

T. Pro. 23/32
T 10/95

UNIVERSIDAD DE GRANADA



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 11/10/99
ENTRADA NUM. 3782

TESIS DOCTORAL

INTERACCIÓN DE LA FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA CLOROPLASTÍDICA CON SU MODULADOR TIORREDOXINA: MODELIZACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
29 SEPT. 1999
COMISION DE DOCTORADO



Owen S. Wangenstein Fuentes
Granada 1999

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613386980
N.º Copia 116384519

**Interacción de la fructosa-1,6-bisfosfatasa
cloroplastídica con su modulador tiorredoxina:
modelización molecular y caracterización experimental**

**Memoria que presenta el licenciado en Ciencias Químicas
Owen S. Wangenstein Fuentes para optar al grado de Doctor.**

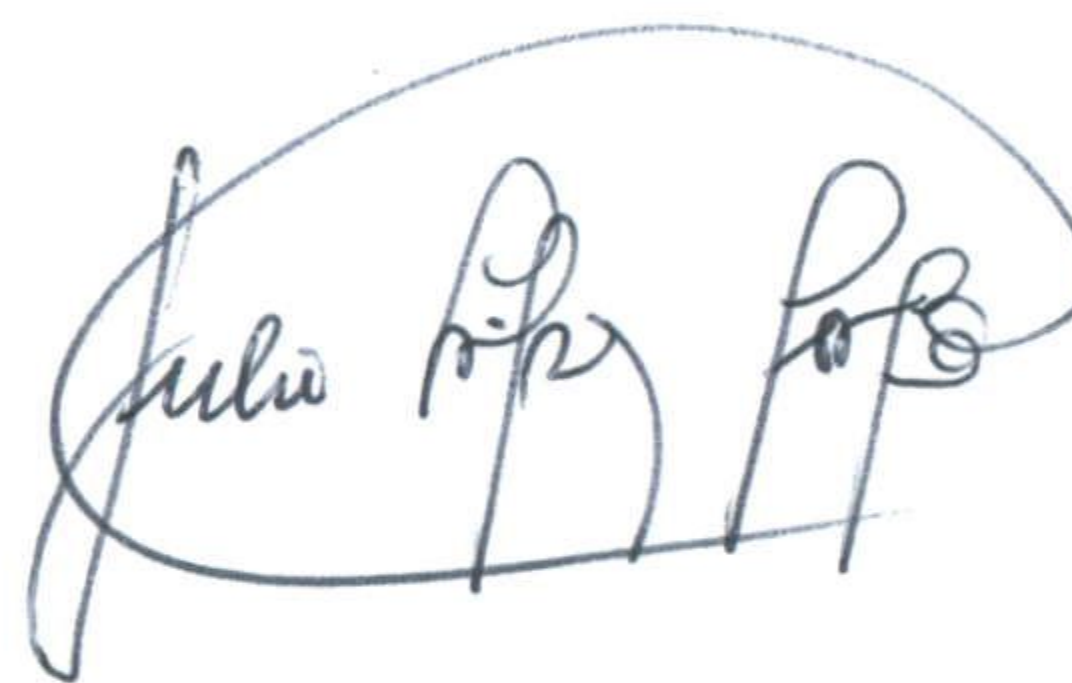


Fdo. Owen S. Wangenstein Fuentes

Vº Bº
LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

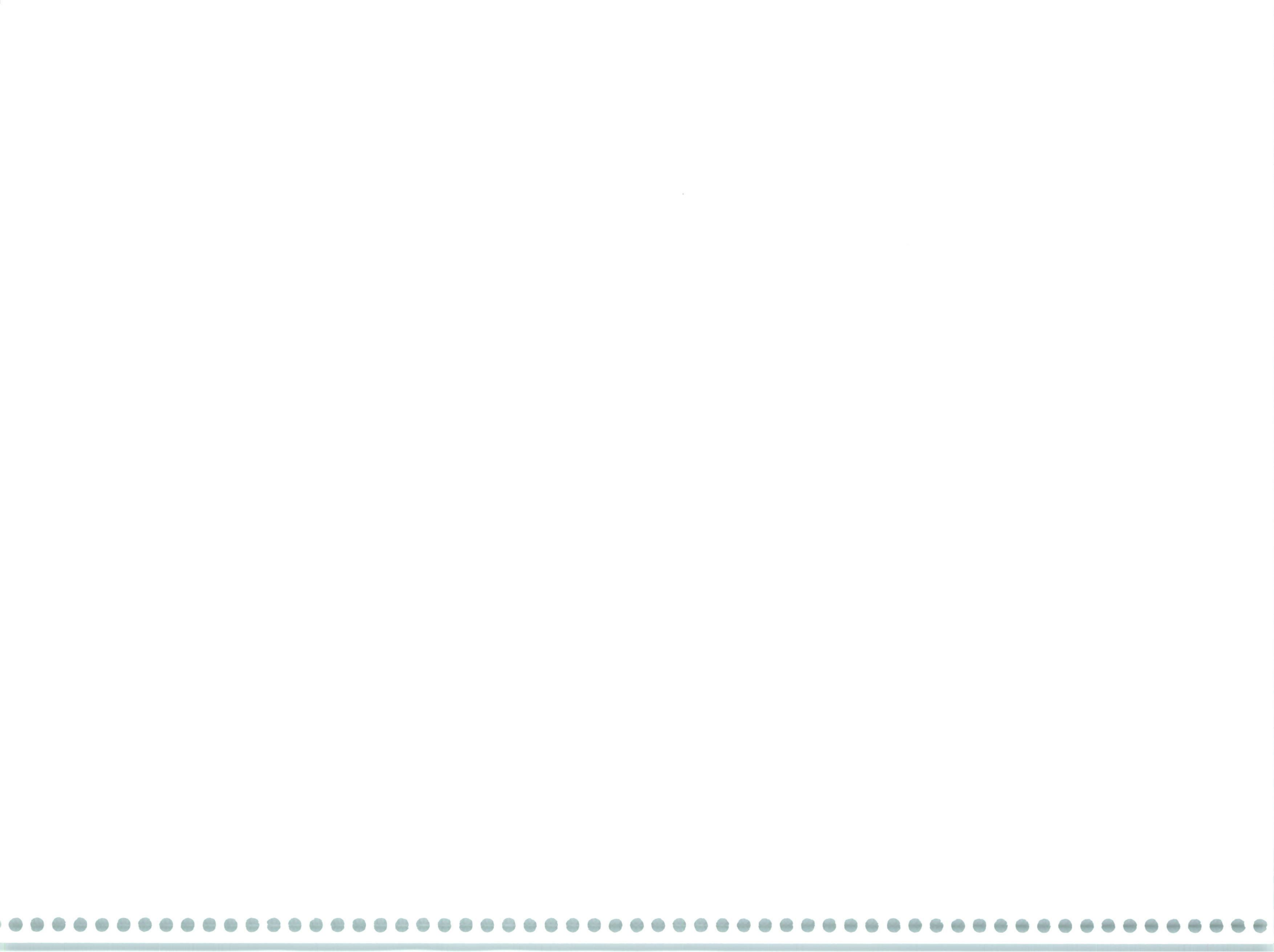


Fdo. Dra. Ana Chueca Sancho
Doctora en Farmacia
Profesora de Investigación del C.S.I.C.



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

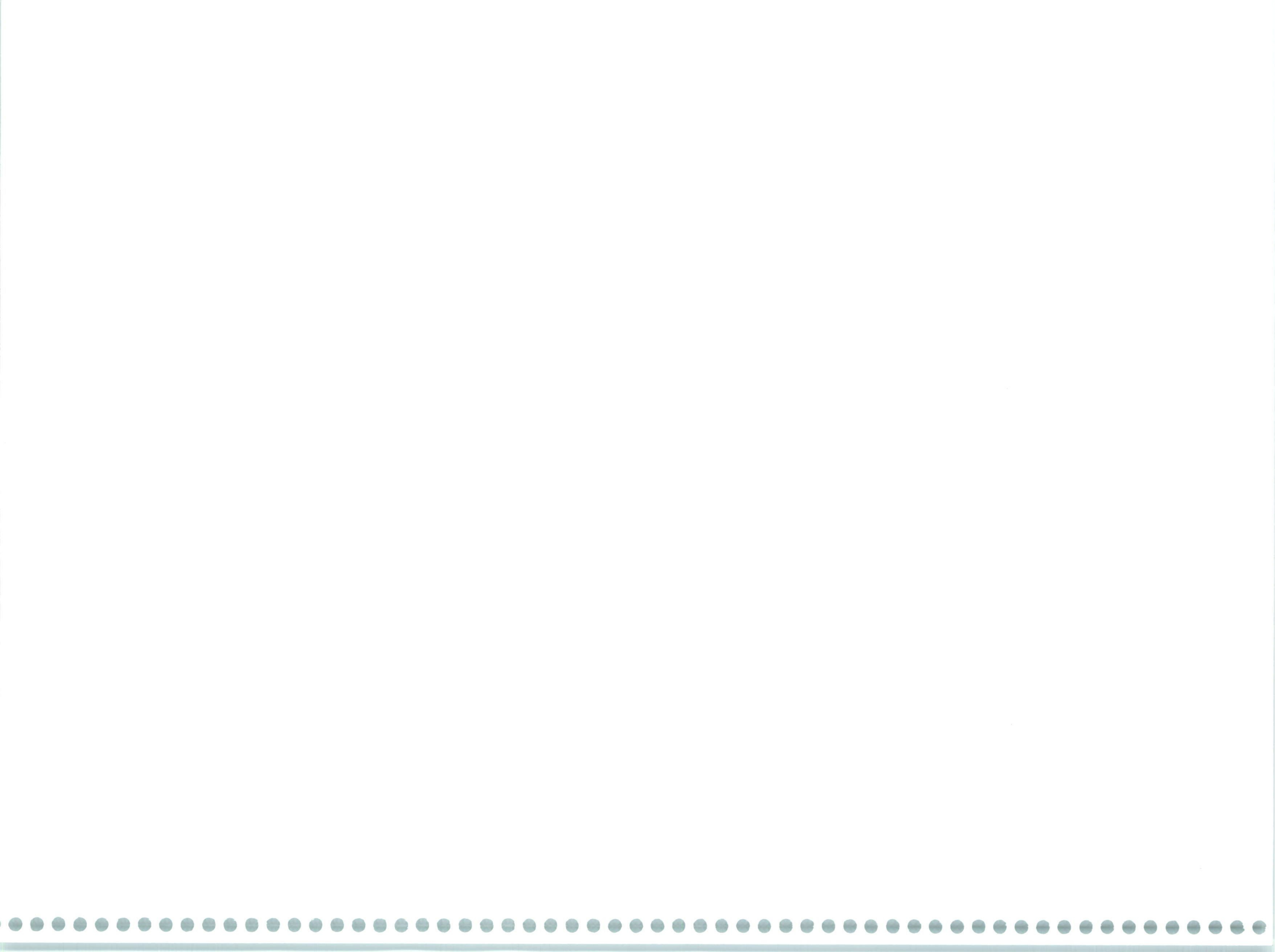
Granada, Septiembre de 1999



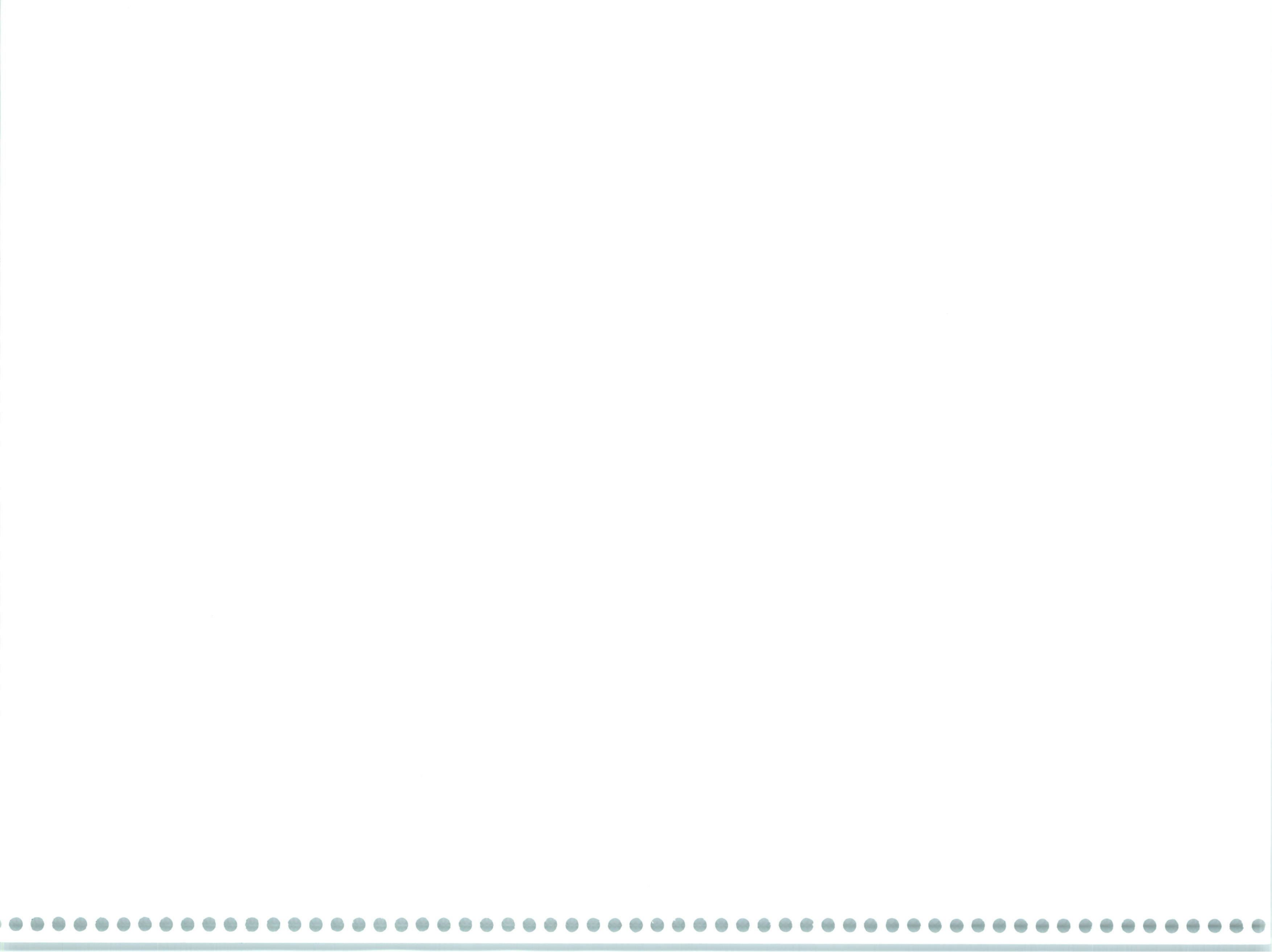
El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Granada.

Su elaboración ha sido financiada por una Beca Predoctoral del Plan de Formación de Profesorado Universitario, del Ministerio de Educación y Cultura.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron presentados en la XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal - V Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal (Córdoba, 1997), en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Sevilla, 1998) y en la III Reunión de la Red Temática Nacional sobre Plegamiento, Estabilidad e Ingeniería de Proteínas (Guardamar de Segura, 1999).



*A mi esposa María del Mar,
por su infinita paciencia.*



Agradecimientos

Puede que suene a tópico, pero en este caso es la rigurosa verdad, el trabajo que aquí se presenta no hubiera podido llevarse a cabo sin la inestimable ayuda y colaboración de las siguientes personas. Para todas ellas, mi más sincero y eterno agradecimiento.

En primer lugar, por supuesto, a los directores de este trabajo, Ana Chueca y Julio López Gorgé, que arriesgaron mucho al depositar su confianza en un químico industrial aficionado a la Biología, con pocas probabilidades de éxito, y me trataron más como a un hijo que como a un becario.

A Narciso Algaba, que tanto me ha ayudado en el laboratorio, soportando tan estoicamente mis retrasos y ausencias, que merecería figurar como coautor de esta Tesis, si ello fuera posible.

Al resto del grupo de Fotosíntesis de la E.E.Z., Juanjo, Charo, Matilde, Mariam y Paquita y, por supuesto a los becarios, Ester, Roland, Eduardo, Jaber, Marisa y Carlos, por saber soportar mi inexperiencia, mi impaciencia y mi inmodestia sin protestar demasiado, y por ayudarme en todas mis necesidades, sin esperar nada a cambio.

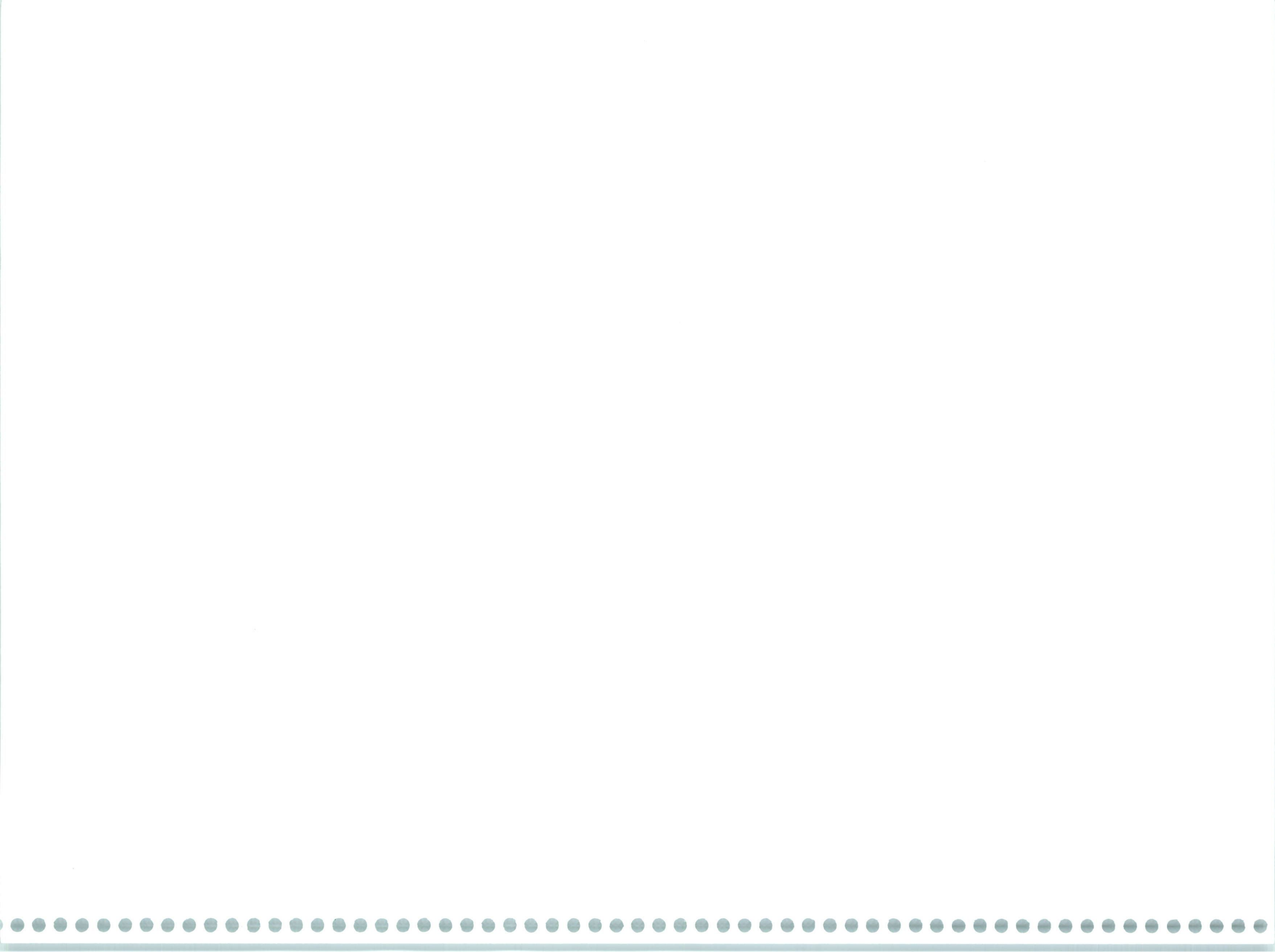
A todos los demás becarios de la E.E.Z., por demostrar empíricamente que la probabilidad de sobrevivir al proceso de realización de una Tesis es más alta de lo que la gente normalmente cree. Y porque se enfadarían si no los mencionara.

A Javier López-Jaramillo, por descubrir el camino forestal que llevaba a la interacción FBPasa - Trx, y convertirlo en una autopista por la cual me ha sido muy fácil circular.

A Antonio Parody, que permitió amablemente que me llevara su dializador de equilibrio a nuestro laboratorio “durante un par de semanas” y no se enfadó excesivamente cuando se lo devolví al cabo de un par de años. Y también por aceptar ser mi tutor de doctorado e introducirme en las oscuras y arcanas artes de la interacción entre proteínas.

A David Knaff y Masakazu Hirasawa, por enseñarme todo lo que sé sobre potenciales redox y haberme permitido realizar una fructífera estancia en su laboratorio de Texas Tech.

Y por último, aunque no menos importante, a los profesores y becarios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada; en especial a Alejandro Fernández Barrero, Andrés García Granados y Miriam Álvarez, por permitir que esta Tesis pueda ser leída en su Departamento, aunque cualquier parecido con la Química Orgánica sea pura coincidencia.



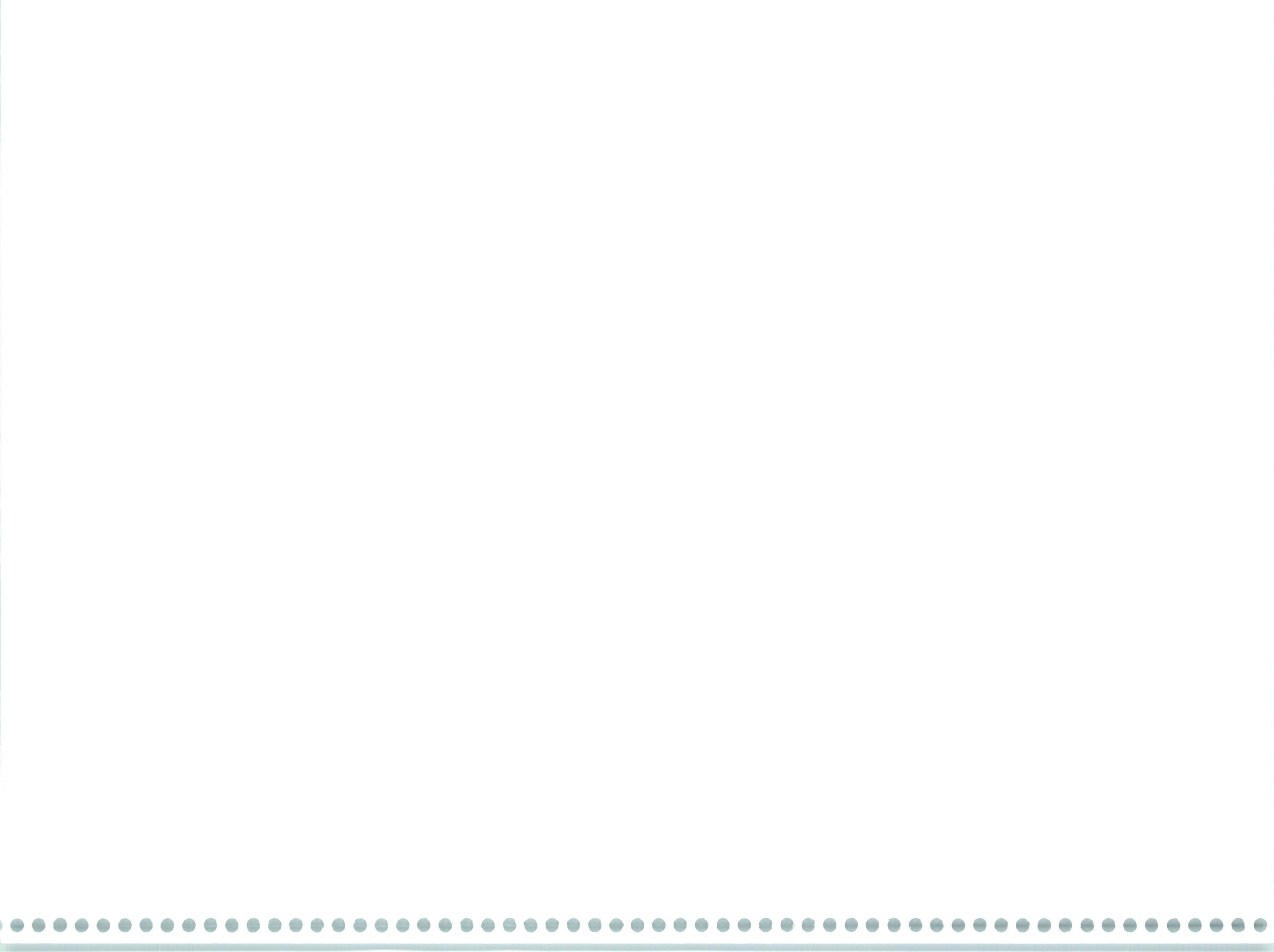
ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 La fotosíntesis y el ciclo de Benson-Calvin	3
1.2. La fructosa-1,6-bisfosfatasa	8
1.3. Las tiorredoxinas	15
1.4. Las tiorredoxinas del cloroplasto	20
1.5. Estudio de la interacción tiorredoxina - FBPasa	26
2. Objetivos	31
3. Material y métodos	35
3.1. Herramientas de Bioinformática	37
3.1.1. Programas de análisis de secuencias y estudios filogenéticos	37
3.1.2. Programas de modelización molecular y <i>docking</i>	39
3.2. Cepas bacterianas	42
3.3. Plásmidos	43
3.3.1. El plásmido pET12a	43
3.3.2. El plásmido pMI	44
3.4. Manipulación del ADN	46
3.4.1. Aislamiento de ADN plasmídico	46
3.4.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	47
3.4.3. Extracción de ADN de geles de agarosa	48
3.4.4. Medida de la concentración de ADN	49
3.4.5. Amplificación de ADN mediante PCR	49
3.4.6. Restricción de ADN	51
3.4.7. Ligación de ADN	52
3.4.8. Secuenciación de ADN	53
3.4.9. Mutagénesis dirigida del ADN	53
3.5. Manipulación de <i>Escherichia coli</i>	54
3.5.1. Medios de cultivo	54
3.5.2. Preparación de células competentes	54
3.5.3. Transformación de las células competentes	54
3.6. Manipulación de proteínas	55
3.6.1. Expresión de los plásmidos recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	55
3.6.2. Purificación de las tiorredoxinas expresadas en <i>Escherichia coli</i>	57
3.6.3. Purificación de la FBPasa expresada en <i>Escherichia coli</i>	57
3.6.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS	63
3.6.5. Medida de la concentración de proteínas	63
3.7. Análisis de la activación de FBPasa por tiorredoxina	65
3.8. Estudio de los parámetros de unión mediante diálisis en equilibrio	66
3.8.1. Dispositivo experimental	66
3.8.2. Modelo matemático empleado para el ajuste de los datos de equilibrio	69
3.9. Medida del potencial redox de las tiorredoxinas	72
3.9.1. Fundamento teórico	72
3.9.2. Procedimiento experimental	75
3.9.3. Tratamiento de los datos	76

4. Resultados y discusión	77
4.1. Reconstruyendo la historia evolutiva de las tiorredoxinas	79
4.1.1. Búsqueda de secuencias en las bases de datos	79
4.1.2. Las tiorredoxinas de los Arqueones	83
4.1.3. Las tiorredoxinas bacterianas y de cianobacterias	85
4.1.4. Las tiorredoxinas eucarióticas	89
4.1.5. Aminoácidos conservados en las distintas tiorredoxinas cloroplastídicas	97
4.2. Modelo teórico para la interacción tiorredoxina - FBPasa	103
4.2.1. Modelos de las tiorredoxinas m y f de guisante	103
4.2.2. Predicciones de <i>docking</i> mediante el programa GRAMM	105
4.2.3. Modelos teóricos de interacción de las Trxs con el “bucle-170” de la FBPasa	109
4.2.4. Modelos teóricos de interacción de las Trxs con la FBPasa completa	112
4.2.5. Elección de los aminoácidos a mutar	116
4.3. Obtención del mutante Trx m E63Q	117
4.4. Obtención del mutante Trx m R74E	121
4.5. Caracterización de los mutantes	124
4.5.1. Comprobación de los plásmidos mutantes	124
4.5.2. Expresión, purificación y caracterización electroforética de las proteínas mutantes	127
4.6. Medida de la capacidad de activación de las tiorredoxinas sobre la FBPasa	128
4.7. Estudio del equilibrio de unión mediante diálisis en equilibrio	132
4.7.1. Determinación del tiempo necesario para que se establezca el equilibrio	132
4.7.2. Estudio y minimización del efecto Donnan	133
4.7.3. Obtención de las isotermas de unión para la Trx m silvestre y los mutantes	135
4.7.4. Análisis numérico de los resultados	137
4.8. Medidas de los potenciales de reducción de la tiorredoxina m silvestre y de los mutantes	140
4.8.1. Determinación de la concentración de DTT óptima	140
4.8.2. Determinación del tiempo de incubación óptimo	141
4.8.3. Determinación de los potenciales en el punto medio (E_m) de la Trx m y de los mutantes, a diferentes valores de pH	142
5. Conclusiones	149
6. Bibliografía	155
Anexo I. Reactivos y disoluciones de uso común utilizados en este trabajo	179

Dice la arcilla a quien la modela: “¿Qué es lo que haces?”

