----	DNVTLSDVL	144
	190	200	210	220	230	240	
1	GUISANTE	IVNVCPG	SNLLAAGYCMYSS	VAFVLTIGKGVF	FTLDP	LYGEFVLTQENLQIPKSGEI	233
2	ESPINA	VNVCPG	SNLLAAGYCMYSS	VIFVLTIGKGVY	FTLDP	MYGEFVLTSEKIQIPKAGKI	235
3	TRIGO	IVNVCPG	SNLLAAGYCMYSS	VIFVLTIGKGVY	FTLDP	MYGEFVLTQEKVQIPKSGKI	233
4	ARABIDOPSIS	IVNVCPG	SNLLAAGYCMYSS	VIFVLTIGKGVF	FTLDP	MYGEFVLTQENIEIPKAGRI	235
5	COLZA	IVNVCPG	SNLLAAGYCMYSS	VIFVLTIGKGVF	FTLDP	MYGEFVLTQENIEIPKAGKI	235
6	RIÑÓN CERDO	-----	QPGNIVAAGYALY	GSATMLVLANV	GVNCFMLDPA	IGEFILVDRDVKIKKKGSI	208
7	HÍGADO HUMA	-----	QPGNIVAAGYALY	GSATMLVLANV	GVNCFMLDPA	IGEFILVDRDVKIKKKGKI	209
8	RATÓN	-----	QPGNIVAAGYALY	GSATMLVLANV	GVNCFMLDPA	IGEFILVDRDVKIKKKGKI	209
9	RATA	-----	QPGNIVAAGYALY	GSATMLVLANV	GVNCFMLDPA	IGEFILVDRDVKIKKKGNI	209
10	OVEJA	-----	QPGNIVAAGYALY	GSATMLVLANV	GVNCFMLDPA	IGEFILVDRDVKIKKKGSI	208
11	ESPINACA	-----	QPGNIVAAGYALY	GSATMLVLANV	GVNCFMLDPA	IGEFILVDRDVKIKKKGKI	211

Introducción

12 REMOLACHA	-----QPGK N MVAAGYCMYGS S CTLVMSIG S GVN G FT H DP S IGEFIL T HPDIKI P KKGKI	199
13 PATATA	-----QPGM N MLAAGYCMYGS S CTLVLSIG S GVN G FT L DP S IGEFIL T HPDIKI P KKGKI	211
14 COLZA	-----KPG N EMVAAGYCMYGS S CMLVLSIG T GVH G FT L DP S IGEFIL T HPDIKI P KKGNI	210
15 CAÑA AZUCAR	-----QPGK D MLAAGYCMYGS S CTLVLSIG T GVN G FT L DP S IGEFIL T HPDIKI P KKGKI	199
	250 260 270 280 290 300	
1 GUISANTE	YS E NEGNYK L W D ENLRKY I DDI K EPG S GP S ARY I GS L VG D FH R TLLYGGIY G YP R DK	293
2 ESPINACA	YS E NEGNYK M W D DKLRKY M DDL K EPG S Q P YSSRY I GS L VG D FH R TLLYGGIY G YPR D A	295
3 TRIGO	YS E NEGNYA L W D DKLRKY M DSI K EPG T SG K PY S ARY I GS L VG D FH R TLLYGGIY G YPS D Q	293
4 ARABIDOPSIS	YS E NEGNYQ M W D DKLRKY I DDL K DPG P TG K PY S ARY I GS L VG D FH R TLLYGGIY G YPR D A	295
5 COLZA	YS E NEGNYQ M W D ENLRKY I DDL K DPG P SG K PY S ARY I GS L VG D FH R TLLYGGIY G YPR D A	295
6 RIÑÓN CERDO	YS I NEGYAKE F DPALTEY I QRR K F P PDNSAPY G ARY V GSMVADVH R TLLYGGIFL Y PANK	268
7 HÍGADO HUMA	YS I NEGYAK E DFPAVIEY I QRR K F P PDNSAPY G ARY V GSMVADVH R TLLYGGIFL Y PANK	269
8 RATÓN	FS I NEGYAK Y EDAATAEY V QRR K F P EDGSE P Y G ARY V GSMVADVH R TLLYGGIFL Y PANK	269
9 RATA	YS I NEGYAK E DFPALTEY I QRR K F P PDNSAPY G ARY V GSMVADVH R TLLYGGIFL Y PANK	269
10 OVEJA	YS I NEGYAK E DFPALTEY V QRR K F P PDNSAPY G SRY V GSMVADVH R TLLYGGIFL Y PADK	268
11 ESPINACA	YS V NEGNAK N W D GP T TKY V EK K F P TDG S PK S LR I IGSMVADVH R TLLYGGIFL Y P G DK	271
12 REMOLACHA	YS V NEGNAK N W D GP T TKY V EK K F P KD G SSPK S LR I IGSMVADVH R TLLYGGIFL Y P G DK	259
13 PATATA	YS V NEGNAK N W D SPT S KY V Q S CK P ADG S SPK S LR I IGSMVADVH R TLLYGGIFL Y P G DK	271
14 COLZA	YS V NEGNAQ N W D GP T TKY V ER K CK P KD G SPAK S LR I VGSMVADVH R TLLYGGIFL Y PADK	270
15 CAÑA AZUCAR	YS V NEGNAK N W D V P VAK F VER K CK P KD G SPPK S LR I IGSMVADVH R TLLYGGVFL Y PADQ	259
	310 320 330 340 350 360	
1 GUISANTE	K S KNGK L RLLYE C APMS F IV E QAGGK G SDG H Q R VLDI Q PT E IHQ R VPL Y IG S TEE V EKV-	352
2 ESPINACA	K S KNGK L RLLYE C APMS F IV E QAGGK G SDG H Q R ILD I Q P T E IHQ R VPL Y IG S VEE V EKL-	354
3 TRIGO	K S KNGK L RLLYE C APMS F IAE Q AGGK G SDG H Q R VLDI M PTAV H Q R VPL Y VG S VEE V EKV-	352
4 ARABIDOPSIS	K S KNGK L RLLYE C APMS F IV E QAGGK G SDG H SRVLDI Q PT E IHQ R VPL Y IG S TEE V EKL-	354
5 COLZA	K S KNGK L RLLYE C APMS F IV E QAGGK G SDG H HRVLDI Q PT E IHQ R VPL Y IG S KEE V EKL-	354
6 RIÑÓN CERDO	K S PKGK L RLLYE C NP M AYVME K AGGLA T TG K EAVLDI V PT D IHQ R AP I ILG S PEDVTE L L	328
7 HÍGADO HUMA	K S ENGK L RLLYE C NP M AYVME K AGGLA T TG K EAVLDI V PT D IHQ R AP I ILG S PDDVLE F L	329
8 RATÓN	K S ENGK L RLLYE C NP V AYIIE Q AGGMA T TG T QPVLDV K PSIH Q RVPL I LG P -----L	322
9 RATA	KN P SGK L RLLYE C NP I AYVME K AGGLA T TG N EDILD I VPT E IHQ K APVIM G S T EDVQ E F L	329
10 OVEJA	K S PSGK L RLLYE C DP M AYVIE K AGGMA T TG K EAVLDI V PT D IHQ K VPL I LG S PEDVTE F L	328
11 ESPINACA	K S ENGK L RVL Y EVF P MSFIME Q AGGQA F TG K ORALDL I P T KIHER S PV F LGSYDDVE I EIK	331
12 REMOLACHA	K S ENGK L RVL Y EVF P MSFIME Q AGGQA F TG E ORALDL V PKNIHDR S PV F LGSYDDVE I EIK	319
13 PATATA	K S ENGK L RVL Y EVF P MSFIME Q AGGQA F TG K ORALDL V PKIHER S PI L GSYDDVE I EIK	331
14 COLZA	K S ENGK L RVL Y EVF P MAFIME Q AGGQA F TG K RALDL V PKIHER S PV F LGSYDDVE I EIK	330
15 CAÑA AZUCAR	K S ENGK L RVL Y EVF P MSFIME Q AGGQ S FTG K RALDL V PKIHER S PV F LGSYDDVE I EIK	319
	370 380 390	
1 GUISANTE	EKY-----LA-----	357
2 ESPINACA	EKY-----LA-----	359
3 TRIGO	EKF-----LSSE-----	359
4 ARABIDOPSIS	EKY-----LA-----	359
5 COLZA	EKY-----LA-----	359
6 RIÑÓN CERDO	EIYQKHAAK-----	337
7 HÍGADO HUMA	KVYEKHS-----	337
8 RATÓN	RMCKSISAVCRETROAGSEPEPMSPLPFVFN--	354
9 RATA	EIYNKDKAKSRPSLPLPQSRARES P VHSICDEL F	363
10 OVEJA	EI-KKYTAK-----	336
11 ESPINACA	ALY-----AAQEK-----	340
12 REMOLACHA	ALY-----AAEQN-----	328
13 PATATA	KLY-----AAEQ-----	339
14 COLZA	ALY-----AEEK-----	338
15 CAÑA AZUCAR	ALY-----AEQAKSSS-----	330

Lámina 1. Alineamiento de FBPasas cloroplastídicas (1-5), de mamíferos (6-10), y citosólicas (11-15). La numeración horizontal es virtual mientras que la lateral es la real para cada proteína. Porcentaje de identidad entre los residuos: rojo = 100; azul > = 75; verde > = 50; gris < 50.

existencia de dos estadios con propiedades cinéticas diferentes, el estadio de modulación y el catalítico. Es posible separar ambos procesos *in vitro* mediante el ensayo en dos pasos, de manera que la determinación de la catálisis vaya precedida por la incubación de la enzima con los moduladores. Esto permite determinar si una sustancia activa o desactiva la transición de la enzima entre sus formas, oxidada (inactiva) y reducida (activa), y si de mismo activa o inhibe la catálisis.

2. COMPARACIÓN

El gen de la FBPasa ha sido aislado y secuenciado en diferentes ramas eubacteriales, tales *Nitrobacter vulgaris* (Strecher *et al.*, 1994), *Rhodobacter sphaeroides* (Gibson *et al.*, 1990), *Xanthobacter flavus* (Meijer *et al.*, 1990), *Alcalygenes eutrophus* (Yoo *et al.*, 1995), *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996), *Anabaena* (Newman *et al.*, 1995), *Nostoc punctiforme* (Summers *et al.*, 1994), *Escherichia coli* (Marcus *et al.*, 1986), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), etc.

De ellos, la enzima de *Rhodobacter*, *Alcalygenes* y la de la cianobacteria *Synechocystis* es bifuncional (Abdelal *et al.*, 1974; Amachi *et al.*, 1979; Gerbling *et al.*, 1986; Springgate *et al.*, 1972; Tamoi *et al.*, 1998). En efecto, estas FBPasas pueden utilizar como sustrato tanto la FBP como la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (SPB). En cambio, la enzima de *E. coli* carece de actividad SPBasa (Fraenkel *et al.*, 1966). Hay que indicar que el gen de la enzima bifuncional puede provenir de una transferencia genética lateral, pues la enzima de dos de las eubacterias anteriores es codificada por un plásmido.

En eucariotas, la cuestión ha sido muy controvertida. Mientras que en los años 70 y principios 80 se consideraba la enzima como bifuncional (Buchanan *et al.*, 1976; Gerbling *et al.*, 1986), más recientes investigaciones han puesto de manifiesto la existencia de enzimas diferenciadas para cada sustrato (Cadet, 1996; Dunford *et al.*, 1998; Ashton *et al.*, 1998), habiendo sido clonado y secuenciado la SBPasa de trigo (Raines *et al.*, 1992).

El alineamiento de la secuencia de las FBPasas eubacterianas, citosólicas y cloroplastídicas, así como las SBPasas cloroplastídicas, pone de evidencia que la mayoría de las regiones altamente conservadas de la FBPasa se encuentra también en la SBPasa. Esto confirma que FBPasa y SBPasa comparten un ancestro común (Martin *et al.*, 1996). Efectivamente, la SBPasa presenta 30 % de identidad con la FBPasa de diversas fuentes, lo que junto con las homologías antes señaladas entre las FBPasas citosólicas y cloroplastídicas, han hecho a Martin *et al.*, (1996) proponer una hipótesis para dar cuenta de la evolución de esta enzima. La FBPasa citosólica de plantas superiores, así como la eucariota de organismos no fotosintéticos son bastante similares a la enzima eubacteriana, lo que indica un origen eubacteriano de los genes nucleares eucariotas. Respecto a la enzima cloroplastídica, ésta se diferenció de la citosólica por una serie de duplicaciones genéticas ocurridas tempranamente en la evolución de los eucariotas. Las FBPasa y SBPasa cloroplastídicas se especializaron a partir de una enzima FBP/SBP eubacteriana (Figura 1). Un dendograma generado a partir de las

secuencias peptídicas de FBPasas de diferentes fuentes presenta el perfil que se expresa en la Lámina 2.

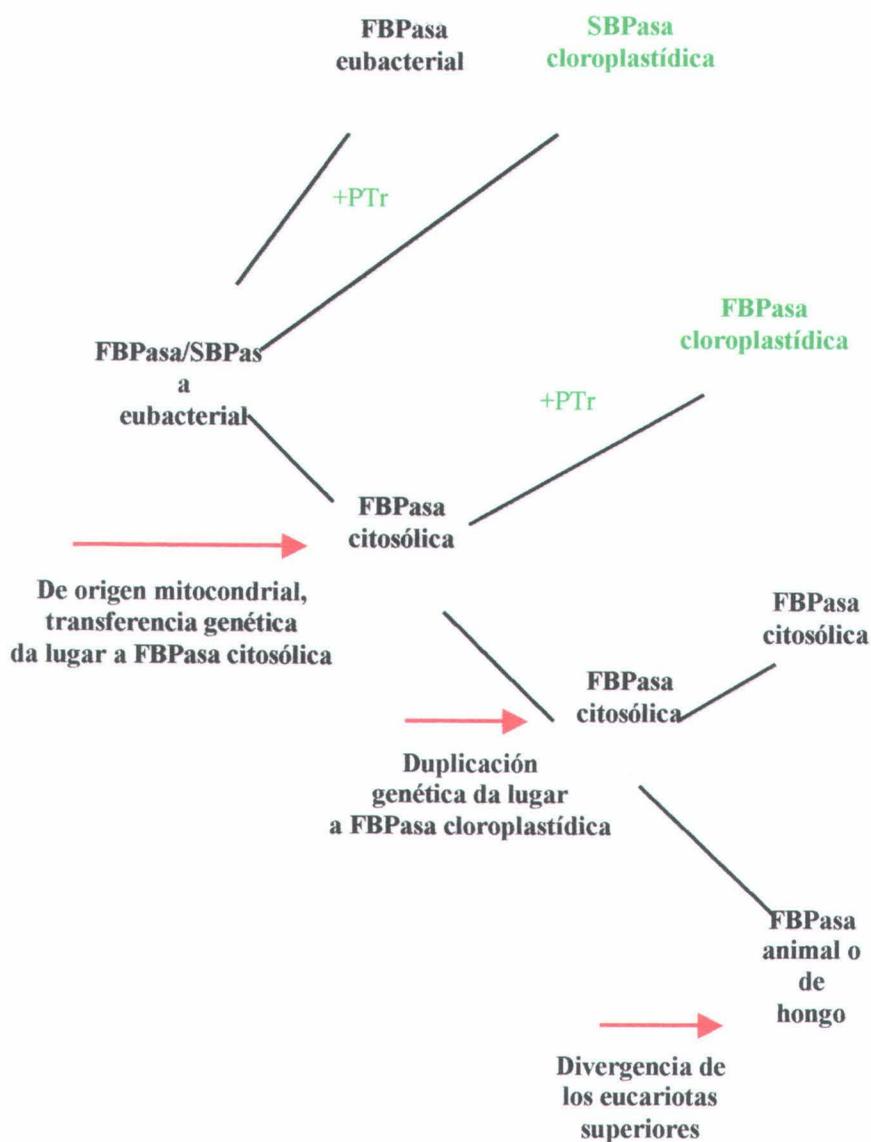


Figura 1. Diagrama de la evolución de los genes de la FBPasa de procariotas y eucariotas. +Trp indica la adquisición de un péptido de transición para la importación al cloroplasto. Las flechas indican acontecimientos ocurridos en la evolución de la FBPasa (Martin *et al.*, 1996).

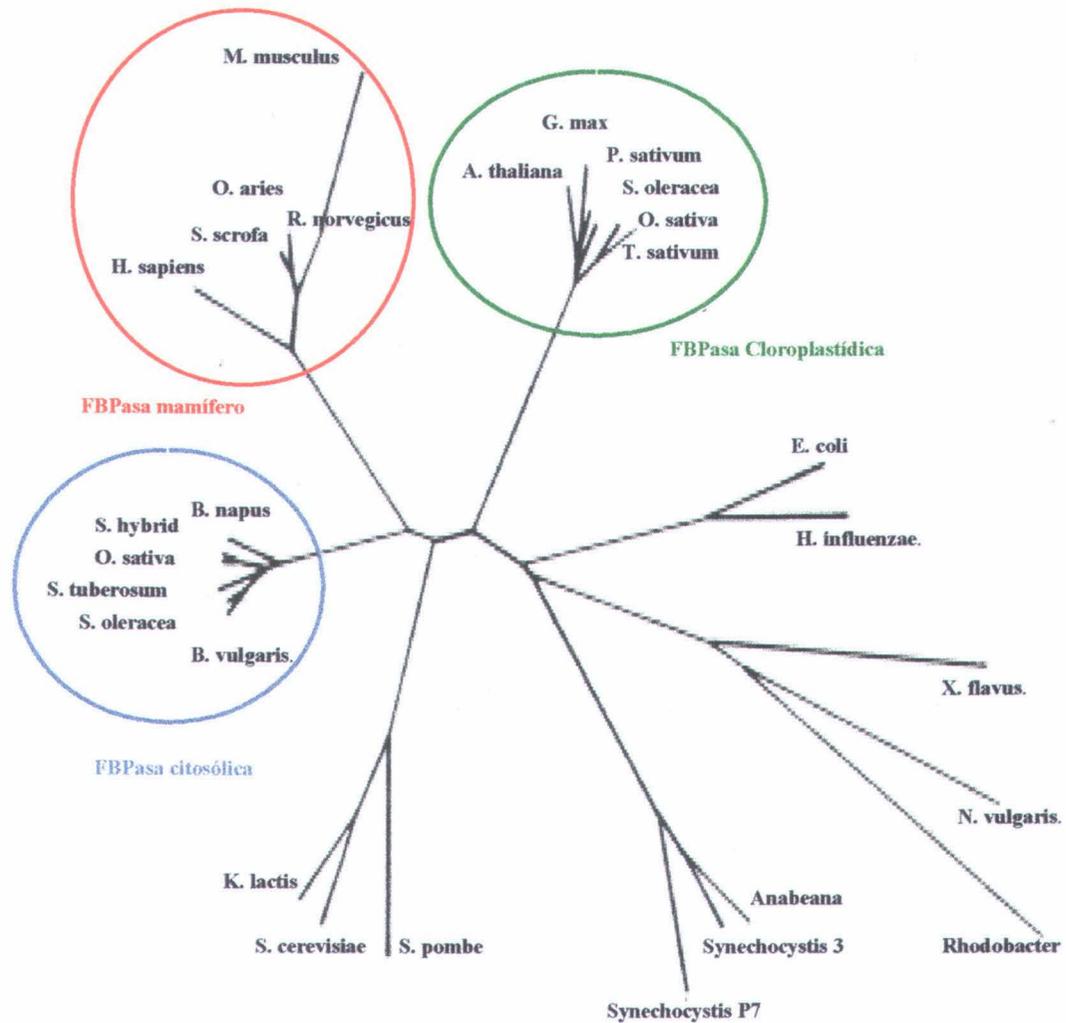


Lámina 2. Arbol filogénico de FBPasas de diferentes fuentes. (Sahrawy, comunicación personal).

3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

3.1. La FBPasa gluconeogénica de mamífero

Algunos genes de las FBPasas de mamíferos han sido identificados y clonados: *Ovis aries*, oveja (Fischer *et al.*, 1983), *Rattus norvegicus*, rata (El-Magrhabi *et al.*, 1988), *Sus scrofa*, cerdo (Williams *et al.*, 1992), *Homo sapiens* (El-Magrhabi *et al.*, 1993), *Mus musculus*, ratón (Cloix *et al.*, 1997), *Oryctolagus cuniculus*, conejo (Kaiser *et al.*, 1996). La proteína ha sido cristalizada y la estructura determinada para la enzima de cerdo (Ke *et al.*, 1989), humana (Zhang *et al.*, 1995) y conejo (Weeks *et al.*, 1999), siendo la de cerdo la más estudiada.

El estudio cristalográfico reveló que la FBPasa es una enzima alfa-beta homotetramérica (Lámina 3). La clasificación establecida por el servidor CATH (www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/), (Orengo *et al.*, 1997), presenta el primer monómero con 15 hélices alfa, 12 láminas beta y 7 vueltas beta (Figura 2) y hace aparecer variabilidades entre los monómeros. Cada uno está formado por 2 dominios unidos por un puente polipeptídico (Ke *et al.*, 1989). En la enzima de hígado humano los residuos 1 a 199 soportan el sitio alostérico, formando el dominio AMP. Los residuos 200 a 335, que soportan el sitio de acoplamiento del sustrato, constituyen el dominio FBP.

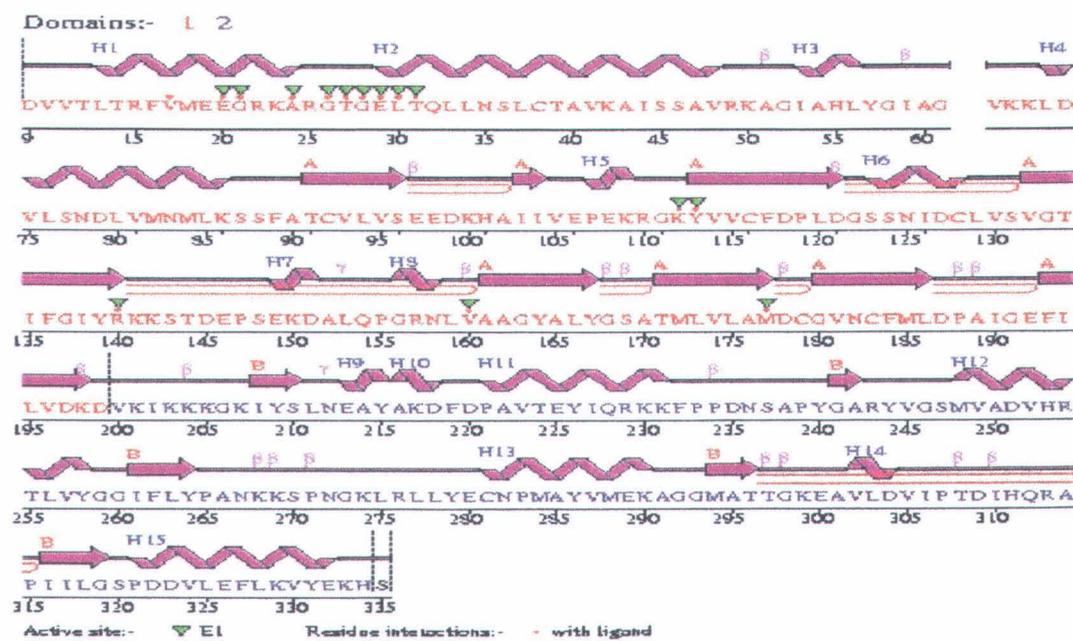


Figura 2. Estructura secundaria de la FBPasa humana (Zhang *et al.*, 1995).

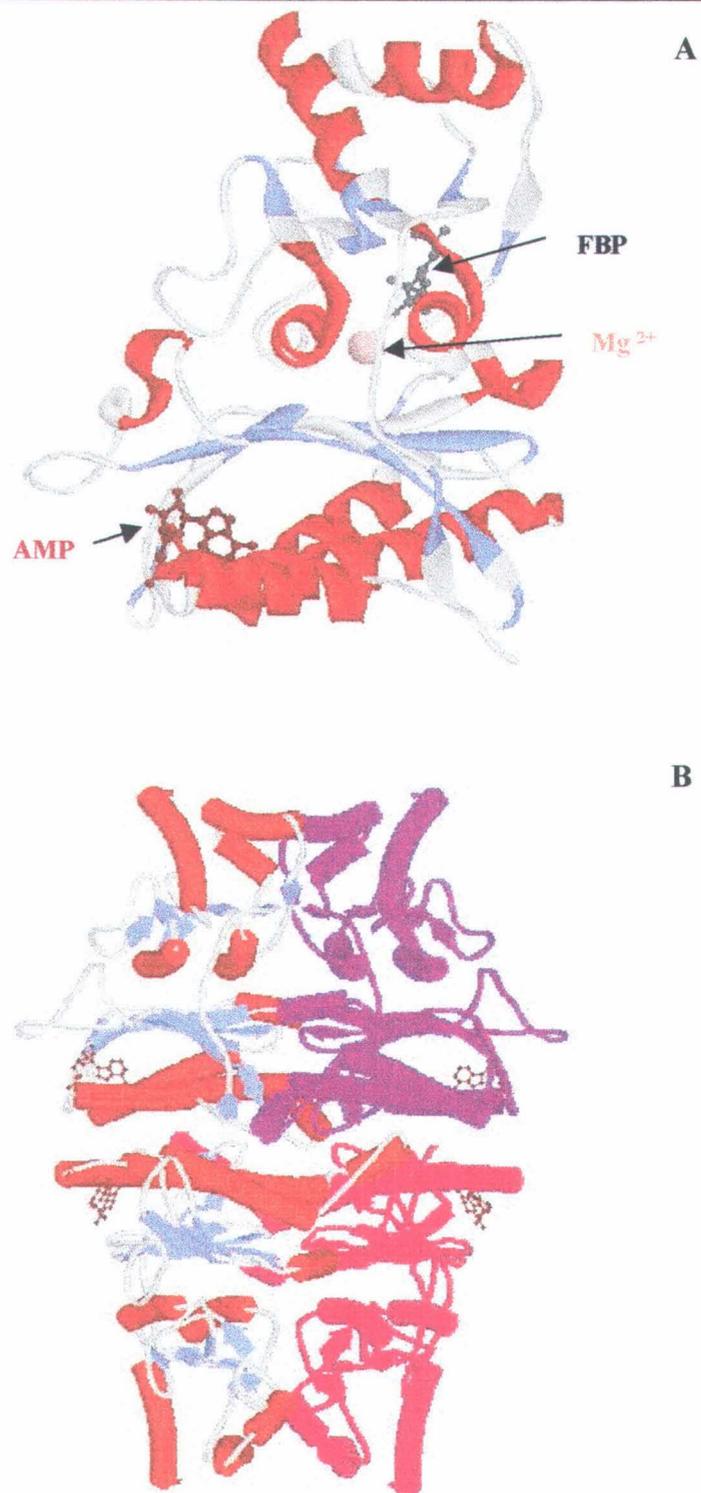


Lámina 3. A. Estructura terciaria del monómero acomplejado con FBP, Mg²⁺ y AMP. La estructura secundaria aparece indicada con las hélices alfa y láminas beta.

B. Estructura cuaternaria del tetrámero acomplejado con AMP.

El sitio alostérico está situado a 28 Å de un centro activo definido por el sitio de unión del ion Mg^{2+} (o 2 iones Mn^{2+}), y por residuos en contacto con el fosfato-1 del sustrato (Ke *et al.*, 1990a y 1990b; Liang *et al.*, 1992 y 1993; Zhang *et al.*, 1993).

El sustrato existe bajo 2 formas principales en equilibrio, el anómero alfa (15 %) y el beta (81 %). Según Marcus *et al.* (1976) la forma beta es probablemente el sustrato hidrolizado por la enzima. Para Liang *et al.*, (1992), ambos anómeros pueden unirse al centro activo en presencia o ausencia del ion metálico. En cambio, Frey *et al.*, (1977) y Zhang *et al.*, (1993) concluyen que sólo el anómero alfa es hidrolizado por la enzima.

El AMP se une de manera no competitiva y levemente cooperativa. Establece enlaces hidrógenos con una constelación de residuos tales como Val 17, Thr 27, Gly 28, Gly 29, Leu 30, Thr 31, Lys 112, Tyr 113, Arg 140, Val 160 y Met 177 (Figura 3) en la enzima de hígado humano. Esos residuos son conservados en todas las secuencias publicadas de mamíferos mamífero (Gidh-Jain *et al.*, 1994), salvo en la enzima de cerdo, que presenta una metionina en lugar de la Leu 30.

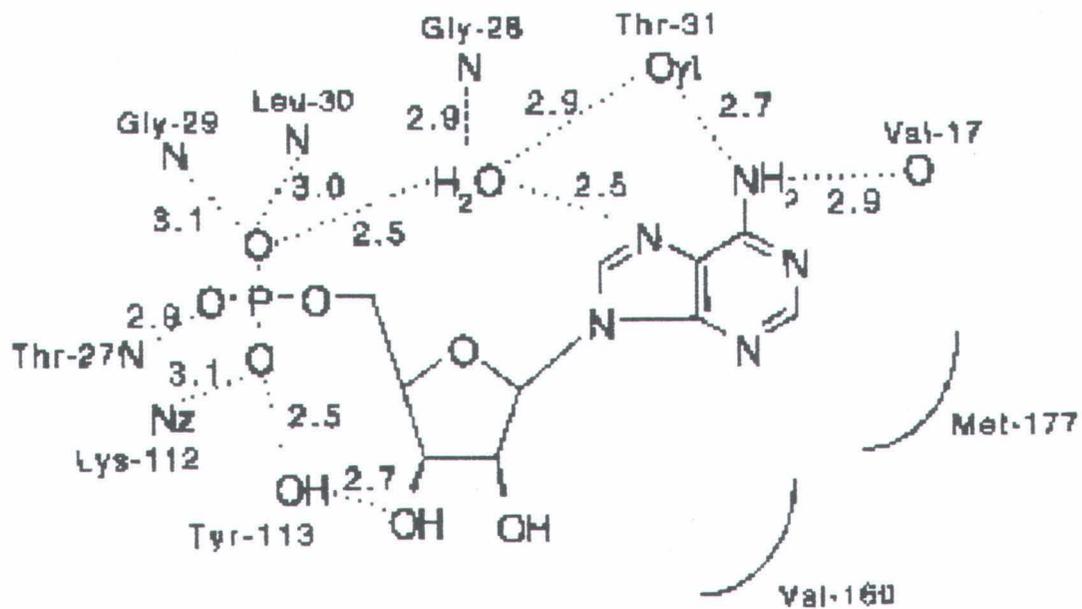


Figura 3. Representación de las interacciones entre el AMP y los residuos del sitio alostérico en la enzima de hígado humano (Iversen *et al.*, 1997).

En la estructura de la enzima de riñón de cerdo, de hígado humano y de hígado de conejo, la unión del AMP provoca cambios conformacionales. En efecto, como ya se apuntó anteriormente, el nucleótido provoca una rotación del segundo dímero con respecto al primero de 16 ° en la enzima humana (17° en la enzima del cerdo),

conformación T, frente a la R primitiva. Esto provoca una reorienta la estructura secundaria, en particular en la zona de los aminoácidos 50-72, en la reorganización de las interacciones por enlaces hidrógenos y de van der Waals, cambiando la conformación del sitio de unión del ión metálico (Lámina 4). Todos estos elementos son responsables del cambio conformacional del tetrámero que ocurre en la transición R-T.

La subtilisina, tripsina y proteasas lisosomales hidrolizan el lazo de la parte N terminal de la FBPasa, lo que genera una forma de enzima con un pH óptimo 9.2, y reduce o hace desaparecer el efecto del AMP (Marcus *et al.*, 1981). Recientemente se ha puesto de evidencia que el AMP activaba la FBPasa muscular de serpiente a pH 9.2 (Zhao *et al.*, 1998), hecho no observado en otras enzimas animales. Esta activación es dependiente de Mg^{2+} , pero se observa sólo a partir de una concentración de Mg^{2+} 1 mM. Esto sugiere que el pH puede ser un factor de regulación de la enzima en la interacción con el AMP, ya que el acoplamiento del nucleótido puede ser diferente a pH neutro que a pH alcalino; residuos que se ionizan con un pKa de 8.9 pueden estar involucrados en el proceso.

El sistema FBPasa / fosfofructokinasa-1 (PFKasa-1) es el mayor sitio de regulación de la gluconeogénesis / glicólisis. Esas dos enzimas tienen la misma ubicación celular y controlan dos reacciones opuestas e irreversibles. Gluconeogénesis y glicólisis son recíprocamente reguladas por AMP, citrato y fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6-P) en la etapa de interconversión de la F-6-P en FBP. La PFKasa-1 es activada por la F2,6-P y AMP e inhibida por ATP y citrato. En cambio, la FBPasa es activada por citrato e inhibida por F-2,6-P en sinergia con AMP (van Schaftingen *et al.*, 1981; Pilkis *et al.*, 1981; François *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 1988). La buena coordinación de esas dos enzimas es un ejemplo de regulación del metabolismo que, en caso contrario, conduciría a una rápida depresión de la energía celular.

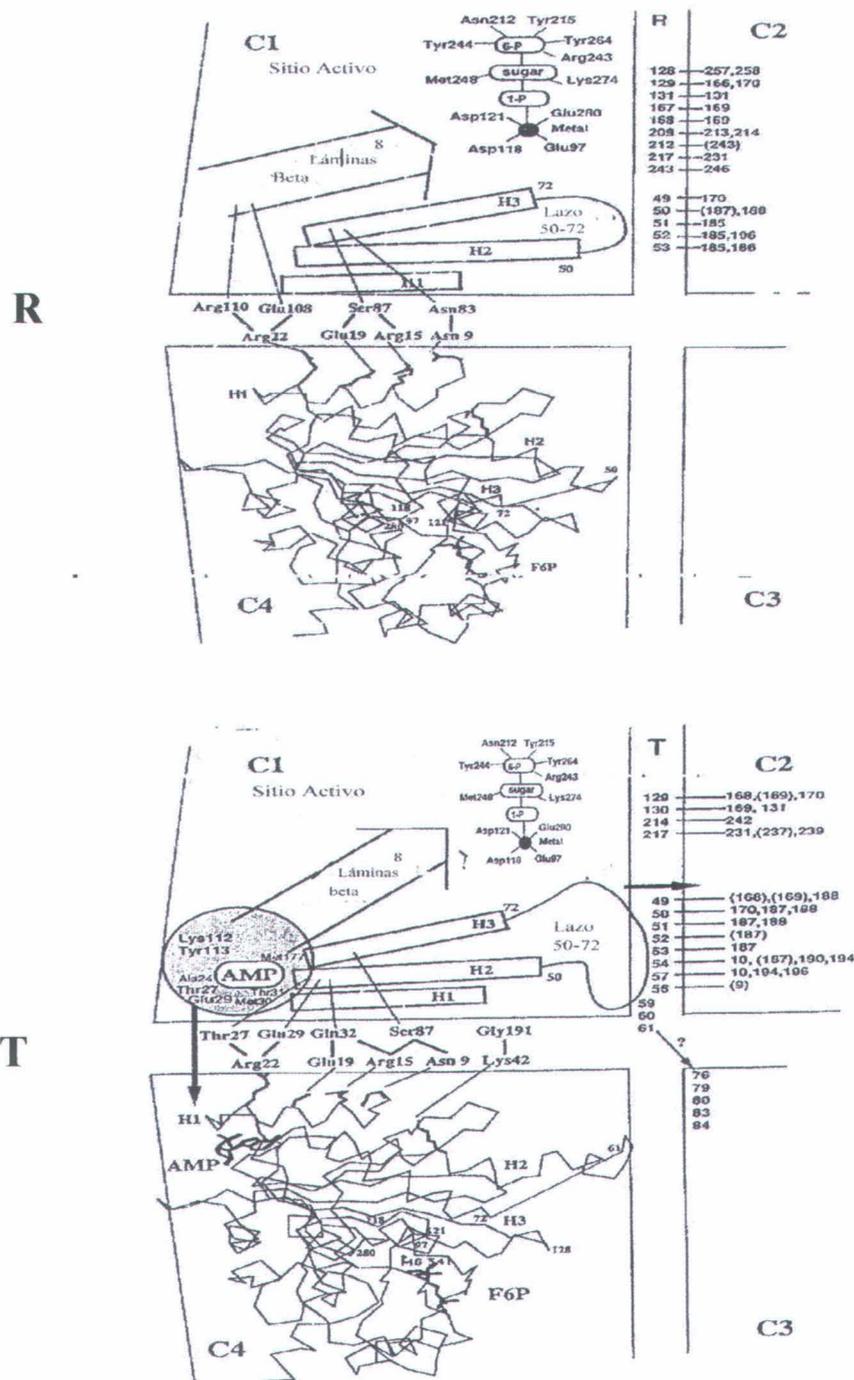


Lámina 4. Cambios estructurales que ocurren en el tetrámero inducidos por la unión del AMP en el sitio alostérico. De manera jerárquica son: (1) rotación de 17° del dímero (rotación R → T), (2) reorientación de los dominios AMP y FBP en el monómero, (3) reorientación de la estructura secundaria y de los lazos en el monómero, y (4) reorganización de los enlaces hidrógenos y de las interacciones de van der Waals (Liang *et al.*, 1994).

Control por F-2,6-P

En el organismo humano el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa sanguínea es de primera importancia para su supervivencia, ya que la glucosa es la fuente de energía de los tejidos cerebrales, eritrocitarios, renales o testiculares. La gluconeogénesis es la síntesis de novo de glucosa a partir de metabolitos no carbohidratados, como el ácido láctico, aminoácidos y glicerol. La glucosa puede formarse también a partir de intermediarios carbohidratados, como el piruvato, la dihidroxiacetona-fosfato o el oxaloacetato. Esta reacción es muy costosa en términos de ATP consumidos (Tabla 1).

Sustratos	Productos
Gluconeogénesis	
2 Piruvatos + 4 ATP + 2 GTP + 2 NADH + 2 H ⁺ + 6 H ₂ O	Glucosa + 4 ADP + 2 GDP + 6 Pi + 2 NAD ⁺ $\Delta G_0' = - 47.6 \text{ KJ/mol}$
Glicolisis	
Glucosa + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD ⁺	2 Piruvatos + 2 ATP + 2 NADH + 2 H ⁺ + 2H ₂ O $\Delta G_0' = - 73.3 \text{ KJ/mol.}$

Tabla. 1. Balance de las reacciones de gluconeogénesis y glicolisis.

El hígado es el principal tejido de respuesta a señales que indican un nivel anormal (reducido o elevado) de glucosa sanguínea. De hecho, una de las principales funciones del hígado es la de producir glucosa para la circulación. Ambos, elevados y reducidos niveles de glucosa circulatoria, generan respuesta hormonal para restaurar la homeostasis. La hipoglucemia genera liberación de glucagón de las células alfa del páncreas. La hiperglucemia genera la de insulina de las células beta. Otras hormonas, como la de crecimiento, el ACTH y otros glucocorticoides, estimulan el nivel de glucosa circulatoria.

El glucagón se une a receptores de membrana de célula hepática, induciendo un incremento de la conversión de ATP en cAMP por medio de una adenilato-ciclasa. El cAMP activa la proteína kinasa (PKA) que fosforila numerosas enzimas, incluida la fosfatasa bifuncional PFKasa-2/F-2,6-Pasa. Esta defosforila la F-2,6-P, lo que induce una disminución del nivel de F-2,6-P en los hepatocitos y, subsiguientemente, un aumento de la actividad FBPasa y una reducción de la PFKasa-1 (Figura 4). En esas condiciones el hígado deja de consumir glucosa y se vuelve, metabólicamente hablando, gluconeogénico, produciendo glucosa para restablecer la normoglicemia. La actividad FBPasa es también regulada por la *ratio* ATP/ADP. Cuando ésta es elevada, la gluconeogénesis procede a su máximo nivel.

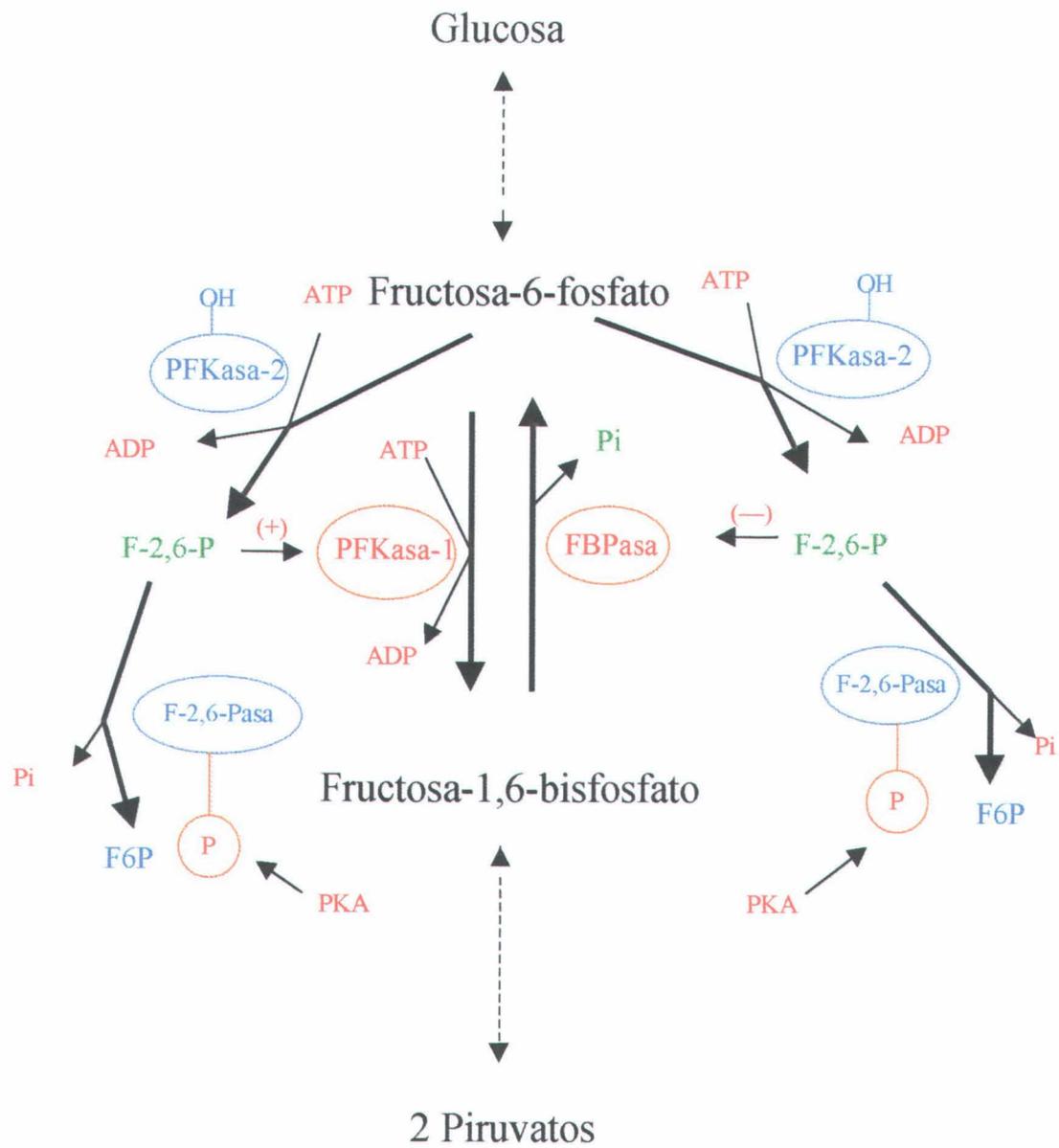


Figura 4. Regulación de la gluconeogénesis / glicólisis por la F-2,6-P a nivel de las enzimas FBPasa / PFKasa-1.

3.2. FBPasa fotosintética

El gen de diferentes FBPasas de plantas superiores ha sido identificado, como el de la cloroplastídica de *Triticum aestivum*, trigo (Raines *et al.*, 1988), *Arabidopsis thaliana* (Horsnell *et al.*, 1991), *Solanum tuberosum*, patata (Kossmann *et al.*, 1992), *Brassica napus*, colza, (Rodríguez-Suarez *et al.*, 1993), *Pisum sativum*, guisante (Carrasco *et al.*, 1994), *Spinacia oleracea*, espinaca (Martin *et al.*, 1996), *Oryza sativa*, arroz (Takahashi *et al.*, 1998), y *Glycine max*, soja (Jeon *et al.*, 1998), así como el de las citosólicas de *Beta vulgaris*, remolacha (Harn *et al.*, 1992), *Spinacia oleracea* (Hur *et al.*, 1992), *Brassica napus* (Laroche *et al.*, 1995) y *Oryza sativa* (Takahashi *et al.*, 1998).

La enzima de espinaca ha sido la más estudiada, y Villeret *et al.*, (1995) determinaron la estructura de la enzima reducida. Ésta es igualmente homotetramérica, y cada monómero presenta la misma estructura en hélices alfa y láminas beta que la enzima de cerdo (Figura 5). La enzima cloroplastídica se destaca por el "lazo 170" que presenta diversas conformaciones en el modelo de Villeret (Figura 6). El tetrámero presenta una forma "super T" llamada S, pues el plano del dímero C3C4 forma un ángulo de 20° con respecto al de C1C2.

Como ya se apuntó, las cisteínas implicadas en la modulación rédox están ubicadas en el "lazo 170", y se encuentran a una distancia bastante larga una de otra en el modelo. Eso sugiere que la reducción de la enzima se acompaña de cambios conformacionales importantes del tetrámero, a no ser que los "lazos 170" hayan sido deformados en el proceso de cristalización.

Aunque no se regula por AMP, la enzima conserva el sitio alostérico de unión al nucleótido. La FBPasa cristalizada en presencia de AMP no presenta densidad electrónica en la zona de unión del nucleótido. Eso sugiere que el AMP no se une a la enzima cloroplastídica, lo que viene explicado por la orientación diferente de las tres primeras hélices alfa. Además, los residuos que interaccionan con el nucleótido en la enzima de cerdo no son conservados en la enzima de espinaca. El sitio de unión del AMP debe ser una reliquia del antecesor.

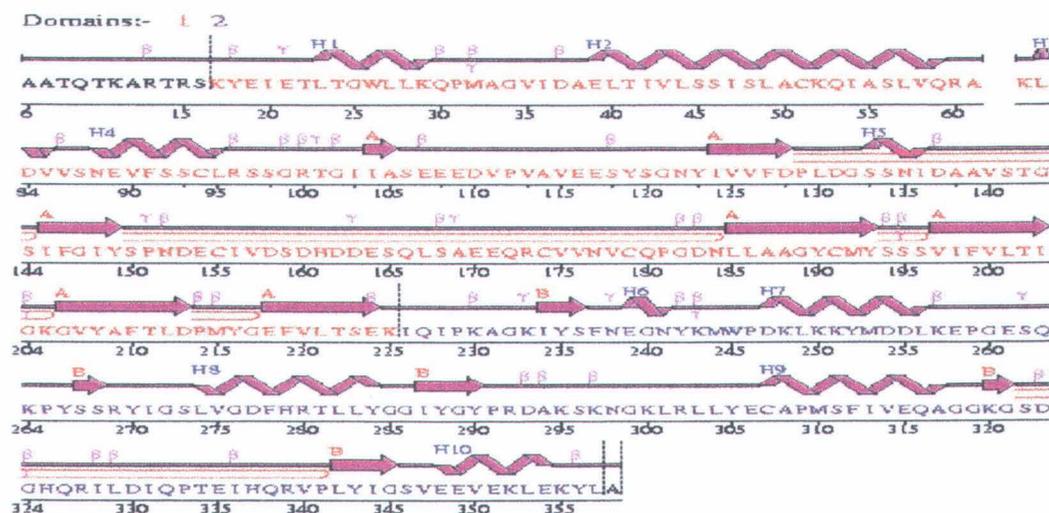


Figura 5. Estructura secundaria de la FBPasa cloroplastídica de espinaca (Villeret *et al.*, 1995). El lazo 170 se ubica entre los residuos 150-185.

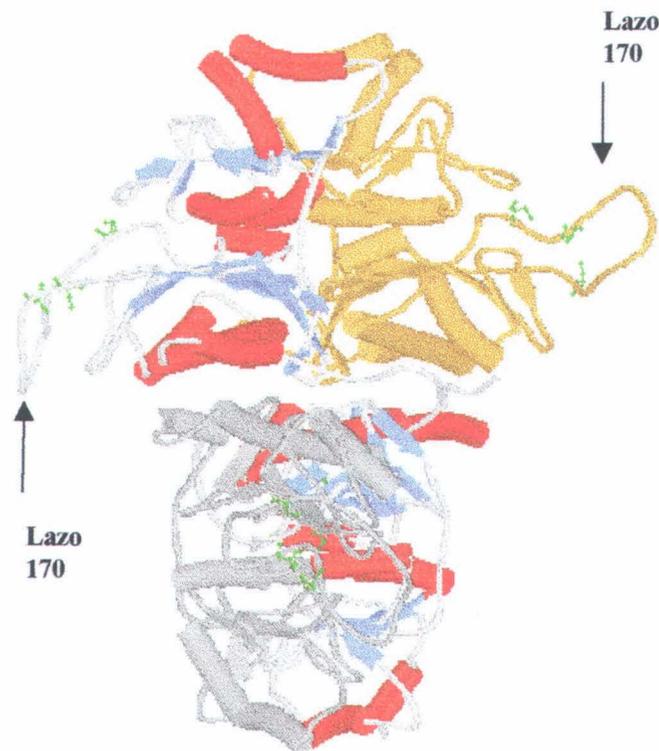


Figura 6. Estructura tetramérica de la FBPasa cloroplastídica de espinaca. El “lazo 170”, con las tres cisteínas representadas, forma una estructura sobresaliente accesible al solvente (Villeret *et al.*, 1995).

4. FBPasas Y FOTOSÍNTESIS

4.1. Fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los fenómenos más deslumbrados del planeta. Se puede definir como el conjunto de reacciones por las cuáles los organismos autótrofos utilizan la energía lumínica solar para fotolisar el agua, generando así energía química y poder reductor en forma de NADPH y ATP. Estos son luego utilizados para la asimilación, y reducción a formas biológicamente activas, de elementos que se encuentran en la naturaleza en alto estado de oxidación (CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}), o en formas de baja reactividad (N_2). Por lo que se refiere a la fotosíntesis del carbono, la más importante en término de biomasa, tiene lugar gracias a un conjunto de enzimas solubles ubicados en el estroma del cloroplasto.

Las reacciones de la primera fase de la fotosíntesis, captación fotónica y síntesis de NADPH y ATP, son catalizadas por un sistema de pigmentos, transportadores y enzimas fijados a las membranas tilacoidales. Dos complejos multiproteínicos directamente excitables por la luz solar, los fotosistemas I y II (PS I, PS II), forman los componentes principales. La fotólisis del agua es catalizada por una especie de H₂O-deshidrogenasa del PS II, liberando protones y electrones en el espacio tilacoidal. Los electrones entran en un proceso de transporte electrónico, que va desplazando los equivalentes de reducción a través de varios componentes, reproduciendo un diagrama llamado "esquema Z". Al final de la cadena de transporte una proteína soluble, con un núcleo de dos átomos de azufre y dos de hierro, la ferredoxina, acepta dos electrones, reduciéndose. El poder reductor llegado hasta la ferredoxina se emplea en reducir la NADP⁺ a NADPH a través de la ferredoxina-NADP-reductasa. Parte de la ferredoxina reducida puede ceder sus equivalentes de reducción a otros aceptores, como la tiorredoxina, a través de ferredoxina-tiorredoxina reductasa. Los protones generados sirven para sintetizar ATP. La reacción, acoplada al flujo electrónico, es catalizada por una H⁺-ATP-sintetasa.

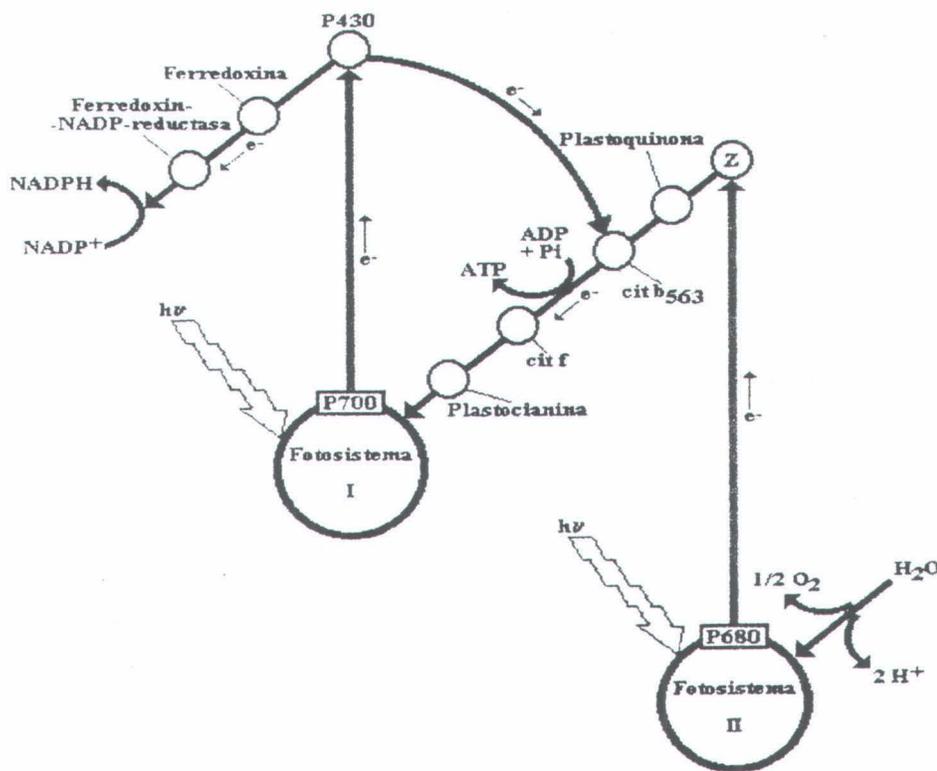


Figura 7. Esquema en Z de la ruta del transporte electrónico fotosintético. El eje vertical del diagrama representa energía. Los procesos de transferencia electrónica que se producen en dirección ascendente necesitan que se capture energía luminosa. La ruta normal de transporte no cíclico comienza en el PS II, y tras una serie de transportes de electrones, finaliza con la síntesis de NADPH. La ruta alternativa de transporte cíclico se produce cuando no se dispone de NADP⁺ como aceptor de electrones de la ferredoxina, y en ella, se sintetiza ATP sin formación paralela de NADPH. Los aceptores están fijos a la membrana tilacoidal, mientras que la ferredoxina y la ferredoxina-NADP-reductasa están parcialmente solubles en el estroma.

En la segunda fase de la fotosíntesis, el ATP y el NADPH precedentes, solubles en el estroma, son utilizados en la síntesis de hidratos de carbono a partir del dióxido de carbono atmosférico, mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Benson-Calvin (Lámina 5).

Pueden distinguir tres etapas en el ciclo:

1. Fijación del CO₂ atmosférico mediante la carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RBP);
2. Reducción del carbono fijado a triosas-fosfato;
3. Regeneración del aceptor del carbono, la RBP.

Se inicia el ciclo de Calvin con la carboxilación de la RBP, reacción catalizada por la ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa-oxigenasa (RUBISCO), la proteína más abundante de la biosfera. La RBP se transforma en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (PGA). Este es fosforilado y reducido para originar gliceraldehido-3-fosfato (GAP), que puede isomerizarse a dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) mediante una reacción catalizada por la triosa-fosfato-isomerasa. Con este proceso, el carbono pasa de un estado de oxidación +4 en el CO₂ hasta 0 en el DHAP, consiguiéndose así la completa reducción del carbono atmosférico para su posterior utilización en el metabolismo celular.

El ciclo se completa por un conjunto de nueve reacciones (isomerizaciones, condensaciones e hidrólisis) que sirven para regenerar la RBP. Las triosas-fosfato (GAP, DHAP) pueden atravesar la membrana cloroplastídica para integrarse en la síntesis y metabolismo de la sacarosa, bien reaccionar en el cloroplasto para regenerar los metabolitos del ciclo asimilativo, o dirigirse en la organela hacia la síntesis de almidón. Cuando la fotosíntesis alcanza un estado de equilibrio, 5/6 de las triosas-fosfato se emplean para la regeneración de la RBP, y 1/6 es convertido en almidón en el cloroplasto, o exportado al citoplasma para ser transformado en sacarosa.

La regulación del ciclo de Calvin, que supone la coordinación de 11 sistemas enzimáticos, así como de los niveles de ATP y NADPH, es crítica para el buen funcionamiento de la planta. La FBPasa es una enzima clave en la regulación del ciclo, pues define la concentración de FBP y F-6-P en el estroma. Una baja actividad de FBPasa inducirá una alta concentración de FBP y, por efecto "feed-back", también de DHAP y GAP, quedando disponibles para su exportación al citosol para la síntesis de sacarosa. En cambio, con una alta actividad de FBPasa se formará un exceso de F-6-P, parte del cual se transformará en G-6-P para empezar la síntesis de almidón. Controlando la actividad de la FBPasa, se podrá dirigir el metabolismo del vegetal en el sentido de la síntesis de sacarosa o hacia la producción de almidón.

Las triosas-fosfato generadas en el cloroplasto son transportadas en el citosol en una reacción de cambio con Pi por medio del translocador de triosa-P / Pi del cloroplasto. Las triosas-P son utilizadas en la síntesis de sacarosa con liberación de Pi. Cuando se reduce esta síntesis, se reduce la exportación de triosa-Pi por la depresión de la concentración de Pi en el citosol. La carencia de Pi induce también la reducción de la concentración de ATP. Una alta razón triosa-P/Pi induce la acumulación de almidón.

Así, la fluctuación de la concentración de Pi es también importante en la regulación de reparto del fotosintetizado entre almidón y sacarosa.

Dos son las enzimas que controlan la síntesis de sacarosa, la FBPasa citosólica y la sucrosa-fosfato-sintasa (SPS). Las triosas-P se combinan para formar FBP, que es defosforilada por la FBPasa a F-6-P. Cuando el nivel de triosas-P en el citosol limita la síntesis de sacarosa, la F-2,6-P frena la conversión de las triosas-P en hexosas-P inhibiendo la FBPasa, lo que inhibe la sacarosa-fosfato-sintetasa por falta de sustrato. Debida a su estratégica ubicación en la ruta de síntesis de la sacarosa, la FBPasa citosólica controla el flujo de triosas fosfato del cloroplasto y, por lo tanto, coordina la tasa de síntesis de sacarosa con el nivel de fotosíntesis.

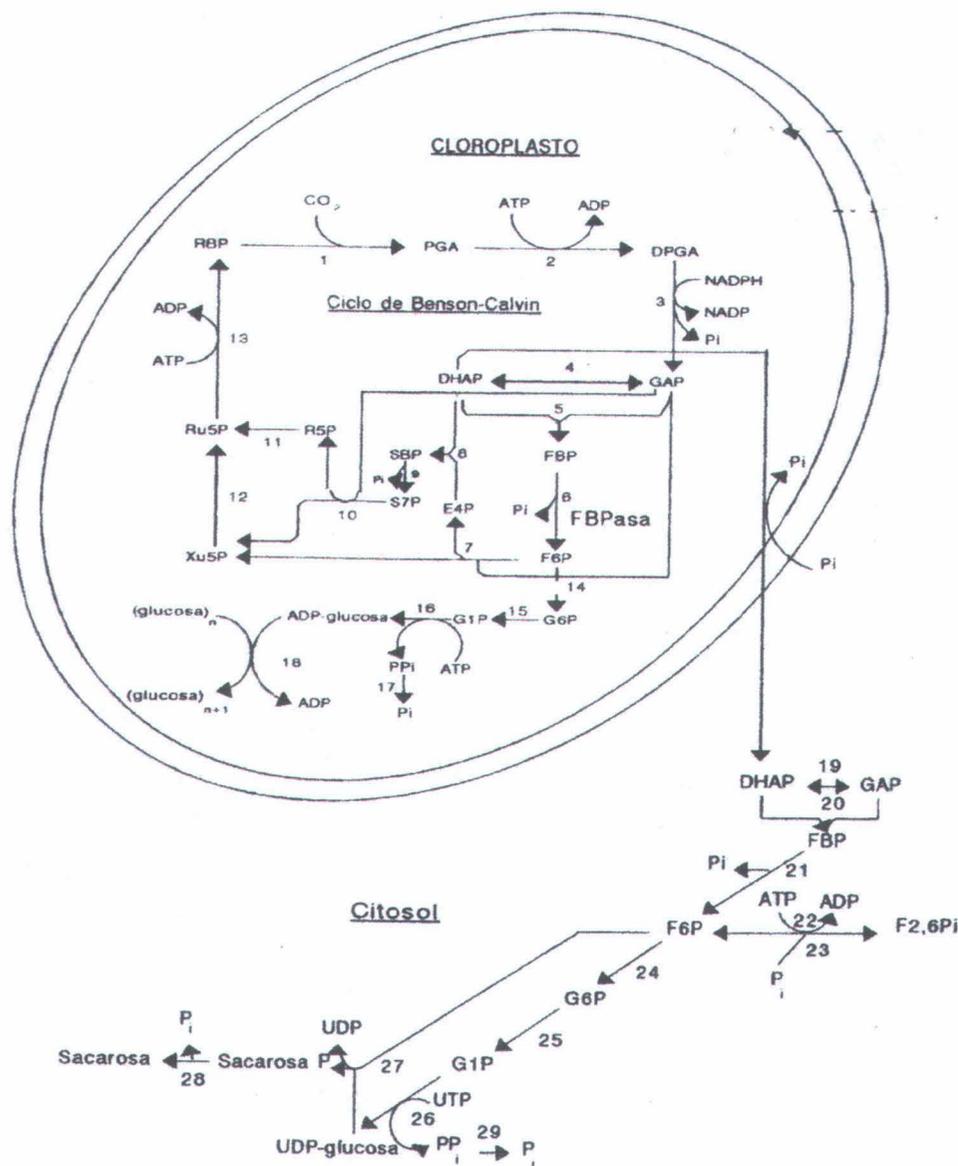


Lámina 5. Ciclo de Benson-Calvin y su relación con la síntesis de almidón y sacarosa. La numeración corresponde a las distintas etapas enzimáticas:

1. RUBISCO; 2. Fosfoglicerato quinasa; 3. NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; 4. Triosa-fosfato-isomerasa; 5. Aldolasa; 6. FBPasa; 7. Transacetolasa; 8. Aldolasa; 9. SBPasa; 10. Transacetolasa; 11. Fosforribulosa isomerasa; 12. Ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; 13. Fosforribuloquinasa; 14. Fosfoglucosa isomerasa; 15. Fosfoglucocomutasa; 16. ADP-glucosa pirofosforilasa; 17. Pirofosfatasa; 18. Almidón sintetasa; 19. Triosa fosfato isomerasa; 20. Aldolasa; 21. FBPasa citosólica; 22. Fructosa-6-fosfato 2-quinasa; 23. Fructosa-2,6-bisfosfatasa; 24. Fosfoglucosa isomerasa; 25. Fosfoglucocomutasa; 26. UDP-glucosa pirofosforilasa; 27. Sacarosa fosfato sintetasa; 28. Sacarosa fosfato fosfatasa; 29. Pirofosfatasa.

5. TIORREDOXINAS

5.1. Generalidades

Las tiorredoxinas son proteínas ubicuas de bajo peso molecular (~12 KDa) mantienen dos cisteínas muy conservadas en un centro activo (-CXXC-) de secuencia igualmente altamente conservada (Eklund *et al.*, 1991). Las células vegetales poseen, al menos, 3 diferentes tipos de tiorredoxina caracterizadas por su función, localización y estructura primaria (Buchanan *et al.*, 1994). De ellos dos han sido encontrados en el cloroplasto, en el cual actúan como proteínas reguladoras en la asimilación carbonada, mientras que un tercer tipo está presente en el citoplasma. Ambas formas cloroplastídicas han sido diferenciadas por su especificidad respecto a enzimas diana. La Trx *f* presenta alta especificidad para la FBPasa y otras enzimas del ciclo de Calvin, como la SBPasa, la fosforribulokinasa y la NADP-gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa. La Trx *m* interacciona eficazmente con la NADP-malato-deshidrogenasa, a la que activa, en una enzima crucial para las plantas C4. En cambio, desactiva la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, una enzima de la ruta oxidativa de las pentosas-fosfato.

La estructura primaria de las dos tiorredoxinas cloroplastídicas presenta sólo un 30 % de identidad en espinaca y un 23 % en guisante. Por en contrario, las Trx *m* de origen procariota, (Jacquot *et al.*, 1997), son unas similares a la Trx de *E. coli*, con un 46 % de identidad. Más diferentes son las Trx *f*, de origen eucariota. No obstante, como ya se ha dicho, los centros activos de las dos Trxs son estrictamente conservados.

La Trx *h* participa en numerosas reacciones. Interviene en la movilización de proteínas de reservas en la germinación. Ha sido identificada en arroz como una de las proteínas mayoritarias en la savia del floema (Ishiwatari *et al.*, 1995). Además, su capacidad de formar complejos multiprotéicos, intervendría en la conformación de proteínas en el citosol.

Recientemente se ha caracterizado una tiorredoxina mitocondrial (Spyrou *et al.*, 1997) presente en células de rata. Su secuencia se acerca a la de Trx *m* y de bacterias. Se ha sugerido un papel en la defensa frente a radicales libres que se derivan de la respiración mitocondrial. De hecho, la tiorredoxina mitocondrial se expresa preferencialmente en tejidos con gran gasto respiratorio, como el corazón, músculo esquelético, cerebro y testículos.

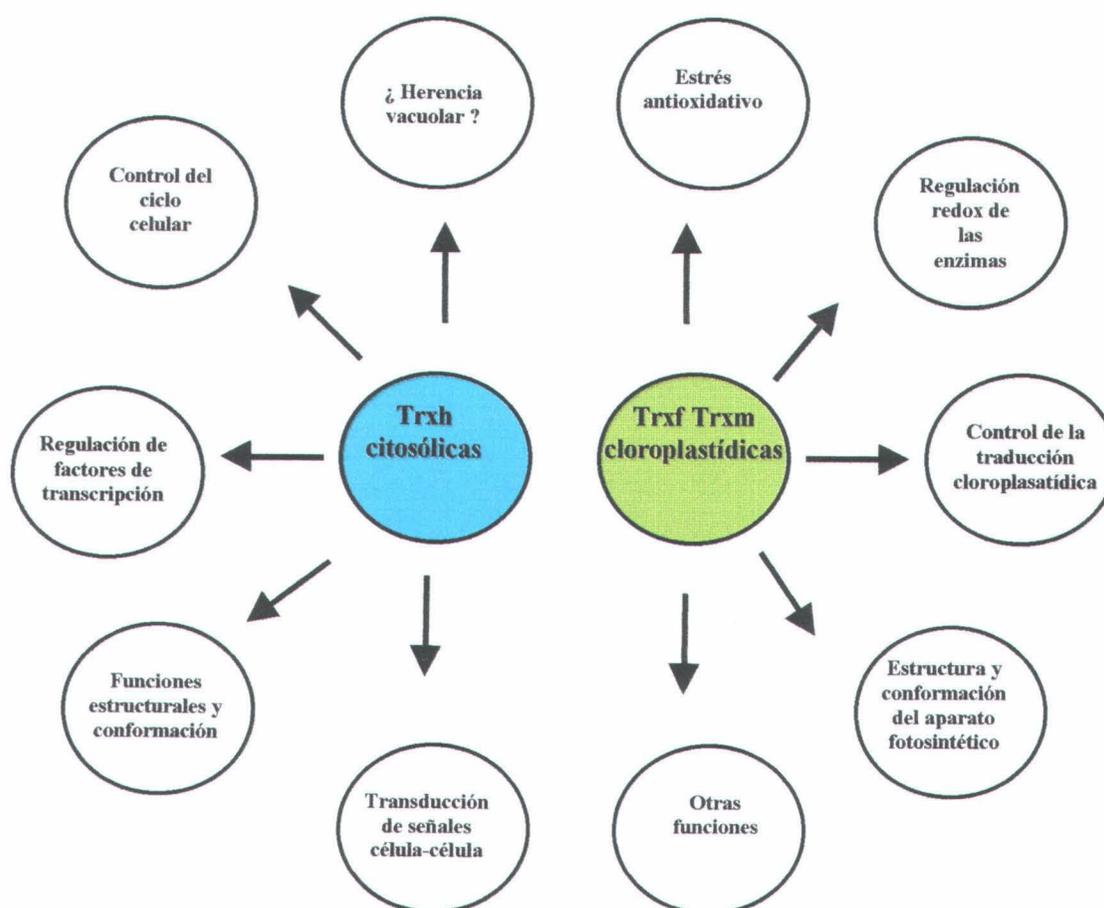


Figura 8. Resumen de las diferentes funciones de las tiorredoxinas vegetales. Adaptado de Jacquot *et al.*, (1997).