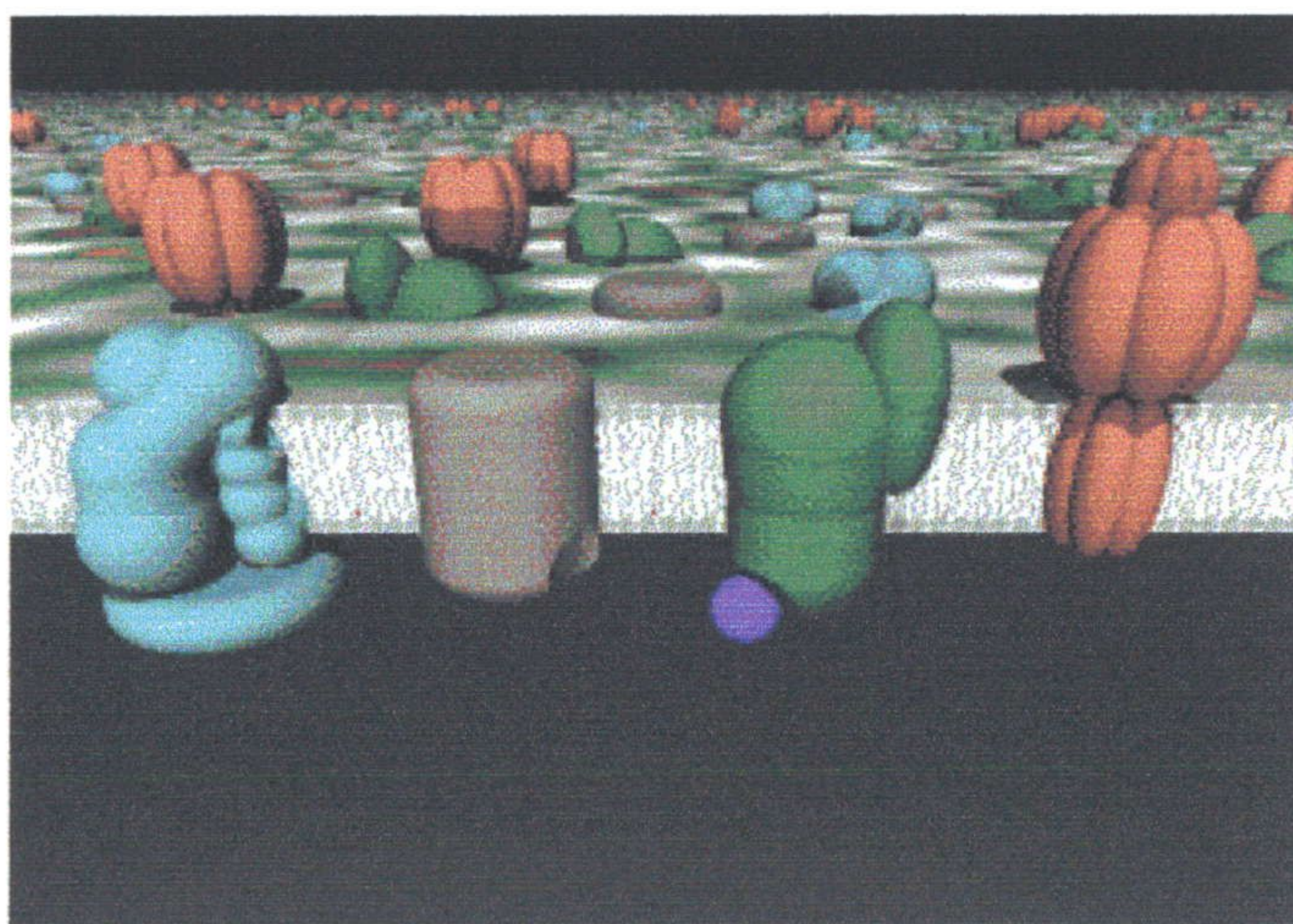
Isaías, 45,9



1. INTRODUCCIÓN

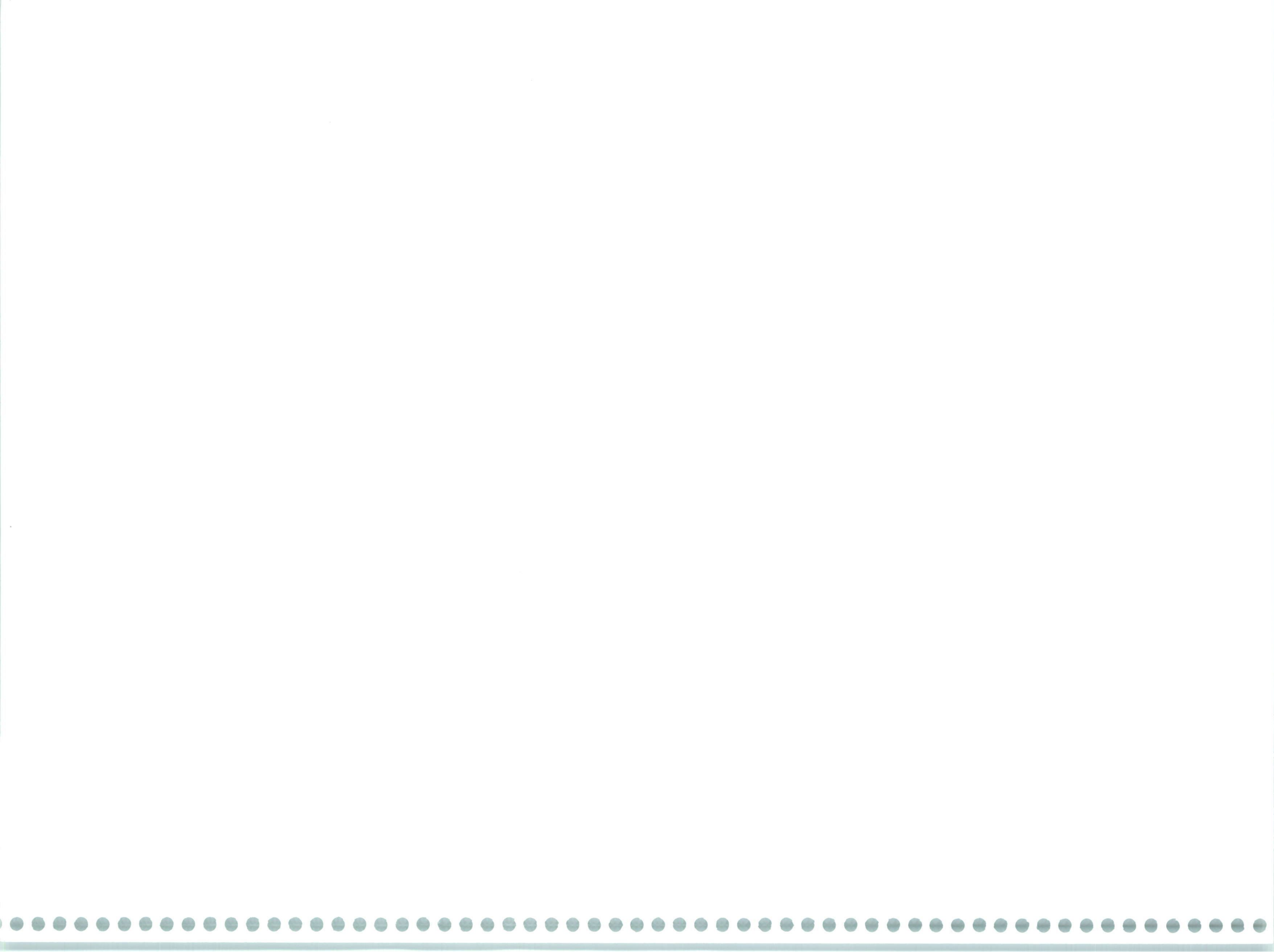
Preferiría comprender una sola causa que ser rey de Persia.

Demócrito de Abdera



Corte de la membrana tilacoidal, mostrando algunos de los más importantes complejos enzimáticos allí ubicados, de izquierda a derecha: fotosistema II, citocromo b₆/f, fotosistema I y H⁺-ATP-sintetasa.

De *Virtual Cell* (Univ. of Illinois at Urbana-Champaign):
<http://ampere.scale.uiuc.edu/~m-lexa/cell/cell.html>

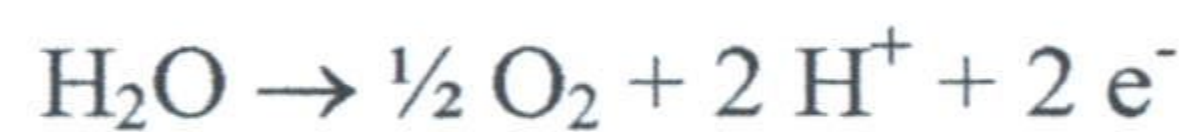


1.1. LA FOTOSÍNTESIS Y EL CICLO DE BENSON-CALVIN

La fotosíntesis es el proceso químico más importante para la vida

La fotosíntesis puede definirse como el conjunto de procesos a través de los cuales algunos organismos autótrofos (fotoautótrofos) transforman la energía solar en potencial energético (ATP) y reductor (NADPH), que son luego utilizados en la reducción y asimilación de elementos biogénicos 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). Desde un punto de vista estrictamente químico, la fotosíntesis del carbono, sobre la que se centrará este trabajo, consiste en la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua. Los procesos fotosintéticos en las plantas se llevan a cabo en el interior del cloroplasto por sistemas enzimáticos fijados a las membranas tilacoidales o localizados en la fase soluble, denominada estroma.

Tradicionalmente, los textos de bioquímica vegetal dividen la fotosíntesis en dos etapas: fase lumínica y fase oscura (Lehninger, 1988). Durante la fase lumínica, la energía luminosa es utilizada para generar energía química y poder reductor que, en la mayoría de los organismos fotosintéticos –exceptuando algunas bacterias que utilizan otras fuentes– procede de la fotólisis del agua, con el consiguiente desprendimiento de oxígeno, protones y electrones, según la siguiente reacción global.



En la fase oscura, o ciclo de Benson-Calvin, el poder reductor y la energía generados en la etapa anterior en forma de NADPH y ATP, se utilizan para la síntesis de carbohidratos, gracias a un conjunto de enzimas que se encuentran solubles en el estroma del cloroplasto.

En la fase lumínica se obtiene ATP y NADPH gracias a las enzimas y otros componentes de la membrana tilacoidal, que constituyen una cadena de transporte electrónico

Las reacciones de la fase lumínica están catalizadas por un sistema de enzimas, pigmentos y transportadores redox fijados a las membranas tilacoidales. Los componentes principales de este sistema son los fotosistemas I y II, dos complejos multiproteínicos excitables directamente por la luz solar. La reacción de fotólisis del agua se produce en el fotosistema II, gracias a una enzima denominada H_2O -deshidrogenasa, liberándose protones en el espacio tilacoidal y entrando los electrones en un proceso de transporte electrónico que va desplazando los equivalentes de reducción a través de varios componentes, según se aprecia en la figura 1.1, que reproduce el diagrama llamado “esquema Z”.

Los protones generados sirven para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, en una reacción acoplada al flujo electrónico, catalizada por la H^+ -ATP-sintetasa. De este modo se almacena en forma de enlaces energéticos parte de la energía procedente del sol.

El destino de los electrones al final de la cadena de transporte de la membrana tilacoidal, es una proteína soluble denominada ferredoxina, que contiene un núcleo con dos átomos de azufre y dos de hierro. La ferredoxina oxidada acepta dos electrones de la

cadena de transporte, reduciéndose. De este modo, el poder reductor generado gracias a la energía solar toma forma química en una proteína hidrosoluble reducida, que puede transportarlo a través del estroma hasta otras moléculas biológicas.

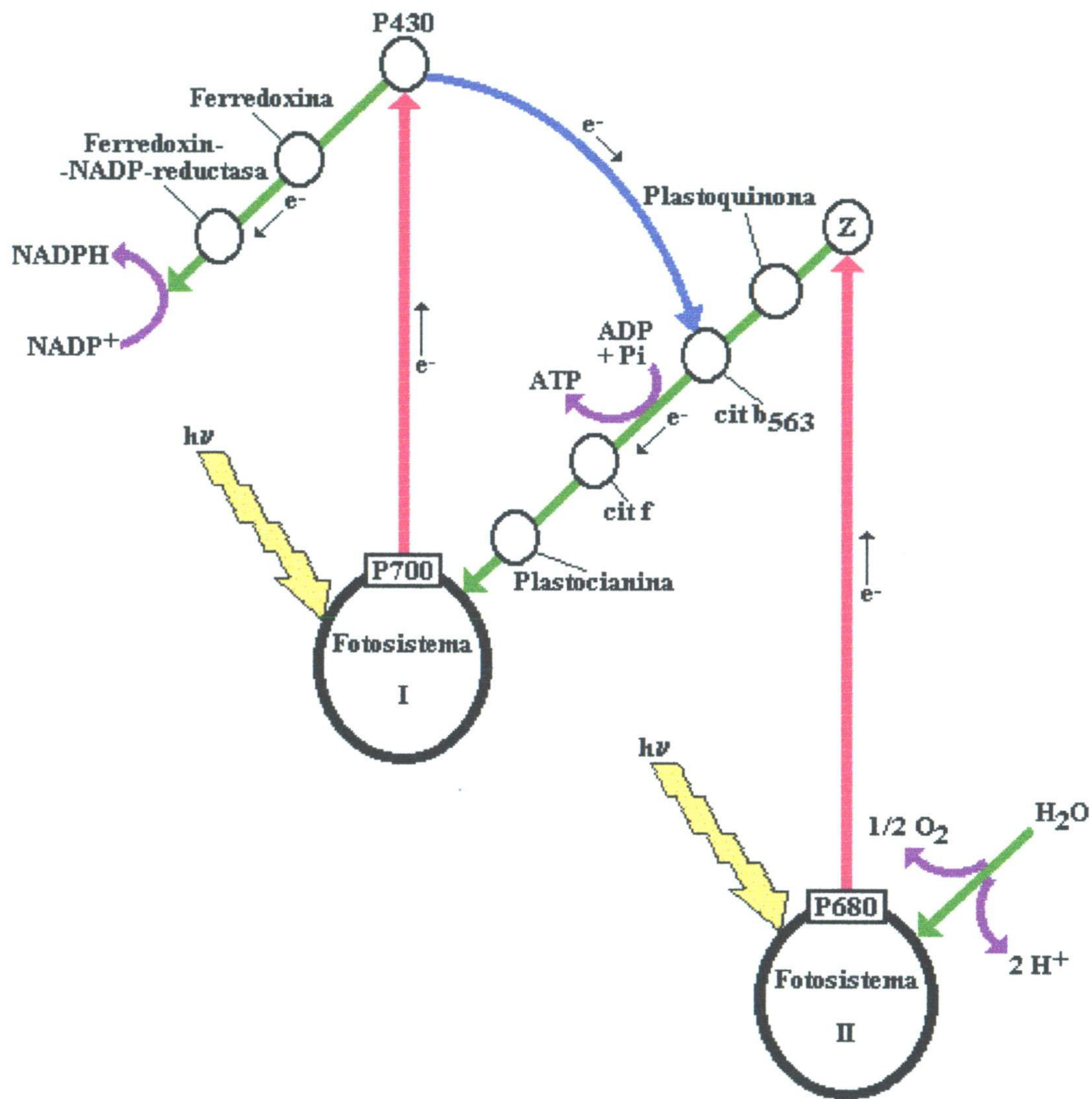


Fig. 1.1. Esquema en Z que muestra las rutas del transporte electrónico fotosintético. El eje vertical del diagrama representa energía. Los procesos de transferencia de electrones que se producen en dirección ascendente (flechas rojas) necesitan que se capture energía luminosa. Los procesos representados por flechas verdes transcurren de modo espontáneo, con una disminución de energía libre. La ruta normal de transporte no cíclico comienza en el fotosistema II y, tras una serie de transportadores de electrones, finaliza con la síntesis de NADPH. La flecha azul representa la ruta alternativa de transporte cíclico, en la cual se sintetiza ATP sin formación de NADPH. Esta ruta se sigue cuando no se dispone de $NADP^+$ para aceptar electrones de la ferredoxina. Todos los aceptores representados en la figura, hasta el P430, están fijos a la membrana tilacoidal, los tres últimos, la ferredoxina, la ferredoxin-NADP-reductasa y el NADPH son solubles en el estroma.

La mayor parte del poder reductor que llega hasta la ferredoxina se emplea en reducir a las moléculas de NADP^+ disponibles en el estroma, dando lugar a la formación de NADPH. Esto se lleva a cabo a través de la ferredoxin-NADP-reductasa. Con ello se almacena el poder reductor en una molécula reducida, que se utiliza como moneda de cambio de equivalentes de reducción en todo el metabolismo de la planta.

Sin embargo, parte de las moléculas de ferredoxina reducida, pueden ceder sus equivalentes de reducción a otros aceptores. Por ejemplo, para la síntesis de glutamato a partir de glutamina y α -cetoglutarato, o para reducir los grupos $-\text{NO}_2$ y $-\text{SO}_3\text{H}$ hasta $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$. Otro importante aceptor es la tiorredoxina, una pequeña proteína (alrededor de 12 kDa) que actúa como reductor de grupos disulfuro y cuyo estudio constituye el objeto de este trabajo. Para reducir a la tiorredoxina, la ferredoxina requiere de otra proteína estromática, la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa, una sulfoferroproteína heterodimérica de entre 20 y 35 kDa.

La fase oscura, o ciclo de Benson-Calvin, que se lleva a cabo en el estroma, permite la síntesis de carbohidratos y otros compuestos reducidos. Su regulación es crítica para el metabolismo de la planta

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

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

El ciclo se inicia con la carboxilación de la RBP con CO_2 atmosférico, reacción catalizada por la ribulosa-1,5-bisfosfato-carboxilasa-oxigenasa (RUBISCO), que es posiblemente la proteína más abundante de la biosfera. La RBP se transforma entonces en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (PGA), asimilándose así el CO_2 en forma de biomolécula. Posteriormente, el PGA 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 CO_2 hasta 0 en la DHAP, consiguiéndose así la completa reducción del carbono atmosférico para su posterior utilización en el metabolismo celular.

El ciclo se cierra mediante un conjunto de nueve reacciones (isomerizaciones, condensaciones e hidrólisis) que sirven para regenerar la RBP. Las triosas-fosfato (GAP y DHAP) pueden atravesar la membrana cloroplastídica para integrarse en el metabolismo extracloroplástico y, en particular, para la síntesis de sacarosa, o bien reaccionar en el cloroplasto para regenerar los metabolitos del ciclo asimilativo o para 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. En la figura 1.2 se representan esquemáticamente estas relaciones entre el ciclo de Benson-Calvin y las síntesis de almidón y sacarosa.

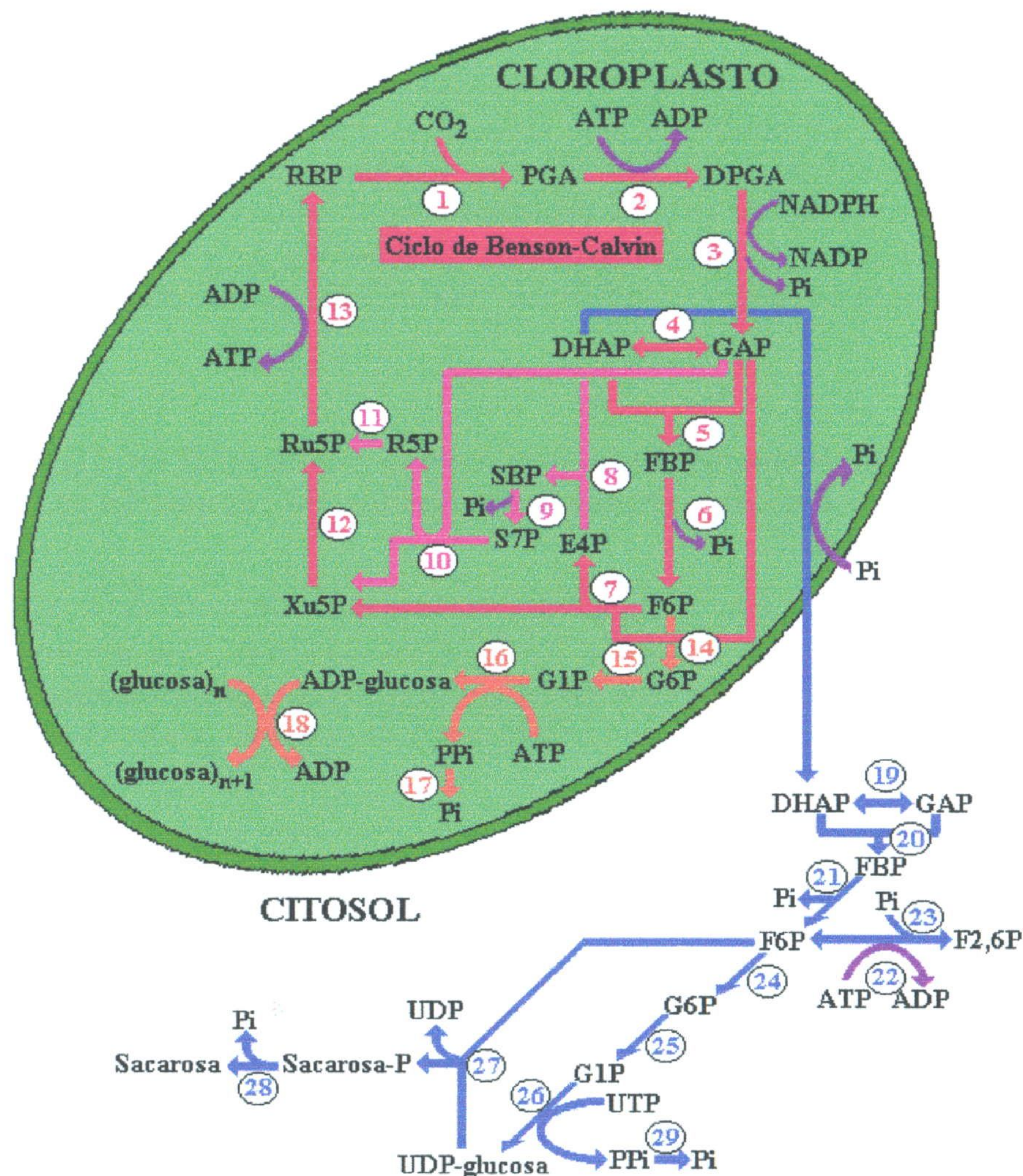


Fig. 1.2. El ciclo de Benson-Calvin (representado por las flechas rojas y rosas) y su relación con las síntesis de almidón (naranja) y sacarosa (azul). Los círculos numerados representan las distintas etapas enzimáticas: (1) RUBISCO, (2) fosfoglicerato-quinasa, (3) NADP-gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, (4) triosa-fosfato-isomerasa, (5) aldolasa, (6) fructosa-1,6-bisfosfatasa, (7) transcetolasa, (8) aldolasa, (9) sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, (10) transcetolasa, (11) fosforribosa-isomerasa, (12) ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa, (13) fosforribuloquinasa, (14) fosfoglucosa-isomerasa, (15) fosfoglucomutasa, (16) ADP-glucosa-pirofosforilasa, (17) pirofosfatasa, (18) almidón-sintetasa, (19) triosa-fosfato-isomerasa, (20) aldolasa, (21) fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica, (22) fructosa-6-fosfato-2-quinasa, (23) fructosa-2,6-bisfosfatasa, (24) fosfoglucosa-isomerasa, (25) fosfoglucomutasa, (26) UDP-glucosa-pirofosforilasa, (27) sacarosa-fosfato-sintetasa, (28) sacarosa-fosfato-fosfatasa y (29) pirofosfatasa. Las abreviaturas de los metabolitos son: RBP: ribulosa-1,5-bisfosfato; PGA: ácido 3-fosfoglicérico; DPGA: 3-fosfogliceroil-fosfato; GAP: gliceraldehído-3-fosfato; DHAP: dihidroxiacetona-fosfato; FBP: fructosa-1,6-bisfosfato, F6P: fructosa-6-fosfato; Xu5P: xilulosa-5-fosfato; Ru5P: ribulosa-5-fosfato; SBP: sedoheptulosa-1,7-bisfosfato; S7P: sedoheptulosa-7-fosfato; R5P: ribosa-5-fosfato; E4P: eritrosa-4-fosfato; G6P: glucosa-6-fosfato; G1P: glucosa-1-fosfato; F2,6P: fructosa-2,6-bisfosfato.

La regulación del ciclo de Benson-Calvin es crítica para el buen funcionamiento de la planta. Esta regulación debe coordinar las actividades de al menos 11 sistemas enzimáticos, así como los niveles de ATP y NADPH originados en la fase lumínica. Los destinos principales de los metabolitos intermedios son tres: asimilación del CO₂ atmosférico (para formar nuevas biomoléculas), síntesis de almidón (sustancia de reserva energética), o síntesis de sacarosa (utilizada como moneda de cambio energética fácilmente traslocable a los distintos órganos de la planta).

La regulación de la fase oscura de la fotosíntesis se lleva a cabo a dos niveles, estando ambos relacionados con la transición oscuridad-luz. A corto plazo actúa la fotoactivación de algunas de las enzimas del ciclo, que tiene lugar a través de la reducción hasta disulfuro de ciertos grupos ditiol claves de las enzimas previamente existentes en el cloroplasto, aunque inactivas (Buchanan, 1980). El otro nivel regulatorio es la síntesis fotoinducida de nuevas enzimas, habiéndose descrito más de 40 enzimas cuya síntesis se incrementa con la iluminación de la planta (Towin y Silverthorne, 1985). El hecho de estar regulada por la luz, requiriendo de ésta para que se lleve a cabo, hace replantearse la denominación clásica de "fase oscura" para esta etapa de la fotosíntesis.

Una enzima clave para la regulación del ciclo de Benson-Calvin es la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), que cataliza la desfosforilación de la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) hasta fructosa-6-fosfato (F6P), regulando así la concentración de ambos metabolitos en el estroma. Si la actividad de la FBPasa es baja, existirá alta concentración de FBP, por lo que la DHAP y el GAP no reaccionarán, quedando así disponibles para su exportación al citosol para la síntesis de sacarosa. Por el contrario, si la actividad FBPasa es alta, se formará un exceso de F6P, parte del cuál se transformará en G6P en el estroma, para comenzar la síntesis de almidón. Se perfila así la FBPasa como una posible enzima objetivo para la regulación del metabolismo de la planta. Controlando la actividad FBPasa, se podrá dirigir el metabolismo del vegetal en el sentido de la síntesis de sacarosa, o hacia la producción de almidón.

1.2. LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) es una enzima ubicua en los seres vivos. Las células fotosintéticas poseen dos tipos de FBPasa, una citosólica y otra cloroplastídica.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (E.C. 3.1.3.11, FBPasa) es una enzima clave del metabolismo de los glúcidos, que cataliza la hidrólisis de la fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato y fosfato inorgánico:



Es una enzima ampliamente distribuida en todos los seres vivos. Todas las FBPasas que se han estudiado precisan de Mg^{2+} como cofactor. En levaduras y tejidos animales ha sido estudiada en relación con la gluconeogénesis, donde constituye un paso de regulación clave (Krebs, 1964). En vegetales, Marre *et al.* (1965) pusieron de manifiesto la existencia de actividad FBPasa asociada a la gluconeogénesis, habiéndose observado un incremento en la actividad FBPasa en el endospermo de semillas en germinación (Thomas y Rees, 1972; Youle y Huang, 1976, Bortman *et al.*, 1981), que se ha relacionado con la movilización de la reserva lipídica.

En células fotosintéticas existen dos enzimas diferentes con actividad FBPasa, una localizada en el cloroplasto y otra en el citosol (Buchanan, 1980; Kelly *et al.*, 1982). La FBPasa citosólica (o gluconeogénica) es la que interviene en la gluconeogénesis. Está también implicada en la regulación y síntesis de sacarosa a partir de las triosas-fosfato exportadas desde el cloroplasto (fig. 1.2) (Zimmerman *et al.*, 1978; Stitt y Heldt, 1985; Khayat y Daie, 1991; Prado *et al.*, 1991). Está regulada por las alteraciones en las concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato y AMP (inhibidores), así como por el pH y las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Stitt *et al.*, 1985; Brauer *et al.*, 1990, Prado *et al.*, 1991).