5.2. Estructura

La estructura tridimensional de la tiorredoxina de *E. coli* (Eklund *et al.*, 1991) y las tiorredoxinas humanas (Qin *et al.*, 1994; Weichsel *et al.*, 1996) han sido ampliamente estudiadas. Entre organismos fotosintéticos se ha determinado la estructura tridimensional de la tiorredoxina-2 de *Anabaena* (Saarinen *et al.*, 1995) y la Trx *h* de *Chlamydomonas* por RMN (Mittard *et al.*, 1997). Más recientemente, se han cristalizado las Trx *f* y Trx *m* de espinaca (Capitani *et al.*, 1998). La estructura de ambas proteínas presenta el perfil típico de la conformación tiorredoxina, a saber, una proteína globular con un centro formado por 5 láminas beta, envuelto por 4 hélices alfa. El 90% de la proteína está involucrado en esta estructura alfa-beta, lo que explica su alta estabilidad. Este tipo de conformación se encuentra en estos biocatalizadores con grupos tioles, como la glutaredoxina y proteína disulfuro isomerases. El centro activo se

encuentra en un entorno de residuos hidrófobos que delimitan un surco, coronado por un conjunto de residuos cargados.

La desviación RMS (Root Mean Square) entre Trx *m* de espinaca y la de *E. coli* para 104 carbonos alfa comunes es de 1.0 Å, mientras que la desviación entre las Trx *f* y *m* de dicha especie para 102 carbonos alfa es de 1.2 Å. Este dato confirma que, a nivel estructural, la Trx *m* está más próxima a la proteína de *E. coli* que a la Trx *f*. Además, hay cierta similitud en torno al centro activo entre la Trx de *E. coli* y la Trx *m*, lo que explica que la proteína de *E. coli* puede sustituir a la Trx *m* en algunas reacciones. No obstante, la zona en torno a la cisteína del lado N-terminal del centro activo de la Trx *m* es más polar y menos hidrofóbica que en la proteína de *E. coli*.

La Trx *f* posee una tercera cisteína expuesta a la superficie. Esta cisteína es conservada en todas las secuencias de Trx *f*. Mutagénesis dirigida de este aminoácido reduce la capacidad de la Trx *f* en activar la FBPasa (Del Val *et al.*, 1993). Eso indica que este residuo puede estar implicado en la interacción con la enzima diana. Además de esta cisteína, la Trx *f* presenta en torno al centro activo una distribución de residuos polares, cargados e hidrófobos sustancialmente diferente respecto a la Trx *m* y de *E. coli*. Esto debe tener su importancia en la orientación de la molécula a la hora de interactuar con proteínas diana.

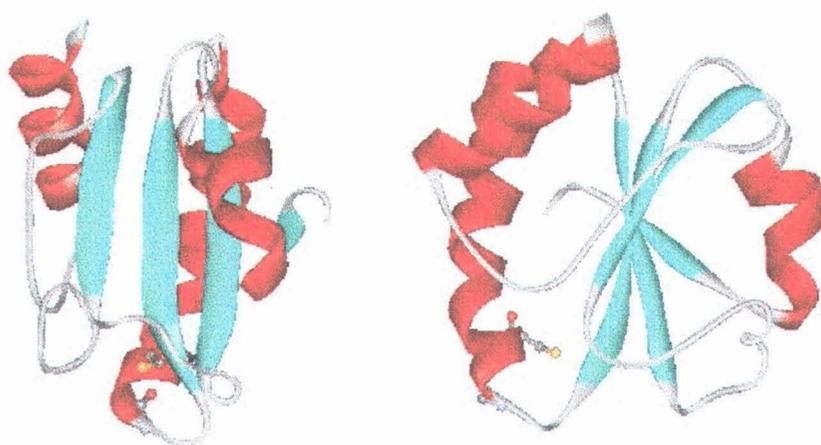


Figura 9. Estructura tridimensional de la Tiorredoxina de *E. coli* (Eklund *et al.*, 1991)

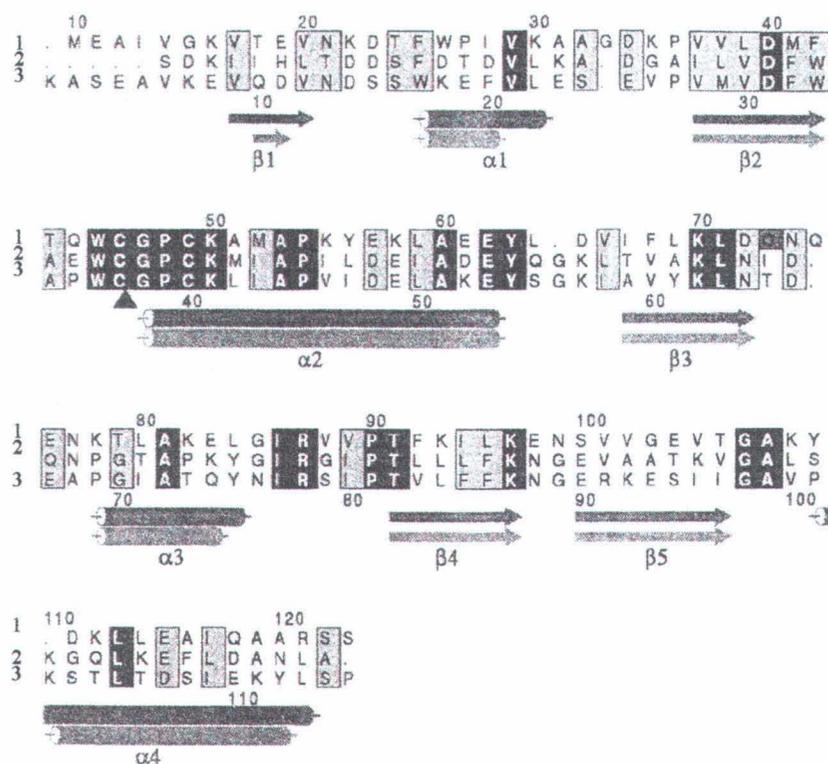


Figura 10. Alineamiento de secuencias de la Trx f (1) y Trx m (3) de espinaca (*Spinacia oleracea*) con la tiorredoxina de *E. coli* (2) (según Capitani *et al.*, 1998).

5.3. Mecanismo de reacción

Hermoso *et al.*, (1996) demostraron que un fragmento del “lazo 170” de la FBPasa de guisante era capaz de unirse a la Trx f y Trx m homólogas. Eso sugirió que, si bien las cisteínas por sí solas no podían justificar la interacción, deberían existir otros componentes, electrostáticos y/o hidrofóbicos, implicados en la reacción.

La cristalización del complejo de ADN-polimerasa del fago T7 con la tiorredoxina de *E. coli* (Doublie *et al.*, 1998) mostró que la unión entre esas dos entidades se llevaba a cabo a través de un bucle de la polimerasa expuesto al medio, con la cara del centro activo de la tiorredoxina. En este complejo, la tiorredoxina no cumple una función rédox, sino estructural. La mayoría de las interacciones resultan ser de tipo hidrofóbico.

Qin *et al.*, (1995, 1996) estudiaron el complejo de la tiorredoxina humana con dos péptidos distintos de 13 aminoácidos cada uno, correspondientes a los bucles reguladores del factor de transcripción NFκB y del factor de acoplamiento nuclear Ref1. Ambos péptidos incluyen la cisteína objeto del ataque nucleofílico primario por la

cisteína 32 de la Trx, de modo que formaran complejos covalentes. En los dos casos, existe un encaje el mismo surco de la superficie de la Trx.

Esos datos sugieren que, presumiblemente, las tiorredoxinas, ya sean bacterianas, humanas o vegetales, se unirían a sus proteínas diana a través del canal hidrófobo, en medio del cual sobresale la cisteína reactiva. A continuación, la reducción de la proteína se iniciaría por un ataque nucleófilo del tiolato reactivo sobre un átomo de azufre de la diana, generando un intermediario disulfuro mixto e inestable. El ciclo catalítico se completaría por la rotura del complejo y la liberación de una Trx oxidada y una proteína ditiol.

La tiorredoxina oxidada necesita ser reducida a su forma inicial. Como se ha señalado anteriormente, en el cloroplasto, durante la fase lumínica, la ferredoxina de la cadena de transporte electrónico cede equivalentes de reducción a las Trx *f* o Trx *m*. La reacción es catalizada por la ferredoxina-tiorredoxina-reductasa. En el citosol existe un sistema similar a aquél encontrado en células animales o bacterianas, no fotosintéticas para la reducción de las tiorredoxinas. En este caso el donador de electrones es el NADPH, y la transferencia electrónica entre el NADPH y la Trx *h* es catalizada por una flavoproteína, la NADPH-tiorredoxina-reductasa.



OBJETIVOS

El Grupo de investigación sobre Fotosíntesis de la Estación Experimental del Zaidín ha mantenido un interés constante en la comprensión de la modulación por la luz de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cloroplastídica, así como por el sistema ferredoxina-tiorredoxina que modula la relación entre la luz y el metabolismo vegetal. En ese sentido mantiene una línea de investigación para elucidar a nivel molecular la unión de la FBPasa a la tiorredoxina, la eficiencia de la transferencia electrónica a través de las cisteínas de ambas proteínas sulfuradas, así como el nivel de expresión de las diferentes tiorredoxinas en la planta.

Por otro lado, recientes investigaciones (Anderson *et al.*, 1997) apuntan a que modificaciones en el potencial redox pueden ejercer algún efecto modulador indirecto sobre la FBPasa citosólica de la célula vegetal. Como hemos apuntado repetidas veces, la enzima citosólica presenta una estructura similar a la de la cloroplastídica, excepto el "lazo 170" de esta última que contiene las 3 cisteínas implicadas en la modulación redox.

A la vista de los antecedentes expuestos en la Introducción, nos proponemos transformar la FBPasa citosólica de remolacha (*Beta vulgaris*)¹ así como la enzima de hígado humano², en una forma modulable por regulación redox, insertando en la mitad de la proteína la secuencia reguladora ("lazo 170") de la enzima fotosintética de guisante (*Pisum sativum*).

Para ello se propuso el siguiente plan de trabajo:

1. Predicción de las características de las proteínas putativas por medio de soporte bioinformático.
2. Construcción de las FBPasas quiméricas.
3. Expresión heteróloga y purificación de las diferentes FBPasas vegetales, animales y quiméricas, y análisis de su modulación por óxido reducción.
4. Aislamiento de la FBPasa citosólica de guisante (*Pisum sativum* L.).
5. Análisis del efecto de la luz sobre la expresión del gen .

¹ . La donación del gen (cDNA) fue una cortesía de Dra. Jaleh Daie, Department of Botany, Birge Hall, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA.

² . La donación del gen codificante (cDNA) fue una cortesía de Dr. M. Raafat El-Maghrabi, Department of Physiology and Biophysics, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11794-8861, USA.



MATERIALES Y MÉTODOS

I. MANIPULACION DE MATERIAL VEGETAL

1. CONDICIONES DE CULTIVO DE LA PLANTA

Se lavan las semillas de guisante (*Pisum sativum* var. Lincoln) al grifo, y se dejan embeber en agua durante una noche, rechazando las deterioradas. Se esterilizan lavándolas superficialmente con H_2O_2 al 3 % (dilución al 10 % del perhidrol Merck) y formaldehído al 3 %, se escurren en agua de nuevo, y se llevan a germinar en vermiculita dispuesta en bandejas de plástico hasta que emerjan las primeras foliolas (aproximadamente 10 días). La germinación se conduce a 25 °C, con fotoperiodo de 16 horas, y unos 50 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ de irradiación, con riego periódico, somero, de agua, evitando encharcamientos.

Al cabo de este tiempo se pasan las plántulas a cultivo hidropónico en cubetas de plástico de unos 2 litros de capacidad, en las que se instalan hasta 8 plántulas por cubeta, insertadas en pequeños cilindros de espuma de plástico que acceden a través de sendos agujeros de la tapa de la cubeta. El fondo, la pared lateral y la tapa de las cubetas son opacas a fin de evitar la implantación de algas en el medio. La tapa tiene la posibilidad de insertar finas guías extensibles de madera, que se instalan a medida que el desarrollo de la planta lo exija. Finalmente, el medio de cultivo es continuamente aireado a través de un fino tubo de vidrio, que se introduce por el centro de la tapa hasta media altura del cultivo, y por el cual se insufla una pequeña corriente de aire gracias a bombas de impulsión. Para evitar la entrada de esporas de hongos, y la contaminación subsiguiente del medio de cultivo, el aire debe filtrarse previamente por algodón cardado y, si resulta necesario, hacerse barbotear por agua.

El medio de cultivo líquido es de Hewitt (1966), cuya fórmula de preparación es la siguiente:

Solución A de micronutrientes (en 500 ml):

BO_3H_3	1.4375 g
$SO_4Zn\ 7H_2O$	0.1099 g
$Cl_2Mn\ 4\ H_2O$	0.9002 g
$SO_4Cu\ 5\ H_2O$	0.1000 g

Solución B de macronutrientes (en 1000 ml):

$(NO_3)_2Ca\ 4\ H_2O$	22.5220 g
-----------------------	-----------

NO ₃ K	1.7620 g
(NO ₃) ₂ Mg 6 H ₂ O	3.1932 g
EDTA/Fe	1.4112 g

Solución C de macronutrientes (en 1000 ml):

SO ₄ Mg 7 H ₂ O	5.7460 g
---------------------------------------	----------

Solución D de macronutrientes (en 1000 ml):

PO ₄ H ₂ K	12.6880 g
----------------------------------	-----------

La fórmula para la preparación de 5 litros de medio nutritivo es la siguiente, siguiendo el orden indicado, y agitando bien después de cada adición:

H ₂ O destilada	4000 ml
Solución B de macronutrientes	250 ml
Solución C de macronutrientes	250 ml
Solución D de macronutrientes	250 ml
Solución A de micronutrientes	5 ml
H ₂ O destilada	csp 5 litros

La concentración de este medio de cultivo en los distintos nutrientes es:

NO ₃ ⁻	11.65 miliequivalentes / litro
PO ₄ H ₂ ⁻	4.66 miliequivalentes / litro
SO ₄ ²⁻	2.33 miliequivalentes / litro
K ⁺	5.96 miliequivalentes / litro
Ca ²⁺	9.54 miliequivalentes / litro
Mg ²⁺	3.58 miliequivalentes / litro
Fe	10 ppm
Mn	0.5 ppm
B	0.5 ppm
Cu	0.05 ppm
Zn	0.05 ppm

Se ajusta a pH 5.5 con KOH 1N (aproximadamente 1.3 a 1.4 ml por 5 litros de medio), valor que a los 5-7 días desciende a 5.3-5.4. El medio de cultivo deberá renovarse cuando el pH

se desvíe 0.5 unidades de su valor inicial, lo que viene a ser cada semana. El agua transpirada deberá reponerse diariamente (agua destilada), hasta el nivel habitual del pote.

Las condiciones de cultivo hidropónico son las siguientes:

Temperatura día/noche	25 °/ 20 °C
Fotoperiodo	16 horas
Humedad	80 %
Iluminación	300 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ (65.2 W.m^{-2})

II. MANIPULACION DE CEPAS BACTERIANAS Y DE VECTORES PLASMÍDICOS

1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se utilizan las cepas MC1022 y JM109 de *Escherichia coli* (*E. coli*) para clonar y amplificar los plásmidos, y la cepa BL21(DE3) para la expresión de proteínas.

Resumen de las características de las cepas utilizadas:

Cepa	Genotipo	Aplicación	Referencia
MC1022	<i>araD139 (ara, leu) 7697 (lacZ)M15 galK strA</i>	Hospedador, amplificación	Casadaban <i>et al.</i> , 1980
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thl hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻) supE44 Δ(lac- proAB) relA1 [F⁻ traD36 proAB lacI^qZΔM15]λ⁻</i>	Hospedador con alta capacidad de transformación	Messing <i>et al.</i> , 1981
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT r_B⁻ m_B⁻ (DE3)</i> ¹	Expresión	Studier <i>et al.</i> , 1990

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).

2. PLÁSMIDOS

Se utilizaron tres plásmidos para clonar los fragmentos de ADN y expresar el ADNc. Todos ellos portan el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina.

Los plásmidos **pET12a** y **pET 3d** (Studier *et al.*, 1990) pertenecen a la familia de los vectores pET (plasmids for Expression in T7), diseñados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* de forma muy eficiente. Los genes clonados quedan bajo el control del promotor T7, reconocible por la ARN-polimerasa del fago T7, cuya actividad es muy superior a la polimerasa bacteriana, que no reconoce este promotor. De este modo los plásmidos pueden quedar latentes en cepas bacterianas que carecen del gen de la polimerasa T7. Cuando la cepa posee dicha polimerasa, la proteína recombinante puede llegar a constituir 50% de las proteínas expresadas por la bacteria.

Con el vector pET12a (Lámina A) el péptido líder, a saber, la secuencia comprendida entre el inicio de la transcripción y el comienzo del gen subclonado, es un péptido señal. Este implica que la proteína recombinante se dirige al periplasma, lo que facilita su correcto plegamiento y evita que aparezca como cuerpos de inclusión. Esta característica se simboliza por ompT.

Con el vector pET3d la secuencia líder contiene 11 aminoácidos del extremo amino terminal del péptido producto del gen 10 del bacteriófago T7. Este fragmento es reconocido por anticuerpos T7•Tag, suministrados por Novagen, lo que permite seguir la expresión y purificación del gen subclonado. Esta característica se simboliza por T7•TagTM.

El plásmido **pGEM7-T** (Lámina A) proviene de otro vector de Promega, el pGEM-5Zf(+), que ha sido cortado por *EcoR* V y añadido una timidina en 3' en ambas extremidades. Este vector se emplea para clonar directamente fragmentos de ADN amplificado por PCR, puesto que ciertas polimerasas termoestables añaden una deoxiadenina en la extremidad 3' del ADN amplificado. pGEM7-T contiene el origen de replicación del fago filamentoso f1. El plásmido contiene los promotores de las RNA polimerasas T7 y SP5 en ambos lados del sitio de clonaje, que incluye sitios únicos para las enzimas de restricción *Apa* I, *Aat* II, *Sph* I, *Nco* I, *Sac* II, *Spe* I, *Not* I, *Pst* I, *Sal* I, *Nde* I, *Sac* I, *BstX* I y *Nsi* I. Este se ubica dentro de la región codificante del α -péptido de la β -galactosidasa, que permite seleccionar plásmidos recombinantes. En efecto, células transformadas y cultivadas en un medio complementado con el inductor IPTG y con X-gal darán colonias azules si la secuencia de lectura del gen *LacZ* no está interrumpida por un inserto. En el caso contrario, producirán colonias blancas. En la práctica, los insertos con más de 500 pb tienden a generar colonias azuladas (Murray *et al.*, 1993). En este caso, para identificar las colonias recombinantes se tiene en cuenta del diámetro de éstas. En general, las colonias con actividad β -galactosidasa crecen poco relativamente a aquéllas que carecen de esta actividad. Tras una noche de crecimiento, las colonias negativas son puntitos azules, mientras las positivas tienen aproximadamente un milímetro de diámetro.

El plásmido **pGEX** (Lámina A), comercializado por Pharmacia, es un vector de expresión empleado para obtener proteínas conjugadas a las glutatión S-transferasas (GST). Consta de un

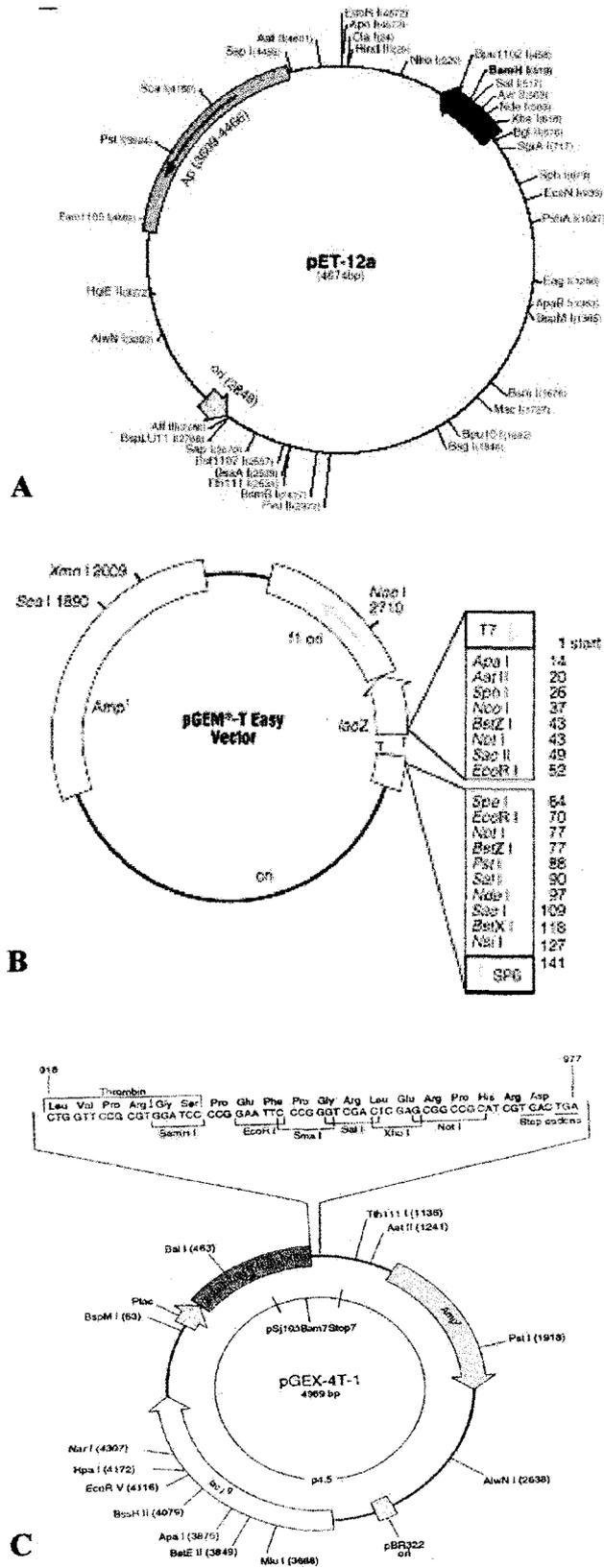


Lámina A.
Los plásmidos
utilizados:
pET12a (A), pGMT
(B) y
pGEX-4T-1 (C).

promotor *tac* y un operador *lac*, que permite un alto nivel de expresión químicamente inducible mediante IPTG. El vector contiene un sitio de inicio de la traducción, seguido del gen GST, un sitio de proteólisis, y un sitio de clonaje múltiple (MCS) con codones de parada detrás del MCS. Contiene un gen *lac*^f interno, útil para cualquier cepa de *E. coli*. Este gen tiene una mutación en su promotor que produce una mayor cantidad de represor *lac* I. El vector posee un gen *amp*^r que le confiere resistencia frente a ampicilina, así que un origen de replicación para *E. coli* (*ori*). En este trabajo se emplea el vector de la serie, pGEXT-4T-1. El gen fue clonado entre los sitios BamHI y Sal I del MCS.

Resumen de las principales características de los plásmidos:

Vector	Promotor	Líder	Sitio proteasas	Sitios de clonación		Secuencias para oligos
				ATG	Fusión	
pET 12a	T7	OmpT	Señal para peptidasa	Nde I	Bam HI	Promotor T7 Terminator T7
pET 3d	T7	T7•Tag TM	ninguna	Nco I	Bam HI	Promotor T7 Terminator T7
PGEM7-T	T7			Múltiple		pUC/M13F pUC/M13R
PGEX-4T-1	<i>tac</i>		Trombina	Múltiple		5'·pGEX S P 3'·pGEX S P

3. 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:

ClNa	10 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Para preparar el medio sólido (LBA), se adiciona al LB Bacto-Agar al 1.5% (p/v).

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.

Los reactivos utilizados para hacer crecer bacterias, y para aislamiento y manipulación de ADN y de ARN, fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 1 atm de presión durante 30 minutos, excepto las soluciones de IPTG y de ampicilina, que lo fueron mediante filtración esterilizante a través de filtros de tamaño de poro de 0.45 µm.

4. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

La transfección de ADN a células de *E. coli* fue estudiada por Cohen *et al.* (1972), a partir de las observaciones preliminares de Mandel y Higa (1970), según las cuales la exposición de *E. coli* a Cl_2Ca y otros iones divalentes a temperaturas próximas a 0°C, favorecía la penetración del ADN extraño en la célula. El tratamiento con Cl_2Ca origina un estado especial de la célula denominado competencia.

Para preparar células competentes se inoculan 3 ml de LB con una colonia bacteriana fresca y se deja crecer durante 16 horas a 37°C con agitación. Se inoculan 250 ml de LB con 1.5 ml del cultivo, y se deja crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar la densidad óptica 0.4-0.6 a 600 nm, lo que corresponde a la fase temprana de crecimiento. A partir de este momento, para mantener la integridad de las bacterias, conviene trabajar en frío y usar pipetas, puntas y tubos fríos.

Se transfiere el cultivo a tubos de 50 ml y se deja en hielo 10 minutos. Se recogen las células por centrifugación a 3000 g durante 10 min, y se resuspenden en 30 ml de una solución de Cl_2Ca 0,1 M fría. Se incuba 40 min en hielo, y se vuelve a recoger por centrifugación 10 min a 2100 g. Se resuspende con 6 ml de Cl_2Ca 0.1 M y glicerol al 15% (v/v). Se hacen alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf, se congela en baño de N_2 líquido y se almacena a -80°C.

5. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se añade de 0.1 a 1 µg de ADN plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes previamente descongelada en hielo, y se deja incubar en hielo durante 1 hora. Posteriormente se las somete a choque térmico (1.5 min a 42°C) para facilitar la penetración del ADN, dejándose nuevamente en hielo durante 10 min. A continuación se añaden 800 µl de LB y se incuba media hora a 37°C. Finalmente, se siembran de 2 a 200 µl del cultivo en placas selectivas de LBA-ampicilina, y se deja crecer toda la noche a 37 °C.

6. TRANSFORMACIÓN EN GEL

Para una transformación a partir de una solución de ligación en gel (ver apartado III. 10), se añaden a la mezcla de ligación 40 μ l de tampón TNE (Tris-ClH 50 mM pH 7.5, ClNa 100 mM, EDTA 5 mM) y 40 μ l de tampón 10x TCM (Tris-ClH 100 mM pH 7.5, Cl₂Ca 100 mM, Cl₂Mg 100 mM). Se calienta 10 min a 65 °C. Se enfría 5 min. Agregamos 200 μ l de bacterias competentes, se mezcla cuidadosamente incubándose 1 hora en hielo. Se somete a choque térmico (1.5 min a 42°C), y se procede como anteriormente.

III. MANIPULACIÓN DE ACIDOS NUCLÉICOS

1. PREPARACIÓN DE ADN GENÓMICO DE TEJIDO FOLIAR.

Para preparar ADN genómico de plantas se utilizó el método basado en el tratamiento con el detergente monoiónico bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que ayuda a lisar las células vegetales y extraer los ácidos nucleicos. Estos se recuperan luego por precipitación alcohólica (etanol o isopropanol). Con este método se obtiene ADN con una pureza menor que cuando se usa cloruro de cesio, pero más adecuado para las siguientes manipulaciones.

1. Colocar 3 g de hojas en un mortero al cual se añade nitrógeno líquido, y reduciendo el tejido vegetal a un fino polvo. Se añaden 15 ml del tampón de extracción previamente calentado a 95°C, y se sigue moliendo con el pistilo.
2. Transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml, y se incuba en baño María a 56 °C durante 20-30 min, agitando suavemente. Luego se deja enfriar a temperatura ambiente.
3. Se añaden 15 ml de cloroformo / alcohol isoamílico (24/1 v/v) mezclando hasta formar una emulsión. Luego se centrifuga a 8000 g durante 10 min a 20°C.
4. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo, y se añade 1/10 volumen (1.5-2 ml) de CTAB al 10 % (p/v) en ClNa 0.7 M.
5. Se repite la extracción con 15 ml de cloroformo / alcohol isoamílico, y se proceda como anteriormente.
6. Transferimos la fase acuosa a un tubo de vidrio Corex estéril, y se añade un volumen igual de tampón de precipitación, y se deja estar 20 a 30 min a temperatura ambiente. Se recoge el precipitado con una varilla de vidrio y se transfiere a un tubo de centrifuga.

7. Se centrifuga a 1500 g durante 10-15 min. El sedimento contiene ADN complejado con CTAB. En una buena preparación el sedimento debería ser blanco o ligeramente colorado. Si fuera amarillo (presencia de polifenoles), se procede a un tratamiento con PVPP.
8. Resuspender el precipitado en tampón TE o en agua, calentar a 65 °C durante 5 min. Si hubiera mucho ADN se va recogiendo lo disuelto, y agregando más tampón de extracción, reuniéndose las fracciones extraídas.
9. Se precipita el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) dejando estar desde 30 min hasta toda la noche, si fuera necesario.
10. Para eliminar los restos de CTAB y sales, se lava el precipitado 2 veces con etanol al 65 % y 2 veces con etanol al 85 %. Luego se seca el sedimento al vacío.
11. Se resuspende el ADN en TE y se reparte en alícuotas de 100 µl.
12. Se incuba la solución de ADN con RNasa a 37 °C durante 1 hora; (RNasa A: 100 µg / ml; RNasa T1: 10 µg / ml).

Reactivos:

Tampón de extracción (2X):

CTAB al 2%
Tris-ClH 100 mM, pH 8
EDTA 20 mM, pH 8
ClNa 1.4 M
PVP al 1 %
2-mercaptoetanol al 2%

Tampón de precipitación:

CTAB al 1 %
Tris-ClH 50 mM, pH 8
EDTA 10 mM, pH 8

TE alta sal:

Tris-ClH 10 mM pH 8
EDTA 1 mM pH 8
ClNa 1 M

2. PREPARACIÓN DE ARN DE TEJIDO FOLIAR

2.1. Extracción de ARN total

Todo el material utilizado fue tratado previamente para evitar contaminaciones con ARNasas. Se empleó el siguiente protocolo:

1. Se colocan aproximadamente 500 mg de tejido foliar en un mortero enfriado previamente a -80°C , o con nitrógeno líquido. Se agrega al mismo más nitrógeno líquido, y se reduce el tejido a un fino polvo. Para lograr este punto y evitar que se descongelara prematuramente, a veces es necesario agregar más nitrógeno líquido.
2. Agregar al mortero 5 ml de solución desnaturante (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, N-lauril sarcosina 0.5% p.v, 2-mercapto etanol 0.1M), y se homogeneiza el tejido.
3. Se transfiere el homogenado a un tubo de polipropileno. Se agrega 0.1 ml de acetato de sodio 2M pH 4, y se mezcla suavemente por inversión. Adicionar 1ml de fenol saturado en agua, se mezcla suavemente, y se agregan 0.2 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1 v.v. Se mezcla suavemente y se incuba la suspensión 15 min a 4°C .
4. Una vez centrifugado 20 min a 10000 g a 4°C , se transfiere la fase acuosa superior a un tubo limpio.
5. Se precipita el ARN agregando 1 volumen (5 ml) de isopropanol. Se incuba a -20°C durante 30 min, se centrifuga 10 min a 10000 g a 4°C , descartándose el sobrenadante.
6. Disolver el pellet de ARN con 1 ml de solución desnaturante, transfiriendo la suspensión a un tubo de Eppendorf de 2 ml.
7. Se precipita el ARN con 1 ml de isopropanol durante 30 min a -20°C , se centrifuga 10 min a 10000 g a 4°C y se descarta el sobrenadante
8. Resuspender el precipitado en etanol del 75%, se mezcla por vortex y se incuba 15 min a temperatura ambiente para disolver las cantidades residuales de guanidina que contaminan el ARN.
9. Se centrifuga 5 min a 10000 g a 4°C , y descartar el sobrenadante. Se seca el precipitado de ARN a vacío durante 5 minutos, y se disuelve en 200 μl de agua libre de ARNsas. Se incuba 15 min a 60°C , conservándose la solución de ARN a -80°C .

2.2 Extracción de ARN mensajero

Se utilizó el kit de Boehringer Mannheim, con el que se aísla ARN mensajero poliadenilado utilizando oligo-dT biotina y partículas magnéticas de estreptavidina. Se siguieron las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Se utilizó el método de extracción con tiocianato de guanidina debido al alto contenido de ARNasa de los tejidos vegetales.

El protocolo es el siguiente:

1. Se colocan 100 a 500 mg de tejido en un mortero enfriado previamente. Se añade nitrógeno líquido y se reduce el tejido a un fino polvo. Sin dejar que se descongele se agrega tampón de lisis (Tris-HCl 0.1M pH 8, tiocianato de guanidina 4 M, DTT 1% p.v, laurilsarcosina 0.5% p.v) en una proporción de 400 µl de tampón por cada 100 mg de tejido. Se homogeneiza éste y se pasa 4 veces el homogenado por aguja y jeringa estériles. El homogenado se deposita en tubos Eppendorf de 2 ml, centrifugándose 30 seg a 11000 g.
2. Se pasan 400 µl del sobrenadante a otro tubo conteniendo 1.1ml de tampón de dilución (Tris-HCl 0.1M pH 7.5, CILi 5 M, EDTA 0.5 M, y se ajusta finalmente a pH 8-8.5).
3. Agregamos 1.5 µl de oligo-dT biotina y se dejan los tubos en mezcla frigorífica de CINA mezclado con hielo granizado.
4. Se preparan las partículas magnéticas disponiendo alicuotas de 150 µl de la suspensión de éstas en nuevos tubos. Estos se colocan en el separador magnético y se descarta el líquido de conservación. Las partículas se lavan una vez con tampón de lisis suministrado con el kit. Se vuelven a separar y se descarta el tampón de lisis. Sobre los tubos con las partículas se vuelcan los extractos con oligo-dT biotina. Se mezcla suavemente hasta dispersar las partículas. Se dejan en la mezcla frigorífica 5 min y 3 min en el separador, descartando el líquido sobrenadante.
5. Se lava 3 veces con el tampón de lavado provisto por el kit, separando las partículas y descartando el líquido cada vez. Se resuspenden las partículas en 25 µl de agua libre de ARNasas, y se calienta a 65°C 2 min.
6. Se separan las partículas y la solución de ARNm se transfiere a un nuevo tubo, conservándose a -80°C hasta su uso.
7. Las partículas magnéticas se pueden reutilizar dos veces más. Para ello, luego de quitar la solución de ARNm, se resuspenden en 100 µl de agua libre de ARNasas. Se calienta 2 min a 65°C. Se separan las partículas, se descarta el agua y se resuspenden en 150 µl del tampón de conservación suministrado con el kit.

3. PREPARACIÓN DE ADNc POR AMPLIFICACIÓN DE MOLDE (PCR).

Material y Métodos

Para amplificar fragmentos de ADN, secuenciar, e introducir sitios de restricción, se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988; Innis *et al.*, 1990; Arnheim, 1990; McPherson *et al.*, 1992), que permite copiar un fragmento de ADN o ARN de manera exponencial. Consiste en el apareamiento de dos oligonucleótidos que actúan como cebadores o primers a ambos lados del fragmento que se desea amplificar, y repetir ciclos de calentamientos y enfriamientos para sucesivamente obtener la desnaturalización del ADN, el acoplamiento de los cebadores con el molde, y la polimerización del fragmento de ADN. Esta reacción es posible gracias al empleo de una ADN polimerasa extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*, conocida como Taq-polimerasa, que es capaz de soportar repetidas incubaciones a temperaturas próximas a 95 °C sin desnaturalizarse ni disminuir significadamente su actividad. El termociclador empleado para el desarrollo del presente trabajo ha sido el Perkin-Elmer Geneamp 2400.

Las reacciones de amplificación se pueden hacer con fines analíticos o preparativos. Para llevar a cabo la reacción, se mezclan los componentes en las condiciones siguientes:

Componente	Volumen	Concentración final
10X Tampón con Mg ⁺⁺	5 µl	1 X
dNTP (solución de los 4 dNTP al 1.25 mM cada uno)	8 µl	200 µM cada dNTP
Cebador #1, 10 µM	2.5 µl	0.5 µM
Cebador #2, 10 µM	2.5 µl	0.5 µM
ADN molde		1-4 ng de ADN
Taq-polimerasa	0.5 µl	2.5 unidades
Agua estéril	csp 50 µl	

Se programa el termociclador para ejecutar las tres etapas de la reacción, y se establece el número de ciclos según la concentración de ADN que se pretende obtener, puesto que, en cada ciclo se dobla la cantidad de ADN de partida.

La primera etapa (5 minutos a 95 °C) consiste en la desnaturalización completa del molde, durante la cuál se separan las dos hebras del ADN;

La segunda etapa conste de tres fases:

1. Desnaturalización del complejo molde-oligo amplificado (1 min, 95 °C).
2. Apareamiento del cebador con el molde. La temperatura de hibridación o T_m (melting temperature) depende de la proporción de adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) del cebador. Se establece la T_m por la fórmula: $T_m = 2(A + T) + (C + G)$. Se excluye del cálculo la porción del cebador que no se aparee (sitios de restricción, etc.). En general, es recomendable utilizar una temperatura de apareamiento 5 °C inferior a la T_m de los cebadores.

3. Extensión del cebador sobre el molde. Típicamente 1 min a 72 °C, aunque el tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento que se pretende obtener.

La tercera etapa es la de extensión final (5 min a 72 °C) para rellenar los posibles huecos y completar las cadenas de ADN que hayan podido quedar a medio terminar

La reacción de polimerización en cadena en gel de bajo punto de fusión obedece a los mismos criterios descritos anteriormente. La concentración final de agarosa no debe superar el 1.5 % del medio reaccional.

4. PREPARACIÓN DE ADNc POR RT-PCR

4.1. RT-PCR

Se han desarrollado numerosas técnicas para medir la expresión de genes en células y tejidos. Se pueden mencionar entre las más usadas la transferencia, previa electroforesis en geles de poliacrilamida, del ARN a membranas de nylon o nitrocelulosa, y la hibridación con una sonda de ADNc marcada, seguida de revelado (Northern blot); síntesis de ADN copia (ADNc) a partir de un molde de ARN mediante una transcriptasa reversa, acoplada a la amplificación por PCR del fragmento obtenido (RT-PCR), ensayos de protección frente a RNasas, hibridación *in situ*; "primer extension"; "dot blots", etc. De todas ellas la técnica de RT-PCR es considerada la más sensible y versátil. Puede ser usada para determinar la presencia o ausencia de un transcrito, para estimar los niveles de expresión de un gen dado e, incluso para clonar ADN sin necesidad de una librería de ADNc. Aunque adolece de una falta de precisión a la hora de calcular los niveles exactos de expresión de un gen, debido principalmente a la naturaleza exponencial de la amplificación, es muy apropiada para comparar las cantidades relativas de un mARN específico en diferentes tejidos, o en un mismo tejido en distintas condiciones fisiológicas. Para llegar a este objetivo se necesita una cuidada puesta a punto de la técnica, que comienza con el diseño de los oligonucleótidos y finaliza con la determinación del programa más adecuado en el equipo de PCR.

Generalmente para la primera reacción, la síntesis de ADNc, se utilizan las transcriptasas reversas de AMV (avian myeloblastosis virus), o de MMLV (Moloney murine leukemia virus) y para la segunda, la amplificación por PCR, las DNA polimerasas de *Thermus aquaticus* (Taq) o de *Thermus flavus* (Tfl). La mayoría de los protocolos de RT-PCR en los que se usa AMV RT y Taq polimerasa, recomiendan la inactivación de la transcriptasa reversa después del primer paso mediante dilución, con el objeto de eliminar los efectos inhibitorios de la primera sobre la segunda. En el presente trabajo se ha optado por la utilización del kit de Promega "Access RT-PCR System" que incorpora AMV RT para el primer paso de síntesis de ADNc, y ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl) para la amplificación, sobre la que, aparentemente, la AMV RT no tiene efectos negativos. Este sistema incluye un único tampón, optimizado para ambas reacciones, lo que permite realizar la reacción completa de RT-PCR de una sola vez en un único tubo. El evitar la necesidad de diluciones redonda en un menor tiempo de mano de obra, y en la obtención de resultados con menor error experimental.

4.2. Diseño de oligonucleótidos

La aplicabilidad de la técnica de RT-PCR tropieza con dificultades cuando se trata de genes de una longitud mayor de 1kb, como es el caso de los correspondientes a la FBPasa. En estos casos es apropiado utilizar oligonucleótidos de alrededor de 30 bases, complementarias a secuencia que se quiera amplificar.

Secuencias oligonucleotídicas utilizadas:

Nombre	Sentido	Secuencia
FBP-N	(+)	5' ATGGCTGTGAAGGAAGCAACTAGTGAGAC 3'
FBP-C	(-)	5' TTAAGCTAAGTACTTTTCAACCTTCTCCAC 3'
FC4	(+)	5'TGGTTGCTGCTGGTTATTGTATG 3'
FC5	(-)	5' CATACAATAACCAGCAGCAACC 3'

4.3. Condiciones operatorias

Mezcla de reacción para un volumen total de 25 µl:

Tampón de Reacción 5x	5 µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM	0.5 µl
Digoxigenina-11-dUTP 1 mM	0.25 µl
SO ₄ Mg 25 mM	1 µl
AMV RT (5 unidades/µl)	0.5 µl
Tfl DNA polimerasa	0.5 µl
H ₂ O libre de Rnasas	10.25 µl
Inhibidor de Rnasas (40 unidades/µl)	1 µl
Molde de mRNA (aproximadamente 50 ng/µl)	5 µl

La adición de digoxigenina a la mezcla de reacción, para que fuera incorporada durante la amplificación del fragmento de interés, evitó la necesidad de realizar hibridaciones con sondas marcadas para efectuar el revelado.

Programa:

	Reacción	Temperatura	Tiempo
1 paso	Transcripción reversa	48°C	45 min
	Desnaturalización	94°C	2 min
	Desnaturalización	94°C	30 seg

40 ciclos	Hibridación	58°C	2 min
	Polimerización	68°C	3 min
1 paso	Polimerización	68°C	10 min
	Conservación	4°C	

4.4. Analisis de los productos de RT-PCR

Concluida la reacción de RT-PCR se realizó la electroforesis en gel de agarosa (ver II.6) al 1.5% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA Na₂·2H₂O 2 mM, pH 8.5). En cada pocillo se depositó 1 µl de la solución de ADNc producto del RT-PCR y 5 µl del tampón de carga (azul de bromofenol al 0.3% p/v en glicerol al 30% v/v). El desarrollo se llevó a cabo bajo una tensión de 10 volt/cm.

Finalizada la electroforesis se realizó la transferencia neutra del ADN a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer), durante una noche utilizando tampón SSC 20x (ClNa 3 M, citrato de Na₃·3H₂O 0.3 M, pH 7.0). El gel se limpió durante 30 seg en el tampón SSC, y se depositó sobre 3 tiras de papel Whatman 3 previamente humedecidas, con los extremos de una de ellas sumergidos en el tampón. Sobre el gel se colocó la membrana también impregnada con tampón, y encima de esta se depositaron tres tiras de Whatman 3 humedecidas. Finalmente, se depositó un bloque de 15 cm de grosor de papel absorbente. Sobre el papel absorbente se colocó un peso aproximado de 2 kg. El tampón SSC ascendía haciendo pasar el ADN del gel a la membrana de nylon cargada positivamente, donde quedaba fijado.

Para visualizar las bandas de ADN se utilizó el kit de Boehringer de detección de digoxigenina por reacción colorimétrica de la fosfatasa alcalina. Se empleó el siguiente protocolo, en relación a una membrana de 10x10 cm:

1. Se lavó la membrana 1 min en tampón-1 (ácido maléico 0.1 M, ClNa 0.15 M pH 7.5) adicionado con 0,3% (v/v) de Tween 20.
2. Desechado el líquido de lavado, se incubó la membrana durante 30 min con 100 ml de tampón-2 (solución de bloqueo del kit al 10%, p/v, en tampón 1).
2. Se descartó el tampón 2 y se incubó la membrana en 20 ml de solución de conjugado anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina 150 mU/ml en tampón 2.
3. Desechamos la solución y se lavó la membrana 2 veces 15 min con 100 ml de tampón 1, y una vez 2 min con tampón 3 (Tris-ClH 100 mM, ClNa 100 mM, Cl₂ Mg 50 mM, pH 9.5).
4. Se descartó el líquido de lavado y se depositaron sobre la membrana 10 ml de solución de sustrato (200 µl de solución de NBT/BCIP al 67% en dimetil sulfóxido, por cada 10 ml de tampón 3). Se permitió el desarrollo del color en oscuridad sin agitación.
5. Se detuvo la reacción sumergiendo la membrana en 50 ml de tampón 4 (Tris-ClH 10 mM,

EDTA 1mM pH 8.0) durante 5 min. Finalmente, la membrana se dejó secar al aire y se procedió a su densitometría.

La densitometría y cuantificación de las bandas resultantes se realizaron en un equipo (averiguar modelo) o bien utilizando un scanner y el programa QuantiScan. En ambos casos se consideró el área debajo de los picos de absorbancia para realizar los cálculos.

5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO: MINIPREP

En este trabajo se utilizó el procedimiento de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979; Birnboim, 1983) para aislar plásmidos de las bacterias. Básicamente consiste en el tratamiento del cultivo con una solución de OHNa y SDS para lisar las células y desnaturalizar las proteínas (SDS) y el ADN cromosómico y plasmídico (OHNa). A continuación se neutraliza la mezcla con acetato potásico que provoca la renaturalización y solubilización del ADN plasmídico. La mayoría del ADN cromosómico y las proteínas precipitan, eliminándose por centrifugación. Finalmente, se concentra el ADN plasmídico precipitándolo con etanol.

Se centrifugan 3 ml de cultivo en fase estacionara en una centrifuga de mesa, y se resuspenden las células en 100 μ l de solución I (Tris-ClH 50 mM pH 7.6, EDTA 10 mM), incubándose 5 min a temperatura ambiente. Se adicionan 200 μ l de solución II (OHNa 0.2%, SDS 1%), se mezcla y se incuba en hielo 5 min. Se neutraliza el lisado añadiendo 150 μ l de solución III (AcOK 3M, AcOH 1.8 M). Mezclamos bien y se incuba 10 min en hielo. Los restos celulares se eliminan por centrifugación durante 10 min. Se transfiere el sobrenadante a un tubo Eppendorf con 200 μ l de isopropanol frío, se agita y se deja precipitar 15 min a 4 °C. Alternativamente se precipita el ADN plasmídico añadiendo al sobrenadante 1 ml de etanol absoluto. Se centrifuga 10 min y el precipitado se lava con etanol al 70% frío. Se seca el sedimento y se resuspende en 50 μ l de TE con ARNasa (Tris-ClH 10 mM pH 7.6; 100 μ g/ml ARNasa A).

6. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis horizontal en geles de agarosa (McDonell *et al.*, 1977), se utiliza para identificar y purificar fragmentos de ADN. Esta técnica se fundamenta en el hecho que, a pH básico o cerca de la neutralidad, la relación carga/masa de una molécula de ADN es constante e independiente de su longitud. Al someter una mezcla de fragmentos de ADN a un campo eléctrico, cada cual migrará de forma inversamente proporcional a su tamaño, lo que permite calcular el tamaño de los fragmentos por referencia a unos marcadores de peso molecular. En el caso de ADN circular, como un plásmido, la migración dependerá también del grado de enrollamiento. Migrará más el fragmento que tendrá un menor enrollamiento.

Los dos tampones generalmente empleados en electroforesis de ADN son el Tris-Acetato-EDTA (TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM), y el Tris-borato-EDTA (TBE: Tris-borato 89

mM, EDTA 1 mM). El pH de ambos es básico y en consecuencia, el fosfato del ADN tendrá una carga neta negativa y migrará hacia el ánodo. A pesar de esta similitud, cada tampón tiene sus características propias, de las que conviene sacar provecho. En electroforesis analítica ambos tampones, 1X TAE o TBE (1X o 0.5X), dan el mismo resultado con ADN de 1 a 12 kb. Con ADN más largo el TAE, combinado a un bajo voltaje (1 a 2 V/ cm), da una mejor resolución, mientras que los fragmentos de ADN menores de 1 kb se separan mejor en el TBE. En electroforesis preparativa se recomienda utilizar el TAE. En efecto, el borato del TBE reacciona con los grupos hidróxilos del polisacarido de la agarosa formando un complejo tetrahidro-borato no covalente.

Rutinariamente se prepararon geles de agarosa al 0.8% (p/v) en TAE para analizar plásmidos, al 1.5% para fragmentos intermedios (0.3 a 2 kb), y al 2% para los fragmentos menores de 0.3 kb. Se empleó agarosa de bajo punto de fusión NuSieve GTG (FCF Corporation) cuando se deseaba realizar reacciones enzimáticas en gel. En este caso se emplea un tampón TAE con bajo concentración en EDTA (0.1 mM), puesto que a mayor concentración el EDTA reduce el nivel de Mg^{2+} libre, que es un cofactor imprescindible de muchas reacciones enzimáticas.

La electroforesis se lleva a cabo disponiendo el gel solidificado en una cubeta para electroforesis horizontal. Se carga en cada pocillo una mezcla (5:1) de la muestra con el tampón de carga (azul de bromofenol al 0.3% en glicerol al 30%), y se corre la electroforesis a un voltaje de 5 a 10 V/cm. Para visualizar el ADN se tiñe el gel por inmersión en una solución de bromuro de etidio de 1 μ g/ml durante 10-15 min. Se lava el gel con agua, y se expone a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador.

Como referencia de peso molecular se emplearon los Marcadores nº X de Boehringer Mannheim, que incluyen fragmentos de 0.13 a 12.2 kb. Ocasionalmente se emplearon los marcadores de LABGEN, que incluyen fragmentos de 0.25 a 10 kb.

7. EXTRACCIÓN DE ADN DE GELES DE AGAROSA

La extracción de ADN de un gel de agarosa con fenol se basa en el hecho de que éste impide la formación del gel, ya que los monómeros que forma la agarosa son solubles en fenol. Se corta con un bisturí la banda deseada y se dispone en un tubo Eppendorf. Es conveniente que la masa de agarosa no supere los 200 mg por tubo. Cuando el trozo de gel es myor, se reparte en tubos diferentes, combinando el contenido antes de precipitar con etanol o isopropanol. Al tubo conteniendo el gel se le añaden 500 μ l de fenol neutro. Con una varilla de vidrio se fragmenta el gel, agitando vigorosamente al vórtex hasta la obtención de una emulsión. A continuación se sumerge en nitrógeno líquido, lo que descompone los fragmentos de agarosa y libera el ADN en la fase orgánica. Se centrifuga 10 min a temperatura ambiente, y se recupera la fase acuosa que contiene el ADN, a la cual se añade un volumen de fenol:cloroformo (1:1). Se mezcla enérgicamente al vórtex y se centrifuga 5 min. Se recupera de nuevo la fase acuosa y se le añade un volumen de isopropanol frío, y un décimo de volumen de acetato sódico 3 M. Se mezcla y se lleva a -80 °C una media hora para que precipite el ADN. Se centrifuga a 4 °C a 10000 g durante 15 min, se elimina el sobrenadante, y se seca el precipitado a vacío. Se resuspende el ADN en 20

µl de agua estéril.

Caso de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve):

Se corta con un bisturí la banda deseada y se la dispone en un tubo Eppendorf. Se funde la agarosa calentándola a 67°C, 10 min. Se añade un volumen adecuado de TE precalentado a 67 °C, de manera que suministre una concentración de agarosa del 0.5 %. Agregamos un volumen de fenol neutro, y se mezcla enérgicamente al vórtex. Se centrifuga 3 min a temperatura ambiente, recuperándose la fase acuosa conteniendo el ADN. A continuación se procede como anteriormente.

8. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

Para evaluar la concentración y la pureza de una muestra de ADN se emplea el método espectrofotométrico descrito por O'Hara-Mays y Capwell (1993). Consiste en determinar la absorbancia de la solución de ADN a 340, 280, 270 y 260 nm. La concentración de la muestra se calcula sobre la base de una absorción de $A_{260} = 1$ para soluciones de 50 µg / ml de ADN de doble hebra. 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. Si es menor de 1.65, la contaminación es con proteínas o fenol. La presencia de fenol en la muestra 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.

9. RESTRICCIÓN DE ADN

Las endonucleasas de restricción más utilizadas en biología molecular son las de tipo II (Fush y Blakesley, 1993). 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. Todas las enzimas de restricción empleadas en este trabajo generan extremos cohesivos, por ser más prácticos a la hora de subclonar insertos en plásmidos.

Las digestiones con las restrictasas se realizaron en las condiciones óptimas que fija 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 de tampón. 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 digiere completamente 1 µg de ADN (habitualmente del fago lambda) en 1 hora en las condiciones de digestiones óptimas.

10. 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 el clonaje molecular, la más empleada es la ligasa del fago T4 debido a su eficacia, permitiendo ligar tanto extremos cohesivos como 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.*, 1982).

Para la ligación de ADN, se parte de plásmido linearizado y del inserto a clonar, ambos cortados con enzimas de restricción compatibles. Estas moléculas se combinan según proporciones variables, no sobrepasando la cantidad final de 300 ng de ADN total. La ligación se lleva a cabo en 10 μ l del tampón de ligasa adecuado suministrado por el fabricante conteniendo ATP necesario a la actividad de la ligasa. Se utiliza 1 unidad de ligasa del fago T4, y se incuba toda la noche a 12-15 °C.

Para la ligación en gel de bajo punto de fusión, se procede de la manera siguiente:

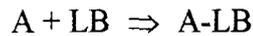
Después de la electroforesis de los fragmentos a enlazar, se funde la agarosa conteniendo el ADN en bloque de calor 10 min a 65 °C. Se calienta 9 μ l de agua en un tubo de Eppendorf durante 1 min a 65 °C, y se transfiere a este 2 μ l de vector y 6 μ l de inserto. Se deja estar 2 min a temperatura ambiente, añadiéndose 2 μ l de tampón de ligación (10X). Se adiciona 1 μ l de ADN ligasa T4, y se incuba 16 horas a 12-15 °C.

11. SECUENCIACIÓN DE ADN

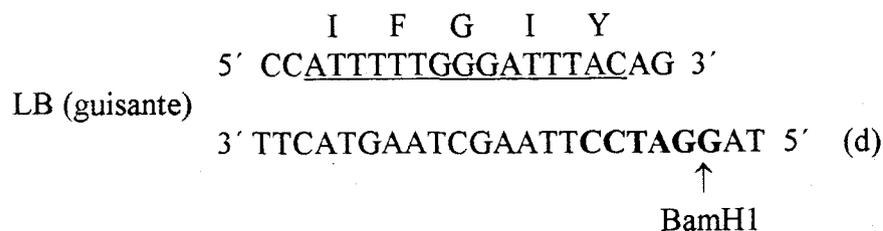
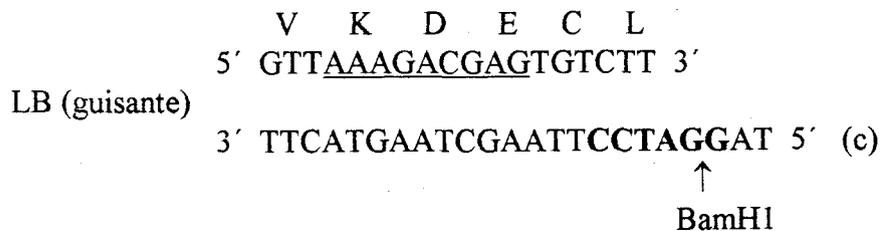
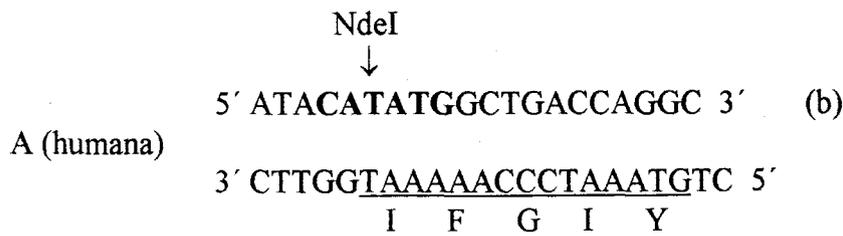
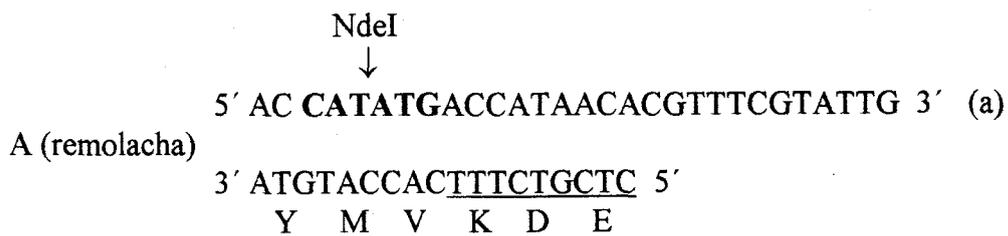
La secuenciación de los plásmidos obtenidos en este trabajo han sido realizado por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra que dispone de un secuenciador automático ABI-Prism. El método utilizado es el de terminación de cadena de Sanger *et al.*, (1977), llamado también método "dideoxi". Consiste en la realización de una copia complementaria del ADN de cadena sencilla empleando para ello una ADN polimerasa y un cebador. El método aprovecha la capacidad de la ADN polimerasa que reconoce como sustrato a los 2',3'-didesoxirribonucleótidos (ddNTPs), los cuales, por carecer del grupo -OH en 3', bloquea la reacción.

12. CONSTRUCCIÓN DE FBPasas QUIMÉRICAS

Se construyeron dos tipos de genes quiméricos para FBPasa. En el tipo X1 se enlazó la mitad N-terminal del gen codificante para la FBPasa citosólica de remolacha azucarera (aminoácidos 1 a 134) (Harn and Daie, 1992), o del gen que codifica a la FBPasa humana (aminoácidos 1 a 143)(El-Maghrabi *et al.*, 1993)(A), con la mitad C-terminal (aminoácidos 151 a 357) del gen codificante para la FBPasa cloroplastídica de guisante (Carrasco *et al.*, 1994)(LB). Este último fragmento es portador, en el extremo 5'-terminal, de la secuencia nucleotídica que codifica el denominado "lazo 170" (aminoácidos 151 a 178)(L), no existente en la FBPasa citosólica, en el que se encuentran las cisteínas reguladoras de la FBPasa cloroplastídica (C-154, C-174, C-179):



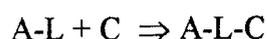
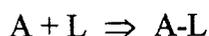
Para ello se amplificaron por PCR ambos fragmentos de forma independiente, usando como moldes los genes correspondientes a las FBPasas citosólica de remolacha o humana, y el codificante para la enzima cloroplastídica de guisante, y como cebadores las siguientes parejas de oligonucleótidos sintéticos, complementarios de los extremos 5' y 3' de ambos fragmentos:



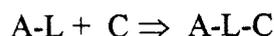
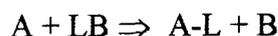
en donde aparecen en negritas las zonas de restricción incluidas en el extremo 5' del fragmento A, y en la zona 3' del fragmento LB. Posteriormente los fragmentos A y el fragmento LB se ligaron mediante un nuevo PCR, utilizando como moldes ellos mismos, y como cebadores los

oligonucleótidos (a) y (c), o (b) y (d), correspondientes respectivamente al extremo 5' de A (remolacha o humana), y 3' de B (guisante). En los oligos descritos se señalan los aminoácidos codificados por las zonas de unión de ambos fragmentos, apareciendo subrayadas las secuencias complementarias de los lugares de solapamiento. Finalmente, la quimera resultante se clonó en el vector de expresión pET-12a via las zonas de restricción comunes arriba indicadas.

En la construcción quimérica X2 se insertaron en la zona correspondiente del gen codificante para la FBPasa citosólica de remolacha azucarera y de la FBPasa humana, los codones que codifican el "lazo 170" de la FBPasa cloroplastídica de guisante. Ello se puede llevar a cabo enlazando el extremo 3' de la mitad N-terminal de la FBPasa citosólica (A), con el 5' de la zona codificante del "lazo 170" (L), y el extremo 3' de ésta con el 5' de la secuencia que codifica la mitad C-terminal de la FBPasa citosólica (C) de remolacha o humana:

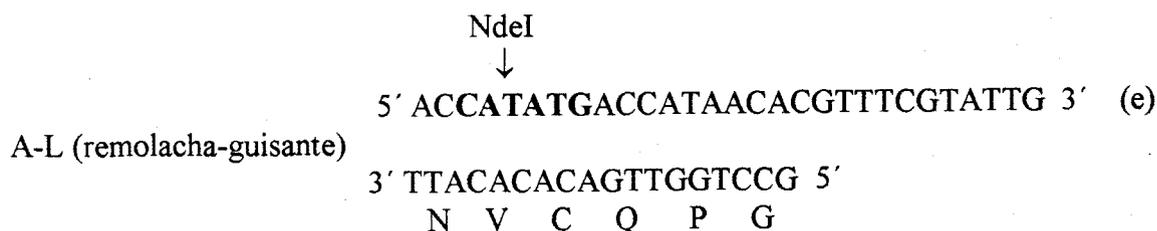


Otra forma de construcción de esta FBPasa quimérica consiste en ligar el extremo 3' de A con el 5' de LB, al igual que se hizo para la construcción de la FBPasa quimérica X1, pero utilizando ahora un cebador que limite la ligación al fragmento regulador L, dejando fuera la zona no reguladora B. Finalmente, se enlaza el lado 3' de L con el extremo 5' de la mitad C-terminal de la FBPasa citosólica (C):

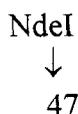


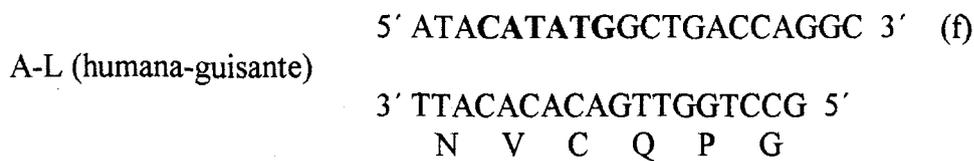
Esta última fue la alternativa que se utilizó. Como hemos apuntado, la construcción X2 se llevó a cabo por partida doble, insertando la zona reguladora de la FBPasa cloroplastídica de guisante (L) tanto en la FBPasa citosólica de remolacha azucarera, como en la FBPasa humana. Los cebadores oligonucleotídicos usados en la construcción de A-L fueron los siguientes:

para A-L (remolacha azucarera) se empleó la pareja de oligonucleótidos:



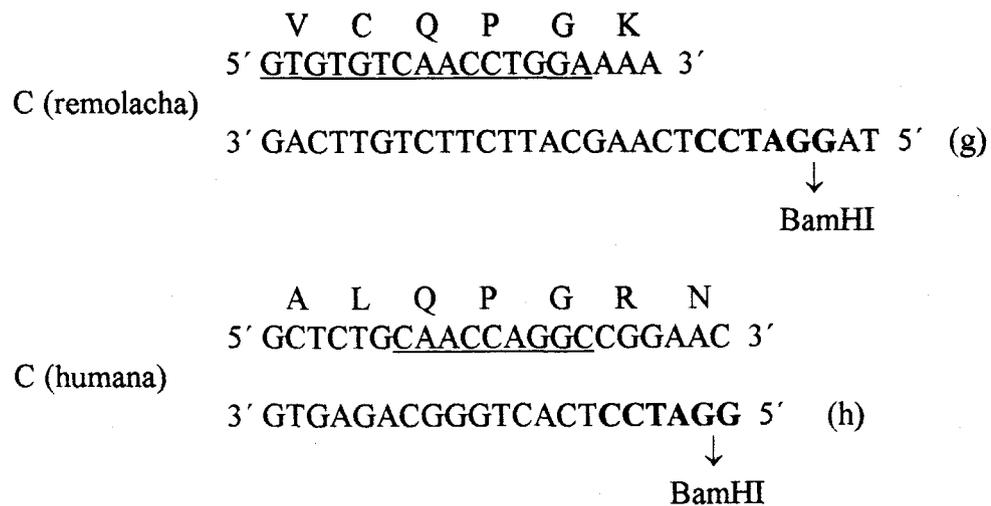
mientras que para A-L (humana) los oligonucleótidos utilizados fueron:





en donde aparecen en negritas la zona de restricción incluida en el extremo 5' del fragmento A. En los cebadores descritos se señalan los aminoácidos codificados por la zona C-terminal de ambos fragmentos A-L. Como moldes se emplearon las secuencias nucleotídicas codificantes para el fragmento A de las FBPasas citosólicas de remolacha y humana, construidas tal como se dice anteriormente, y la secuencia codificante para el fragmento LB de la FBPasa cloroplastídica de guisante, obtenida según mas arriba se dice.

El fragmento C se construyó de forma análoga, tanto de la FBPasa citosólica de remolacha como humana, utilizando como moldes los genes correspondientes a una y otra enzima, y las siguientes parejas de oligonucleótidos:



en donde de nuevo aparecen señaladas en negritas las zonas de restricción incluidas en el extremo 3' del fragmento C, se indican los aminoácidos codificados por la zona de unión de este fragmento, y se subrayan las secuencias complementarias de los lugares de acoplamiento.

Finalmente, los fragmentos A-L y C se fusionaron mediante un último PCR en que se empleó la pareja de cebadores (e) y (g) para la FBPasa quimera de remolacha azucarera, y la pareja (f) y (h) para la enzima quimérica humana. En ambos casos se utilizaron como moldes las correspondientes construcciones de remolacha y humana, A-L y C.

Para un mejor entendimiento de lo que antecede, recomendamos seguir la descripción de las construcciones a la vista de las secuencias nucleotídicas completas de la FBPasa citosólica de remolacha azucarera, de la FBPasa de hígado humano, y de la FBPasa cloroplastídica de guisante, desarrolladas en la Lámina I.2.

13. ANÁLISIS DE ACIDOS NUCLEICOS POR HIBRIDACIONES

Consiste en la transferencia de moléculas de ADN o ARN separadas por electroforesis en gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa (Southern, 1975). 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. Se utilizaron sondas marcadas con digoxigenina. Sobre éste se fija un anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina que reacciona con el lumigen PPD (Boehringer, Mannheim) originando luminiscencia.

El marquaje de la sonda se hizo por random-primed por PCR añadiendo en la mezcla de dNTP el Dig-UTP, y la purificación de la sonda marcada de los residuos no deseables (cebadores, dNTP, etc.) se llevo a cabo por filtración sobre columna Microspin S-300 HR (Pharmacia), preempaquetada con Sephacryl S-300 y equilibrada con buffer TE.

14. ANÁLISIS DE ADN POR SOUTHERN BLOTTING

Se corre una electroforesis en gel de agarosa. A continuación se incuba con un volumen suficiente de solución desnaturalizante (OHNa 0.5 M y ClNa 1.5 M) durante 30 min y agitación suave. Se lava con agua destilada y se incuba en las mismas condiciones otros 30 min con un volumen similar de solución de neutralización (Tris-ClH 1 M, pH 7.5 y ClNa 3 M). Paralelamente, se corta un trozo de membrana de nylon de GeneScreen Plus (NEM) de un tamaño superior al del gel y se incuba durante 15 ó 20 min en tampón SSC 10X (citrato sódico 0.3 M, pH 7 y ClNa 3 M). Posteriormente se monta el siguiente sistema: se corta 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 10X) y otras dos de tamaño similar al gel y todas ellas se humedecen en solución SSC 10X. Se colocan las tiras mayores sobre un cristal, con los extremos sumergidos en SSC 10X 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 1 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 de la solución a través del gel. Se deja transferir durante toda la noche. A la mañana siguiente, la membrana se lava con SSC 2X y se incuba 1 hora a 80°C para fijar el ADN transferido.

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 Manheim) 2 %, N-lauril sarcosina 0.1 % y SDS 0.02 % 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 la sonda marcada (previa desnaturalización) 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 %) durante 10 min, y otras dos a 68 °C durante 15 min cada vez, con la solución de lavado II (SSC 0.1X y SDS 0.1 %). Por último, se lava la membrana con SSC 2X a temperatura ambiente, y se expone a una película durante un tiempo conveniente, tras lo cual se revela por métodos estándar.

IV. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

1. SÍNTESIS *IN VIVO*. DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA

El método utilizado para determinar la vida media de la FBPasa citosólica de guisante fue el mismo desarrollado por Sharawy *et al.* (1990) para la determinación de la vida media de la FBPasa cloroplastídica de guisante. En esencia, se lleva a cabo el marcado *in vivo* de proteínas foliares por incorporación de ^{35}S -metionina a la hoja. Se toman muestras de la misma a distintos tiempos, y se acompleja la proteína a analizar por tratamiento del extracto foliar con su anticuerpo específico. Dicho complejo se aísla con Proteína A-Sepharosa, que fija las inmunoglobulinas tipo G. Aislado el complejo insoluble, y separada la proteína del mismo, se mide la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido. La vida media se calcula en función del tiempo de incorporación y del decaimiento de la radioactividad en la proteína seleccionada.