La FBPasa cloroplastídica forma parte del ciclo de Benson-Calvin, donde juega un importante papel en su regulación. Su presencia ha sido descrita en bacterias fotosintéticas (Springgate y Stachow, 1972; Joint *et al.*, 1972), algas (App y Jagendorf, 1964; Moore y Tischer, 1965; Cséke *et al.*, 1981; Schmidt, 1981), líquenes (Brown y Kershaw, 1986) y plantas superiores (Racker y Schroeder, 1958; Viswanathan y Krishnan, 1962; Aiazzi y Bozzi, 1963; Satta y Sisini, 1964; Scala *et al.*, 1968; Nishizawa y Buchanan, 1981).

Las FBPasas cloroplastídicas estudiadas con mayor profundidad hasta el momento son las procedentes de hojas de espinaca y de guisante (Lázaro *et al.*, 1974; Buchanan *et al.*, 1976; Zimmerman *et al.*, 1976). Hasta fechas recientes se consideraba que la FBPasa cloroplastídica, como la mayoría de las enzimas del ciclo de Benson-Calvin, se encontraba solubilizada en el estroma. Sin embargo, existen evidencias de que las enzimas cloroplastídicas forman complejos con las membranas tilacoidales y con otros componentes del ciclo. Rodríguez-Andrés *et al.* (1987, 1990) encontraron en guisante y espinaca un porcentaje significativo de FBPasa unida a las membranas tilacoidales, dependiendo de la concentración de Mg^{2+} , K^+ o Na^+ del medio de lisis. Hermoso *et al.* (1992) han mostrado que, en hojas de espinaca, la FBPasa y la tiorredoxina f, su activador fisiológico, se localizan tanto asociadas a membranas como solubles en el estroma.

La actividad de la FBPasa cloroplastídica no está regulada por AMP, como su homóloga citosólica. Sin embargo, su actividad se ve incrementada por el aumento en el pH y en la concentración de Mg^{2+} que ocurren durante la transición oscuridad-luz en los cloroplastos iluminados. Así mismo, como otras enzimas cloroplastídicas, es activada mediante la reducción de un puente disulfuro por el sistema ferredoxina-tiorredoxina (Jacquot, 1984).

Las FBPasas son enzimas tetraméricas con cuatro subunidades idénticas. Las FBPasas cloroplastídicas poseen una secuencia reguladora expuesta al disolvente, que presenta carga negativa

Se conocen las secuencias aminoacídicas de numerosas FBPasas; entre ellas, las citosólicas de riñón de cerdo (Marcus *et al.*, 1982), hígado de cordero (Fisher y Thompson, 1983), hígado de rata (El Maghrabi *et al.*, 1988), *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Rogers *et al.*, 1988), *Escherichia coli* (Hamilton *et al.*, 1988) y *Rhodobacter sphaeroides* (Gibson *et al.*, 1990), así como las cloroplastídicas de trigo (Raines *et al.*, 1988), espinaca (Marcus y Harrsch, 1990), *Arabidopsis thaliana* (Horsnell y Raines, 1991), patata (Kossmann *et al.*, 1992), colza (Rodríguez-Suarez y Wolosiuk, 1993) y guisante (Carrasco *et al.*, 1994; Jacquot *et al.*, 1995).

Con excepción de la FBPasa cloroplastídica de espinaca, secuenciada por degradación de Edman, las estructuras primarias de las demás FBPasas cloroplastídicas se han obtenido a partir de las secuencias nucleotídicas de sus correspondientes cDNAs. De la FBPasa cloroplastídica de trigo se conoce, además, su secuencia nucleotídica genómica (Lloyd *et al.*, 1991), lo que ha permitido detectar la presencia de tres intrones, uno de ellos localizado en la región codificante de la secuencia reguladora por la luz, así como definir regiones promotoras implicadas en la expresión de órgano.

Cuando se comparan las estructuras primarias de las FBPasas fotosintéticas y citosólicas, deducidas a partir de los correspondientes cDNAs, se comprueba que las primeras poseen entre 50 y 60 aminoácidos en el extremo amino que presentan baja homología, que corresponden al péptido de tránsito para su importación en el cloroplasto, pues todas son de codificación nuclear. Se puede comprobar que, aunque existen regiones muy conservadas entre unas y otras, destacando la que se sitúa en torno a Lys-299 (numeración según Carrasco *et al.*, 1994), relacionada con el centro activo de la enzima (Sahrawy *et al.*, 1995), el grado de homología entre las FBPasas fotosintéticas y las citosólicas no supera el 50%.

Las FBPasas cloroplastídicas maduras (excluyendo el péptido de tránsito) poseen un tamaño que oscila entre los 356 aminoácidos de la enzima de patata y los 359 de la de *Arabidopsis*. La homología entre ellas es del orden del 80%, destacando la presencia de siete cisteínas en posiciones muy conservadas (Carrasco *et al.*, 1994). Marcus *et al.* (1988) identificaron una región constituida por dos cisteínas, separadas por cuatro aminoácidos que está presente en todas las enzimas moduladas por la luz. Hermoso *et al.* (1995) y Sahrawy *et al.* (1997) demostraron la presencia de una zona rica en aminoácidos cargados negativamente y extremadamente accesible, denominada "bucle-170", implicada en la interacción con la tiorredoxina y que está ausente en las FBPasas citosólicas (fig. 1.3).

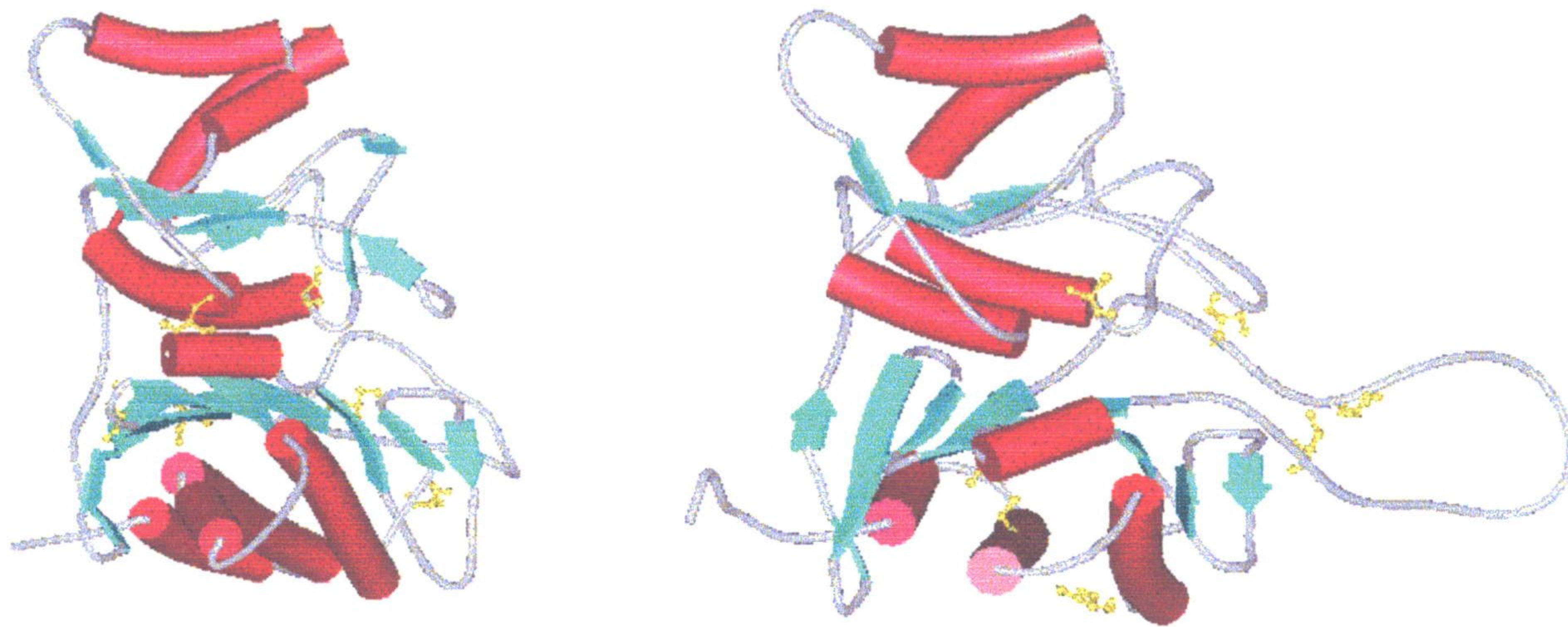


Fig. 1.3. Estructura terciaria de la subunidad de la FBPasa humana (izquierda) y cloroplastica de espinaca (derecha); datos cristalograficos de Zhang *et al.* (1995) y Villeret *et al.* (1993), respectivamente. Se representan en rojo las hélices- α y en celeste las estructuras en lámina- β . En amarillo se muestran las cisteínas. Se observa a la derecha el bucle 170, que constituye la zona reguladora de interacción con la tioredoxina, totalmente accesible en la FBPasa de espinaca (cloroplastica) e inexistente en la humana (así como en todas las FBPasas citosolicas).

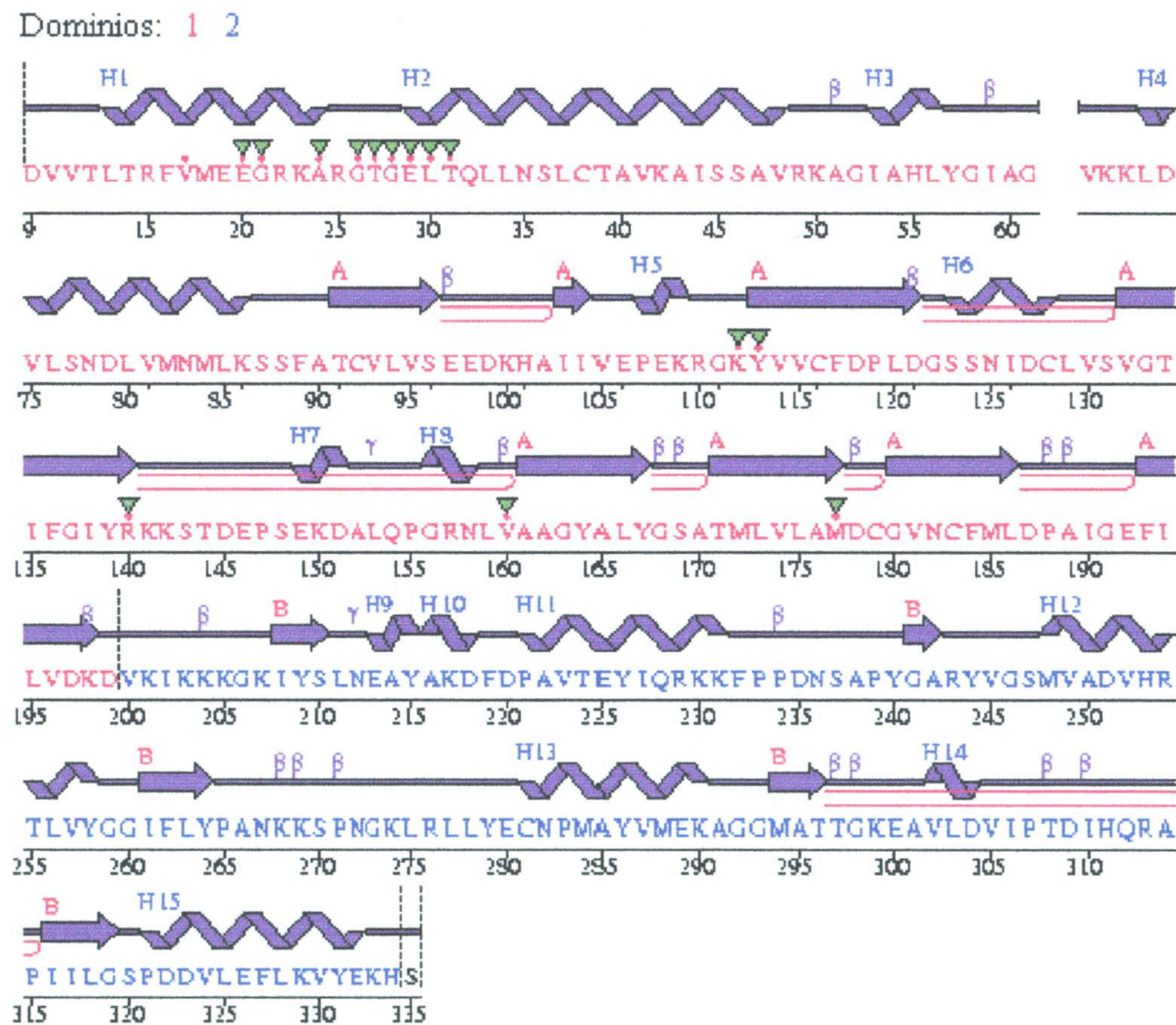


Fig. 1.4. Estructura secundaria de la FBPasa humana (Zhang *et al.*, 1995).

A nivel de estructura tridimensional sólo se han cristalizado las FBPasas de hígado humano (Zhang *et al.*, 1995), de riñón de cerdo (Ke *et al.*, 1989) y la cloroplastídica de espinaca (Villeret *et al.*, 1995). En todos los casos la enzima está constituida por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuáles consta de 8 a 15 hélices- α y de 12 a 13 estructuras β . Las estructuras secundarias pueden observarse en las figuras 1.4 y 1.5.

Cada subunidad del tetrámero está organizada en dos dominios. El primero, compuesto por una capa de cuatro grandes hélices- α , seguida por una lámina- β , se denomina dominio AMP, ya que es donde este ligando se une en el caso de las FBPasas citosólicas (en el caso de las cloroplastídicas, no existe interacción con AMP). El segundo está formado por un "sandwich" de una lámina- β entre dos grupos de hélices- α y se denomina dominio FBP, ya que a él se une el sustrato, la fructosa-1,6-bisfosfato. En las FBPasas cloroplastídicas el bucle-170, o zona reguladora, se localiza en medio del dominio AMP.

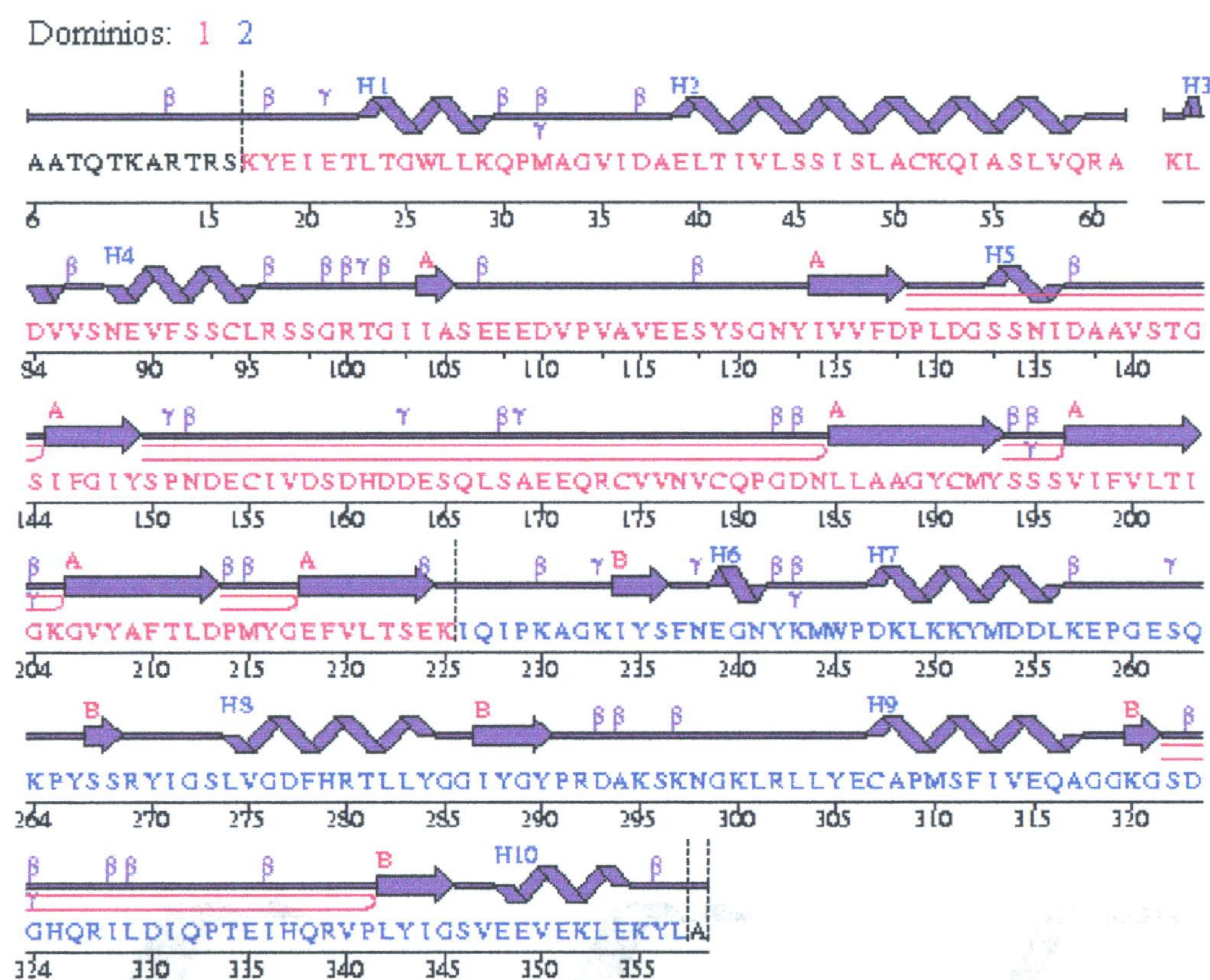


Fig. 1.5. Estructura secundaria de la FBPasa cloroplastídica de espinaca (Villeret *et al.*, 1995). Obsérvese el bucle-170, entre los aminoácidos 150 y 185, aproximadamente.

Un aspecto interesante es conocer la localización de las cisteínas implicadas en la activación mediante tiorredoxina. Los primeros estudios (Li *et al.*, 1994) concluyeron que el puente disulfuro que se rompía en el paso de la forma inactiva a la activada era el localizado entre las cisteínas 173 y 178. Sin embargo, López-Jaramillo y colaboradores (Jacquot *et al.*, 1997) demostraron, mediante estudios de mutagénesis dirigida, que dicho puente es el que se encuentra entre las cisteínas 153 y 173, o bien entre las 153 y 178. Todas ellas están localizadas en el "bucle 170", que adopta una estructura muy flexible. La ruptura de este puente disulfuro provoca un cambio conformacional que activa a la enzima.

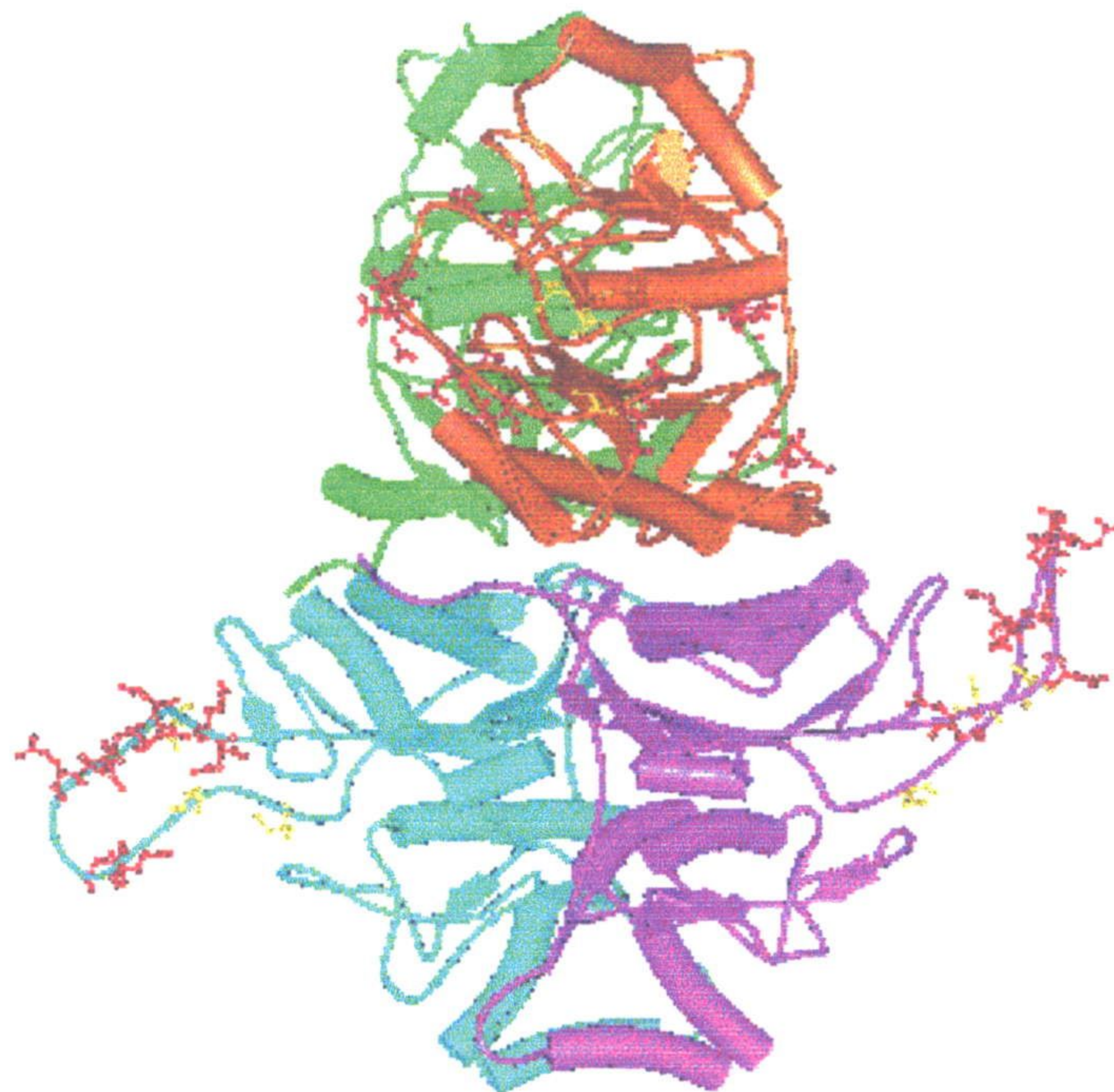


Fig. 1.6. Estructura cuaternaria tetramérica de la FBPasa cloroplastídica de espinaca. Se representa cada monómero de un color diferente. En los “bucles 170”, se han representado las tres cisteínas (en amarillo), así como los aminoácidos cargados negativamente (en rojo).

Ke *et al.* (1990a, 1990b, 1991a) pusieron de manifiesto que la forma tetramérica de la FBPasa citosólica de riñón de cerdo presenta dos conformaciones alostéricas, la forma T, de baja actividad, que se obtiene cuando la enzima está unida a su inhibidor, AMP y la forma R, en la cuál la FBPasa es altamente activa, que está favorecida por la presencia de sustrato, FBP. Ambas formas se caracterizan por el ángulo de rotación del dímero formado por las dos subunidades superiores respecto al dímero inferior (figura 1.7). En la forma R, ambos dímeros están prácticamente en el mismo plano, mientras que en la forma T aparecen rotados, respecto de la anterior, en un ángulo de unos 15°.

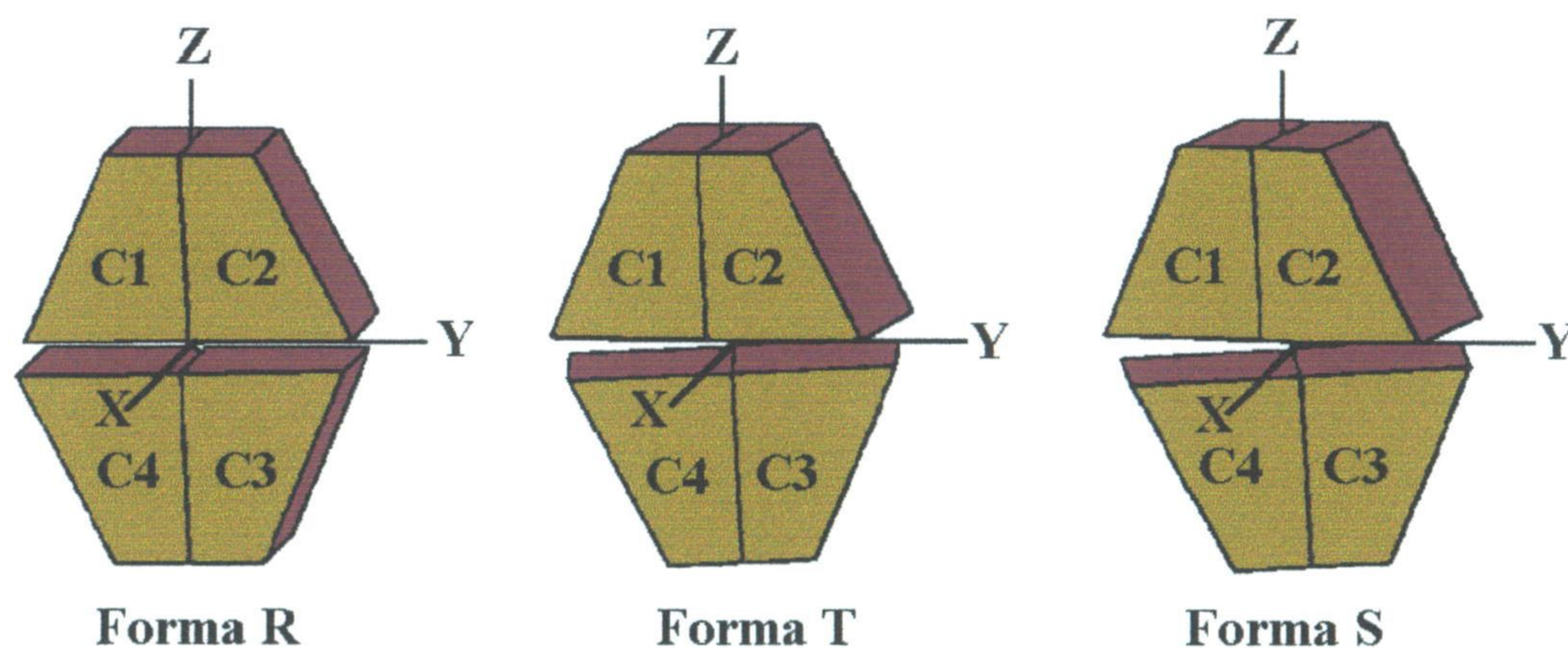


Fig. 1.7. Representación esquemática de las formas alostéricas R, T y S del tetrámero de FBPasa, ilustrando los ángulos de rotación de 15° y 20° respecto de la forma R de las formas T y S, respectivamente.

Villeret *et al.* (1995) demostraron que la FBPasa cloroplastídica de espinaca cristaliza en una forma que presenta una rotación aún mayor que la de la forma T, a la que denominaron forma S. La diferencia en el ángulo de rotación con la forma R de la FBPasa de cerdo es de unos 20°. Se supone que el cambio de conformación que activa a la enzima está favorecido por los factores capaces de activar a la FBPasa cloroplastídica: reducción de puentes disulfuro por la tiorredoxina, cambios de pH y concentración de Mg^{2+} , Ca^{2+} y FBP.

La FBPasa cloroplastídica se activa mediante la reducción de un puente disulfuro, pero también es activable mediante cambios en la concentración de diversos iones y metabolitos

Como ya hemos visto, la regulación de la actividad de la FBPasa cloroplastídica es clave para el funcionamiento de todo el metabolismo de la planta.

Como otras enzimas del ciclo de Benson-Calvin, la FBPasa presenta el fenómeno de histéresis (Herting y Wolosiuk, 1983), que consiste en la existencia de dos formas de propiedades cinéticas diferentes (activa e inactiva), cuya velocidad de interconversión es lenta comparada con la velocidad de catálisis. Este hecho justifica la necesidad de separar el estudio de ambos procesos, modulación y catálisis, para poder determinar si una sustancia activa o desactiva la transición de la enzima entre sus dos formas, y si activa o inhibe la catálisis. Ello se lleva a cabo mediante un ensayo en dos pasos, de manera que la determinación de la catálisis vaya precedida por la incubación de la FBPasa con los moduladores.

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

En cuanto a la modulación dependiente de iones y metabolitos, hay que decir que la luz induce una transferencia de H^+ del estroma al espacio tilacoidal, que va acompañada de la transferencia de Cl^- y Mg^{2+} en dirección contraria. Paralelamente, el Ca^{2+} cloroplastídico aumenta en el cloroplasto iluminado, al ser importado en éste desde el citoplasma. Estos son los iones que podrían intervenir a nivel fisiológico en la activación de la FBPasa en la transición oscuridad-luz. Kreimer *et al.* (1988) comprobaron que la activación de la FBPasa es paralela a la entrada de Ca^{2+} en el cloroplasto durante los dos primeros minutos de iluminación; sin embargo, *in vivo*, el efecto modulador del Ca^{2+} debe estar separado temporal y espacialmente del proceso de catálisis, puesto que *in vitro* se ha demostrado que el Ca^{2+} es un inhibidor de éste (Herting y Wolosiuk, 1983).