La metodología seguida fue la siguiente:

1. Se diluyen 500 μCi de ^{35}S -metionina (a. e. ≥ 1000 Ci/mmol, Amersham) en solución al 2% de Tween-80, y se pincelan hojas jóvenes de guisante. Se recogen muestras foliares entre 1 y 27 horas, que se pesan y guardan a -20°C hasta su procesamiento.
2. El material foliar se homogeneiza en tampón PBS ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HNa}_2$ 20 mM pH 7.4, ClNa 150 mM), recogiendo el sobrenadante por centrifugación. De éste se retira una primera alícuota para medir proteínas. Una segunda, de 3 μl , se dispone sobre el trozo de papel Whatman n° 3 para medir la radioactividad total incorporada. Una tercera, de 5 μl , se deposita también sobre otro trozo de papel Whatman para medida de las proteínas precipitables con ácido tricloroacético.
3. El resto del sobrenadante se llevó a un tubo Eppendorf, al que se agregó tampón PBS conteniendo metionina 50 mM y Tritón X-100 al 10%, hasta una concentración final en Tritón de 2%. Se agrega el anticuerpo frente a la FBPasa citosólica, dejándose incubar la mezcla a 4°C durante una noche.
4. Se adiciona Proteína A-Sepharosa a razón de 0.5 mg por μl de la solución de anticuerpo agregada anteriormente, y se incuba 90 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se centrifuga 1 min a 20000-25000 g, lavándose el sedimento de Proteína A-Sepharosa 3 veces con tampón PBS conteniendo metionina 10 mM y 1% de Tritón X-100, y dos veces más con PBS conteniendo metionina 10 mM y 0.1% de SDS. Tras el último lavado se adicionaron 25 μl de tampón de carga para proteínas, calentándose a baño maría durante 5 min. Del sobrenadante de una última centrifugación se tomaron 5 μl en un vial de centelleo, midiéndose la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb mod. 1500.
5. Para un análisis más preciso las muestras se someten a electroforesis en SDS-PAGE. Tras la

tinción y decoloración con Azul Coomassie, se secan los geles sobre papel Whatman, y se procede a una autoradiografía por exposición al Phosphoimager. Con el soporte informático asociado al equipo se densitometraron las bandas obtenidas.

6. La radioactividad incorporada en las proteínas precipitadas con ácido tricloroacético se determinó agregando a la tira de papel Whatman anterior solución de tricloroacético conteniendo 0.1% de metionina, calentando la mezcla a baño maría durante 20 min. Las tiras se lavaron con la misma solución precipitante fría, después con etanol y, finalmente, con éter, dejándose secar. Se colocaron en un vial de centelleo, efectuándose el conteo previa adición de 15 ml de Aquasol. Lo mismo se procedió con la otra tira de papel Whatman, para determinar la radioactividad total.

2. PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES DE HOJAS

Se homogeneizan en frío 0.4 g de hojas congeladas (en nitrógeno líquido, ó a -80°C) con buffer Tris-ClH 25 mM, pH 7.5, Cl_2Mg 5 mM, 2-beta-mercaptoetanol 5 mM y EDTA/ Na_2 0.5 mM, en proporción 1:4 (p:v). Se centrifuga a 15 000 g durante 15 min y se decanta con cuidado de forma cuantitativa sobre una probeta graduada, midiéndose el volumen total de extracto. Sobre éste se puede determinar el contenido de proteínas y medir actividades enzimáticas.

3. SEPARACIÓN DE LA FBPASA CITOSÓLICA DE LA PLASTÍDICA

Las dos isoenzimas son separadas según el método de Sharkey *et al.* (1988). Se aclara el extracto anterior por centrifugación a 15 000 g durante 2 min. Se elimina el precipitado y se añade $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 28% de saturación. Tras disolución se centrifuga como antes. Se recupera el sobrenadante, al cual se añade $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 65% de saturación. Se recupera el precipitado por centrifugación, resuspendiéndolo en un volumen mínimo del tampón de elución ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ - PO_4HNa_2 20 mM, pH 7.5, EDTA 0.4 mM, ClNa 50 mM y DTT 10 mM). Las dos isoformas de FBPasas se separan por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 (Sigma) como sigue. Se añade la solución anterior a un volumen x10 de la suspensión de la matriz preequilibrada en el tampón de elución. Se deja estar el extracto con el gel durante 2 min a temperatura ambiente con agitación suave, y se sedimenta el Sephadex por centrifugación a 200 g durante 30 seg. Se recupera el sobrenadante S1. Se lava el Sephadex con un volumen de tampón de elución igual, recuperándose el sobrenadante S2 como anteriormente. Se repite el lavado una vez más obteniéndose el sobrenadante S3. La FBPasa citosólica se encuentra en S1 y S2.

Se incrementa la fuerza iónica del tampón de elución. Se lava el DEAE-Sephadex dos veces como anteriormente con el tampón de elución (ClNa 1 mM), y se recuperan los sobrenadantes S4 y S5, en los cuales se encuentra la FBPasa plastídica.

4. EXPRESIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN *E. COLI*

Los genes de las proteínas que se deseaban expresar fueron clonados en plásmidos de la familia pET. Se transformaron bacterias de la cepa BL21 (DE3) que porta en su genoma el ADN del bacteriófago lisogénico 8DE3, el cual contiene el gen de la T7-ARN-polimerasa. Este está bajo el control del promotor lacUV5, un derivado del promotor lac, inducible por un sustituto no metabolizable de la lactosa, el IPTG (isopropil-beta-D-galactosido). Al añadir el inductor, se libera el represor, lo que permite a la ARN-polimerasa comenzar la transcripción de la T7-ARN-polimerasa. Ésta se expresa en el periplasma bacteriano y reconoce al promotor T7, con lo que comienza la expresión del ARNm del gen clonado y la correspondiente expresión de la proteína deseada.

La polimerasa T7 es más eficiente que la bacteriana, lo que permite que la proteína recombinante alcance el 50 % de la proteína expresada. Además, los plásmidos de la familia pET son de alto número de copias, lo que contribuye a la eficiencia de este sistema de expresión.

Para expresar proteínas en esas condiciones, se parte de una colonia de BL21(DE3) transformada con el plásmido *ad hoc*, y se incuba en 3 ml de LB suplementado con ampicilina a 37 °C durante unas 8 horas para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. De este último se toman 150 µl y se inoculan en 150 ml de LB con ampicilina, dejando incubar con agitación toda la noche a 37 °C. A la mañana siguiente se reparten los 150 ml del cultivo en tres matraces de 2 litros, conteniendo 1 L de LB con ampicilina cada uno. Se incuba con agitación hasta que se alcance la fase exponencial temprana ($DO_{600\text{ nm}} = 0.8-1$). En este momento se añade IPTG hasta una concentración 100 mM para inducir la expresión de la ARN polimerasa T7 y, por consiguiente, la expresión del gen de la proteína recombinante. Se incuba a 37 °C durante 4 a 6 horas. Finalizada la expresión, se recogen las células por centrifugación a 6000 g durante 10 min, y se almacenan a - 80 °C hasta el momento de la purificación proteica.

5. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

5.1. FBPasa cloroplastídica de guisante

El método utilizado fue el desarrollado por Jacquot *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Las células correspondientes a 5 L de cultivo se resuspenden en 60 ml de tampón Tris-ClH 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 se trabaja en frío. El material insoluble

se elimina por centrifugación de 30 min a 50 000 g, sometándose el sobrenadante a un tratamiento térmico de 60°C durante 5 min. Las proteínas desnaturalizadas se precipitan por centrifugación a 50 000 g durante 20 min, y el sobrenadante es fraccionado con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ entre el 35 y 80 % de saturación, tras lo cual las proteínas precipitadas se disuelven en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.5. Esta solución se pasa por una columna de filtración Sephadex G-50 (Pharmacia) de 4.5 x 60 cm, equilibrada con el mismo tampón. Las fracciones que presentan actividad FBPasa se reúnen, por una columna de intercambio iónico DEAE Sephacel (Pharmacia) de 2.5 x 50 cm, equilibrada con tampón acetato. La elución se lleva a cabo 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 se justan y concentran para, a continuación, pasarlas por una columna de filtración ACA 44 (LKB), equilibrada con el tampón acetato anteriormente descrito. Tras eluirlo con el mismo tampón, se concentran y distribuyen en alícuotas de 1 ml. Se almacenan a - 80 °C.

5.2. FBPasa humana

El método utilizado fue el desarrollado por El-Maghrabi *et al.* (1993). Tras la lisis y eliminación del precipitado, se calienta el sobrenadante a 58 °C durante 3 min, eliminándose las proteínas desnaturalizadas por centrifugación a 50 000 g durante 15 min. Se fracciona el sobrenadante con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ entre el 45 y 75 % de saturación, y se resuspende el precipitado último en un volumen mínimo de tampón ácido malónico 5 mM pH 7.2, DTT 1 mM, EDTA 0.1 mM y PMSF 1.5 mM. Se dializa a temperatura ambiente durante 2 horas frente a 1 L del tampón de resuspensión en una membrana de 12-14 kDa de corte (Spectrx / Por 2). Se centrifuga para eliminar el material insoluble, y se filtra sobre una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia) equilibrada con el mismo tampón para eliminar el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Se reúnen las fracciones conteniendo la proteína identificadas por medida de la actividad FBPasa.

Las fracciones activas reunidas se pasan por una columna de carboxi-metil Sephadex G-50 equilibrada en tampón malonato, lavando la columna con el mismo hasta que la absorbancia vuelva a la línea de base. Se eluye la FBPasa unida a la columna con el mismo tampón hecho en AMP 1 mM y FBP 2 mM. La FBPasa eluye justo después del volumen muerto. A causa de que el AMP absorbe a la longitud de onda de seguimiento de la elución de proteínas (280 nm), la línea de base del espectro de elución de éste enmascara los picos de elución de las fracciones proteicas. Por otro lado, puesto se está eluyendo FBPasa con AMP, un inhibidor de la FBPasa citosólica, la enzima sale con escasa actividad. Las fracciones enzimáticas se detectan por electroforesis en gel de acrilamida, y tinción con plata.

Se ha visto que el AMP estabiliza la enzima, al igual que el FBP, aunque a un grado menor. Por ello es preferible congelar las muestras tras la elución sin diálisis previa para una mejor conservación, y proceder a la eliminación del AMP y FBP cuando haga falta.

5.3. FBPasa citosólica de remolacha

El gen de la FBPasa de remolacha fue clonado en vector pGEXT-4T-1, expresando la enzima como proteína de fusión-GST. Las glutatión S-transferasas son una familia de proteínas que conjugan glutatión a través del átomo de azufre de la cisteína de este a diversos grupos electrofilicos de aquellas. Se han purificado GSTs de diversas especies animales, siendo las de la rata las mejor caracterizadas. Las GSTs forman homodimeros, existiendo en la rata 7 subunidades diferentes, cuya expresión es inducible por medio de agentes xenobióticos. La función de las GSTs parece estar relacionada con procesos de detoxificación y de eliminación de radicales libres de oxígeno.

La GST utilizada para crear proteínas de fusión es una proteína de 26 kDa y un pI = 5.0, aislada y clonada a partir del nemátodo *Schistosoma japonicum*. Es una proteína con una afinidad alta por el glutatión reducido, lo que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad con glutatión-Sepharose. Las proteínas así purificadas pueden ser eluidas en condiciones suaves (5-10 mM glutatión), lo que preserva su estructura nativa y su actividad biológica. La incorporación en los vectores de expresión, después de la secuencia de la GST, de secuencias reconocidas por proteasas, permite, tras una incubación con una proteasa adecuada, la obtención de la proteína de interés sin GST. La detección de la proteína de fusión se puede hacer mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con Coomassie, electroforesis SDS-PAGE y Western-blot con anti-GST o anti-proteína expresada, o por valoración de la actividad enzimática GST con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB).

Las células se resuspenden en tampón PBS con PMSF (1.5 mM), procediéndose a la lisis y eliminación del precipitado como anteriormente se indicó. Se colocan 200 µl de GS-Sepharosa (Pharmacia) en un tubo Eppendorf de 1 ml, se decanta la fase sólida por centrifugación a 500 g durante 5 min, y se elimina el sobrenadante. Se añade 1 ml de PBS frío, se mezcla bien y se centrifuga y elimina el sobrenadante como anteriormente. Repetir el lavado 2 veces más. Agregar 200 µl de tampón PBS, mezclar bien y adicionar 1 ml del extracto proteico. Se agita suavemente 30 min a temperatura ambiente. La proteína-GST se fija a la matriz sólida que se recupera por centrifugación. Este se lava 4 veces con 1 ml de PBS, agitando 5 min cada vez. Finalmente, se lava el sedimento 4 veces con 200 µl de glutatión 10 mM, incubando 10 min cada vez. Se centrifuga y recogen las muestras sobrenadantes, donde se encuentra la proteína-GST.

Para recuperar la proteína sin el peptido GST, se somete la matriz GS-Sepharosa portando la proteína de fusión a una hidrólisis en trombina. Para ello se añade 10 µl de solución de trombina (Pharmacia) y 190 µl de PBS. Se agita suavemente toda la noche a temperatura ambiente, se centrifuga y se recupera el sobrenadante con la proteína de interés. El GST queda fijado a la matriz sólida.

5.4. FBPasa quiméricas

Se realizó una purificación parcial de las FBPasas quiméricas siguiendo los pasos del protocolo inicial hasta el fraccionamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, omitiendo la fase de calentamiento. Se ajustó el pH del tampón maléico de resuspensión en función del pI teórico de cada enzima.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Cuantificación de las proteínas

La determinación de la concentración de proteínas en disolución se hizo utilizando el método descrito por Bradford, (1976), basado en la relación directa existente entre la cantidad de proteína y la coloración que este produce en Azul de Coomassie. Se ha seguido el protocolo indicado para disoluciones de proteína de concentración menor a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (microensayo). Se prepara una curva patrón de seroalbúmina bovina en el mismo tampón que las proteínas a cuantificar. A 800 μl de disolución patrón, o problema, se añaden 200 μl del reactivo (Azul Coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol), kit de Bio-Rad, se deja estar 5 min y se mide su absorbancia a 595 nm. El color es estable durante 1 hora. El ensayo se hace por triplicado. La interpolación en recta de regresión de la curva patrón permite la determinación de proteína de las muestras.

6.2. Electroforesis

La movilidad electroforética de una proteína es función, no sólo de su masa molecular, sino también de su carga neta y de su forma. El SDS (lauryl sulfato sódico) se acopla a las proteínas, rompe su estructura y forma, disociándolas en cadenas polipeptídicas lineales, con una densidad de carga neta proporcional al tamaño de esas cadenas. En consecuencia, los complejos proteína-SDS tienen una movilidad electroforética en gel de poliacrilamida inversamente proporcional al logaritmo de la longitud de la cadena polipeptídica.

La electroforesis vertical en gel de poliacrilamida sin (nativa) o en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) fue la técnica empleada para determinar pesos moleculares, y como primer paso en inmunoblotting. Se ha utilizado el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad).

Protocolos para la preparación de los geles:

SDS – PAGE

	Gel separador		Gel concentrador
	15 %	12,5 %	4 %
Agua destilada	2.35 ml	3.35 ml	6.1 ml
Tris- ClH 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	-
Tris- ClH 0.5 M pH 6.8	-	-	2.5 ml

Material y métodos

SDS 10 %	100 ml	100 μ l	100 ml
Acrilamida / Bis 30 % ¹	5 ml	4 ml	1.3 ml
Persulfato amónico 10 %	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED ²	5 μ l	5 μ l	10 μ l

1. Solución de acrilamida al 29.2 %, y N-N'-metilbisacrilamida al 0.8 %
2. N,N,N',N'-tetrametilendiamina

Nativa - PAGE

	Gel separador	Gel concentrador
	7 %	4 %
Agua destilada	5.11 ml	1.82 ml
Tris-ClH 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris-ClH 0.5 M pH 6.8	-	0.75 ml
Acrilamida / Bis 30 %	2.33 ml	0.4 ml
Persulfato amónico 10 %	50 μ l	15 μ l
TEMED	5 μ l	3.6 μ l

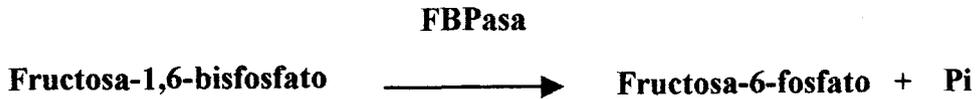
6.3. Tinción con Coomassie

Se sumergen los geles durante 30 min en una solución de Azul Coomassie R-250 al 0.1 % en solución fijadora (metanol 40 % y ácido acético 10 %). Para decolorar, se incuba durante 1-3 horas en solución fijadora con frecuentes cambios de solución para eliminar el colorante extraído (Garfín, 1990). Se detectan bandas con una concentración de proteína del orden de 0.1-1 μ g.

6.4. Tinción con plata

Se incuban los geles durante 30 min en una solución de fijación (metanol 50 %, ácido acético 12 % y 0.5 ml /L de formaldehído al 37%), y se lavan dos veces con etanol al 50 % durante 10 min cada vez. Posteriormente se tratan con una solución de $S_2O_3Na_2 \cdot 5 H_2O$ 0.8 M durante 1 min, lavándose con abundante agua destilada, 3 veces durante 20 seg. Se incuban con la solución de impregnación (NO_3Ag 11.8 mM y 0.75 ml/L de formaldehído al 37 %) durante 10 min, lavando con agua destilada 3 veces durante 20 seg. se tratan con la solución de revelado (CO_3Na_2 0.723 M, 0.5 ml/L de formaldehído al 37 %, y $S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ 16 μ M) hasta que aparezcan las bandas. Por último, se lavan con agua destilada varias veces, deteniéndose la reacción con la solución de parada (metanol 50 %, ácido acético 12 %). Se detectan bandas con una concentración de proteínas del orden de 10-100 ng (Merril *et al.*, 1984; Blum *et al.*, 1987).

6.5. Tinción por actividad

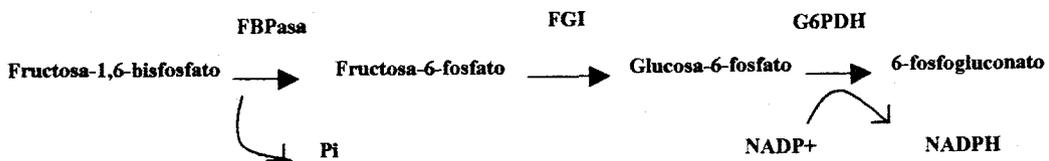


La reacción se hizo utilizando el método desarrollado por Chen *et al.* (1956), con unas modificaciones. La reacción del ortofosfato liberado con el reactivo sulfomolibdico da lugar a un fosfomolibdato, el cual es reducido por el ácido ascórbico. El color (azul de molibdeno) generado es proporcional a la concentración de ortofosfato liberado, y se podría medir en el espectrofotómetro con un máximo de absorción a 820 nm. La determinación se efectúa con las FBPasas cloroplastídica y quiméricas en tampón Tris-ClH 100 mM pH 8.8, en presencia de FBP 4 mM, Cl₂Mg 10 mM y EDTA.Na₂ 0.5 mM. Con las FBPasas citosólicas, la determinación se realiza en Tris-ClH 100 mM pH 7.5, en presencia de FBP 300 μM y Cl₂Mg 5 mM.

Tras hacer la electroforesis nativa de las muestras cuya actividad FBPasa se pretende detectar, se preincuba el gel durante 30 min y a 28 °C (20 °C con las FBPasas quiméricas) en la mezcla de determinación e, inmediatamente, se incuba el gel en el tampón de revelado conteniendo el reactivo sulfomolibdico (18 ml de molibdato amónico al 0.4 % en ácido sulfúrico al 3 %, y 4.5 ml de ácido l-ascórbico al 66.7 mg / ml) a 37°C, de 10 a 45 min. Se observa la aparición de un color azul allí donde hay FBPasa activa.

6.6. Actividades enzimáticas

La determinación de la actividad FBPasa se realizó midiendo la reducción de NADP⁺ en NADPH a 340 nm, reacción producida en presencia de las enzimas auxiliares fosfoglucoasa isomerasa (FGI) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), según la secuencia de reacciones acopladas:



La actividad de la enzima cloroplastídica se midió rutinariamente en presencia de exceso de Mg²⁺ (10 mM) a pH 8.8 (Lázaro *et al.*, 1974), mientras que la citosólica se determinó a pH 7.5 frente a 5 mM magnesio. La actividad de las enzimas quiméricas se midieron a pH 8, con 5 mM Mg²⁺.

Reactivos	Plastídica		Citosólica		Quimérica	
	μ l	mM	μ l	mM	μ l	mM
Tris-ClH 0.5 mM pH 8.8 [pH 7.5 citosólica]	200	100	200	100	200	100
EDTA 5 mM	100	0.5	-	-	-	-
Cl ₂ Mg 100 mM	100	10	50	5	50	5
NADP 3 mM	100	0.3	100	0.3	100	0.3
FBP 6 mM [0.6 mM citosólica]	100	0.6	100	0.06	50	0.3
G6PDH 0.7U	1		1	1	1	
FGI 1.4 U	2		2	2	2	
Agua destilada csp	1000		1000		1000	
FBPasa	x		X		x	

La determinación de FBPasa activada por tiorredoxinas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Prado *et al.* (1992). El ensayo se basa en que a pH 7.9 la FBPasa cloroplastídica no es activa a no ser que previamente sea reducida por un donador de equivalentes de reducción. La tiorredoxina, tras ser reducida por ditioneitol (DTT) (Herting y Wolosiuk, 1980), actúa como agente reductor, cediendo equivalentes de reducción a la FBPasa activándola. Aunque con menor efectividad el DTT también puede reducir la FBPasa, activándola.

El ensayo se realiza en dos pasos:

1. Activación: en un volumen de 100 μ l se incuban tiorredoxina y FBPasa en la mezcla de incubación (Tris-ClH pH 7.9 100 mM, DTT 2.5 mM, FBP 0.4 mM, Cl₂Ca 0.05 mM) durante 10 min a 28 °C.
2. Catálisis: transcurrido el tiempo, la mezcla se pasa a una cubeta con 900 μ l de tris- Cl H 50 mM pH 7.9, Cl₂Mg 1 mM, FBP 0.36 mM, EGTA (ácido etilenglicol-bis(beta-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 progresión de la reacción a 340 nm.

6.7. Western blotting

La transferencia se realizó de acuerdo con el protocolo prescrito por Tobwin *et al.* (1979) y, posteriormente por Gershoni y Palde (1983). Se empleó el equipo Mini Trans-Blot (Bio-Rad), que es compatible con el Mini-Protean (Bio-Rad).

Tras realizar la electroforesis de las muestras, se corta un trozo equivalente de membrana de nitrocelulosa (Millipore), sumergiendo ambos, gel y membrana uno sobre otro 15 min en el tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, y metanol 20 %). 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.

Finalizada la transferencia, se sumerge en el tampón suplementado con leche desnatada al 5 %, a temperatura ambiente y agitación durante 2 horas, ó a 4 °C toda la noche. Posteriormente se lava 3 veces con tampón PBST (PBS con Tween 20 al 0.05 %) durante 10 min, y se incuba la membrana con una dilución 1/1000 del anticuerpo en PBSTA (PBST con albúmina sérica bovina al 1 %), 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C.

Finalmente, se lava la membrana como anteriormente, y se incuba con una dilución 1/1000 de anti-IgG peroxidasa, durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación. Transcurido el tiempo, se lavan las membranas tres veces con PBST, y dos veces con PBS. El revelado final se llevó a cabo sumergiéndola en una solución de 20 µg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 4 ml de 1-propanol en 20 ml de PBS suplementado con 20 µl de H₂O₂. Se lava la membrana con agua destilada, y se deja secar en papel de filtro al abrigo de la luz.

Cuando se desea incrementar la sensibilidad del medio, se recurre a la detección por quimiluminiscencia. El protocolo es básicamente el mismo, pero la dilución del anticuerpo secundario (anti-IgG peroxidasa) es 1/4 000. Se incuba la membrana en el reactivo de revelado: 8 mg de luminol (Boehringer, Mannheim) en 20 ml de Tris-ClH 50 mM pH 8.6, ClNa 150 mM, al cual se añade en el momento del revelado 200 µl de 4-yodofenol al 1 % en DMSO más 3.2 µl de H₂O₂, durante 2 a 3 minutos. Se escurre y envuelve con plástico de cocina, exponiéndose a una película para auto-radiografía (Hyperfilm MP, Amersham) de unos segundos a 30 min, según la intensidad de la luminiscencia. La película se revele utilizando métodos estándar.

V. BIOINFORMÁTICA

1. HERRAMIENTAS GENERALES

Para analizar las secuencias en bases de ácidos nucleicos, así como las de aminoácidos en proteínas, se utilizó el paquete de programas en línea del Instituto Pasteur, accesible a la dirección <http://bioweb.pasteur.fr>, en donde se encuentran todas las herramientas de base. Se utilizó este sitio en particular para la conversión de formato (ReadSeq), el alineamiento de secuencias (Dialign, Clustaw), interrogar al banco de datos para identificar una secuencia (Blast), etc.

La predicción de estructura secundaria de las proteínas se realizó utilizando Stride (Frishman, D. Y Argos P., 1995). Este programa genera la estructura secundaria de una proteína a partir de sus coordenadas atómicas, teniendo en cuenta simultáneamente los enlaces hígrógeno y los ángulos dihedrales de la cadena principal.

2. MODELIZACIÓN POR HOMOLOGÍA MOLECULAR

Los modelos de las proteínas quiméricas, así como el de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris*, han sido generados por homología por el servicio en línea de modelación de SWISS-MODEL accesible a la dirección <http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>. SWISS-MODEL es un servicio desarrollado por M. C. Peitch (1995, 1996), y M. C. Peitch y N. Guex (1997). La modelización ha sido realizada por el programa ProMod II, y la minimización de energía por GROMOS 96.

3. EVALUACIÓN DE LOS MODELOS

La evaluación de los modelos se llevó a cabo utilizando la suite de programas del servicio WHATCHECK, accesible a la dirección <http://w.w.w.sander.embl-heidelberg.de/whatcheck>, en donde se encuentran las herramientas para analizar los parámetros globales y locales de una estructura así como el volumen y la superficie. En éste se utilizó de preferencia la suite PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), que permite averiguar la calidad de las características estereoquímicas de una estructura experimental o teórica.

4. INTERACCIÓN MOLECULAR

La predicción de complejos ha sido realizada por el algoritmo GRAMM1 (Global Range Molecular Matching), desarrollado por Katchalski-Katzir *et al.* (1992). El programa realiza una búsqueda exhaustiva en 6 dimensiones, tres translaciones y 3 rotaciones del ligando con respecto al receptor. El único requisito para operar es disponer de las coordenadas atómicas de las dos moléculas. GRAMM puede operar acoplamiento geométricos, hidrofóbicos y de baja resolución.

4.1. Acoplamiento geométrico

De manera general, el algoritmo trabaja con estructuras moleculares proyectadas como rejillas tridimensionales. consideremos 2 moléculas: A (receptor) y B (ligando). Los átomos de A y B, representados como esferas de un diámetro dado, son en primer lugar proyectados en una red tridimensional. Cada punto de la red está incluido en una esfera, a la cual se atribuye un valor diferente de cero. Una o dos superficies de la molécula A son generadas por proyecciones secuenciales de los átomos. Esas superficies representan un volumen disponible para la interacción con B. Se atribuye al interior de A valores negativos para prevenir penetración

1. La donación del programa fue una cortesía de Dr. Ilya A. Vakser - Department of Cell and Molecular Pharmacology - Medical University of South Carolina - 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425.

intermolecular.

A continuación, a una orientación dada del ligando, se superponen las rejillas del receptor y del ligando, y se calculan las proyecciones por correlación. Luego se cambia la orientación del ligando, y se repite el mismo proceso. Se prueban sistemáticamente todas las orientaciones posibles, con un ángulo de rotación predefinido. Las configuraciones potenciales del complejo se definen en función de la marca, que es proporcional a la superficie de contacto entre las moléculas. Para cada configuración del complejo el programa genera las coordenadas atómicas que permiten visualizar la entidad.

4.2. Acoplamiento hidrofóbico

El objetivo de esta alternativa es afinar la técnica, eliminando determinados grupos responsables de los falsos positivos (Vakser *et al.*, 1994). Conservando el mismo esquema, se eliminan determinados grupos atómicos, no hidrofóbicos, en la representación tridimensional de las moléculas.

La molécula B está representada únicamente por sus grupos atómicos hidrofóbicos, mientras que se excluyen de manera selectiva grupos no hidrofóbicos de la superficie de A. En efecto, antes de proyectar en la red, se sortean los grupos atómicos de forma que los hidrófobos sean proyectados los primeros, a fin de conferir a los puntos de la red un carácter hidrofóbico.

En resumen, se trata de una situación intermedia entre una interacción entre todos los átomos de la superficie, como es el caso en un acoplamiento geométrico, y una interacción puramente hidrofóbica.

4.3 Acoplamiento de baja resolución

Esta otra alternativa (Vakser, 1996) ha sido diseñada para estructuras de baja resolución (7 Å para las proteínas). Por lo tanto, se deben eliminar los componentes de alta resolución de las moléculas. A esta escala no se observan los detalles que permiten evaluar la superficie de contacto, como en los métodos precedentes. La marca de la interacción entre A y B ya no será proporcional a la superficie de contacto, sino a la densidad atómica en la interface de A-B. Para obtener más información con respecto a la densidad atómica, se sustituye la representación del tipo "sí o no" (blanco y negro) por otra que da cuenta de diferencias de grados en la proyección (escala de grises).

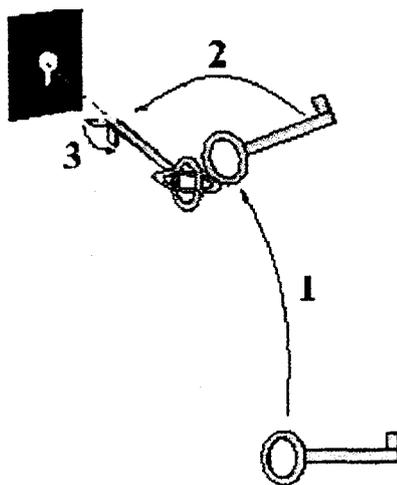
Los resultados obtenidos con este método sugieren algunos aspectos del reconocimiento entre ligando y receptor. En efecto, se puede representar el acoplamiento en tres etapas simbolizándolas en términos de llave (ligando) y cerradura (receptor):

Etapa 1. El ligando B se traslada al sitio de acoplamiento. A esta escala (7 Å), los detalles atómicos no están presentes, pero los elementos conformacionales del mismo tamaño (giro beta, etc.) pueden ser responsables de esta etapa de reconocimiento.

Etapa 2. La orientación del ligando manifiesta ciertas preferencias con respecto a las buenas soluciones, o sea, la llave se coloca preferencialmente en el eje de la cerradura.

Etapa 3. Cuando el ligando está lo suficiente cerca del sitio de acoplamiento, hay un reajuste de sus elementos para encajar en el sitio idóneo; o sea, la llave tiende a adaptarse al agujero de la cerradura. Formalmente, en la representación de baja resolución, los detalles atómicos del reajuste están ausentes, aunque en la realidad esos elementos atómicos son los protagonistas en esta última etapa.

Las etapas formalizadas aquí no deben considerarse en un orden rígido. Las etapas 1 y 2 son intercambiables. No todos los acoplamientos pueden describirse según esta fenomenología.



4.4. Análisis de los complejos

El análisis de los complejos ha sido realizado por medio del algoritmo LIGPLOT2 (Wallace *et al.*, 1995). En un complejo, lee la estructura tridimensional del ligando a partir de las coordenadas atómicas de los residuos proteicos con los cuales interacciona; desenrolla cada objeto con respecto a sus enlaces, y los presenta en un diagrama bidimensional.

2. La donación del algoritmo fue una cortesía de Dr. Roman Laskowski – Biomolecular Structure and Modelling Unit – Dept. of Biochemistry- University College – Gower street- London WC1E 6BT.



Capítulo I. PREDICCIÓN

I. I. RESULTADOS

1. ESTRUCTURA PRIMARIA

1.1 Construcción de las FBPasas quiméricas

Antes de iniciar la explicación de las construcciones llevadas a cabo, queremos advertir que se ha adoptado la numeración que se indica en la Lámina I.1 para la secuencia de aminoácidos, bien sean reales o virtuales.

Las proteínas iniciales utilizadas en las construcciones son la FBPasa cloroplastídica de guisante (*Pisum sativum* L.), la FBPasa citosólica de remolacha (*Beta vulgaris* L.) y la FBPasa gluconeogénica de hígado humano. El alineamiento de esas tres entidades (Lámina I.1) muestra que el grado de identidad entre las FBPasas citosólicas y la enzima cloroplastídica es del orden del 45%, mientras que la identidad entre ambas FBPasas citosólicas es del 51%. Dos zonas aparecen fundamentalmente discrepantes entre las enzimas cloroplastídica y del citosol. El extremo N-terminal de la FBPasa de remolacha azucarera carece de los primeros 18 aminoácidos, una característica compartida con la enzima homóloga de espinaca (Marcus and Harrsch, 1990). Una carencia de este tipo, aunque mas corta, de sólo 6 aminoácidos, se da también en la enzima de hígado humano.

La segunda discrepancia es el denominado "lazo 170", una secuencia de unos 25 aminoácidos (entre los residuos 152 y 178 para la FBPasa de guisante) exclusiva de las FBPasas del cloroplasto, que sustenta los tres restos de cisteína (Cys-154, Cys-174 y Cys-179) implicados en la regulación por la luz de esta enzima fotosintética. Puesto que las FBPasas citosólicas y cloroplastídicas parecen exhibir un mecanismo de acción equivalente, con un centro activo común, ambas conservan las secuencias implicadas en la unión al sustrato (FBP), fundamentalmente en la mitad C-terminal de la enzima, mientras que las citosólicas mantienen restos esenciales para el anclaje del modulador AMP, un regulador no operativo en la FBPasa del cloroplasto

Con estos antecedentes se construyeron dos tipos de FBPasas quiméricas (Lámina I.2). El primero (construcción X1) consiste en la sustitución del dominio FBP (mitad C-terminal) de la enzima citosólica por el correspondiente de la FBPasa cloroplastídica, incluido el "lazo 170". Así pues, y siguiendo la numeración indicada, la primera quimera se compone de los aminoácidos 1 a 152 (reales 1 a 134) de la enzima citosólica de *Beta vulgaris*, enlazados a los aminoácidos 152 a 357 de la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum*. Esta proteína quimérica ha sido denominada BV1. Lo mismo le ocurre a la FBPasa quimérica constituida por la mitad N-terminal de la enzima de hígado humano (aminoácidos 1 a 148, reales 1 a 143), y por la mitad C-terminal de la FBPasa cloroplastídica de guisante (aminoácidos 148 a 357) Esta otra FBPasa quimérica se denominó HL1.

El segundo tipo (construcción X2) resulta de la inserción del "lazo 170" de la FBPasa cloroplastídica de guisante (aminoácidos 152 a 178) en la posición equivalente de

	10	20	30	40	50	60			
1 P.S.	MAVKEATSETTKRSGYEII	TLTSWLLQOE	-QKPIIDAELTIVLSSI	SMACKQIASLVQRA			59		
2 B.V.	M-----	TITRFVLNEQ	SKRPESRGDF	TILMSHIVLGCK	FVCSAVNKA		42		
3 H.L.	MA-DQAPFDT-----	DVNTLTRFVM	-EEGRKARGTGELT	QLLNSLCTAVKAI	SSAVRKA		52		
	70	80	90	100	110	120			
1 P.S.	NI SNLTGTQ	GAVNIQGEDQ	KKLDVLSNEVFSN	CLRSSGRTGII	AEEEE	EDVPVAVEESYS	119		
2 B.V.	GLAKLIGLAGET	NIQGEQ	KKLDVLSNEVFI	KALISSGRTCIL	VSEED	DEEATFVEPSLRG	102		
3 H.L.	GIAHLYGIAGST	NVTGDQ	VKKLDVLSNDL	VMMMLKSSFAT	CVLVSEED	KHAIIVEPEKRG	112		
	130	140	150	160	170	180			
1 P.S.	NYIVVFDPLD	GSSNLDAAVS	TGSIFGIYSP	NDECLPFGDD	SDDN	LGTEEQRCIVNVC	179		
2 B.V.	KYCVVFDPLD	GCSNIDCGVS	IGTIFGIYMVK	-----	DLNNATLDDVL	-----	145		
3 H.L.	KYVCFDPLD	GSSNIDCLVS	VGTFGIYRKK	-----	STDEPSEKDAL	-----	155		
	190	200	210	220	230	240			
1 P.S.	PGSNLLAAGY	CMYSSSVIF	VLTIGKGVFV	FTLDP	LYGEFVLTQ	ENLQIPKSGKIYS	FNEG 239		
2 B.V.	PGKMMVAAGY	CMYGSSCTL	VMSTGSGVNG	FTHDPSL	GEFILTHP	DIKIPKKGKIYS	VNEG 205		
3 H.L.	PGRNLVAAGY	ALYGSATML	VLAMDCGVN	CFMLDPAI	GEFILVDK	DVKIKKKGKIYS	INEG 215		
	250	260	270	280	290	300			
1 P.S.	NYKLW	DENLKKYI	DDLKEP	GPSGKPY	SARYIGSL	VGDFHRTL	LYGGIYGYP	DKKSKNGK 299	
2 B.V.	NAKNWD	GPTTKY	VEKCKFP	RDGSSPK	SLRYIGSM	VADVHRTL	LYGGIFMYP	GDKKS PNGK 265	
3 H.L.	YAKDFD	PAVTEYI	IQRRKFP	PDNSAPY	GARYVGS	MADVHRTL	VYGGIFLYP	ANKKS PNGK 275	
	310	320	330	340	350	360			
1 P.S.	LRLLYE	CAPMSFIVE	QAGGKGS	DGHQ	RVLDIQ	PTEIHQR	VPLYIGS	TEEVEKVEK-YLA- 357	
2 B.V.	LRVLYE	VFPMSFL	MEQAGG	QAF	TGEQR	ALDLV	PKNIHDR	SPVFLGS	YDDVEDIKALYAAE 325
3 H.L.	LRLLYE	CNPMAY	VMKAGG	MATTG	KEAVLD	VIP	TDIHQR	APVILGS	PDDVLEFLKVYE-K 334
1 P.S.	----							357	
2 B.V.	QKNA							329	
3 H.L.	HSAQ							338	

Lámina I. 1. Alineamiento de las tres FBPasas silvestres: cloroplastídica de *Pisum sativum* (P.S.), citosólica de *Beta vulgaris* (B.V.), y gluconeogénica de hígado humano (H.L.). Los colores indican el porcentaje de identidad entre los residuos: rojo = 100 %; azul \geq 75%; verde \geq 50; gris $<$ 50. La numeración central es virtual mientras que la numeración lateral es la real para cada proteína.

Resultados

	10	20	30	40	50	60	
1 P.S	MAVKEATSETTKKRS	GYEIIITLTSWLL	QQE-QKPIIDAEL	TIVLSSI	SMACKQIASL	VQRA	59
2 B.V	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	42
3 BV1	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	42
4 BV2	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	42
5 H.L	MA-DQAPFD	T-----	DVNTLTRFVM	-EEGRKARGT	GELTQLLNSL	CTAVKAISSAVRKA	52
6 HL1	MA-DQAPFD	T-----	DVNTLTRFVM	-EEGRKARGT	GELTQLLNSL	CTAVKAISSAVRKA	52
7 HL2	MA-DQAPFD	T-----	DVNTLTRFVM	-EEGRKARGT	GELTQLLNSL	CTAVKAISSAVRKA	52

	70	80	90	100	110	120	
1 P.S	NISNLTG	TQGAVNIQGED	QKKLDVLSNEV	FSNCLRSSGR	TGIIASEE	EDVPVAVEES	YSG 119
2 B.V	GLAKLIG	LAGE	TNIQGE	EQKKLDVLSNEV	FIKALISSGR	TCILVSEED	EETVVEPSIRG 102
3 BV1	GLAKLIG	LAGE	TNIQGE	EQKKLDVLSNEV	FIKALISSGR	TCILVSEED	EETVVEPSIRG 102
4 BV2	GLAKLIG	LAGE	TNIQGE	EQKKLDVLSNEV	FIKALISSGR	TCILVSEED	EETVVEPSIRG 102
5 H.L	GIAHLYG	IAGSTNVTG	DQVKKLDVLSN	DIVMMLKSS	FATCVLVSE	EDKHAIIVEPE	KRG 112
6 HL1	GIAHLYG	IAGSTNVTG	DQVKKLDVLSN	DIVMMLKSS	FATCVLVSE	EDKHAIIVEPE	KRG 112
7 HL2	GIAHLYG	IAGSTNVTG	DQVKKLDVLSN	DIVMMLKSS	FATCVLVSE	EDKHAIIVEPE	KRG 112

	130	140	150	160	170	180	
1 P.S	NYIVVFD	PLDGCSSNLDA	AVS	TGSIFGIY	SPNDECLP	DFGDDSDDN	TLGTEEQRCIVNVCQ 179
2 B.V	KYCVVFD	PLDGCSSNID	CGVS	IGTIFGIY	MVKD--L	-----	NNATLD-----DVLQ 145
3 BV1	KYCVVFD	PLDGCSSNID	CGVS	IGTIFGIY	MVKDECLP	DFGDDSDDN	TLGTEEQRCIVNVCQ 162
4 BV2	KYCVVFD	PLDGCSSNID	CGVS	IGTIFGIY	MVKDECLP	DFGDDSDDN	TLGTEEQRCIVNVCQ 162
5 H.L	KYVVC	FDPLDGCSSNID	CLVSVGT	IFGIYRKKST	-----	DEPSEKDAL	-----Q 155
6 HL1	KYVVC	FDPLDGCSSNID	CLVSVGT	IFGIYRKKST	-----	DEPSEKDAL	-----Q 155
7 HL2	KYVVC	FDPLDGCSSNID	CLVSVGT	IFGIYRKKST	-----	DEPSEKDAL	-----Q 155

	190	200	210	220	230	240	
1 P.S	PGSNLLA	AGYCMYSSSV	IFVLTIGK	GVFVFTLDP	LYGEFVLTQ	ENLQIPKSGKI	YSFNEG 239
2 B.V	PGKNMVA	AGYCMYSSS	CTLVMSTG	SGVNGFTHDP	SLGEFILTH	PDIKIPKKGKI	YSVNEG 205
3 BV1	PGSNLLA	AGYCMYSSSV	IFVLTIGK	GVFVFTLDP	LYGEFVLTQ	ENLQIPKSGKI	YSFNEG 222
4 BV2	PGKNMVA	AGYCMYSSS	CTLVMSTG	SGVNGFTHDP	SLGEFILTH	PDIKIPKKGKI	YSVNEG 222
5 H.L	PGRNLVA	AGYALYGS	ATMLVLA	MDCGVNCFML	DPALGEFIL	VDKVKIKKKGKI	YSFNEG 215
6 HL1	PGSNLLA	AGYCMYSSSV	IFVLTIGK	GVFVFTLDP	LYGEFVLTQ	ENLQIPKSGKI	YSFNEG 232
7 HL2	PGRNLVA	AGYALYGS	ATMLVLA	MDCGVNCFML	DPALGEFIL	VDKVKIKKKGKI	YSFNEG 232

	250	260	270	280	290	300			
1 P.S	NYKLW	DENLKKY	IDDLKEP	GPSPGKPY	SARYIGSLV	GD FHR	TLLYGGIYGYP	RDKKS	KNGK 299
2 B.V	NAKNW	DGPTTKY	VEKCKFP	KDGS	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTLLYGGI	FMYPG	DKKSPNGK 265
3 BV1	NYKLW	DENLKKY	IDDLKEP	GPSPGKPY	SARYIGSLV	GD FHR	TLLYGGIYGYP	RDKKS	KNGK 282
4 BV2	NAKNW	DGPTTKY	VEKCKFP	KDGS	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTLLYGGI	FMYPG	DKKSPNGK 282
5 H.L	YAKDF	PAVTEYI	QRRKFP	PDNSAPY	GARYVGS	MVADVHRT	LVYGGIFLYP	ANKKS	PNGK 275
6 HL1	NYKLW	DENLKKY	IDDLKEP	GPSPGKPY	SARYIGSLV	GD FHR	TLLYGGIYGYP	RDKKS	KNGK 292
7 HL2	YAKDF	PAVTEYI	QRRKFP	PDNSAPY	GARYVGS	MVADVHRT	LVYGGIFLYP	ANKKS	PNGK 292

	310	320	330	340	350	360				
1 P.S	LRLLYE	CAPMSFIVE	QAGGKGS	SDGHQ	RVLDIQPT	IEHQ	RVP	LYIGS	TEEVEKVEKYL---	356
2 B.V	LRVLYE	VFPMSF	IMEQAGG	QAFTGE	QRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVEDI-KALYAA	324
3 BV1	LRLLYE	CAPMSFIVE	QAGGKGS	SDGHQ	RVLDIQPT	IEHQ	RVP	LYIGS	TEEVEKVEKYL---	339
4 BV2	LRVLYE	VFPMSF	IMEQAGG	QAFTGE	QRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVEDI-KALYAA	341
5 H.L	LRLLYE	CNP	MAYVMEKAGG	MATTG	KEAVL	VIPTDI	HQ	RA	PVILGSPDDVLEFLK-VYE-	333
6 HL1	LRLLYE	CAPMSFIVE	QAGGKGS	SDGHQ	RVLDIQPT	IEHQ	RVP	LYIGS	TEEVEKVEKYL---	349
7 HL2	LRLLYE	CNP	MAYVMEKAGG	MATTG	KEAVL	VIPTDI	HQ	RA	PVILGSPDDVLEFLK-VYE-	350

1 P.S ----A 357
2 B.V EQKNA 329
3 BV1 ----A 340
4 BV2 EQKNA 346
5 H.L KHSAQ 338
6 HL1 ----A 350
7 HL2 KHSAQ 355

Lámina I. 2. Alineamiento de las FBPasas silvestres con las quiméricas.
Porcentaje de identidad entre los residuos: :rojo = 100%; azul
>= 75%; verde >= 50%; gris < 50%. La numeración
central es una numeración virtual deducida del alineamiento, mientras que
la lateral es la real para cada proteína.

ambas enzimas citosólicas. Ello implica la delección de una corta secuencia de aminoácidos presente en dicho lugar en ambas FBPasas citosólicas: residuos 154 a 177 virtuales (8 aminoácidos reales) en la enzima de remolacha, y residuos 149 a 167 virtuales (14 aminoácidos reales) en la de hígado humano. A ambas FBPasas quiméricas se les ha denominado BV2 y HL2, respectivamente.

1.2. Composición de las FBPasas quiméricas

Las FBPasas gluconeogénicas (citosólicas) y cloroplastídicas tienen estructuras terciarias y cuaternarias equivalentes (Ke *et al.*, 1989; Villeret *et al.*, 1995). Ambas son tetrámeros constituidos por 4 subunidades iguales de 40000 Da. Por ello no debe resultar extraño que las quimeras de tipo X1 no muestren significativas diferencias de composición y estructurales, aunque sí las puedan tener en aspectos cinéticos y de especificidad. Eso es lo que refleja la Tabla I.1, donde lo más significativo es el incremento del número de restos de cisteínas en BV1, derivado de los 3 residuos de este aminoácido aportados por el "lazo 170", lo que compensa con creces el menor número de restos de cisteína en la mitad N-terminal de la FBPasa cloroplastídica respecto de la citosólica.

También es de resaltar el aumento de la acidez de BV1 con relación a su parental citosólico, lo que se debe tanto al incremento del porcentaje de aminoácidos ácidos como a la disminución de los básicos, lo que se debe fundamentalmente al elevado número de restos ácidos del "lazo 170". En general, tanto los parentales cloroplastídico y citosólico, como el híbrido de ambos, exhiben un fuerte porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, lo que se traduce en una estructura globular de las proteínas.

Respecto a las quimeras tipo X2, la inserción del "lazo 170" incrementa en 3 el número de restos de cisteína, tanto en BV2 como en HL2. Por la misma razón aumenta el porcentaje de restos ácidos y disminuye el de básicos, cosa especialmente evidente en la enzima de hígado humano, cuya zona deleccionada es extremadamente rica en estos últimos. Por otro lado, la estructura terciaria de la molécula no debe sufrir modificaciones, ya que el "lazo 170" ocupa en la FBPasa cloroplastídica, y presumiblemente también en las quimeras X2, una posición externa al núcleo de la molécula, tanto bajo una perspectiva de estructura terciaria como cuaternaria.

Aminoácidos	<i>Pisum sativum</i>		<i>Beta vulgaris</i>		BV1		BV2		<i>Higado humano</i>		HL1		HL2	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Acidos	48	13.4	36	11.8	47	13.8	45	13.0	41	12.1	46	13.1	46	12.9
Básicos	36	10.1	41	12.4	39	11.5	42	12.1	45	13.3	41	11.7	42	11.8
Hidrófobicos	183	51.2	150	45.6	161	47.3	156	45.1	150	44.3	166	47.4	160	45.0
Hidroxilados	51	14.3	41	12.5	40	11.7	33	9.53	37	10.9	44	12.6	38	10.7
Cys	7	1.96	9	2.73	11	3.23	12	3.46	7	2.07	9	2.57	10	2.81
Asn	16	4.48	15	4.55	13	3.82	15	4.33	13	3.84	15	4.28	16	4.50
Gln	16	4.48	8	2.43	11	3.23	9	2.60	7	2.07	11	3.14	8	2.25
Total	357		329		340		346		338		350		355	
Masa Molecular kDa	39.24		35.94		37.64		37.85		36.81		38.48		38.61	

TABLA I.1. Composición en las distintas categorías de aminoácidos de las diferentes FBPasas.

1.3. Perfiles de hidropatía.

La hidrofobicidad de la cadena lateral de un aminoácido varía con el método de determinación. Por eso se prefiere utilizar el término más neutro de hidropatía para describir la preferencia relativa de una cadena lateral de un aminoácido hacia un entorno acuoso, polar o no polar. El estudio de los diferentes perfiles de las proteínas salvajes globulares, confirman la correlación positiva entre antigenicidad, hidrofiliidad, flexibilidad y accesibilidad al solvente. En efecto, las zonas de la molécula susceptibles de actuar como determinantes antigénicos deben corresponder a regiones expuestas al medio y, por ello, hidrofílicas.

El análisis de los perfiles de la enzima cloroplastídica (Lámina I. 3) enseña que las cadenas laterales hidrofílicas se reparten en las zonas (1-30), (60-131), (217-265) y (285-322), simétricas con respecto al "lazo 170" (152-178), también hidrofílico y que representa una importante región de antigenicidad potencial. Hay que subrayar que la proteína humana presenta un perfil similar, con una zona de fuerte antigenicidad potencial en el centro de la cadena (137-158), una zona que corresponde a la estructura que enlaza los dos dominios de la proteína.

El perfil de la enzima de la *Beta vulgaris* se aleja sensiblemente de los precedentes. No se observa esa zona de mayor antigenicidad potencial en el centro de la cadena. Además, aparece una zona hidrofílica (187-230) que pertenece al dominio FBP, (lado C-terminal), correspondiente a regiones hidrofóbicas en las proteínas homólogas, (82-217) en el caso de la cloroplastídica, y (158-194) para la proteína humana. Se

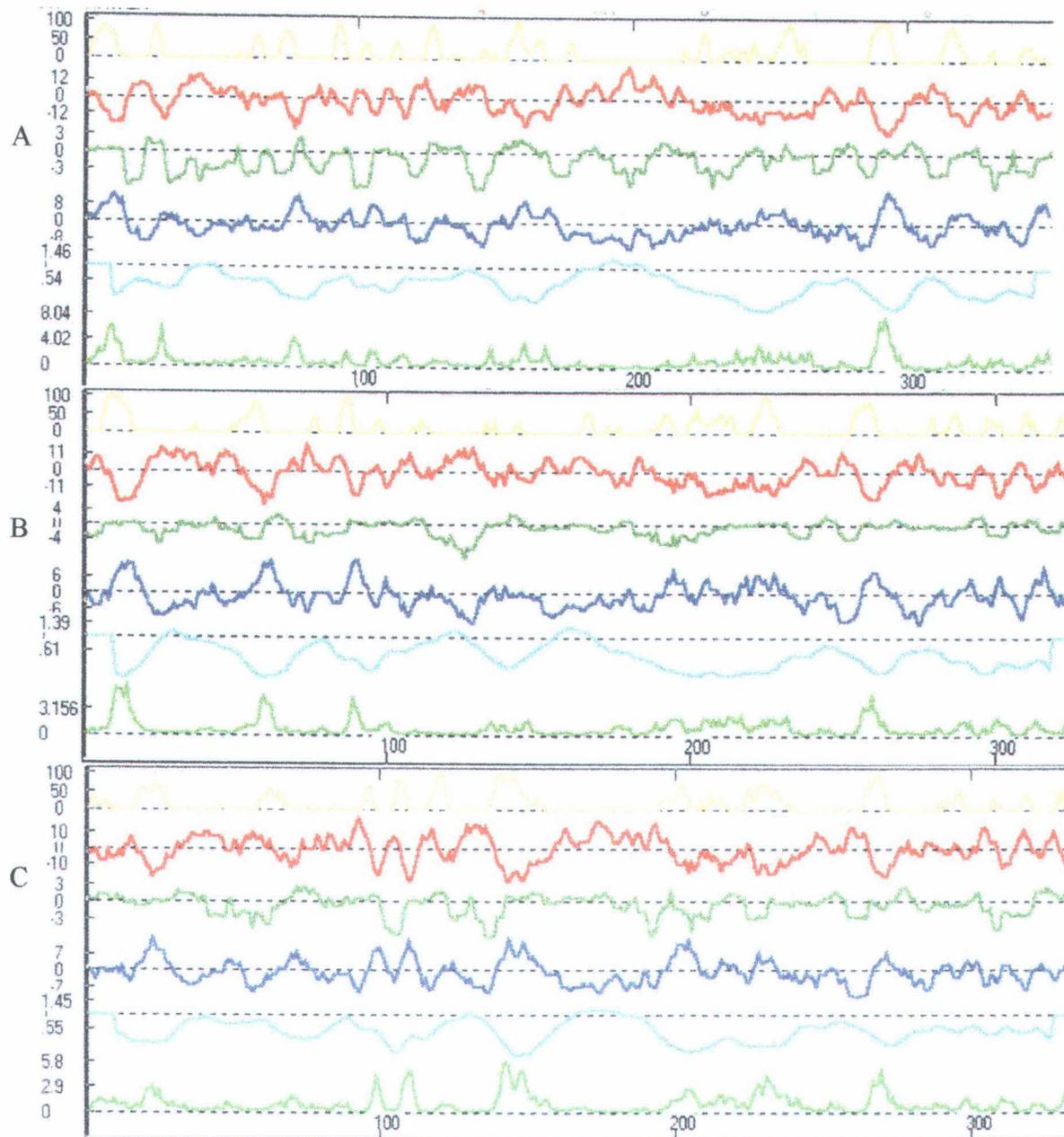


Lámina I. 3. Perfil de hidropatía de las FBPasas cloroplastídica de guisante (A), citosólica de remolacha (B), y gluconeogénica de hígado humano (C).

Antigenicidad (Parker *et al.*, 1986); **Hidrofobicidad** (Kyte *et al.*, 1982);
Antigenicidad (Welling *et al.*, 1976); **Hidrofilicidad**; **Carácter de membrana**;
Accesibilidad al solvente.

trataría de saber si esas características tienen algunas implicaciones en la especificidad de los anticuerpos generados por esas proteínas.

Las entidades HL1 y BV1 (Lámina I. 4.) heredan las características de la cloroplastídica en su parte C-terminal. A causa de la similitud del perfil de hidropatía entre la enzima humana y la cloroplastídica, el perfil de HL1 se acerca a la de ambas FBPasas salvajes.

En la entidad BV2, se nota la aparición de residuos hidrofóbicos en la mitad de la cadena, lo que hay que vincular a algunos residuos hidrofóbicos del "lazo 170". En la entidad HL2, se detecta únicamente la sustitución de los residuos delecionados (141-154) por los del "lazo 170". En ambos casos se trata de residuos presentando un grado de accesibilidad al solvente, superior al resto de la cadena, lo que establece una similitud de perfil hidropático entre las cadenas de la cloroplastídica, la humana y la quimérica HL2.

De acuerdo con estos perfiles, habrá que esperar ciertas reacciones inmunológicas cruzadas entre esas diferentes proteínas. Frente a un anticuerpo contra la FBPasa cloroplastídica el orden de reconocimiento antigénico será el siguiente:

Cloroplastídica > Humana ≥ Quimérica HL2 ≥ Quimérica HL1 ≥ Quimérica BV1 ≥ Quimérica BV2

Frente a un anticuerpo contra la FBPasa humana el orden será:

Humana > Cloroplastídica ≥ Quimérica HL2 ≥ Quimérica HL1 ≥ Quimérica BV1 ≥ Quimérica BV2

Y frente a un anticuerpo contra la FBPasa de *Beta vulgaris*:

Beta vulgaris > Quimérica BV2 ≥ Quimérica BV1

2. ESTRUCTURA SECUNDARIA

La predicción de la estructura secundaria de las FBPasas salvajes y quiméricas fue determinada por el algoritmo STRIDE, que calcula los elementos estructurales a partir de las coordenadas atómicas. Realiza la predicción en 7 categorías:

Estructura	Código
Alfa hélice	H
Hélice 3_{10}	G
Hélice pi	I
Estructura beta	E
Puente aislada	B o b
Vuelta (turn)	T
Giro (coil)	C

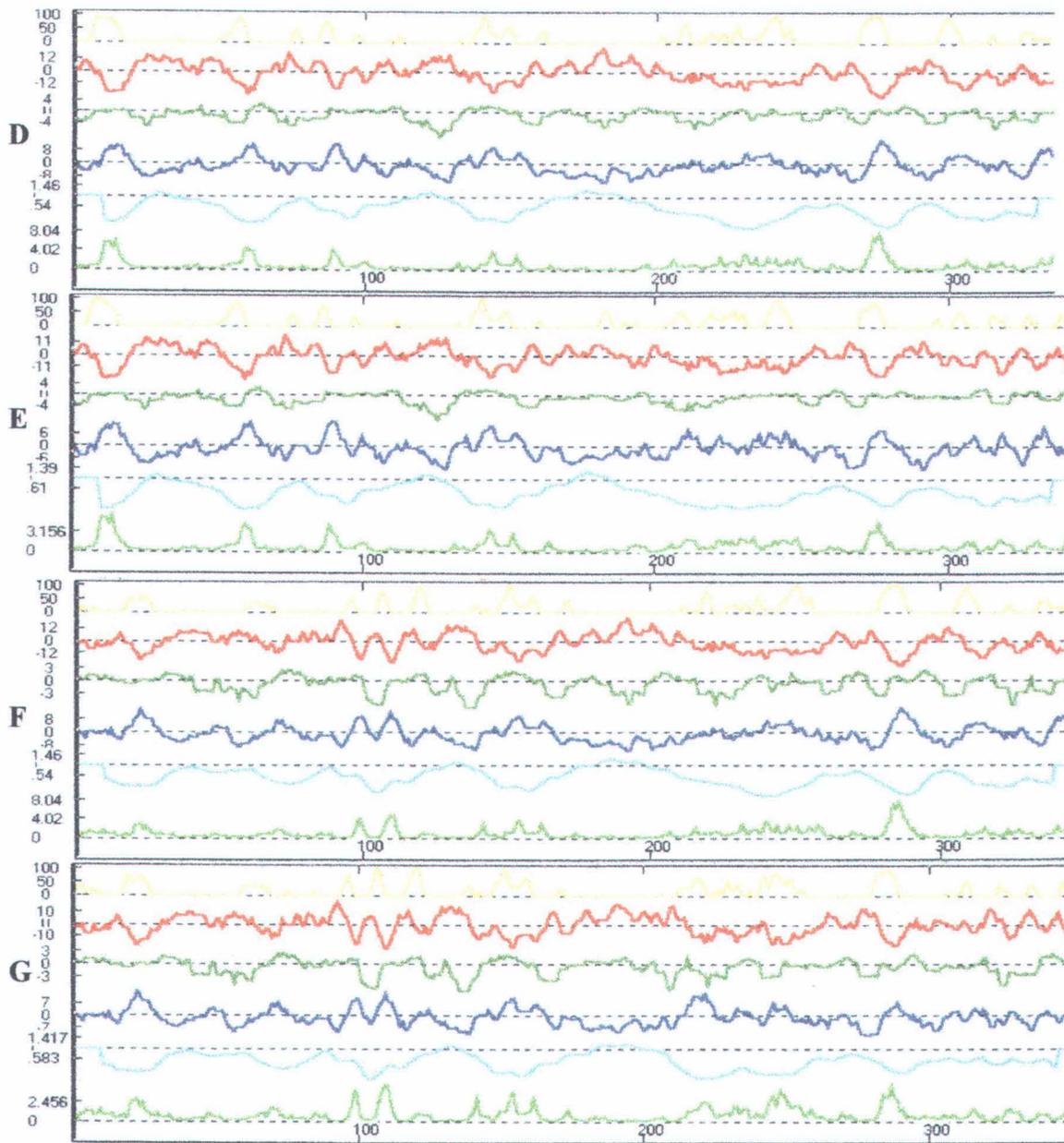


Lámina I. 4. Perfil de hidropatía de las FBPasas quiméricas BV1(D), BV2 (E), HL1 (F), y HL2 (G).

Antigenicidad (Parker *et al.*, 1986); **Hidrofobicidad** (Kyte *et al.*, 1982);
Antigenicidad (Welling *et al.*, 1976); **Hidrofilicidad**; **Carácter de membrana**;
Accesibilidad al solvente:

En este trabajo utilizamos dos estructuras de referencia, la de la FBPasa cloroplastídica de espinaca y la enzima humana, ya que ambas proteínas han sido cristalizadas, y sus estructuras determinadas.

Los modelos que genera el algoritmo coinciden con los datos estructurales de la literatura, a saber, que la FBPasa es una proteína estructurada en 9 alfa hélices, 13 hojas beta y 15 giros (Lámina I. 5). Las estructuras secundarias de las quiméricas se alinean con las referencias con un porcentaje de identidad del 80 % en la parte C terminal. Las discrepancias surgen al nivel de las tres primeras hélices alfa en BV1 y HL1. Además, SWISS-MODEL propone dos soluciones para BV1 (BV1a y BV1b) con respecto a lo antes dicho.

En la parte N terminal la estructura de la enzima humana se corresponde con la de la proteína de riñón de cerdo (Jiin-Yun Liang *et al.*, 1992). Se encuentran las tres primeras hélices H1 (12-14), H2 (28-50) y H3 (72-88) en la misma posición. No obstante, el programa interpreta los residuos 54-58, al principio del "lazo 50-72", como formando una hélice alfa. Los datos de la literatura no mencionan los detalles de la estructura secundaria de la enzima humana lo que permitiría comprobar si esta proteína presenta una hélice alfa supernumeraria respecto a su homóloga de cerdo. Se trataría de una hélice 3_{10} como en el caso del modelo de la FBPasa de *Beta vulgaris*. Este tipo de hélice, cuyo nombre se refiere al hecho de presentar 3 residuos por vuelta y 10 átomos entre el donador del enlace hidrogeno y el aceptor, se observa en condiciones especiales, o como final de hélice alfa normal. Esta estructura puede ser, pues, la final de la hélice H2. El programa interpreta la hélice H4 como hélice 3_{10} .

En el caso de la enzima cloroplastídica de espinaca, las coordenadas atómicas empiezan con el aminoácido 4. Se encuentran las hélices H1 (22-34) y H2 (38-60) en la posición que las había descrito Villeret *et al.* (1995). El "lazo 50-72", que sustente los residuos 61-81 en el caso de espinaca, es una zona sin estructura determinada en la predicción. Esto corresponde a residuos sin densidad electrónica en difracción por rayos X, como lo indica en el trabajo. En el modelo, la hélice H3, compuesta de los residuos 87-94, está entre dos vueltas. En la estructura de Villeret las dos vueltas conforman parte de la hélice H3, que se extiende así del aminoácido 82 hasta el 98. A continuación la predicción coincide con los datos cristalográficos. Esto constituye un test de calibración del programa para poder interpretar los datos de la FBPasas quiméricas.

Las estructuras secundarias de BV1a y HL1 empiezan con retraso con respecto a las proteínas silvestres. Por lo tanto, se produce un desplazamiento de las 3 hélices alfa hacia la parte C terminal de las proteínas. Esta organización de H1 (24-32), H2 (40-61) y H3 (67-78) de BV1a, y H1 (34-41), H2 (50-71) y H3 (75-89) de HL1, reduce en ambos casos el lazo 50-72 con respecto a las referencias.

La alternativa BV1b hace coincidir las hélices H1 (3-9) y H2 (20-40) con las de las proteínas silvestres. Se nota la presencia de la hélice supernumeraria (44-48), como en el caso de la proteína humana. Al igual que en esta, puede ser una hélice 3_{10} como final de H2. La hélice H3 (53-79) de BV1b empieza en la región ocupada por el lazo 50-72, lo que modifica su conformación con respecto a la estructura silvestre.

Resultados

	10	20	30	40	50	60	
1 SO	AAVGEAATETKARTRSKYEIETLTGWLLKQE-MAGVIDAELTIVLSSISLACKQIASLVQ						59
2 BV	M-----	TITRFVLNEQSKRPESRGDFTILMSHIVLGCKFVCSAVN					40
3 BV1a	M-----	TITRFVLNEQSKRPESRGDFTILMSHIVLGCKFVCSAVN					40
4 BV1b	M-----	TITRFVLNEQSKRPESRGDFTILMSHIVLGCKFVCSAVN					40
5 BV2	M-----	TITRFVLNEQSKRPESRGDFTILMSHIVLGCKFVCSAVN					40
6 HL	MA-DQAPFDT-----	DVNTLTRFVM-EEGRKARGTGELTQLLNSLCTAVKAISSAVR					50
7 HL1	MA-DQAPFDT-----	DVNTLTRFVM-EEGRKARGTGELTQLLNSLCTAVKAISSAVR					50
8 HL2	MA-DQAPFDT-----	DVNTLTRFVM-EEGRKARGTGELTQLLNSLCTAVKAISSAVR					50

	70	80	90	100	110	120	
1 SO	RAGISNLTGIQGAVNIQGEDQKKL DVVSNEVFSSCLRSSGRTGIIASEEEDVPVAVEESY						119
2 BV	KAGLAKLIGLAGETNIQEEQKKL DVLSNEVFIKALISSGRTCILVSEEEDEATFVEPSL						100
3 BV1a	KAGLAKLIGLAGETNIQEEQKKL DVLSNEVFIKALISSGRTCILVSEEEDEATFVEPSL						100
4 BV1b	KAGLAKLIGLAGETNIQEEQKKL DVLSNEVFIKALISSGRTCILVSEEEDEATFVEPSL						100
5 BV2	KAGLAKLIGLAGETNIQEEQKKL DVLSNEVFIKALISSGRTCILVSEEEDEATFVEPSL						100
6 HL	KAGIAHLYGIAGSTNVTGDQVKKLDVLSNDLVMNMLKSSFATCVLVSEEDKHAIIVEPEK						110
7 HL1	KAGIAHLYGIAGSTNVTGDQVKKLDVLSNDLVMNMLKSSFATCVLVSEEDKHAIIVEPEK						110
8 HL2	KAGIAHLYGIAGSTNVTGDQVKKLDVLSNDLVMNMLKSSFATCVLVSEEDKHAIIVEPEK						110

	130	140	150	160	170	180	
1 SO	SGNYIVVFDPLDGSSNIDAAVSTGSI FGIYSPNDECIVD-SDHDDSQLSAAEQRCVNV						178
2 BV	RGKYCVVFDPLDGCSNIDCGVSI GTFIGIYMVKD--L-----NNATLD-----DV						143
3 BV1a	RGKYCVVFDPLDGCSNIDCGVSI GTFIGIYMVKDECLPDFGDDSDNTLGTEEQRCIVNV						160
4 BV1b	RGKYCVVFDPLDGCSNIDCGVSI GTFIGIYMVKDECLPDFGDDSDNTLGTEEQRCIVNV						160
5 BV2	RGKYCVVFDPLDGCSNIDCGVSI GTFIGIYMVKDECLPDFGDDSDNTLGTEEQRCIVNV						160
6 HL	RGKYVCFDPLDGSSNIDCLVSVGTIFGIYRKKST-----DEPSEKDAL-----						154
7 HL1	RGKYVCFDPLDGSSNIDCLVSVGTIFGIYSPNDECLPDFGDDSDNTLGTEEQRCIVNV						170
8 HL2	RGKYVCFDPLDGSSNIDCLVSVGTIFGIYSPNDECLPDFGDDSDNTLGTEEQRCIVNV						170

	190	200	210	220	230	240	
1 SO	CQPGDNLLAAGYCMYSSSVIFVLTIGKGVYAFTLDPMYGEFVLTSEKIQIPKAGKIYSFN						238
2 BV	LQPGKNMVAAGYCMYSSSCTLMVSTGSGVNGFTHDPSLGEFILTHPDIKIPKKGKIYSVN						203
3 BV1a	CQPGSNLLAAGYCMYSSSVIFVLTIGKGVVFVFTLDPLYGEFVLTQENLQIPKSGEIYSFN						220
4 BV1b	CQPGSNLLAAGYCMYSSSVIFVLTIGKGVVFVFTLDPLYGEFVLTQENLQIPKSGEIYSFN						220
5 BV2	CQPGKNMVAAGYCMYSSSCTLMVSTGSGVNGFTHDPSLGEFILTHPDIKIPKKGKIYSVN						220
6 HL	-QPGRNLVAAGYALYGSATMLV LAMDCGVNCFMLDPAIGEFILVDKDVKIKKKGKIYSLN						213
7 HL1	CQPGSNLLAAGYCMYSSSVIFVLTIGKGVVFVFTLDPLYGEFVLTQENLQIPKSGKIYSFN						230
8 HL2	CQPGRNLVAAGYALYGSATMLV LAMDCGVNCFMLDPAIGEFILVDKDVKIKKKGKIYSLN						230

	250	260	270	280	290	300	
1 SO	EGNYKMWDKLLKKYMDDLKEPGESQKPYSSRYIGSLVGDFHRTL LLYGGIYGYPRDAKSKN						298
2 BV	EGNAKNWDGPTTKYVEKCKFKPKDGSSPKSLRYIGSMVADVHRTL LLYGGIFMYPGDKKS PN						263
3 BV1a	EGNYKLDENLKKYIDDLKEPGSPGPKPYSSRYIGSLVGDFHRTL LLYGGIYGYPRDKKSKN						280
4 BV1b	EGNYKLDENLKKYIDDLKEPGSPGPKPYSSRYIGSLVGDFHRTL LLYGGIYGYPRDKKSKN						280
5 BV2	EGNAKNWDGPTTKYVEKCKFKPKDGSSPKSLRYIGSMVADVHRTL LLYGGIFMYPGDKKS PN						280
6 HL	EGYAKDFDPAVTEYIQRKKFPNDNSAPYGARYVGS MVADVHRTL VYGGIFLYPANKKSPN						273
7 HL1	EGNYKLDENLKKYIDDLKEPGSPGPKPYSSRYIGSLVGDFHRTL LLYGGIYGYPRDKKSKN						290
8 HL2	EGYAKDFDPAVTEYIQRKKFPNDNSAPYGARYVGS MVADVHRTL VYGGIFLYPANKKSPN						290

	310	320	330	340	350	360	
1 SO	GKLRLLYECAPMSFIVEQA	GGKGS	DGHQRI	ILDIQ	PTEIHQRV	PLYIGSV	EEVEKLEKYL- 357
2 BV	GKLRVLYEVFPMSFLMEQA	GGQAFT	GEQFAL	DLVPKNI	HDRSPV	FLGSYDD	VEDI-KALY 322
3 BV1a	GKLRLLYECAPMSFIVEQA	GGKGS	DGHQRI	VLDIQ	PTEIHQRV	PLYIGST	EEVEKVEKYL- 339
4 BV1b	GKLRLLYECAPMSFIVEQA	GGKGS	DGHQRI	VLDIQ	PTEIHQRV	PLYIGST	EEVEKVEKYL- 339
5 BV2	GKLRVLYEVFPMSFLMEQA	GGQAFT	GEQFAL	DLVPKNI	HDRSPV	FLGSYDD	VEDI-KALY 339
6 HL	GKLRLLYECNP	MAYVMEKA	GGMAT	TGKEAV	LDVIP	TDIHQR	APVILGSPDDVLEFLK-VY 332
7 HL1	GKLRLLYECAPMSFIVEQA	GGKGS	DGHQRI	VLDIQ	PTEIHQRV	PLYIGST	EEVEKVEKYL- 349
8 HL2	GKLRLLYECNP	MAYVMEKA	GGMAT	TGKEAV	LDVIP	TDIHQR	APVILGSPDDVLEFLK-VY 349

1 SO	-----	357
2 BV	AAEQKNA	329
3 BV1A	-----A	340
4 BV1B	-----A	340
5 BV2	AAEQKNA	346
6 HL	E-KHSAQ	338
7 HL1	-----A	350
8 HL2	E-KHSAQ	355

Lámina I. 5. Comparación de la estructura secundaria de la FBPasa cloroplástica de *Spinacia oleracea* (SO), con la de la enzima citosólica de *Beta vulgaris* (BV), enzima humana (HL), así como las quiméricas BV1, BV2, HL1 y HL2.

Hélice alfa, **hoja beta**, **vuelta**, **hélice 3₁₀**, **punto aislado**. La numeración central es una numeración virtual deducida del alineamiento, mientras que la lateral es la real para cada proteína.

El "lazo 170" de la FBPasa cloroplastídica de espinaca se ubica entre dos hojas beta, la E4 (142-149) y la E5 (181-185). Presenta una estructura no determinada, con algunas vueltas. Como en el caso del "lazo 50-72", los residuos no presentan una densidad electrónica en difracción por rayos X.

En el lazo introducido en tres de las FBPasas quiméricas, sin embargo, aparecen hélices 3_{10} en BV1b (148-150, 158-160), BV2 (147-149, 157-159) y HL2 (157-159). El modelo de la estructura secundaria de la FBPasa cloroplastídica de guisante, como en el caso de la enzima de espinaca, no presenta hélices 3_{10} en el "lazo 170".

3. ESTRUCTURA TERCIARIA

3.1. Los modelos

Los modelos de las FBPasas quiméricas generados por homología conformacional están representados en la Lámina I. 6.

3.2. Análisis de los modelos por alineamiento

Se alinean las cadenas principales de las proteínas. El análisis toma en cuenta la desviación entre esas cadenas en RMSD (Relative Mean Square Deviation). Cada aminoácido de la proteína de interés se colorea según la desviación RMS de su cadena alfa con respecto al aminoácido correspondiente de la proteína de referencia. El color azul oscuro significa una buena superposición mientras que el rojo indica una mala superposición. Los colores entre el azul y el rojo indican el grado en la exactitud del alineamiento.

HL1 / 11SPI

Átomos	Número de átomos implicados en el cálculo	RMS en Å
Carbono alfa	333	3.06
Cadena principal	999	2.79

* El computo del RMSD se realizó con el Swiss-PdbViewer según la ecuación :

$$\sqrt{\frac{\sum D^2}{n^{\circ} \text{ Átomos}}}$$

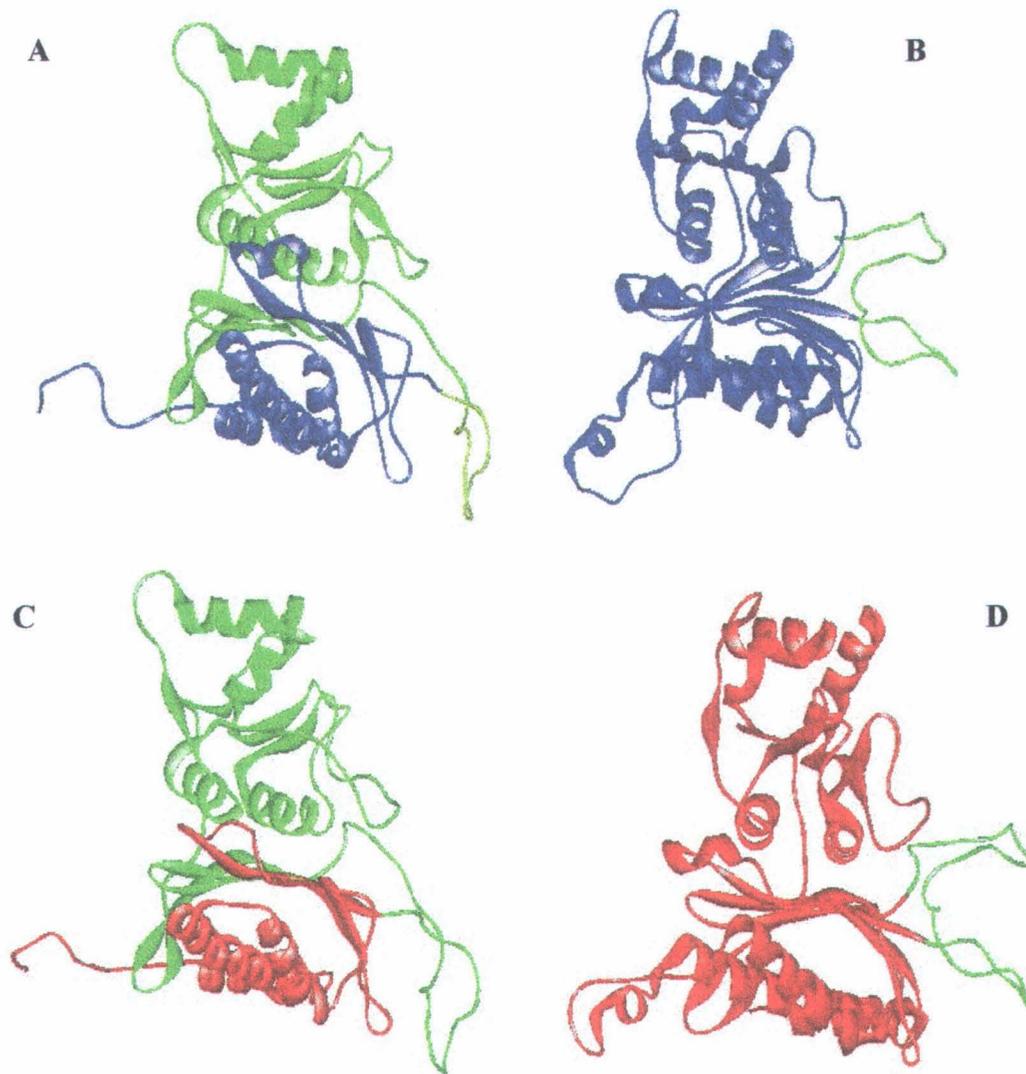


Lámina I. 6. Modelo estructural de las FBPasas quiméricas BV1 (A), BV2 (B), HL1 (C) y HL2 (D). Estas proteínas están compuestas de fragmentos de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris* o **hígado humano**, con fragmentos de la isoenzima cloroplastídica de *Pisum sativum*, (ver 1. 1. Construcción de las FBPasas quiméricas).

D es la distancia en Angstroms entre la pareja de átomos relatados.

El computo requiere seleccionar el mismo número de grupos en cada cadena, puesto que cada aminoácido debe tener su correspondiente, lo que obliga descartar átomos del cálculo cuando las dos cadenas no tienen el mismo número de residuos.

11SPI, se refiere al monómero A del tetramero de la FBPasa cloroplastídica de espinaca (1SPI), estructura resuelta por Villeret *et al.* (1995) a 2.8 Å, factor R: 0.203.

El color blanco de 11SPI (Lámina I. 7) indica que el alineamiento de HL1 con esta estructura presenta el menor RMSD, así que 11SPI nos servirá de referencia para evaluar HL1. HL1 aparece en azul, que significa lo antedicho. Los problemas de alineamiento aparecen sobre todo en la extremidad N terminal de la cadena, al nivel del "lazo 50-72" como hemos mencionado anteriormente.

11SPI y de HL1 comparten el mismo dominio FBP. Sin embargo, aparecen diversos huecos en el alineamiento de éste. Eso significa que la entidad construida no consiste en una justaposición de dominios, sino que la interacción entre esos dominios genera reajustes que no existían en las proteínas silvestres.

HL1 / 21SPI

El alineamiento de HL1 con el monómero B de la FBPasa espinaca (21SPI) enseña que se trata de una buena superposición, pero no óptima como la precedente (Lámina I. 7). Se incrementan los desajustes en toda la cadena, lo que indica que el ángulo entre los dos dominios de la enzima no es el mismo que el de la proteína de espinaca. El alineamiento de HL1 con otras FBPasas citosólicas resulta con un RMS mayor. Así, se puede concluir que el programa modela HL1 como si su estructura ideal se acercara a la de una FBPasa cloroplastídica.

HL2 / 11FTA

Átomos	Número de átomos implicados en el cálculo	RMS en Å
Carbono alfa	317	3.03
Cadena principal	951	2.78

* Se descartaron del cálculo los residuos (Glu136-Phe141, Glu151-Cys162) del "lazo 170", así como Gly53-Gln61 del "lazo 50-72" de BV2, residuos que no forman parte de 11FTA.

11FTA se refiere al monómero A del tetrámero de la FBPasa de hígado humano (1FTA), estructura resuelta por Zhang *et al.* (1993) a 2.3 Å, factor R: 0.200.

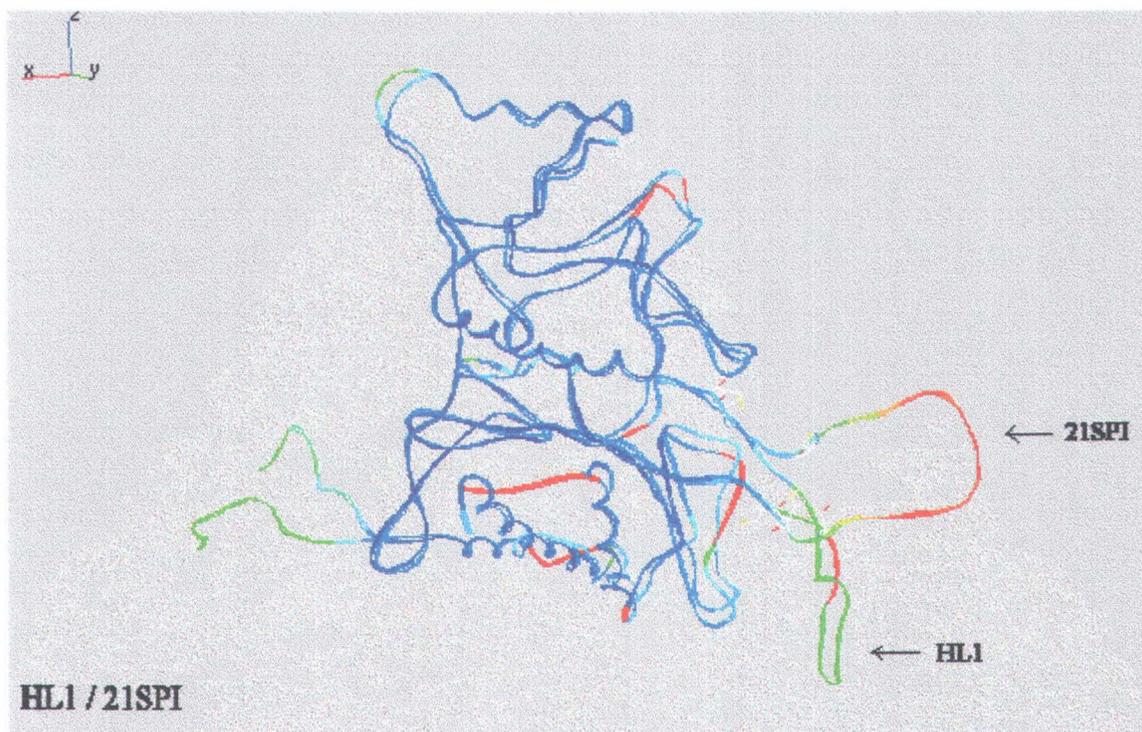
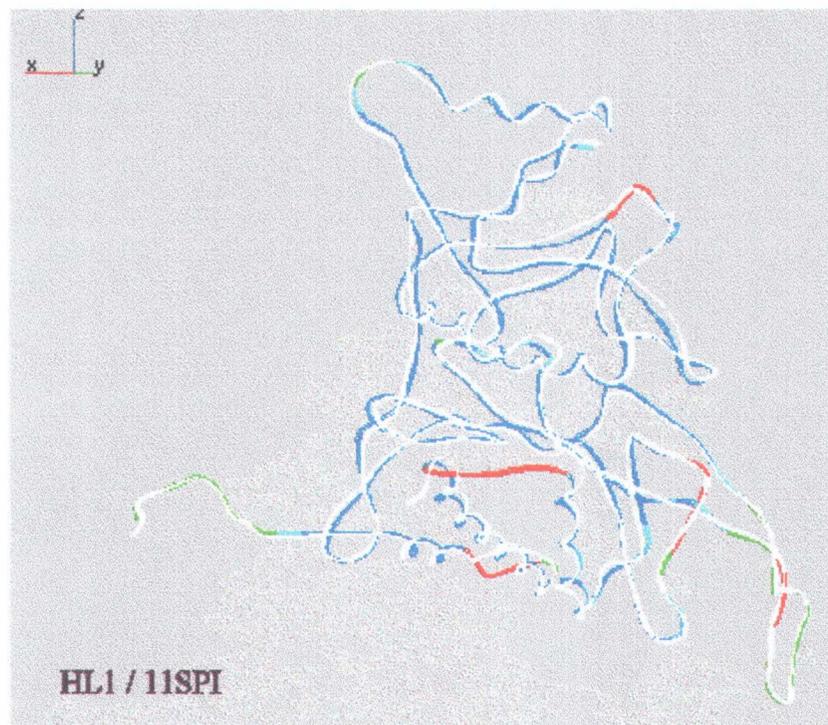


Lámina I. 7. Alineamiento estructural de HL1 con 11SPI y 21SPI.

La entidad 11FTA, única estructura de la proteína humana registrada, sirve de referencia para modelar HL2 (Lámina I. 8). Sobresale el "lazo 170" que está conformado en una estructura intermedia entre la de los lazos de 11SPI y 21SPI. Se nota el desajuste al nivel del "lazo 50-72" por su extensión. Acompañado con AMP, el tetramero de esta proteína está en un estadio alostérico T, y es la única referencia para modelar HL2. La existencia de un tetramero en estadio R hubiera dado elementos suplementarios para una mejor aproximación de los reajustes estructurales que conllevan la inserción del lazo 170 en la proteína humana.

HL2 / 11FSA / 11RDX

11FSA se refiere al monómero A del tetramero de la FBPasa de riñón de cerdo en el estadio alostérico T, con una mutación K42A, estructura resuelta por Lu *et al.* (1996) a 2.3 Å, factor R: 0.184.

11RDX se refiere al monómero A del tetramero de la FBPasa de riñón de cerdo en el estadio alostérico R con una mutación R242A, estructura resuelta por Stec *et al.* (1996) a 2.75 Å, factor R: 0.223.

Existen más datos sobre la FBPasa de cerdo. El alineamiento de las dos estructuras de la proteína gluconeogénica en estadio R (11RDX) y T (11FSA) permite visualizar los cambios que conllevan en la estructura de la proteína (Lámina I. 8). Se observa una diferencia total de RMS entre las dos cadenas principales. Se nota en particular la diferencia de conformación a nivel del "lazo 50-72". El AMP provoca no sólo una torsión del tetramero, sino también reajustes a nivel del monomero.

Según el modelo, la inserción del "lazo 170" en la enzima humana tiene como consecuencia la extensión del "lazo 50-72", que adquiere la misma amplitud que en 11FSA.

BV1 / 11SPI

Átomos de BV1a	Número de átomos implicados	RMS en Å
Carbono alfa	332	16.93
Cadena principal	996	16.81

Átomos de BV1b	Número de átomos implicados	RMS en Å
Carbono alfa	332	2.56
Cadena principal	999	2.32

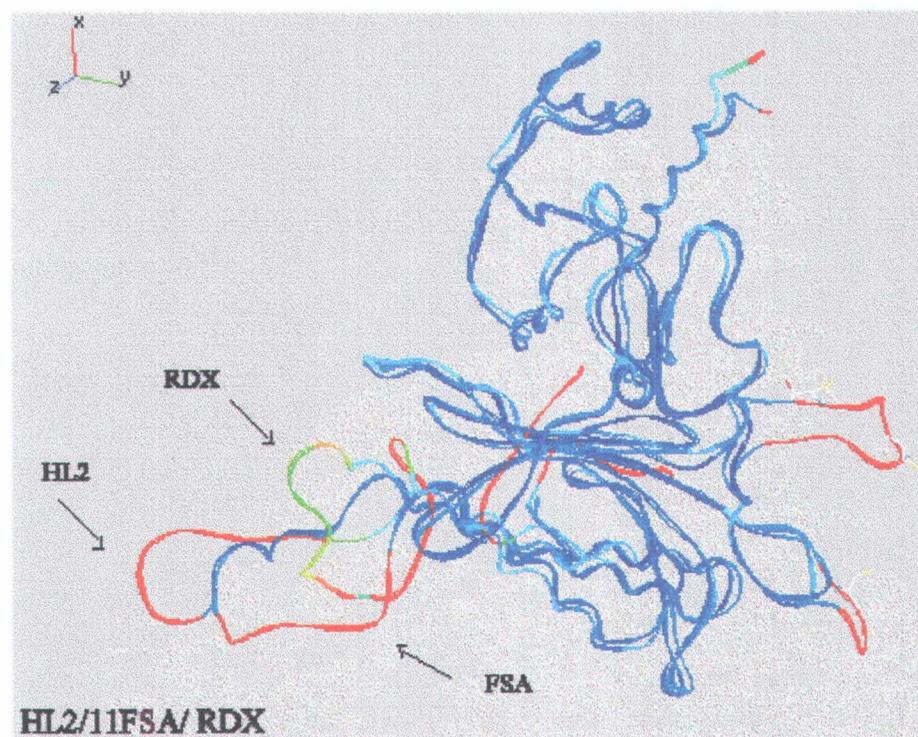
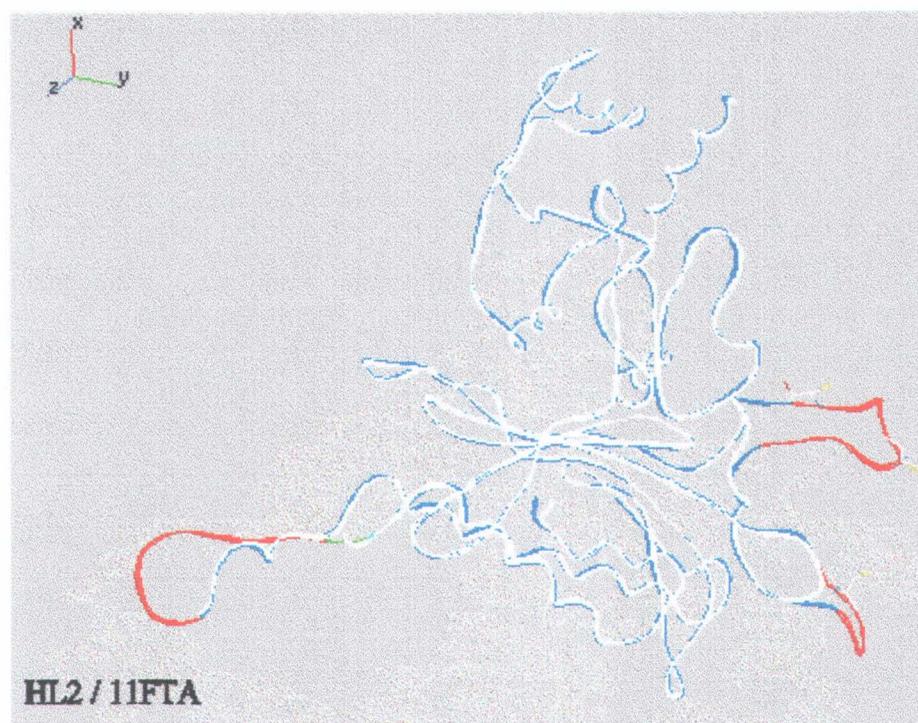


Lámina I. 8. Alineamiento estructural de HL2 con 11FTA, 11FSA y 11RDX.

No existe ninguna FBPasa citosólica de plantas cuya estructura cristalográfica se conozca. Los datos disponibles provienen de proteínas gluconeogénicas, principalmente de la enzima del cerdo (25 estructuras), conejo (1 estructura), humana (1 estructura), y de la cloroplastídica de espinaca. Como en el caso de la entidad HL1, los programas de modelización generan una estructura similar a 11SPI. Se observa la misma discrepancia que en HL1 a nivel del "lazo 50-72" (Lámina I. 9).

BV1 : "Lazo 50-72"

La Lámina I. 10 presenta las propuestas conformacionales para BV1. El "lazo 50-72" de BV1b conserva una estructura clásica, a pesar de la tensión que introduce el alargamiento de H3. BV1a, como también le ocurría a HL1 presenta un lazo truncado.

BV2 / 11FSA

Átomos	Número de átomos implicados	RMS en Å
Carbono alfa	328	3.05
Cadena principal	984	2.77

* Se descartaron del cálculo los residuos (Glu135-Phe140, Glu152-Cys161) del "lazo 170" de BV2, residuos que no forman parte de 11FSA.

La cadena A del tetramero de la proteína de cerdo 1FSA es la referencia del modelo BV2. Como es una proteína que se encuentra en una estructura T, el perfecto alineamiento se extiende incluso al "lazo 50-70". El alineamiento de BV2 con 11RDX aumenta notablemente el RMS al nivel de la cadena principal. Esto confirmaría el perfil conformacional de esta proteína. El "lazo 170" tiene la misma estructura que en de HL2, y presenta la tres cisteínas accesibles al solvente (Lámina I. 9).

4. ESTRUCTURA CUATERNARIA

Los datos precedentes sugieren que las proteínas HL1 y BV1 (Lámina I. 11) tendrían el perfil cuaternario de la FBPasa cloroplastídica de espinaca (1SPI). La estructura del tetramero de HL2 se acercaría a la conformación de la proteína humana (1FTA). El perfil de BV2 tendría como referencia la proteína de riñón de cerdo (1FSA). Se generan los modelos por reconstrucción de coordenadas. Consiste en enlazar fragmentos convenientes en las bases de datos de estructuras conocidas y luego operar

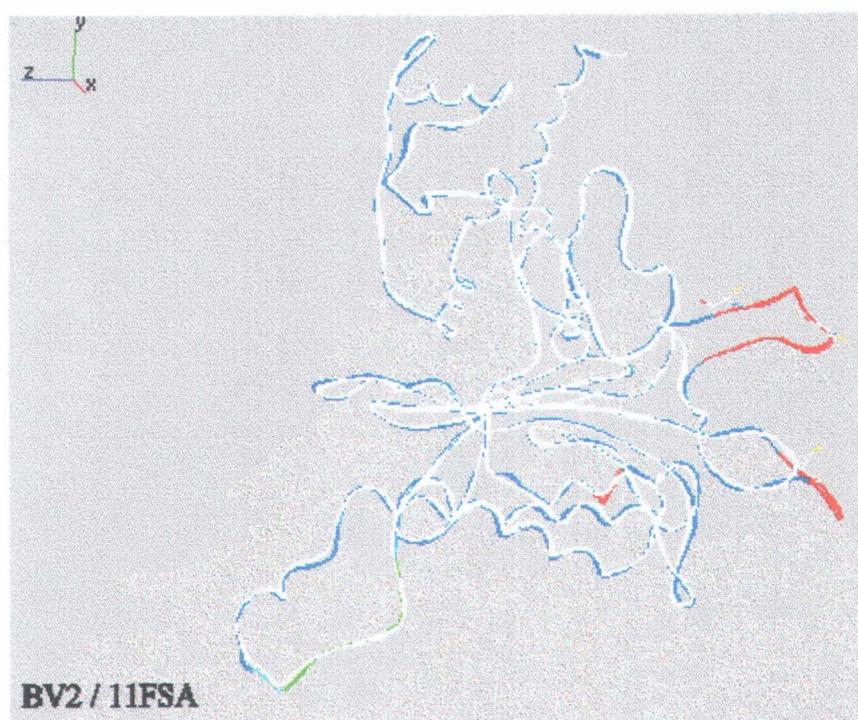
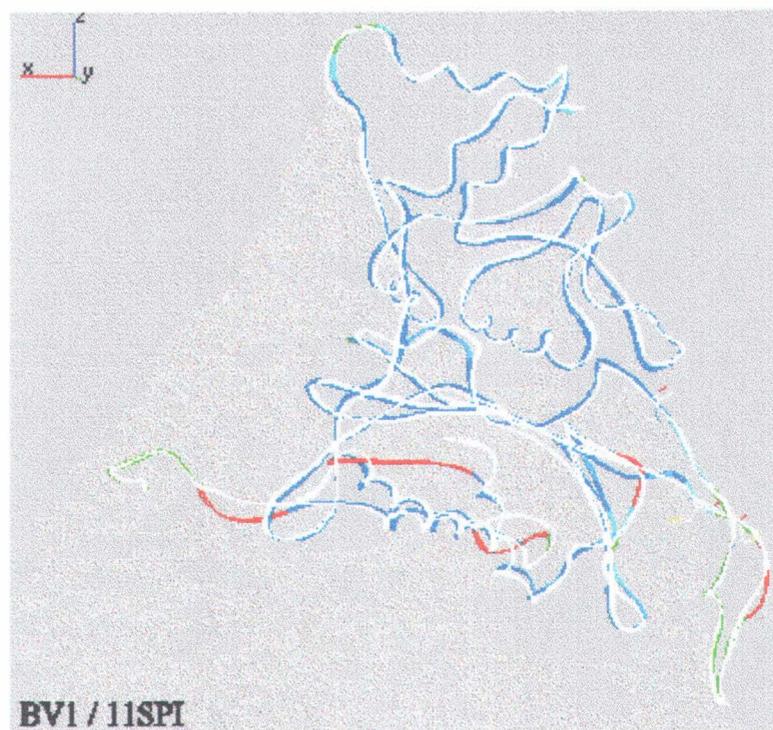


Lámina I. 9. Alineamiento estructural de BV1 con 11SPI, y de BV2 con 11FSA.

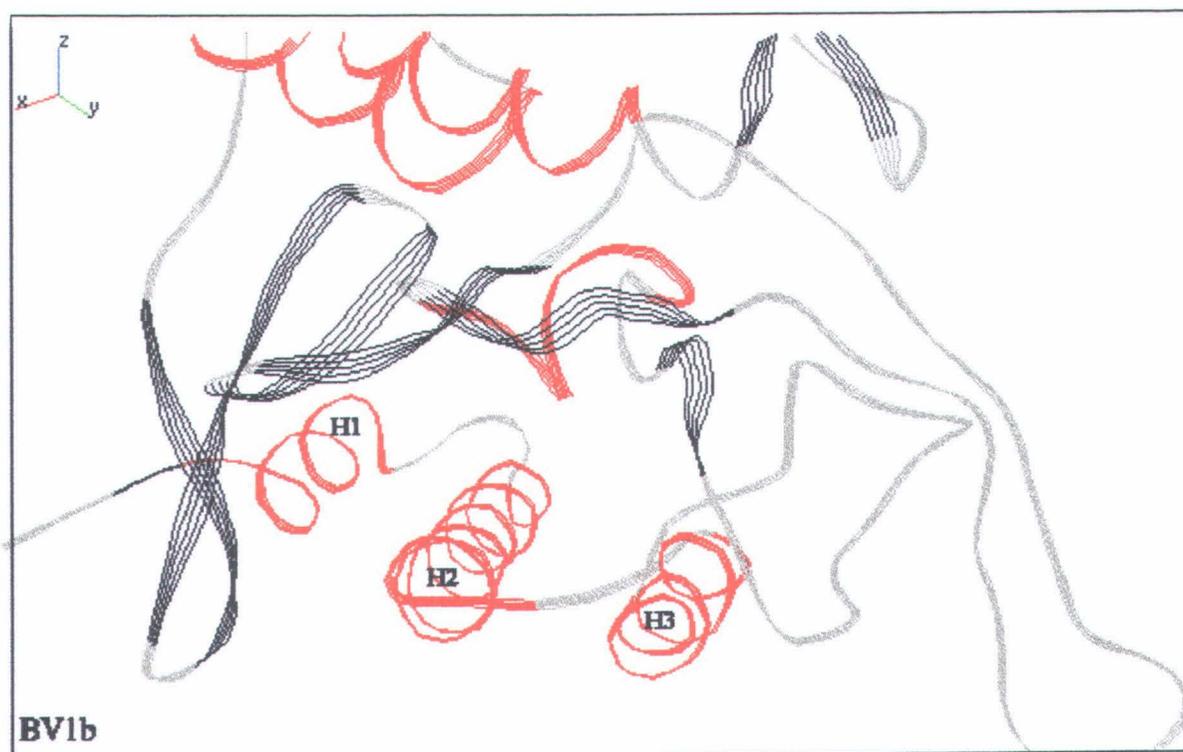
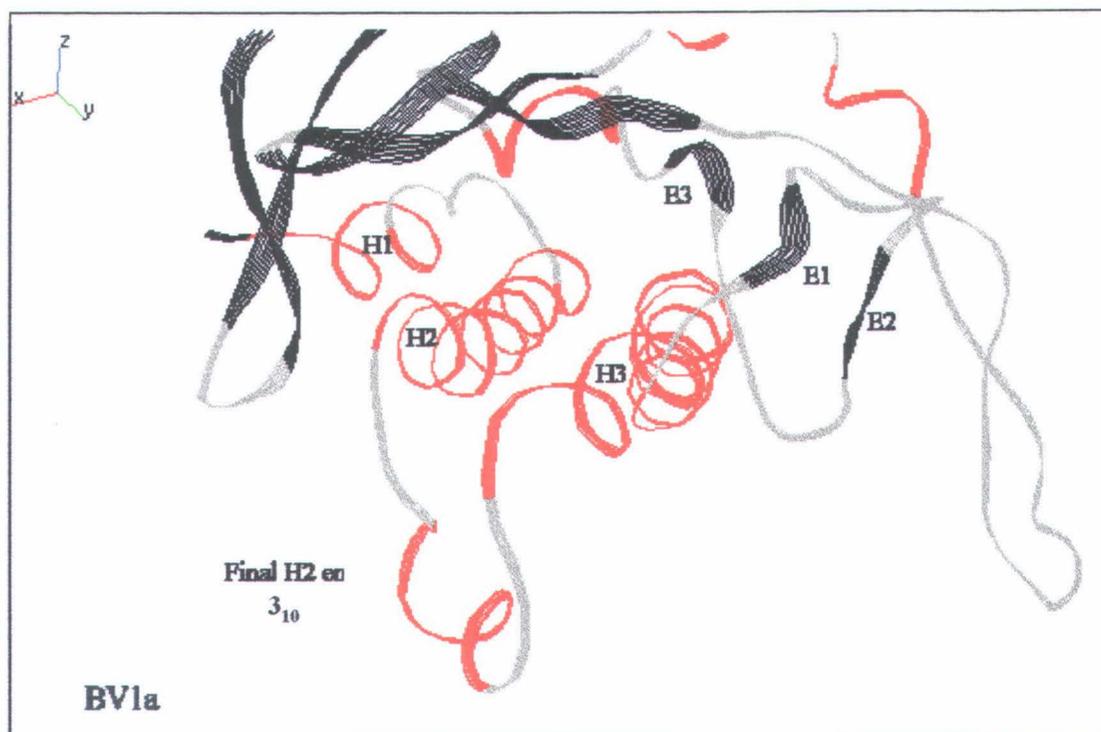
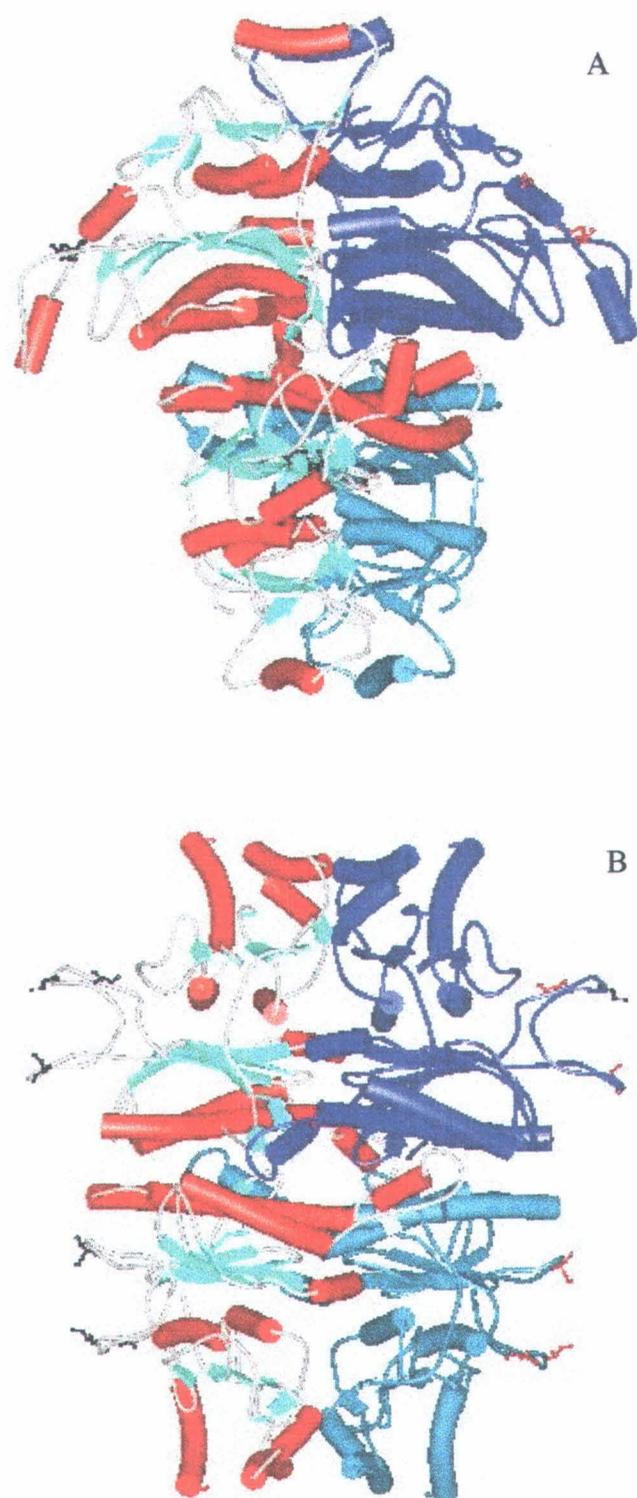


Lámina I. 10. Conformación del lazo 50-72 en BV1a y BV1b.



Lamina I. 11. Perfil teórico de la estructura tetramérica de BV1 o HL1 (A), y BV2 o HL2 (B), generadas por reconstrucción de coordenadas atómicas.

una minimización de energía para corregir las distorsiones introducidas (Jones y Thirup, 1986).

5. VERIFICACIÓN DE LOS MODELOS

5.1. Angulos de torsión

La conformación de una cadena polipeptídica puede ser diseñada en buena aproximación en términos de ángulos de rotación en la cadena principal. Esos ángulos se definen como sigue:

- El ángulo φ es una rotación alrededor del enlace N-C α ;
- ψ es una rotación alrededor del enlace C α -C;
- ω es una rotación alrededor del enlace peptídico.

En general, el enlace se encuentra peptídico en una conformación *trans* ($\omega = 180$ grados), y sólo en algunos casos aparece la conformación *cis* ($\omega = 10$ grados) en la cual está implicada una prolina.

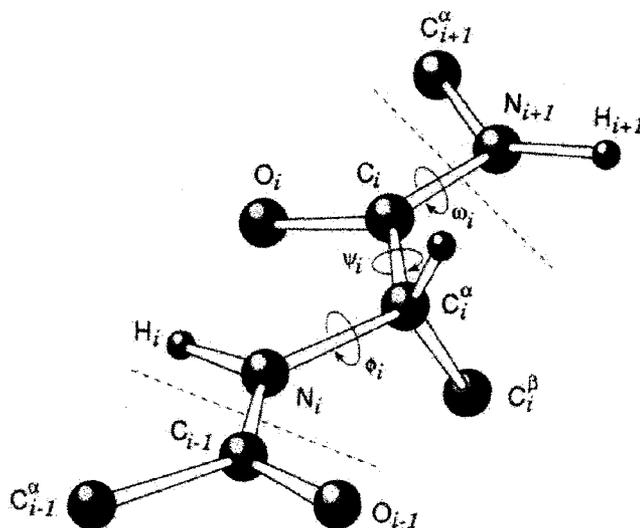


Figura.I. 1. Fragmentos de una cadena polipeptídica en una conformación extendida con $\omega = \psi = \varphi = 180$ grados.

5.2 Representación de Ramachandran

En un polipeptido los enlaces de la cadena principal N-C α y C α -C pueden girar libremente. Esas rotaciones son representadas por los ángulos de torsión ϕ y ψ . Ramachandran y Sasisekharan (1968) utilizaron modelos de pequeños polipéptidos para encontrar conformaciones estables, variándolas de manera sistemática. Los átomos fueron considerados como esferas sólidas y sus dimensiones correspondientes a sus radios de van der Waals. Los ángulos que llevan las esferas a chocar corresponden a conformaciones de la cadena principal que no permiten las leyes estereoquímicas.

La representación de esos ángulos de conformación genera un diagrama de Ramachandran (Lámina I. 12). Hay dos áreas "normales" (en rojo) que corresponden a conformaciones en las cuales no hay colapso estérico. Se tratan de **A** (Right handed alpha-helix) y **B** (Beta-sheet). En **A** se alojan las estructuras alfa_R, las hélices 3_{10} y π . En **B** se encuentran las hojas beta paralelas y anti-paralelas, las poliProlina I y II, así como la poliGlicina II. En **L** se colocan las estructuras alfa_L, y en **p** las épsilon. Las áreas en amarillo son regiones adicionales que representan conformaciones calculadas con un radio de van der Waals más pequeño.

En el área L (Left handed-helix) algunos residuos adoptan ocasionalmente esta conformación. Se trata en general de glicina, aunque se encuentran también la asparagina o el ácido aspártico, cuyas cadenas laterales forman un enlace hidrogeno, con la cadena principal y, por consiguiente, estabilizan esta conformación que, de lo contrario, no sería favorable.

Las áreas no favorables (en blanco) suponen colapsos de la cadena lateral con la cadena principal. La glicina, que carece de cadena lateral, puede adoptar ángulos ϕ y ψ en los 4 cuadrantes de la representación de Ramachandran. Además, se encuentra con frecuencia la glicina, en vueltas en donde otro residuo, tendría impedimentos estéricos.

Áreas	1SPI		1FTA		1FSA	
	Número de Residuos	%	Número de Residuos	%	Número de Residuos	%
Más favorables [A, B, L]	674	59.3**	993	90.4	475	81.1*
Permitidas adicionales [-a, -b, -l, -p]	362	31.8	100	9.1	101	17.2
"Generosamente" permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	81	7.1	4	0.4	8	1.4
No permitidas	20	1.8*	2	0.2*	2	0.3*
Residuos diferentes de glicina y prolina	1137	100	1099	100	586	100
Residuos terminales (Pro y Gly excluidas)	16		12		4	

Resultados

Glicina	108		100		54	
Prolina	56		60		30	
Número total de residuos	1317		1271		674	
	BV1a		BV1b		HL1	
Areas	Número de Residuos	%	Número de Residuos	%	Número de Residuos	%
Más favorables [A, B, L]	236	83.7	217	76.4	220	77.2
Permitidas adicionales [-a, -b, -l, -p]	40	14.2	53	18.7	52	18.2
“Generosamente” permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	4	1.4	6	2.1	6	2.1
No permitidas	2	0.7	8	2.8	7	2.5
Residuos diferentes de glicina y prolina	282	100	284	100	285	100
Residuos terminales (Pro y Gly excluidas)	2		2		2	
Glicina	34		34		33	
Prolina	14		14		14	
Número total de residuos	332		334		334	

Areas	BV2		HL2	
	Número de Residuos	%	Número de Residuos	%
Más favorables [A, B, L]	243	83.2	260	87.5
Permitidas adicionales [-a, -b, -l, -p]	45	15.4	35	11.8
“Generosamente” permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	2	0.7	2	0.7
No permitidas	2	0.7	0	0.0
Residuos diferentes de glicina y prolina	292	100	297	100
Residuos terminales (Pro y Gly excluidas)	2		2	
Glicina	34		29	
Prolina	16		16	
Número total de residuos	344		344	

Tabla.I. 2. Estadísticas de la representación de Ramachandran de las diferentes entidades proteicas. Un modelo de buena calidad debe presentar más de 90 % en las regiones más favorables [A, B, L]. Observación basada a partir del análisis de 118 estructuras resueltas por lo menos a 2.0 Å, y con un factor R que no supera el 20 %.

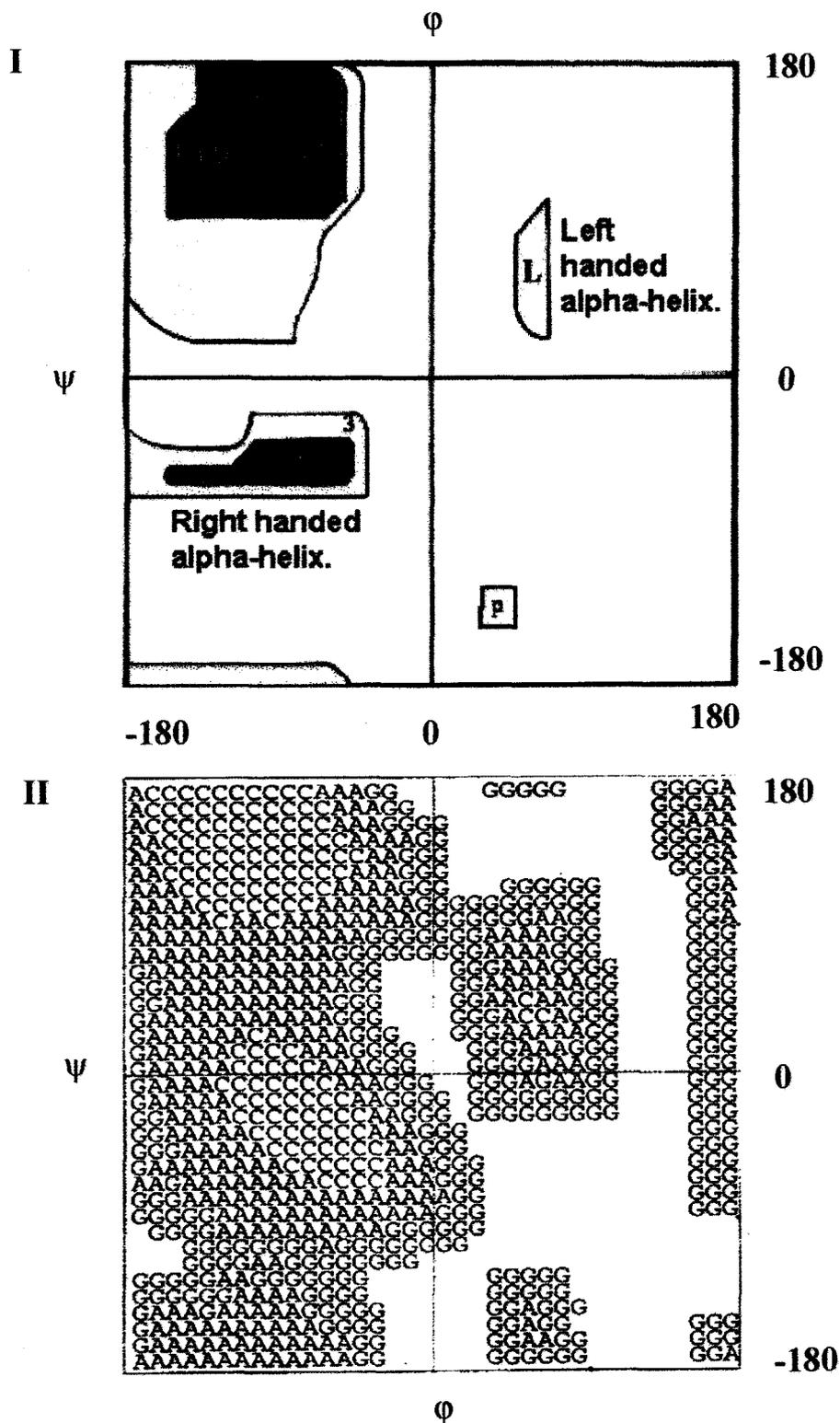


Lámina I.12. Representación de Ramachandran de la distribución de los ángulos de torsión (I). Atribución de áreas: (II) permitidas C (core); permitidas adicionales A (allowed); generosamente permitidas G (generous). En blanco, áreas no permitidas.

5. 3. El factor G

El factor G proporciona una medida de la “normalidad” de las características estereoquímicas de una estructura. Procheck calcula los datos siguientes relativos a los ángulos de torsión (Figura I. 2):

- Combinación ϕ - ψ ;
- Combinación χ_1 - χ_2 ;
- Torsión χ_1 de los residuos que carecen de χ_2 ;
- χ_3 combinada y ángulos de torsión χ_4 ;
- Ángulos de torsión ω .

Con respecto a la geometría covalente:

- Longitud de los enlaces de la cadena principal;
- Ángulos de los enlaces de la cadena principal.

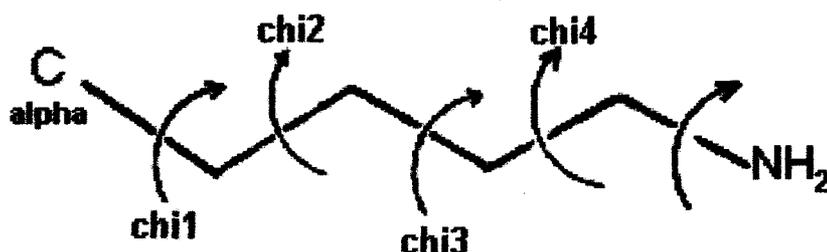


Figura I. 2. Representación de los ángulos de torsión de la cadena lateral. Estos se denominan χ_1 (χ_1), χ_2 (χ_2), χ_3 (χ_3), etc. El ángulo χ_1 está sujeto a ciertas restricciones que derivan de impedimentos estéricos entre el átomo gamma de la cadena lateral y la cadena principal. Las diferentes conformaciones de la cadena lateral son función de χ_1 y se denominan *gauche* (+), en la cual el átomo γ de la cadena lateral está opuesto al grupo carbonil de la cadena principal [$\chi_1 = -60$ grados], *trans*, en la cual el átomo γ está opuesto al nitrógeno de la cadena principal [$\chi_1 = 180$ grados], y *gauche* (-) [$\chi_1 = 60$ grados]. La mayoría de los aminoácidos adoptan las conformaciones *gauche* (+) y *trans*, ya que la *gauche* (-) es inestable, puesto que el átomo γ está cerca de los grupos CO y NH de la cadena principal. En general los ángulos χ_2 tienen una distribución trimodal, similar a χ_1 (+/- 60 y 180 grados) cuando el carbono γ es tetraédrico.

La “normalidad” del factor G de los ángulos de torsión ha sido establecida sobre la base del análisis de 163 cadenas proteicas no homólogas resueltas por rayos X a una resolución de 2.0 Å o mejor, y con un factor R no superando el 20 %. El análisis proporciona la distribución de los valores de ϕ - ψ , χ_1 - χ_2 , χ_1 , χ_3 , χ_4 y ω de cada uno de los 20 tipos de aminoácidos. Esas distribuciones se dividen en células. El número de observaciones en cada célula se utiliza para calcular la probabilidad que un tipo de

residuo tenga una combinación ϕ - ψ dada. Las probabilidades se utilizan para computar un grado de discrepancias para cada célula. Estas pueden adicionarse, lo que permite establecer promedios significativos.

Para la longitud y el ángulo de la cadena principal, el factor G se computa utilizando los promedios y las desviaciones estándar de Engh y Huber (1991), establecidos para pequeñas moléculas.

Así el factor G, que establece un grado de rareza basado en la distribución de los parámetros estereoquímicos, permite evaluar la conformación de una estructura. Un factor G bajo indica una conformación con baja probabilidad. Por ejemplo, residuos colocados en las áreas no permitidas de la representación de Ramachandran tendrán un factor G bajo o muy negativo. Cuando una proteína presenta muchos residuos con un bajo factor G, sugiere que algo pasa con su geometría total.

	1SPI		1FTA		1FSA	
	Score	Score medio	Score	Score medio	Score	Score medio
Distribución ϕ - ψ	- 1.47**		- 0.21		- 0.60*	
Distribución χ_1 - χ_2	- 1.10**		- 0.31		- 0.57*	
χ_1 únicamente	- 0.29		-0.02		- 0.21	
χ_3 Y χ_4	0.23		0.36		0.40	
ω	0.42		-0.09		0.50	
		0.53*		- 0.12		- 0.11
Longitud de enlaces de las cadenas principales	0.31		0.44		0.50	
Angulos de enlaces de la cadena principal	- 0.11		- 0.56*		0.21	
		0.07		- 0.14		0.33
Promedio total		- 0.28		- 0.09		0.07

	BV1a		BV1b		HL1	
	Score	Score medio	Score	Score medio	Score	Score medio
Distribución ϕ - ψ	- 0.54		- 0.69		- 0.75	
Distribución χ_1 - χ_2	- 0.54		- 0.27		- 0.25	
χ_1 únicamente	- 0.12		- 0.20		- 0.07	
χ_3 Y χ_4	0.37		0.33		0.44	
ω	- 0.99		- 0.74		- 0.68	
		- 0.55		- 0.48		- 0.46
Longitud de enlaces de las cadenas principales	0.51		0.38		0.38	
Angulos de enlaces de la cadena principal	- 0.52		- 0.10		- 0.11	
		- 0.09		0.10		0.10
Promedio total		- 0.34		- 0.24		- 0.23

	BV2		HL2	
	Score	Score medio	Score	Score medio
Distribución ϕ - ψ	- 0.40		- 0.31	
Distribución χ_1 - χ_2	- 0.18		- 0.03	
χ_1 únicamente	0.06		0.05	
χ_3 Y χ_4	0.51		0.42	
ω	- 0.60		- 0.39	
		- 0.29		- 0.18
Longitud de enlaces de las cadenas principales	0.39		0.38	
Angulos de enlaces de la cadena principal	0.01		- 0.05	
		0.17		0.13
Promedio total		- 0.10		- 0.05

Tabla.I.3. Factor G de las diferentes entidades proteicas. Este factor proporciona una medida de la "normalidad" de las propiedades de una estructura. $G < - 0.5^*$ es inhabitual. $G < - 1.0^{**}$ es altamente inhabitual.

6. INTERACCIÓN

El objetivo de esas construcciones proteicas es generar entidades modulables por reductores, como el DTT o la tiorredoxina. Con el propósito de analizar la accesibilidad del "lazo 170" insertado, al solvente en general y a la tiorredoxina en particular, se ha empleado el algoritmo GRAMM para probar por simulación la posibilidad de acoplar la tiorredoxina a dicho lazo.

Se presentan dos problemas a la hora de analizar acoplamientos moleculares a partir de coordenadas atómicas. El primero es inherente a la relativa inexactitud de los datos estructurales obtenidos por difracción de rayos X, debido a la flexibilidad natural de los fragmentos, baja resolución de la estructura, imperfecciones del cristal, etc. Además, conviene tener en cuenta que un fichero de coordenadas atómicas es una imagen tridimensional fija de una estructura. Cuando se forma un complejo, ocurre un reajuste conformacional, local o general, del receptor y ligando. Este reajuste no siempre se puede poner en evidencia.

El segundo problema es el número de falsos positivos con respecto a la posición del ligando, determinada cristalograficamente. Para disminuir éstos, hay que realizar un reajuste de la metodología (Material y Métodos, IV).

Nuestra pretensión en este trabajo es llevar a cabo una rápida exploración de la interacción de la tiorredoxina *f* de guisante con las FBPasas quiméricas. Se trata de generar complejos entre las entidades, y de analizar la distribución de las nubes de puntos representados por el centro de gravedad de la Trx *f* alrededor de la FBPasa. Luego se analizará la interacción de los puntos en el área del “lazo 170”.

En esta experiencia se generan interacciones entre la estructura HL2 y el modelo de la Trx *f* de guisante (Lámina I. 13). Se trabaja con el monómero para que éste sirva de test de convalidación del algoritmo para las presentes estructuras, y también para reducir el tiempo de cálculo. De otra parte, no se seleccionan las zonas de interacción entre las dos entidades, sino que se deja que se desarrolle la experiencia de manera estocástica, utilizando así la totalidad de la superficie de las estructuras.

6.1 Acoplamiento geométrico

En el acoplamiento con parámetros geométricos, la interacción con el “lazo 170” se manifiesta inmediatamente. El análisis de la distribución del centro de gravedad de Trx *f* (Lámina I. 14 A) enseña que el 30 % de las interacciones tienen lugar con el “lazo 170”. No obstante, la Trx *f* puede acoplarse en otros lugares de la estructura. En efecto, existe una nube de puntos en el área C terminal, así como en la N terminal y el “lazo 50-72” (Tabla.I 4). Este resultado significa que el algoritmo es capaz de reconocer las zonas sobresalientes de una estructura, así como las áreas que presentan los criterios suficientes para formar un complejo de tipo geométrico.

La modelización de la interacción geométrica utiliza todos los residuos en el ensayo. A causa de ello genera unos falsos positivos que compiten con los complejos reales. De todas forma, los criterios geométricos no pueden ser suficientes para explicar la eficiencia de la Trx *f* en la activación de la enzima cloroplastídica, ya que intervienen otros componentes en la interacción.

Área	Nº puntos
C-terminal	38
N-terminal y “lazo 50-72”	32
“lazo 170”	30

Tabla I.4. Distribución de las posiciones del ligando con respecto a la FBPasa HL2 en los 100 primeros intentos.

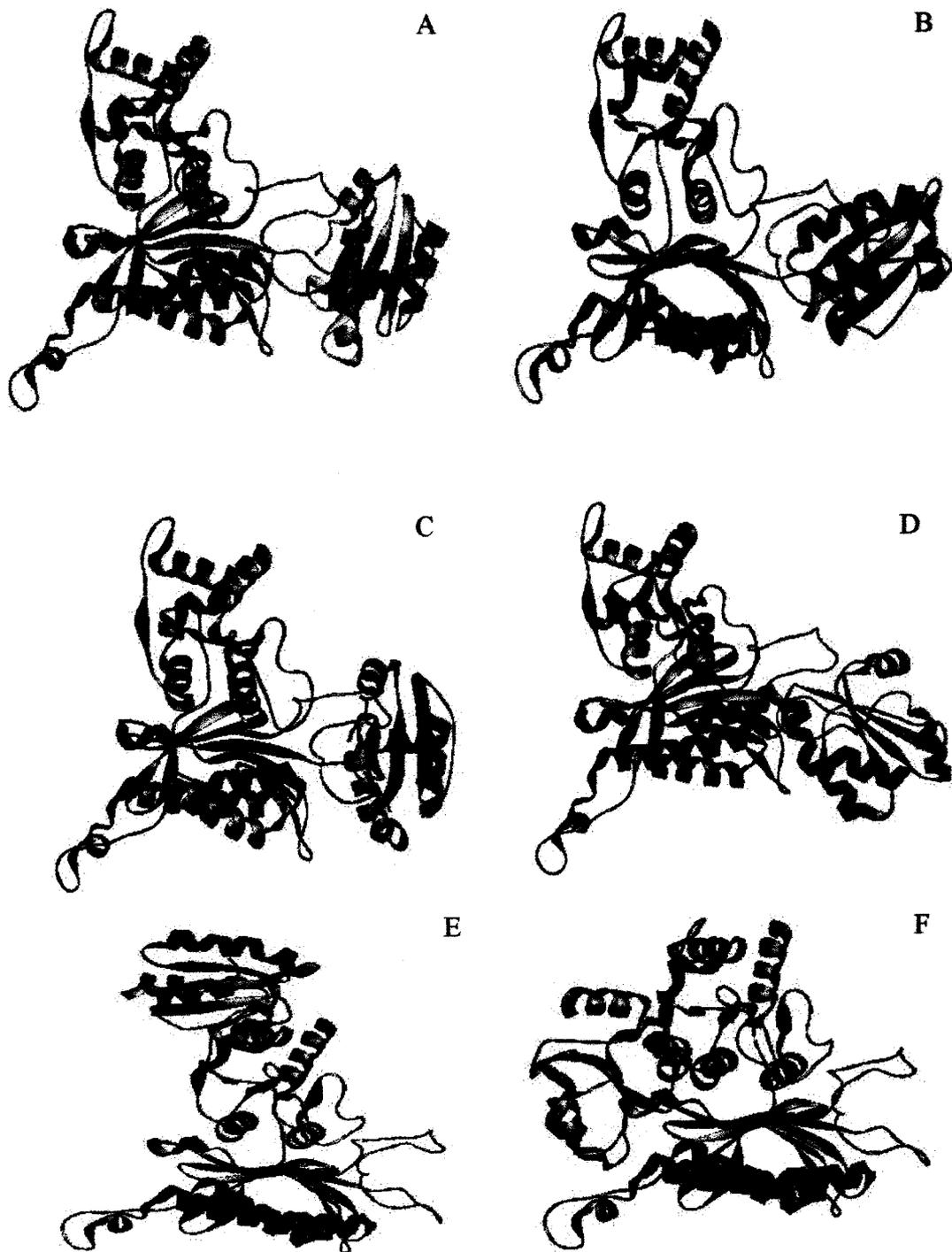


Lámina I.13. Diferentes tipos de complejos HL2-Trx *f* generados por el algoritmo GRAMM. A-D: Complejos de tipo geométrico o hidrofóbico de la Trx *f* con el “lazo 170”. E: Acoplamiento de la Trx *f* con residuos de la parte C-terminal de HL2. F: Complejo de tipo hidrofóbico o de baja resolución en una zona interfacial del dímero.

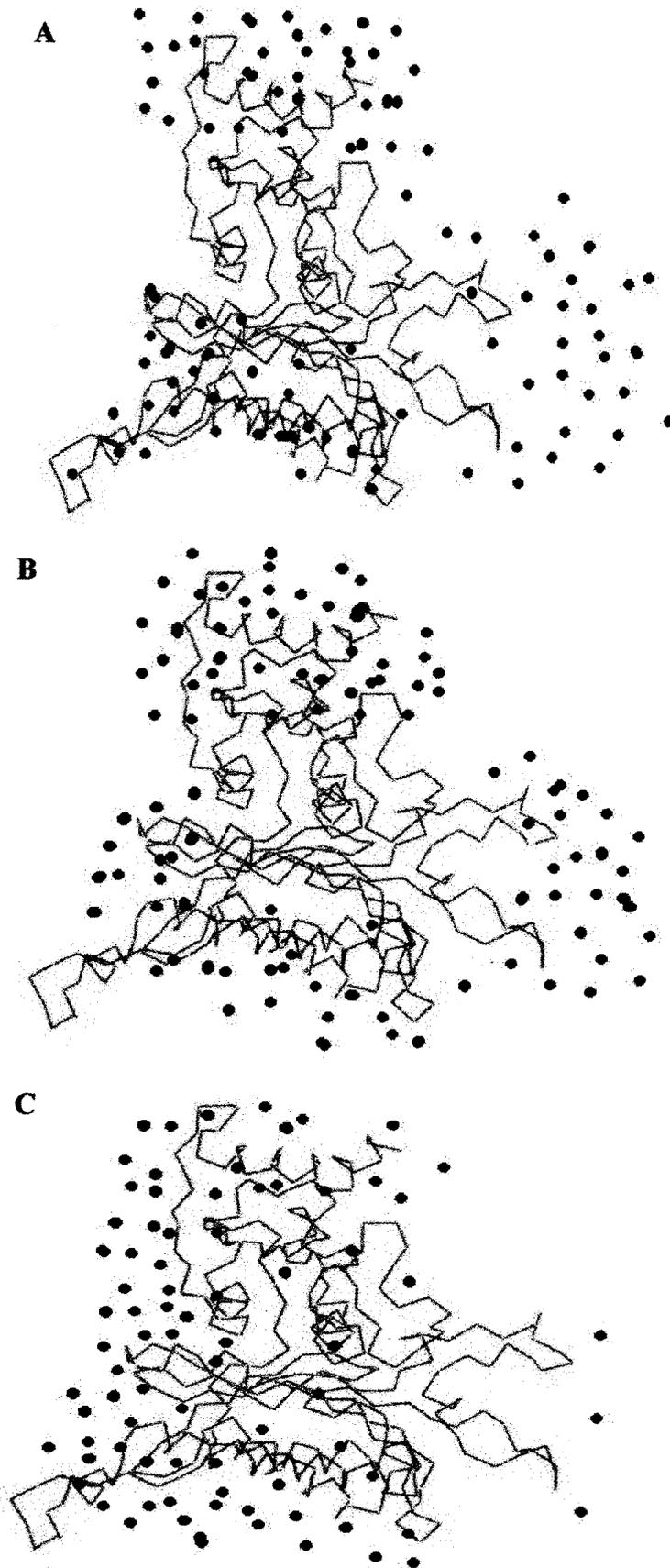


Lámina I.14.
Acoplamiento geométrico (A), hidrofóbico (B), y de baja resolución (C), entre la Trxf con HL2. Distribución de los 100 primeros complejos. Los puntos (•) representan el centro de gravedad de la Trxf con respecto a HL2.

Donador		Aceptor		Distancia (Å)	
CYS Trx <i>f</i>	60 SG	ARG HL2	26 O		2.82
THR HL2	28 N	ILE Trx <i>f</i>	73 O		1.97
THR HL2	28 OG1	ILE Trx <i>f</i>	73 O		3.24
LYS Trx <i>f</i>	74 NZ	GLU HL2	30 OE2		3.05
TYR HL2	114 OH	GLY Trx <i>f</i>	72 O		1.61
ILE Trx <i>f</i>	87 N	ASN HL2	143 O		1.84
CYS HL2	146 SG	ASN Trx <i>f</i>	88 O		3.08
LYS Trx <i>f</i>	86 NZ	THR HL2	161 OG1		2.99
CYS HL2	171 SG	THR Trx <i>f</i>	105 O		2.68
GLN HL2	172 N	VAL Trx <i>f</i>	88 O		3.27
LYS Trx <i>f</i>	93 NZ	ARG HL2	175 O		2.14
CYS Trx <i>f</i>	93 SG	ASP HL2	196 OD2		1.45

Tabla I.5. Analisis de los enlaces de hidrógeno a nivel de los residuos de la primera superficie, en el complejo de tipo geométrico (n° 14) entre la Trx *f* y el “lazo 170” de HL2 (Lámina I. 15). Los átomos son representados por su letra inicial H, C, N, O, etc. El rango de los átomos se nombra según el orden del alfabeto griego alfa (A), beta (B), gamma (G), delta (D), etc.

El diagrama generado por el algoritmo Ligplot de los residuos en interacción en el complejo número 14 (HL2gf14) enseña que 2 de las 3 cisteínas protagonistas del “lazo 170” están en la primera superficie de contacto con la Trx *f* (Lámina I. 15). Las 2 cisteínas reactivas de la Trx *f* se ubican en el hueco del “lazo 170”, así que no pueden aparecer en la primera superficie. No obstante, la cisteína 33 está implicada en las interacciones hidrofóbicas en este complejo. Este ejemplo demuestra la posibilidad de acercar las cisteínas reactivas de las dos entidades en un complejo, utilizando criterios geométricos a nivel de los residuos de la primera superficie.

6.2. Acoplamiento hidrofóbico

En este tipo de ensayo, trabajando con un monómero, provocamos una competencia artificial a favor de las áreas interfaciales del monómero implicadas en las interacciones que estabilizan el dímero y el tetrámero y, por ello, comportan un elevado número de residuos hidrofobos. A pesar de eso, el reparto sigue el mismo esquema anterior (Lámina I. 14 B). Un 24 % de los complejos conciernen al “lazo 170”, y la primera ocurrencia con éste se produce en el noveno intento. Se nota un leve descenso de las interacciones con el “lazo 170”, y un incremento de la ocurrencias a nivel de las áreas interfaciales. Si el acoplamiento geomético genera falsos positivos por utilizar todos los residuos, el hidrofóbico realiza una mejor selección de los átomos susceptibles de interaccionar. El resultado confirma la existencia de un componente hidrofóbico en la interacción entre la Trx *f* y el “lazo 170”.