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

In vitro la FBPasa tetramérica es estable a pH ácido y neutro, disociándose parcialmente en dos subunidades diméricas a pH alcalino (Lázaro *et al.*, 1974), perdiendo la mayor parte de su actividad. El pH del cloroplasto iluminado, en el cual la enzima es activa, es básico; el mantenimiento *in vivo* de la forma activa se debe a la presencia de fructosa-1,6-bisfosfato y Ca^{2+} , que actúan como protectores. Cuando se preincuba *in vitro* la enzima con estos metabolitos, se previene la disociación a pH básico (Ballicora y Wolosiuk, 1990).

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

Este último resultado sirvió para respaldar la antigua hipótesis de que la forma dimérica de la FBPasa era la responsable de la actividad sedoheptulosa-1,6-bisfosfatasa del ciclo de Calvin (Buchanan *et al.*, 1976). Esta pretendida falta de especificidad para el sustrato es actualmente rechazada por la mayor parte de los investigadores, al haberse caracterizado una sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa específica para la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato, tanto en algas (Hahn y Kück, 1994) como en plantas superiores (Raines *et al.*, 1992), estructuralmente relacionada con la FBPasa.

Más importante desde el punto de vista fisiológico es la activación de la FBPasa por las tiorredoxinas del cloroplasto. Esta activación fue puesta de manifiesto por primera vez por Wolosiuk y Buchanan (1976). La modulación por tiorredoxina no es independiente de la modulación por iones y metabolitos anteriormente descrita, sino que ambos factores actúan de modo sinérgico. Herting y Wolosiuk (1983) pusieron de manifiesto que la presencia de azúcares-bisfosfato y cationes bivalentes disminuye en 50 veces la concentración de tiorredoxina necesaria para alcanzar la máxima estimulación de la actividad.

Además, la presencia de Ca^{2+} y fructosa-1,6-bisfosfato permite que la tiorredoxina sea capaz de activar a la FBPasa *in vitro* (Schürmann *et al.*, 1985), cuestión que, como veremos más adelante, no es tan simple como estos autores apuntan, sino que depende de factores de especificidad, tanto de la enzima como del modulador tiorredoxina (López-Jaramillo *et al.*, 1997; Reche *et al.*, 1997).

1.3. LAS TIORREDOXINAS

Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas ubicuas que intervienen en multitud de procesos celulares, fundamentalmente de tipo redox

Las tiorredoxinas (Trxs) son transportadores de hidrógeno y electrones de naturaleza protéica, con una masa molecular en torno a los 12 kDa, que fueron aisladas por primera vez –con distinto nombre- en estudios sobre el sistema reductor del sulfato y sulfóxido en levaduras. Su denominación –que alude a su carácter redox vinculado a la presencia de grupos tiólicos- se debe a Peter Reichard, del departamento de química del Instituto Karolinska de Estocolmo, quien puso de manifiesto su papel en la síntesis de ADN a través de la reducción de ribonucleótidos a sus correspondientes desoxirribonucleótidos, unidades fundamentales para sintetizar el ADN (Laurent *et al.*, 1964).

Las tiorredoxinas se encuentran presentes en todos los organismos vivos (excepto quizás en los Arqueones, como se discutirá más adelante en este trabajo). Todas ellas muestran sorprendentes analogías, lo que explica la existencia de frecuentes reacciones cruzadas entre las mismas. Todas las Trxs cuya estructura ha sido elucidada hasta la fecha poseen igual conformación espacial o *folding* (que, de hecho, recibe el nombre de *folding* de tiorredoxina), así como un centro de reacción de secuencia –WCGPC- altamente conservada. Entre las dos cisteínas del centro de reacción se localiza –en la forma oxidada- un puente disulfuro altamente reactivo, que se transforma en dos grupos tiólicos en la forma reducida.

Se ha demostrado que las Trxs participan en multitud de fenómenos, la mayoría de ellos relacionados con su capacidad reductora (para una revisión, véase Holmgren, 1985). Entre los primeros en ser descritos se hayan: reducción de ribonucleótidos por la ribonucleótido-reductasa (Moore *et al.*, 1964), reducción de sulfóxidos (González-Porqué, 1970), asimilación de nitrógeno (Smith, 1981; Florencio *et al.*, 1993), reducción de sulfatos (Cooper, 1983), degradación de la insulina (Holmgren, 1985), coagulación sanguínea (Blömbäck *et al.*, 1986), activación de la 5'-monodesyodinasa hepática (Goswami *et al.*, 1987), reducción de la α_2 -macroglobulina (Larsson *et al.*, 1988), defensa frente a radicales libres (Schallreuter *et al.*, 1989) y reducción de la gonadotropina coriónica humana (Holmgren, 1989).

Aparte de su capacidad reductora, las tiorredoxinas pueden también tener un papel estructural en la formación de algunos complejos multiproteicos. Así, se ha demostrado que la Trx de *E. coli* es necesaria para la replicación del fago T7, ya que constituye una unidad esencial de la ADN-polimerasa viral (Nossal, 1983). También es requerida para la replicación de los fagos filamentosos M13 y f1 (Russel y Model, 1985). En ambos casos experimentos de mutagénesis dirigida demostraron que el centro regulador de la Trx no es necesario para cumplir su función estructural. También se ha identificado a la tiorredoxina humana en la estructura del receptor de los glucocorticoides que se unen a esteroides (Grippo *et al.*, 1983).

En los últimos tiempos se ha encontrado una profunda implicación de la Trx en el sistema inmunitario humano. Así, Wollman *et al.* (1988) demostraron que puede actuar como una linfoquina y Buchanan *et al.* (1997) demostraron su implicación en la respuesta alérgica frente al trigo. Se ha encontrado que en pacientes afectados con HIV los niveles de Trx en plasma son anormalmente elevados (Nakamura *et al.*, 1995) y que puede inhibir la replicación del HIV en cultivos de macrófagos (Newman *et al.*, 1994).

Además, se ha descubierto que las Trxs regulan la transcripción de algunos genes implicados en la respuesta inmunitaria, activando a determinados factores de transcripción, ya sea reduciendo directamente un puente disulfuro de éstos, como en el caso de NFκB, TFIIIC o BZLF1 (Cromlish y Roeder, 1989; Bannister *et al.*, 1991; Matthews *et al.*, 1992) o a través de una proteína intermediaria, como Ref1, que tras ser reducida por la Trx es capaz de activar al factor AP-1 (Abate *et al.*, 1990).

Recientemente se ha puesto de manifiesto que las tiorredoxinas pueden también actuar como activadores de la traducción de algunos ARNm cloroplastídicos. Esta función se realiza a través de la activación de factores de traducción regulados mediante la reducción de enlaces disulfuro (Danon y Mayfield, 1994; Levings y Siedow, 1995), y tiene como consecuencia el aumento de la expresión de ciertas proteínas codificadas por el genoma cloroplastídico durante la transición oscuridad-luz.

Una de las funciones más estudiada de las Trxs, y la que más nos interesa para este trabajo de investigación, es la fotoactivación de enzimas cloroplastídicas. En plantas existen tres tipos de Trxs, dos de ellas cloroplastídicas (Trxs f y m) y una tercera citosólica (Trx h). Entre ellas existe escasa homología de secuencias (a excepción del centro regulador), indicando sus diferentes historias evolutivas. En la sección 1.4 se estudiarán los aspectos más interesantes de estas proteínas vegetales.

La estructura tridimensional de las tiorredoxinas está altamente conservada.

Se conocen las secuencias de alrededor de 200 tiorredoxinas procedentes de los más variados organismos. Sin embargo, la más estudiada es la de *E. coli* (Lauren *et al.*, 1964; Holmgren, 1968; Höög *et al.*, 1984;). Su secuencia consta de 108 aminoácidos con una masa molecular de 11.700 Da. Es una proteína soluble, cuyo punto isoeléctrico es 4.5. Es sorprendentemente termoestable, lo cuál facilita su purificación. A pH inferior a 4.5 la Trx de *E. coli* se dimeriza parcialmente de forma reversible, proceso cuyo significado fisiológico es dudoso. Las dos únicas cisteínas, 32 y 35 forman un puente disulfuro en la forma oxidada (un anillo de 14 átomos). La forma reducida, tiorredoxina-(SH)₂, puede obtenerse mediante NADPH y tiorredoxin-reductasa, o mediante DTT, incluso a concentraciones relativamente bajas. Esta forma reducida es estable en presencia de EDTA y bajo atmósfera de N₂, pero se oxida al aire a pH neutro y, más rápidamente, a pHs ácidos.

La forma oxidada de la Trx de *E. coli* fue cristalizada en 1970 (Holmgren y Söderberg, 1970) y su estructura fue resuelta a 2.8 Å. Consta de una lámina β formada por cinco hojas, tres paralelas y dos antiparalelas, rodeada por cuatro hélices α (figura 1.8). El centro activo, con la secuencia WCGPC, se localiza al principio de la hélice α-2, muy expuesto al medio. La Trx fue el primer ejemplo de proteína cuyo centro activo se localiza en una protrusión, en lugar de en una hendidura, por lo que ha sido calificada como proteína “macho” (Jacquot *et al.*, 1997).

Ya que todas las Trxs cuya estructura ha sido resuelta hasta ahora poseen una conformación espacial semejante (a pesar de presentar sólo entre el 26 y el 67% de identidad), dicha estructura formada por las cuatro hélices α y la lámina de 5 hojas β ha sido llamado “folding de tiorredoxina”. La estructura secundaria de la Trx de *E. coli* se representa en la figura 1.9.

En la estructura llama la atención la gran cantidad de residuos hidrofóbicos que rodean el centro activo, así como la presencia de algunos aminoácidos cargados en posiciones conservadas en la secuencia de numerosas tiorredoxinas (figura 1.9). Se ha sugerido que estas características están implicadas en la interacción de la tiorredoxina con otras proteínas, como se estudiará en la sección 1.5.

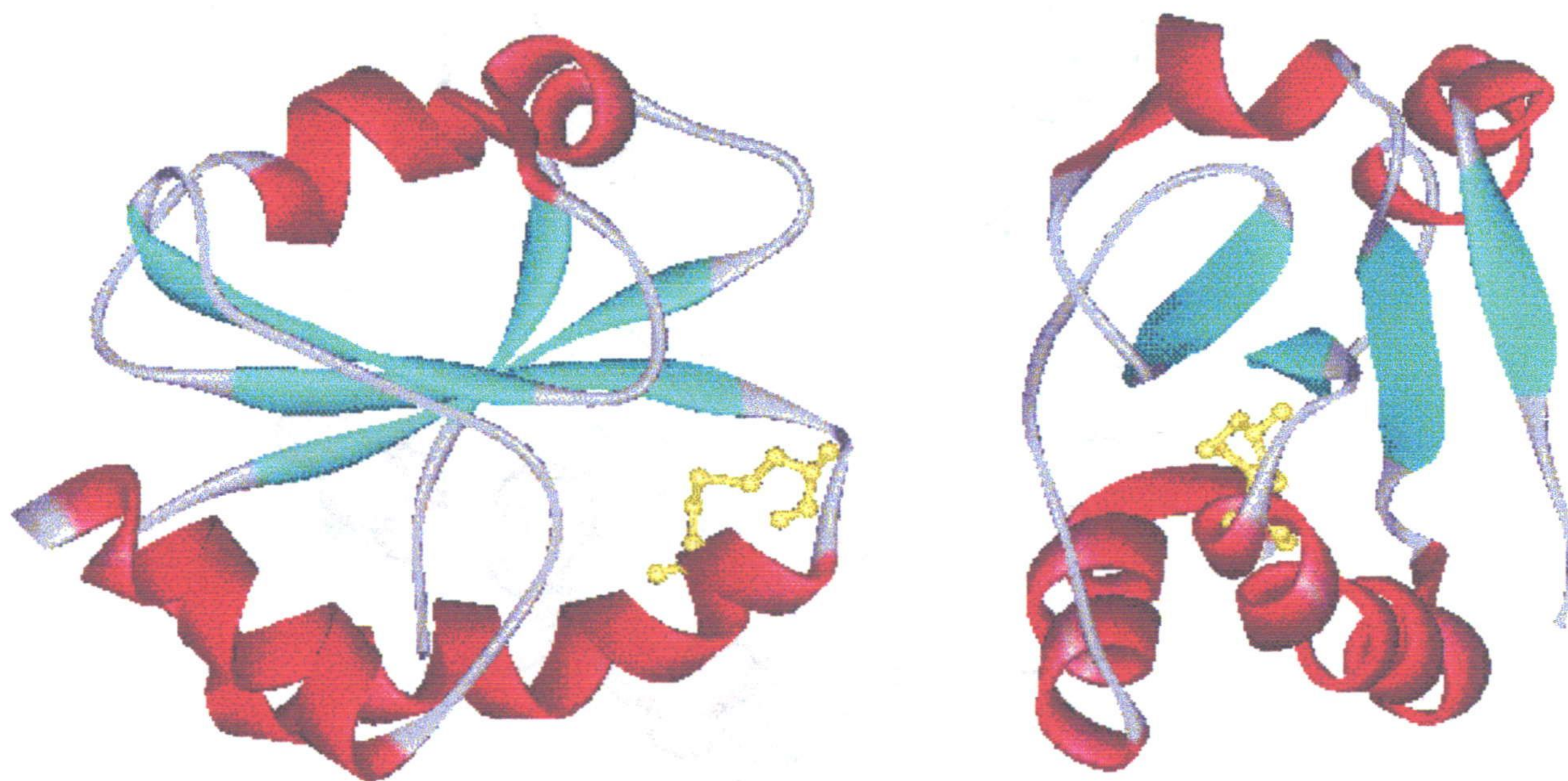


Figura 1.8. Estructura terciaria de la tiorredoxina de *E. coli*, en dos orientaciones distintas. Se muestran en rojo las hélices α y en celeste las estructuras en lámina β ; en amarillo están representadas las dos cisteínas del centro activo. A la derecha, la orientación es la misma que en la figura 1.10.

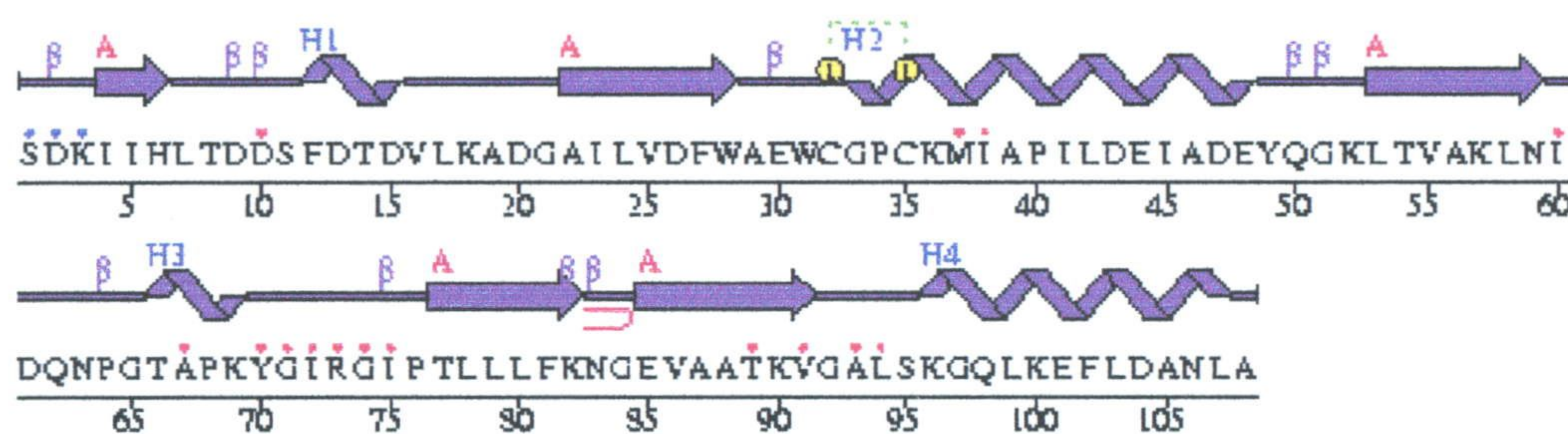


Fig. 1.9. Estructura secundaria de la tiorredoxina de *E. coli*.

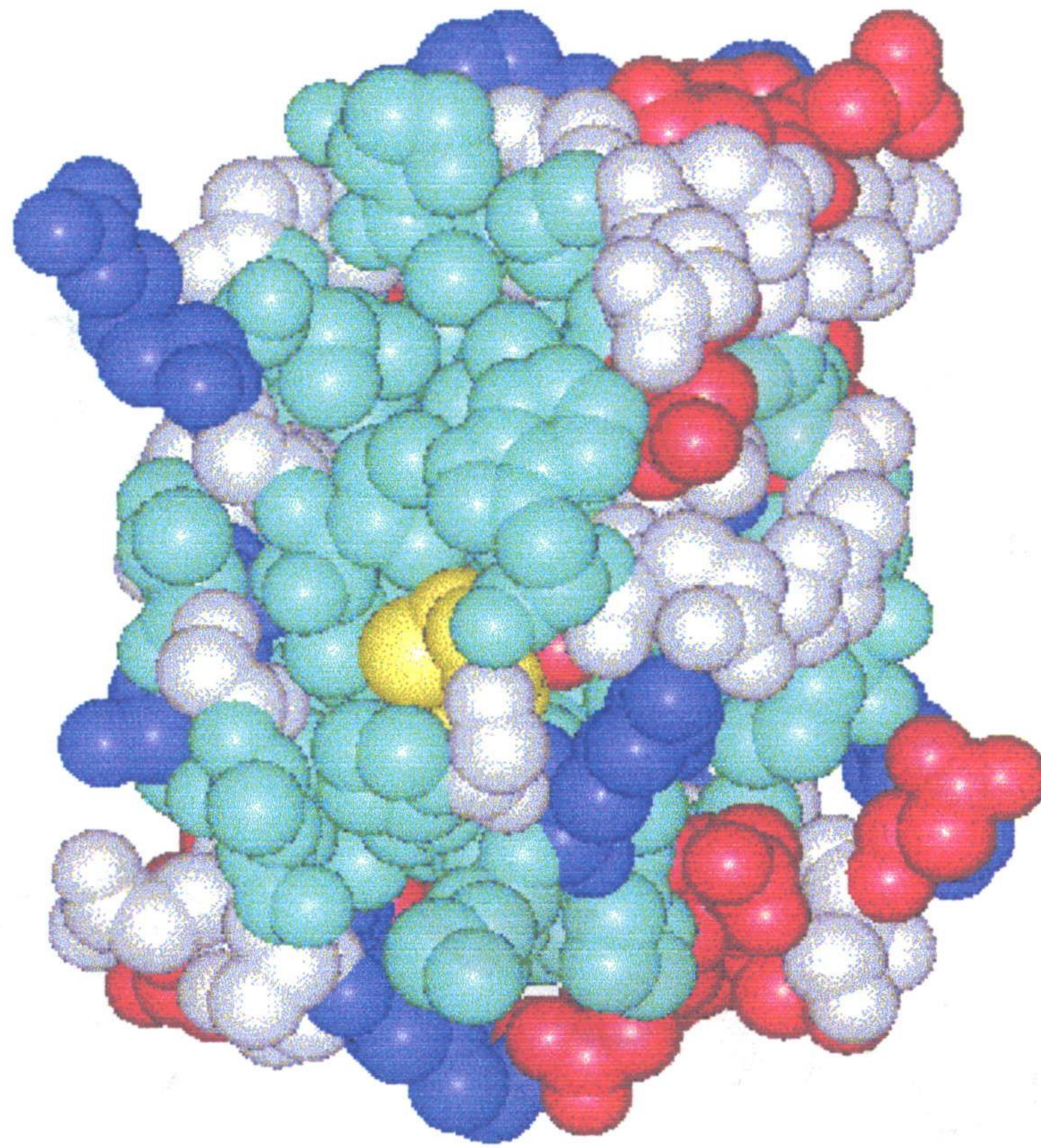


Figura 1.10. Modelo espacial de la Trx de *E. coli*, vista desde la cara que rodea al centro activo (en amarillo). Se muestran en rojo los aminoácidos ácidos, en azul los básicos y en celeste los hidrófobos. Nótese la gran cantidad de hidrófobos rodeando al centro activo. Datos cristalográficos de Holmgren y Söderberg, 1970.

Las estructuras de otras Trxs han sido resueltas mediante difracción por rayos X o RMN. En cuanto a las primeras, han sido cristalizadas y elucidadas la de la Trx del bacteriófago T4 (Söderberg *et al.*, 1978) y la de la Trx humana (Weichsel *et al.*, 1996). Las Trxs f y m de espinaca han sido cristalizadas (Genovesio-Taverne *et al.*, 1991; Lancelin *et al.*, sin publicar), pero sus coordenadas atómicas no han sido publicadas.

Las Trxs son proteínas especialmente indicadas para ser estudiadas por RMN, ya que cumplen los requisitos de pequeño tamaño, alta estabilidad, facilidad de obtención y purificación (recomendable a la hora de obtener proteínas marcadas con ^{15}N y ^{13}C), alta solubilidad y resistencia a pHs ácidos. De hecho, fue una de las primeras proteínas en ser estudiada mediante RMN. Con la Trx de *E. coli* se consiguieron resultados en fecha tan temprana como 1976 (Holmgren y Roberts, 1976). Mediante RMN, además de las formas oxidada y reducida de *E. coli*, se ha estudiado la Trx humana, tanto en forma libre (Forman-Kay *et al.*, 1991), como acompañada con ciertos péptidos a los cuáles se une (Qin *et al.*, 1995 y 1996), así como la Trx h del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Mittard *et al.*, 1995 y 1997). Además, han sido elucidadas mediante este método las estructuras de otras proteínas relacionadas, como la glutarredoxina de *E. coli* (Xia *et al.*, 1992) y el dominio N-terminal de la proteína-disulfuro-isomerasa humana (Kemink *et al.*, 1996), una proteína compuesta por la unión de dos dominios semejantes a tiorredoxinas, que se encuentra tan sólo en animales.

Todas las estructuras estudiadas muestran una gran semejanza en cuanto a estructura terciaria, que conserva su *fold*ing característico. Ello es útil a la hora de calcular teóricamente, mediante modelización molecular sobre los datos conocidos, las estructuras de otras tiorredoxinas que no han sido aún estudiadas. Se presupone que los modelos así obtenidos serán una buena aproximación a la estructura real.

La estructura tridimensional de la Trx humana cristalizada muestra un notable fenómeno. La forma oxidada es un dímero en el cuál las dos subunidades están unidas por un puente disulfuro intermolecular que implica a la cisteína-73 (fig. 1.11). En este punto hay que indicar que la Trx humana, además de las dos cisteínas del centro activo, exhibe tres cisteínas adicionales, 62, 69 y 73. Las dos primeras se encuentran formando un puente disulfuro intramolecular. Incluso cuando se sustituye la cisteína-73 por serina, el mutante resultante también cristaliza en forma de dímero, estando las dos serinas-73 unidas en este caso mediante un puente de hidrógeno, demostrándose así que la condición dimérica es robusta (Weichsel *et al.*, 1996). Se ha sugerido que este dímero podría actuar como forma reguladora de la actividad tiorredoxina, ya que el centro activo queda en la cara interior de la interfase entre subunidades, incapaz de interactuar con otras proteínas. Al reducirse la molécula, se liberarían las dos subunidades en su forma activa, listas para reducir a otras proteínas.

No obstante, estudios más recientes mediante ultracentrifugación analítica y RMN (Gronenborn *et al.*, 1999) indican que, en disolución, la Trx humana mantiene la forma monomérica en un amplio rango de condiciones experimentales. El posible papel fisiológico de la dimerización de la tiorredoxina humana es en la actualidad, por tanto, motivo de controversia.

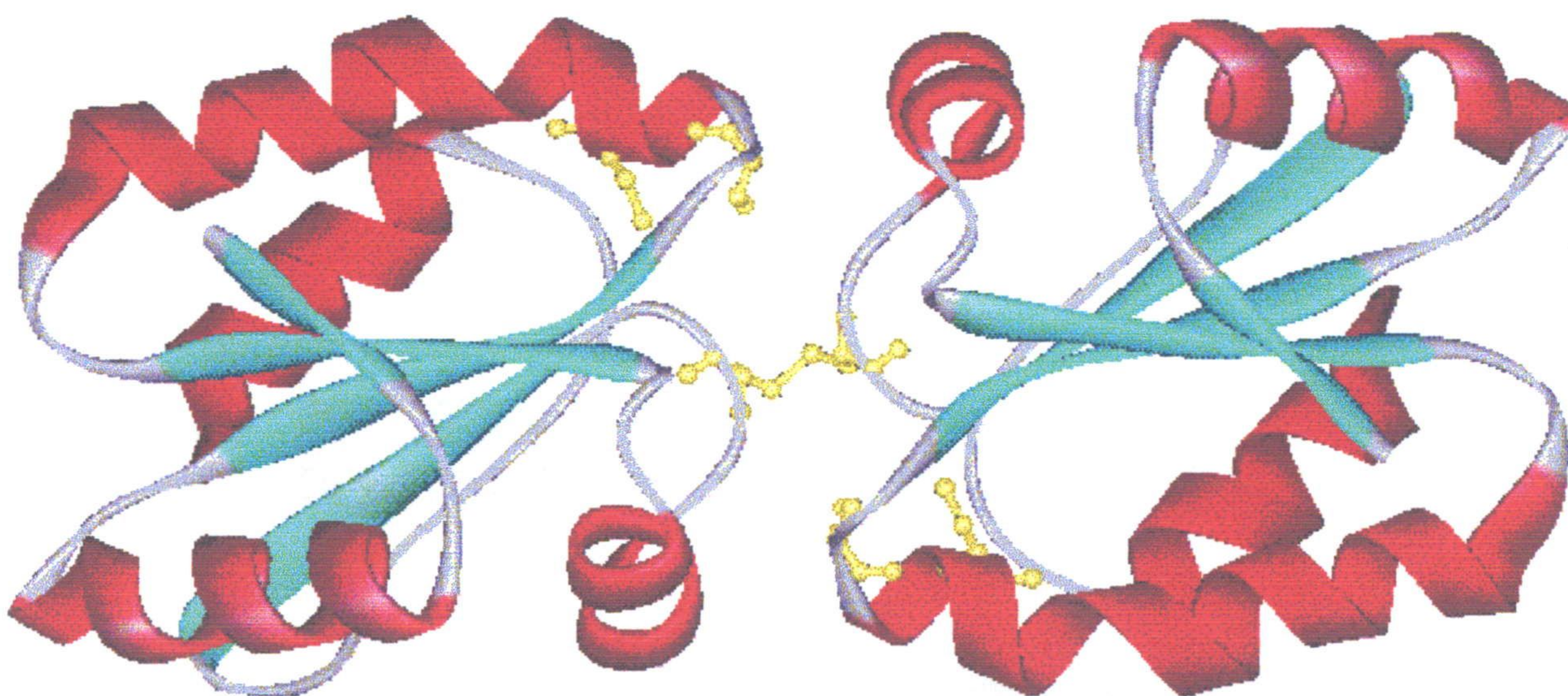


Fig. 1.11. La forma dimerica de la Trx humana oxidada cristalina. Se representan en **amarillo** las cisteínas del centro activo y las que forman el puente disulfuro intermolecular. Esta estructura es también estable cuando se mutan las dos cisteínas intermoleculares por serina, por lo que la interacción entre los dos monómeros es robusta e implica, además del puente disulfuro, a otros tipos de fuerzas intermoleculares. Datos cristalográficos de Weichsel *et al.*, 1996.

1.4. LAS TIORREDOXINAS DEL CLOROPLASTO

En el cloroplasto se localizan dos tiorredoxinas muy diferentes: la tiorredoxina m, de origen bacteriano y la tiorredoxina f, de origen eucariótico

En todas las células vegetales se pueden encontrar tres tipos de Trxs, denominadas h, m y f. La Trx h carece de péptido de tránsito, por lo que se localiza en el citosol. Ha sido identificada como una de las proteínas mayoritarias en la savia del floema (Ishiwatari *et al.*, 1995). Presuntamente, entre otras funciones reguladoras del metabolismo no fotosintético, puede actuar transmitiendo información y poder reductor entre los distintos órganos de la planta. Las plantas poseen varias isoformas de Trx h. Hasta cinco han sido descritas en *Arabidopsis thaliana* (Rivera-Madrid *et al.*, 1995), comprobándose además la expresión de todas ellas a nivel de ARN_m. Las posibles funciones de las Trxs h constituyen hoy día un interesante campo de investigación.

Las otras dos tiorredoxinas vegetales (m y f) se localizan en el cloroplasto, aunque ambas son de codificación nuclear. Sus secuencias de aminoácidos son sorprendentemente diferentes, excepto en su centro activo (-WCGPC-). Para guisante, la identidad entre las Trxs m y f es tan sólo de un 23%, y de un 29% para espinaca.

Las diferencias en sus secuencias (fig. 1.12) se reflejan en su distinta reactividad (Jacquot *et al.*, 1997). La Trx f posee una alta afinidad para activar diversas enzimas cloroplastídicas pertenecientes al ciclo de Benson-Calvin, tales como fructosa-1,6-bisfosfatasa, sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, fosforribuloquinasa y NADP-gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa. La Trx m, en cambio, activa a la NADP-malato-deshidrogenasa (una enzima auxiliar del cloroplasto, crucial para las plantas C₄) y desactiva a la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (enzima del catabolismo cloroplastídico de los glúcidos, o ruta oxidativa de las pentosas-fosfato). Ambas parecen ser eficientes en la activación de la CF₁-ATP-sintetasa, la enzima que forma ATP en la membrana tilacoidal. A pesar de las diferencias cuantitativas en cuanto a capacidad de activación, sin embargo, *in vitro* se dan diferentes reacciones cruzadas (López-Jaramillo *et al.*, 1997). Así, la Trx m de guisante a altas concentraciones es capaz de activar a la FBPasa (no ocurre así con la m de espinaca), y la Trx f es capaz de activar a la malato-deshidrogenasa hasta valores incluso más altos que los logrados con la Trx m (Geck *et al.*, 1996).



Fig. 1.12. Alineamiento de las tiorredoxinas m y f de guisante. Se muestran en **violeta** los restos idénticos y en **rosa** los conservativos cargados. Se aprecia, dentro de la baja identidad general, exceptuando el centro activo, una mucha mayor conservación de los aminoácidos cargados.

Las diferencias entre las Trxs m y f se ponen de manifiesto si comparamos la distribución de los aminoácidos cargados, que se muestra en la tabla 1.1. El pI de la Trx m se aproxima al de la proteína de *E. coli*, mientras que la Trx f es mucho más básica, lo que hace que mantenga una carga neta positiva en un amplio intervalo de pH, incluido el pH básico que se observa en el cloroplasto iluminado. Así mismo, la estabilidad térmica de ambas proteínas es muy distinta, siendo la Trx f mucho menos estable que la m (López-Jaramillo, 1995). Hay que indicar que la estabilidad de las Trxs radica en el lado amino, de carácter ácido, respecto al centro activo, como lo prueba el hecho de la alta estabilidad del híbrido Trx m/f, frente a la baja del Trx f/m (López-Jaramillo et al., 1998). Además, una importante diferencia es la presencia de una tercera cisteína en posiciones no equivalentes de ambas moléculas (Cys-56 en el caso de la Trx m y Cys-60 para la Trx f). A pesar de su cercanía, estas cisteínas quedan en posiciones muy diferentes en la estructura tridimensional. En el caso de la f, la tercera cisteína queda expuesta al medio y en la cara del centro activo, mientras que en la m queda escondida en la estructura y cerca de la cara opuesta.

Tabla 1.1. Aminoácidos cargados en las tiorredoxinas.

	n° de a.a.	a.a. ácidos	a.a. básicos	carga neta	pI	
					pred.	deter.
Trx f (guisante)	109	15	16	+1	7.9	8.0
Trx m (guisante)	108	15	13	-2	5.0	5.4
Trx (<i>E. coli</i>)	109	16	11	-5	4.5	4.5

Las tiorredoxinas del cloroplasto son reducidas por el sistema ferredoxina-tiorredoxina, siendo así portadoras de los electrones provenientes del transporte electrónico fotosintético, que se emplean en multitud de procesos celulares

Veíamos en la figura 1.1 que el aceptor final de la cadena de transporte fotosintético es una pequeña (12 kDa) sulfoferroproteína soluble denominada ferredoxina, que posee un centro activo formado por dos átomos de azufre y otros dos de hierro, capaces de aceptar y donar equivalentes de reducción de modo muy eficaz. La mayor parte de los equivalentes de reducción que llegan a la ferredoxina son transferidos al NADP^+ para formar NADPH reducido. Este intercambio tiene lugar a través de una proteína de acoplamiento denominada ferredoxin- NADP^+ -reductasa.

Sin embargo, en organismos fotosintéticos aeróbicos, como las plantas, la ferredoxina reducida es capaz de ceder también sus electrones a las tiorredoxinas cloroplastídicas, reduciéndolas en una reacción catalizada por otra enzima denominada ferredoxin-tiorredoxin-reductasa, que es un heterodímero formado por una subunidad de 13 kDa, muy conservada en todos los organismos y que posee también un centro activo sulfoférico [Fe_4S_4], unida a otra subunidad muy variable de un organismo a otro, tanto en su secuencia como en sus dimensiones (17 kDa, 15 kDa y 7 kDa para espinaca, maíz y

Nostoc muscorum, respectivamente), presuntamente responsable de la especificidad de la interacción con las tiorredoxinas (Hirasawa *et al.*, 1988; Droux *et al.*, 1987).

Así, los equivalentes de reducción procedentes del transporte fotosintético tilacoidal se canalizan hasta las tiorredoxinas, para que éstas puedan, a su vez, reducir a toda una serie de proteínas diana. De esta forma la luz activa indirectamente toda una serie de procesos en la planta, además de los ya conocidos de síntesis de energía como ATP y de equivalentes de reducción en forma de NADPH. Entre estos procesos activados por la luz se encuentran el ciclo asimilativo de Benson-Calvin, el control de la transcripción y traducción de ciertos genes, tanto del genoma del cloroplasto como del nuclear, la respuesta frente al estrés oxidativo, el plegamiento correcto de las estructuras del aparato fotosintético, etc.

En la figura 1.13 puede observarse un esquema-resumen de las distintas funciones que se han atribuido a las Trxs vegetales, tanto a la h (citosólica) como a las cloroplastídicas (Jacquot *et al.*, 1997). Es necesario comentar que las Trxs h son presumiblemente reducidas por una flavoproteína citosólica, la NADPH-tiorredoxin-reductasa, que obtiene sus equivalentes de reducción del NADPH exportado del cloroplasto. De este modo, todas las Trxs vegetales son reducidas por la luz, de forma más directa en el caso de las cloroplastídicas, o a través de un intermediario citosólico en el caso de la Trx h.

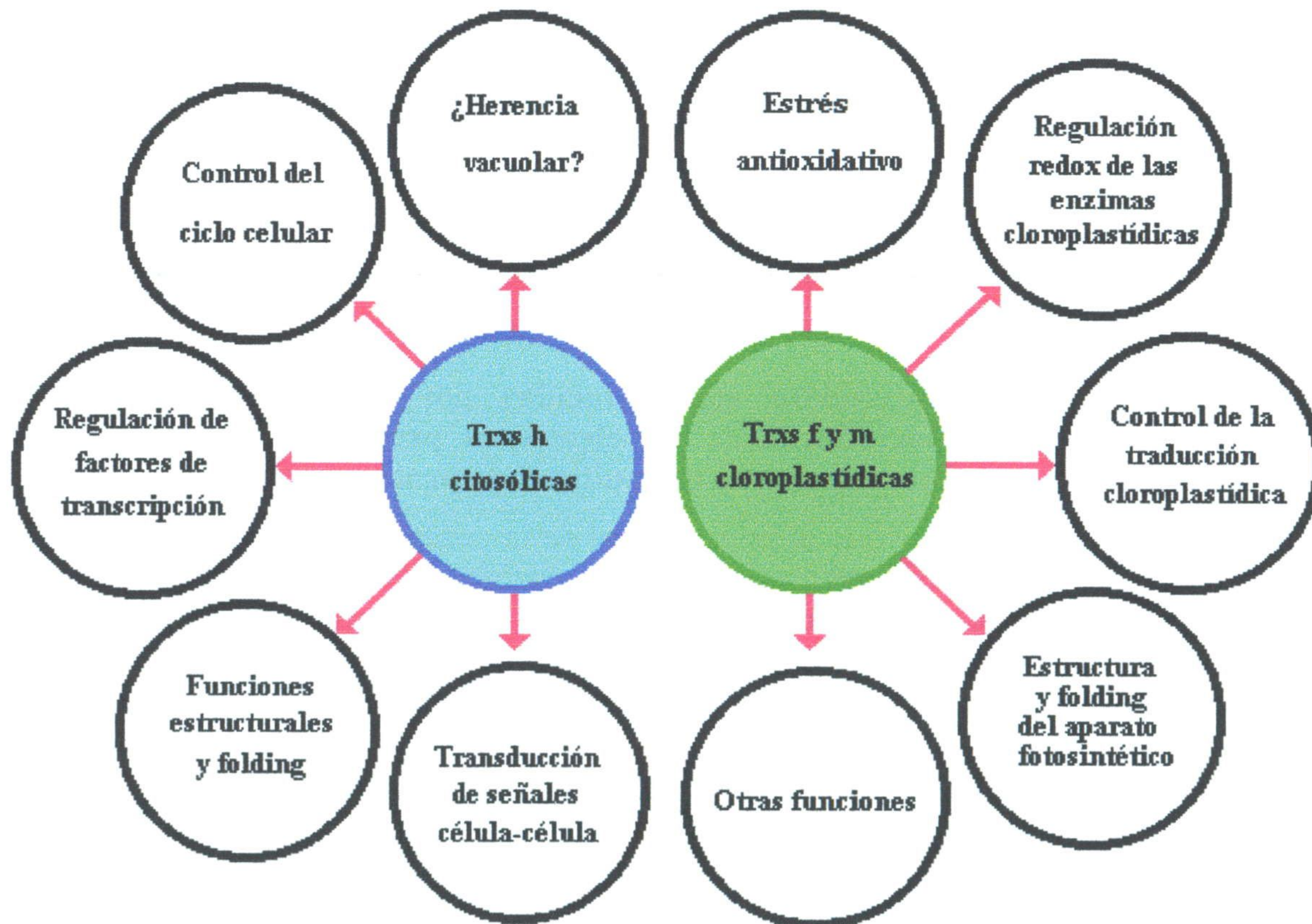


Fig. 1.13. Las funciones de las tiorredoxinas vegetales. Adaptado de Jacquot *et al.*, 1997.

Las estructuras tridimensionales de las tiorredoxinas cloroplastídicas no se han publicado. Se han realizado estudios de modelización molecular

Aunque se ha conseguido cristalizar tanto la Trx m (Lancelin *et al.*, sin publicar) como la Trx f de espinaca (Genovésio-Taverne *et al.*, 1991), sin embargo, las coordenadas tridimensionales no han sido publicadas ni están disponibles en el Protein DataBank. No obstante, dado que la estructura de la tiorredoxina parece ser universal para todas ellas, con objeto de realizar estudios estructurales pueden realizarse modelos moleculares mediante *threading* sobre las estructuras conocidas de otras tiorredoxinas (Programa Swiss-Model). López-Jaramillo realizó en 1995 modelos teóricos basados en las coordenadas de las Trxs de *E. coli* y humana, tanto para la Trx m como para la Trx f de guisante. El resultado se muestra en la figura 1.14. Cabe destacar la conservación de los aminoácidos cargados, especialmente los básicos, a pesar de la falta de identidad general de las secuencias. En general se puede decir que la cara que rodea al centro activo es muy hidrófoba (más en la Trx f que en la Trx m), estando rodeada de ciertos restos básicos muy conservados. Las diferencias más notables son la tercera cisteína que aparece en el caso de la Trx f y la pareja de restos ácidos que aparecen en la Trx m, aproximadamente en la posición equivalente. Además, la Trx f posee algunos restos básicos que no aparecen en la m.

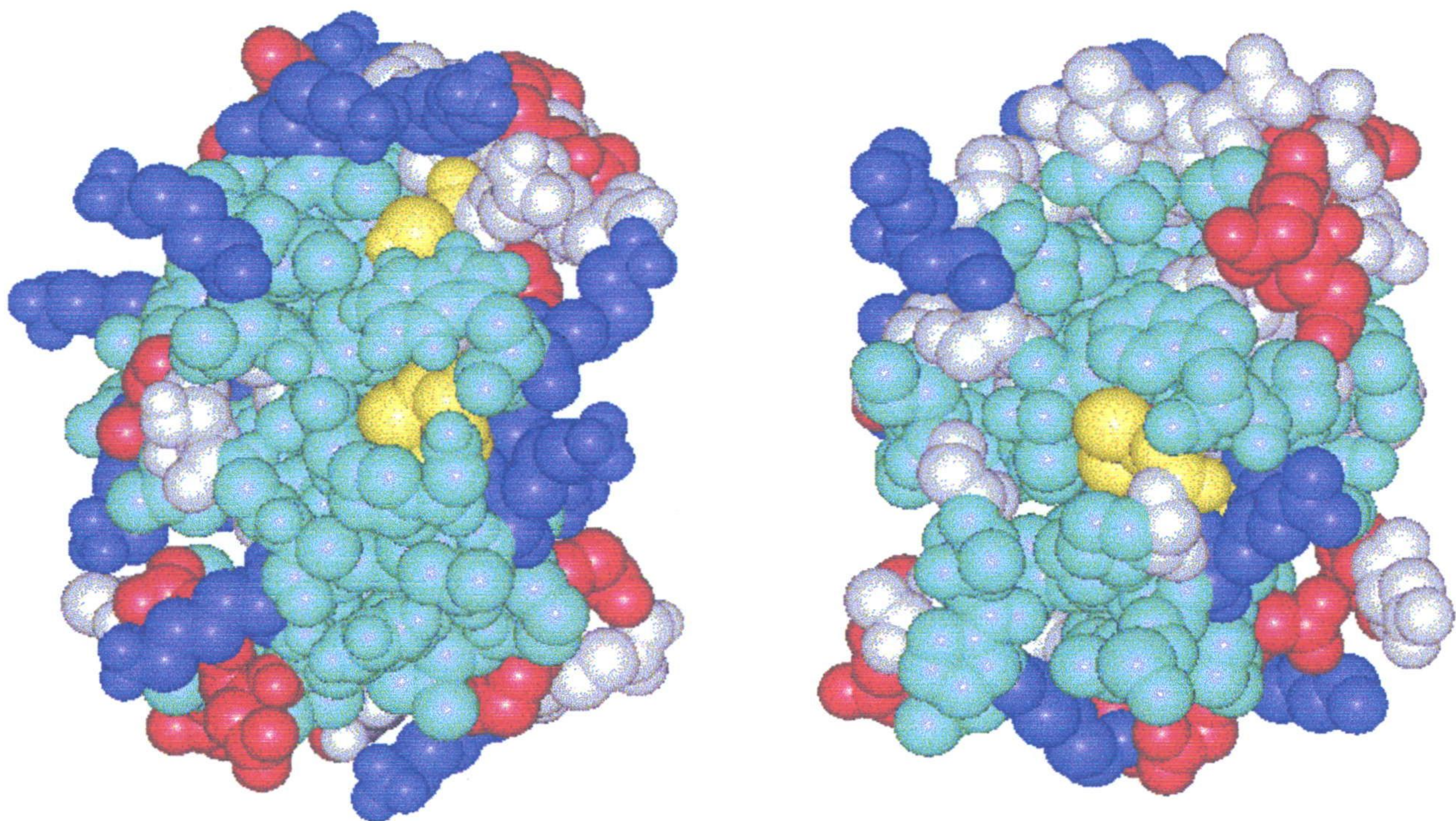


Fig. 1.14. Modelos teóricos de las tiorredoxinas f (izquierda) y m (derecha) de guisante (López-Jaramillo, 1995). Se muestran en rojo y en azul oscuro los aminoácidos ácidos y básicos, respectivamente, en celeste los hidrófobos y en amarillo las cisteínas.

El estudio evolutivo de las tiorredoxinas confirma la hipótesis de que el cloroplasto y la mitocondria proceden de endosimbiontes bacterianos

Las tiorredoxinas, dada su ubicuidad en la mayor parte de las células vivas, su variedad de funciones y su pequeño tamaño, lo que permite normalmente una fácil clonación del gen correspondiente, son proteínas especialmente adecuadas para estudios de genética evolutiva, mediante el desarrollo de árboles filogenéticos.

El primero de estos estudios evolutivos fue realizado por Hartman, Syvanen y Buchanan (Hartman *et al.*, 1990). Se usaron 14 secuencias conocidas de Trxs para realizar un árbol evolutivo, cuyos resultados eran coherentes con los estudios pioneros realizados a partir de las secuencias del ARN ribosómico 16s (Fox *et al.*, 1980; Woese, 1987). Este estudio dividía las tiorredoxinas en cuatro grandes grupos, tres de ellos procariotas y uno eucariota:

- Grupo I: bacterias fotosintéticas púrpuras, *Escherichia* y *Corynebacterium*
- Grupo II: bacterias fotosintéticas verdes (*Chlorobium*)
- Grupo III: cianobacterias (*Chlamydomonas*, *Anabaena*, etc.)
- Grupo IV: Animales

La Trx f de espinaca se integraba en el grupo de las Trxs animales (que quizás debería haber sido llamado Eucariotas), mientras que la Trx m aparecía en el grupo III, junto con las cianobacterias, probando así su origen bacteriano. Este estudio apoyaba la idea establecida en primer lugar por Lynn Margulis (Margulis *et al.*, 1986), ampliamente aceptada en la actualidad, de que el cloroplasto de las células vegetales y la mitocondria de todas las células eucariotas proceden de bacterias endosimbiontes (cianobacterias y bacterias púrpuras, respectivamente), que han delegado la mayor parte de su bioquímica al núcleo eucariótico, aunque aún conservan parte de su genoma. De este modo, el gen para la Trx m pertenecía originalmente al genoma bacteriano, de donde fue traslocado al núcleo, en donde le fue añadido un péptido de tránsito para conducir la proteína de nuevo al cloroplasto, idea corroborada más tarde por Sahrawy *et al.* (1996), como veremos a continuación.

Sahrawy *et al.* (1996) realizaron otro estudio filogenético empleando 35 secuencias, 20 de las cuáles pertenecían a plantas o algas fotosintéticas. El árbol evolutivo resultó ser más heterogéneo, aunque todas las tiorredoxinas m seguían englobándose con las procariotas. Las Trxs h y f formaban sendos grupos compactos, separados de otras Trxs eucariotas. Resultados similares han sido expuestos por Jacquot *et al.* (1997). La aportación más novedosa fue el estudio de las posiciones de los intrones en el interior de los genes de las Trxs. Las Trxs h y f presentan entre uno y tres intrones en las secuencias correspondientes a las proteínas maduras. La tiorredoxina humana presenta cuatro intrones. La aparición de intrones en su estructura revela su origen claramente eucariótico y su evolución a partir de otras proteínas primigenias. Por el contrario, las Trxs m únicamente poseen un intrón entre el péptido de tránsito y la proteína madura, mostrando así su origen bacteriano (las células procariotas no poseen intrones) y su historia evolutiva de migración al núcleo, donde se le añadió posteriormente el péptido de tránsito.

Quizás lo más interesante no sea la demostración de que las tiorredoxinas m son de origen bacteriano, sino que la Trx f es la primera proteína cloroplastídica conocida para la cuál se ha propuesto un origen eucariótico. Todas las demás proteínas presentes en el cloroplasto parecen provenir de la bacteria simbiótica primordial. La Trx f es, por lo que

sabemos, la única proteína eucariótica de la que podemos decir que ha adquirido un péptido de tránsito para incorporarse al cloroplasto y, además, ser funcional en éste. Esta facilidad para los cambios funcionales puede deberse a la alta versatilidad y falta de especificidad general que presentan las Trxs.

Podemos imaginar cómo en la bacteria primordial las proteínas del ciclo de Calvin eran activadas por una proteína bacteriana semejante a la actual Trx m, que aún permanece en el cloroplasto, quizás como reliquia evolutiva. Una vez que el cloroplasto fue absorbido por la célula eucariótica, se produjo la evolución a partir de una Trx h, hasta que fue más eficaz en la activación de las enzimas fotosintéticas que la propia Trx m. Ello fue fácil para una proteína tan versátil como la tiorredoxina. El resto es fácil de imaginar. Sería interesante preguntarse si la Trx m sigue siendo necesaria para la vida de la planta, ya que parece que la Trx f puede sustituirla más eficazmente en la mayoría de sus funciones. Sin embargo, por razones que aún no están muy claras, la m parece ser indispensable, ya que la evolución se tomó la molestia de redirigirla al núcleo y añadirle el péptido de tránsito.

La historia evolutiva de las tiorredoxinas está directamente relacionada con la historia de la vida. Se requieren investigaciones más exhaustivas para aclarar este apasionante dilema. Entre ellas, sería interesante estudiar la viabilidad de plantas transgénicas con el gen de la Trx m delecionado. En este sentido Muller y Buchanan (1989) y Navarro y Florencio (1996) han demostrado que la Trx m es indispensable tanto para el crecimiento fotosintético como para el heterotrófico en Cianobacterias (las Cianobacterias poseen al menos dos tipos de Trxs, unas relacionadas con las Trxs m, y otras no emparentadas con ninguna otra). No se conoce realmente qué papel esencial podría tener la Trx m que no pudiera ser realizado por las otras formas de tiorredoxina. Se han sugerido diversas posibilidades, como el control de la transferencia de energía desde los ficobilisomas al fotosistema I, el mantenimiento de la estructura general del aparato fotosintético (Glazer *et al.*, 1994), la regulación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Gleason, 1996), o la asimilación de sulfatos, función para la cuál las tiorredoxinas son indispensables en otras bacterias, como *E. coli* (Russel *et al.*, 1990).

Si la Trx m corrobora el origen bacteriano del cloroplasto, ¿qué se puede decir de la mitocondria? Recientemente se han encontrado, clonado y caracterizado tiorredoxinas mitocondriales en diferentes especies de animales (Spyrou *et al.*, 1997; Miranda-Vizueté *et al.*, 1997 y 1998; Watabe *et al.*, 1998). Como podríamos esperar, su secuencia está próxima a las Trxs m y a las bacterianas, corroborando así la hipótesis de un origen endosimbiótico para la mitocondria. Son de codificación nuclear, presentan un péptido de tránsito mitocondrial y son altamente termorresistentes (a diferencia de las Trxs eucarióticas). Al contrario que otras Trxs animales, no poseen puentes disulfuro estructurales distintos al del centro activo. Se ha sugerido que su papel es participar en la defensa frente a los radicales libres de oxígeno que se desprenden en la respiración mitocondrial. Esta proposición está respaldada por el hecho de que la tiorredoxina mitocondrial de rata se expresa preferentemente en el corazón y músculo esquelético, tejidos con un gran gasto respiratorio. Inesperadamente, también se expresa de forma mayoritaria en el cerebelo.

Es conocida desde hace tiempo la existencia de una forma de tiorredoxina en la mitocondria de patata (Bodenstein-Lang *et al.*, 1989), aunque hasta la fecha no se ha clonado ni se conoce la secuencia de ninguna tiorredoxina mitocondrial de origen vegetal.

1.5. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN TIORREDOXINA – FBPasa

El estudio de la interacción entre la FBPasa cloroplastídica y la tiorredoxina es fundamental para poder dirigir biotecnológicamente el metabolismo de la planta. La zona de la FBPasa implicada en la interacción se conoce perfectamente y se denomina “bucle-170”

Como ya hemos dicho, la FBPasa es una enzima clave en la regulación del ciclo de Benson-Calvin, ya que de su actividad depende si el metabolismo de la planta se dirige hacia la producción de sacarosa o a la producción de almidón (sección 1.2). Dado que se puede activar esta enzima mediante las tiorredoxinas, el sistema FBPasa-Trx constituye un prometedor objetivo de cara a la obtención de plantas transgénicas de metabolismo regulable, gracias a la flexibilidad del sistema (posibilidad de actuar sobre la FBPasa o sobre cualquiera de las Trxs presentes en el cloroplasto).

Se ha caracterizado perfectamente la zona de la FBPasa responsable de la interacción con las Trxs (Hermoso *et al.*, 1996). Se trata del “bucle-170”, que se encuentra presente únicamente en las FBPasas cloroplastídicas y ausente en las citosólicas. Dicho bucle presenta tres cisteínas en posiciones muy conservadas en todos los vegetales y numerosos restos ácidos que le confieren una carga neta negativa (fig. 1.15).

```

cerdo:      -GIYRKNST.....DEPSEKDAL.....QPGRNLVAAGYALY-
rata:      -GIYRK TSA.....NEPSEKDAL.....QPGRNLVAAGYALY-
guisante:  -GIYSPNDECLPDFGDDSDDN TLGTEEQRCIVNVCQPGSNLLAAGYCMY-
espinaca:  -GIYSPNDECIVD.SDHDESQLSAEEQRCVVNVCQPGDNLLAAGYCMY-
trigo:     -GIYSPSDEC.....HIGDDATLDEV TQM CIVNVCQPGSNLLAAGYCMY-
patata:    -GIYNPNDECLAD..HGDD.STLDNIEQKCIVNVCQPGTNLLAAGYCMY-
    
```

Fig. 1.15. Alineamiento de la zona del “bucle-170” de diversas FBPasas citosólicas y cloroplastídicas. Puede observarse cómo en las FBPasas fotosintéticas (las cuatro últimas) el bucle es mucho mayor y alberga tres cisteínas en posiciones muy conservadas. Estas cisteínas están implicadas en la activación de la enzima mediante tiorredoxina. Se representan en celeste los aminoácidos conservados en todas las FBPasas que flanquean el bucle, mientras que en amarillo se representan las tres cisteínas del bucle y en rosa los abundantes restos ácidos.

Hermoso *et al.* (1996) demostraron mediante estudios inmunológicos y de filtración en gel, que un péptido formado por 19 aminoácidos del bucle-170 de guisante ($^{149}\text{PNDECLPDFGDDSDDN TLG}^{167}$) es capaz de unirse tanto a la Trx m como a la Trx f. Este hecho apoya la idea de que el mecanismo de interacción entre FBPasa y tiorredoxina posee un fuerte componente electrostático, ya que 7 de los 19 aminoácidos del péptido están cargados negativamente. Además, el fragmento sólo incluye una de las tres cisteínas implicadas en el juego de óxido-reducción, lo que prueba que las cisteínas por sí solas no justifican la interacción, sino que debe haber una unión previa debida presumiblemente a los aminoácidos cargados.

Además, el “bucle-170” es una zona muy expuesta al medio en las FBPasas cloroplastídicas y ausente en aquellas FBPasas no reguladas por Trx, por lo que es el candidato perfecto para interactuar con éstas, en un ejemplo muy claro de relación entre estructura y función. Si queremos controlar la FBPasa de modo que se pueda obtener una proteína más activable o menos activable, debemos tratar de realizar mutagénesis sobre estos aminoácidos implicados en la unión.

Los estudios de mutagénesis dirigida ayudan a elucidar qué aminoácidos son importantes en las interacciones proteína-proteína

Si la zona de interacción de la FBPasa es perfectamente conocida, no ocurre así con las Trxs. Poco o nada se sabe acerca de qué aminoácidos de estas últimas son importantes en la interacción con las enzimas fotosintéticas. El estudio de los restos aminoacídicos de Trx implicados en esta interacción es uno de los objetivos de este trabajo.

La mayoría de los estudios que pretenden elucidar qué aminoácidos son importantes en las interacciones proteína-proteína se basan en la mutagénesis dirigida de los restos potencialmente implicados en la unión, y la posterior caracterización de las proteínas mutantes así obtenidas. Esta mutagénesis resulta en la actualidad relativamente sencilla si se dispone del gen clonado de la proteína a mutar, y éste se puede expresar en bacterias (normalmente en *E. coli*).

Todos los estudios de mutagénesis dirigida se basan en una comparación previa de las secuencias de distintas Trxs, con el fin de estudiar qué residuos se conservan, ya que éstos serán los que estén potencialmente implicados en la unión. A continuación se realiza la mutagénesis de los aminoácidos elegidos y la posterior expresión de las proteínas mutantes, observando después su capacidad de interacción con las proteínas diana.

Los primeros estudios de mutagénesis dirigida sobre la Trx de *E. coli* fueron llevados a cabo por Russel y Model (1986). Desde entonces se han realizado multitud de estudios sobre tiorredoxinas de varias especies, con distintos resultados que, a veces, se contradicen. En Trxs fotosintéticas cabe destacar el trabajo de Geck *et al.* (1996) sobre la identificación de los residuos de Trx f de espinaca implicados en la interacción proteína-proteína. Demostraron la importancia de Lys-58, Asn-74, Gln-75 y Asn-77 en la interacción con FBPasa y NADP-malato-deshidrogenasa. Lamotte-Guery *et al.* (1991) demostraron que el Asp-61 de la Trx de *E. coli* está implicado en la interacción con FBPasa y LeMaster *et al.* (1997) probaron que el Asp-26 de la tiorredoxina de *E. coli* es necesario para que ésta sea capaz de activar a las enzimas diana. En nuestro laboratorio, López-Jaramillo *et al.* (1997) demostraron que la Lys-70 de la Trx m de guisante es esencial para la activación de la FBPasa.

Se han realizado estudios estructurales de los complejos de tiorredoxina humana y de *E. coli* con algunas moléculas con las que interactúan

Los estudios de mutagénesis dirigida tienen el inconveniente de ser bastante laboriosos y de que sólo se puede estudiar un aminoácido cada vez. En teoría, para estudiar una proteína de 110 aminoácidos, como la tiorredoxina, deberían realizarse al menos 110 mutaciones para comprobar la importancia de todos y cada uno de los residuos. Si, además, se desea mutar cada residuo por varios aminoácidos distintos, el número de experimentos a llevar a cabo se dispara hasta hacerse irrealizable.