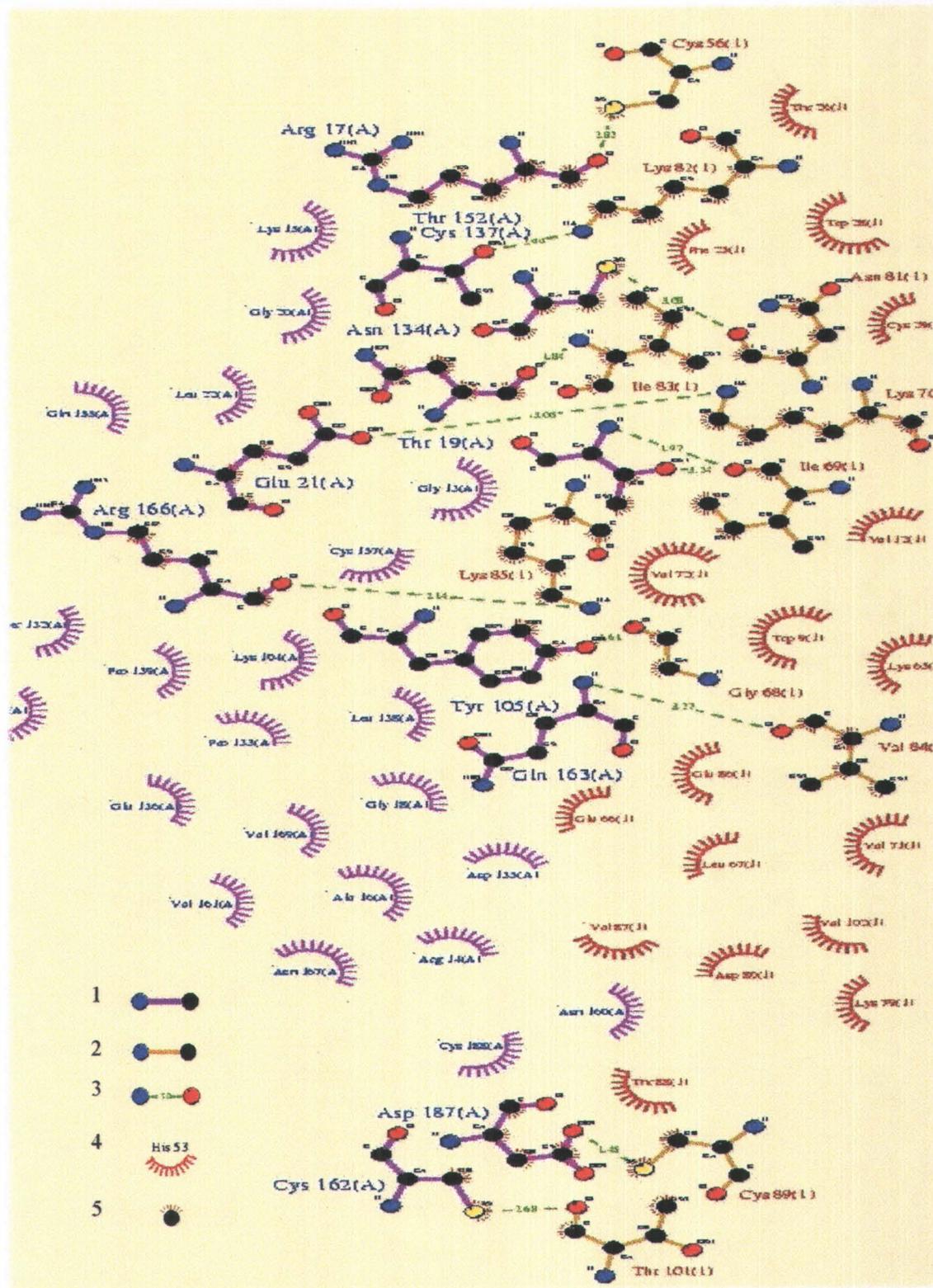


Lámina I. 15. Diagrama de las interacciones en el complejo de tipo geométrico HL2gf14. En rojo los residuos de la Trx *f*, y en morado los de HL2. Hay que añadir 4 al número del residuo de Trx *f* para que éste corresponda a la realidad. De igual modo, hay que añadir 9 a la numeración de HL2. 1. Residuos de primera superficie; 2. Residuos de segunda superficie; 3. Enlace hidrógeno y su longitud; 4. Residuos implicados en interacción hidrofóbica; 5. Átomos correspondientes implicados en la interacción.

Área	Nº puntos
C-terminal	44
N-terminal y "lazo 50-72"	32
"lazo 170"	24

Tabla I. 6. Distribución de las posiciones del ligando con respecto a la FBPasa HL2 en los 100 primeros intentos.

Donador		Aceptor			Distancia (Å)	
ARG	HL2 111	NH1	PRO Trx.f	41	O	2.88
CYS	Trx.f 36	N	PRO HL2	142	O	1.29
THR	Trx.f 26	OG1	ASN HL2	143	O	1.98
ASP	HL2 144	N	CYS Trx.f	33	O	3.15
ILE	Trx.f 39	N	GLU HL2	145	OE2	2.78
ALA	Trx.f 39	N	GLU HL2	145	OE2	2.81
ASP	Trx.f 27	N	ASP HL2	149	OD1	3.18
PHE	Trx.f 29	N	PHE HL2	150	O	2.64
GLN	Trx.f 62	N	GLN HL2	164	OE1	3.22
GLN	HL2 164	NE2	ASP Trx.f	59	OD2	2.06
ARG	HL2 165	NH2	GLU Trx.f	6	O	2.82
CYS	HL2 166	SG	CYS Trx.f	60	O	3.12
LYS	Trx.f 69	NZ	CYS HL2	166	SG	2.93

Tabla I.7. Enlaces de hidrógeno entre los residuos de la primera superficie del complejo de tipo hidrofóbico nº 17 (Lámina I. 16) entre la Trx.f y HL2.

El diagrama del complejo 17 (HL2hf17) generado por Ligplot enseña que las dos cisteínas reactivas (33 y 36) de la Trx.f están en primera superficie (Lámina I. 16). La cisteína 166 del "lazo 170" se encuentra en la misma área, y la 146 está implicada en la interacción hidrofóbica. Este otro ejemplo sugiere la posibilidad de interacción entre las cisteínas protagonistas de las dos entidades, dado que por el juego de los reajustes locales los residuos pueden ser llevados a su sitio idóneo.

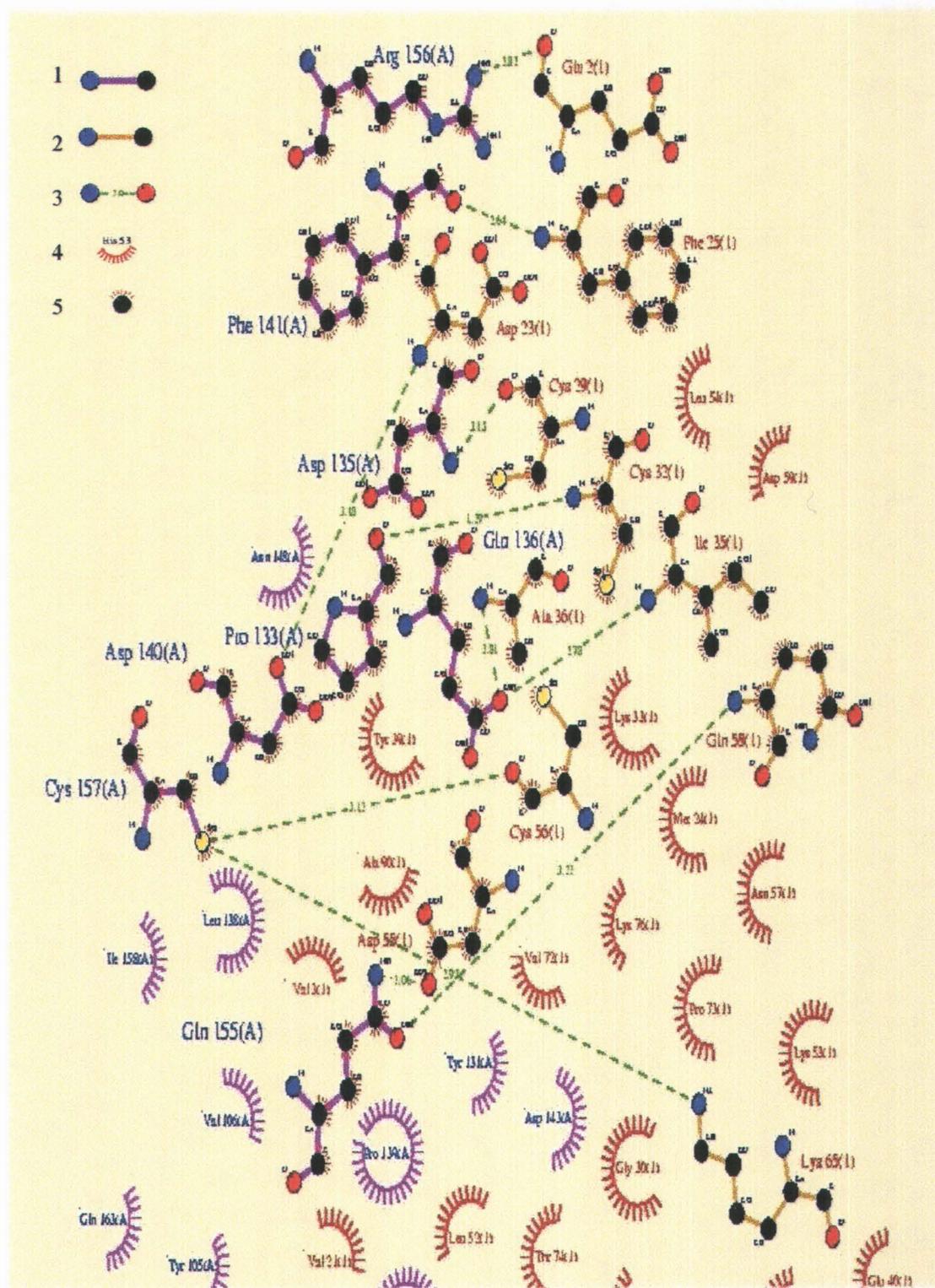


Lámina I. 16. Diagrama de unas interacciones en el complejo de tipo hidrofóbico HL2hf17.

En rojo los residuos de la Trx *f* y en morado los de HL2. Hay que añadir 9 al número de los residuos de HL2, y 4 a los de Trx *f*, para que la numeración del diagrama corresponda a la real.

1. Residuos de primera superficie; 2. Residuos de segunda superficie; 3. Enlace hidrógeno y su longitud; 4. Residuos implicados en interacción hidrofóbica; 5. Átomos correspondientes implicados en la interacción.

6.3. Acoplamiento de baja resolución

En este último ensayo la competencia a favor de las áreas interfaciales es aún mayor. Efectivamente, la minimización de los residuos hidrofílicos en la interacción que comporta este método, concentra las interacciones en las zonas interfaciales del monómero y reduce por lo tanto el número de impactos positivos con el “lazo 170” (Lámina I. 14 C). Este resultado pone de relieve el componente puramente hidrofóbico del “lazo 170” en la interacción con este ligando, resultado que, como el precedente, indica que el algoritmo GRAMM identifica las áreas de la BPasa HL2 según su grado de hidropatía.

Área	Nº puntos
Interfaz	57
“lazo 170”	3
Otra	40

Tabla I. 8. Distribución de las posiciones del ligando con respecto a la FBPasa HL2 en los 100 primeros intentos.

I. II. DISCUSIÓN

Las herramientas de la bioinformática permiten diseñar entidades proteicas y establecer de manera previa sus características estructurales. Este trabajo se propone estudiar FBPasas citosólicas quiméricas construidas por inserción de un fragmento vinculado a la modulación redox de la proteína cloroplastídica implicada en la fotosíntesis. Las preguntas que nos sirvieron de guía fueron las siguientes. ¿Cuál es la estructura más probable de cada una de esas entidades? ¿Están conformes sus estructuras a las leyes estereoquímicas para ser viables? Tratándose de enzimas quiméricas, ¿cuáles son las características heredadas, o nuevas, que permiten identificarlas?

1. ESTRUCTURA PRIMARIA

Una etapa importante en la caracterización de una proteína es su identificación por medio de anticuerpos específicos. Los algoritmos ubican los sitios antigénicos responsables del acoplamiento con anticuerpos en los lazos hidrofílicos de la superficie de la proteína. El cálculo de la hidrofílicidad media de segmentos a lo largo de la cadena proteica, según el método de Parker *et al.* (1986), sugiere algunas conclusiones. Si las zonas de mayor hidrofílicidad corresponden a los epítomos, debería existir reacción inmunológica cruzada entre la FBPasa humana y la enzima del cloroplasto de *Pisum sativum*, la misma razón por la que el anticuerpo contra la FBPasa cloroplastídica de espinaca reconoce a la enzima de rata. El análisis del perfil antigénico de las FBPasas quiméricas construidas sugiere que esas entidades podrían ser identificadas por un anticuerpo contra la enzima humana, o contra la enzima del cloroplasto de guisante.

Se ha puesto de evidencia que los anticuerpos contra la FBPasa cloroplastídica de trigo (*Triticum aestivum*) y de guisante no reconocen la enzima citosólica (Raines *et al.*, 1988; Sahrawy *et al.*, 1990). Lo mismo ha sido observado con el anticuerpo contra la FBPasa citosólica de espinaca con respecto a las enzimas cloroplastídicas de espinaca, guisante, soja, remolacha y maíz (Fonolla *et al.*, 1994; Hur *et al.*, 1997). De otra parte, un anticuerpo monoclonal contra la FBPasa cloroplastídica recombinante de trigo presenta reacción cruzada con extractos foliares de otras variedades de trigo (*Triticum spelta*, *T. durum*), y con preparaciones homogéneas de *Spinacia oleracea* y *Brassica napus* (Hagelin *et al.*, 1996). Estas reacciones cruzadas del anticuerpo monoclonal con enzimas de diferentes especies vegetales indica la persistencia de un epítomo común. El reconocimiento de la FBPasa de mamífero por el anticuerpo de la enzima cloroplastídica se debe también a un epítomo común, lo que indica una mayor cercanía entre las enzimas cloroplastídica y de mamífero, que entre las restantes parejas. Esto sugiere que a la hora de generar árboles filogenéticos, habrá que tener en cuenta datos estructurales, y no sólo información relativa a la estructura primaria de las entidades analizadas.

2. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

La predicción de la conformación de proteína a partir de secuencia de aminoácidos, se basa en la idea que la estructura de proteína nativa corresponde a un sistema en equilibrio termodinámico con una energía libre de Gibbs mínima (Anfinsen, 1973). De otra parte, un número limitado de plegados se encuentra en la ruta de conformación de proteína a pesar de las infinidades posibles (Levinthal, 1968). Factores biológicos como disulfur-isomerasa o chaperonina, reducen la barrera de energía de transición de conformación y protegen plegamientos intermediarios de la agregación. La hipótesis termodinámica y la paradoja de Levinthal, han estimulado la investigación computacional en la predicción de estructura tridimensional de proteína, teniendo en cuenta que no hay necesariamente un camino recto entre secuencia, estructura y función (Thornton, 1995).

Los métodos para obtener información sobre la estructura de proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos se desarrollan rápidamente. De momento, se reparten en 4 categorías. La primera se basa como ya hemos dicho, en la modelización por homología, por la que se establece la estructura de una proteína diana a partir de una o varias estructuras conocidas, cuando hay una clara relación secuencial entre ambas (Johnson *et al.*, 1994; Bajorath *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1994). La segunda es el reconocimiento conformacional (threading), o conformación inversa, cuyo objetivo es obtener un modelo tridimensional lo más correcto posible alineando los residuos de la secuencia diana con las coordenadas de una base de datos estructurales conocida (Jones *et al.*, 1992; Lermer *et al.*, 1995). La tercera, la predicción estructural *ab initio*, difiere de las dos precedentes en la medida en que se basa en técnicas diversas, generándose la estructura de la proteína diana sin el uso directo de estructura conocida. Los métodos utilizados van desde la simulación atómica hasta predicciones basadas en estadística de residuos. Los métodos *ab initio* generan predicciones a diferentes niveles de detalle y exactitud, reflejando los problemas no resueltos (Rooman *et al.*, 1991; Benner *et al.*, 1994). La última categoría concierne la predicción del modo de asociación de ligandos y proteínas por acoplamiento (docking) (Vakser y Aflalo, 1994; Vakser, 1996a, 1996b, 1996c). La conformación por homología, junto con la conformación inversa, es la técnica más desarrollada y eficiente. Generan modelos relevantes del cuerpo proteico, aunque no siempre consiguen un diseño correcto de los lazos que integran los elementos de estructura secundaria. Para ello se han desarrollado otros algoritmos que llevan a cabo esta tarea (Rosenbach y Rosenfeld, 1995).

Estos métodos son, de cierto modo, complementarios. En efecto, la aplicación de la modelización por homología está a menudo limitada por la falta de estructuras conocidas con suficiente similitud secuencial con la proteína diana. La conformación inversa puede superar esta dificultad en determinados casos. Se están desarrollando métodos híbridos, asociando ambas técnicas, con resultados apreciables (Aszodi *et al.*, 1997).

La modelización de la estructura de las FBPasas quiméricas se realizó por SWISS-MODEL, que es una estación de modelización de proteínas por homología. Este

servidor está totalmente automatizado, no requiriendo intervención humana en el proceso. Dispone de herramientas siguientes: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (Altschul *et al.*, 1991), SIM (Similarity) (Huang y Miller, 1991), y ProMod II (Protein Modelling) (Peitsch, 1995), para alineamiento de secuencias. Comparan los modelos con PoMod /ProMod II. La minimización de energía se realiza por medio de Gromos 96 (van Gunsteren *et al.*, 1996). La evaluación del modelo está a cargo del cliente, ya que SWISS-MODEL no proporciona este servicio; el SWISS-PDBViewer dispone de las herramientas para ello.

La extrapolación de la estructura de las FBPasas quiméricas se hizo con respecto al perfil más relacionado, la familia inositol-monofosfatasa / fructosa-1,6-bisfosfatasa (Zhang *et al.*, 1993). Un perfil se compone de un alineamiento estructural múltiple de secuencias. Cada posición contiene información relativa al tipo de residuo más adecuado, así como las posiciones del perfil que más toleran los huecos. Aparecen también divergencias. Hay posiciones altamente conservadas y otras sujetas a variabilidad. Estas están, en general, expuestas al solvente y pueden orientarse con un grado de variabilidad dependiente de las cadenas laterales. Al contrario, los aminoácidos cuya posición es muy conservada pueden estar implicados en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína, o participar en el acoplamiento de sustrato, cofactor u otros subunidades de la proteína. En el tratamiento de una entidad, el perfil dará más peso a las regiones conservadas que a las demás, tales como lazos, y vueltas, etc.

El alineamiento de las FBPasas quiméricas con este perfil pone de relieve las zonas menos conservadas, y, por lo tanto, más sujetas a variabilidades. Se trata esencialmente del fragmento incluido entre la extremidad N-terminal y la hélice H3. Esas discrepancias se notan sobre todo en HL1 y BV1. A nivel funcional esta zona, junto con el "lazo 170", son las dos regiones que diferencian las citosólicas de sus homólogas cloroplastídicas. El hecho de juntar dos heterodominios genera esta dificultad de alinear correctamente las secuencias.

El alineamiento de las quiméricas con el perfil ha generado modelos cuyo RMSD mínimo corresponde a 11SPI para HL1 y BV1, 11FSA para BV2 y 11FTA para HL2. La extensión del "lazo 50-72" en BV2 y HL2 es propia de FBPasas con una estructura alostérica T.

El "lazo 170", como todas las estructuras de este tipo, resulta difícil de predecir con seguridad. El lazo corresponde a la parte más flexible de la entidad y, por ello, presenta un factor B elevado. Este factor es un indicador de la vibración de los átomos en el cristal. La densidad electrónica de un átomo baja con la vibración térmica. B, expresado en Å^2 , indica que la desviación del movimiento es solamente en la dirección perpendicular al plano de reflexión, y describe una área circular. En general, un factor de temperatura por encima de 50 Å^2 indica que la posición atómica es poco definida. El límite superior del factor B se fijó en 100 Å^2 . Un valor de 100 Å^2 significa que la posición atómica no es definida. En la estructura de Villeret *et al.* (1995), el "lazo 170" presenta una alta temperatura cristalográfica, o sea, es poco definido. Así que no se puede esperar una mejor definición de este lazo en las quiméricas que la que presenta la referencia 1SPI.

La conformación del lazo es también muy dependiente de la orientación de las estructuras secundarias que le bordean (Srinivasan, 1991). La diferencia del “efecto borde” en el caso de las quiméricas debe ser mínima en la medida en que está insertado en cada caso entre las hojas beta E4 y E5, correspondiente a su ubicación en la proteína silvestre. No obstante, la existencia de hélices 3_{10} en y al final del lazo de BV1B y HL1 llaman la reflexión siguiente. Se trata de saber si el “lazo 170”, insertado en otro contexto que el silvestre, conserva la conformación que le proporciona la flexibilidad y accesibilidad que le permite interactuar con moléculas como la tiorredoxina o el DTT.

3. EVALUACIÓN DE LOS MODELOS

La evaluación de las calidades estructurales de un modelo es la última etapa en el proceso de modelización. Para evaluar los modelos de las FBPasas quiméricas, hemos seguido, en lo que era posible, las recomendaciones establecidas por el “Second Meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction” (CASP2, Asilomar, 1996; <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), (Dunbrack *et al.*, 1997; Venclovs *et al.*, 1997), así como las de SWISS-MODEL.

La modelización por homología puede ser considerada como una serie de etapas relacionadas, comportando: alineamiento de secuencia, elección de moldes, construcción de las diferentes partes de la proteína (cuerpo, lazos y cadenas laterales), y minimización de energía. Cada etapa del proceso tiene consecuencia en la siguiente, de modo que errores cometidos en las primeras fases condicionarán la calidad final del modelo. La primera tarea en la modelización por comparación consiste en buscar todas las estructuras proteicas relacionadas con la diana, algunas de las cuales servirán de moldes. Esta tarea es facilitada por la existencia de bases de datos, como PIR (George *et al.*, 1986), GENBANK (Burks y Burks, 1988), SWISS-PROT (Bairoch y Boeckmann, 1991), PDB (Abola *et al.*, 1987), así como de algoritmos para la búsqueda exhaustiva y comparación de la diana con cada una de las secuencias de la base de datos. En el alineamiento, se utilizan programas comerciales como ICM (Cardozo *et al.*, 1995), COMPOSER de Tripos o MODELLER de MSI (Sali y Brunell, 1993), programas más populares basados en el método de Smith-Waterman (BESTFIT de GCG), de Needleman-Wunsch (FASTA, GAP), de hidden Markov (CLUSTALW), o programas caseros. El alineamiento secuencia/secuencia tiene siempre mayor identidad que el alineamiento estructura/estructura. En efecto, en el primero, se optimiza la secuencia, mientras que el segundo, se optimiza algo que presenta otro grado de complejidad, la superposición estructural. Colecciones de alineamientos facilitan el uso y el desarrollo de la predicción por homología (Sali y Overington, 1994). Una vez identificadas las estructuras relacionadas con la diana, la segunda tarea consiste en generar un alineamiento múltiple de la diana con todos los moldes potenciales. Esta etapa es importante, puesto que la calidad del alineamiento determinará la exactitud del modelo tridimensional. De este alineamiento se genera un patrón que servirá para construir el modelo. Los tres “componentes” de la proteína diana (el cuerpo constituido por las regiones más conservadas, las cadenas laterales y los lazos) son conformados a partir de estructuras homólogas, o equivalencias encontradas en los moldes o en los bases de datos.

La evaluación de este tipo de modelo, tras la etapa de minimización de energía, indica que los errores típicos de la predicción estructural por comparación son de 4 tipos (Sali *et al.*, 1995). El primero se debe al empaquetamiento de cadenas laterales. Los otros tres se relacionan con un desplazamiento o distorsión de regiones correctamente alineadas con los moldes (lazos, hélices o láminas), con segmentos que no encontraron equivalentes en ninguno de los moldes (i.e. inserción de lazos), o con regiones que han sido alineadas de manera incorrecta con los moldes (lazos o segmentos más largos, con una baja similitud en los moldes). En general, los tres últimos tienden a desaparecer a medida que aumenta el porcentaje de identidad entre la diana y los moldes.

De lo antedicho se deduce la importancia de un correcto fundamento en el grado de identidad secuencial. El problema del alineamiento constituye la mayor fuente de error en la modelización por homología (Johnson *et al.*, 1994). Se ha establecido el 50 % como un valor de calidad. En efecto, en esta zona de similitud se espera una desviación de 1 a 1.5 Å de la cadena principal. Por debajo del 50 % de identidad la desviación de las zonas no relacionadas crece de manera importante (Hilbert *et al.*, 1993).

La calidad del modelo es también función de la bondad del perfil utilizado. En ello intervienen los diferentes moldes. Una estructura experimental puede ser utilizada como molde si es exacta y relevante. La mejor medida de la exactitud de una estructura vendrá dada por la comparación de la misma determinada de manera independiente en diferentes laboratorios, con una resolución de 2 Å como máximo, y un factor R que no supere el 20 %. Esa comparación mostrará que las zonas ordenadas presentan una desviación de unas décimas de Å. En las zonas menos ordenadas, en cambio, pueden presentarse problemas de posicionamiento de la cadena principal, así como de las laterales. La relevancia hace referencia a los datos relativos al entorno del cristal que se han incorporado en las informaciones relativas a la estructura, tales como la presencia de un ligando, residuos en contacto con los bordes del cristal, etc.

El factor R se refiere al acuerdo entre el modelo y los datos experimentales a partir de los cuales fue generado. En efecto, tras la obtención de los datos de difracción, hay que construir un modelo de la proteína correspondiente al mapa de densidad electrónica experimental, y que éste quepa dentro de las leyes estereoquímicas que definen valores ideales de longitud de enlaces, de ángulos de enlaces, de distancia de interacción de van der Waals, etc. Este proceso, denominado de "refinamiento", emplea herramientas estadísticas para determinar la conformidad del modelo con los datos experimentales y los valores estereoquímicos. La desviación entre el modelo y los datos reales se denomina factor R o residuos cristalográficos. Un factor R del 20% indica que el modelo es probablemente correcto, siendo excelente si es del 15%.

Otra forma de verificar la calidad de un molde es por medio de las coordenadas atómicas. Estas proporcionan varios parámetros tanto globales como locales para evaluar la calidad intrínseca de la estructura. Los parámetros globales son la distribución de ángulos de torsión ϕ , ψ y χ_1 así como la energía de enlace hidrógeno. Los parámetros locales se refieren a los ángulos ϕ de la prolina, la planaridad de los enlaces peptídicos, la longitud y el ángulo de torsión χ_3 de los puentes disulfuros. Esos parámetros constituyen una buena guía de la calidad de una estructura, junto con los 2 parámetros claves que son la resolución y el factor R. Hay una clara correlación entre

esos parámetros. Cuando sube la resolución, la distribución de los parámetros globales se reduce, y la longitud de los enlaces y los ángulos de torsión vuelven a coincidir con valores estereoquímicos aceptados como normales (Morris *et al.*, 1992).

En lo que respecta a los modelos teóricos de las FBPasas quiméricas, el porcentaje de identidad entre las dianas y los moldes supera el 70 %, lo que cumple con los criterios precedentes. El alineamiento que se hizo con el perfil más relacionado, el de la inositol-monofosfatasa/fructosa-1,6-bisfosfatasa, muestra un RMSD de coordenadas aceptable a nivel de la cadena principal y de los carbonos alfa. El color azul de la cadena principal en el alineamiento estructural significa lo antedicho. Una desviación mayor se observa a nivel de los lazos. Estas desviaciones caben dentro de aquéllas observadas entre las subunidades de un mismo tetrámero. Se puede concluir que los modelos teóricos coinciden con modelos estructurales de FBPasas. Este dato supone que la inserción del lazo introduce pocos cambios en el cuerpo de la estructura tridimensional. No obstante, este primer criterio no es suficiente, puesto que un bajo RMSD no garantiza una normalidad de las características estereoquímicas de las entidades, aunque un RMSD elevado tampoco es indicativo de problemas estructurales. Esto puede provenir de una referencia inadecuada.

La distribución de los ángulos ϕ y ψ , representada en el diagrama de Ramachandran, constituye una buena guía de la calidad de una estructura con respecto a lo que se observa en las demás estructuras. La referencia 1FTA es el caso típico de una buena estructura, ya que presenta más del 90 % de los residuos en el área [A, B, L]. 1FSA se acerca a dicho valor con 81 %, lo que contrasta con 1SPI, que presenta solamente un 59 %. El análisis de la estructura de 1SPI por el algoritmo de evaluación WHAT IF indica que la estructura de esta proteína ha sido resuelta correctamente, pero su "refinamiento" fue bastante pobre. En consecuencia, esta estructura será incorrecta o inhabitual.

El análisis de PROCHECK indica que los modelos de HL2 y BV2 son más acertados que los de BV1 y HL1. En particular, HL2 presenta 87.5 % de los residuos en el área [A, B, L], y 0 en las áreas no permitidas. La representación de Ramachandran permite evaluar las dos soluciones de BV1. El modelo de BV1a, que presenta un 83.7 % de los residuos en la zona [A, B, L], es más conforme que los datos de BV1b (76.4 %). HL1 y BV1b presentan la misma característica, lo que denota que las calidades estereoquímicas de la cadena principal de ambas entidades son relativamente pobres, características que pueden provenir del molde 1SPI. En cualquier aquel caso, convendría descartar 1SPI como molde hasta que se cristalice y resuelva correctamente otra FBPasa cloroplastídica, ya que no se deben establecer conclusiones generales a partir de una sola estructura. Estas características pueden también provenir de las calidades intrínsecas de las entidades, a saber, que la construcción de tipo X1, implicando la unión de dos heterodominios, no permite obtener una enzima con calidades estereoquímicas suficientes. En aquel caso es probable que precipiten la mayoría de esas proteínas expresadas en *E. coli*.

El factor G constituye otro índice de normalidad, combinando parámetros globales y locales. En todo caso, las características de los modelos de las FBPasas quiméricas son conformes a las que han sido establecidas a partir de estructuras correctas. Hay que

destacar, de nuevo, la mejor conformidad de HL2 y BV2 respecto a los criterios de calidad aceptados.

4. INTERACCIÓN

Basándose en los datos precedentes, se ha utilizado el modelo HL2 y el de la tiorredoxina *f* de guisante, para evaluar las interacciones entre esas dos entidades, en general, y en particular, la posibilidad de acoplamiento al nivel del "lazo 170" tal cual modelizado. Esta experiencia ha sido realizada con el algoritmo GRAMM, uno de los tres programas que lograron identificar correctamente el acoplamiento de la diana T0018 de CAPS2 (Dunbrack *et al.*, 1997). Ensayos de acoplamiento estocástico generan un 30 % de complejos con el lazo, con criterios geométricos y 24 % con criterios hidrofóbicos. Este resultado pone de evidencia la posibilidad de la interacción entre esas dos entidades en el área del lazo, sin descartar otras posibilidades. El análisis de los residuos por el algoritmo Ligplot enseña que, en general, en los complejos formados las cisteínas reactivas de las dos entidades están en la primera superficie de contacto, lo que constituye un buen punto de partida para una posible interacción. Para confirmar ésta haría falta que el lazo de HL2 tenga la conformación idónea, y que los grupos tioles estén orientados adecuadamente.

Dentro de los límites de la presente experiencia, se puede subrayar que este acoplamiento requiere que el lazo forme una estructura que sobresalga del cuerpo proteico. En efecto, ensayos de acoplamiento con las entidades HL1 y BV1 no generaron complejos a nivel del lazo en los 100 primeros intentos con los mismos parámetros utilizados con HL2. Este dato se debe, sin duda, a la conformación del lazo en las entidades HL1 y BV1, la misma que se encuentra en la estructura 11SPI, y que parece menos favorable a la interacción con el efector.

En el modelo de la tiorredoxina utilizado, los grupos tioles están oxidados, de tal modo que no se pueden formar enlaces disulfuros entre las dos entidades. En cualquier caso, el acoplamiento se produce y confirma la presencia del componente hidrofóbico en la interacción de la tiorredoxina con la FBPasa cloroplastídica. De otra parte, se deduce que, *in vitro*, un porcentaje elevado de tiorredoxina oxidada en el medio reaccional, puede competir con la reducida en el acoplamiento con la FBPasa.

A la vista de las posibilidades de interacción de la Trx *f* con la FBPasa, se puede preguntar si la acción de la Trx se limita únicamente al intercambio electrónico por medio del acoplamiento con el "lazo 170", según la hipótesis conocida, o si pudiera tener otros papeles adicionales con respecto a la enzima cloroplastídica. Esto ha sido postulado por Hermoso *et al.* (1996) para explicar el hecho de que la FBPasa cloroplastídica de guisante, preincubada con tiorredoxina en presencia de una proteína de fusión que incorpora el "lazo 170", no experimenta una inhibición competitiva. Antes bien la enzima aparece más y más activa a medida que aumenta la concentración del "lazo 170", lo que parece indicar que la unión de la tiorredoxina con el punto de anclaje de la FBPasa ("lazo 170") introduce en aquélla cambios estructurales que le hacen más funcional.

Los diagramas generados por el algoritmo Ligplot sugieren que se pueden formar numerosos enlaces hidrógeno entre los residuos de la tiorredoxina con los del "lazo 170", y que el complejo es estabilizado por interacciones hidrofóbicas. En consecuencia, este complejo debe ser bastante estable, y deshacerlo debe ser costoso en energía. El intercambio electrónico entre las dos entidades se explica por un ataque nucleofílico de la cisteína más reactiva de la tiorredoxina sobre una cisteína del "lazo 170", con formación de un complejo intermediario inestable. La reacción se completaría con la liberación de la FBPasa reducida y la Trx oxidada (Droux *et al.*, 1988). Tras la reducción de la enzima, ¿es necesario que se disocie el complejo para que funcione la FBPasa? Desde luego se puede proponer la hipótesis de la permanencia del complejo FBPasa-Trx, en cuyo caso, la presencia de la Trx impediría que se reoxide la enzima; o sea, mantendría la enzima en su conformación activa, de modo que una molécula de FBPasa se activaría una sola vez antes de degradarse. Para averiguar la actividad de la entidad FBPasa-Trx proponemos que se forme este complejo *in vitro* según la técnica de Sahrawy *et al.* (1997) y, tras su análisis por electroforesis nativa, realizar una tinción por actividad según el método de Chen *et al.* (1956), a pH 7.9 en presencia de Cl_2Mg 1 mM. Si la entidad FBPasa-Trx presenta actividad enzimática, habríamos demostrado que la disociación del complejo no es imprescindible para la actividad de la enzima. Recientes trabajos del grupo de Y. Meyer (1999) describen un método para una mayor estabilización del complejo de la tiorredoxina con la enzima diana. Puesto que el ataque nucleofílico de ésta tiene lugar vía la cisteína de aquélla más próxima al lado N-terminal, con formación de un complejo fugaz que rápidamente es roto por intervención del segundo resto -SH de la tiorredoxina, la anulación de éste - por ejemplo, por un -mutagénesis dirigida - impedirá que la segunda fase tenga lugar, estabilizándose el complejo. Por este procedimiento (Verdoneq *et al.*, 1999) han conseguido aislar el complejo de Trx *h* con la peroxiredoxina, una proteína dependiente de tiorredoxina que aparece en situaciones de estrés en plantas.

El ensayo efectuado con el modelo monomérico HL2 indica que la tiorredoxina puede acoplarse en las áreas interfaciales con mayor frecuencia que en el lazo. Ante la imposibilidad de cuantificar la constante de disociación de tales entidades, la formación de complejos tiorredoxina-FBPasa con las formas monoméricas y diméricas, puede generar un número notable de falsos positivos que deberían tenerse en cuenta, por ejemplo, en la realización de Western blots de afinidad.

En el modelado de acoplamiento hemos utilizado únicamente los componentes hidrofóbico y geométrico. Para acercarse a la realidad habría que disponer de un algoritmo capaz de combinar y ejecutar en el mismo intento los componentes hidrofóbico, electrostático, geométrico, y considerar los reajustes locales de las coordenadas que ocurren en el lugar de la interacción.

El "lazo 170" es una estructura flexible, sobre todo cuando las cisteínas dianas están reducidas. En la estructura 1SPI no presenta una conformación claramente determinada, y es posible que su perfil siga igual en otras estructuras de la enzima cloroplastídica si no se acompleja este lazo con otras moléculas para que tenga una densidad electrónica adecuada para su resolución por rayos X. El algoritmo GRAMM permite seleccionar los residuos que deben interaccionar tanto en el ligando como en el receptor. Se pueden generar conformaciones teóricas del "lazo 170" por reconstrucción de coordenadas y,

luego, por el juego de reajustes constantes, buscar las conformaciones óptimas del "lazo 170", soportando las formas tanto reducida como oxidada de las 3 cisteínas, y explicando la eficiencia de la transferencia electrónica entre los residuos de la tiorredoxina y los de la FBPasa. Esas conformaciones podrían sugerir algunos elementos relativos a los reajustes conformacionales que ocurren en el tetrámero en su interacción con la tiorredoxina.

5. CONCLUSIÓN

La realización de modelos teóricos es una herramienta importante en ingeniería de proteínas por su capacidad de sugerir. Permite evaluar un concepto y orientar intervenciones. En este trabajo hemos generado entidades teóricas como paso previo a su realización experimental. Estas entidades presentan el mismo perfil que las FBPasas recombinantes conocidas. La evaluación de los parámetros globales indica que esas estructuras, sobre todo las construcciones X2, presentan características estereoquímicas habituales. Así, si esas FBPasas quiméricas se conforman dentro de los límites de los modelos desarrollados, tendrán una viabilidad biológica y un interés biotecnológico.

Capítulo II. FBPasas QUIMÉRICAS

II. I. RESULTADOS

1. CONSTRUCCIÓN

Las proteínas quiméricas BV1 y HL1 (Lámina II. 1), y BV2 y HL2 (Lámina II. 2) fueron construidas por PCR a partir de los genes de las FBPasas cloroplastídica de *Pisum sativum* (PS), citosólica de *Beta vulgaris* (BV) y gluconeogénica de hígado humano (HL). Las condiciones operativas del PCR (concentración de dNTP, de polimerasa, número de ciclos, temperatura y tiempo de hibridación, "hot start", etc.) fueron ajustadas en función del fragmento a sintetizar, a fin de optimizar la reacción. El enlace de los fragmentos se hizo en gel de agarosa con bajo punto de fusión, en tampón TAE con baja concentración de EDTA para asegurar la disponibilidad del ion magnesio.

Para obtener los genes quiméricos, el buen diseño de los cebadores se reveló determinante, sobre todo para las entidades BV2 y HL2. No se generaron bandas inespecíficas. El tamaño de las bandas correspondientes a los genes sintetizados era conforme a lo teórico (Lámina II. 3).

Los genes obtenidos fueron cortados por las enzimas de restricciones *ad hoc* y clonados en el vector de expresión de la familia pET. Los fragmentos intermediarios, así como los genes quiméricos finales fueron secuenciados para averiguar la fidelidad de la replicación, en general, y la exactitud de los puntos de enlace en particular. Dentro de los límites de esta comprobación, estos se revelaron tal cual se diseñaron, sin que se detectara ninguna mutación respecto a los aminoácidos originales.

Ejemplo de la serie HL:



Secuencia inversa y complementaria:

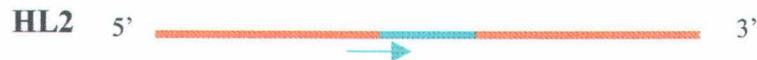
```
>HL1
1...CGGGATTAT ACATATGGCT GACCAGGCGC CCTTCGACAC GGACGTCAAC
51 ACCCTGACCC GTTTTGTTCAT GGGAGAGGGC AGGAAGGCC GCGGCACGGG
101 CGAGTTGACC CAGCTGCTCA ACTCGCTCTG CACAGCAGTC AAAGCCATCT
151 TTTCGGCGGT GCGCAAGGCG GGCATCGCGC ACCTCTATGG CATTGCTGGT
201 TCTACCAACG TAACAGGTGA TCAAGTTAAG AAGCTGGACG TCCTCTCCAA
251 CGACCTGGTT ATGAACATGT TAAAGTCATC CTTTGCCACG TGTGTTCTCG
301 TGTCAGAAGA AGATAAACAC GCCATCATAG TGGAACCGGA GAAAAGGGGT
351 AAATATGTGG TCTGTTTTGA TCCCCTTGAT GGATCTTCCA ACATCGATTG
401 CCTTGTGTCC GTTGGAACCA TTTTGGGGAT TTACAGCCCC AATGACGAGT
```

Resultados

```
451 GTCTTCCTGA TTTTGGTGAT GACTCTGATG ACAACACACT TGGCACAGAA
501 GAACAAAGG .....
```

traducción:

```
>HL1
  1 MADQAPFDTD VNTLTRFVME EGRKARGTGE LTQLLNSLCT AVKAIKSAVR
 51 KAGIAHLYGI AGSTNVTGDQ VKKLDVLSND LVMNMLKSSF ATCVLVSEED
101 KHAIIVEPEK RGKYVVC FDP LDGSSNIDCL VSVGTFIY SPNDECLPDF
151 GDSDDNTLG TEEQR .....
```



```
>HL2
  1 GGATTTTGGT GATGACTCTG ATGACAACAC ACTTGGCACA GAAGAACAAA
 51 GGTGCATTGT GAATGTGTGT CAACCAGGCC GGAACCTGGT GGCAGCCGGC
101 TACGCACTGT ATGGCAGTGC CACCATGCTG GTCCTTGCCA TGGACTGTGG
151 GGTCAACTGC TTCATGCTGG ACCCGGCCAT CGGGGAGTTC ATTTTGGTGG
201 ACAAGGATGT GAAGATAAAA AAGAAAGGTA AAATCTACAG CCTTAACGAG
251 GCGTACGCTA AGGACTTTGA CCCTGCCGTC ACTGAGTACA TCCAGAGGAA
301 GAAGTTCCCC CCAGATAAAT CAGCTCCTTA TGGGGCCCGG TATGTGGGCT
351 CCATGGTGGC TGATGTTTCAT CGCACTCTGG TCTACCGAC .....
```

Traducción

```
>HL2
  1...DFGDSDDN TLGTEEQRCI VNVCQPGRNL VAAGYALYGS ATMLVLAMDC
 51 GVNCFMLDPA IGEFILVDKD VKIKKKKGIY SLNEAYAKDF DPAVTEYIQR
101 KKFPDNSAP YGARYVGS MV ADVHRTLVIY .....
```

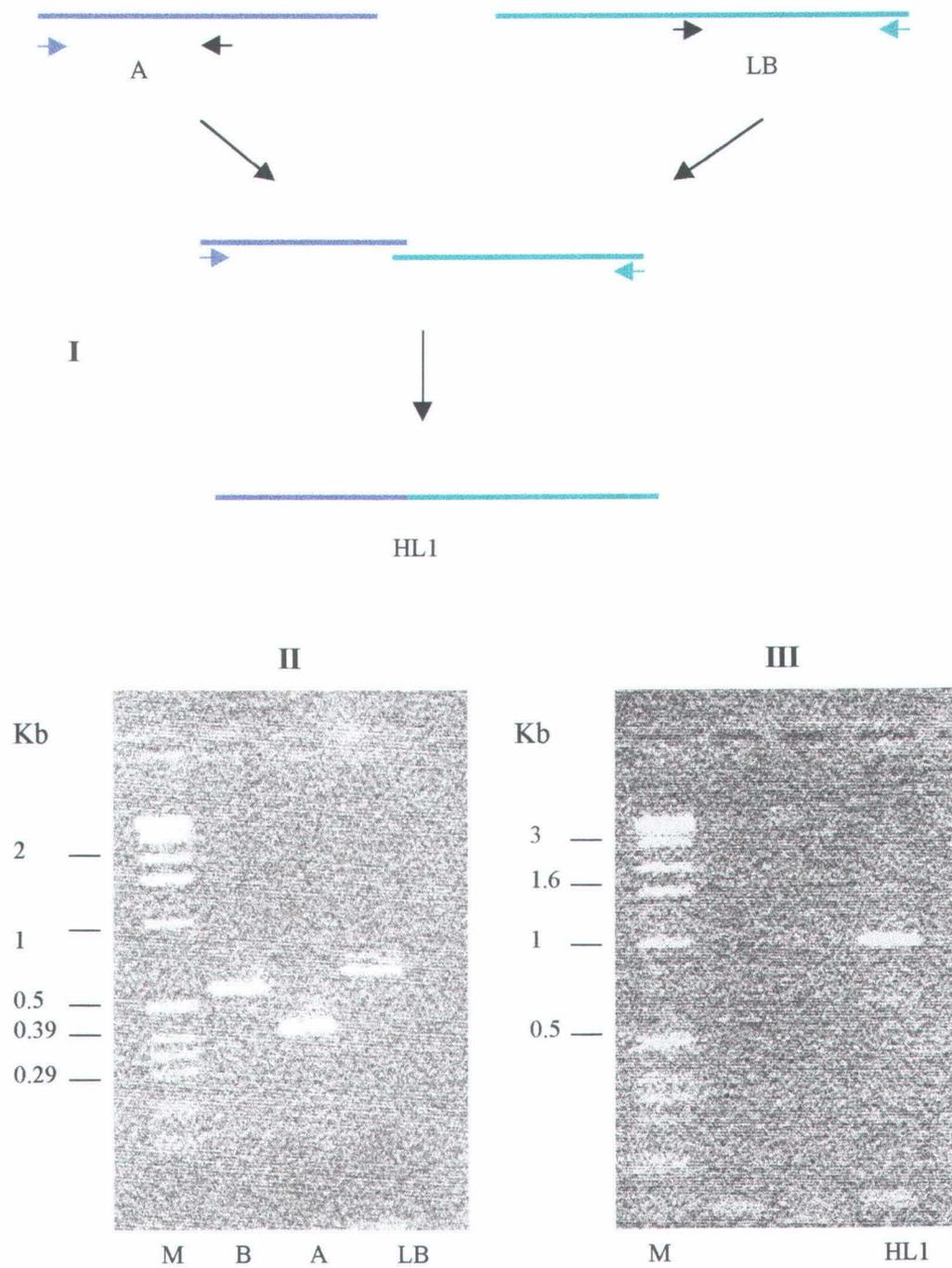


Lámina II.1. Construcción de las entidades X1. Esquema de la construcción (I). Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos intermedarios (II). Fragmento (HL1) resultante del enlace de A con LB (III).

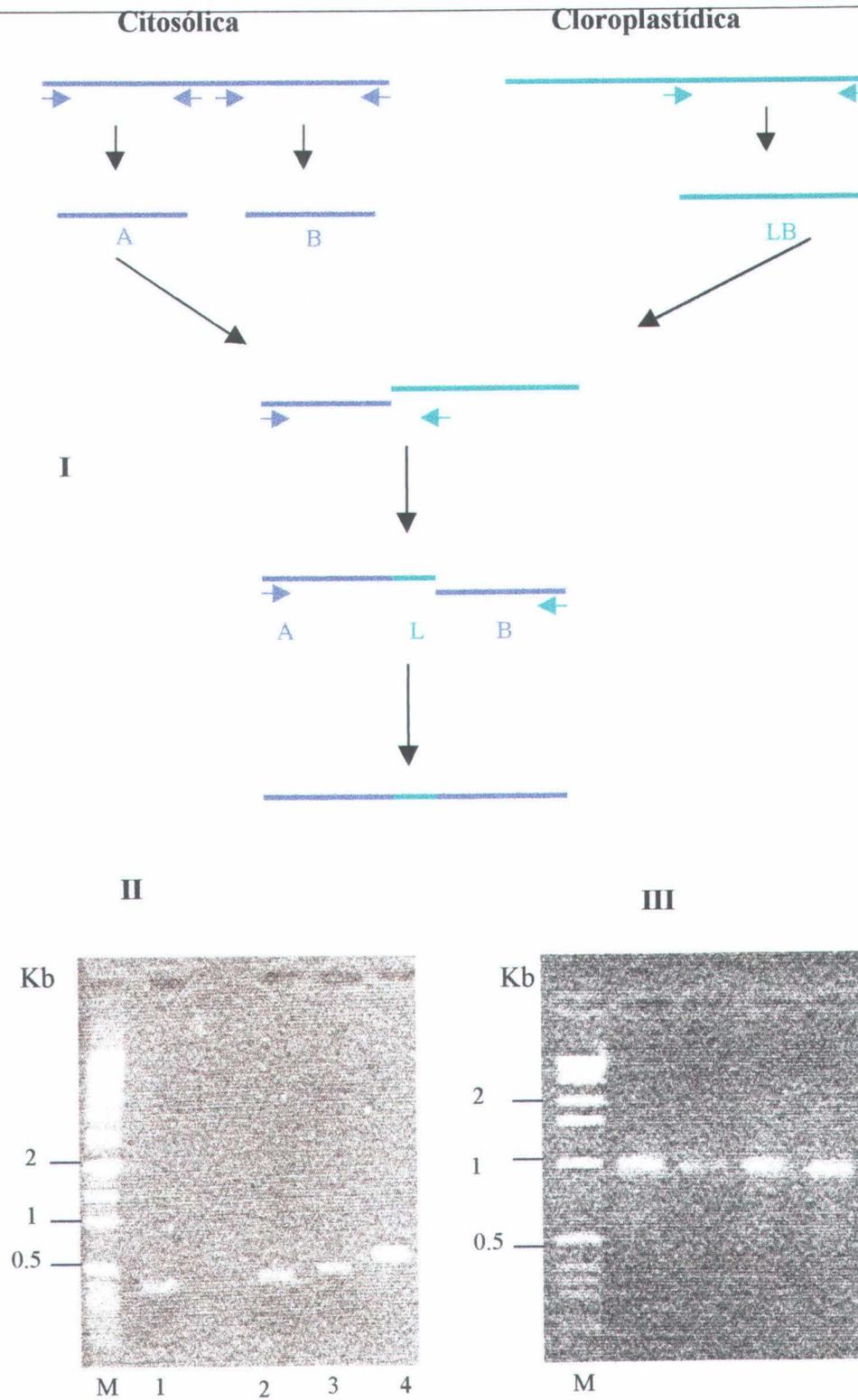


Lámina II.2. Construcción de las entidades X2 (I). Electroforesis de los fragmentos intermedarios en gel de agarosa al 2% : A (1), AL (2), B (3), LB (4) (II). Obtención del gen quimérico (III). Patrones de marcadores moleculares (M).

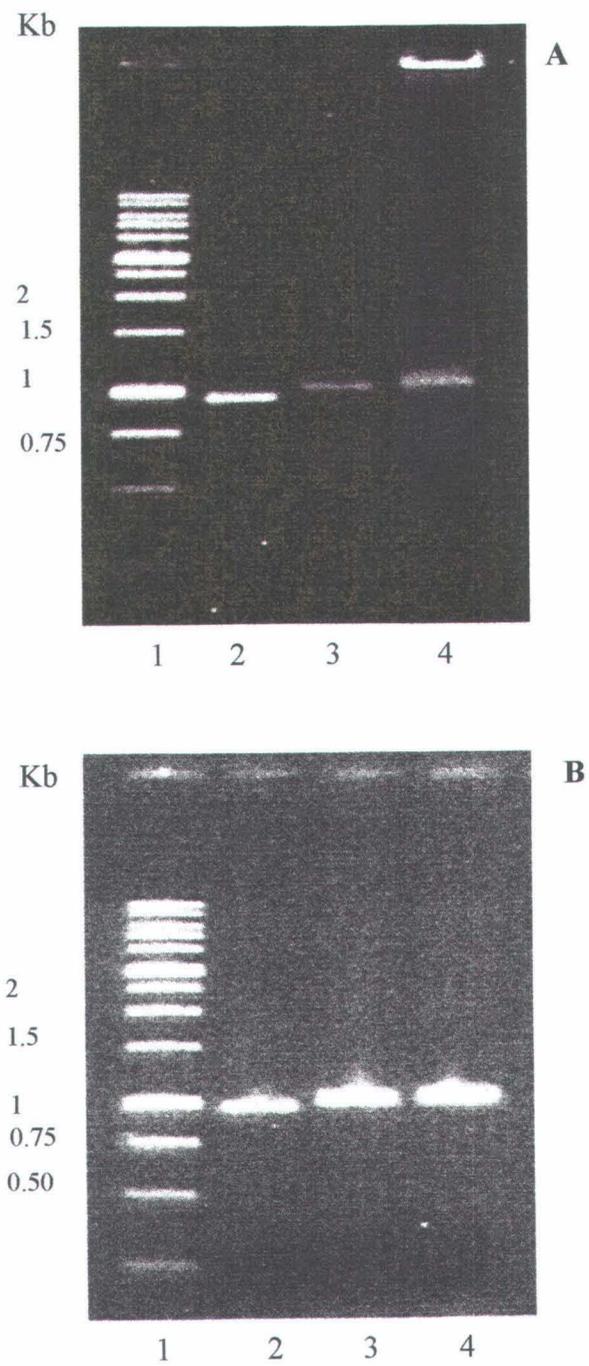


Lámina II. 3. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de fragmentos de ADN correspondiendo a los genes de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris* (2), de BV1 (3) y BV2 (4) (A); de la FBPasa humana (2), de HL1 (3) y HL2 (4) (B). Patrones de marcadores moleculares (1).



Secuencia inversa y complementaria:

```

>HL2
1  CGGGATTATA CATATGGCTG ACCAGGCGCC CTTCGACACG GACGTCAACA
51 CCCTGACCCG CTTCTGCATG GAGGAGGGCA GGAAGGCCCG CGGCACGGGC
101 GAGTTGACCC AGCTGCTCAA CTCGCTCTGC ACAGCAGTCA AAGCCATCTC
151 TTCGGCGGTG CGCAAGGCGG GCATCGCGCA CCTCTATGGC ATTGCTGGTT
201 CTACCAACGT GACAGGTGAT CAAGTTAAGA AGCTGGACGT CCTCTCCAAC
251 GACCTGGTTA TGAACATGTT AAAGTCATCC TTTGCCACGT GTGTTCTCGT
301 GTCAGAAGAA GATAAACACG CCATCATAGT GGAACCGGAG AAAAGGGGTA
351 AATATGTGGT CTGTTTTGAT CCCCTTGATG GATCTTCCAA CATCGATTGC
401 CTTGTGTCCG TTGGAACCAT TTTTGGGATT TACAGCCCCA ATGACGAGTG
451 TCTTCCTGAT TTTGGTGATG ACTCTGATGA CAACACACTT GGCACAGAAG
501 AACAAAGT.....

```

traducción

```

>HL2
1...MADQAPFDTD VNTLTRFVME EGRKARGTGE LTQLLNSLCT AVKAISSAVR
51 KAGIAHLYGI AGSTNVTGDQ VKKLDVLSND LVMNMLKSSF ATCVLVSEED
101 KHAIIVEPEK RGKYVVCDFP LDGSSNIDCL VSVGTFIFGIY SPNDECLPDF
151 GDDSDNTLG TEEQ.....

```

2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

Las FBPasas fueron expresadas en la cepa de *E. coli* BL21 (Material y Métodos, III. 4). La enzima cloroplastídica y la FBPasa humana clonadas en pET, y la citosólica de *Beta vulgaris* clonada en pGEX, fueron purificadas a homogeneidad (Lámina II. 4). La FBPasa de *Beta vulgaris* se encontró plenamente activa, con el mismo comportamiento que la enzima clonada en pET. Esto indica que el polipéptido de la glutatión transferasa acoplado a la parte N terminal de dicha enzima no impide ni su correcto plegamiento, ni su ensamblaje en la estructura cuaternaria. Así pues, se puede utilizar esta enzima tal cual. El corte con trombina liberó un fragmento de 37 kDa correspondiente a la subunidad de la enzima silvestre, así como un polipéptido de 26 kDa de la GST. La trombina no reconoció otro sitio de corte que el previsto (Lámina II. 5B).

Las enzimas quiméricas fueron, en primer lugar purificadas parcialmente siguiendo el protocolo establecido para la enzima humana. Se evitó la etapa térmica puesto que las enzimas mutadas suelen ser menos estables que las silvestres. Tras la última

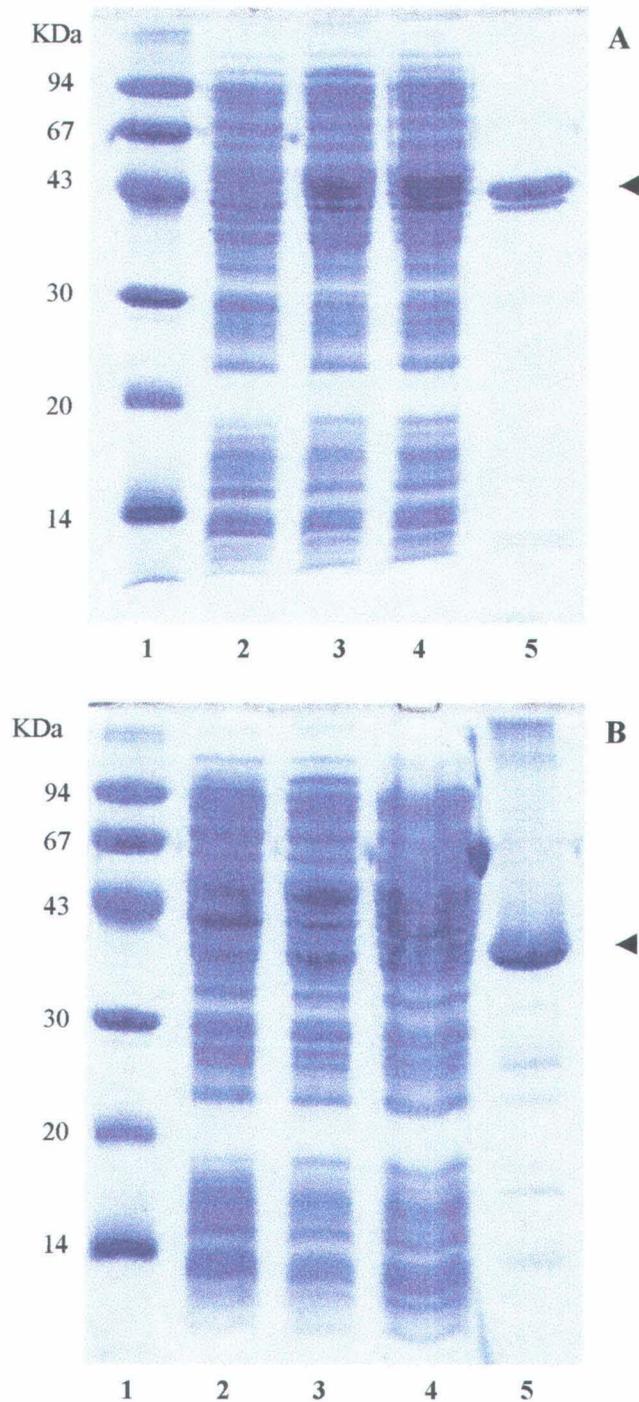


Lámina II. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % de las distintas fracciones recogidas durante el proceso de purificación de la FBPasa cloroplástica de *Pisum sativum* (A), y de la FBPasa de hígado humano (B) expresadas en *E. coli*. Calle 1: Patrones de peso molecular. Calle 2: Extracto crudo de proteínas de *E. coli* transformada por el vector pET12. Calle 3: Extracto crudo de *E. coli* con la FBPasa expresada. Calle 4: Fraccionamiento por sulfato amónico al 35-75% de saturación. Calle 5: FBPasa purificada.

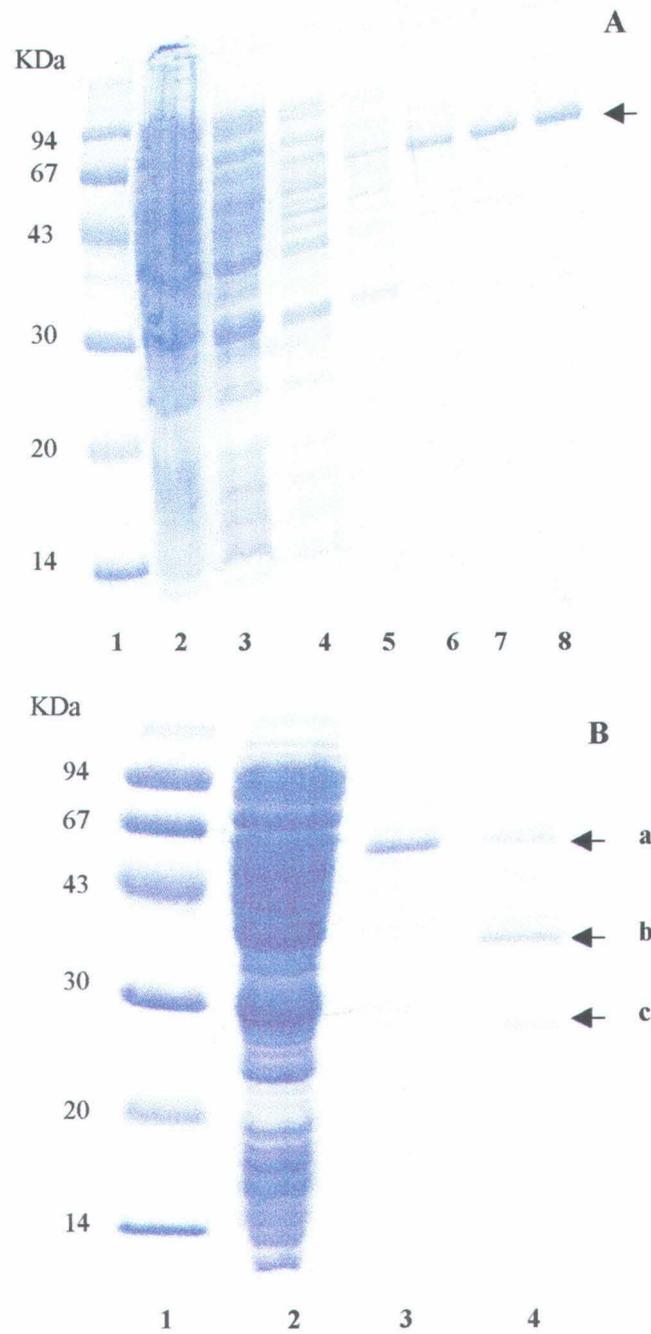


Lámina II. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % de las distintas fracciones recogidas durante el proceso de purificación de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris*, expresada como proteína de fusión. Calle 1: Patrones de peso molecular. Calle 2: Extracto crudo de la proteína expresada en *E. coli*. En A: calles 3-5: lavados de la fase en Sepharose. Calles 6-8: elución de la FBPasa-GST por glutatión. En B: calle 3: FBPasa-GST eluída. Calle 4: corte de FBPasa-GST por trombina. FBPasa-GST no cortada (4a), FBPasa liberada (4b), GST liberada (4c).

precipitación por sulfato amónico, se resuspendieron las diferentes muestras en un tampón maleato ajustado a un pH deducido respecto al pI teórico de cada entidad (Tabla II. 1). Como control se expresaron y purificaron en las mismas condiciones lisados de *E. coli* transformada por el plásmido pET. Hay que indicar que las enzimas quiméricas mostraron una actividad FBPasa más importante a pH básico. También se notó una cierta inercia en la activación de estas enzimas.

La tentativa de purificar esas entidades a homogeneidad reveló otra de sus características. En efecto, tras la elución por AMP y FBP (Material y Métodos, II. 5.2), la eliminación del FBP por diálisis resultó perjudicial a la estabilidad de esas enzimas. Al contrario, la incubación con FBP las estabiliza, del mismo modo que el AMP estabiliza la enzima humana. La expresión de HL2 como proteína de fusión, tal como se hizo para la enzima de *Beta vulgaris*, confirmó este papel de la FBP. No obstante, la trombina corta HL2 en otro sitio que el previsto (Leu-Val-Pro-Arg-*-Gly-Ser). En efecto, esta proteasa puede también cortar una proteína entre determinados residuos hidrófobos. A continuación se estudió un procedimiento de conservación de las enzimas en las mismas condiciones para poder compararlas. Las enzimas quiméricas semipurificadas y resuspendidas en tampón maleato tras la precipitación por sulfato amónico, se conservaron magníficamente para su subsiguiente caracterización.

Entidad proteica	PM teórico	pI teórico	pH tampón de conservación
<i>Pisum sativum</i>	39.24	4.77	5.5
<i>Beta vulgaris</i>	35.94	6.03	7.5
BV1	37.63	4.97	5.8
BV2	37.84	5.31	6.8
Humano	36.81	6.53	7.2
HL1	38.48	5.13	6.8
HL2	38.61	5.19	6.8

Tabla II. 1. Parámetros de las diferentes enzimas expresadas y purificadas.

3. CARACTERIZACIÓN

3.1. Inmunodetección

Para identificar las diferentes proteínas, las FBPasas quiméricas semipurificadas fueron analizadas por western blot, utilizando un anticuerpo contra la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum*. Sorprendentemente el anticuerpo reconoce la enzima humana, pero no reconoce la enzima citosólica de *Beta vulgaris* (Lámina II. 6). Respecto a las quiméricas, el anticuerpo reconoce una banda con aproximadamente el mismo comportamiento electroforético que la proteína humana. No existe una banda similar frente a la FBPasa de *E. coli*. Esos datos confirman las predicciones a propósito de la

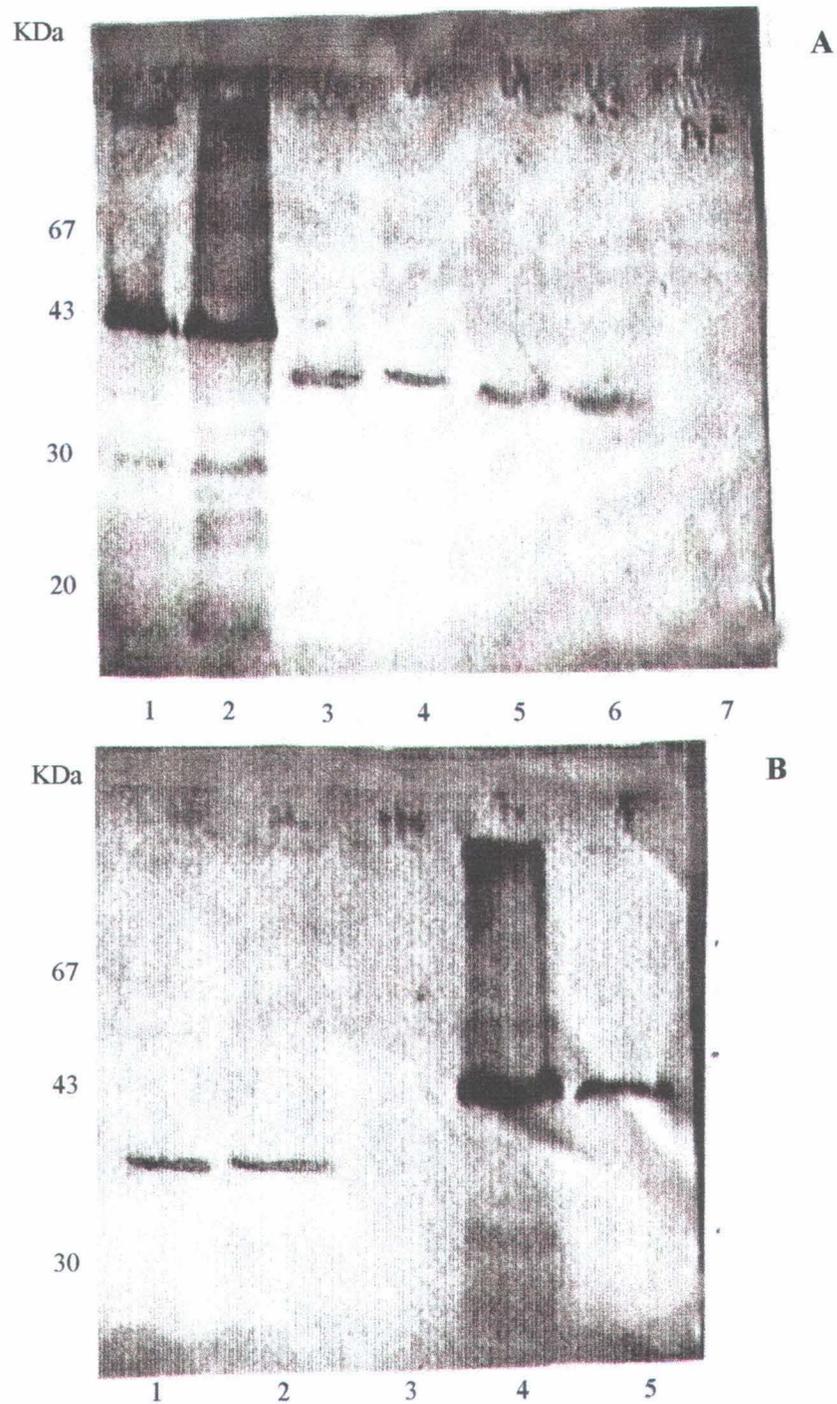


Lámina II. 6. Inmunoblotting de las diferentes FBPasas reveladas con un anticuerpo anti-FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum*. FBPasa recombinante de guisante expresada en *E. coli* y semi-purificada (A1, B5); la misma enzima nativa purificada a homogeneidad (A2, B4); FBPasa humana purificada (A3), y semi-purificada después de expresarla en *E. coli* (A4); enzima citosólica de *Beta vulgaris* (B3). FBPasas quiméricas HL1 (A5), HL2 (A6), BV1 (B2), BV2 (B1). FBPasa de *E. coli* (A7).

similitud del perfil antigénico entre la enzima humana y la FBPasa cloroplastídica, así como el papel del "lazo 170" como epítipo importante en la generación del anticuerpo. Curiosamente hemos observado que los anticuerpos generados con la enzima cloroplastídica recombinante presentan una reacción cruzada más importante con la enzima humana y las FBPasas quiméricas que los generados con la enzima nativa. Ésto indica que hay una cierta diferencia en la presentación de los epítipos entre las dos formas de expresión de la enzima cloroplastídica. En cualquier caso, ninguno de los dos anticuerpos reconoce la enzima de *E. coli*.

3.2. Efecto del pH

La proteína humana presenta una actividad óptima alrededor de pH 7.5, conforme a los datos de la literatura (Dzugaj *et al.*, 1980). La enzima de *Beta vulgaris* presenta un perfil diferente. Se suele medir la actividad de la enzima nativa a pH 7.5 (Khayat *et al.*, 1993) que debe corresponder a su pH óptimo. En cambio la actividad de la enzima recombinante es más importante a pH básico (Lámina II. 7). Este comportamiento se verifica con el gen clonado en pET como en pGEX. Las FBPasas quiméricas exhiben una actividad óptima a pH básico, entre 8.0 y 8.5.