Existe otra posibilidad que permite caracterizar perfectamente, de una sola vez, todos los aminoácidos implicados en la interacción. Se trata de realizar estudios estructurales del complejo proteína-proteína, ya sea mediante cristalización del mismo y difracción de rayos X, o mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Recientemente se han obtenido resultados con la tiorredoxina utilizando ambos métodos. Doublie *et al.* (1998) cristalizaron el complejo de ADN-polimerasa del fago T7 con la Trx de *E. coli*, que es necesaria para conferir procesividad a la polimerasa viral (de hecho, los primeros mutantes de la Trx de *E. coli* se detectaron gracias a su resistencia al fago T7). La estructura fue resuelta mediante difracción de rayos X a 2.2 Å de resolución (figura 1.16).



Fig. 1.16. Estructura del complejo T7-ADN-polimerasa (en verde) con Trx de *E. coli* (a la derecha, mostrando su estructura secundaria y las cisteínas del centro activo). En el centro se observa una doble hélice de ADN que también se ha cocrystalizado. Se puede observar que la zona de unión de la polimerasa es un bucle expuesto al medio, parecido al de la FBPasa cloroplastídica (Doublie *et al.*, 1998).

La unión de la polimerasa del T7 a la Trx de *E. coli* se lleva a cabo a través de un bucle expuesto al medio, parecido al que se encuentra en la FBPasa cloroplastídica, pero con una gran diferencia: de los 28 aminoácidos que intervienen en la interacción (del 262 al 270, del 289 al 293 y del 319 al 332) sólo dos poseen carga negativa y únicamente uno de ellos, el Glu-319, forma un enlace electrostático con la Arg-73 de la Trx. La mayoría de las interacciones son de tipo hidrofóbico (18 de los 28 aminoácidos), y abundan los puentes de hidrógeno. Una cosa resulta interesante: aunque la presencia de las cisteínas del centro activo de la Trx no son necesarias para el ensamblaje (la tiorredoxina sólo cumple una función estructural, y no redox, en este complejo), sin embargo, la polimerasa se une a la Trx por la cara de su centro activo, aprovechando el gran número de restos hidrofóbicos que rodean a éste.

En cuanto a la RMN, es imposible aplicarla a proteínas muy grandes y, mucho menos, a complejos de éstas (la proteína más grande que ha podido ser resuelta hasta el momento por RMN tiene alrededor de 30 kDa). Sin embargo, es posible utilizar la técnica para estudiar el complejo entre la tiorredoxina (suficientemente pequeña, con 12 kDa) y un péptido correspondiente al bucle de la proteína diana con la que se une, siempre que éste haya sido identificado.

Así, Qin *et al.* (1995 y 1996) aplicaron la RMN al estudio del complejo de la Trx humana con dos péptidos distintos de 13 aminoácidos cada uno, correspondientes a los bucles reguladores del factor de transcripción NF κ B y del factor de acoplamiento nuclear Ref1. Se aprovechó el hecho de que ambos péptidos incluyen la cisteína que es atacada en primer lugar por la Trx humana, de modo que se forman complejos covalentes con un puente disulfuro mixto entre la cisteína 32 de la Trx y la cisteína de los péptidos, fácilmente purificables y suficientemente estables para ser estudiados por RMN. Los resultados se muestran en la figura 1.17.

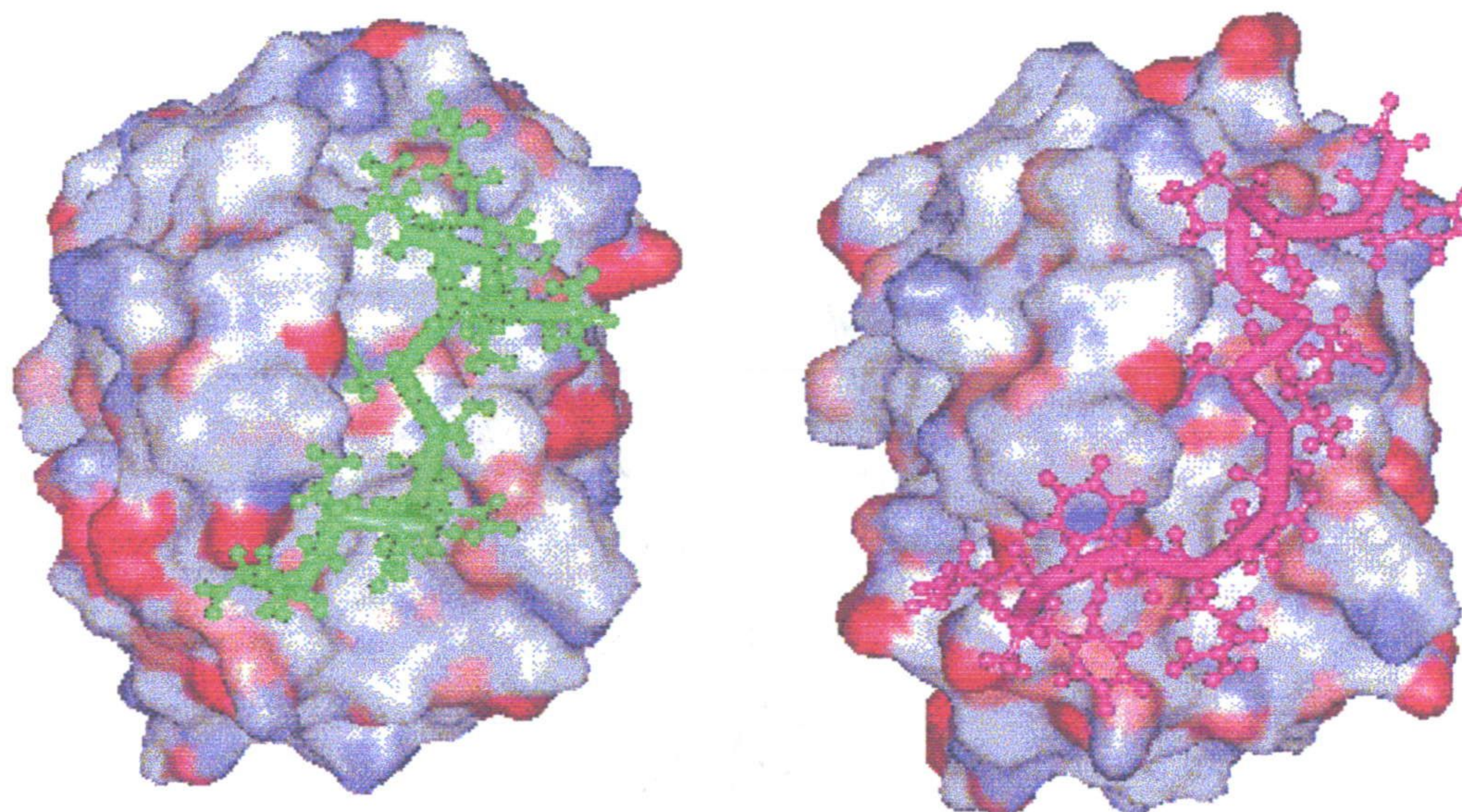


Fig. 1.17. Estructuras de los complejos de tiorredoxina humana con los péptidos de las proteínas diana Ref1 (izquierda, en verde) y NF κ B (derecha, en rosa). Se representa la superficie de la tiorredoxina, mostrando la densidad de carga superficial (rojo: negativo y azul: positivo). La Cys-32 del centro activo es la mancha roja aproximadamente en el centro de la tiorredoxina, que se une mediante un puente disulfuro a una cisteína del péptido (Qin *et al.*, 1995 y 1996).

Los resultados son bastante sorprendentes. En primer lugar, las orientaciones relativas de ambos péptidos son opuestas. Así, en el caso de Ref1 el extremo amino del péptido es el superior en la figura 1.16, mientras que para NF κ B el extremo amino es el inferior. Sin embargo, ambos péptidos encajan en el mismo surco de la superficie de la proteína. Curiosamente este surco se encuentra también en la Trx de *E. coli*, así como en los modelos de la f y la m de guisante. Presumiblemente, dicho surco es común a todas las tiorredoxinas y es, potencialmente, la zona de interacción con las proteínas diana.

Qin *et al.* (1996) han hecho una búsqueda exhaustiva de todas las interacciones existentes entre ambos péptidos y la Trx humana. Así, encuentran únicamente dos interacciones electrostáticas entre el péptido de NFκB y la Trx y ninguna en el caso de Ref1. Además, notablemente, ambas interacciones se dan entre residuos positivos del péptido y residuos negativos de la Trx, al contrario de lo predicho para la interacción con la FBPasa por Hermoso *et al.* (1996). Las interacciones hidrofóbicas son las predominantes (23 para NFκB y 18 para Ref1), mientras que existen algunos puentes de hidrógeno (6 para NFκB, de los cuáles 3 son de tipo backbone-backbone y 4 para Ref1, con 3 de tipo backbone-backbone). Los enlaces de hidrógeno de tipo backbone-backbone son independientes de las cadenas laterales aminoacídicas y, presumiblemente, se darían cualquiera que fuera la secuencia del péptido.

Es interesante preguntarse si la ADN-polimerasa del fago T7 se une a la Trx de *E. coli* en el mismo surco que usan los péptidos para unirse a la proteína humana. La respuesta se muestra en la figura 1.18, donde puede observarse que el bucle de la polimerasa ocupa una posición aproximadamente equivalente a dicho surco. Presumiblemente las tiorredoxinas, ya sean bacterianas, humana o de cualquier otra procedencia, prefieren unirse a sus proteínas diana utilizando dicho canal hidrófobo, en medio del cuál sobresale la cisteína atacante.

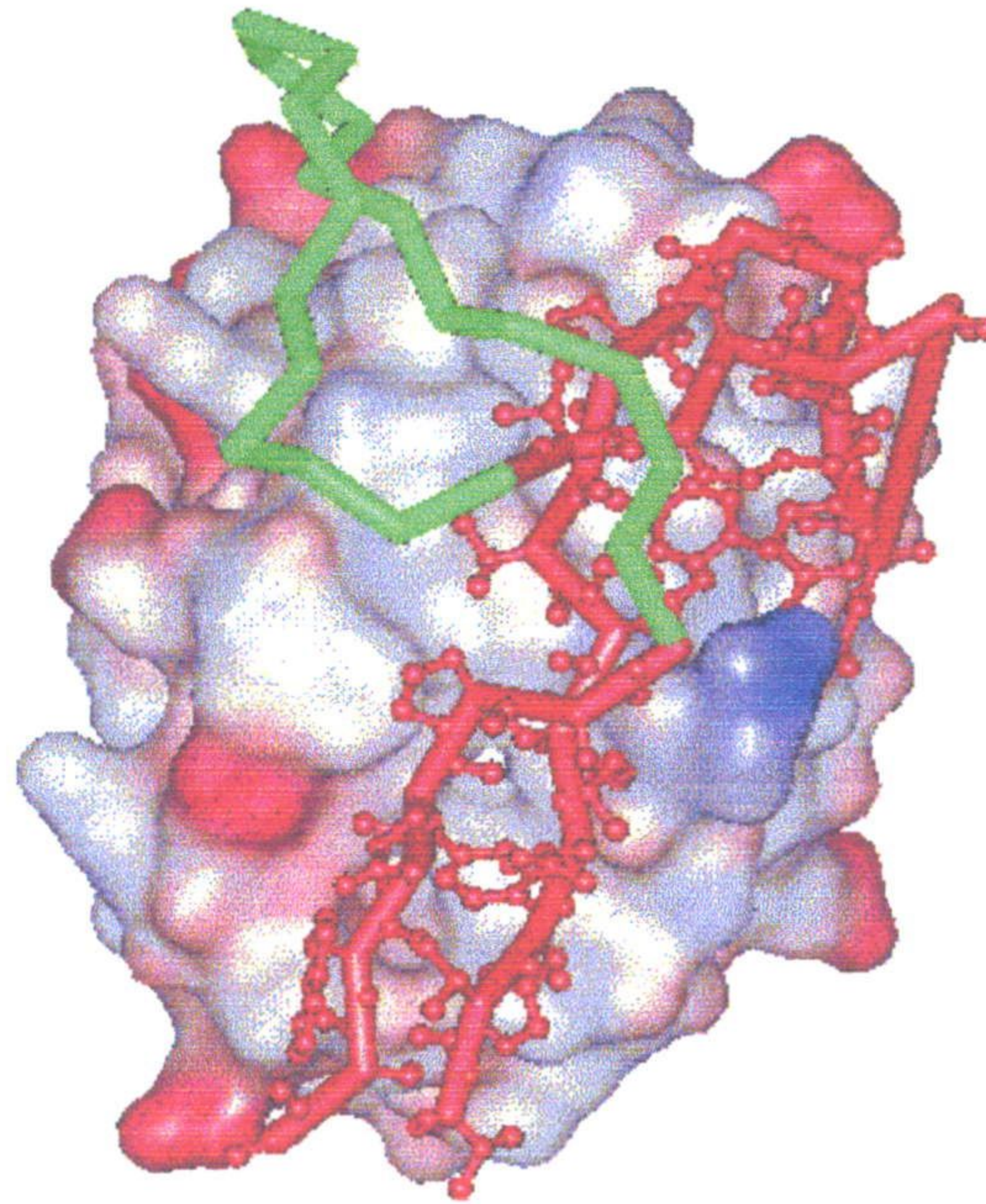
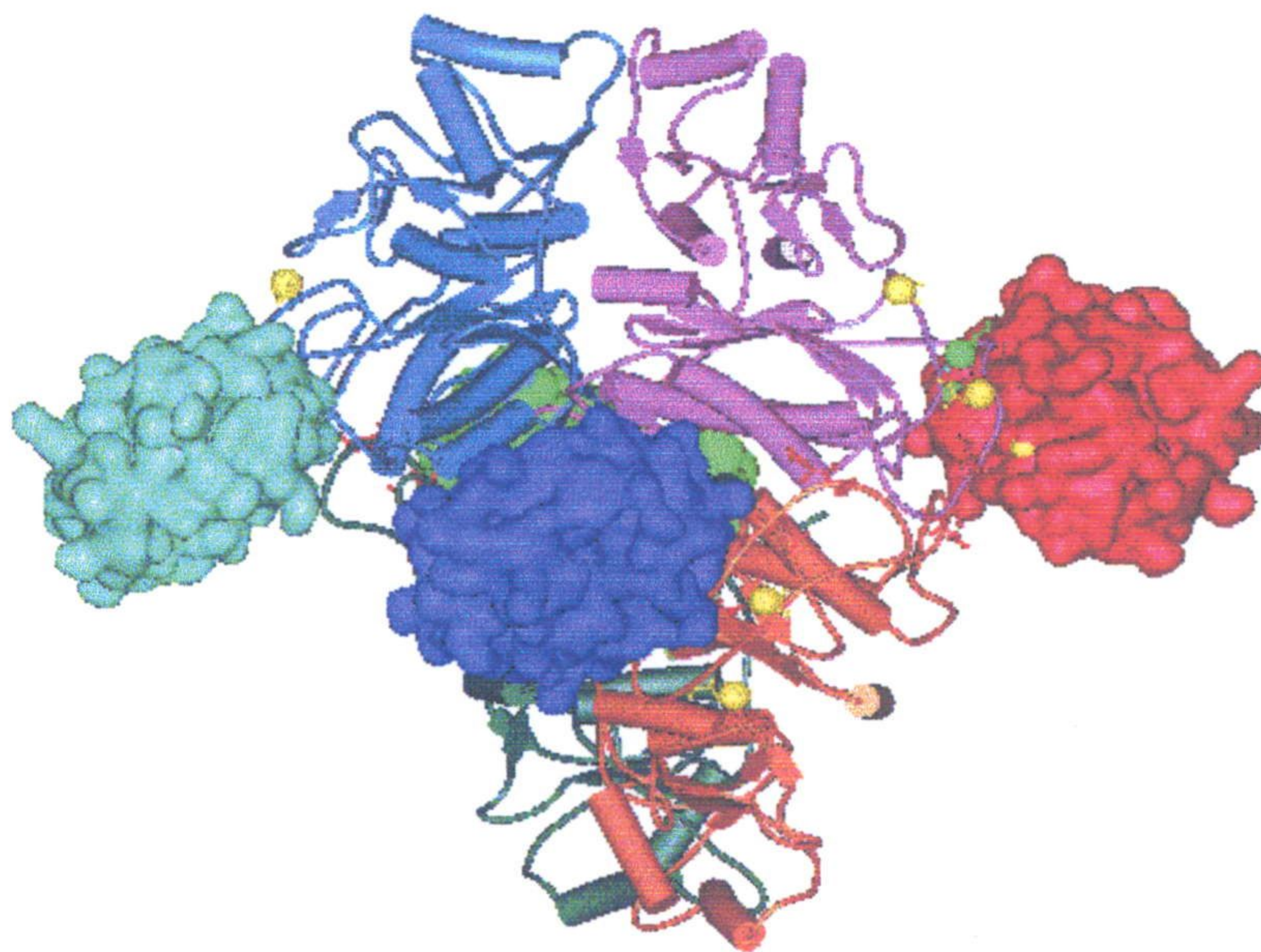


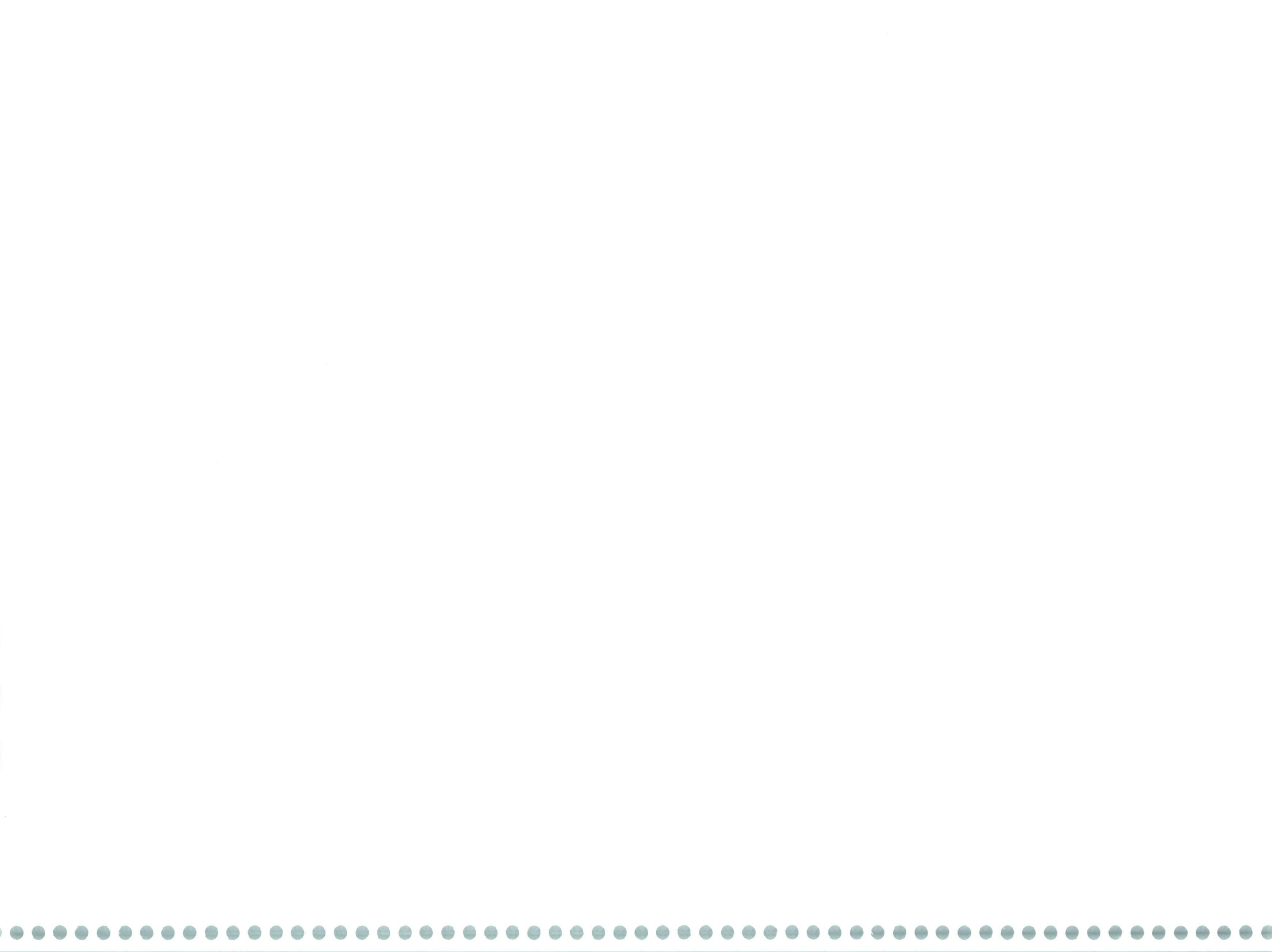
Fig. 1.18. Tiorredoxina de *E. coli* mostrando su distribución superficial de cargas, orientada en posición aproximadamente equivalente a las tiorredoxinas humanas de la figura 1.17. Se representan en rojo los aminoácidos de la polimerasa del T7 que intervienen en la interacción. El bucle verde queda por encima del plano de la figura y no interacciona con la tiorredoxina. Se observa que el fragmento peptídico de la polimerasa ocupa una posición en el surco de la tiorredoxina equivalente al ocupado por los péptidos de los factores de transcripción en la figura anterior.

2. OBJETIVOS

Entonces el Creador dijo: “lo saben ya todo... ¿qué vamos a hacer con ellos? Que su vista alcance sólo a lo que está cerca de ellos, que sólo puedan ver una pequeña parte del rostro de la tierra... ¿No son por su naturaleza simples criaturas producto de nuestras manos? ¿Tienen que ser también dioses?”.

El Popol-Vuh, de los mayas-quiché

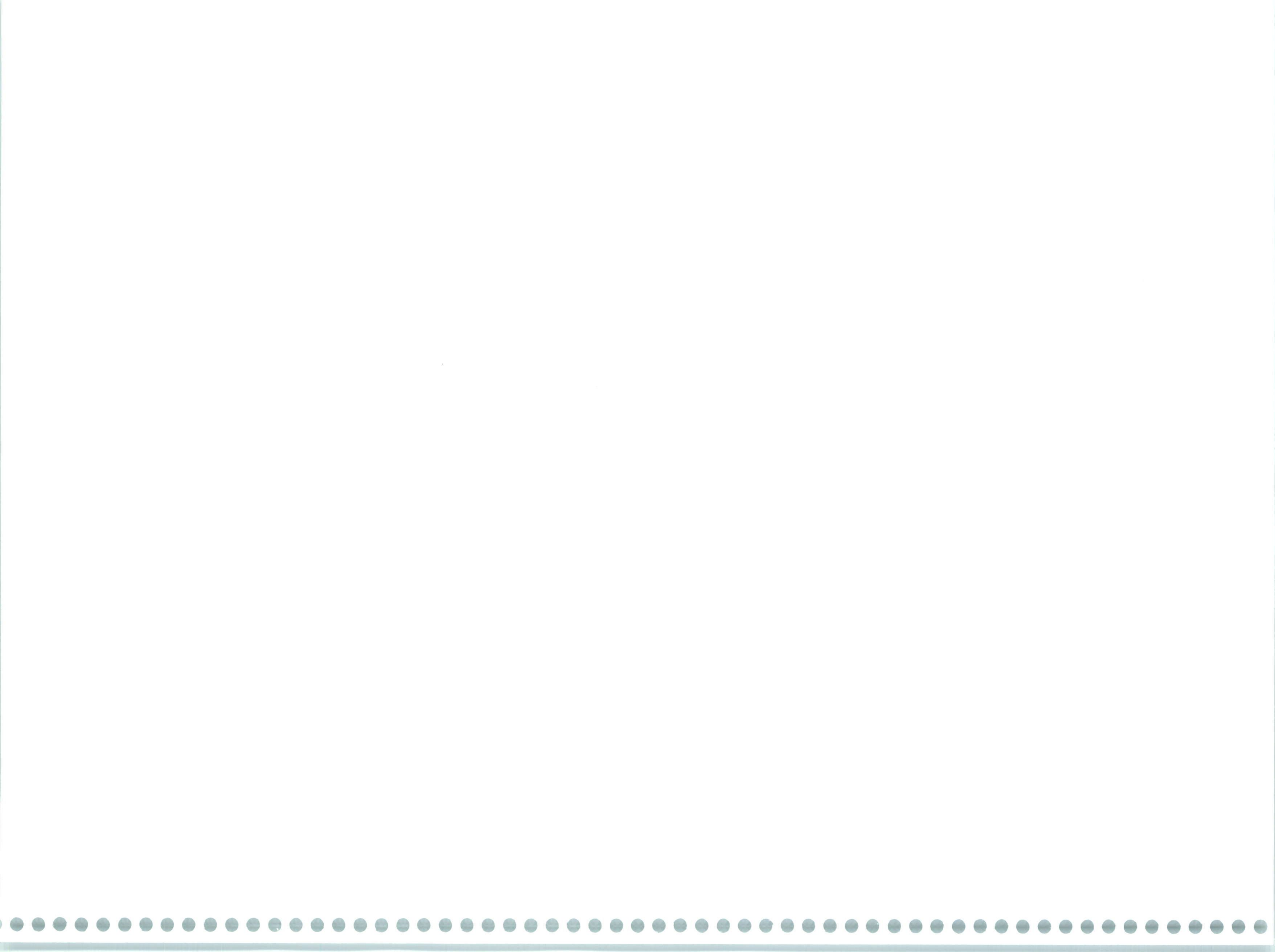




Uno de los objetivos fundamentales a largo plazo de nuestro grupo de investigación es profundizar en los mecanismos moleculares mediante los cuáles las enzimas fotosintéticas son reguladas, con el fin de poder dirigir el metabolismo de la planta. En este sentido se emplea la interacción entre la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la tiorredoxina como modelo de estudio, por ser de especial importancia a la hora de dirigir el destino de los productos de la fotosíntesis. Uno de nuestros éxitos fue la identificación del "bucle-170" como la zona de interacción de la FBPasa. El siguiente paso consiste en identificar las zonas de unión de las tiorredoxinas, objeto del presente trabajo.

Para conseguir este fin, el plan de trabajo propuesto fue el siguiente:

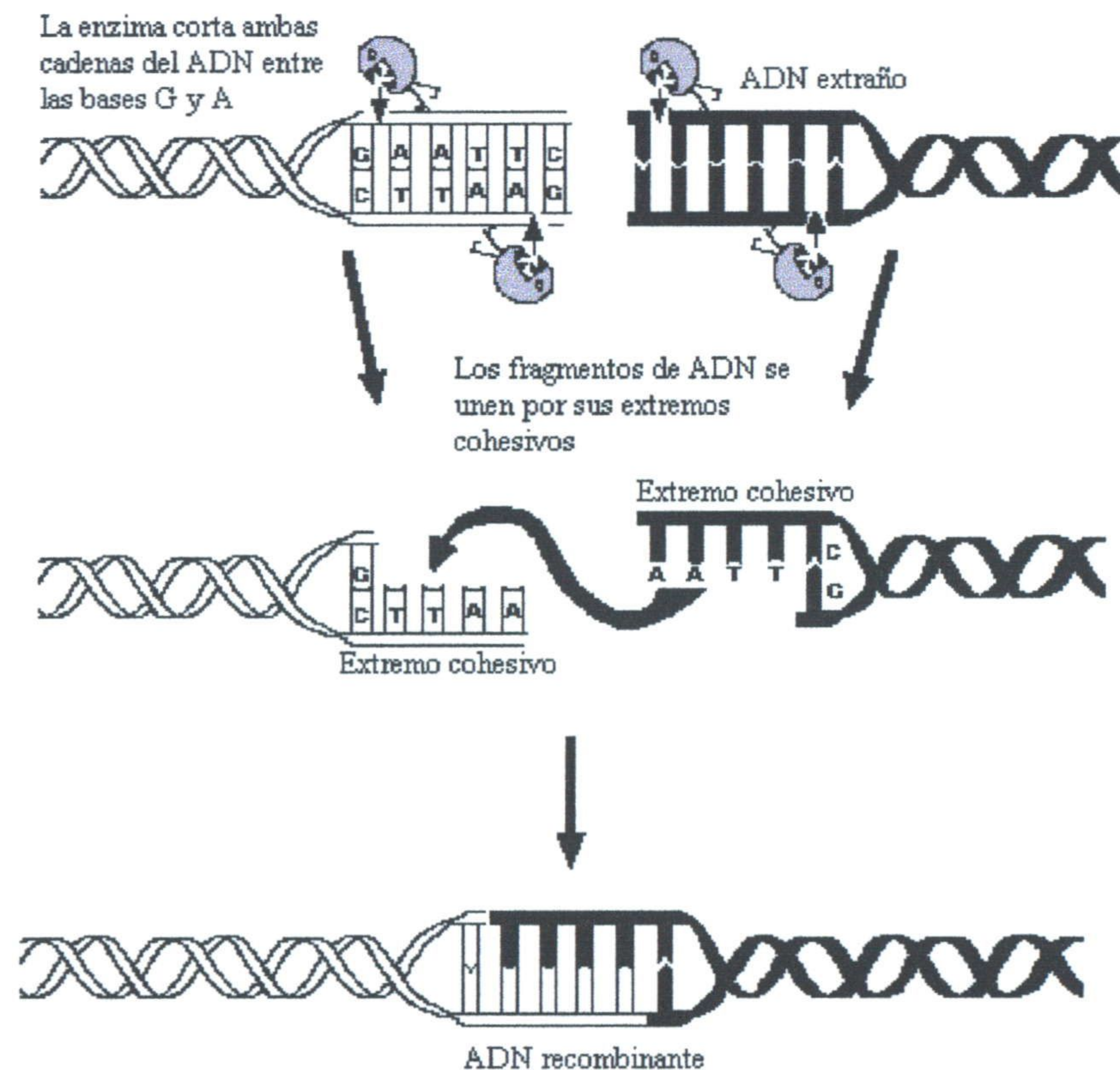
1. Estudio comparativo y evolutivo de las secuencias de las tiorredoxinas presentes en los bancos de datos, con el fin de reconocer las características conservadas a lo largo de la evolución, que deben ser las más estrechamente relacionadas con su función.
2. Obtención de un modelo teórico tridimensional de interacción de las Trxs f y m con la FBPasa cloroplastídica de guisante.
3. Estudio, en base al modelo propuesto, de los aminoácidos de las Trxs f y m potencialmente implicados en la unión con la FBPasa.
4. Mutagénesis dirigida de los aminoácidos presuntamente implicados en la unión y obtención de las Trxs mutantes purificadas.
 - 4.1. Mutagénesis del gen de la Trx m de guisante.
 - 4.2. Expresión de las proteínas mutantes en *E. coli*.
 - 4.3. Purificación a homogeneidad de las proteínas mutantes.
5. Estudio de la interacción de las Trxs silvestres y de los mutantes con la FBPasa cloroplastídica, para comprobar la bondad del modelo propuesto.
 - 5.1. Estudios de la capacidad de activación de FBPasa por las Trxs mutantes.
 - 5.2. Estudio del equilibrio de unión mediante diálisis en equilibrio.
 - 5.3. Estudio del potencial redox de las Trxs silvestres y de los mutantes.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

Antes de las Altas y Remotas Épocas, oh queridísimo mío, hubo la Época del Comienzo Mismo, y fue en esos días cuando el Mago Más Anciano dispuso las cosas. Primero preparó la Tierra; luego preparó el Mar; y luego dijo a todos los animales que podían salir a jugar.

Rudyard Kipling, *El cangrejo que jugaba con el mar*





3.1. HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA

En este trabajo se hace uso extensivo de herramientas computacionales. Estas se han convertido hoy en día en imprescindibles para el trabajo del biólogo molecular, y han avanzado tanto en los últimos años que sus resultados, en muchos casos, pueden ser considerados casi con el mismo nivel de confianza que un resultado experimental. En cualquier caso, la utilidad principal de los modelos informáticos no es confirmar, sino sugerir. Los cálculos teóricos, las simulaciones por ordenador y las comparaciones de secuencias y estructuras tienen su máximo valor a la hora de proporcionar ideas que, después, puedan ser comprobadas experimentalmente mediante "métodos tradicionales".

Dado su carácter predictivo *a priori*, se tratan en esta sección los métodos informáticos en primer lugar, antes que los métodos de laboratorio "clásicos", con objeto de seguir un orden de exposición lo más ajustado posible al orden lógico y cronológico en el que se han utilizado los distintos métodos para la realización del presente trabajo.

Se pueden dividir las herramientas bioinformáticas en dos grandes grupos:

- Programas de análisis de secuencias y estudios filogenéticos.
- Programas de representación y modelización de estructuras moleculares.

Ambos tipos de programas han sido empleados en este trabajo y sus resultados han sugerido la realización de experimentos ulteriores que, en la mayoría de los casos, han confirmado las predicciones del ordenador.

3.1.1. Programas de análisis de secuencias y estudios filogenéticos

Búsquedas en bancos de datos

El primer paso para llevar a cabo estudios comparativos de secuencias de proteínas, ya sea en forma de ADN o de aminoácidos, es realizar una búsqueda en las bases de datos disponibles vía Internet, en la mayoría de los casos de forma completamente gratuita. Dos de los bancos de datos de secuencias más populares, que han sido empleados para la realización de este trabajo son:

- **PIR (Protein Information Resource)**: Banco de datos de secuencias de proteínas, mantenido por la National Biomedical Research Foundation y localizado en la Universidad de Georgetown. Se accede vía WWW en la dirección: <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>

- **ENTREZ**: Se trata en realidad de un conjunto de bancos de datos (incluyendo el famoso GenBank, la mayor base de datos de secuencias de ADN del mundo), accesibles desde una única herramienta de búsqueda, localizada en el National Center for Biotechnology Information, un anexo de la National Library of Medicine en Bethesda, Maryland, que también mantiene la conocida base de datos MEDLINE de bibliografía biomédica. Se puede acceder en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> y permite la búsqueda de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como de estructuras. También se pueden examinar genomas completos (ya existen 6 arqueones, 16 bacterias y 2 eucariotas completamente secuenciados y han sido realizados los mapas cromosómicos de otros 4 eucariotas, incluyendo al hombre). Así mismo, se puede acceder a una base de

datos de Taxonomía, donde se pueden obtener filogenias completas de todos los organismos representados en los bancos de datos de proteínas o ADN.

Comparación de secuencias y alineamientos

Los programas más populares para realizar múltiples alineamientos de secuencias emplean el conocido algoritmo CLUSTAL y su versión mejorada CLUSTALW. En este trabajo se han empleado los programas ANTHEPROT 2.9 y ProAnalist 2.0, ambos disponibles para ordenadores PC-compatibles que empleen el sistema operativo Windows y que se pueden obtener gratuitamente en la dirección del Instituto Pasteur: <http://bioweb.pasteur.fr>. Además de realizar alineamientos con un número de secuencias limitado, permiten el cálculo de varias propiedades de las proteínas, tales como la predicción de estructuras secundarias, perfiles de hidropatía y antigenicidad y composición aminoacídica de las secuencias introducidas.

Programas de filogenia molecular y visualización de árboles filogenéticos

El paquete informático más extendido para realizar estudios filogenéticos a partir de la comparación de secuencias es PHYLIP (Phylogeny Inference Package), desarrollado por Joseph Felsenstein y disponible gratuitamente para su uso en una gran variedad de plataformas en la dirección <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> (Felsenstein, 1989). Se trata de una colección de diversos programas que realizan comparaciones de secuencias mediante variados algoritmos y permiten el desarrollo de árboles filogenéticos. En este trabajo se ha empleado la versión 3.5 para Windows.

Los métodos empleados para estudios de filogenia molecular se dividen en cuatro grupos, todos ellos incluidos en PHYLIP:

- **Métodos de máxima parsimonia:** Se basan en encontrar el número mínimo de mutaciones necesarias para convertir una secuencia en otra. El programa sitúa tanto más cerca en el árbol filogenético dos secuencias cuanto menor es el número mínimo de pasos necesarios para interconvertirlas.

- **Métodos de máxima probabilidad:** Se basan en considerar todos los posibles árboles evolutivos para un conjunto de secuencias dado y evaluar entonces, mediante métodos estadísticos, cuál de ellos es el más probable. Lógicamente, cuando el número de secuencias es grande, no se pueden calcular todos los árboles posibles, sino que se emplean métodos heurísticos para hallar respuestas en un tiempo finito, aunque puede que el resultado no sea el óptimo.

- **Métodos de distancias:** Los métodos de distancias crean una matriz de distancias genéticas comparando todas las secuencias de entrada. Entonces, se parte de las dos secuencias con menor distancia entre ellas, y se calcula la distancia media entre este par con todas las demás, para ir construyendo así el árbol mediante un proceso iterativo. Los métodos de distancias asumen implícitamente la existencia de un "reloj molecular" que mantiene el ritmo de las mutaciones constante.

- **Métodos de relaciones vecinales (*Neighbor Joining*):** Son una variante de los métodos de distancias, que permiten crear árboles sin raíz. Los árboles con raíz, como los creados por los métodos de distancias, suponen la existencia de un ancestro común para todos los organismos representados en el árbol, fijando una dirección para el proceso

evolutivo. Se denominan también cladogramas. Por el contrario, los árboles sin raíz, también llamados radiales, muestran sólo las relaciones entre los organismos representados en el árbol, sin asumir que provienen de un ancestro común y sin fijar una dirección para la evolución.

Es de notar que PHYLIP, en la versión para Windows utilizada, no es capaz de realizar alineamientos, sino que requiere emplear como entrada un alineamiento de secuencias realizado mediante algún otro programa. Por ello, puede resultar más útil realizar el alineamiento vía Internet (WWW), con la implementación de CLUSTALW y PHYLIP, que se encuentra disponible en la dirección del Instituto Pasteur: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw.html>. En este caso, la entrada se realiza en forma de secuencias sin alinear. El programa sucesivamente emplea CLUSTALW para alinearlas, calcula las distancias genéticas, y usa PHYLIP para dar como resultado el árbol filogenético realizado con las distancias genéticas calculadas.

La visualización de los árboles filogenéticos obtenidos con los métodos anteriores se ha realizado con Treeview 1.5.2 para Windows, que está disponible en la dirección: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/> Se trata de un potente programa que permite la visualización de cladogramas y árboles filogenéticos en varios formatos, dentro del entorno Windows.

3.1.2. Programas de modelización molecular y *docking*

El programa SWISS-MODEL

SWISS-MODEL (Peitsch, 1995; Guex y Peitsch, 1997) es un programa de modelización molecular (*threading*) de uso público, que está localizado en el GLAXO Institute for Molecular Biology (GIMB) de Ginebra, al que puede accederse a través de Internet en la dirección: <http://expasy.hcuge.cg/swissmod/SWISS-MODEL.html>

Los programas de *threading* permiten modelar una secuencia de aminoácidos sobre estructuras tridimensionales conocidas experimentalmente y almacenadas en la base de datos del Protein Data Bank. El usuario únicamente debe introducir la secuencia de la proteína que desea modelar. El programa se encarga de alinearla con las secuencias cuyas estructuras existan en el Protein Data Bank que más identidad guarden con la secuencia problema. Una vez concluido el alineamiento, el programa sustituye los aminoácidos de la estructura por los de la secuencia problema (*threading*), tras lo cual realiza una etapa de optimización energética para dar lugar a un modelo teórico mejorado. El resultado es enviado al usuario por correo electrónico, en forma de fichero de texto con las coordenadas atómicas del modelo, en formato PDB (el mismo formato que se emplea para almacenar en el Protein Data Bank las estructuras reales obtenidas por RMN o difracción de rayos X).

Los resultados son tanto más confiables cuanto mayor sea la identidad de la proteína problema con las proteínas sobre cuyas secuencias se ha modelado, y cuanto más conservada esté la estructura tridimensional en la familia de proteínas a la que pertenece la molécula problema.

En este trabajo, SWISS-MODEL ha sido empleado para obtener los modelos teóricos de las tiorredoxinas f y m de guisante, cuyas estructuras no se conocen experimentalmente,

pero cuyas secuencias guardan una homología adecuada con las tiorredoxinas de *E. coli*, humana y de *Chlamydomonas*, que están contenidas en el banco de datos.

El programa WebLab Viewer

WebLab Viewer es un potente programa de visualización molecular desarrollado por Molecular Simulations Inc., heredero del ya clásico RasMol, y que está disponible al público de forma gratuita en la dirección de Internet: <http://www.msi.com>

En este trabajo se ha empleado la versión 2.01 para Windows 95. El programa permite una gran variedad de representaciones en tres dimensiones de estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de proteínas y ácidos nucleicos, con la capacidad de visualizar varias moléculas de forma simultánea y de realizar cálculos de diversos parámetros de la superficie molecular. Todas las representaciones moleculares de este trabajo, así como el desarrollo del modelo de interacción entre las tiorredoxinas y la FBPasa, han sido llevadas a cabo con este programa.

El programa GRAMM

GRAMM (Katchalski-Katzir *et al.*, 1992; Vakser, 1996) es un programa de cálculo de *docking* molecular. Es decir, trata de predecir teóricamente la zona de interacción entre dos moléculas, dadas las coordenadas tridimensionales de las mismas. El programa se encuentra aún en desarrollo, y es distribuido por sus autores con la advertencia de que sus resultados no son aún muy confiables. El algoritmo se basa en fijar la posición de una de las dos moléculas (normalmente la mayor) y realizar una minimización de la energía de interacción respecto a seis variables (las tres coordenadas de posición y los tres ángulos de rotación de la molécula menor). El programa da como resultado una lista con los resultados más probables (de menor energía).

La gran limitación de los algoritmos de predicción de *docking* actuales es el uso de estructuras rígidas, es decir, no tienen en cuenta la posibilidad de que los aminoácidos de la interfase entre las dos moléculas reajusten sus posiciones para acoplarse durante el proceso de unión, como probablemente ocurre en la realidad, lo cuál hace que el valor de sus predicciones sea muy limitado. La bondad de los resultados se estima según su peso estadístico. Es decir, si entre las 100 mejores soluciones hay 50 o 60 muy parecidas, posiblemente la situación real estará próxima a ellas. Por el contrario, si el programa predice numerosas soluciones no relacionadas entre sí, la predicción no será muy digna de tener en cuenta.

GRAMM posee varios parámetros ajustables, que permiten generar distintos tipos de predicciones, de los modos de operación que permite GRAMM, dos de ellos han sido los más empleados, habiendo sido sus resultados más exhaustivamente contrastados con los datos reales. Se trata de los métodos de *docking* geométrico y *docking* hidrofóbico.

El método de *docking* geométrico (Katchalski-Katzir *et al.*, 1992) tiene en consideración todos los átomos presentes en la superficie de las moléculas, calculando su energía de interacción en función de cómo se ajusten ambas superficies, desde el punto de vista de su complementariedad geométrica.

El método de *docking* hidrofóbico (Vakser y Aflalo, 1994) se diferencia del anterior en que únicamente tiene en cuenta las zonas hidrofóbicas de las superficies que se ponen en interacción.

Esto supone varias ventajas, en primer lugar, al usar menor cantidad de átomos en los cálculos, se reduce el tiempo de computación necesario; en segundo lugar, las zonas hidrofílicas son las que poseen mayor flexibilidad, siendo más susceptibles de reajustar sus posiciones relativas durante la interacción, por lo que tomarlas en consideración, dado que se emplean estructuras rígidas, no resulta muy significativo y podría empeorar, más que mejorar la predicción. Por el contrario, las zonas hidrofóbicas son mucho más rígidas y su estructura permanece más estable a la hora de interaccionar, como demuestra la comparación de las estructuras experimentales de muchos complejos que han podido ser cocrystalizados con la estructura de las proteínas aisladas (Korn y Burnett, 1991).

Estos autores pusieron de manifiesto que en las interfases entre las subunidades de un complejo multiproteínico existe una amplia complementariedad entre los grupos hidrofóbicos de las proteínas que se ponen en contacto y, además, que la hidrofobicidad es mayor en las zonas de contacto que en el resto de la superficie de las proteínas. Todo ello supone una justificación adecuada para el método de *docking* hidrofóbico.

Uno de los inconvenientes de GRAMM es que no se basa en el cálculo de energías físicas reales que tengan en cuenta los distintos tipos de interacciones existentes entre las proteínas: fuerzas electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas, interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno y puentes disulfuro. En lugar de ello, el método se basa en el cálculo, mediante transformada de Fourier, de una función de complementariedad geométrica, que asigna valores arbitrarios según el ajuste de las superficies de ambas proteínas, ya sea teniendo en cuenta todos los átomos o sólo aquellos de carácter hidrofóbico.

De hecho, ninguno de los programas de predicción de interacciones entre macromoléculas que existen en la actualidad cuantifica adecuadamente todos estos tipos de fuerzas que, por otra parte, aún no se comprenden en su totalidad. Los cálculos que serían necesarios para esta forma de aproximación global al problema caerían fuera del alcance de los ordenadores actuales. Esta es la principal razón por la cuál la realidad de las predicciones obtenidas por los presentes algoritmos de cálculo de *docking* deja bastante que desear.

3.2. CEPAS BACTERIANAS

En esta investigación se utilizaron dos tipos de cepas de *Escherichia coli*, según se deseara clonar y amplificar los plásmidos (cepas MC1022 y JM109) o expresar las proteínas correspondientes (cepa BL21(DE3)). Para clonar los plásmidos se requiere una cepa estable y de alta capacidad de transformación, mientras que para expresar las proteínas, dado que se usa el sistema de expresión T7 (Studier *et al.*, 1990), se requiere una cepa que porte el gen de la T7-ARN-polimerasa, tal como se detalla en el apartado 3.5.1.

Las características de las cepas utilizadas se detallan a continuación.

CEPA	GENOTIPO	APLICACIÓN	REFERENCIA
MC1022	araD139 (ara,leu)7697 (lacZ)M15 galK strA	Hospedador y amplificación del ADN plasmídico	Casadaban y Cohen, 1980
JM109	recA1 endA1 gyrA96 thl hsdR17 (r _K ⁻ ,m _K ⁻) supE44 Δ(lac- proAB) relA1 [F ⁻ traD36 proAB lacI ^q ZΔM15] λ ⁻	Hospedador con alta capacidad de transformación	Messing <i>et al.</i> , 1981
BL21(DE3)	F ⁻ ompT r _B ⁻ m _B ⁻ (λDE3) 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, inducible por IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido).

3.3. PLÁSMIDOS

Se han utilizado dos plásmidos como material de partida. El plásmido pET12a (Studier *et al.*, 1990), que es un plásmido comercial genérico para la expresión en T7 y el plásmido pMI (López Jaramillo, 1995), que es una modificación del plásmido anterior, en el cuál se ha subclonado el gen de la Trx m de guisante, en su forma silvestre.

3.3.1. El plásmido pET12a

El pET12a (Studier *et al.*, 1990) (figura 3.1) pertenece a la familia de los vectores pET (*plasmids for expression in T7*), diseñados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* de forma altamente eficaz. 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 conteniendo el gen deseado pueden quedar latentes cuando son portados por cepas bacterianas que no contengan o no expresen el gen de la polimerasa del T7, mientras que son sobre-expresados en cepas que contengan dicha polimerasa, pudiendo llegar la proteína recombinante a constituir hasta el 50% de la proteína total expresada por la célula.

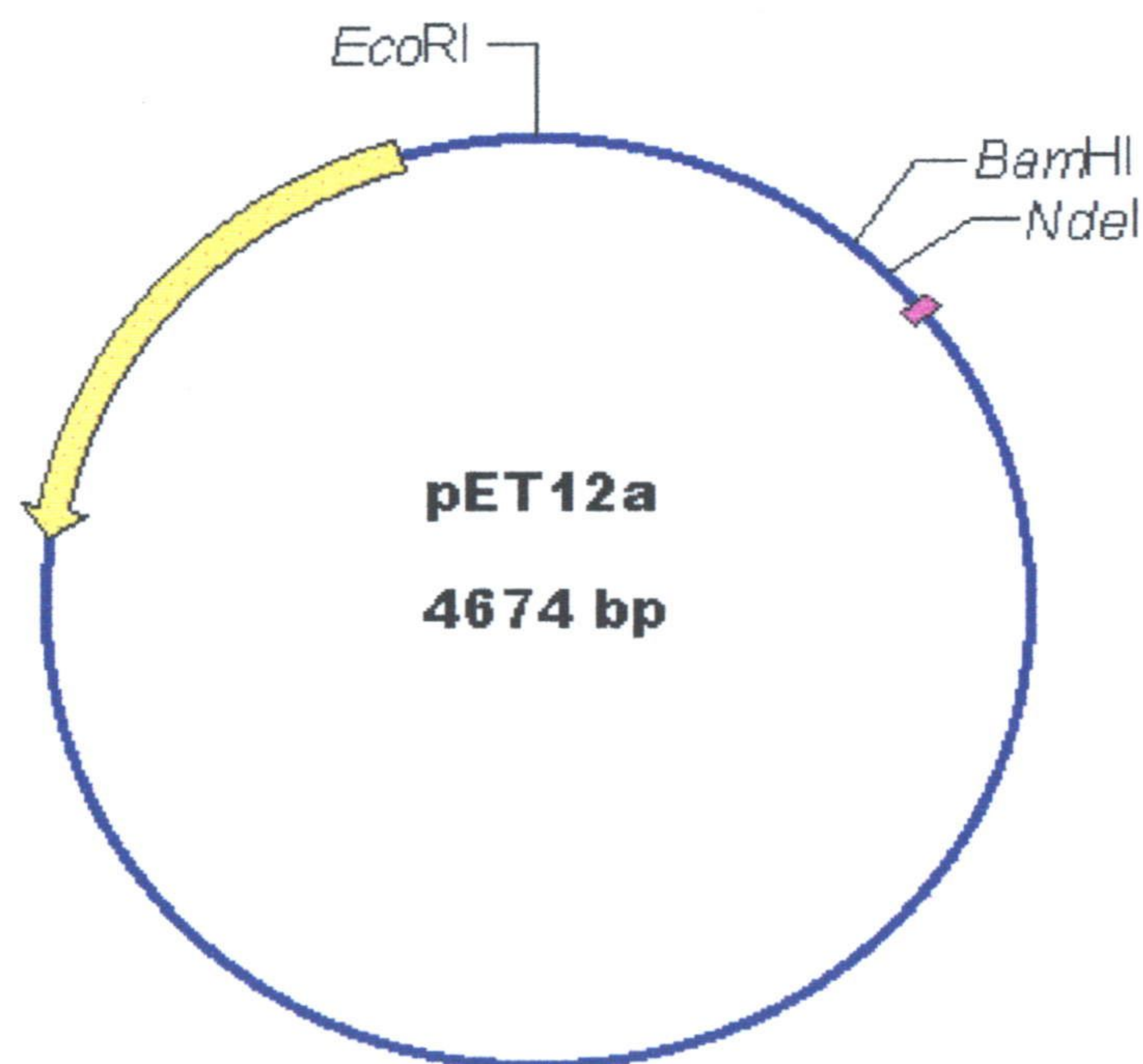


Fig. 3.1. Plásmido pET12a. Se representa en amarillo el gen de la β -lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina y en rosa el promotor T7, reconocible por la T7-ARN-polimerasa. Entre los sitios de reconocimiento de NdeI y BamHI se sitúa el péptido líder ompT, que facilita el tránsito de la proteína al periplasma celular.

El plásmido pET12a, como la mayoría de los pertenecientes a la familia pET, contiene el gen de la β -lactamasa, que confiere a la célula resistencia a la ampicilina, permitiendo así la selección de las bacterias transformadas.

El pET12a permite dos variaciones para subclonar genes. Si se subclona en el sitio NdeI, el ARN_m obtenido a partir del promotor T7 contendrá sólo la secuencia de la proteína deseada, comenzando con su codón iniciador de metionina (ATG). La otra opción, si se desea, es subclonar en el sitio BamHI, con lo cual la proteína recombinante contendrá la secuencia líder ompT, que consta de 26 aminoácidos y hace que la proteína se dirija al periplasma de la bacteria, permitiendo así su correcto plegamiento y evitando que aparezca como cuerpos de inclusión. Esta secuencia líder posteriormente puede ser eliminada mediante una peptidasa. En el presente trabajo, como no hubo problemas de cuerpos de inclusión durante la purificación de las tiorredoxinas, no se utilizó la secuencia líder, clonándose siempre las proteínas deseadas en el sitio NdeI.

El pET12a fue utilizado en este trabajo para subclonar los genes de las proteínas mutantes, mediante ligación con los insertos correspondientes.

Resumen de características del plásmido pET12a

Longitud:	4674 pb
Resistencia a antibióticos:	ampicilina (β -lactamasa)
Promotor del gen subclonado:	T7
Gen expresado por la ARN-polimerasa:	26 aminoácidos de la secuencia líder ompT
Sitios de clonación:	BamHI (proteína de fusión con la secuencia líder) NdeI (proteína sin líder)
Secuencias para oligos:	Promotor T7 (oligo T7) Terminador T7 (oligo T7-terminator)
Sitios de proteasas:	Peptidasa entre la secuencia líder y la proteína recombinante.

3.3.2. El plásmido pMI

El pMI (figura 3.2) fue obtenido en nuestro laboratorio (López-Jaramillo, 1995), al subclonar en el sitio NdeI del pET12a el gen de la Trx m silvestre de guisante a partir de una genoteca de ADNc de guisante, obtenida a partir de plántulas de guisante (*Pisum sativum* L. var. Alaska), de seis días de antigüedad, crecidas en presencia de luz.

El plásmido pMI permite la sobre-expresión de Trx m de guisante en *E. coli* BL21(DE3) y fue utilizado como molde a partir del cual realizar la mutagénesis dirigida de los aminoácidos objeto de este trabajo.

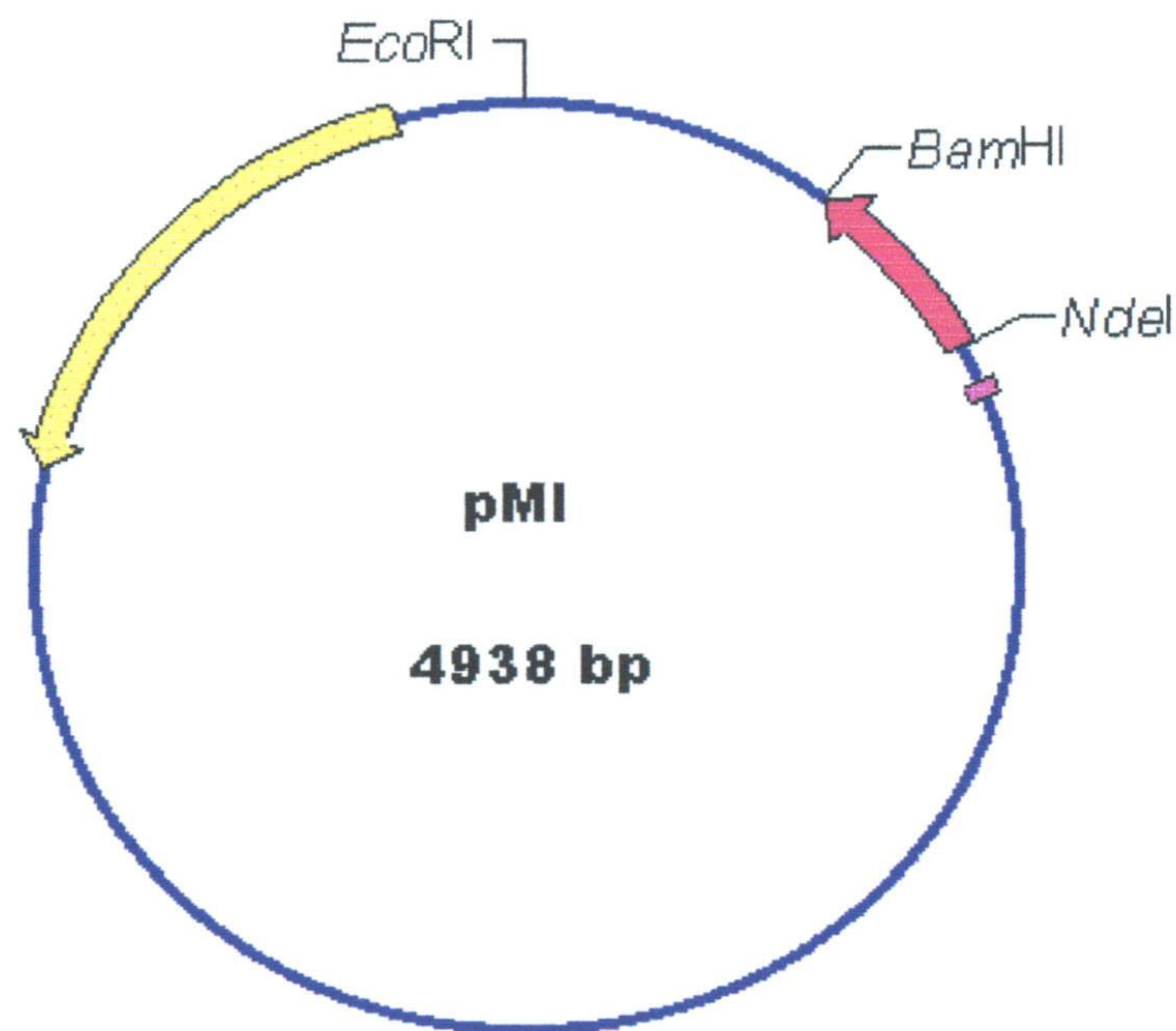


Fig. 3.2. Plásmido pMI. Se representa en rojo el gen de la Trx m de guisante. Las demás características son semejantes a las de la figura 3.1.