3.3. Efecto de FBP y Cl₂Mg

La activación de las distintas FBPasas ha sido medida con diferentes concentraciones de FBP, en presencia de Cl₂Mg 5 mM, a pH 7.5 en el caso de las enzimas silvestres, y a pH 8.0 en el caso de las quiméricas. La proteína humana presenta una K_m aparente de 10.3 :M, y una V_m de 0.108)DO. min⁻¹ a 340 nm (Tabla II. 2). Esos resultados son coherentes con los datos de la literatura relativos a la afinidad de la enzima humana por el sustrato. En cambio la enzima de *Beta vulgaris* presenta una K_m aparente de 91.1 :M, con una V_m de 0.185. Este elevado valor de K_m indica que el pH 7.5 no es el óptimo de la proteína recombinante utilizada.

Las enzimas quiméricas tienen el mismo perfil que las silvestres (Láminas II 8 y 9), pero se activan con una concentración mayor de FBP. En efecto, esas entidades tienen una inercia inicial para reaccionar más importante que las proteínas silvestres. El FBP, además de sustrato, se comporta como un activador de la quiméricas. Paralelamente se estudió el comportamiento de estas enzimas frente a concentraciones activantes de Cl₂Mg. Como ocurre con el FBP, cada enzima presenta características propias. El Cl₂Mg es imprescindible a la actividad de éstas, pero no es un activador a la manera de la FBP.

	BV	BV1	BV2	HL	HL1	HL2
K _m FBP (:M)	91.1	52.4	62.2	10.3	43.0	140
K _m Cl ₂ Mg (mM)	4.09	2.63	3.22	5.34	5.16	2.84
V _{max} (DO.min ⁻¹)	0.185	0.084	0.025	0.108	0.068	0.150

Tabla II. 2. Comportamiento de las enzimas quiméricas frente a diferentes concentraciones de FBP y Cl₂Mg a pH 8.0. BV y HL se analizaron a pH 7.5.

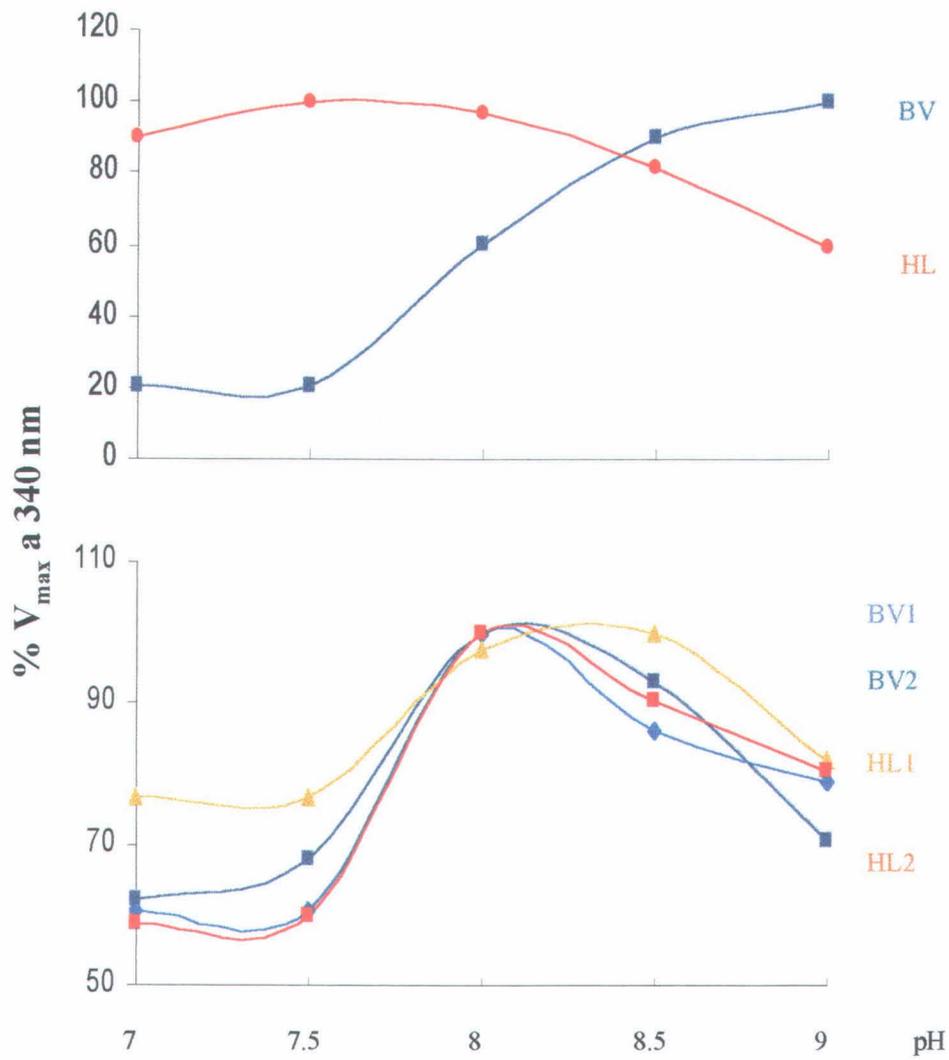


Lámina II. 7. Cinética de activación de las diferentes FBPasas expresadas en *E. coli* en función del pH.

Resultados

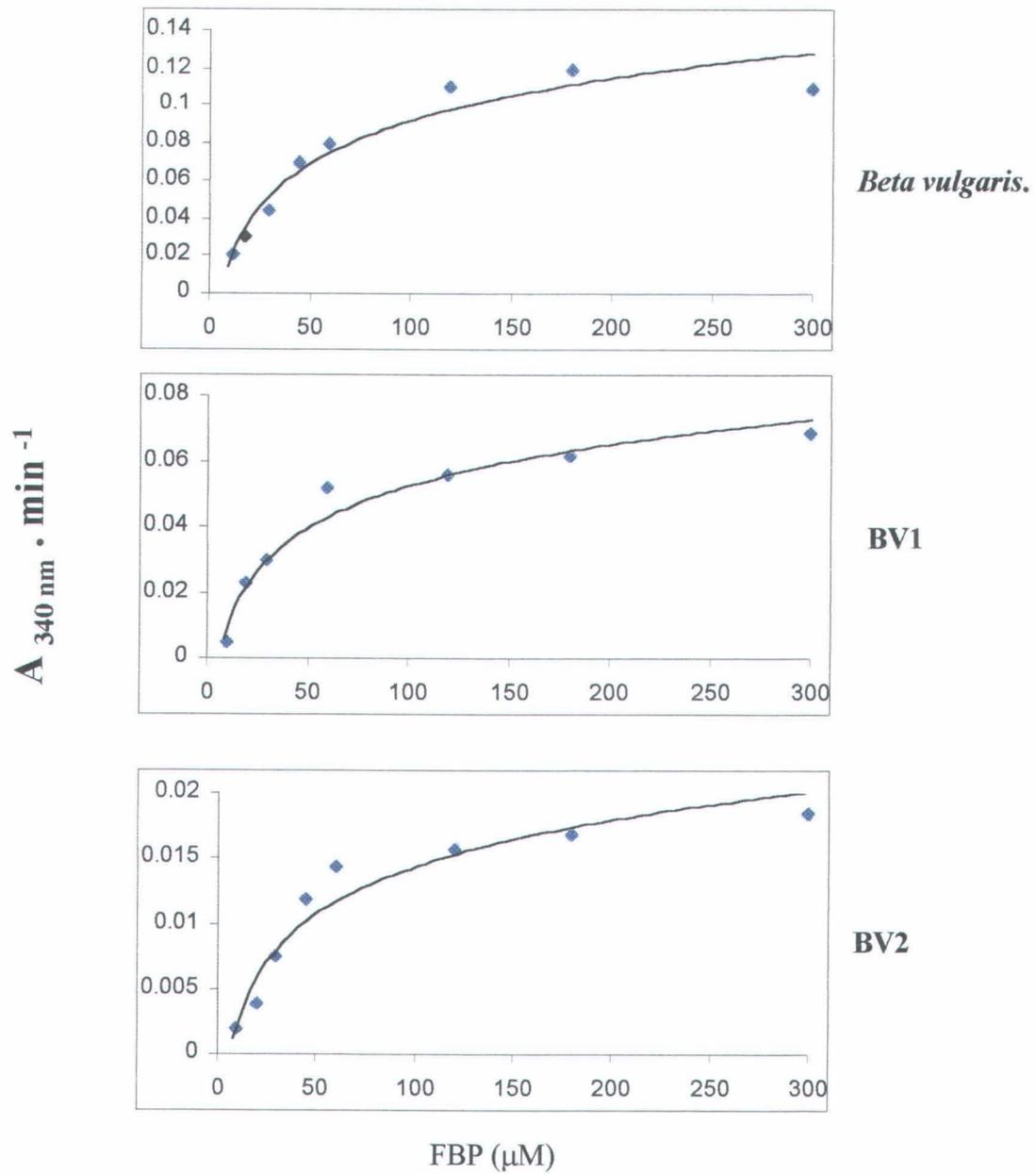


Lámina II. 8. Cinética de activación de la FBPasa de *Beta vulgaris* a pH 7.5, y de las quiméricas BV1 y BV2 a pH 8.0, con 80 μg de proteína total.

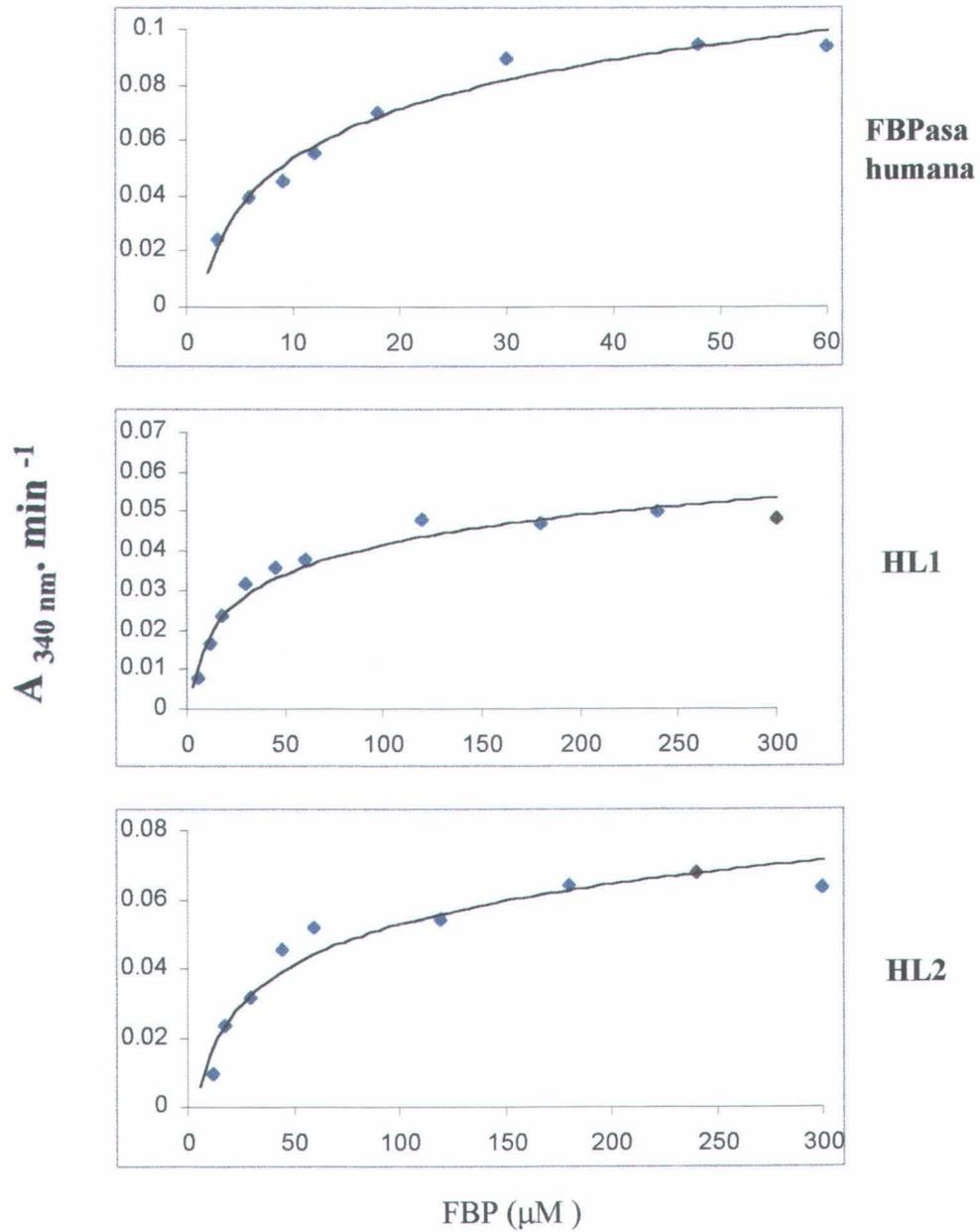


Lámina II. 9. Cinética de activación de la FBPasa humana a pH 7.5, con 23 μg de proteína total, y de las quiméricas HL1 y HL2 a pH 8.0, con 80 μg de proteína total.

3.4. Detección por actividad *in situ*

Al objeto de verificar el efecto de la quimerización sobre la tetramerización, se analizaron las diferentes entidades por electroforesis nativa, y revelado por actividad según el método de Chen *et al.* (1956) con algunas modificaciones (Material y Métodos III. 6-5). Las formas activas conocidas de la FBPasa son el dímero y el tetrámero, o complejos de más alto peso molecular. La migración de la enzima en el gel depende de su magnitud molecular, su punto isoeléctico y de la concentración del gel en acrilamida. Siendo iguales los dos últimos parámetros, la migración dependerá exclusivamente de la masa y forma molecular. En paralelo se midió la actividad FBPasa en medio líquido con el mismo método a 820 nm, a fin de prevenir un posible efecto de la electroforesis sobre el comportamiento enzimático.

La tinción por actividad *in situ* mostró en cada caso una banda correspondiente a la FBPasa. La proteína humana, con el pI más elevado (6.53), migra poco en el gel en comparación a la proteína de *Pisum sativum* (pI = 4.77). Curiosamente, las dos formas de la proteína de *Beta vulgaris* presentan el mismo comportamiento electroforético (Lámina II. 10B). Todas ellas reaccionan fuertemente, mientras que las quiméricas, en cambio, aparecen muy débilmente, aunque la medición de las actividades en las mismas condiciones en el lisado de *E. coli* donde se expresaron mostró que tienen actividad enzimática suficiente como para esperar una mejor detección en el gel (Lámina II. 10A).

Estos resultados indican que la fase electroforética induce una inhibición de las FBPasas quiméricas por inactivación o por desnaturalización del tetrámero. Modificaciones de las condiciones operativas, tales como bajar la concentración de acrilamida, o la reducción de la tensión no mejoraron el resultado.

3.5. Efecto del AMP y fructosa-2,6-bisfosfato

El efecto de los moduladores AMP y fructosa-2,6-bisfosfato ha sido ensayado sobre las enzimas silvestres y las FBPasas quiméricas a pH 7.5 y 8.8 (Láminas II. 11 y 12). La enzima humana es muy sensible al AMP, como lo han descrito Dzugaj *et al.* (1980) y El-Maghrabi *et al.* (1992). Una concentración 10 μ M provoca un 50% de inhibición. Comparativamente, la enzima de planta tiene menos afinidad para este inhibidor, necesita una concentración 500 μ M para alcanzar el 50% de inhibición. Resultados similares son relatados por Khayat *et al.* (1993).

Las FBPasas quiméricas presentaron una alta sensibilidad al AMP, lo que significa que, pese a los cambios introducidos, esas enzimas conservan la capacidad de interaccionar con el AMP. De manera general, el incremento del pH reduce la afinidad para el AMP, lo que se traduce por una mayor actividad enzimática.

La fructosa-2,6-bisfosfato es un potente inhibidor de la enzima citosólica. Esta molécula exhibió el mismo efecto sobre las FBPasas quiméricas. En este caso un incremento del pH aumenta ligeramente la afinidad de esta molécula para las enzimas que presentan una actividad óptima a pH más básico, como la cloroplastídica de *Pisum*

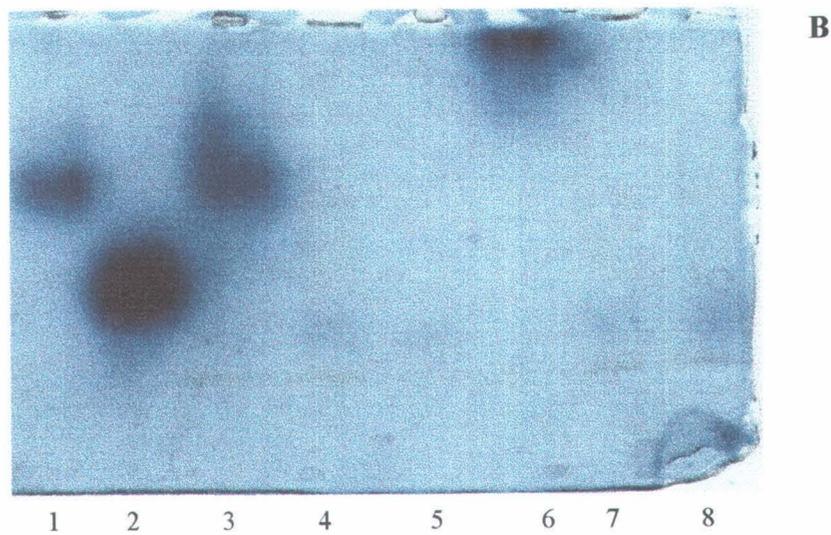
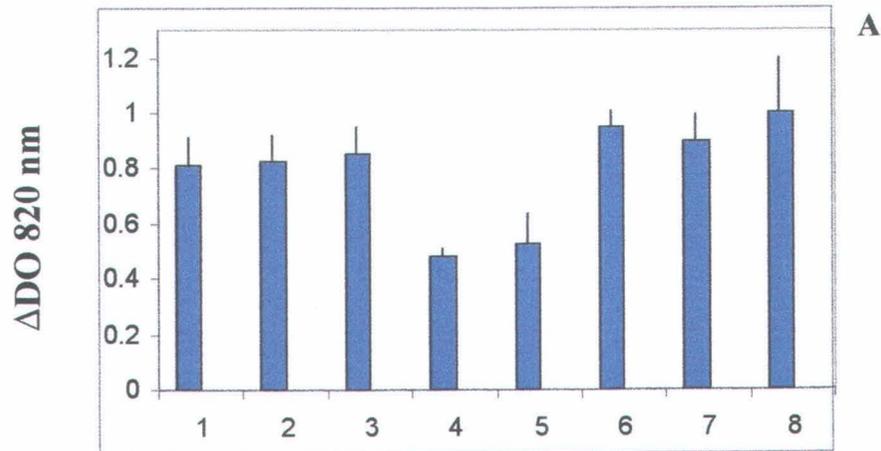


Lámina II. 10. Actividad de las diferentes FBPasas medida a pH 8 según el método de Chen *et al.* (1956). Reacción enzimática en medio líquido medida a 820 nm (A).

Tinción *in situ* por actividad tras electroforesis nativa en gel de poliacrilamida a 7% (B). En ambos casos se utilizaron 23 μ g de proteína total para la enzima humana y la de *Pisum sativum*, y 80 μ g para las demás.

FBPasa-GST de *Beta vulgaris* (1), *Pisum sativum* (2), *Beta vulgaris* clonado en pET (3), BV1 (4), BV2 (5), enzima humana (6), HL1 (7) y HL2 (8).

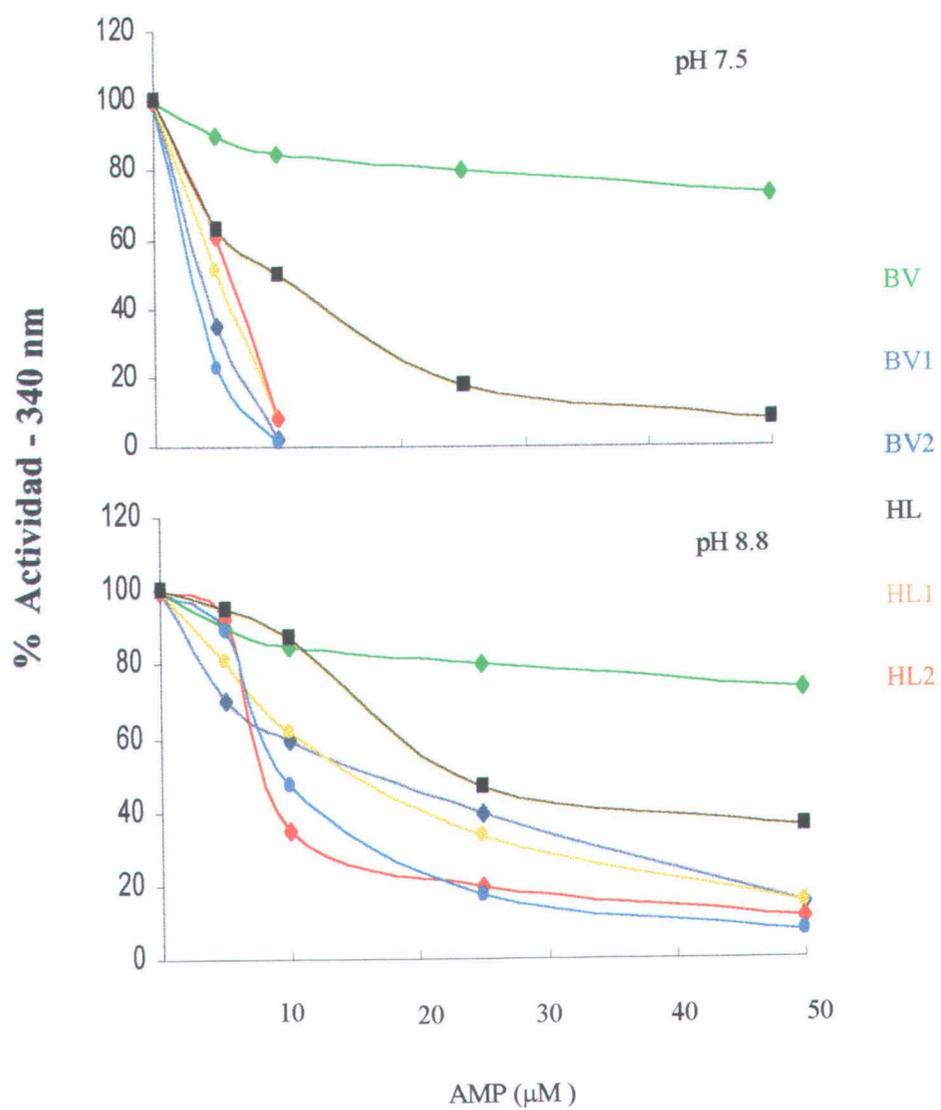


Lámina II. 11. Inhibición de las diferentes FBPasas por AMP, a pH 7.5 y 8.8.

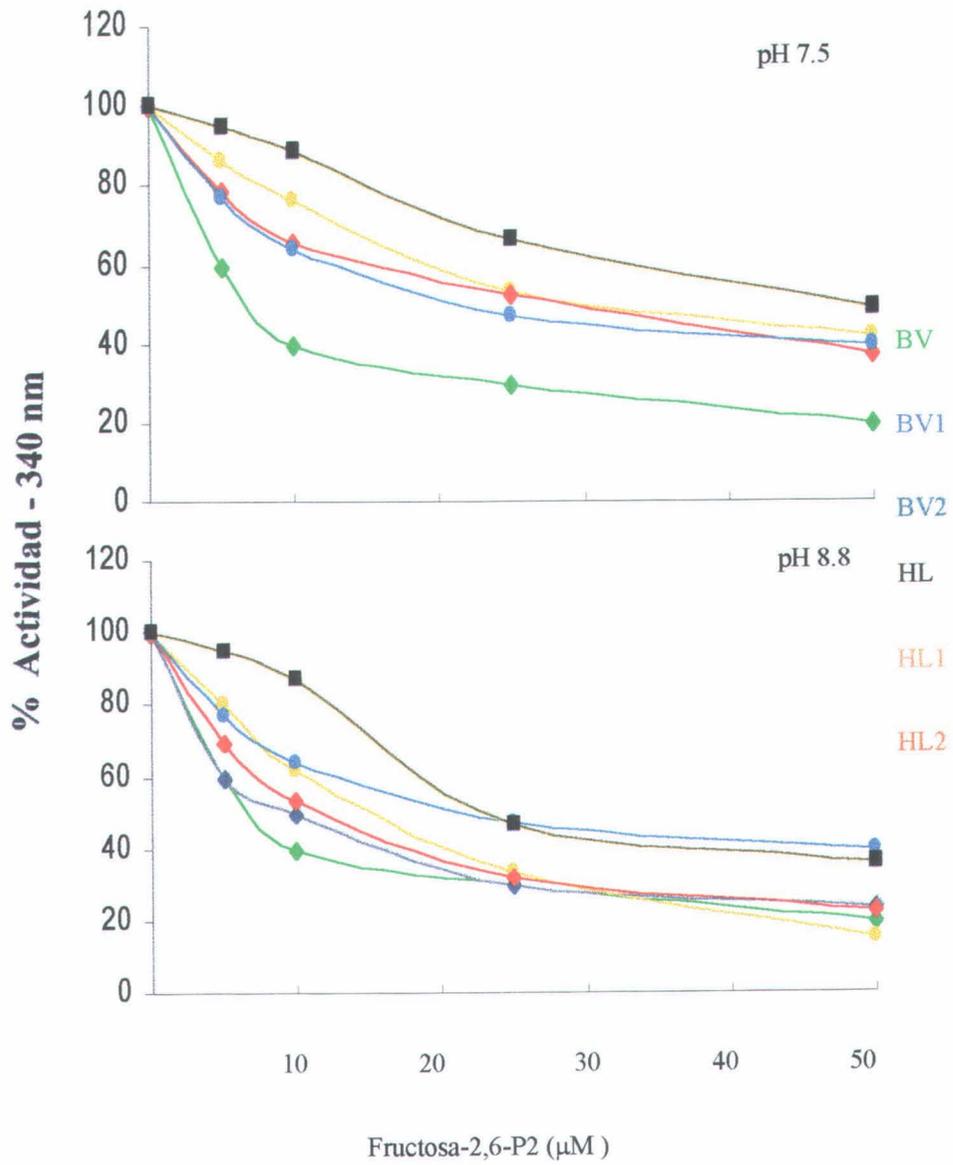


Lámina II. 12. Inhibición de las diferentes FBPasas por la fructosa-2,6-bisfosfato, a pH 7.5 y 8.8 .

sativum, la enzima de *Beta vulgaris* o las FBPasas quiméricas, lo que conllevó a un ligero aumento de la inhibición. La enzima humana presenta la tendencia inversa.

Concentración necesaria para un 50% de inhibición				
Efactor	AMP		Fructosa-2,6-bisfosfato	
pH	7.5	8.8	7.5	8.8
<i>P. sativum</i> (pastídica)	>1000	>1000	500	250
<i>B. vulgaris</i> (citosólica)	500	>1000	7.5	5
BV1	4	10	20	10
BV2	3	15	20	10
HL	10	22	51	70
HL1	5	11	25	14
HL2	8	8	25	12

Tabla II. 3. Inhibición de las diferentes FBPasas por AMP y F-2,6-P.

4. ACTIVACIÓN

4.1. Acción del DTT

En esta experiencia la enzima cloroplastídica de *Pisum sativum* sirve de referencia. Se puede plenamente activar esta enzima a pH 8.8 en presencia de una concentración 10 mM de iones magnesio, una activación que, obviamente, no supone la reducción de residuos disulfuros. La adición de 10 mM DTT en la mezcla de reacción permite incrementar aún más la actividad, lo que confirma el rol preponderante desempeñado por los residuos tioles en la activación de esta enzima. Esta acción del DTT se manifiesta ya a pH 7.5, a pesar de no ser el pH óptimo para la actividad enzimática (Lámina II. 13A).

La enzima humana no es modulable por DTT. No se detectan en la molécula residuos tioles accesibles al reductor a pH 7.5, 7.9 y 8.8. La modulación rédox no interviene en la regulación de esta enzima (Lámina II. 13B).

Igualmente, la enzima citosólica de *Beta vulgaris* no respondió de manera significativa a la acción del DTT a pH 7.5. Esos datos confirman los resultados de Khayat *et al* (1993) con la enzima nativa. Sin embargo, cuando se incrementa el pH la enzima recombinante se vuelve modulable por DTT de manera significativa (Lámina II. 13C). Este resultado aporta nuevos datos sobre las características intrínsecas de esta enzima. en esta línea hay que indicar los resultados recientemente presentados por Anderson *et al.* (1997), que encuentran en la FBPasa citosólica de *Brassica napus* elementos de regulación rédox a través de grupos tioles.

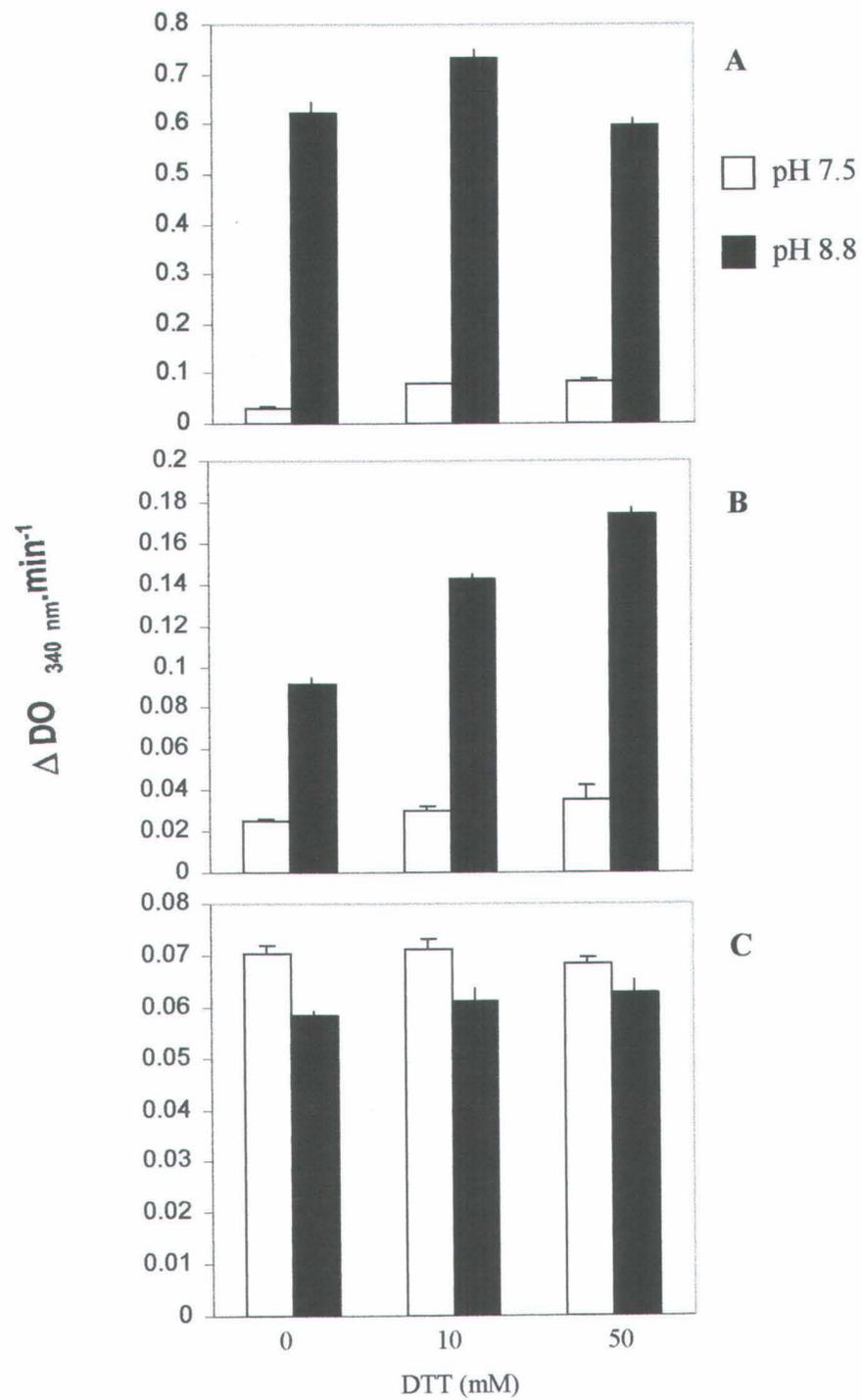


Lámina II. 13. Efecto de 10 y 50 mM DTT, a pH 7.5 y 8.8, sobre la actividad de la FBPasa cloroplastica de *Pisum sativum* (A), de la citosolica de *Beta vulgaris* (B), y de la enzima del hígado humana (C).

La enzima citosólica de *Beta vulgaris* no posee, como su homóloga cloroplastídica, un "lazo 170" con cisteínas, sede de la modulación rédox de la enzima del cloroplasto. Esto indica que pueden existir otros residuos implicados en una modulación rédox distintos a los del "lazo 170". La enzima citosólica de *Beta vulgaris* sustenta 9 cisteínas en cada monómero, de las que las cisteínas 32, 36, 83, 105, 114, 119, 156 y 162 aparecen ubicadas en el modelo generado por homología (Lámina II. 14A) en áreas interdominios. En el dominio C terminal se encuentra la 221. Las cisteínas 36 y 162 se encuentran a una distancia (2.04 Å) suficientemente próxima, y en buena orientación para formar un puente disulfuro (Lámina II. 14B). La cisteína 36 está ubicada en la hélice alfa H2, y la 162 en la hoja beta E6. El puente disulfuro se encontraría en el área de acoplamiento del AMP, una zona accesible a pequeñas moléculas como el DTT. Por el contrario, Anderson *et al.* (1997) proponen a las cisteínas 92 y 114 de diferentes FBPasas citosólicas, equivalentes a las cisteínas 83 y 105 de *Beta vulgaris*, como las más probables de intervenir en una regulación rédox de las FBPasas citosólicas.

En el caso de las FBPasas quiméricas, una misma concentración de proteína total (80 µg) fue incubada durante 10 min a 28 °C con 10 y 50 mM DTT y la actividad FBPasa medida a pH 7.5 y 8.8. En ambos casos el DTT tuvo un efecto positivo sobre la actividad (Lámina II. 15). Como antes se apuntó, es preciso añadir FBP al medio de incubación para mantener la estabilidad de las enzimas quiméricas. En efecto, la fase de incubación provoca un descenso de la actividad de las FBPasas en general, que es aún mayor en el caso de las quiméricas.

La activación de estas enzimas por el DTT supone la existencia de enlaces disulfuros accesibles al reductor. Estos pueden ser los del "lazo 170" introducido, u otros como es el caso de la FBPasa de *Beta vulgaris*.

La entidad BV1 posee 11 cisteínas, que en el modelo estructural están ubicadas en el dominio AMP (32, 36, 83, 105), en el dominio FBP (114, 119, 173, 289), y en el "lazo 170" (136, 156, 161). Las cisteínas 32 y 36, ubicadas en la hélice H2 de BV1a (ver Capítulo I), están a distancia y orientación idóneas para formar un puente disulfuro de 2.07 Å. La cisteína 83, situada en la hélice E1, y la cisteína 105, en la hélice E2, también pueden formar un enlace disulfuro de 2.04 Å. Además, aparece un enlace entre las cisteínas 136 y 156 (2.04 Å) del "lazo 170" (Lámina II. 16A).

La reducción del enlace del primer puente disulfuro putativo, ubicado en el área de acoplamiento del AMP, no parece suficiente para explicar un aumento de la actividad. Al contrario, la reducción del segundo enlace putativo, situado en el eje del plano del "lazo 170", puede generar un reajuste conformacional susceptible de modular la actividad.

El modelo BV1b (ver Capítulo I) se diferencia del BV1a por la conformación de su extremidad N-terminal, en general, y las 3 primeras hélices alfa, en particular. En BV1b las cisteínas precedentes ya no se encuentran en condiciones idóneas para interactuar.

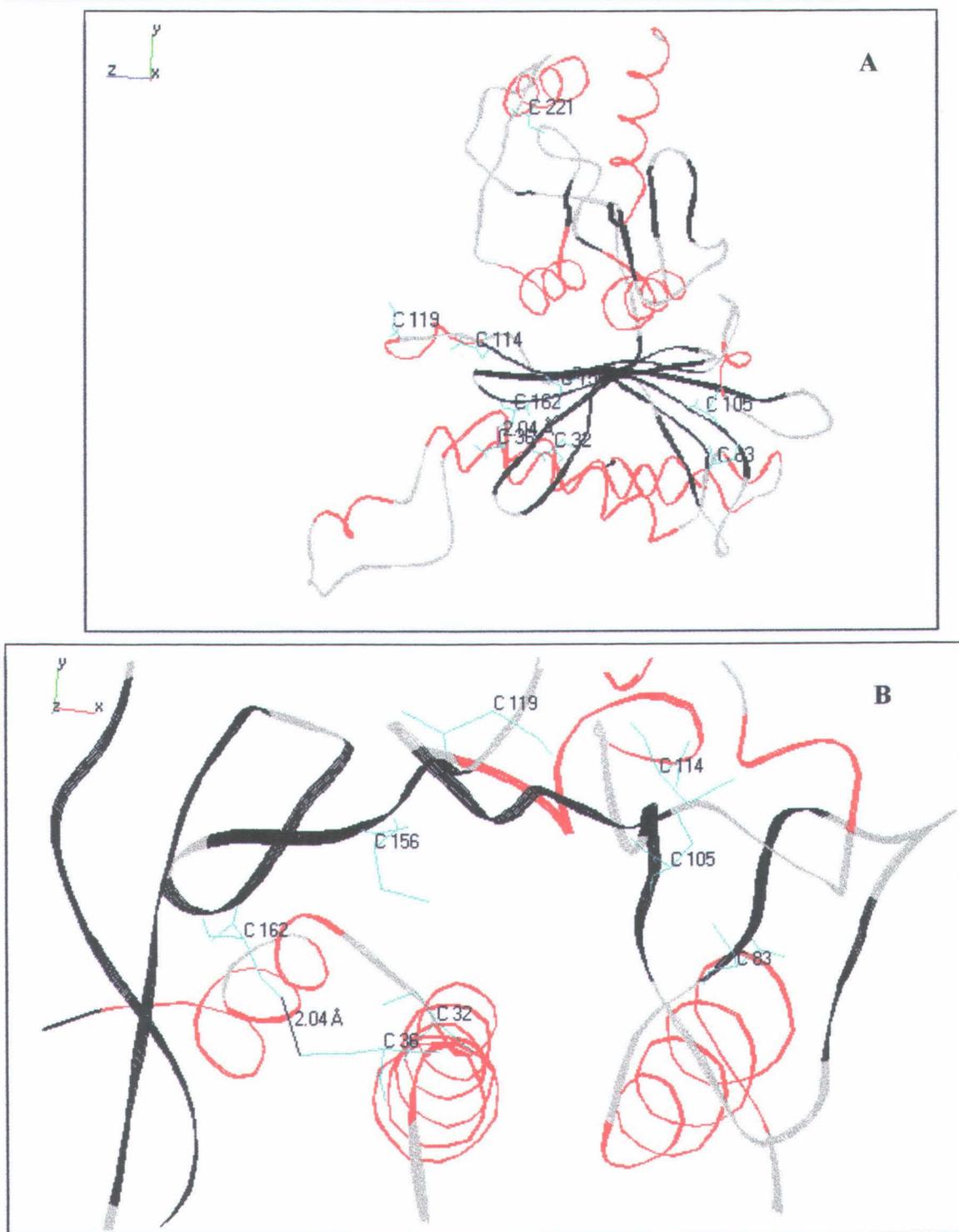


Lámina II. 14. Ubicación de las 9 cisteínas en el modelo estructural de la FPBasa citosólica de *Beta vulgaris* (A). Las cisteínas 36 y 162 se encuentran a una distancia y orientación adecuada para formar un puente disulfuro, accesible a reductores como el DTT (B).

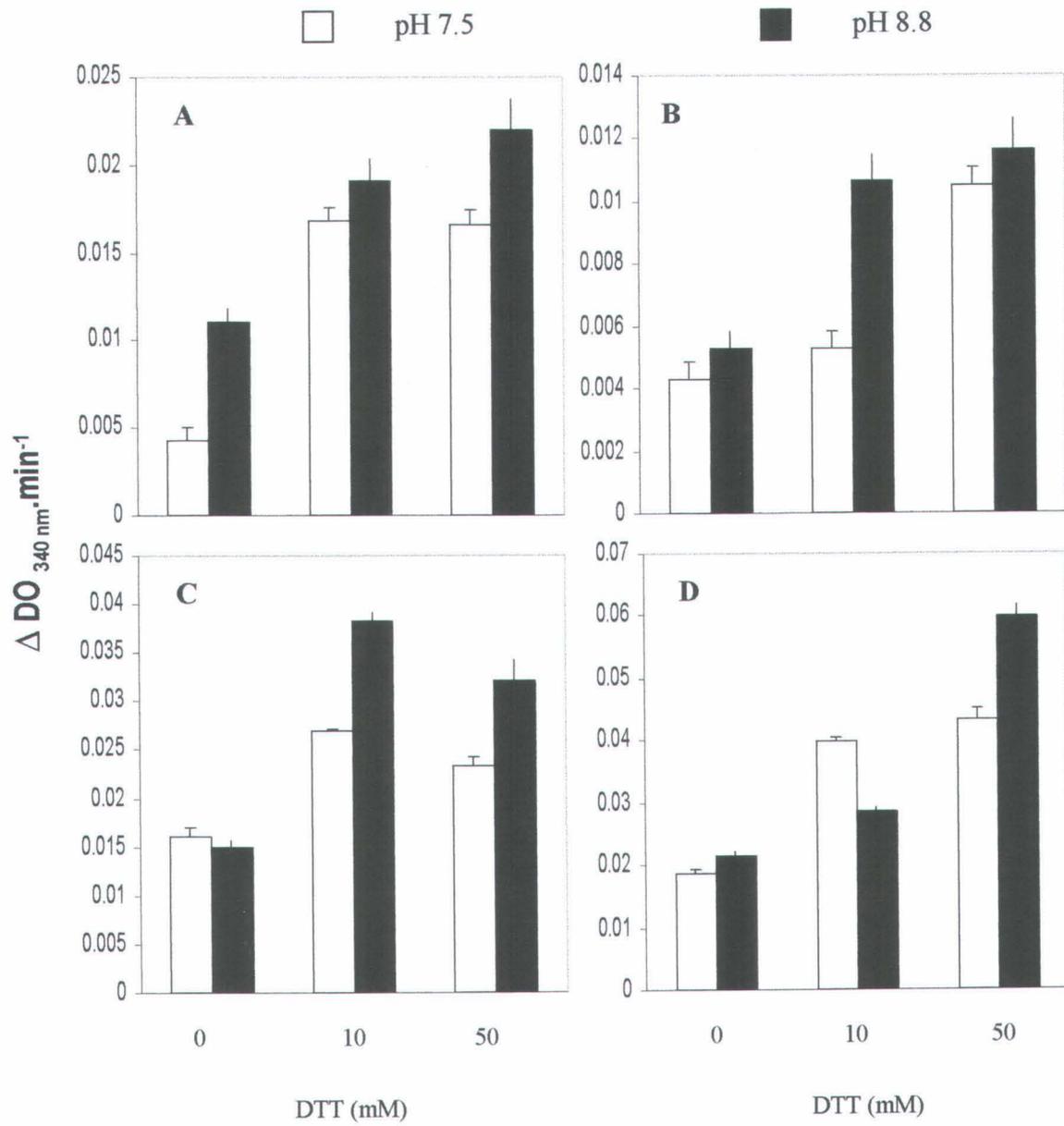


Lámina II. 15. Efecto de 10 y 50 mM DTT, a pH 7.5 y 8.8, sobre la actividad de las FBPasas quiméricas BV1 (A), BV2 (B), HL1 (C), y HL2 (D).

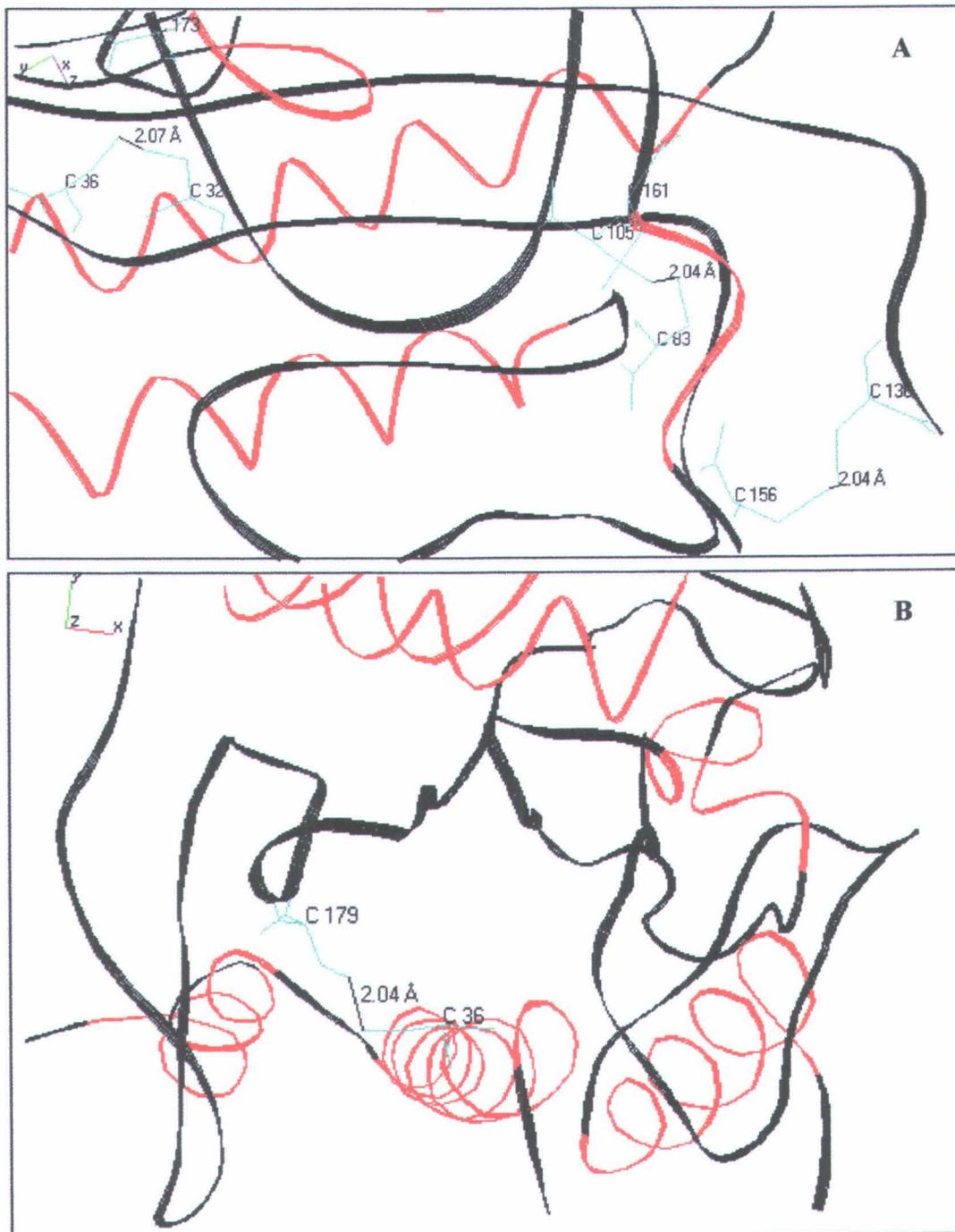


Lámina II. 16. Interacción entre cisteínas en el modelo estructural de la FPBasa quimérica BV1a (A) y BV2 (B). Las cisteínas 32 y 36, y las 83 y 105, pueden formar puentes disulfuro en BV1a. Se nota un enlace disulfuro al nivel del “lazo 170” entre las cisteínas 136 y 156. En la estructura BV2 se encuentra el mismo puente disulfuro que en la enzima de *Beta vulgaris* entre las cisteínas 36 y 179.

En la estructura BV2, al igual que ocurre con la enzima de *Beta vulgaris*, las cisteínas 36 y 179 pueden formar un puente disulfuro de 2.04 Å. Éste está también ubicado en la área de acoplamiento del AMP y, por lo tanto, accesible al solvente. En los modelos estructurales de HL1 y HL2 las cisteínas no están situadas en posición adecuada para interaccionar. Habrá que atribuir la activación por DTT a la reducción de los residuos de cisteína del “lazo 170”.

Cisteínas del “lazo 170”	<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Pisum sativum</i>	BV1	BV2	HL1	HL2
1 ^a	155	153	136	136	146	146
2 ^a	174	173	156	156	166	166
3 ^a	179	178	161	161	171	171

Tabla II. 4. Posición respectiva de las cisteínas del “lazo 170” implicadas en la modulación redox.

4.2. Acción de la tiorredoxina

La activación de la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum* sirve aquí de referencia. Como es sabido, la Trx *f* es más eficiente en la transferencia de equivalentes de reducción a las cisteínas de esta FBPasa que la Trx *m* (Lámina II. 17). Ninguna de las dos Trxs activa la enzima de *Beta vulgaris*, seguramente por no poder acceder al puente disulfuro putativo. Las Trxs tampoco activan la enzima humana, lo que es coherente con los datos estructurales de esta enzima. Más aún, la presencia de esas pequeñas proteínas provoca un leve descenso de la actividad enzimática.

Respeto a las FBPasas quiméricas (Lámina II. 18), la presencia de Trx provoca un incremento de la actividad de las entidades BV2 (Trx *m*), HL1 (Trx *f*) y HL2 (Trx *f*, Trx *m*). La acción de este reductor es solamente atribuible a la existencia de enlaces disulfuros a nivel del “lazo 170”, supuesto que éstos estén accesibles. Resumiendo, se observa que las FBPasas quiméricas no responden de manera uniforme, sino según el tipo de Trx.

Por otra parte, el efecto de las Trxs no tiene el mismo alcance que en la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum*. En efecto, tres son los efectores capaces de activar esas enzimas, el FBP, el DTT y la tiorredoxina. El FBP no sólo activa, sino que también estabiliza la estructura, lo que se manifiesta en la fase de preincubación a 28 °C. Para poner en evidencia el efecto de la tiorredoxina, había que incubar la enzima con una concentración de FBP y de DTT que no la active totalmente. Por otra parte, se puede activar la enzima cloroplastídica *in vitro* en presencia de Trx con tan sólo 1mM de Cl₂Mg. En cambio, las quiméricas conservan su exigencia inicial en Cl₂Mg. En resumen, las Trxs pueden activar las FBPasas quiméricas provocando un reajuste conformacional más apropiado a la actividad de esas FBPasas, aunque con un exceso de FBP o de DTT se puede obtener el mismo efecto

Resultados

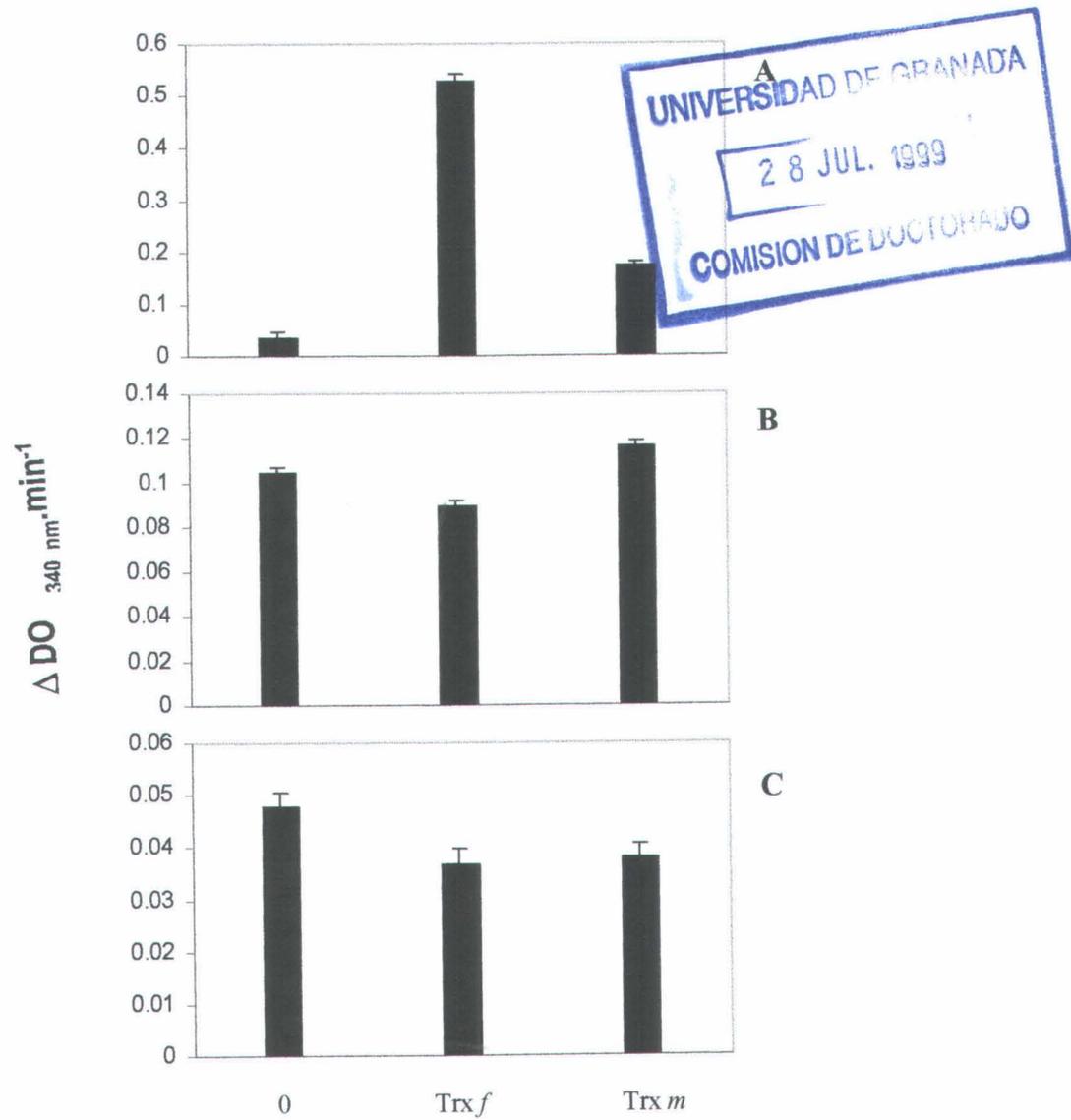


Lámina II. 17. Efecto de la Trx *f* (4.3 μ g) y Trx *m* (7.8 μ g) a pH 7.9, sobre la actividad de la FBPasa cloroplastica de *Pisum sativum* (A), de la citosolica de *Beta vulgaris* (B), y de la enzima del higado humana (C).

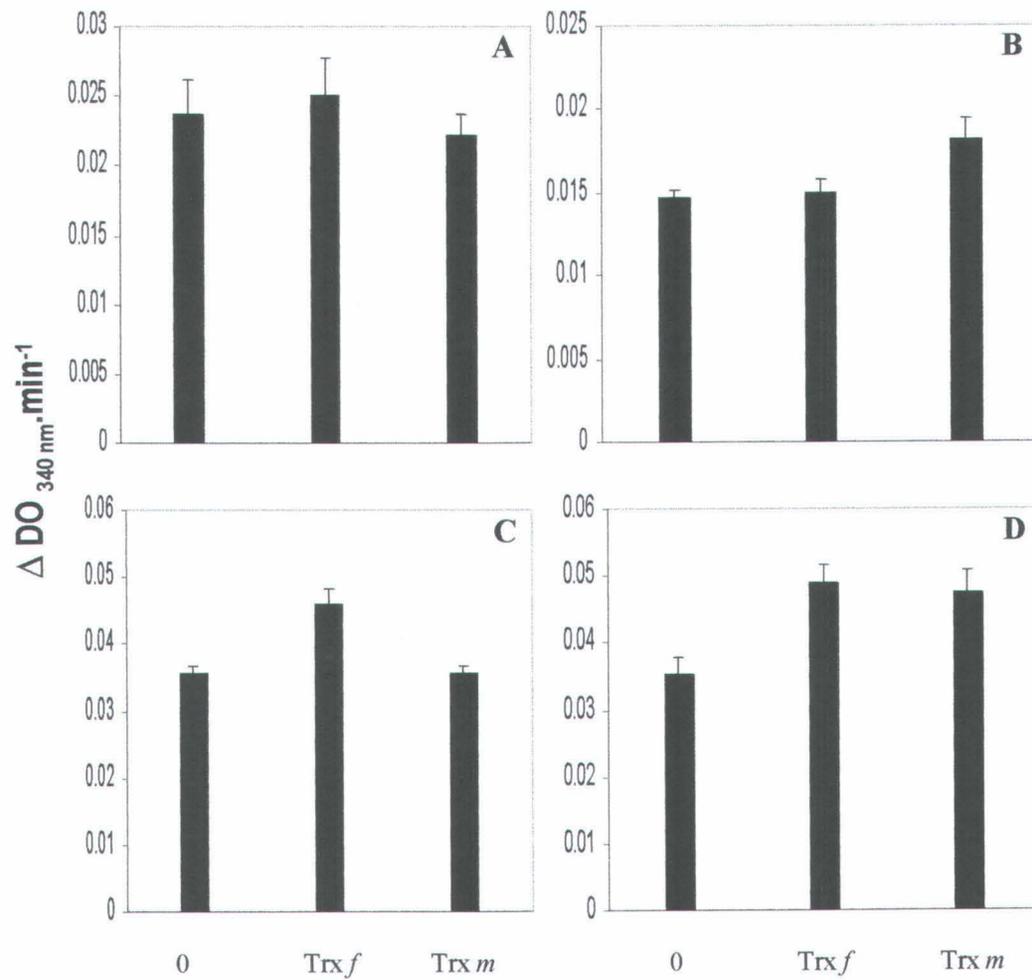
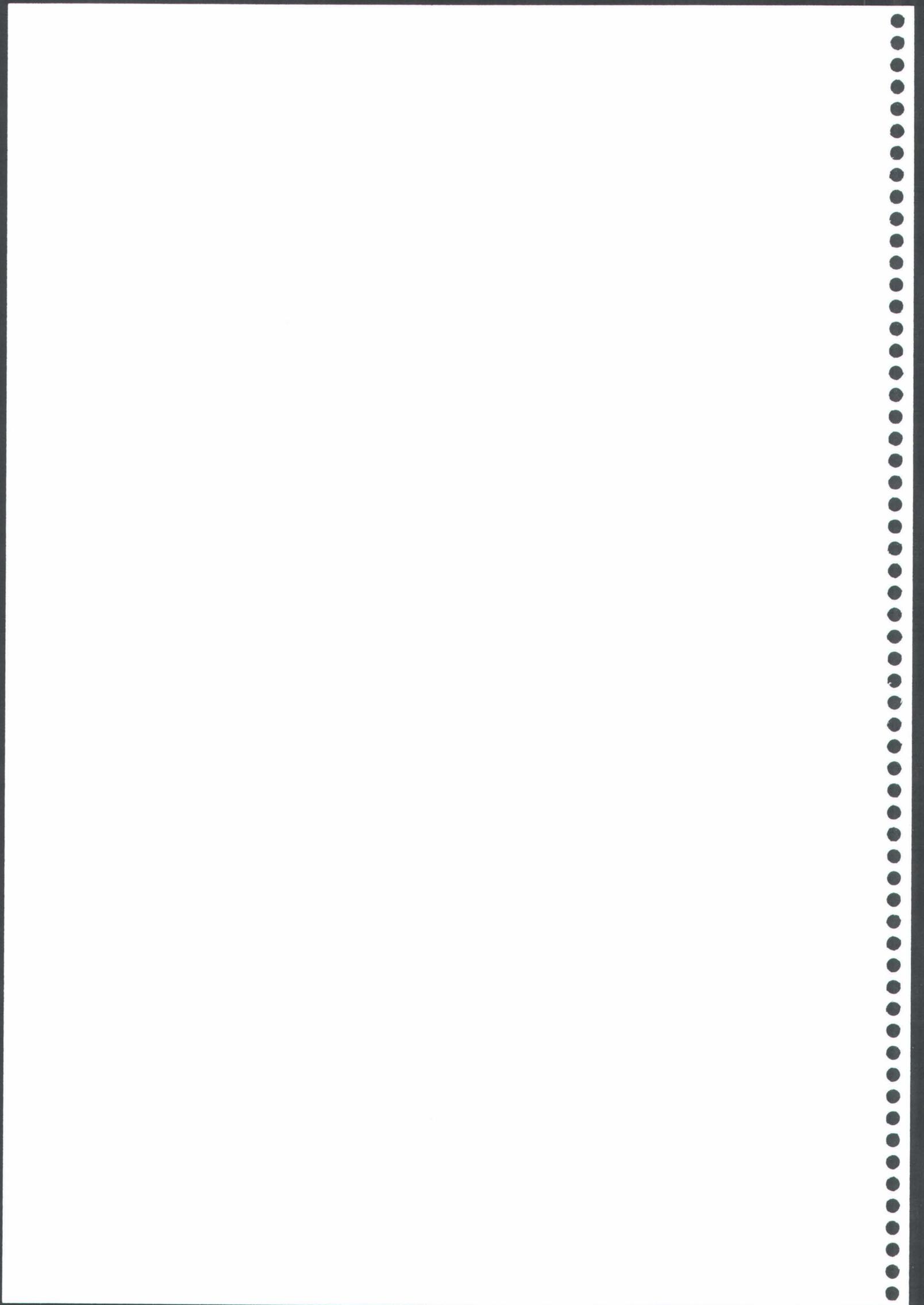


Lámina II. 18. Efecto de la Trx *f* (4.3 μg) y Trx *m* (7.8 μg), a pH 7.9, sobre la actividad de las FBPasas quiméricas BV1 (A), BV2 (B), HL1 (C), y HL2 (D).



II. II. DISCUSIÓN

1. OBTENCIÓN DE FBPasas QUIMÉRICAS

El objetivo de este trabajo ha sido el de construir FBPasas citosólicas quiméricas, por inserción en igual lugar del "lazo 170" de la enzima cloroplastídica de *Pisum sativum*. Estas nuevas enzimas se encontrarán dotadas del fragmento implicado en la regulación rédox de la FBPasa cloroplastídica (Markus *et al.*, 1988). Mutaciones al nivel del "lazo 170" confirman el papel de las tres cisteínas 153, 173 y 178 en la interacción con la tiorredoxina. La 153 parece la más importante en la regulación rédox, pues puede formar un enlace disulfuro alternativamente con la 173 o la 178 (Jacquot *et al.*, 1997).

La conformación exacta del "lazo 170" queda por determinar. En la estructura de la enzima de *Spinacea oleracea* de Villeret *et al.* (1995), los átomos a azufre de las cisteínas 174 y 179, equivalentes a las 173 y 178 de la FBPasa de guisante, están distantes de 5 a 16 Å, según el monómero, mientras que el de la cisteína 155, equivalente a la 153 de guisante, está distante aproximadamente 9 Å del de la cisteína más cerca. Con esas distancias, la formación de enlaces disulfuros no es concebible. La evaluación del modelo de Villeret (Capítulo I) indica que el factor B del "lazo 170" es demasiado elevado como para sacar conclusiones acertadas con respecto a su conformación.

El presente trabajo se ha llevado a cabo con la enzima citosólica de *Beta vulgaris* y la de hígado humano, ensayando el efecto de la inserción del "lazo 170" de la FBPasa cloroplastídica en aquellas, unas enzimas en que la modulación de su actividad no obedece a una regulación rédox. Esas construcciones podrían ser caracterizadas por un reductor (DTT, tiorredoxina) o, antagónicamente, por el AMP.

El análisis de estas proteínas quiméricas era dependiente de su síntesis a concentraciones suficientes, ya que la expresión de proteínas eucariotas en *E. coli* está sujeta a precipitación por agregación, con formación de cuerpos de inclusión (Jaenicke, 1987). En efecto, las proteínas bacterianas son, en general, de pequeño tamaño y se conforman de manera post-traducciona (Netzer *et al.*, 1997). Su promedio es de 35 kDa (317 residuos), y tienen un bajo número de proteínas multidomiales. En cambio, las proteínas eucariotas son, en general, largas y de dominios múltiples, y se conforman de manera co-traducciona. En consecuencia, esas entidades frecuentemente no logran conformarse correctamente *in vitro* (Netzer *et al.*, 1998). La inserción del "lazo 170" en las proteínas citosólicas podría contribuir aun más a la mala conformación de éstas y, por lo tanto, a su inactivación y agregación. De hecho, un elevado porcentaje de las proteínas sintetizadas precipita con los residuos celulares tras el prensado.

Se ha obtenido una concentración de proteínas quiméricas apreciables, y en un razonable grado de purificación. Se ha preparado también la enzima de *Beta vulgaris*, expresada como proteína de fusión con un fragmento peptídico de 26 kDa, la glutatión transferasa (GST). Estos datos subrayan la importancia de los dominios de la FBPasa como unidad estructural y como núcleo de conformación, lo que permite obtener enzimas viables a pesar de las modificaciones introducidas.

2. CARACTERIZACIÓN

Las diferentes FBPasas fueron parcialmente purificadas de los lisados de *E. coli* con sulfato amónico entre 35 y 75 % de saturación, y resuspendidas en tampón maleato. Se apreció un desplazamiento del pH óptimo hacia un pH más básico con respecto a la proteína silvestre. También se puso de manifiesto una cierta inercia a la activación, así como una K_m frente al sustrato más elevada, mientras que la K_m frente al Mg^{2+} quedaba sin cambios importantes.

Las modificaciones introducidas en las proteínas silvestres provocan una pérdida de la estabilidad térmica, así como una tendencia a la inactivación debida, sin duda, a degradación o desnaturalización. A causa de ello fue preciso almacenar estas proteínas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en pequeñas alicuotas, y utilizar muestras recién descongeladas o expresadas. Mutaciones puntuales en la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum* provocan también este tipo de desestabilización de la enzima (Jacquot *et al.*, 1997), mientras que mutaciones a nivel del lazo 50-72 de la enzima de riñón de cerdo (Kurbanov, 1998), en el sitio de acoplamiento del metal (Chen *et al.*, 1993), o en el sitio de acoplamiento del sustrato en la enzima de rata (El-Maghrabi *et al.*, 1991), afectan notablemente los parámetros catalíticos de esas enzimas. En cambio, mutaciones de aminoácidos implicados en la interacción con AMP en la enzima humana, no parecen afectar estos parámetros (Gigh-Jain *et al.*, 1994).

A pesar de todo, las proteínas quiméricas presentan una evidente actividad FBPasa, lo que indica que su conformación es lo suficiente correcta. La quimerización conlleva una pérdida del K_{cat} con respecto a la proteína silvestre. Se observó también una cierta pérdida de afinidad para el sustrato, a pesar de que éste estabilice la estructura. En consecuencia, se podía aumentar la concentración de FBP en la fase de incubación a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ a más de $600\text{ }\mu\text{M}$ sin observar un efecto inhibitorio de parte del sustrato, cosa habitual en las FBPasas citosólicas (Zimmermann *et al.*, 1978).

La alteración de los parámetros cinéticos de estas enzimas quiméricas podría provenir de desajustes locales que no se ponen de manifiesto en los modelos estructurales generados por homología, ya que este método busca la similitud. Un aminoácido clave, como los del sitio de acoplamiento del FBP, que se encontrara fuera de su contexto normal, podría generar una cierta ineficiencia en la hidrólisis del fosfato. Del mismo modo, un aminoácido implicado en la fijación del metal, o en la estabilización del AMP, como la alanina 24, la leucina 30 o la arginina 140 de la proteína humana, que estuviera descolocado por torsiones locales inducidas por la inserción del "lazo 170", podría generar un aumento de la K_m del sustrato.

La pérdida de la estabilidad térmica indica que el empaquetamiento de la enzima silvestre ha sido modificado. Experiencias de rediseño de proteínas confirman la idea de que un incremento del empaquetamiento interno aumenta la estabilidad térmica, aunque el exceso puede conllevar una disminución funcional (Levitt *et al.*, 1997). La estabilidad de una proteína resulta de la combinación de diferentes factores, como los enlaces hidrógeno, las interacciones de van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas, así como modificaciones en la superficie externa. Muchas son las posibilidades de desplazar el equilibrio original por mutaciones, sin que compense el nuevo equilibrio.

Carrasco *et al.* (1994) vieron que la FBPassa cloroplastídica de *Pisum sativum* expresada en *E. coli*, pierde el 58 % de actividad tras 30 min a 60 °C, mientras que la enzima nativa sometida al mismo tratamiento queda plenamente activa. Además, cambiaban otros parámetros, como la K_m para el sustrato, el coeficiente de Hill, así como el comportamiento electroforético. Esta FBPassa recombinante no padece ninguna mutación de origen genético. La única diferencia entre las dos entidades viene de su modo distinto de expresión, a saber, la nativa en un entorno eucariota, y la recombinante en otro procariota.

La probabilidad de desajuste conformacional de las proteínas eucariotas expresadas en *E. coli* aumenta con el número de residuos y de dominios, así como con la extensión de las mutaciones inducidas. En el caso de expresiones heterólogas en sistemas procarióticos de proteínas eucariotas cuyos genes han sufrido, además, una mutación, como es el caso de las FBPassas quiméricas que nos ocupan, la forma de ver la causa de la inestabilidad del producto de expresión, es llevar a cabo una mutación inversa y realizar de nuevo la expresión en condiciones análogas. El restablecimiento del gen original debería inducir la recuperación de la estabilidad perdida. En caso contrario, habría que concluir que la expresión en *E. coli* tiene más incidencia en la estabilidad de la proteína que la mutación provocada.

Las proteínas quiméricas manifiestan una mayor afinidad para el AMP que las proteínas silvestres. Eso indica que el sitio de acoplamiento del nucleótido no ha sido alterado de manera substancial en los modelos BV1 y HL1 por las manipulaciones genéticas.

Los modelos BV2 y HL2 presentan una estructura en forma T por la torsión del plano del monómero, y la nueva conformación del lazo 50-72. Si fuera el caso, se debería esperar obtener una proteína con una constante de catálisis inferior al de la proteína silvestre, y con una mayor afinidad para el AMP, ya que la estructura adopta una forma favorable a la unión del nucleótido. En otras palabras, haría falta menos AMP para modular dicha enzima.

La distinta sensibilidad al nucleótido puede deberse a las mismas circunstancias mencionadas anteriormente, a saber, un desajuste local en una área funcional o estructural. En efecto, mutaciones en torno al sitio de fijación del metal en la enzima de riñón de cerdo induce un aumento de la afinidad para el AMP, junto con una importante disminución de constante de catálisis, mientras que los demás parámetros como la K_m para el sustrato no presentan alteraciones importantes (Chen *et al.*, 1993).

3. ACTIVACIÓN

Las enzimas quiméricas estabilizadas por el sustrato responden positivamente a la acción del DTT en un rango de pH de 7.5 a 8.8. Esto indica que las cisteínas introducidas con el "lazo 170", sobre todo en las entidades HL1 y HL2, pueden interaccionar para formar enlaces disulfuros. Esta reacción, que conlleva una fase de incubación y reducción de enlaces covalentes, pone de relieve los rasgos individuales de estas proteínas quiméricas. La entidad HL2 presenta los mejores parámetros cinéticos, lo que coincide con los datos de evaluación del modelo estructural. HL2 presenta más actividad a pH 7.5 que a pH 8.8. en presencia de 10 mM DTT. En comparación, BV2 que debería tener el mismo perfil es la enzima con menos actividad.

El efecto de las Trxs *f* y *m* sobre esas entidades permite confirmar la funcionalidad del "lazo 170" insertado. La entidad HL2 se destaca por reaccionar con Trx *f* y Trx *m*, mientras que HL1 responde solo a Trx *f* y BV2 solo a Trx *m*. El efecto sobre BV1 no es significativo en las condiciones empleadas. Eso sugiere que los puentes disulfuros de esas enzimas no presentan la misma accesibilidad; o sea, que la conformación del "lazo 170" es diferente en los cuatro casos. Por otro lado, hay conformaciones más apropiadas a una Trx que a otra; es decir, que ambas Trxs no requieren la misma accesibilidad de esos enlaces disulfuros, tal como ha sido sugerido por Dorothee *et al.* (1998). Según estos autores, las interacciones proteína-proteína entre FBPasa y las distintas Trxs generan conformaciones diferentes a la FBPasa original.

Los efectos de las Trxs *f* y *m* sobre las FBPasas quiméricas son limitados por varios motivos, y no pueden compararse en su magnitud a lo que ocurre con la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum*. Tomando la entidad HL2 como referencia, se ha introducido en su estructura un lazo que no es imprescindible para que funcione. HL2 puede ser activa con los residuos tioles del "lazo 170" oxidados, aunque la reducción de éstos por DTT o Trx incrementa la actividad específica. Por otro lado, para poner de evidencia el efecto de la Trx, hace falta utilizar un medio reaccional normal, pero operar en la fase de incubación en presencia de una concentración *ad hoc* de DTT y FBP. Lo que entonces se pone de evidencia es únicamente el suplemento de actividad que provoca la reducción de los residuos tioles. En cierto modo esta reacción es, en su fundamento, comparable al efecto de 10 mM DTT sobre la actividad cloroplastídica de *Pisum sativum* a pH 8.8, en presencia de 10 mM Cl₂Mg. Más aún, la reacción se mide a pH 7.9, cerca del pH óptimo de las entidades quiméricas, lo que deja un leve margen a la Trx para amplificar la actividad. En comparación, el DTT a pH 7.5 o 8.8 provoca un mayor aumento de actividad.

En conclusión, las construcciones proteicas realizadas logran mimetizar la enzima cloroplastídica sólo hasta cierto punto. No obstante, estos resultados proporcionan datos adicionales a favor de las cisteínas del "lazo 170" como efectores del intercambio electrónico que ocurre en la interacción con la tiorredoxina, modulando la FBPasa cloroplastídica.

Se ha puesto de evidencia la posibilidad de establecimiento de un puente disulfuro putativo entre las cisteínas 32 y 162 de la enzima citosólica de *Beta vulgaris*, lo que

podría explicar la activación significativa de esta enzima por DTT a pH superior a 7.5. Estas cisteínas son equivalentes a las cisteínas 49 y 190 de *Pisum sativum*, que en esta última, no están implicadas en la regulación redox de esta enzima (Jacquot *et al.*, 1997). De otra parte, un puente disulfuro ha sido detectado entre esos mismos aminoácidos de la FBPasa cloroplastídica de *Spinacea oleracea* (Dorothee *et al.*, 1998). Este enlace se vuelve accesible a la sulfitolisis sólo cuando la enzima ha sido reducida por Trx *f* y, con un grado menor, por Trx *m*. En la enzima oxidada el enlace no es accesible a un ataque nucleofílico por iones sulfitos.

En las enzimas citosólicas se ha postulado la existencia de puentes disulfuros putativos, en particular en *Brassica napus*, *Saccharum*, y *Solanum tuberosum* (Anderson *et al.*, 1995, 1997). La mutación de la cisteína 162 de *Beta vulgaris* permitiría determinar si este enlace 36-162 está implicado en la modulación redox por DTT y, por tanto, si además del conocido papel del AMP y de la fructosa-2,6-bisfosfato en la regulación de la enzima gluconeogénica, existe en el caso de la citosólica de *Beta vulgaris* un tipo de regulación redox. En última instancia, si el resultado encontrado *in vitro* tiene un sentido fisiológico o, por el contrario, se trata de un efecto artefactual. En la misma línea, habría que buscar enlaces disulfuros putativos en la demás FBPasas citosólicas, como la de *Pisum sativum*, y estudiar las dos isoenzimas de una misma especie como un sistema integrado.

4. CONCLUSIÓN

En este trabajo se han construido FBPasas citosólicas quiméricas, portando en el mismo sitio que la isoenzima cloroplastídica el "lazo 170" implicado en la interacción FBPasa-tiorredoxina. Esas entidades presentan actividad enzimática, lo que permite suponer una conformación correcta, como postulaban los estudios predictivos. Estas entidades presentan también otras características, como pérdida de la estabilidad térmica y el papel estabilizador del sustrato.

Estas proteínas son modulables por DTT, lo que indica la operatividad de las cisteínas introducidas. Tres de las cuatro FBPasas quiméricas son modulables por tiorredoxina, pero la reacción depende del tipo de tiorredoxina. Ello indica que el "lazo 170" tiene una conformación diferente en cada caso, y que hay conformaciones más apropiadas para cada tipo de tiorredoxina.

En todas las experiencias la entidad HL2 presentó las mejores características. Sobre esta base se podría poner a punto un protocolo para purificar esta enzima a homogeneidad, y utilizarla como modelo de estudio.

Resumiendo, este trabajo pone de manifiesto que las mutaciones pueden generar proteínas con las características perseguidas, pero aparecen otras añadidas, como pérdida de la termoestabilidad, tendencia a la degradación, etc., cuando no es la pérdida por completo de la actividad enzimática. Esto significa que todavía no se dominan

algunas reglas que habría que establecer en ingeniería de proteínas para obtener entidades con una viabilidad operacional. Habrá que seguir acumulando datos. Por ello, experiencias *in silico* e *in vitro* pueden ser herramientas complementarias en la gestión de esta área de conocimiento.

Capítulo III.
FBPasa CITOSÓLICA DE *PISUM SATIVUM*

III. I. RESULTADOS

1. AISLAMIENTO DEL GEN DE LA FBPasa CITOSÓLICA DE *PISUM SATIVUM*

El alineamiento de las secuencias codificantes de las FBPasas citosólicas de plantas conocidas hasta la fecha muestra la existencia de 50 % de identidad (Lámina III. 1). Se reparten en dos grupos. En el primero se encuentran las de *Beta vulgaris* y *Saccharum*, con genes de 989 y 995 pares de bases (pb), respectivamente. En el segundo se encuentran las de *Brassica napus*, *Spinacia oleracea*, *Solanum tuberosum* y *Oryza sativa*, con 1029, 1021, 1023 y 1021 pb. En efecto, las del primer grupo se caracterizan por una extremidad 5' con un defecto de 36 pb, que corresponden a 12 aminoácidos. La secuencia de los genes del segundo grupo presenta, a partir de la posición 37, el perfil consenso siguiente:

ATG ACC/A^G ATA/C^C AC.....

La secuencia desde esta posición 37, hasta la extremidad 3' de los genes del segundo grupo, es idéntica a la extremidad 5' de los del primer grupo, correspondiendo a una secuencia de lectura abierta (Open Reading Frame). En efecto, el codón universal de iniciación ATG de la posición 37 está en fase con la secuencia total de lectura. Estos datos indican que es posible identificar los genes de las demás FBPasas citosólicas a partir de sus ARNm respectivos, por RT-PCR con cebadores consensos.

Para aislar el gen de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum*, se han diseñado los cebadores consensos siguientes (Material y Método III. 4-2):

FCGN, correspondiente a la extremidad 5' de los genes del segundo grupo;

FBP-N, secuencia homóloga a la extremidad 5' de los del primer grupo o, alternativamente, a la posición 37 de los del segundo grupo;

FBP-C, correspondiente a la extremidad 3' en ambos grupos;

FC4 (directo) y **FC5** (inverso), correspondientes a una secuencia conservada en la mitad del gen de ambos grupos.

Extracciones de ARNm de diferentes tejidos fueron sometidas a RT-PCR con combinaciones de los cebadores anteriores. Se aislaron fragmentos de aproximadamente 0.5 y 1 kb. Estos fueron analizados por southern blotting utilizando como sonda el gen de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris*, marcado con digoxigenina. Un fragmento de 1 kb obtenido con los cebadores FBP-N_FBP-C, así como otros dos de 0.5 kb obtenidos con FBP-N_FC5, y FC4_FBP-C, dieron positivo con la sonda (Lámina III. 2). Estos

		10	20	30	40	50	60	
1	BV	-----ATGACCATAACACGTTTCGTATTG					24	
2	SO	ATGGATCATGCTGGGGATGCAATGCCGTACGGACTTGATGACCATAACACGGTATGTGTTG	60					
3	ST	ATGGATCACGCGGGCGGATCGACACCGGACGGATTTGATGACAATAACAAGGTTTGTGTTG	60					
4	BN	ATGGATCACGAAGCAGATGCTTTCCGT---GATTTGATGACCATCACGAGATTTCGTGCTG	57					
5	OS	ATGGATCACGAGGCGGACGCCGTACCGGACGGACTGATGACCATCACGCGGTACGTGCTG	60					
6	SH	-----ATGACCATCACGCGGCACGTGCTG					24	
		70	80	90	100	110	120	
1	BV	AATGAACAGTTCGAAACGTCCTGAGTCTCGTGGTGACTTCACCATTCCTTATGAGTCACATT	84					
2	SO	AATGAGCAGTCCAAACGCCCGAGTCTCGTGGTGATTTCACAATTCCTCAGTCACATT	120					
3	ST	AATGAGCAGACGAAGCACCCGGAATCCCGTGGAGACTTCAGTATTTGCTCAGTCACATT	120					
4	BN	AATGAGCAATCAAAGTATCCAGAGTCTCGTGGGGATTTACGATTTTGCTCAGCAACATC	117					
5	OS	AACGAGCAGAGCCGCAACCCGGAGGCACGCGGGACCTCACCATCCTCCTCTCCACATC	120					
6	SH	AACGAGCAGAGCCGGAACCCCGAGTCCCGGGGACTTCACCATCCTGCTCTCCACATC	84					
		130	140	150	160	170	180	
1	BV	GTTCTTGGCTGCAAATTTGTCTGCTCTGCTGTTAATAAAGGCTGGTCTTGCCAAGCTCATA	144					
2	SO	GTTCTTGGCTGCAAATTTGTTTGTCTGCTGTTAACAAGGCTGGTCTTGCCAAGCTCATA	180					
3	ST	GTTCTTGGCTGCAAAGTTTCGTATGCACTGCTGTTAACAAGGCAGGTTTAGCCAAACTCTA	180					
4	BN	GTTTTGGGATGCAAATTCGTCTGCAGTCCCGTCAACAAGGCTGGTCTTGCCAAGCTTATT	177					
5	OS	GTGCTTGGCTGCAAAGTTTCGTCTGCCTCCGCCGTCAACAAGGCCGGGCTTGCCAAGCTCATC	180					
6	SH	GTCTCTGGCTGCAAAGTTTCGTCTGCCTCCGCCGTCAACAAGGCCGGACTTGCGCAGCTCATT	144					
		190	200	210	220	230	240	
1	BV	GGACTTGCAGGGGAGACAAATATTCAGGGTGAAGAGCAAAGAAGTTGGATGTTCTTTCA	204					
2	SO	GGACTTGCAGGGGAGACTAACATTCAGGGTGAAGAGCAAAGAAGCTAGATGTGCTCTCA	240					
3	ST	GGACTTGCAGGGGAGACTAATGTGCAGGGAGAAGATCAAAGAAGAACTTGATGTACTCTCA	240					
4	BN	GGACTTGCAGGGGAGACAAATATTCAGGGTGAAGAGCAAAGAAGCTGGATGTGCTCTCT	237					
5	OH	GGGCTGGCCGGCGAGACCAACGTTTCAGGGAGAGGAGCAGAAGAAGCTGGACGTGCTGTCC	240					
6	SH	GGACTCGCCGGAGAGACCAACGTTGCAGGGAGAGGAGCAGAAGAAGCTGGACGTCTGTCC	204					
		250	260	270	280	290	300	
1	BV	AATGAAGTTTTTCATTAAGGCCTTGATAGTAGTGGCAGAACTTGCATTCTTGTGTCTGAG	264					
2	SO	AATGAAGTTTTTGTAAAGGCTTTGACAGTAGTGGCCGAACCTTGCATCCTTGTGTCTGAA	300					
3	ST	AATGAAGTGTATCAAGGCTTTGGTLAGCAGTAACCGAACATGCATTCTTGTCTCTGAA	300					
4	BN	AACGATGTTTTTGTCAAAGCTTTGGTLAGCAGCGGCAGAACTTCTGTTCTTGTCTCGGAA	297					
5	OS	AACGAGGTGTTTCGTCAAGGCTCTCGTLAGCAGCGGCCGCACCTGCCGTTCTTGTCTCGAG	300					
6	SH	AACGAGGTGTTTCGTCAAGGCCCTCGTLAGCAGCGGTGCGACCTGCCGTTCTTGTCTCGAG	264					
		310	320	330	340	350	360	
1	BV	GAGGATGAGGAGGCAACATTCGTTGAGCCATCTCTACGTGGAAAGTATTGTGTTGTTTTT	324					
2	SO	GAGGACGAGGAGGCAACATTCATTGAGCCATCTCTGCGTGGAAAGTATTGTGTTGTTTTT	360					
3	ST	GAAGATGAAGAAGCCACATTTGTTAGGCCAGCTAACCGTGGAAAATACTGTGTAGTTTTT	360					
4	BN	GAAGATGAGGAAGCTACGTTTGTGGAGTCATCCAAGTGTGGAAAGTACTGTGTTGTTTTT	357					
5	OS	GAGGACGAGGAAGCGACGTTTCGTGGACCCTGCGCTGCGTGGAAAGTATTGCGTGTGCTTT	360					
6	SH	GAGGACGAGGAACAACGTTTCGTGGACCCTAAGCTACGTGGAAAGTACTGTGTTGCTTT	324					

		370	380	390	400	410	420	
1	BV	GACCCTTTGGATGGATGTTCCAACATTGACTGTGGTGTATCGATTGGCACTATCTTTGGG						384
2	SO	GACCCTCTGGATGGATCTTCCAACATTGACTGTGGTGTTC AATTGGCACGATATTTGGG						420
3	ST	GATCCTCTGGATGGATCATCGAACATTGATTGTGGTGTTC TATTGGAACGATCTTTGGA						420
4	BN	GATCCACTTGATGGATCCTCAAACATTGACTGTGGTGTCTCCATTGGAACAATCTTTGGA						417
5	OS	GATCCACTCGACGGCTCCTCCAACATCGACTGTGGCGTCTCCATCGGAACGATCTTTGGG						420
6	SH	GATCCCCTCGACGGTTCCTCCAACATCGACTGTGGCGTCTCCATCGGAACGATCTTTGGG						384
		430	440	450	460	470	480	
1	BV	ATTTACATGGTCAAAGATCTTAATAATGCAACTCTTGATGATGTCTCCAACCTGGAAA						444
2	SO	ATTTACATGGTCAAAGATTTTGAAGACTGCGACTCTTGAAGATGTCTGCAACCTGGAAAG						480
3	ST	ATTTACATGATCAAAGACGGTCAATGAACCAACTAGATGATGTCTTGC AACCTGGGATG						480
4	BN	ATTTACACAATGGAACACAGTGTGAGCCGACTACTAAGATGTTCTGAAACCTGGGAAT						477
5	OA	ATCTACATGATCAAAGATAAGGAGAATGTGACTCTTGAGGACGTGTTACAGCCTGGAAA						480
6	SH	ATTTACATGATCAAAGACAAGGACAATGTCACTCTGTCCGACGTACTGCAACCTGGCAAG						444
		490	500	510	520	530	540	
1	BV	AATATGGTAGCTGCTGGTTATTGCATGTATGGGAGCTCTTGCACGCTTGT CATGAGCACT						504
2	SO	AATATGGTAGCTGCTGGTTATTGCATGTATGGGAGCTCTTGCACGCTTGT TTTGAGCACT						540
3	ST	AACATGTTAGCTGCTGGTTACTGCATGTATGGAAGTTCTTGTACGCTAG TTTGAGCACT						540
4	BN	GAAATGGTTGCAGCGGGTTACTGTATGTACGGAAGCTCCTGCATGCTTGT GTTGAGCACA						537
5	OS	AACATGGTTGCTGCTGGATACTGCATGTACGGCAGTTCTTGCACGCTT GTTCTGAGTACT						540
6	SH	GACATGCTTGCAGCTGGATACTGCATGTATGGCAGTTCTTGCACGCTT GTTCTGAGCACT						504
		550	560	570	580	590	600	
1	BV	GGAAGCGGTGTCAATGGTTTTCACTCATGACCCATCTCTTGGAGAGTTTAT TTTAACTCAT						564
2	SO	GGAAGCGGTGTTAATGGTTTTCACTCTAGATCCATCTCTTGGAGAGTATAT TTTAACTCAT						600
3	ST	GGATCTGGAGTTAATGGTTTTACCTTGATCCCTCTCTTGGCGAGTTCATCCTAACTCAT						600
4	BN	GGAACAGGTGTCCACGGATTTACCTGGACCCATCTCTAGGAGAGTTCATAT TAACTCAC						597
5	OS	GGAATGGTGTCAATGGCTTCACTTTGATCCATCTCTCGGGGAGTTCATAT TAACTCAT						600
6	SH	GGAACTGGTGTCAATGGCTTCACTTTGATCCTTCACTTGGCGAGTTCATACTAACTCAT						564
		610	620	630	640	650	660	
1	BV	CCGGACATCAAGATCCCAAAGAAGGGTAAGATCTATTCTGTGAATGAAGGCAATGCAAAG						624
2	SO	CCAGACATCAAGATTCCAAACAAGGGTAAGATCTATTCAGTGAATGAAGGCAATGCAAAG						660
3	ST	CCTGACATCAAGATTCCTAAGAAAGGGAAAGATTTATTCAGTGAATGAAGGAAATGCCAAG						660
4	BN	CCAGACATTAAGATTCCAAAGAAGGGAAACATATACTCAGTGAATGAAGGAAATGCTCAG						657
5	OS	CCAGACATCAAGATACCAAAGAAGGGAAAGATTTATTCAGTGAATGAAGGAAATGCCAAA						660
6	SH	CCAGACATCAAGATACCTAAGAAGGGAAAGATTTATTCAGTCAATGAAGGGAACGCCAAA						624
		670	680	690	700	710	720	
1	BV	AACTGGGATGGCCCAACAACAAAGTACGTGGAGAAATGTAAGTTCCTAAGGATGGTTCA						684
2	SO	AATTGGGATGGCCCAACAACAAAGTATGTGGAAAAATGTAAGTTCCTGACAGATGGTTCA						720
3	ST	AACTGGGACAGTCCAACATCCAAATATGTGCAGAGCTGCAAGTATCCCGCTGATGGTTCT						720
4	BN	AACTGGGATGGTCCAACCACAAAATATGTAGAGAGATGCAAGTATCCCAAAGATGGTTCT						717
5	OS	AATTGGGACGAGCCTACCGCAAAGTTTGTGGAGAAGTGAAGTTCCTAAGGATGGTTCA						720
6	SH	AATTGGGACGTGCCTGTTGCAAAGTTTGTGGAGAAGTGAAGTACCCCAAAGATGGTTCCG						684

		730	740	750	760	770	780	
1 BV	TCACCAAAATCTCTCAGATACATCGGAAGTATGGTAGCGGATGTTTCATCGCACTCTACTT							744
2 SO	TCACCCAAGTCTCTCAGATACATTGGAAGTATGGTAGCTGATGTTTCATCGCACTTTACTA							780
3 ST	TCACCAAAATCTTTGAGATATATTGGAAGTATGGTTGCTGATGTTTCATCGTACATTACTC							780
4 BN	CCCGCAAAGTCACTGAGATATGTCGGAAGTATGGTAGCCGATGTTTCATCGCACTCTGCTT							777
5 OS	TCACCTAAATCCTTGAGATACATTGGAAGTATGGTTGCTGATGTCCACCGTACGTTGCTA							780
6 SH	CCACCAAAATCTTTGAGATACATTGGAAGTATGGTTGCTGATGTGCACCGTACCTTGCTA							744
		790	800	810	820	830	840	
1 BV	TATGGTGGCATCTTTTATGTACCCTGGTGATAAGAAGAGCCCTAACGGAAAACCTACGAGTT							804
2 SO	TATGGTGGCATCTTTTTGTACCCTGGTGATAAGAAGAGCCCCAACGGAAAACCTAAGAGTT							840
3 ST	TATGGAGGCATCTTCTTGTACCCCGGAGATAAGAAAAGCCCCAACGGGAAACTGAGGGTT							840
4 BN	TATGGAGGAATCTTCTGTACCCGGCTGACAAGAAAAGCCCCAATGGGAAATTGCGTGTG							837
5 OA	TATGGAGGAGTATTTTTGTACCCTGCAGACAAGAAGAGCCCAATGGAAAACCTCCGTGTT							840
6 SH	TATGGAGGTGTATTTTTGTACCCTGCTGACCAGAAGAGCCCAATGGAAAAGCTCCGTGTC							804
		850	860	870	880	890	900	
1 BV	CTTTATGAGGTCTTTCCCATGTCATTCTTAATGGAGCAAGCAGGTGGACAAGCTTTTACT							864
2 SO	CTCTACGAGGTCTTTCCAATGTCCTTCTTAATGGAACAAGCTGGCGGACAAGCTTTTACC							900
3 ST	CTCTATGAAGTATTTCCCATGTCATTTCTGATGGAACAAGCAGGAGGCCAAGCATTACT							900
4 BN	CTGTATGAAGTCTTCCCAATGGCGTTCTTGTGAGCAAGCTGGAGGTCAGGCCTTCACT							897
5 OA	CTGTATGAAGTTTTCCCATGTCATTCTTGTGAGCAGGCTGGAGGCCAGTCTTTTACA							900
6 SH	CTTTATGAAGTTTTCCCATGTCATTCTTAATGGAGCAGGCTGGAGGTCAGTCTTTACA							864
		910	920	930	940	950	960	
1 BV	GGCGAACAAACGGGCACTTGACTTGGTCCCAAAGAACATACATGATCGTTCCACCAGTATTC							924
2 SO	GGCAAACAACGGGCACTTGACTTGATCCCGACAAAATACATGAACGCTCACCAGTATTC							960
3 ST	GGGAAGCAACGGGCACTTGACTTAGTTCCAGAGAAGATACACGAACGCTCTCCTATATTT							960
4 BN	GGCAAAGAAAAGGGCACTGGACCTTGTCCCGAAAAGATCCATGAGCGTTCTCCCATATTT							957
5 OS	GGCAAAGAACGGGCTCTTGACCTCGTTTCTTACCAAGATTCACGAGAGATCCCAATATTT							960
6 SH	GGCAAAGAACGGGCTCTTGATCTGGTCCCAACCAAGATCCACGAGAGATCCCGATATTC							924
		970	980	990	1000	1010	1020	
1 BV	CTTGGCAGCTATGACGACGTTGAAGACATCAAAGCACTCTATGCTGCTGAACAG-AAGAA							983
2 SO	CTCGGCAGCTATGATGATGTTGAAGACATCAAAGCCCTCTATGCTGCTCAAGAG-AAGAC							1019
3 ST	CTTGGTAGTTATGATGATGTTGAGGAGATCAAAAAGCTCTACGCTGCTGAAGAGCAAAC							1020
4 BN	CTTGGTAGCTATGACGATGTAGAGGAGATTAAGGCTCTGTATGCGGAGGAGGAGAAGAAC							1017
5 OS	CTTGGAAAGCTTCGAAGATGTGGAGGAGATCAAAGGTTGTACGCTGCACAGGCCAAGT-A							1019
6 SH	CTCGGCAGCTACGACGATGTGGAGGAAATCAAAGCATTGTACGCCGAGCAGGCAAAGTCA							984
1 BV	TGCTTG-----							989
2 SO	GGCCTGA-----							1026
3 ST	TGA-----							1023
4 BN	TA-----							1019
5 OS	A-----							1020
6 SH	AGCTCAGCTTG-----							995

Lámina III. 1. Alineamiento de las secuencias codificantes de las diferentes FBPasas citosólicas: *Beta vulgaris* (1), *Spinacia oleracea* (2), *Solanum tuberosum* (3), *Brassica napus* (4), *Oryza sativa* (5) y *Saccharum hybrid* (6).

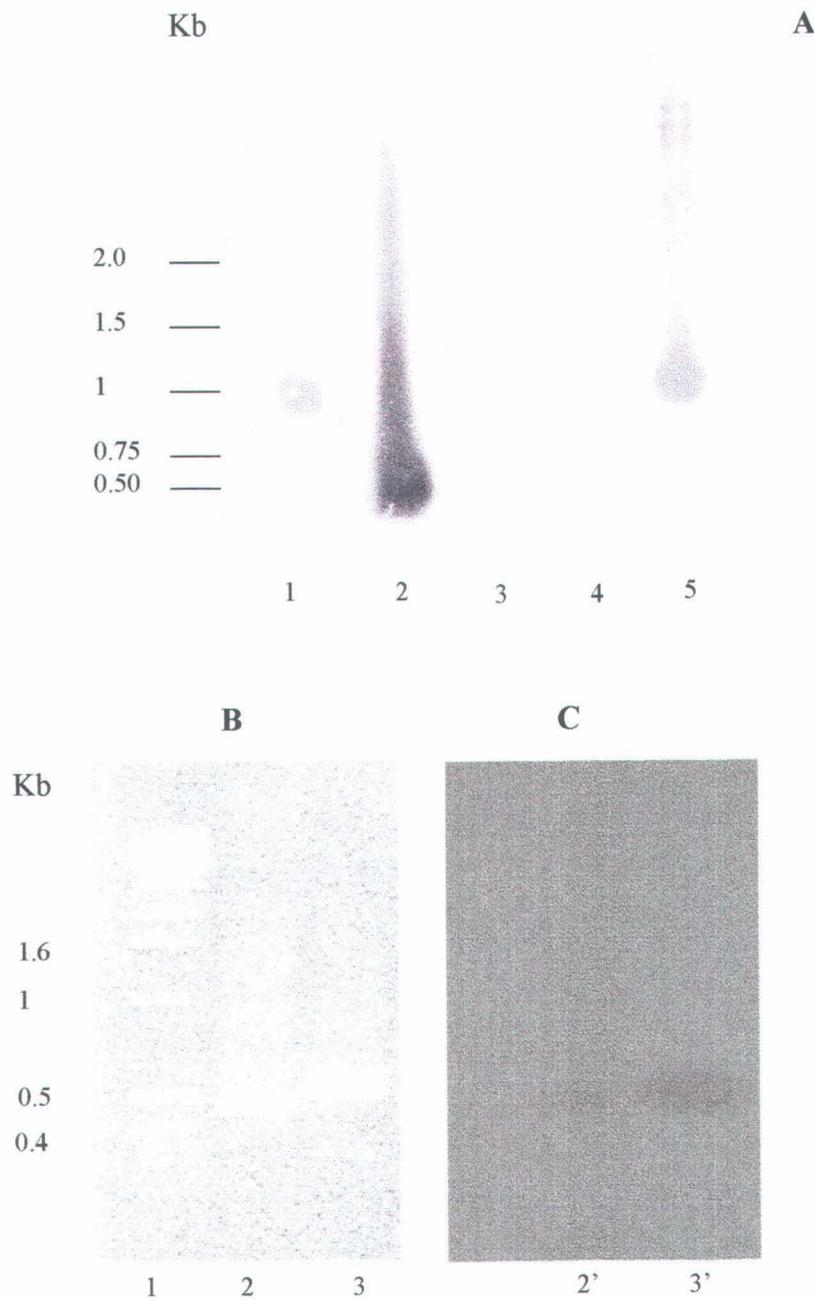


Lámina III. 2. (A) Southern blotting de diferentes fragmentos aislados por RT-PCR, hibridados con el gen de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris* marcado con digoxigenina. Fragmentos FBP-N_FBP-C (1, 5); FC4_FBP-C (2). (B) electroforesis en gel de agarosa (1%) de fragmentos genómicos aislados por PCR. (1) Patrones de marcadores moleculares; FBP-N_FC5 (2); FC4_FBP-C (3). (C), hibridación con la sonda tras transferencia. FBP-N_FC5 (2'); FC4_FBP-C (3').

fueron clonados en el vector pGMT y secuenciados. El fragmento de 1 kb corresponde a un gen de FBPassa citosólica. El alineamiento con el gen de las demás FBPassas citosólicas presentó el mismo grado de homología. Los fragmentos de 0.5 kb correspondieron a las partes 5' y 3' del fragmento de 1 kb. La secuencia se envió al banco de datos EMBL Data Library, quedando registrada con el número de acceso AJ243392.

FBP-PScit 990

```

1  ATGACCATAA CACGGTTCGT ATTGAATGAA CAATCAAAGC GCCCTGAATC
51  ACGCGGCGAT TTCACCATCT TGCTCAGTCA CATTGTTCTG GGATGTAAAT
101 TCGTTTGTTC TGCTGTAAAC AAGGCTGGTC TTGCTAAGCT CATTGGACTT
151 GCTGGAGAGA CAAATATACA GGGTGAAGAA CAGAAGAAGC TGGATGTTCT
201 TTCCAATGAT GTATTCATCA AGGCTTTGAT AAGCAGTGGC AGAACATGTA
251 TTCTTGTTTC TGAAGAAGAT GAGGAGGCAA CATTGTGGA ACCCTCGCTG
301 CGTGAAAGT ATTGTGTTGT TTTTGATCCA TTGGATGGCT CCTCTAACAT
351 TGATTGTGGT GTTTCCATTG GAACTATTTT TGGGATTTAT ATGGTGAAAG
401 ATAACCATGC ACCAACCCTC GATGATGTCC TGCAACCTGG CAAGAACATG
451 TTGGCAGCTG GTTATTGTAT GTATGGAAGC TCTTGACACG TTGTGCTAAG
501 CACCGGAAGT GGTGTTAATG GTTTCACCCT TGACCCTTCT CTCGGTGAAT
551 TCATCTTAAC TCACCCTGAC ATTAAGATCC CAAAGAAGGG AAAGATTTAT
601 TCAGTGAATG AAGGGAATGC CAAGAACTGG GATGGCCCTA CTACCAAGTA
651 TGTGGAGAAA TGCAAGTTTC CCACAGATGG TTCATCACCA AAGTCTCTAA
701 GATATATTGG AAGCATGGTA GCTGATGTTT ATCGCACATT GCTTTATGGA
751 GGTATCTTTT TGTACCCTGC TGACAAAAG AGTCCAAATG GAAAACCTCG
801 TGTATTGTAT GAAGTCTTCC CAATGTCCTT CTTGATGGAA CAGGCCGGAG
851 GACAGTCTTT CACCGGCAAG CAAAGGGCAC TTGATTTAAT ACCAACCAAG
901 ATTCATGAAC GTTCTCCCAT ATTTCTTGGT AGCTATGACG ATGTGGAAGA
951 AATCAAAGCA CTCTATGCTG CTGAACAGAA GAATGCTTAG

```

FBP-PScit 329

```

1  MTITREVLNE QSKRPESRGD FTILLSHIVL GCKFVCSAVN KAGLAKLIGL
51  AGETNIQGEE QKLDVLSND VFIKALISSG RTCILVSEED EEATFVEPSL
101 RGKYCVVDFP LDGSSNIDCG VSIGTIFGIY MVKDNHAPTL DDVLQPGKNM
151 LAAGYCMYGS SCTLVLSTGS GVNGFTLDPS LGEFILTHPD IKIPKKGKIY
201 SVNEGNAKNW DGPTTKYVEK CKFPTDGSSP KSLRYIGSMV ADVHRTLTYG
251 GIFLYPADKK SPNGKLRVLY EVFPMSFLME QAGGQSFTGK QRALDLIPTK
301 IHERSPIFLG SYDDVEEIKL LYAAEQKNA

```

Tabla III. 1. Secuencia codificante y estructura primaria de la FBPassa citosólica de *Pisum sativum*.

La secuencia de aminoácidos presenta 80 % de identidad con las demás FBPassas citosólicas, y por siguiente, carece del "lazo 170" con las tres cisteínas conservadas de la enzima cloroplastídica. En cambio, aparece una zona de baja homología en la mitad de la estructura primaria de la proteína, característica que se encuentra en todas las FBPassas citosólicas secuenciadas (Lámina III. 3).

	10	20	30	40	50	60							
1 BETA	M-----	TITRFLNEQSKRPES	RGDFTILM	SHIVLGCKFVCS	AVNKAGLAKLI		48						
2 BRAS	MDHEADAFR-DIM	TITRFLNEQSKYPE	SRGDFITILL	SNIVLGCKFVCS	AVNKAGLAKLI		59						
3 ORYZ	MDHEADAYRTDIM	TITRYVLNEQSRNPE	ARGDLTILLS	HIVLGCKFVAS	AVNKAGLAKLI		60						
4 PISU	M-----	TITRFLNEQSKRPES	RGDFTILM	SHIVLGCKFVCS	AVNKAGLAKLI		48						
5 SACH	M-----	TITRFLNEQSRNPE	SRGDFITILL	SHIVLGCKFVAS	AVNKAGLAQLI		48						
6 SOLA	MDHAADRRTDIM	TITRFLNEQTKNPE	SRGDFISILL	SHIVLGCKFVCT	AVNKAGLAKLI		60						
7 SPIN	MDHAGDAMRTDIM	TITRYVLNEQSKRPES	RGDFTILM	SHIVLGCKFVCS	AVNKAGLAKLI		60						
	70	80	90	100	110	120							
1 BETA	GLAGETNIQGE	EQKCLDVL	SNVVF	IKALISS	GRTCLV	SEDEE	ATFVPSLRGKYCVVF	108					
2 BRAS	GLAGDTNIQGE	EQKCLDVL	SNVVF	IKALVSS	GRTSVLV	SEDEE	ATFVSSKCGKYCVVF	119					
3 ORYZ	GLAGETNVQGE	EQKCLDVL	SNVVF	IKALVSS	GRTCVLV	SEDEE	ATFVDPALRGKYCVCF	120					
4 PISU	GLAGETNIQGE	EQKCLDVL	SNVVF	IKALISS	GRTCLV	SEDEE	ATFVPSLRGKYCVVF	108					
5 SACH	GLAGETNVQGE	EQKCLDVL	SNVVF	IKALVSS	GRTCVLV	SEDEE	ATTFVDPKLRGKYCVCF	108					
6 SOLA	GLAGETNVQGE	DQKCLDVL	SNVVF	IKALVSS	NRTCLV	SEDEE	ATFVRPANRGKYCVVF	120					
7 SPIN	GLAGETNIQGE	EQKCLDVL	SNVVF	IKALTSS	GRTCLV	SEDEE	ATFIEPSLRGKYCVVF	120					
	130	140	150	160	170	180							
1 BETA	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCTLVMST	168				
2 BRAS	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCMLVLS	179				
3 ORYZ	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCTLVLS	180				
4 PISU	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCTLVLS	168				
5 SACH	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCTLVLS	168				
6 SOLA	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCTLVLS	180				
7 SPIN	DPLDGC	SNIDCGV	SGTIFGI	YMKD	LNATL	DDVLQ	PGKNMVAAGY	CMYSSCTLVLS	180				
	190	200	210	220	230	240							
1 BETA	GSGVNG	FTHDPSL	GEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	GP	TTKY	VEKCK	FPKDGS	228
2 BRAS	GTGVH	GFTHDPS	LGEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	GP	TTKY	VERCK	YPKDGS	239
3 ORYZ	GNGVNG	FTHDPSL	GEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	EP	TAKF	VEKCK	FPKDGS	240
4 PISU	GSGVNG	FTHDPSL	GEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	GP	TTKY	VEKCK	FPTDGS	228
5 SACH	GTGVH	GFTHDPS	LGEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	VP	AKF	VEKCK	YPKDGS	228
6 SOLA	GSGVNG	FTHDPSL	GEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	SP	TSKY	VQ	CSCKYPADGS	240
7 SPIN	GSGVNG	FTHDPSL	GEFIL	THPD	IKIPK	KGKI	YSVNEG	NAKNWD	GP	TTKY	VEKCK	FPTDGS	240
	250	260	270	280	290	300							
1 BETA	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPGDK	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MSFL	MEQAGG	QAFT	288
2 BRAS	PAKSLRY	VGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPADK	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MAFL	MEQAGG	QAFT	299
3 ORYZ	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPADK	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MSFL	MEQAGG	QSFT	300
4 PISU	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPADK	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MSFL	MEQAGG	QSFT	288
5 SACH	PPKSLRY	IGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPADQ	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MSFL	MEQAGG	QSFT	288
6 SOLA	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPGDK	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MSFL	MEQAGG	QAFT	300
7 SPIN	SPKSLRY	IGSMVAD	VHRTL	LTYGG	IFL	YPGDK	KSPNG	KLRVLY	EVFP	MSFL	MEQAGG	QAFT	300
	310	320	330	340									
1 BETA	GEQRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVED	IKALYA	AEQKN--	328					
2 BRAS	GKKRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVEE	IKALYA	EEFK---	338					
3 ORYZ	GKERALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	FEDVEE	IKGLYA	AAQAK---	339					
4 PISU	GKQRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVEE	IKALYA	AEQKNA-	329					
5 SACH	GKERALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVEE	IKALYA	EAQKSSS	330					
6 SOLA	GKQRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVEE	IKKLYA	AEQ---	339					
7 SPIN	GKQRALD	LVPKNI	HDRSP	VFLGS	YDDVED	IKALYA	AQEK-T-	340					

Lámina III. 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las FBPasas citosólicas: *Beta vulgaris* (1), *Brassica napus* (2), *Oryza sativa* (3), *Pisum sativum* (4), *Saccharum hybrid* (5), *Solanum tuberosum* (6), y *Spinacia oleracea* (6). Porcentaje de identidad: = 100; > 75; > 50; < 50.

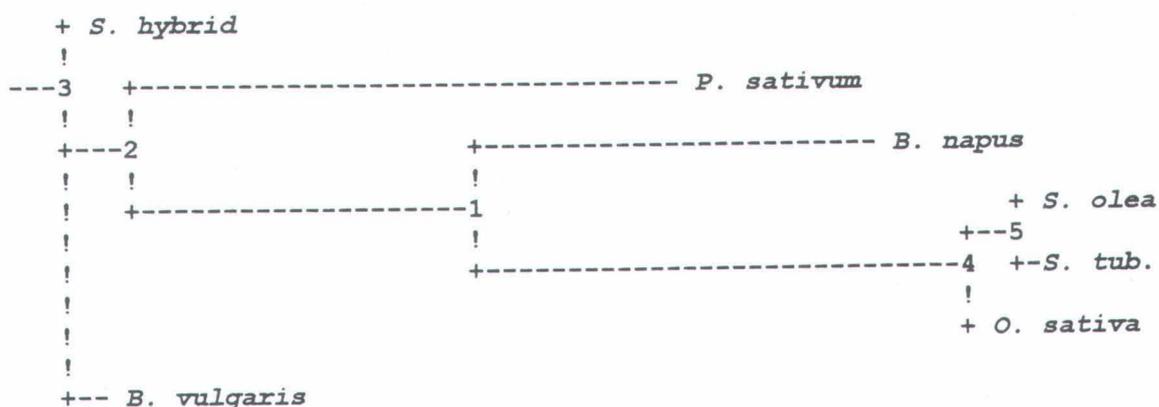
Extractos de ADN genómico de tejido foliar de *Pisum sativum* fueron analizados por PCR con las mismas combinaciones de cebadores anteriores, a fin de aislar la secuencia genómica. Fragmentos de 0.5 (FC4_FBP-C) y 0.4 kb (FBP-N_FC5) fueron encontrados. Su respectiva secuenciación reveló una identidad con zonas del lado 5' y 3' del gen.

Estos fragmentos se utilizaron para medir la expresión en diferentes tejidos de la planta por RT-PCR. El ARNm se encontró expresado en los tejidos verdes, como folíolos peciolados, sésiles, vaina, grano y tallo. La expresión en la raíz fue muy baja. La expresión en hojas sometidas a estrés lumínico fue más importante que en las hojas de control (Lámina III. 4). Dado el carácter fotoinducido de la expresión de numerosas proteínas foliares (Fluhr *et al.*, 1986), este tipo de estrés es una manera de aumentar el nivel de expresión de determinados ARNm, que de lo contrario serían indetectables por RT-PCR.

2. COMPARACIÓN CON OTRAS FBPasas CITOSÓLICAS

El dendograma de los genes de las FBPasas citosólicas, generado por el algoritmo fastDNAm1 (Tabla III. 2), según el método de máxima probabilidad de Felsenstein (1981), permite situar el de *Pisum sativum* en la posición indicada en la Lámina III. 5.

43 árboles examinados



Ln Probabilidad = -7697.22469

Entre	y	Distancia	Límite de confianza aprox.	
3	<i>S. hybrid</i>	0.06978	(0.02632,	0.11665) **
3	2	0.35278	(cero,	4.18215)
2	<i>P. sativum</i>	2.63448	(2.16846,	infinidad) **
2	1	1.66331	(1.03921,	infinidad) **
1	<i>B. napus</i>	1.94221	(1.32466,	infinidad) **
1	4	2.34435	(1.65496,	infinidad) **
4	5	0.19040	(0.15738,	0.22535) **
5	<i>S. oleracea</i>	0.10893	(0.08317,	0.13586) **
5	<i>S. tuberosum</i>	0.13763	(0.10931,	0.16736) **
4	<i>O. sativa</i>	0.00000	(cero,	0.03357)
3	<i>B. vulgaris</i>	0.27324	(0.22899,	0.32103) **

* = significativamente positivo, $P < 0.05$

** = significativamente positivo, $P < 0.01$

Tabla III. 2. Dendrograma generado por el algoritmo FastADNAml para evaluar la distancia genética entre las diferentes citosólicas, según el método de máxima probabilidad de Felsenstein (1981).

En esta gráfica se observa que las FBPasas citosólicas del primer grupo forman un bloque. Las restantes divergen de las de *Beta vulgaris* y *Saccharum*, esta última única planta C4 del grupo. La enzima de *Pisum sativum* está más cerca de la de estos últimos, mientras que la de *Brassica napus* ocupa una posición intermedia. Hay una correlación entre distancia genética y tamaño del gen.

Las FBPasas citosólicas presentan un pI teórico con un promedio en torno a 5.55, salvo las de *Beta vulgaris* y *Pisum sativum*, que exhiben un valor superior. En general, se nota que las proteínas del segundo grupo parecen exhibir un pI más elevado (Tabla III. 3).

Enzima	pI teórico	MW teórica
<i>Beta vulgaris</i>	6.02	35.94
<i>Brassica napus</i>	5.31	37.04
<i>Pisum sativum</i>	6.25	35.90
<i>Saccharum hybrid</i>	5.38	36.00
<i>Solanum tuberosum</i>	5.80	37.19
<i>Spinacia oleracea</i>	5.53	37.12
<i>Oryza sativa</i>	5.55	37.03

Tabla III. 3. Comparación de las diferentes FBPasas citosólicas respecto a su pI teórico y peso molecular.

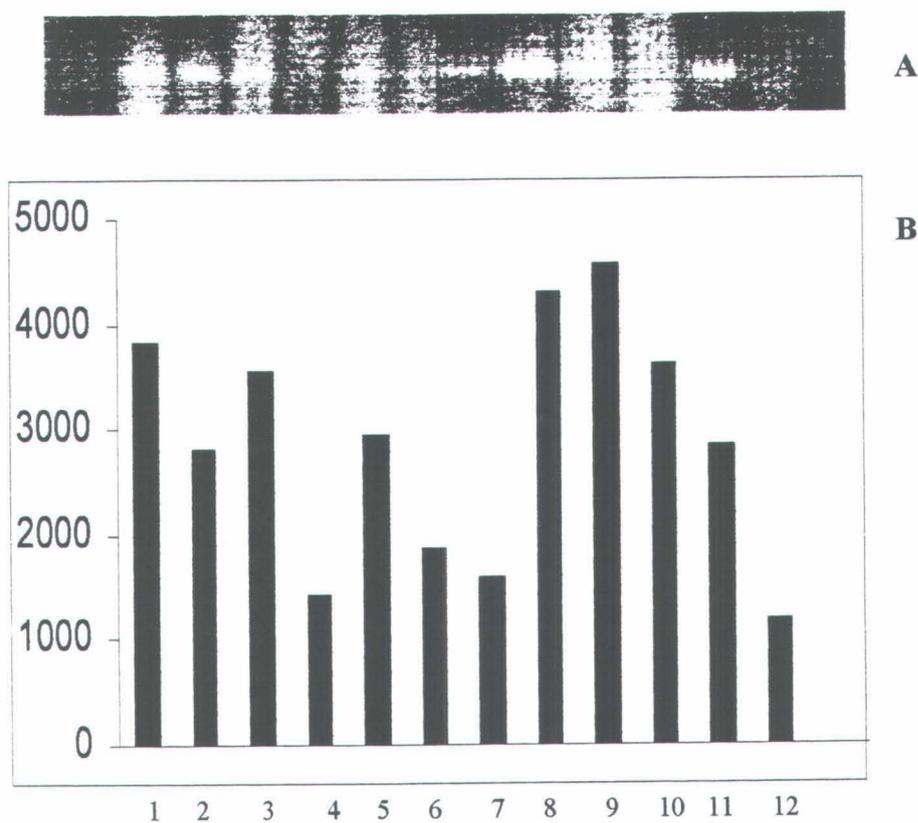


Lámina III. 4. A. Análisis por southern blotting de la expresión de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum* en diferentes tejidos: (1-3) hojas de plantas sometidas a estrés lumínico; (4-6) hojas control; (7) foliolo peciolado; (8) foliolo sésil; (9) vaina; (10) grano; (11) tallo; (12) raíz.

B. Cuantificación densitométrica de la hibridación.

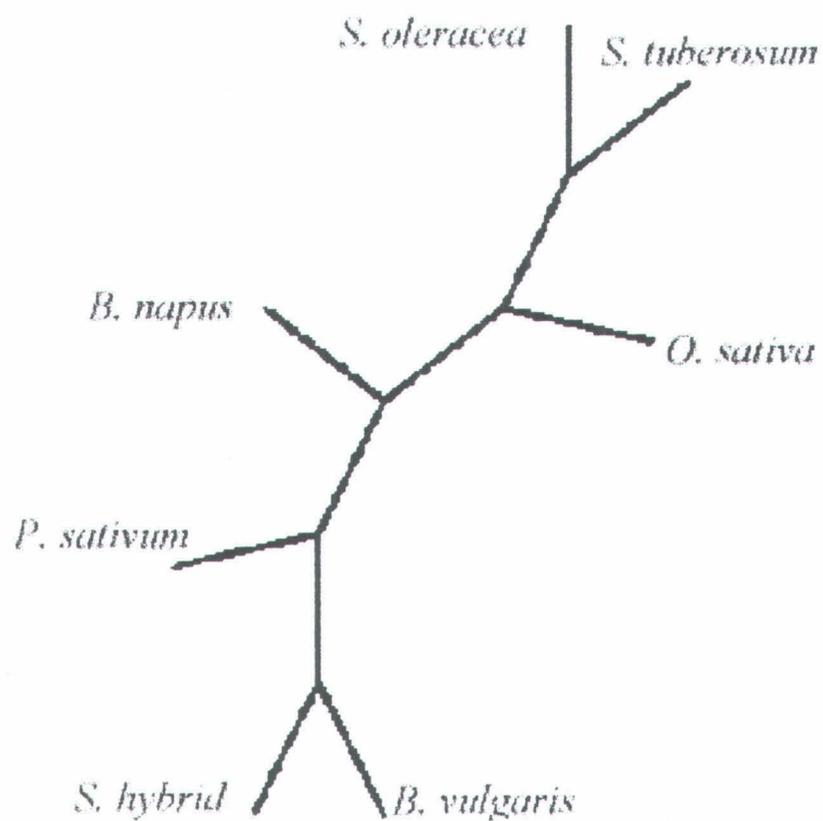


Lámina III. 5. Dendograma generado por el algoritmo FastDNAmI de las diferentes FBPasas citosólicas, según el método de máxima probabilidad de Felsenstein (1981).

3. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA FBPasa.

Al objeto de analizar el efecto de la luz sobre la expresión de la FBPasa citosólica, semillas etioladas fueron sometidas a 48 h de luz continua en cámara de cultivo, (Material y Método I. 1) y luego colocadas en la oscuridad hasta las 72 h. El muestreo se hizo a las 0, 2, 6, 10, 24, 48, 68 y 72 h del tratamiento. Las muestras fueron rápidamente pesadas, y congeladas a -80°C hasta su uso.

Las FBPasas citosólicas y cloroplastídicas de *Pisum sativum* fueron parcialmente purificadas según el método de Sharkey *et al.* (1988) para medir su actividad respectiva y analizarlas por inmunoblotting. La FBPasa cloroplastídica se utilizó como control positivo.

La síntesis *de novo* del ARNm de la FBPasa cloroplastídica se detectó y a partir de la segunda hora de luz, y alcanza su máximo a las 24 h de tratamiento (Lámina III. 6). Los mensajeros desaparecen en la fase de oscuridad. En el caso de la enzima citosólica se observa una síntesis *de novo* de ARNm entre las 24 y las 48 h de luz. De igual modo, desaparecen los mensajeros en la oscuridad. Se observa que la expresión del mensajero de la citosólica tiene lugar más lentamente que el de la FBPasa cloroplastídica, iniciándose cuando éste alcanza su máximo.

Respecto a la expresión proteica, la actividad enzimática de la FBPasa cloroplastídica (Lámina III. 7) aumenta de manera progresiva hasta las 48 h y luego se estabiliza. Esta cinética es conforme al resultado del inmunoblotting. La actividad de la citosólica crece entre las 24 y las 48 h de luz, y se mantiene constante en la fase de oscuridad. Estos datos son también conformes al resultado del inmunoblotting.

Los resultados expuestos confirman lo ya conocido, que la expresión de la FBPasa cloroplastídica es regulada por la luz. En el caso de la enzima citosólica no se detecta la presencia de ARNm, ni en la planta etiolada, ni en la fase de oscuridad. La inducción del mensajero, como la de la actividad enzimática, ocurre de manera secuencial con respecto a la enzima cloroplastídica. Esto sugiere que la expresión de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum* es también regulada por la luz. El retraso en la inducción de los mensajeros de ésta respecto a los de la enzima cloroplastídica puede entenderse si los efectores entre la luz y la síntesis del ARNm dependieran de otro sensor, que podría ser la concentración de P_i , de triosas fosfato, o de FBP en el citosol.

4. EFECTO DEL DTT Y DE LA TIORREDOXINA

La FBPasa citosólica de *Pisum sativum* no es activable por DTT ni por las tiorredoxinas *m* y *f* en las condiciones empleadas (Lámina III. 8). En consecuencia, se puede afirmar que la enzima no es modulable por actividad redox.

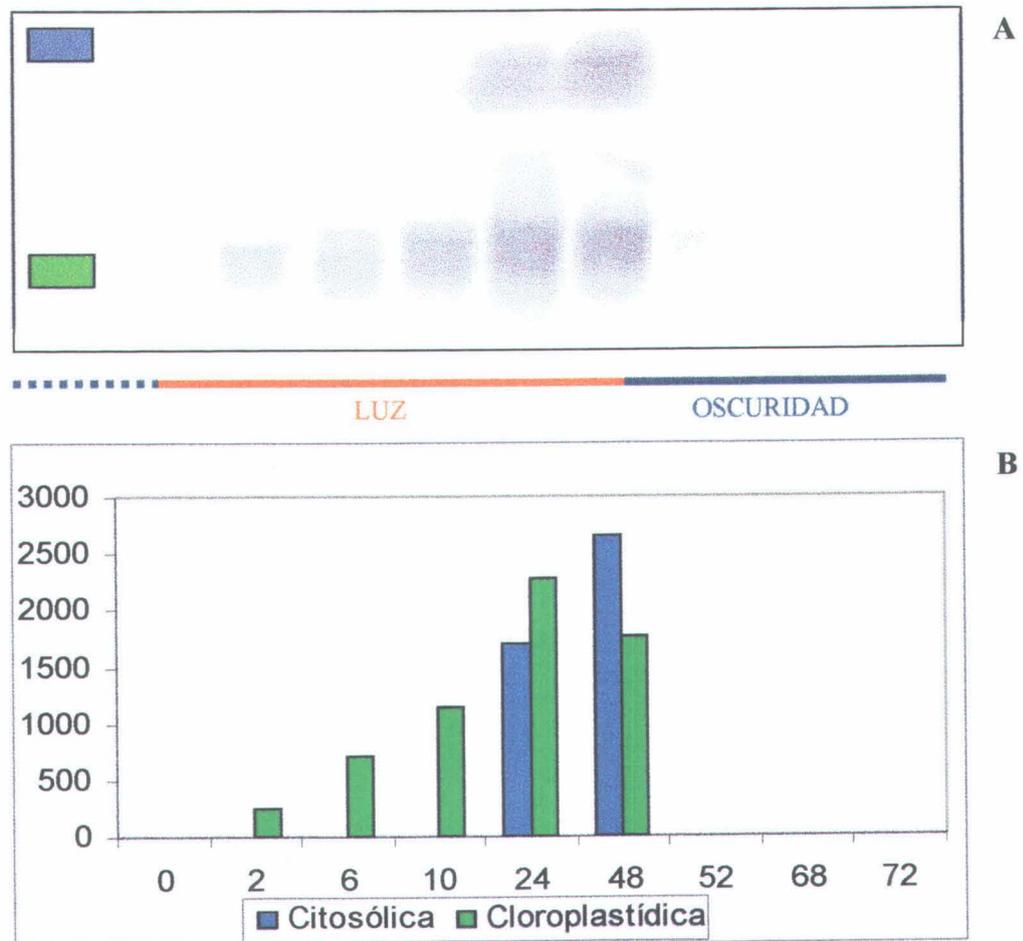


Lámina III 6. Efecto de la luz en la expresión (ARNm) de las FBPasas de *Pisum sativum*. Cotiledones etiolados fueron sometidos a 48 h de luz constante, y luego colocado en oscuridad hasta 72 h. El muestro se hizo a las 2, 6, 10, 24, 48, 52, 68 y 72 h de tratamiento. Los transcritos de cada enzima fueron amplificados por RT-PCR, y medidos por southern blotting (A).

Cuantificación densitométrica de la reacción (B).

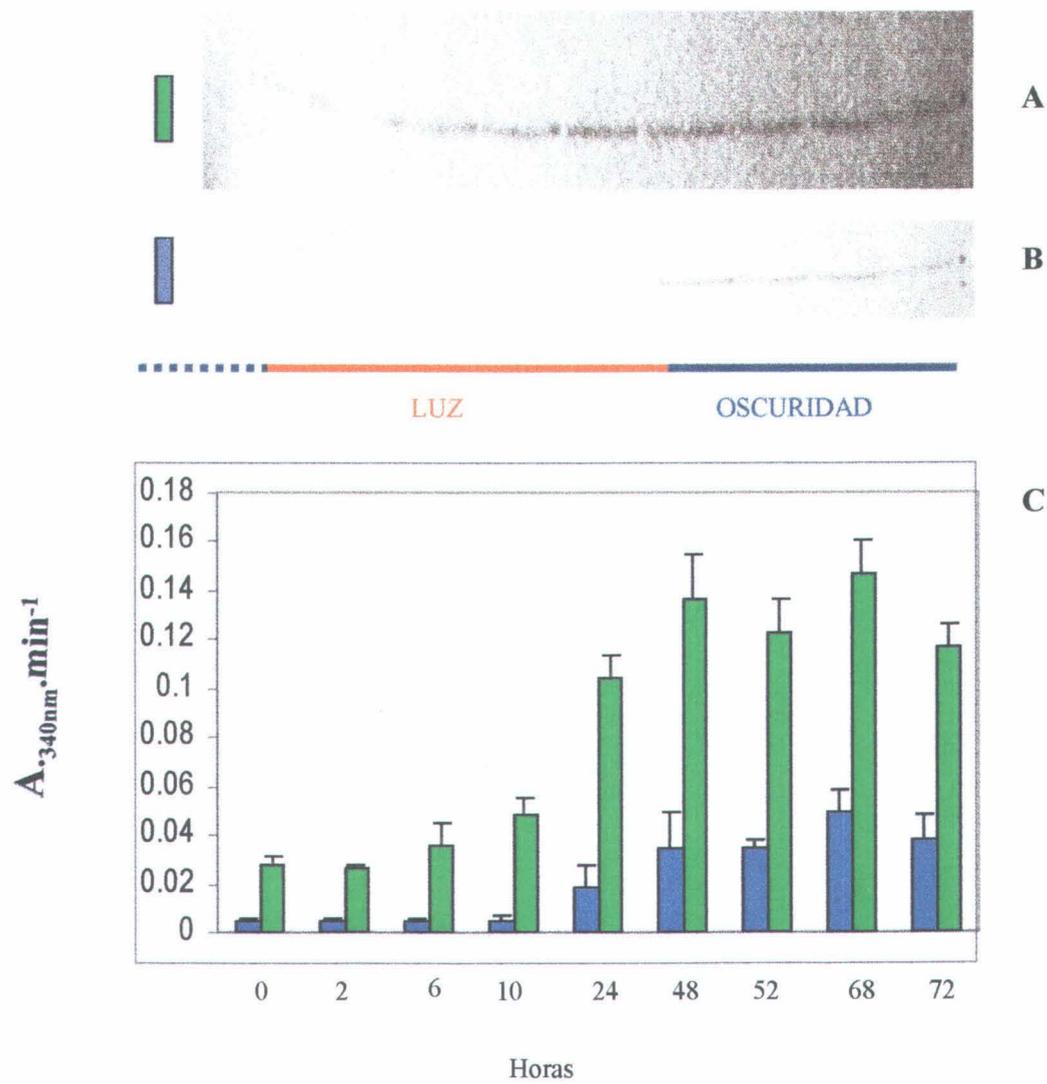


Lámina III. 7. Efecto de la luz sobre la expresión de la FBPasa de *Pisum sativum*. Análisis por inmunoblotting de 40 μ g de proteína total cloroplastídica (A) y citosólica (B), fraccionada por electroforesis en gel de poliacrilamida (12 %). C. Actividad de las enzimas respectivas. FBPasa cloroplastídica (■) y citosólica (■).

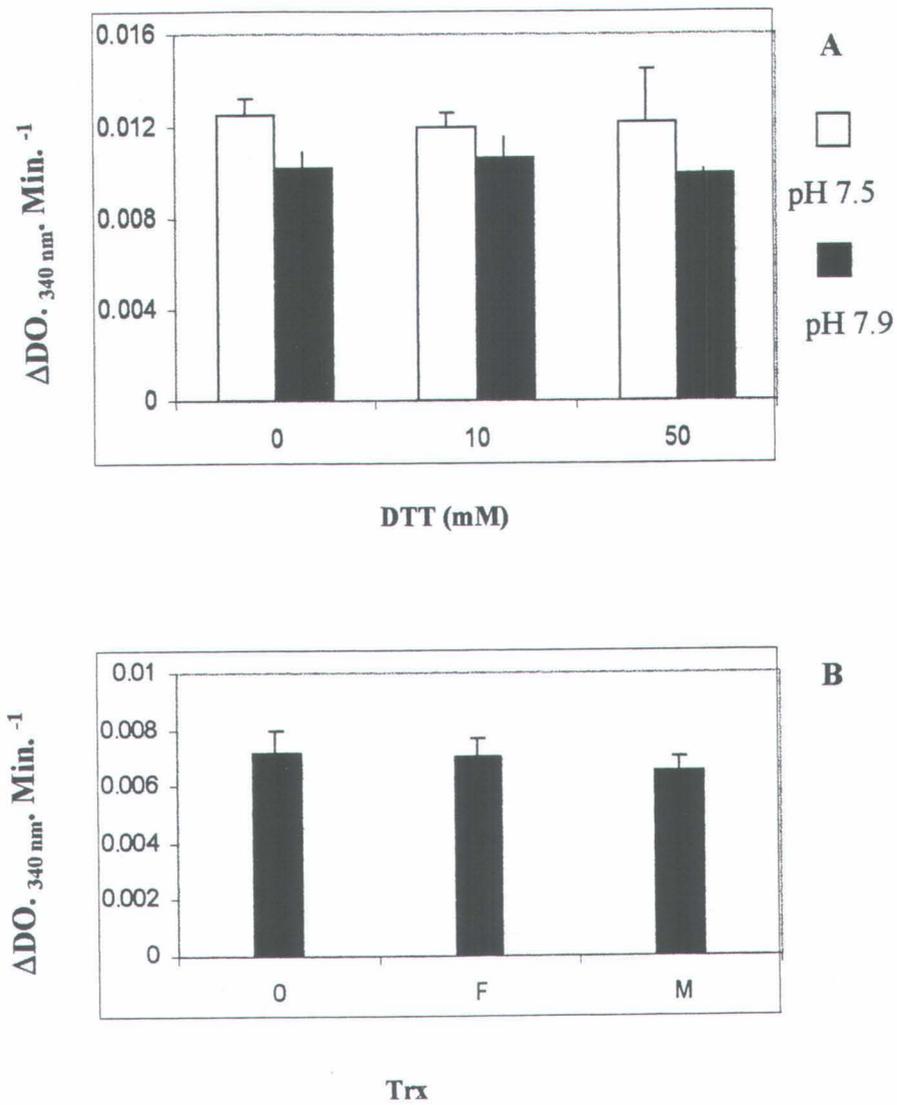


Lámina III. 8. A. Efecto del DTT sobre la actividad FBPasa citosólica nativa, purificada por el método de Sharkey *et al.* (1988), a pHs 7.5 y 7.9.

B. Efecto de 4.3 μg de Trx *f* (F), o 7.8 μg de Trx *m* (M), sobre la actividad FBPasa a pH 7.9.

5. SÍNTESIS IN VIVO. DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA

La determinación de la vida media de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum* se hizo utilizando el método de Sahrawy *et al.* (1990). A plántulas de *Pisum sativum* iluminadas durante 15 h se les administró un pulso de ^{35}S -metionina, recogiendo hojas a diferentes tiempos (1, 5, 8, 11, 15, 24 y 27 h después de la incorporación), homogeneizándolas después como se ha descrito. En las diferentes alícuotas se determinó proteínas totales solubles precipitadas con ácido tricloroacético, así como el contenido de FBPasa marcada medido por conteo de la fracción inmunoprecipitada con suero IgG anti-FBPasa citosólica de *Pisum sativum*, y digestión de la banda electroforética localizada por fluorografía.

El marcado de las proteínas solubles totales presenta un ritmo de síntesis rápida hasta 8 h, y luego más lento hasta un máximo a las 24 horas. En cuanto a la FBPasa citosólica, alcanza su máxima incorporación a las 8 h después del pulso de metionina marcada (Lámina III. 9A).

La incorporación del aminoácido marcado es más rápida en la FBPasa cloroplastídica que en la citosólica (Lámina III. 9B). En efecto, se detecta desde el primer muestro en la cloroplastídica, mientras que la incorporación en la citosólica aparece 5 horas después. La vida media de la enzima citosólica fue de 6 horas, lo que denota un turnover más rápido con respecto a las 14 horas de la cloroplastídica. Este dato está de acuerdo con la predicción de región PEST, que preveía una vida media superior a 2 horas.

	Posición	índice PEST	Secuencia
(1)	82 - 100	1.56	TCILVSEEDEEATFVEPSL
(2)	104 - 132	-19.1	YCVVFDPLDGSSNIDCGVSIGTIFGIYMV
(3)	137 - 147	-11.51	APTLDDVLQPG
(4)	149 - 187	-14.48	NMLAAGYCMYGSSCTLVLSTGSGVNGFTLDPSLGEFILT
(5)	246 - 258	-27.4	TLLYGGIFLYPAD
(6)	268 - 289	-17.9	VLYEVFPMSFLMEQAGGQSFTG
(7)	305 - 318	-7.43	SPIFLGSYDDVEEI

Tabla III. 4. Predicción de regiones ricas en PEST (prolina, ácido glutámico, serina, treonina y, en menor medida, ácido aspártico). Una región es calificada PEST cuando el parámetro obtenido alcance un valor igual o superior a 5, lo que es índice de una vida media corta.

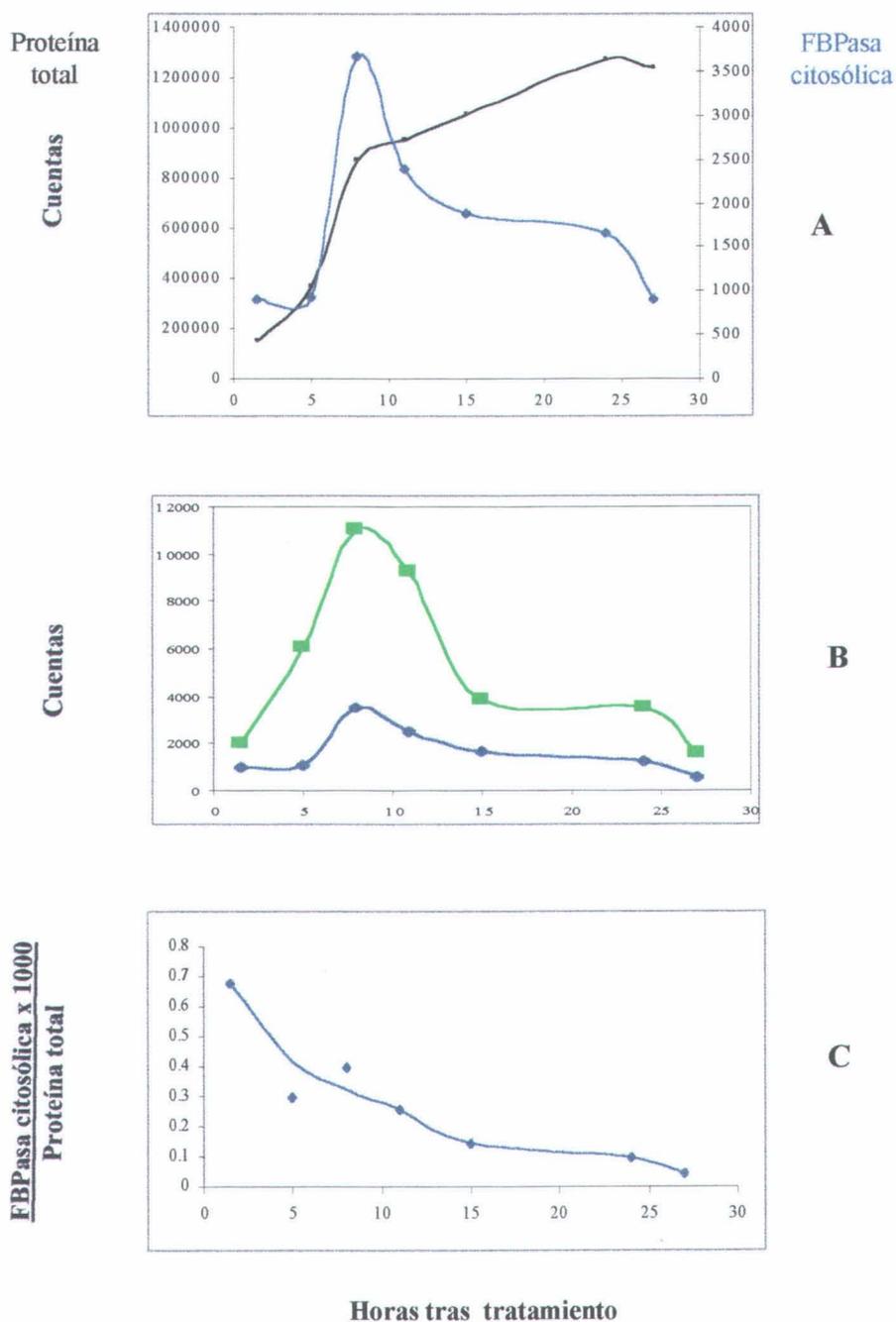


Lámina III. 9. Síntesis *in vivo*. **A.** Incorporación de 35 S-metionina en proteínas totales, comparada con la FBPasa citosólica. **B.** Cinética de incorporación de radioactividad en las dos FBPasas. **C.** Porcentaje de FBPasa citosólica marcada respecto a las proteínas totales.

III. II. DISCUSIÓN

I. AISLAMIENTO DEL GEN DE LA FBPaasa CITOSÓLICA DE *PISUM SATIVUM*

Se ha aislado un fragmento de ADNc de 1 kb por RT-PCR de un extracto foliar con los cebadores FBP-N_FBP-C. La secuencia de este fragmento indica que se trata del gen completo buscado. Este ha sido confirmado por aislamiento y secuenciación de los fragmentos 5' y 3' terminales del mismo. No se obtuvieron buenos resultados con los cebadores FCGN_FBP-C, lo que sugiere que la secuencia de lectura encontrada corresponde al gen completo, y que *Pisum sativum* pertenecería al mismo grupo que *Beta vulgaris* y *Saccharum* con un defecto de 12 aminoácidos en el extremo N-terminal. La secuencia de aminoácidos presenta entre el 84 y 90 % de identidad con las de otras FBPasas conocidas.

La enzima citosólica presenta un 51.9 % de identidad con la cloroplastídica. Ésta cifra se sitúa dentro de los valores encontrados para las parejas de FBPasas de otras especies, 48.2 % para las enzimas de *Brassica napus*, 49 para las de *Oryza sativa*, y 52 % para las de *Spinacia oleracea* (Marcus *et al.*, 1990).

El aislamiento de ADNc por RT-PCR indica que la amplificación de transcritos puede ser un método alternativo al banco genómico para aislar un gen, en cuanto se disponga de información suficiente para diseñar los cebadores. Solo tener la precaución de identificar las bases que hubieran sido sustituidas por las de los cebadores. Efectivamente, la amplificación de transcritos ha sido utilizada para aislar los genes de las FBPasas de cortex cerebral, de corazón, riñón, hígado y testículos de una cepa de ratones, todos ellos con la misma pareja de cebadores (Cloix *et al.*, 1997). Del mismo modo se aisló el gen de la FBPaasa de lengua humana (Skalecki *et al.*, 1999).

En los fragmentos aislados del extracto de ADN total, no se encontraron intrones. Estos fragmentos corresponden a la casi totalidad del gen, y no presentaron contaminación por ARNm. Hasta ahora no se ha publicado ninguna secuencia genómica de FBPaasa citosólica vegetal. Existen intrones en los genes de FBPasas de mamíferos (El-Maghrabi *et al.*, 1990 y 1995), pero no se encontraron en el gen de la enzima de levadura (Roger *et al.*, 1988). El analizar la totalidad de la secuencia genómica es cada vez más relevante para entender la regulación de la expresión del gen, y la estructura de la proteína correspondiente. En efecto, los exones en el gen de rata corresponden a dominios funcionales de la enzima, la mayoría residuos implicados en el acoplamiento con la fructosa-2,6-bisfosfato, estando el sitio activo codificado por el exón 6 (El-Maghrabi *et al.*, 1990). De otra parte, en la región 5' reguladora existen secuencias de acoplamiento del AMPc, así como de hormonas que como la insulina, controlan la

transcripción del gen de la enzima de mamíferos. Existe también en el primer intrón una secuencia de acoplamiento de la vitamina D3, que regula la expresión en tejidos que expresan los receptores de esta vitamina, como en el caso del tejido renal, cosa que no ocurre en hígado (Burmester *et al.*, 1988).

La vitamina A regula también la expresión de la FBPasa de mamíferos, así como de otras enzimas implicadas en la gluconeogénesis, como la fosfoenolpiruvato carboxikinasa y la 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Shin *et al.*, 1997). Esos datos relativos a la enzima de origen animal podrían ayudar a la identificación de efectores intermediarios en la regulación de la transcripción de la FBPasa vegetal por la luz.

La enzima citosólica de *Brassica*, *Spinacia*, *Solanum* y *Oryza* se caracteriza por tener 12 aminoácidos suplementarios en la extremidad N-terminal, con respecto a las demás FBPasas citosólicas. Se ha subrayado que estas enzimas poseen una segunda fase de lectura abierta a partir de la posición 37. Se trataría de elucidar el papel de estos residuos en la estructura de la enzima. La delección de esos 12 codones en las FBPasas del segundo grupo permitiría determinar las características de expresión correspondiente a esta segunda fase de lectura, con respecto a las enzimas de *Beta vulgaris*, *Saccharum* o *Pisum sativum*.

Una situación con alguna similitud se presenta en las FBPasas de mamíferos. En efecto, las FBPasas humano y de hígado de rata poseen los mismos residuos implicados en la interacción con AMP y la fructosa-2,6-bisfosfato, y exhiben K_m similares. No obstante, la actividad específica de la enzima de rata es casi el doble de la humana, el K_i para el AMP es el triple, y el K_i para la fructosa-2,6-bisfosfato es 13 veces mayor en el caso de la enzima de rata. Una posible explicación de esta discrepancia es la extensión de la extremidad C-terminal de la enzima de rata en 25 aminoácidos, que tendría un efecto positivo en la catálisis, y negativo en la afinidad de la enzima por la fructosa-2,6-bisfosfato, pero no para el sustrato (El-Maghrabi *et al.*, 1993). Según este argumento, las enzimas de cerdo, oveja y conejo deberían tener parámetros cinéticos similares a los de la humana. La determinación y comparación de los parámetros de estas enzimas permitirán aclarar las diferencias observadas en la estructura primaria.

2. EFECTO DE LOS REDUCTORES

La FBPasa citosólica de *Pisum sativum* no es activable por DTT en las condiciones utilizadas, a pH 7.5 o 8.8, a pesar de poseer cisteínas susceptibles de formar un enlace disulfuro putativo. Como era de esperar, las tioredoxinas *f* y *m* tampoco activan esta enzima. Más aún, la presencia de estas pequeñas proteínas en el medio de incubación induce una leve inhibición de la enzima, como se ha demostrado con la enzima humana (Capítulo II). Experiencias de acoplamiento sobre modelos enseñaron que la Trx *f* puede acoplarse de manera inespecífica con estas enzimas (Capítulo I). El efecto observado debería ser una consecuencia indirecta de esto.

Anderson *et al.* (1995, 1997a, 1997b) pusieron de evidencia actividad rédox en FBPasa nativa aislada de un extracto bruto de raíces, sometida a la acción de DDT o de

mercaptoetanol, tanto en *Brassica napus*, como en *Saccharum*, *Spinacia oleracea* y *Beta vulgaris*.

Existe una enzima citosólica, específica de plantas, la pirofosfato:fructosa-6-fosfato fosfotransferasa (PFPasa), descubierta en los años 1980 (Sabularse *et al.*, 1981; Canal *et al.*, 1983), que de manera reversible cataliza *in vivo* la formación de fructosa-6-P, al igual que la FBPasa, o sintetiza la FBP, como la fosfofructokinasa ATP-dependiente, (Kruger *et al.*, 1990; Stitt *et al.*, 1990). La actividad de la PFPasa depende del estadio de desarrollo del vegetal y del contexto ambiental (Spilatro *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1989; Hatzfeld *et al.*, 1990; Theodorou *et al.*, 1992). Al contrario de la FBPasa, la PFPasa es activable por la fructosa-2,6-bisfosfato (Stitt, 1990).

El incremento de la actividad FBPasa observado en los extractos de raíces tratados con reductores podría incluir actividad PFPasa, cuya regulación redox no ha sido investigada. Trabajos suplementarios son necesarios para asegurar que el metabolismo citosólico de los azúcares está redox modulado por efectores.

3. EFECTO DE LA LUZ EN LA EXPRESIÓN DE LA FBPasa CITOSÓLICA

La transición oscuridad/luz induce la transcripción de mensajeros de la FBPasa citosólica en semillas etioladas de *Pisum sativum*. Esos transcritos desaparecen con la transición luz/oscuridad. La inducción de éstos se correlaciona con la actividad enzimática y el análisis por inmunoblotting. Se observa una actividad enzimática basal desde las primeras horas de luz. Esta puede derivarse de la presencia de PFPasa residual, no excluida en la determinación de actividad FBPasa por el método de Sharkey *et al.*, (19982), ya que la FBP activa levemente esta enzima aún en ausencia de fructosa-2,6-bisfosfato (Stitt, 1990). Trabajos similares deberían hacerse en plantas desarrolladas para verificar el efecto del grado de desarrollo del vegetal.

La luz modula también la transcripción de la FBPasa citosólica de *Beta vulgaris* (Khayat *et al.*, 1993) así como la de *Oryza sativa* (Takahashi *et al.*, 1997). En cambio, el nivel de transcripción de la enzima de *Spinacia oleracea* permanece constante, y no aparece afectado por la transición oscuridad/luz (Hur *et al.*, 1997). Pero en este caso se detectan 2 transcritos. Uno se expresa de forma permanente, mientras que otro es inducido sólo en periodos prolongados de oscuridad, codificando una proteína diferente. Estos datos sugieren que la transición oscuridad/luz tiene un efecto sobre la expresión del gen de la FBPasa citosólica, aunque se manifiesta de manera diferente según el vegetal.

Khayat *et al.*, (1993) establecieron que la enzima de *Beta vulgaris* sufre una modulación post-traduccional en la medida en que un periodo prolongado de oscuridad o de estrés hídrico (Harn *et al.*, 1992b) induce un cambio en la actividad enzimática, mientras que la concentración de enzima permanece estable. No se encontraron modificaciones post-traduccionales en el caso de *Triticum aestivum* ni en *Glycine maxima* (Rufty *et al.*, 1983; Stitt *et al.*, 1982 y 1983), mientras que en *Spinacia* la modificación post-traduccional se sustituye por la síntesis de una nueva enzima.

Se ha identificado la naturaleza de la modificación post-traducciona en otras FBPasas. La enzima de hígado de rata es modulada por el fenómeno de fosforilación/desfosforilación. En efecto, una proteína kinasa dependiente de AMP fosforila la extensión C-terminal de la enzima, activándola (Hosey *et al.*, 1981; Meek *et al.*, 1984; Rittenhouse *et al.*, 1983). En cambio, la fosforilación inactiva reversiblemente la FBPasa de levadura (Lenz *et al.*, 1980; Mazon *et al.*, 1982). Trabajos similares son necesarios para descubrir la alternativa elegida por cada vegetal para regular la FBPasa citosólica en respuesta a la transición oscuridad/ luz.

4. VIDA MEDIA DE LA FBPasa CITOSÓLICA DE *PISUM SATIVUM*

Recientemente ha sido posible relacionar la tasa de recambio de una proteína con la identidad de su extremo amino-terminal, al menos en lo que hace referencia a proteínas que son degradadas vía ubiquitina. Bachmair *et al.* (1986) encontraron que ciertos residuos en posición amino-terminal confieren gran resistencia a la degradación por ubiquitina, mientras otros resultan especialmente sensibles. Los residuos resistentes son, además de la propia metionina, aquéllos cuya presencia en las posiciones inmediatamente próximas al extremo amino-terminal promueven la eliminación post-traducciona de la metionina iniciadora. Entre ellos se encuentran, en eucariotas, la alanina, la glicocola y la valina. En cambio los aminoácidos que dificultan dicha eliminación son particularmente sensibles; es el caso de la lisina, arginina e histidina. En estas condiciones, la mayor parte de las proteínas se encontrarían en el primer caso, y serían resistentes a la degradación, hasta que resulten dañadas o rotas en alguna posición interna. Rogers *et al.* (1986) encontraron que secuencias de aminoácidos en proteínas eucariotas con una vida media intracelular inferior a las dos horas parecen contener una o más regiones ricas en prolina (P), ácido glutamático (E), serina (S), treonina (T), y, en menor medida, ácido aspártico. Estas regiones, llamadas regiones PEST, aparecen generalmente flanqueadas por residuos cargados positivamente.

La vida media se estimó de acuerdo con el algoritmo de Bachmair *et al.* (1986). Esta estimación de la vida media fue corroborada utilizando el programa PEST, que muestra las "regiones PEST" presentes en la secuencia. El algoritmo empleado para la identificación de regiones PEST en una determinada secuencia se basa en la proporción de aminoácidos PEST de la misma. Este valor se combina con un índice de hidrofobicidad computado para la presunta región PEST. La región estudiada se considera "región PEST" verdadera cuando el parámetro obtenido alcanza un valor igual o superior a 5.

En el caso de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum*, ninguna de las siete regiones seleccionadas como posibles regiones PEST alcanzó tal valor, por lo que se considera, que la proteína está exenta de dichas regiones. Si consideramos la secuencia amino-terminal, aparece sólo la metionina como resistente a la degradación, mientras que le siguen otros aminoácidos sensibles a ella, como la treonina y arginina; ésto, unido a la falta de regiones PEST, hacen que la FBPasa citosólica de *Pisum sativum* sea una proteína con una tasa de recambio medio rápido.

Para corroborar estas predicciones, se determinó experimentalmente la vida media de la FBPasa citosólica. El máximo marcaje en las proteínas solubles precipitadas con ácido tricloroacético se observó a las 24 horas, presentando a lo largo de toda la experiencia una curva con un ritmo de síntesis rápida hasta las 8 horas, y más lento hasta las 24. En cuanto a la FBPasa, la máxima incorporación radiactiva se obtuvo a las 8 horas después del pulso de ^{35}S -metionina, decreciendo luego hasta las 27 horas que duró la experiencia. A la hora y media del marcaje, la síntesis de FBPasa sintetizada, con respecto al total de proteínas marcadas, fue de un 0.064 %, descendiendo al 0.046% a las ocho horas, a pesar de ser el tiempo de máxima incorporación.

De esos resultados se dedujo que la FBPasa citosólica tiene una vida media de 6 horas, un turnover relativamente rápido, mayor que el de la FBPasa cloroplastídica con una vida media de 14 horas, (Sahrawy *et al.* 1990), y del mismo orden que las 7.5 horas determinadas para la tiorredoxina *f* de espinaca (Carrasco *et al.*, 1994). La máxima incorporación de radioactividad en las proteínas precipitadas por ácido tricloroacético se observó a las 24 horas, lo que indica una vida media de la mayoría de todas ellas más larga que la de las FBPasas. La rapidez de síntesis y turnover de la FBPasa citosólica puede explicarse por el gran aporte de triosas-fosfato sintetizadas en el cloroplasto de la planta iluminada. Estas son exportadas y utilizadas para formar sacarosa en el citosol, proceso en el cual la FBPasa citosólica ejerce su acción.

Los resultados obtenidos son coherentes con los datos del capítulo precedente. La diferencia que aparece en el recambio entre las dos FBPasas puede explicarse por un modelo de regulación (Stitt *et al.*, 1985, 1990). Las triosas-fosfato, en primer lugar, se acumulan en el citosol, y sólo cuando éstas alcanzan un nivel límite se activa la FBPasa citosólica. La respuesta a la concentración de triosas-fosfato se correlaciona con una disminución de la concentración de F-2,6-P, y un aumento de la de FBP. El límite de las triosas-fosfato asegura que los intermediarios del ciclo de Calvin no sean utilizados únicamente para la síntesis de sacarosa, evitando así una depresión de los metabolitos del estroma. Existe, pues, un sistema de control que vincula el nivel de fotosíntesis con la síntesis de sacarosa.

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha aislado el gen de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum* por amplificación de transcritos utilizando la técnica de RT-PCR. El gen y la secuencia de proteína correspondiente son conformes a las características de las demás FBPasas citosólicas disponibles en las bases de datos.

Esto permitió evaluar el efecto de la luz sobre la transcripción de dicha enzima. Los resultados obtenidos permiten concluir que la luz regula la expresión del gen de la FBPasa citosólica de *Pisum sativum*, como ya fue establecido para la enzima cloroplastídica. No obstante, se observa un tiempo de latencia entre la aparición de los dos transcritos y, a la vez, una presencia más breve del de la citosólica. Esta tendencia ha sido confirmada por la determinación de la vida media de cada enzima por incorporación de ^{35}S -metionina.



CONCLUSIONES GENERALES

1. Un análisis preliminar computerizado de las características estructurales de las FBPasas quiméricas bajo estudio predijo su viabilidad química y biológica. Determinó también la posibilidad de identificarlas por reacción cruzada con anticuerpos policlonales frente a la FBPasa de hígado humano, o de la enzima cloroplastídica de guisante (*Pisum sativum* L.).
2. Se construyeron dos tipos de FBPasas quiméricas. En los tipos X1 se enlazó la mitad N-terminal del gen codificante para la FBPasa humana y citosólica de remolacha azucarera, con la mitad C-terminal del gen que codifica la FBPasa cloroplastídica de guisante, y que porta el denominado "lazo 170", implicado en la regulación rédox de esta enzima. En los tipos X2 se insertó en el lugar correspondiente de las FBPasas humana y citosólica de remolacha azucarera, dicho "lazo 170" de la FBPasa cloroplastídica de guisante.
3. Las proteínas quiméricas expresadas en *E. coli* exhibían actividad FBPasa, y fueron identificadas con anticuerpos frente a la enzima cloroplastídica de guisante. Estas quimeras resultaron ser mas inestables que las homólogas silvestres recombinantes, y necesitaron la presencia del sustrato, FBP, como estabilizador para el mantenimiento de la actividad.
4. Se ha puesto de manifiesto un incremento de la actividad de las FBPasas quiméricas en presencia de DTT o de tiorredoxina, aunque la activación no alcanzó los niveles de la enzima cloroplastídica. Esos datos confirman el papel del "lazo 170" como fragmento regulador, y a las cisteínas de éste como la sede del intercambio electrónico con la tiorredoxina. Por otro lado, la entidad HL2, que presentó los mejores parámetros cinéticos, conserva muchas características de la enzima citosólica.
5. Se ha aislado un fragmento de cDNA de extractos foliares de *Pisum sativum*, cuyo análisis reveló se trata de una secuencia de lectura abierta correspondiente al gen de la FBPasa citosólica de guisante. La proteína expresada presenta un 80% de identidad con otras FBPasas citosólicas conocidas, y un 50 % de homología con la proteína cloroplastídica de guisante.
6. Experiencias de síntesis *in vivo* pusieron de manifiesto que, al igual que ocurre con la cloroplastídica, la luz modula la expresión del gen de la FBPasa citosólica de guisante, aunque existe un tiempo de latencia superior entre el inicio de la luz y la aparición de los transcritos. Ello hace suponer que la transmisión del efecto luz para activar la transcripción del gen depende de la concentración de algún metabolito por identificar que debe alcanzar un cierto nivel.

BIBLIOGRAFÍA

- Abola E. E., Bernstein F. C., Bryant S. H., Koetzle T. F. y Weng J.** (1987). Protein data bank. In *Crystallographic Databases – Information, Content, software Systems, Scientific Applications*. Edit. Allen F. H., Bergerkoff G., Sievers R. Data Commision of the International Union of Crystallography., 107-132.
- Allen J. F.** (1993). Redox control of gene expression and the function of chloroplast genomes- an hypothesis. *Photosynt. Research*, **36**: 95-102.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. y Lipman D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
- Alwine J. C., Kemp D. J. y Stark G R.** (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloximetil-paper and hybridization with DNA probes. *Proc.Natl. Acad. Sci: USA*, **74**: 5350-5354.
- Anderson L. E., Li D., Prakash N. y Stevens F. J.** (1995). Identification of potential redox-sensitive cysteines in cytosolic forms of fructose-1,6-bisphosphatase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Planta*, **196**: 118-124.
- Anderson L. E., Li D., Muslin E. H., Stevens F. J. y Schiffer M.** (1997). Predicting redox-sensitive cysteines in plant enzymes by homology modeling. *C. R. Acad. Sci: Paris, Sciences de la vie / Life Sciences*, **320**: 767-781.
- Anderson L. E., Li D., Nehrlich S. C., Hill M. H.y Stevens F. J.** (1997). The cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase of *Brassia napus* contains a new potential regulatory disulfide and is redox-sensitive. *Plant Sciences*, **128**: 23-30.
- Anfinsen C. B.** (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**: 223-230.
- Armin A. y Deng X-W.** (1996). Light control of seedling development. *An. Rev. Plant Physiol.Plant Mol. Biol.*, **47**: 215-243.
- Ashton A. R. y Siegel G. M.** (1997). Estimulación de spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by mercuric ions. *FEBS Letters*, **408**: 30-32.
- Ashton A. R.** (1998a). Sedoheptulose-1,7-bisphosphate phosphatase activity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Identification of enzymes hydrolyzing fructose-1,6-bisphosphate and sedoheptulose-1,7-bisphosphate in stromal extracts from chloroplasts of spinach (*Spinacia oleracea*). *Austr. J. Plant Physiol.*, **25**: 531-537.
- Ashton A. R.** (1998b). A simple procedure for purifying the major chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from spinach (*Spinacia oleracea*) and characterization of its stimulation by sub-femtomolar mercuric ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **357** (2): 207-224.

- Aszodi A., Munro R. E. y Taylor.** (1997). Protein modeling by multiple sequence threading and distance geometry. *Proteins*, **S 1**: 38-42.
- Bairoch A.** (1990). PROSITE: a dictionary of protein sites and patterns. Universidad de Ginebra.
- Bairoch A. y Boeckmann B.** (1991). The SWISS-PROT protein sequence data bank. *Nucleic Acids Res.*, **19**: 2247-2249.
- Bajorah J., Stenkamp R y Aroffo A.** (1994). Knowledge-based model building of proteins: concepts and examples. *Prot. Sci.*, **2**: 1798-1810.
- Balmer Y. Y Schürmann P.** (1998). Construction of mutants for the study of reduction of spinach fructose-1,6-bisphosphatase by thioredoxin f. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. **III**: 1935-1938.
- 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.
- Ballicora M. A., D'Alessio A. C., Mora-Garcia S., Rodriguez-Suárez R. J. y Wolosiuk R. A.** (1998). The reductive modulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by tributylphosphine and sodium borohydride. **44** (3): 431-437.
- Bax A.** (1989). Two-dimensional NMR and protein structure. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 223-236.
- Blankenship R. E. y Hartman H.** (1998). The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *TIBS.*, **23**: 94-97.
- Bliznyuk A. A. y Gready J. E.** (1999). Simple method for locating possible ligand binding sites on protein surfaces. *J. Comp. Chem.*, **20** (9): 983-988.
- Blom N. S y Sygusch J.** (1997). High resolution fast quantitative docking using Fourier domain correlation techniques. *Proteins*, **27**: 499-506.
- Braddford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Benner SA., Gerloff D. L. y Jenny T. F.** (1994). Predicting protein crystal structures. *Science*, **265**: 1642-1644.
- Benner SA.** (1996). Protein structure prediction. *Science*, **274** (5292): 1448-1449.
- Borchert S., Harborth J., Schünemann D., Hoferichter P. y Heldt H. W.** (1993). Studies of the enzymatic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiol.*, **101**: 303-312.

- Brauer M., Sanders D. Y Stitt M.** (1990). Regulation of photosynthetic sucrose synthesis: a role for calcium ? *Planta*, **182**: 236-243.
- Britt H., Levitt P. y Levitt M.** (1995). The complexity and accuracy of discrete state models of protein structure. *J. Mol. Biol.*, **249**: 493-507.
- Bryson J. W., Betz S. F., Lu H. S., Suich D. J., Zhou H. X., O'Neil K. T., DeGrado W. F.** (1995). Protein design: an hierarchic approach. *Science*, **10**: 935-941.
- 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.** (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. rev. plant Physiol.* **31**: 341-374.
- Buchanan B.B., Adamidi C., Lozano R. M., Yee B. C., Momma M., Kobrehel K., Ermel R. y frick O. L.** (1997). Thioredoxin-linked mitigation of allosteric responses to wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**: 5372-5377.
- Büker M., Schünemann D. y Borchert S.** (1998). Enzymic properties and capacities of developing tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit plastids. *Jour. Exper. Bot.*, **49** (321): 681-691.
- Burks H. S. y Burks C.** (1988). The Genebank sequence data bank. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 1861-1864.
- Cadet F.** (1996). Theoretical support for the existence of a sedoheptulose-1,7-bisphosphatase involved in chloroplast photosynthesis pathway. *Biochem. Educ.*, **24**: 36-40.
- Capitani G., Markovic-Housley Z. y Jansonius J. N.** (1998). Crystal structures of thioredoxins *f* and *m* from spinach chloroplasts. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. III: 1939-1942.
- Cardozo T., Totrov M. y Abagyan R.** (1995). Homology modelling by the internal coordinate mechanics (ICM) method. *Proteins*, **23**: 403-414.
- 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 pea cDNA clone coding for a photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase with some features different from those of the leaf chloroplast enzyme. *Planta*, **193**: 494-501.
- Charles F., Delwiche F. Y Palmer J. D.** (1997). The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. *Pl. Syst. Evol.*, **S 11**: 53-86.

- Chen L., Hedge R., Chen M. y Fromm H. J.** (1993). Site-specific mutagenesis of the metal binding sites of porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **307** (2): 350-354.
- Chen y., Wu J. W., Xu G. J., Tsou C. L. y Wang Z. X.** (1997). Inactivation kinetics of the reduced spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by subtilisin. *Eur. J. Biochem.*, **248** (3): 925-929.
- Chiang M. C. y Chiang H. L.** (1998). Vid24p, a novel protein localized to the fructose-1,6-bisphosphatase-containing vesicles, regulates targeting of fructose-1,6-bisphosphatase from the vesicles to the vacuole for degradation. *J. cell Biol.*, **140** (6): 1347-1356.
- Choe J., Poland B. W., Fromm H. J. y Honzatko R. B.** (1998). Role of dynamic loop in cation activation and allosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry*, **37** (33): 11441-11450.
- Chothia C. y Janin J.** (1975). Principles of protein-protein recognition. *Nature*, **256**: 705-708.
- Chothia C.** (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 537-572.
- Chothia C. y Lesk A. M.** (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.*, **5**: 823-826.
- Chothia C.** (1990). The classification and origins of protein folding patterns. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**: 1007-1039.
- Creighton T. E.** (1993). Proteins, structures and molecular properties (second edition). *W. H. Freeman and Company*. 507p.
- Cloix J. F., Beaulieu E. y Hevor T.** (1997). Various fructose-1,6-bisphosphatase mRNA in mouse brain, liver, kidney and heart. *Neuroreport*, **8** (3): 617-622.
- Daie J.** (1993). Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: a key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynthesis Research*, **38**: 5-14.
- DeGrado W. F., Wasserman Z. R. y Lear J. D.** (1989). Protein design, a minimalist approach. *Science*, **243**: 622-628.
- Dennis D. T. y Miernyk J. A.** (1982). Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 27-50.
- 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.

- Doolittle R. F. (1995). The multiplicity of domains in proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **64**: 287-314.
- Dorothee F., Drescher F., Follmann H. y Häberlein I. (1998). Sulfitolysis and thioredoxin-dependent reduction reveal the presence of a structural disulfide bridge in spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Letters*, **424**: 109-112.
- Ducruix A. y Giegé R. (1992). Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. *The Practical Approach Series, Oxford University Press*. 331p.
- Dunbrack R. L., Gerlof D., Bower M. y Chen X. (1997). Meeting review: the second meeting on the critical assessment of techniques for protein structure prediction (CASP2), Asilomar, California, December 13-16, 1996. *Fold. Des.*, **1**: R27-R42.
- Dunford R. P., Catley M. A., Raines Ch. A., Lloyd J. C. y Dyer T. A. (1998). Purification of active chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase expressed in *Escherichia coli*. *Prot. Express Purif.*, **14**: 139-145.
- Duwening E., Steup M., Willmitzer L. y Kossmann J. (1997). Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant J.*, **12** (2): 323-333.
- Dzugaj A. Y Kochman M. (1980). Purification of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **614**: 407-412.
- Eilers F., Modaresi S. y Jungermann K. (1995). Predominant periportal expression of the fructose-1,6-bisphosphatase gene in rat liver: dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle. *Histochem. Cell Biol.*, **103** (4): 293-300.
- Eisenhaber F., Persson B. y Argos P. (1995). Protein structure prediction: recognition of primary, secondary, and tertiary structural features from amino acid sequence. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30** (1): 1-94.
- El-Maghrabi M. R., Pilkis S., Marker A. J., Colosia A. D., d'Angelo G., Frase B. A., y Pilkis 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.
- El-Maghrabi M. R., Lange A. J., Kümmel L. y Pilkis S. J. (1991a). The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene, structure and regulation of expression. *J. Biol. Chem.*, **266** (4): 2115-2120.
- El-Maghrabi M. R. y Pilkis S. J. (1991b). Expression of rat fructose-1,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **176** (1): 137-144.

- El-Maghrabi M. R., Austin L. R., Correia J. J. y Pilkis S. J. (1992). Lysine 274 is essential for fructose-2,6-bisphosphate inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **267** (10): 6526-6530.
- El-Maghrabi M. R., Gidh-Jain M., Austin L. R., y Pilkis S. J. (1993). Isolation of a human fructose-1,6-bisphosphatase cDNA and expression of the protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **268** (13): 9466-9472.
- El-Maghrabi M. R., Lange A. J., Jiang W., Yamagata K., Stoffel M., Takeda J., Fernald A. A., Le Beau M. M., Bell G. I., Baker L. y Pilkis S. J. (1995). Human fructose-1,6-bisphosphatase gene (*FBPI*): exon-intron organization, localization to chromosome bands 9q22.2-q22.3, and mutation screening in subjects with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Genomics*, **27**: 520-525.
- Engh R. A. y Huber R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, **A47**: 392-400.
- Felsenstein J. (1981). Evolution trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, **17**: 368-376.
- Fisher W. K. y Thompson E. O. P. (1983). Aminoacid sequence studies on sheep liver fructose-1,6-bisphosphatase II. The complete sequence. *Aust. J. Biol. Sci.*, **36**: 235-250.
- Fonollá J., Hermoso R., Carrasco J. L., Chueca A., Lázaro J. J., Prado F. E. y Gorgé J. L. (1994). Antigenic relationships between chloroplast and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatases. *Plant Physiol.*, **104**: 381-386.
- Fuchs R. y Bakesley R. (1983). Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Meth. Enzymol.*, **100**: 3-38.
- Fujita Y., Yoshida K., Miwa Y., Yanai N., Nagakawa E., Kasahara Y. (1998). Identification and expression of the *Bacillus subtilis* fructose-1,6-bisphosphatase gene (*fbp*). *J. bacteriol.*, **180** (16): 4309-4313.
- Freedmann R. B., Hirst T. R., Tuite M. F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *TIBS*, **19**: 331-336.
- Furbank R. T., Chitty J. A., Jenkins C. L. D., Taylor W. C., Yrevanion S. J., von Caemmerer S. y Ashton A. R. (1997). Genetic manipulation of key photosynthetic enzymes in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. *Aust. J. plant Physiol.*, **24**: 477-485.
- Geberling K-P., Steup M. y Latzko E. (1985). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Synechococcus leopoliensis*. *Eur. J. Biochem.*, **147**: 207-215.
- Geigenberger P., Hajirezaei M., Gieger M., Deiting U., Sonnewald U. y Stitt M. (1998). Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch

synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers. *Planta*, **205**: 428-437.

Geiger D. R. y Servaites J. C. (1994). Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**: 235-256.

George D. G., Barker W. C. y Hunt L. T. (1986). The protein identification resource. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 11-15.

Gerbling K. P., Steup M. y Latzko E. (1986). Fructose-1,6-bisphosphatase from B form *Synechococcus leopoliensis* hydrolysis both fructose and sedoheptulose bisphosphate. *Plant Physiol.*, **80**: 716-720.

Gidh-Jain M., Zhang Y., van Poelje P. D., Liang J.Y., Huang S., Kim J., Elliott J. T., Erion M. D., Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R. y Lipscomb W. N. (1994). The allosteric site of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **44**: 27732-27738.

Giudici-Orticoni M. T., Buc J., Bidaud M. y Ricard J. (1990). Thermodynamics of information transfer between subunits in oligomeric enzymes and kinetic cooperativity. 3. Information transfer between the subunits of chloroplast fructose bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **194** (2): 483-490.

Goldschmidt-Clermont M. (1998). Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Intern. Rev. Cytol.*, **177**: 115-179.

Granner D., Andreone T., Sasaki K. y Beale E. (1983). Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene by insulin. *Nature*, **305** (6): 549-551.

Green P.J. (1993). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol.*, **102**: 1065-1070.

Grotjohann N., Schneider G. y Kowallik W. (1992). Different forms of fructose-1,6-bisphosphatase. *Z. Naturforsch.*, **48c**: 22-27.

Guex N. y Peitsch M. C. (1998). SWISS-PDBViewer V 3.1. *Glaxo Wellcome Experimental Research*.

Guex N. y Peitsch M. C. (1998). Principles of protein structure, comparative modelling and visualisation. *Glaxo Wellcome Experimental Research*.

Hagelin K., Rodriguez-Suárez R., Katzen F., Wolosiuk R. A., Baldi P. C. Giambartolomei G. H., Fossati C. A. y Dyer T. (1996). Interpecies cross-reactivity of a monoclonal antibody directed against wheat chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Cell Mol. Biol.*, **42** (5): 673-682.

Hajirezaei M., Sonnewald U., Viola R., Carlisle S., Dennis D. y Stitt M. (1994). Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-

phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta*, **192**: 16-20.

Hamilton W. D. O., Harrison D. A. y Gyer T. A. (1988). Sequence of the *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Nucleic Acid Res.*, **16**: 8707.

Hanning G y Makrides S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *TIBTECH.*, **16**: 54-60.

Harn C., Khayat E. y Daie J. (1993). Expression dynamics of genes encoding key carbon metabolism enzymes during sink to source transition of developing leaves. *Plant Cell Physiol.*, **34** (7): 1045-1053.

Hartman H., Syvanen M. y Buchanan B.B. (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins *f* and *m*. *Mol. Biol. Evol.*, **7**(3): 247-254.

Harris G. C. y Königer M. (1997). The "high" concentrations of enzymes within the chloroplast. *Photosynt. Research*, **54**: 5-23.

Harrison E. P., Willingham N. M., Lloyd J. C. y Raines C. A. (1998). Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation. *Planta*, **204**: 27-36.

Harrsch P. B., Kim Y., Fox J. L. y Marcus F. (1985). Amino acid sequence similarity between spinach chloroplast and mammalian gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133** (2): 520-526.

Hilbert M., Böhm G. y Jaenicke R. (1993). Structural relationships of homologous proteins as a fundamental principle in homology modeling. *Proteins*, **17** (2): 138-151.

Hellinga H. W. (1997). Rational protein design: combining theory and experiment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**: 10015-10017.

Hermoso R., Fonollá J., de Felipe M. R., Chueca A., Lazaro J.J., y López Gorgé J. (1992). Double immunogold localization of thioredoxin *f* and *m* and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, **30** (1): 39-46.

Hermoso R., Castillo M., Chueca A., Lazaro J.J., Sahrawy M. y López Gorgé J. (1996). Binding site on pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase involved in the interaction with thioredoxin. *Plant Mol. Biol.*, **30** (3): 455-465.

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.

Herting C. y Wolosiuk R. A. (1983). Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 984-988.

- Herzog B., Stitt M. y Heldt H. W.** (1984). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. *Plant. Physiol.*, **75**: 561-565.
- Hewit E.** (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In Commonwealth Bureau of Horticulture and Plant Crops CAB, Farham Royal Brucks (England), p. 431.
- Hirasawa M., Schurmann P., Jacquot J-P., Maieri W., Keryer E., Hartman F. C., Knaff D. B.** (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry*, **38** (16): 5200-5205.
- Hogges M., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J-P., Stein M., Lepiniec L. y Créatin C.** (1994). Purificación and characterization of pea thioredoxin *f* expressed in *Echerichia coli*. *Plant Mol. Biol.*, **26** (1): 225-234.
- Hodgson R. J. y Plaxton W. C.** (1995). Effect of polyethylene glycol on the activity, intrinsic fluorescence, and oligomeric structure of castor bean cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Let.*, **368**: 559-562.
- Hodgson R. J., Jia Z y Plaxton W. C.** (1998). A fluorescence study of ligand-induced conformational changes in cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from germinating castor oil seeds. *Biochem. Biophys.*, **1388** (2): 285-294.
- Holm C. y Sander C.** (1994). Searching protein structure databases has come of age. *Proteins*, **19**: 165-173.
- Holm C. y Sander C.** (1996). Mapping the protein universe. *Science*, **273**: 595-602.
- Holmgren A.** (1968). Thioredoxin. 6. The aminoacid sequence of the protein from *Echerichia coli* B. *Eur. J. biochem.*, **6**: 475-484.
- Holmgren A.** (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**: 237-271.
- Holmgren A.** (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, **264**: 13963-13966.
- Huang X. y Miller M. A.** (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.*, **12**: 337-367.
- Huber R. y Bennett W.** (1983). Functional significance of flexibility in proteins. *Biopolymers*, **22** (1): 261-279.
- Huber S. C.** (1986). Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *An. Rev. Plant Physiol.*, **37**: 233-246.

- Huber S. C. y Huber J. L.** (1992). Role of sucrose-phosphate synthase in metabolism in leaves. *Plant Physiol.*, **99**: 1275-1278.
- Huber S. C. y Huber J. L.** (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 431-444.
- Huber S. C., Toroser D., Winter H., Athwal G. S. y Huber J. L.** (1998). Regulation of plant metabolism by protein phosphorylation. *Photosynthesis: Mechanism and Effects*, vol. V: 3505-3510.
- Hur Y., Unger E. A. y Vasconcelos A. C.** (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from spinach. *Plant Mol. Biol.*, **19**: 799-802.
- Hur Y. y Vasconcelos A. C.** (1998). Spinach cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: I. Its organ-specific and developmental expression characteristics. *Mol. Cells.*, **8** (2): 138-147.
- Hur Y. y Vasconcelos A. C.** (1998). Spinach cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: II. Light effect on its expression. *Mol. Cells.*, **8** (2): 148-156.
- Ishiwatari Y., Honda C., Karashima 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.
- Iversen L. F., Brzozowski M., Hastrup S., Hubbard R., Kastrup J. S., Larsen I. K., Naerum L., Norskov-Lauidsen L., Rasmussen P. B., Thim L., Wiberg F. C. y Lundgren K.** (1997). Characterization of the allosteric binding pocket of human liver fructose-1,6-bisphosphatase by protein crystallography and inhibitor activity studies. *Protein Science*, **6**: 971-982.
- Jacquot J-P., Lopez-Jaramillo J., Chueca A., Cherfils J., Lemaire S., Chedozeau B., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Wolosiuk R. y López Gorgé J.** (1995). High-level expression of recombinant pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *Eur. J. biochem.*, **229**: 675-681.
- Jacquot J-P., Lancelin J. M. y Meyer Y.** (1997). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.*, **136**: 543-570.
- Jacquot J-P., Lopez-Jaramillo J., Miginiac-Maslow M., Lemaire S., Cherfils J., Chueca A., y López Gorgé J.** (1997). Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Letters*, **401**: 143-147.
- Janin J., Wodak S., Levitt M. y Maigret B.** (1978). Conformation of amino acid side-chains in proteins. *J. Mol. Biol.*, **125**: 357-386.
- Janin J.** (1995). Elusive affinities. *Proteins*, **21**: 30-39.

- Jeon Y. H., Bhoo S. H. y Hahn T. R.**, (1999). Molecular characterization of a cDNA encoding chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase from soybean (*Glycina maxima* L.). *comunicación personal*.
- Johnson M. S., Srinivasan N., Sowdhamini R. y Blundell T. L.** (1994). Knowledge-based protein modeling. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29** (1): 1-68.
- Jones T. H. y Thirup S.** (1986). Using known structures in protein model building and crystallography. *EMBO J.*, **5**: 819-822.
- Jones S. y Thornton J. M.** (1997). Prediction of protein-protein interaction sites using patch analysis. *J. Mol Biol.*, **272**: 133-143.
- Jones S. y Thornton J. M.** (1997). Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *J. Mol Biol.*, **272**: 121-132.
- Kabsch W. y Sander C.** (1983). Dictionary of protein recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22** (12): 2577-2637.
- Kaiser S.** (1998). Cell volume regulates liver phosphoenolpyruvate carboxykinase and fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Am. J. Physiol.*, **274** (Pt 1): G 509-517.
- Katchalsky-Katzir E., Shariv I., Eiseinstein M., Friesem A. A.** (1992). Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **89**: 2195-2199.
- Katti S. K., Lemaster D. M. y Eklund H.** 1990). Crystal structure of thioredoxin from *Echerichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **212**: 167-184.
- Kardar M.** (1996). Which came first, protein sequence or structure ? *Science*, **273**: 610.
- Ke H., Thorpe C. 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., Liang J-Y. y Lipscomb W. N.** (1991). Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose 6-phosphate at 2.1 Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **88**: 2989-2993.
- Kelly C. J., Zimmerman G. y Latzko E.** (1976). Light induced activation of fructose-1,6-bisphosphatase in isolated intact chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 193-199.
- Khayat E., Harn C.** (1991). Purification of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and immunological analysis of light/dark modulation in sugarbeet leaves. *Supl. Plant Physiol.*, **96**: 84.
- Khayat E., Harn C. y Daie J.** (1993). Purification and light-dependent molecular modulation of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in sugarbeet leaves. *Plant. Physiol.*, **101**: 57-64.

Kikawa Y., Inuzuka M., Jin B. Y., Kaji S., Koga j., Yamamoto Y., Fujisawa K., Hata I., Nakai A., Shigematsu Y., Mizunuma H., Taketo A., Mayumi M. y Sudo M. (1997). Identification of genetic mutations in japanese patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, **61** (4): 852-861.

Kloppstech K. (1997). Light regulation of photosynthetic genes. *Physiol. Plantarum*, **100**: 739-747.

Knaff D. B., Hirasawa M. y Jacquot J-P. (1998). The oxydation-reduction properties of the plant chloroplast ferredoxin, thioredoxin, fructose-1,6-bisphosphatase system. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. V: 1943-1946.

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.

Kossmann J., Sonnewald U. Y Willmitzer L. (1994). Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *The Plant Journal*, **6** (5): 637-650.

Kurbanov F. T., Choe J-Y., Honzatko R. B. Y Fromm H. J. (1998). Directed mutations in the poorly defined region of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase significantly affect catalysis and the mechanism of AMP inhibition. *J. Biol. Chem.*, **273**: 17511-17516.

Kruger N. J., Kombrink E. y Beevers H. (1983). Pyrophosphate: fructose-6-phosphotransferase in germinating castor bean seedlings. *FEBS Letters*, **153**: 409-412.

Kramer B., Rarey M. y Lengauer T. (1997). CASP2 experiences with docking flexible ligands using FlexX. *Proteins*, **S1**: 221-225.

Kwok S. C., Tripet B., Man J. H., Chana M. S., Lavigne P., Mant C. L. y Hodges R. (1998). Structural cassette mutagenesis in a de novo designed protein: proof of a novel concept for examining protein folding and stability. *Biopolymers*, **47**: 101-123.

Kuzma M. M., King S. T., Chalifoux M., Wood . M., Bladkeley S. D. y Dennis D. T. (1998). Overexpression of pyrophosphate-dependant phosphofructokinase (PEP) in transgenic tobacco. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. V: 3541-3544.

Kyte J. y Doolittle R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132.

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.*, **909**: 1-26.

- 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.
- Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. y Thornton J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**: 283-291.
- Laskowski R. A., Hutchinson E. G., Michie A. D., Wallace A. C., Jones M. L. y Thornton J. M. (1997). PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *TIBS*, **22**: 488-490.
- 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.
- Lemaster D., Springer P. A., y Unkefer C. J. (1997). The role of buried aspartate of *Escherichia coli* thioredoxin in the activation of the mixed disulfide intermediate. *J. Biol. Chem.*, **272** (48): 29998-30001.
- Lemer C. M., Rومان M. J. y Wodak S. J. (1995). Protein structure prediction by threading methods: evaluation of current techniques. *Proteins*, **23** (3): 337-355.
- Lepiniec 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.
- Lesk A. M. (1995). Protein architecture. A practical approach. *The Practical Approach Series. Oxford University Press*. 287p.
- Lesk A. M. (1995). Systematic representation of protein folding patterns. *J. Mol. Graphics*, **13**: 159-164.
- Levitt M., Gerstein M., Huang E., Subbiah S. y Tsai J. (1997). Protein folding: the end game. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**: 549-579.
- Li B., Geiger D. R. y Shieh W-J. (1992). Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugarbeet leaves. *Plant Physiol.*, **99**: 1393-1399.
- 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. *Biophysical J.*, **67**: 29-35.

- Li H., Helling R., Tang C. y Wingreen N. (1996). Emergence of preferred structure in a simple model of protein folding. *Science*, **273**: 666-669.
- Liang J-Y. Zhang Y., Huang S., Ke H. y Lipscomb W. N. (1992). Catalysis and allosteric regulation in fructose-1,6-bisphosphatase.
- Liang J-Y. Zhang Y., Huang S., Ke H. y Lipscomb W. N. (1993). Allosteric transition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**:2132-2136.
- Lipscomb W. N. (1991). Structure and function of allosteric enzymes. *Biochem. Mol. Biology*, **2**: 1-15.
- Lloyd J. C., Raines C. A., John U. P. y Dyer T. (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.
- 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., Jacquot J-P., Hermoso R., Lázaro J.J., Sahrawy M. y López-Gorgé J. (1998). High-yield expression of pea thioredoxin *m* and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation. *Plant Physiol.*, **114** (4): 1169-1175.
- López Jaramillo J., Chueca A., Sahrawy M. y López-Gorgé J. (1998). Hybrids from pea chloroplast thioredoxins *f* and *m*: physicochemical and kinetic characteristics. *Plant J.*, **15** (2): 155-163.
- Lu G. (1996). Evidence for an active T-state pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase: interface residue Lys-42 is important for allosteric inhibition and AMP cooperativity. *Protein Sci.*, **5** (11): 2333-2342.
- Lu G., Giroux E. L. y Kantrowitz E. R. (1997). Importance of the dimer-dimer interface for allosteric signal transduction and AMP cooperativity of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. Site-specific mutagenesis studies of glu-192 and Asp-187 residues on the 190' loop. *J. Biol. Chem.*, **272** (8): 5076-5081.
- Lykke-Andersen J., Aagaard C., Semionkov M. y Garret R. A. (1997). Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution. *TIBS*, **22**: 326-331.
- 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, N Y.

- Marcus F., Edelstein I., Reardon L., Hienrikson R. L. (1982). Complete aminoacid 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 aminoacid sequence of fructose-1,6-bisphosphatase: identification of a region unique to light regulated chloroplast enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**: 5379-5383.
- Marcus F. y Harrsch P. B. (1990). Aminoacid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**: 151-157.
- Martin W., Mustafa A-Z., Henze K. y Schnarrenberger C. (1996). Higher-plant chloroplast and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase isoenzymes: origins via duplication rather than procaryote-eucaryote divergence. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 485-491.
- Martin W. y Schnarrenberger C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr. Genet.*, **32**: 1-18.
- Matthews J. R., Wakasugi N., Virelizier J. L., Yodoi J. y Hay R. T. (1992). Thioredoxin regulate the DNA binding activity of NFκB by reduction of a disulfide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3821-3830.
- Mattews B. W. (1993). Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 139-160.
- Meyer Y., Verdoucq L. y Vignols F. (1999). Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.*, in press.
- Miginiac-Maslow M., Issakidis E., Lemaire M., Ruelland E., Jacquot J-P. y Decottignies P. (1997). Light-dependant activation of NADP-malate dehydrogenase: a complex process. *Aust. J. Plant Physiol.*, **24**: 529-542.
- Minor D. L. y Kim P. S. (1996). Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature*, **380**: 730-734.
- Mittard ., Blackledge M., Stein M., Jacquot J-P, Marion D. y Lancelin J. M. (1997). NMR solution structure of oxidized thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. biochem.*, **243**: 374-383.
- Morra-García S., Rodríguez-Suárez R. y Wolosiuk R. A. (1998). Role of electrostatic interactions on the affinity of thioredoxin for target proteins. *J. Biol. Chem.*, **273**: 16273-16280.
- Morris A. L., MacArthur M. W., Hutchinson E. G. y Thornton J. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, **12**: 345-364.

- 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.
- Netzer W. J. y Hartl F. U.** (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eucaryotes. *Nature*, **388**: 343-349.
- Netzer W. J. y Hartl F. U.** (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and independent mechanisms. *TIBS*, **23**: 68-73.
- Nishizawa A. N. y Buchanan B. B.** (1981). Enzyme regulation in C4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin linked fructose diphosphatase and seuheptulose bisphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.*, **256**: 6119-6126.
- Norel R., Lin S. L., Wolfson H. J., Nussinov R.** (1995). Molecular surface complementary at protein-protein interfaces: the critical role played by surface normals at well placed, sparse, points in docking. *J. Mol. Biol.*, **252**: 263-273.
- Ocón E., Hermoso R. y Lázaro J. J.** (1998). Chemical cross-linking between fructose-1,6-bisphosphatase and thioredoxin f. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. V: 3549-3552.
- O'Hara-Mays E. E. y Capwell J. C.** (1993). Miniprep for chloroplast DNA isolation. *Microchemical Journal*, **47**: 245-250.
- Ohyama K.** (1996). Chloroplast and mitochondrial genomes from a liverwort, *Marchantia polymorpha*, gene organization and molecular evolution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60** (1): 16-24.
- Österlund B. Y Janson J. C.** (1997). A strategic approach to protein purification: part I. *Science Tools from Pharmacia Biotech.*, **2** (3): 8-10.
- Österlund B. Y Janson J. C.** (1998). A strategic approach to protein purification: part II. *Science Tools from Pharmacia Biotech.*, **3** (1): 3-5.
- Pagano E., Chueca A., Hermoso R. y López Gorgé J.** (1998). Content of thioredoxins f and m, and their targets FBPase and NADP-MDH, in pea plants grown under normal and light-stressed conditions. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. V: 1947-1950.
- Parker J. M. R.** (1999). The relationship between peptide plane rotation (PRP) and similar conformations. *J. comp.chem.*, **20** (9): 947-955.
- Paul M., Sonnewald U., Hajirezaei M., Dennis D. y Stitt M.** (1995). Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase do not differ significantly from wild type in photosynthate partitioning, plant growth or their ability to cope with limiting phosphate, limiting nitrogen and suboptimal temperatures. *Planta*, **196**: 277-283.

- Pearson W. R. (1990). Rapid and sensitive comparison with FASTA and FASTP. *Methods Enzymol.*, **163**: 63-98.
- Peitsch M. C. (1995a). ProMod: automated knowledge-based protein modelling tool. *PDB Quarterly Newsletter*, **72**: 4.
- Peitsch M. C. (1995b). Protein modeling by e-mail. *Bio/technology*, **13**: 658.
- Peitsch M.C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans.*, **24** (1): 274-279.
- Peitsch M. C. y Guex N. (1997a). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdbviewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**: 2714.
- Peitsch M. C., Wikins M. R., Tonella L., Sanchez J. C., Appel R. D. Y Hochstrasser D. F. (1997b). Large scale protein modelling and integration with the SWISS-PROT and SWISS-2DPAGE databases: the example of *Echerichia coli*. *Electrophoresis*, **18**: 498-501.
- Pfaller W., Thorwartl U., Nevinny-Stickel M., Krall M., Schober M., Joannidis M. y Hobisch A. (1994). Clinical value of fructose-1,6-bisphosphatase in monitoring renal proximal tubular injury. *Kidney Int. Suppl.*, **47** S: 68-75
- Pilkis S. J., El-Magrjabi M. R., Pilkis J. y Claus S. (1981). Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **256** (18): 3619-3622.
- Plá A. y López Gorgé J. (1981). Thioredoxin/fructose-1,6-bisphosphatase affinity in the enzyme activation by the ferredoxin-thioredoxin system. *Biochem. Biophys. Acta*, **636**: 113-118.
- Plaxton W. C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 185-214.
- Prado F. E., Lázaro J. J. y López Gorgé J. L. (1991). Regulation by Ca^{2+} of a cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaves. *Plant Physiol.*, **96**: 1026-1033.
- Praag E. (1997). Kinetic properties of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from grapefruit. Effect of citrate. *Biochem. Mol. Biol. Inter.*, **43** (3): 625-631.
- Price G. D., Evans J. R., von Caemmerer S., Yu J-W. Y Badger M. R. (1995). Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO_2 assimilation via a reduction in ribulose bisphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta*, **195**: 369-378.
- Qin J., Clore M., Poindexter-Kennedy W., Hurth J. R. y Gronenborn A. (1995). Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF κ B. *Structure*, **3**: 289-297.

- Qin J., Clore M., Poindexter-Kennedy W., Kuszewski J., y Gronenborn A.** (1996). The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure*, **4**: 613-620.
- Rádis-Baptista G., Urquiza Valdivia D. N. y Abrahão-Neto J.** (1998). Fructose-2,6-bisphosphate biosynthesis and regulation of carbohydrate metabolism in *aspergillus oryzae*. *Can. J. Microbiol.*, **44**: 6-11.
- Raines C. A., Lloyd J. C., Willingham N. M., Potts S. y Gyer T. A.** (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 homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *Eur. J. Biochem.*, **205**: 1053-1059.
- Ramachandran G. N. y Sasisekharan V.** (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **23**: 283-437.
- Rarey M., Kramer B. Y Lengauer T.** (1999a). The particle concept: placing discrete water molecules during protein-ligand docking predictions. *Proteins*, **34** (1): 17-28.
- Rarey M., Kramer B. Y Lengauer T.** (1999b). Docking of hydrophobic ligands with interaction-based matching algorithms. *Bioinformatics* **15** (3): 243-250.
- Rivera-Madid R., Maestres D., Marinho P., Jacquot J. P., Decottignies M., Miginiac-Maslow M. y Meyer Y.** (1995). Evidence of five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5620-5624.
- Rodríguez-Andrés A., Lázaro J. J., Chueva A., Hermoso R. y López-Gorgé J.** (1987) binding of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to chloroplast membranes. *Plant Science*, **52**: 41-48.
- Rodríguez-Andrés A., Lázaro J. J., Chueva A., Hermoso R. y López-Gorgé J.** (1990). Effects of alcohols on the association of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to thylakoid membranes. *Physiol. Plant.*, **78**: 409-413.
- Rodríguez-Suárez R. J. y Wolosiuk R. A.** (1993). Sequence of a cDNA encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed. *Plant Physiol.*, **103**: 1453-1454.
- Rodríguez-Suárez R. J., D'Alessio A. C. y Wolosiuk R. A.** (1998). Two chloroplast fructose-1,6-bisphosphatases are expressed in rapeseed (*Brassica napus*). *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. V: 3553-3556.
- Rogres D. T., Hiller E., Mitsock L. y Orr E.** (1988). Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 6051-6057.

- Rogers J. H. (1990). The role of introns in evolution. *FEBS Letters*, **2**: 339-343.
- Rosenbach D. y Rosenfeld D. (1995). Simultaneous modeling of multiple loops in proteins. *Proteins*, **4** (3): 496-505.
- 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. y Sander C. y Schneider R. (1994). Redefining the goals of protein secondary structure prediction. *J. Mol. Biol.*, **235** (1): 13-26.
- Rost B. y Schneider R. (1997). Pedestrian guide to analysis sequence databases. *In*: Ashman K. ed. *Core techniques in Biochemistry*, Heidelberg, Springer.
- Russel R. B. y Barton G. J. (1994). Structural features can be unconverted in proteins with similar folds. An analysis of side-chain to side-chain contacts secondary structure and accessibility. *J. Mol. Biol.*, **244**: 332-350.
- Sahrawy M., Chueca A., Hermoso R., Lázaro J.J. y López Gorgé J. (1990a). Role of light in the biosynthesis and turnover of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *New Phytol.*, **115**: 603-608.
- Sahrawy M., Chueca A., Hermoso R., Lázaro J.J. y López Gorgé J. (1990b). *In-vivo* and *in-vitro* synthesis of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase from pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, **182**: 319-324.
- Sahrawy M., Chueca A., y López Gorgé J. (1995). Site-directed mutagenesis shows that lysine-299 is essential for activity of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Science*, **106**: 81-89.
- Sahrawy M., Hecht V., López Jaramillo J., Chueca A., Chartier Y. Y Meyer Y. (1996). Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J. Mol. Evol.*, **42**: 422-431.
- Sahrawy M., Chueca A., Hermoso R., Lázaro J.J. y López Gorgé J. (1997). Directed mutagenesis shows that the preceding region of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase regulatory sequence is the thioredoxin docking site. *J. Mol. Biol.*, **269** (4): 623-630.
- 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.
- Sali A. y Blundell T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**: 779-815.

- Sali A.** (1995). Modelling mutations and homologous proteins. *Cur. Opinion Biotechnology*, **6**: 437-451.
- Sander C. y Schneider R.** (1991). Database of homology-derived structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*, **9**: 56-68.
- Schmoll D., Cesar M., Fuhrmann E. y Hamprecht B.** (1995). Colocalization of fructose-1,6-bisphosphatase and glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Brain Res.*, **677** (2): 341-344.
- Scott P., Kruger N. J.** (1994). Fructose-2,6-bisphosphate levels in mature leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and potato (*Solanum tuberosum*). *Planta*, **19**: 16-20.
- Serrano J. L. y García Lobo J. M.** (1992). Manual de genética molecular. *Ed. Sintesis*. 284p.
- Sharkey T. D., Kobza J., Seelmann J. R. y Brown R. H.** (1988). Reduced cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase activity leads to loss of O₂ sensitivity in *flaveria linaris* mutant. *Plant Physiol.*, **86**: 667-671.
- Sharkey T. D., Savitch L. V., Vanderveer P. J. y Micallef B. J.** (1992). Carbon partitioning in *flaveria linaris* mutant with reduced cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.*, **100**: 210-215.
- Shin D. J. y McGrane M. M.** (1997). Vitamin A regulates genes involved in hepatic gluconeogenesis in mice: phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1,6-bisphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Nutr.*, **127** (7): 1274-1278.
- Schmidt A.** (1981). A thioredoxin activated fructose-1,6-bisphosphatase from the cyanobacteria *Syenchococcus* 6301. *Planta*, **152**: 101-104.
- Smekens S., MacDonald F. D. y Buchanan B. B.** (1989). Studies on the entry of fructose-2,6-bisphosphate into chloroplasts. *Plant Physiol.*, **70**: 978-981.
- Shortle D.** (1999). Structure prediction: The state of the art. *Curr. Biol.*, **9** (6): R205-209.
- Shyur L. F., Aleshin A. E., Honzatko R. B., Fromm H. J.** (1996). Biochemical properties of mutant and wild-type fructose-1,6-bisphosphatases are consistent with the coupling of intra and intersubunit conformational changes in the T and R state transition. *J. Biol. Chem.*, **271** (52): 33301-33307.
- Shyur L. F., Poland B. W., Honzatko R. B. y Fromm H. J.** (1997). Major changes in the kinetic mechanism of AMP inhibition and AMP cooperativity attend the mutation of Arg 49 in fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **272** (42): 26295-26299.
- Signora L., Galtier N., Skot L., Lucas H. y Foyer C. H.** (1998). Over-expression of sucrose of sucrose phosphate synthase in arabidopsis thaliana results in increased foliar sucrose/starch

ratios and favors decreased foliar carbohydrate accumulation in plants after prolonged growth with CO₂ enrichment. *J. Exper. Bot.*, **49** (321): 669-680.

Skalecki K., Rakus D., Wisniewski J. R., Kolodziej J. y Dzugaj D. (1999). cDNA sequence and kinetic properties of human lung fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **365** (1): 1-9.

Sobolev V., Moallem T. M., Wade R. C., Vriend G. y Edelman M. (1997). CASP2 molecular docking predictions with the LIGIN software. *Proteins*, **S1**: 210-214.

Sola M. M., Salto R., Oliver F. J., Gutiérrez M. y Vragas A. M. (1993). Effects of AMP and fructose-2,6-bisphosphate on fluxes between glucose-6-phosphate and triose-phosphate in renal cortical extracts. *J. Biol. Chem.*, **268** (26): 19352-19357.

Solomon D.H., Raynal M. C., Tejwani G. A., Tejwani G. A. y Cayre Y. E. (1988). Activation of the fructose 1,6-bisphosphatase gene by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ during monocytic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6904-6908.

Springgate C. F. y Stachow C. S. (1982). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Methods in Enzymology*, **90**: 378-379.

Spyrou G., Enmark E., Miranda-Vizuete A. y Gustafson J. A. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, **272** (5): 2936-2941.

Stec B. (1996). Crystal structures of the active site mutant (Arg-243-->Ala) in the T and R allosteric states of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Sci.*, **5** (8): 1541-1553.

Stein M. y Wolosiuk R. A. (1987). The effect of chaotropic anions on the activation and the activity of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **262** (33): 16171-16179.

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.

Stitt M., Herzog B. y Heldt H. W. (1985a). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. *Plant. Physiol.*, **79**: 590-598.

Stitt M. y Heldt H. W. (1985b). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. *Plant. Physiol.*, **79**: 599-608.

Stitt M. (1987). Fructose-2,6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* **84**: 201-204.

Stitt M. (1990). Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, **41**: 153-185.

Stitt M., von Schaewen A. y Willmitzer L. (1990). "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. *Planta*, **183**: 40-50.

Stitt M. (1995). Regulation of metabolism in transgenic plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**: 341-368.

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

Tamoi M., Murakami A., Takeda T. y Shigeoka S. (1998). Acquisition of a new type of fructose-1,6-bisphosphatase with resistance to hydrogen peroxide in cyanobacteria: molecular characterization of the enzyme from *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta*, **1383** (2): 232-244.

The EU BRIDGE Data Project Consortium (Gray P. D. M., Kemp G. J. L., Rawlings C. J., Brown., Sander C., Thornton J. M., Orengo C. M., Wodak S. J. y Richelle J.) (1996). Macromolecular structure information and databases. *TIBS*, **21**: 251-256.

Tillmann H. y Eschrich K. (1998). Isolation and characterization of an allelic cDNA for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase. *Gene*, **212** (2): 295-304.

Tobias R. B., Boyer C. D. y Shannon J. C. (1992). Enzymes catalyzing the reversible conversion of fructose-6-phosphate and Fructose-1,6-bisphosphatase in *maize* (*Zea mays* L.) kernels. *Plant Physiol.*, **99**: 140-145.

Towin E. M. y Silverthorne J. (1985). Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**: 569-593.

Tuchscherer G., Scheibler L., Dumy P., Mutter M. (1998). Protein design: on the threshold of functional properties. *Biopolymers*, **47**: 63-73.

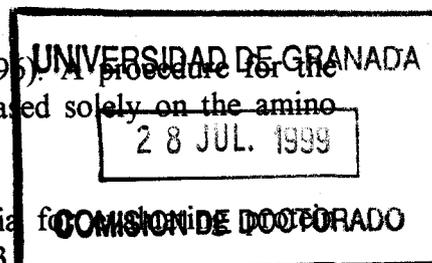
Usuda H., Kalt-Torres W., Kerr P. S. y Huber S. C. (1987). Diurnal changes in maize leaf photosynthesis. *Plant Physiol.*, **83**: 289-293.

Vakser I. A. y Aflalo C. (1994). Hydrophobic docking: a proposed enhancement to molecular recognition techniques. *Proteins*, **20**: 320-329.

Vakser I. A. (1996a). Low-resolution docking: prediction of complexes for underdetermined structures. *Biopolymers*, **39**: 455-464.

Vakser I. A. (1996b). Long-distance potentials: an approach to the multiple-minima problem in ligand-receptor interaction. *Protein Engineering*, **9** (1): 37-41.

- Vakser I. A. (1996c). Main-chain complementary in protein-protein recognition. *Protein Eng.*, **9**: 741-744.
- Vakser IA. (1997). Evaluation of GRAMM low-resolution docking methodology on the hemagglutinin-antibody complex. *Proteins, Suppl 1*: 226-230.
- Vakser IA. GRAMM v 1.03: global range molecular matching. Rockefeller University, New York, NY. URL: <http://guitar.rockefeller.edu/gramm>
- Varadarajan R., Nagarajaram H. A. y Ramakrishnan C. (1996). A procedure for the prediction of temperature-sensitive mutants of aglobular protein based solely on the amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**: 13908-13913.
- Venclovas C., Zemla A., Fidelis K. y Moulton J. (1997). Criteria for protein structures derived from comparative modeling. *Proteins, Sup 1*: 7-13.
- Verdoucq L. *et al.* (1999). In vivo characterization of thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Villeret V., Huang S., Zhang Y., Xue Y. y Lipscomb W. N. (1995a). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at Å 2.8 resolution. *Biochemistry*, **34**: 4299-4306.
- 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 analogue 2,5-anhydro-D-glucitol-1-6-bisphosphate and catalytic metal ions monitored by X-ray crystallography. *Biochemistry*, **34** (13): 4307-4315.
- Vincent O. y Gancedo J. M. (1995). Analysis of positive elements sensitive to glucose in the promoter of the FBPI gene from yeast. *J. Biol. Chem.*, **270** (21): 12832-12838.
- Wahle E. y Keller W. (1996). The biochemistry of polyadenylation. *TIBS*, **21**: 247-250.
- Walker R. P., Acheson R. M., Tésci L. I. y Leegood R. C. (1997). Phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ plants: its role and regulation. *Aust. J. Plant Physiol.*, **24** (4): 459-468.
- Wallace AC. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.*, **8** (2): 127-34.
- Weeks C. M., Rszak A. W., Erman M., Kaiser R., Jornvall H. y Ghosh D. (1999). Structure of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase at 2.3 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **55** (Pt1): 93-102.
- Weichsel A., Gasdaska J. R., Powis G. y Montfort W. R. (1996). Human thioredoxin dimer. Reduced form. *PDB entry code IERT*.



- Whitt G. S.** (1987). Species differences in isozymes tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. *Isozymes: Current topics in biological and medical research.*, **15**: 1-26.
- Wollan 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 glutation regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature*, **266**: 565-567.
- Xue Y., Huang S., Liang J. J., Zhang Y. y Lipscomb W. N.** (1994). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP, and Zn²⁺ at 2.0 Å resolution: aspects of synergism between inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 12482-12486.
- Xu Z., Horwich A. L. y Sigler P. B.** (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-ADP₇ chaperonin complex. *Nature*, **388**: 741-750.
- Zhang Y., Liang J-Y., Huang S., Ke H. y Lipscomb W. N.** (1993a). Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* **32** (7):1844-1857.
- Zhang Y., Liang J. Y. y Lipscomb W. N.** (1993b). Structural similarities between fructose-1,6-bisphosphatase and inositol monophosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **190** (3): 1080-1083.
- Zhang R. y Fromm H. J.** (1995). Mutation of arginine 276 to methionine changes Mg²⁺ cooperativity and the kinetic mechanism of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry*, **34** (25): 8190-8195.
- Zhang R. , Villeret V., Lipscomb W. N. y Fromm H. J.** (1996). Kinetics and mechanisms of activation and inhibition of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase by monovalent cations. *Biochemistry*, **35** (9): 3038-3043.
- Zhao F. K., Xu S. Q. y Xu G. J.** (1998). AMP activation of snake muscle fructose-1,6-bisphosphatase at alkaline pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244** (3): 928-932.
- Zimmermann G., Kelly G. J. y Latzko E.** (1978). Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **253** (17): 5952-5956.
- Zimmermann G., Kelly G. J. y Latzko E.** (1982). Fructose-1,6-bisphosphatase from of spinach leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods in Enzymology*, **90**: 371-378.
- Zrenner R., Krause K-P., Apel P. y Sonnewald U.** (1996). Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on growth and tuber yield. *Plant J.*, **9** (5): 671-681.

Zwanzig R., Szabo A. y Bagchi B. (1992). Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 20-22.