Resumen de características del plásmido pMI

Longitud:	4938 pb
Resistencia a antibióticos:	ampicilina (β -lactamasa)
Promotor del gen subclonado:	T7
Gen expresado por la ARN-polimerasa:	Tiorredoxina m silvestre de guisante
Secuencia líder:	ninguna
Secuencias para oligos:	Promotor T7 (oligo T7) Terminador T7 (oligo T7-terminator) Extremo amino de Trx m de guisante (oligo PeamN) Extremo carboxilo de Trx m de guisante (oligo PeamC)
Sitios de proteasas:	ninguno

3.4. MANIPULACIÓN DEL ADN

3.4.1. Aislamiento de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos bacterianos en fase estacionaria (normalmente, crecidos durante toda la noche en medio LB (anexo I) con ampicilina). Sólo se realizaron minipreparaciones (3-5 ml de cultivo). Se emplearon dos procedimientos, el utilizado normalmente era el de lisis alcalina, basado en Ish-Horowicz *et al.* (1981). Ocasionalmente, cuando se requería ADN de gran pureza (para la secuenciación, por ejemplo), se utilizó el kit comercial Wizard Miniprep, de Promega. El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante.

El procedimiento de lisis alcalina se basa en tratar el cultivo con NaOH y SDS para lisar las células y desnaturalizar el ADN y las proteínas, tras lo cual se neutraliza con una solución de acetato potásico que provoca la precipitación de las proteínas y el ADN cromosómico. El ADN plasmídico se renaturaliza y queda en disolución. Tras separar el precipitado, se purifica el ADN plasmídico mediante extracciones con fenol y fenol-cloroformo, precipitándolo con etanol y resuspendiéndolo finalmente en agua, Tris-HCl o TE (anexo I). Se prefirió usar agua en la mayoría de los casos, pues los plásmidos usados son suficientemente estables (hasta al menos 2 años a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), y el EDTA que contiene el TE puede afectar a las reacciones enzimáticas a las que sea sometido el plásmido.

Para un cultivo de 3 ml, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Centrifugar las células durante 2 min. en una centrífuga de mesa.
2. Resuspender el pellet celular en 100 μl de GTE (anexo I), suplementado con 10 μl de lisozima (50 mg/ml). Dejar 5 min. a temperatura ambiente para que actúe la lisozima.
3. Añadir 200 μl de disolución de NaOH (0.2 N) y SDS (5%), y dejar 5 min. en hielo.
4. Neutralizar con 150 μl de disolución de acetato potásico 5 M. Añadir 1 μl de ribonucleasa (10 mg/ml). Agitar al vórtex y dejar 5 min. en hielo para eliminar el ARN.
5. Centrifugar 3 min. y transferir la disolución clarificada a un nuevo tubo.
6. Extraer con 450 μl de fenol neutro (anexo I) para eliminar las proteínas. Agitar al vórtex, decantar mediante 5 min. de centrifugación y transferir a un nuevo tubo la fase acuosa (superior) conteniendo el ADN.
7. Añadir 1 ml de etanol al 95% y dejar 15 min. a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para precipitar el ADN.
8. Centrifugar 1 min. y recoger el pellet de ADN. Lavar éste con 1 ml de etanol al 70% para eliminar las sales. Agitar al vórtex y centrifugar de nuevo 1 min. Desechar el sobrenadante y secar durante 15 min. en bomba de vacío.
9. Resuspender en 20-40 μl de agua, Tris-HCl pH 7.9 o TE.

3.4.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis horizontal en geles de agarosa (McDonnell *et al.*, 1977), se utiliza para visualizar, analizar, identificar y purificar fragmentos de ADN. El fundamento de la técnica es el hecho de que a pH básico o próximo a la neutralidad, la relación carga/masa de una molécula de ADN es constante e independiente de su longitud, por lo que al ser sometidos a un campo eléctrico, los distintos fragmentos de ADN migrarán de forma inversamente proporcional a su tamaño, pudiendo separarse así los componentes de una mezcla de distintos fragmentos y calcularse el tamaño de estos por referencia a unos fragmentos de pesos moleculares conocidos (marcadores de peso molecular). Además, en el caso de fragmentos circulares, como los plásmidos, la migración depende también del grado de enrollamiento, migrando más los fragmentos que tengan un menor enrollamiento.

Para preparar un gel de agarosa se disuelve mediante calentamiento (un horno de microondas es lo más adecuado) la cantidad deseada de agarosa en buffer TBE o TAE, tras lo cual se vierte la cantidad deseada en un vidrio y se introduce un molde que permita la formación de los pocillos donde se va a cargar el ADN, dejando que se solidifique. Si el gel es analítico se prefiere el uso de TBE, por ser los resultados más reproducibles. Si el gel es preparativo y se pretende usar el ADN posteriormente para llevar a cabo reacciones enzimáticas sobre el mismo, se recomienda el uso de TAE o, mejor aún, TAE (bajo en EDTA), ya que el ácido bórico y el EDTA pueden inhibir a algunas enzimas de restricción y a la ADN-polimerasa.

La concentración de la agarosa utilizada en el gel depende del tamaño de los fragmentos que se deseen separar. En este trabajo se utilizaron fundamentalmente tres concentraciones: 0.8% para separar o visualizar plásmidos completos (de 1 a 15 kb), 1.5% para fragmentos intermedios e insertos (de 100 pb a 2 kb) y 3% para los fragmentos más pequeños (menores de 300 pb). En este último caso, la agarosa utilizada era un 2% de agarosa normal y un 1% de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve de FCF Corp. o similar), para facilitar la fusión del gel. Si el gel es preparativo y se va a realizar la extracción de las bandas de ADN mediante fenol, se puede utilizar agarosa de bajo punto de fusión exclusivamente, lo que facilita la purificación posterior del ADN (apartado 3.4.3).

Para llevar a cabo la electroforesis, se dispone el gel ya solidificado en una cubeta de electroforesis horizontal, tras lo cual se carga en cada pocillo una mezcla de la muestra a analizar con tampón de carga (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.3% (p/v)) y se corre la electroforesis a un voltaje de 5 a 10 V/cm durante 45 minutos a 1 hora. Para visualizar el ADN el gel se tiñe por inmersión en una solución de bromuro de etidio de 1mg/l durante 10-15 minutos y, tras lavar con agua, se expone a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador.

Como marcadores de peso molecular se emplearon los denominados X de Boehringer Mannheim, que incluyen fragmentos de 0.13 hasta 12.2 kb, con bandas espaciadas aproximadamente 1 kb.

3.4.3. Extracción de ADN de geles de agarosa

Para purificar los fragmentos de ADN tras una reacción enzimática se han empleado dos métodos de extracción del mismo a partir de un gel de agarosa. Normalmente se ha utilizado el método de extracción con fenol. Ocasionalmente, se ha empleado el kit comercial QIAEx II, de la casa QIAgen, utilizando en ese caso el protocolo descrito por el fabricante.

La extracción 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 forman la agarosa son solubles en fenol. Si se enfría mediante inmersión súbita en nitrógeno líquido, el gel de agarosa se descompone y los fragmentos de agarosa se disuelven en la fase orgánica, quedando una fase acuosa que contiene el ADN. Antes del choque térmico con nitrógeno líquido, es necesario trocear el gel de agarosa en fragmentos del menor tamaño posible, para que la extracción sea eficaz. En el caso de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve) no es necesario, ya que basta con calentar la mezcla del fenol y el fragmento de gel a 60 °C durante 5 min. para que se produzca la fusión del gel, antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se corta la banda deseada del gel de ADN con una cuchilla o cutter y se la dispone en un tubo Eppendorf (se realiza esta operación en el transiluminador tras la inmersión en bromuro de etidio, lo que permite visualizar la banda).
2. Se dispone el trozo de agarosa sobre un cristal limpio y se corta con una cuchilla en fragmentos pequeños. Si se trata de agarosa Nusieve, este paso no es necesario.
3. Se disponen los trocitos de agarosa en el mismo Eppendorf y se añaden 500 µl de fenol neutro. Si se trata de Nusieve, se calienta a 60 °C hasta que se produzca la fusión del gel (unos 5 min). Se mezcla enérgicamente al vórtex, obteniéndose un color lechoso.
4. Se sumerge el tubo en nitrógeno líquido durante 2 min. hasta que se congele. Se saca y se centrifuga 10 min. en centrífuga de mesa. Aparecen dos fases, estando el ADN en la fase acuosa, superior.
5. Se pasa la fase acuosa a un tubo limpio y se añade 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1).
6. Se mezcla enérgicamente al vórtex y se centrifuga 5 min.
7. Se saca de nuevo la fase acuosa y se añade un volumen de isopropanol (conservado a -20 °C) y 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M.
8. Se agita al vórtex y se lleva a -80 °C una media hora para que precipite el ADN.
9. Se centrifuga a 4 °C, 15 min. a 10.000 rpm.
10. Se retira el sobrenadante y se seca el tubo a vacío (unos 15 min.).
11. Se resuspende el ADN en 20 µl de agua estéril.

3.4.4. Medida de la concentración de ADN

La estimación de forma aproximada de la concentración del ADN a partir de un gel de agarosa, se puede realizar por comparación directa con las bandas de los marcadores de peso molecular, sabiendo que el mínimo que se puede visualizar mediante tinción con bromuro de etidio es de 5 ng de ADN y suponiendo conocida la cantidad de ADN correspondiente a cada banda del marcador de peso molecular (suministrada por el fabricante).

Cuando se precisa una medida más exacta de la concentración, se puede emplear el método espectrofotométrico descrito por O'Hara-Mays y Capwell (1993) que, además, permite evaluar la pureza de la muestra. Consiste en determinar la absorbancia de la solución de ADN a 340 nm, 260 nm, 270 nm y 280 nm, frente a un blanco de TE. La concentración de la muestra se calcula respecto al valor estándar de $A_{260} = 1$ para soluciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena doble. La relación A_{260}/A_{280} indica si existe contaminación con ARN, proteínas o fenol. Cuando esta relación es mayor de 1.85 existe contaminación con ARN, y si es menor de 1.65 la contaminación es con proteínas o fenol. La presencia de fenol en la 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.

3.4.5. Amplificación de ADN mediante PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988; Innis *et al.*, 1990) es uno de los métodos más versátiles y útiles que puede utilizar el biólogo molecular. Consiste en la amplificación selectiva de los fragmentos de ADN comprendidos entre las secuencias de dos oligonucleótidos, conocidos como cebadores o primers (figura 3.3). La reacción es posible gracias al empleo de la ADN-polimerasa extraída de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, conocida como Taq-polimerasa, que es capaz de soportar sin desnaturalizarse ni disminuir significativamente su actividad sucesivas incubaciones a temperaturas próximas a 95 °C. Un aparato de PCR básicamente consiste en un bloque (o baño) a temperatura controlada y programable, ya que lo único que se requiere es que se lleven a cabo diversos ciclos de calentamiento y enfriamiento. El disponible en nuestro laboratorio es un Perkin-Elmer Geneamp 2400 y tiene la ventaja de que no requiere añadir a la muestra aceite de parafina para evitar pérdidas por evaporación, como sucede en otros modelos anteriores.

Las reacciones de amplificación se pueden hacer con fines analíticos o preparativos. Con fines analíticos, se suelen usar 25 μl de volumen total, mientras que con fines preparativos se emplean 100 o 200 μl totales, normalmente repartidos en tubos de 25 μl , que se mezclan al final de la operación; todo ello porque el control de la temperatura es más eficaz a menor volumen de muestra.

Una reacción de PCR requiere cuatro componentes fundamentales:

1. El ADN a amplificar (100-150 ng por cada 25 μl).
2. Los dos cebadores o primers específicos (uno directo y otro inverso) (20 ng de cada uno).
3. La enzima Taq-polimerasa (2 unidades).
4. Los desoxinucleótidos-trifosfato necesarios para sintetizar el ADN (2.5 nmol de cada uno de los cuatro: dATP, dTTP, dCTP y dGTP).

Además, es necesario ponerlo todo en un buffer adecuado (suministrado por el fabricante), que contiene Mg^{++} , requerido como cofactor para que la Taq-polimerasa sea activa al pH al cual se lleva a cabo la reacción (normalmente 7.5).

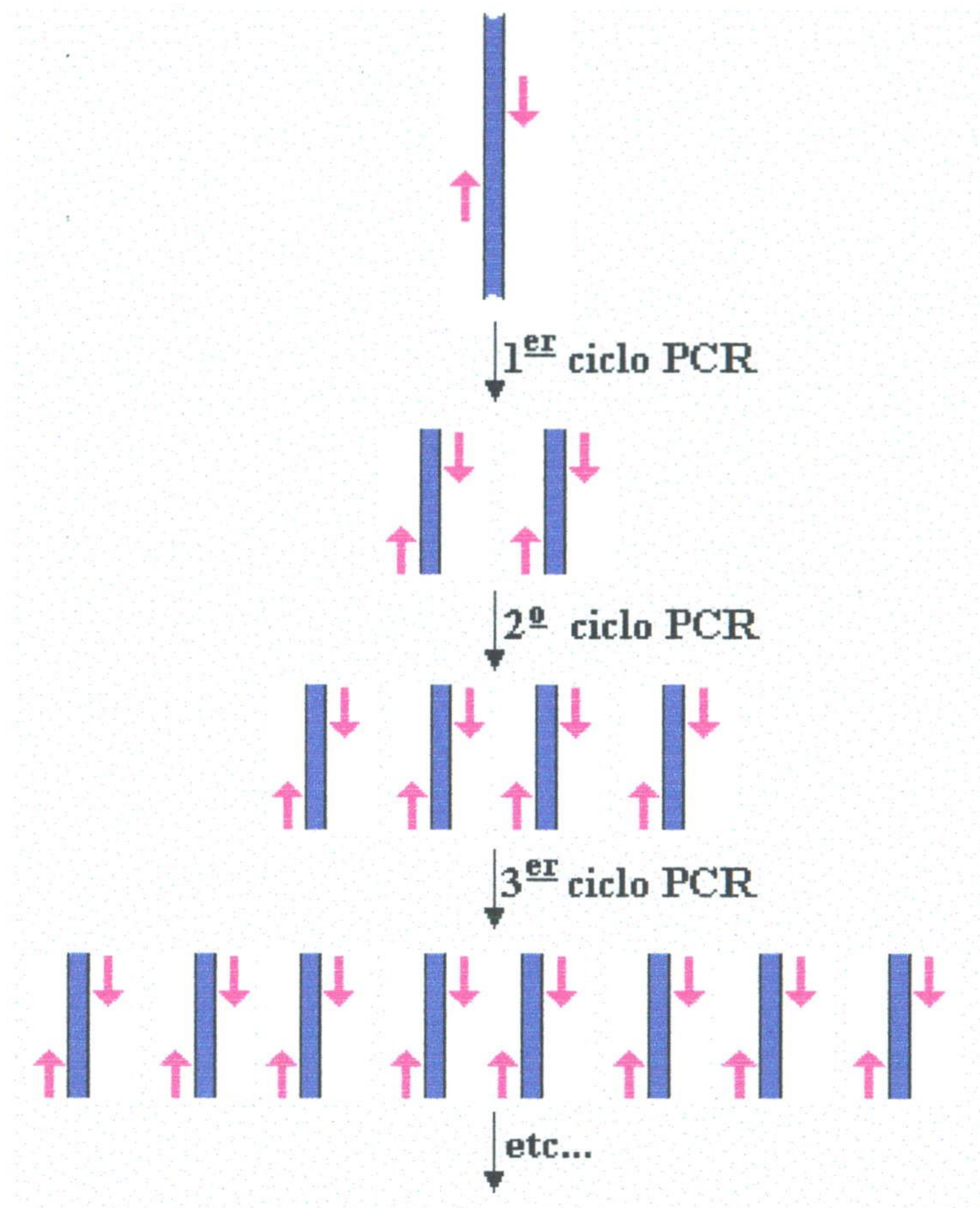


Fig. 3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En azul se representa el ADN y en rosa los oligonucleótidos que actúan de primers o cebadores de la Taq-polimerasa. En cada ciclo se dobla la cantidad de ADN de partida.

Una reacción de PCR típica comprende tres partes:

1. Una etapa de desnaturalización (normalmente 5 min. a 95 °C), durante la cuál se separan las dos cadenas del ADN, paso necesario para que se puedan aparear los cebadores.
2. Varios ciclos (de 25 a 40, normalmente) de amplificación, cada uno de los cuales comprende tres etapas:
 - 2.1. Desnaturalización a 95 °C (1 min. habitualmente).
 - 2.2. Apareamiento a una temperatura T_m que depende de la composición de los oligos y de la longitud de éstos (1.5 min. habitualmente).
 - 2.3. Extensión a 70 °C durante 1 minuto típicamente, aunque el tiempo de extensión depende de la longitud del ADN que se pretenda obtener.
3. Una etapa de extensión final a 70 °C (5 min.) para rellenar los posibles huecos y completar las cadenas de ADN que hayan podido quedar sin terminar.

La T_m (melting temperature) puede calcularse de modo orientativo mediante la fórmula: T_m (°C) = 2 (A+T) + 4(C+G), aunque puede ser necesaria una confirmación experimental. A una T_m excesiva los oligos no podrán aparearse con el ADN y no se producirá la amplificación, pero a una T_m demasiado baja es posible que se produzcan reacciones inespecíficas y los productos de PCR pueden aparecer contaminados.

Los productos de PCR pueden analizarse mediante electroforesis en geles de agarosa. Para purificarlos con fines preparativos puede emplearse la extracción con fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol, sólo si la PCR ha ido muy bien y se obtiene un único producto (una única banda en electroforesis de agarosa). Si aparecen bandas contaminantes es necesario un paso previo de purificación en gel de agarosa preparativa, y posterior extracción de la banda deseada.

3.4.6. Restricción de ADN

Las enzimas de restricción (también denominadas endonucleasas o restrictasas) son una herramienta fundamental de trabajo en biología molecular. Son proteínas que rompen la cadena de ADN en sitios determinados y específicos (sitios de restricción). Las más utilizadas son las de tipo II (Fuchs y Blakesley, 1983), que 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 mucho más útiles a la hora de subclonar insertos en plásmidos.

Las digestiones con enzimas de restricción se realizan en las condiciones óptimas que fija el fabricante para cada enzima, ya que éstas difieren bastante unas de otras. Con fines analíticos, se suelen llevar a cabo en 25 μ l de volumen total, con 0.5-1 μ g de ADN y 1 unidad enzimática de la enzima, en el tampón fijado por el fabricante. Con fines preparativos se pueden cortar hasta 5 μ g de ADN, con 10 unidades enzimáticas en un volumen total de 100-150 μ l de tampón. Normalmente se incuba a 37 °C durante 1 ó 2 horas, en función de la cantidad de ADN y de enzima empleadas, teniendo presente que una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que digiere completamente 1 μ g de ADN (habitualmente del fago λ) en 1 h en las condiciones de digestión óptimas.

En las técnicas de clonaje molecular es habitual tener que cortar el ADN, tanto del vector que se va a emplear como del inserto que se quiere subclonar, con dos enzimas de restricción distintas. Las digestiones dobles suelen presentar ciertos problemas cuando las condiciones óptimas de las dos enzimas no son compatibles (distintos tampones de restricción), por lo que a veces es necesario llevar a cabo determinadas estrategias que permitan llevar a cabo la doble digestión de un modo eficaz. En este trabajo se han utilizado digestiones dobles con EcoR I y Nde I, que no requieren un tratamiento especial, por ser ambas enzimas eficaces en el mismo tampón (buffer H de Boehringer Mannheim). Sin embargo, la digestión con BamH I y Nde I requiere un protocolo especial, consistente en utilizar un volumen grande (150 μ l), emplear el tampón adecuado para Nde I (Buffer D de Promega) e incubar con dicha enzima durante dos horas. Al final de este tiempo, se añade BamH I (doble cantidad de la empleada normalmente) y un poco más de Nde I, dejando incubar a 37 °C de 6 a 7 horas.

Opcionalmente se puede añadir a las mezclas de restricción seroalbúmina bovina acetilada (BSA) (0.1 µg/ml), lo cual aumenta la eficacia de la mayoría de las enzimas de restricción y, además, impide que éstas corten el ADN en sitios inespecíficos.

Las enzimas de restricción empleadas en el presente trabajo se detallan en la siguiente tabla:

ENZIMA	FABRICANTE	SITIO DE RESTRICCIÓN	EMPLEO EN ESTE TRABAJO
EcoR I	Boehringer Mannheim	G [^] AATTC	Clonaje molecular del mutante R74E
BamH I	Boehringer Mannheim	G [^] GATCC	Clonaje molecular del mutante E63Q
Nde I	Promega	CA [^] TATG	Clonaje molecular de ambos mutantes
Nco I	Boehringer Mannheim	CC [^] ATGG	Análisis de los plásmidos mutantes
Ava II	Boehringer Mannheim	G [^] GWCC ¹	Análisis de los plásmidos mutantes

¹ W representa A o T, indistintamente.

3.4.7. Ligación del 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 clonaje molecular la más empleada es la ligasa del fago T4 (T4-ligasa), debido a su eficacia y a que permite 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 (Dugaiczyk *et al.*, 1975; Maniatis *et al.*, 1982).

Un paso clave en el clonaje molecular es la ligación del inserto conteniendo el gen a clonar y el plásmido linealizado adecuado, ambos cortados con enzimas de restricción compatibles. Estas moléculas se combinaron según proporciones variables, no sobrepasando la cantidad final de 300 ng de ADN total. La ligación se llevó a cabo en 20 µl del tampón de ligasa adecuado, suministrado por el fabricante y que contiene ATP necesario para la actividad de la ligasa, utilizando 1 unidad de ligasa del fago T4 e incubando toda la noche a 12-15 °C. Ocasionalmente se recurrió a tiempos de ligación más largos, de hasta 48 horas.

3.4.8. Secuenciación de ADN

Los métodos de secuenciación de ADN se han automatizado en los últimos años, mejorando en rapidez, eficacia y reproducibilidad, así como abaratando su coste hasta límites difícilmente imaginables hace una década. Para realizar la secuenciación de los plásmidos obtenidos en este trabajo se ha recurrido al Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", de Granada, que dispone de un secuenciador automático ABI-Prism que secuencia eficazmente hasta unas 500 bases a un coste muy razonable.

3.4.9. Mutagénesis dirigida del ADN

Para realizar la mutagénesis dirigida (el cambio de un codón determinado de una secuencia codificante de ADN por otro codón que codifique para el aminoácido deseado), se ha usado el protocolo descrito por Corkmack (1991). Se basa en la realización de dos reacciones de PCR consecutivas, empleando como cebadores los oligos de principio y final del gen a mutar, así como dos oligos internos que contengan el codón que se quiera introducir en el gen (figura 3.4).

En la primera PCR se amplifican las dos mitades del gen, empleando, por una parte, el oligo del extremo amino del gen junto con el oligo inverso que contenga la mutación y, por otra, el oligo directo conteniendo la mutación y el oligo inverso del extremo carboxilo. Se obtienen así dos mitades del gen conteniendo la mutación deseada, que se superponen en diez o doce pares de bases.

En la segunda PCR se utilizan las dos mitades así obtenidas como molde para la polimerasa, empleando los oligos de los extremos amino y carboxilo. Si todo va bien, se obtiene tras la amplificación un inserto final de la misma longitud que el gen inicial, pero que contiene el codón codificador de la mutación.

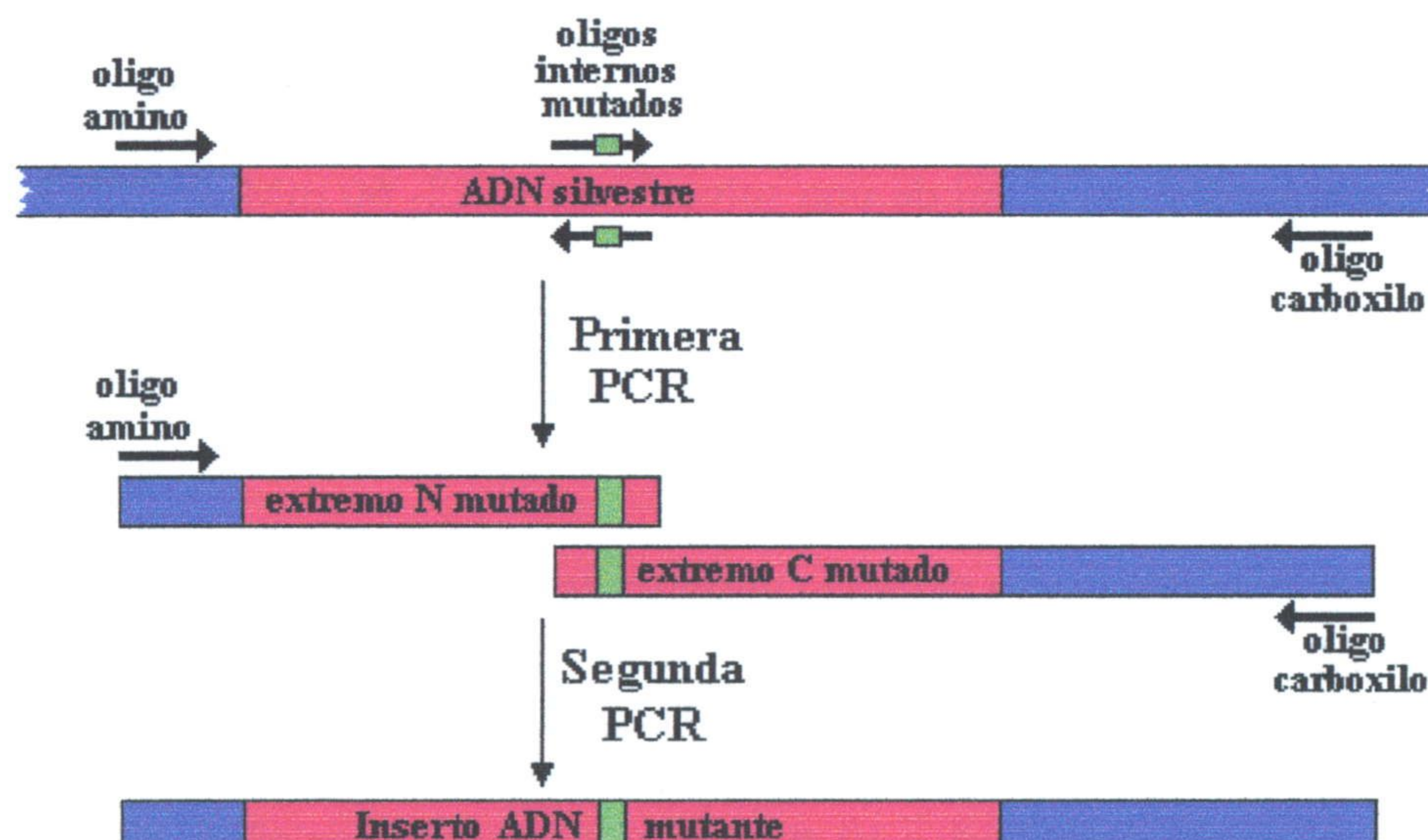


Fig. 3.4. Mutagénesis dirigida mediante doble PCR.

3.5. MANIPULACIÓN DE *Escherichia coli*

3.5.1. Medios de cultivo

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

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

Para preparar el medio sólido para las placas (LBA), se adiciona al medio 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. Para usarla en los medios de cultivo se diluyó mil veces, de modo que la concentración final en éstos fue de 100 µg/ml.

3.5.2. Preparación de células competentes

La transfección de ADN al interior de las células de *E. coli* fue estudiada por Cohen *et al.* (1972), a partir de las observaciones preliminares de Mandel y Higa (1970), según las cuáles la exposición de *E. coli* a CaCl₂ y otros iones divalentes a temperaturas próximas a 0 °C favorecía la penetración del ADN extraño en la célula. El tratamiento con CaCl₂ en frío origina un estado especial de la célula denominado competencia. Para preparar células competentes se toman 3 ml de un cultivo en fase estacionaria de la cepa correspondiente de *E. coli* y se diluyen en 500 ml de medio LB, llevándose a incubar a 37 °C y agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($A_{600\text{ nm}} = 0.4 - 0.6$). A partir de este momento se trabaja en frío, ya que la supervivencia de las células competentes está limitada por la temperatura. Se recogen las células por centrifugación a 3000 g durante 10 min. y se resuspenden en 30 ml de una solución de CaCl₂ 60 mM en PIPES 10 mM, pH 7, y glicerol al 15% (v/v). Se incuba 40 min. en hielo y se vuelven a recoger por centrifugación 10 min. a 2100 g. De nuevo se resuspenden en 6 ml del tampón anterior, y se fraccionan en alícuotas de 200 µl. Si no se van a utilizar inmediatamente, pueden almacenarse a -80 °C, manteniéndose su competencia durante varios meses.

3.5.3. Transformación de las células competentes

Se añaden de 0.1 a 1 µg de ADN plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes y se deja incubando 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 5 - 10 min. A continuación se añaden 800 µl de LB y se incuba media hora a 37 °C, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico correspondiente (en nuestro caso, la expresión de la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina). Finalmente se centrifuga el cultivo y se resuspende el pellet celular en 100 µl de LB, sembrándose entonces en placas selectivas de LBA-ampicilina. Las placas se dejan crecer a 37 °C durante toda la noche.

3.6. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.6.1. Expresión de los plásmidos recombinantes en *Escherichia coli*

Para la expresión de las proteínas recombinantes se ha empleado el sistema de expresión T7 (Studier *et al.*, 1990), clonando los genes deseados en el vector de expresión pET12a.

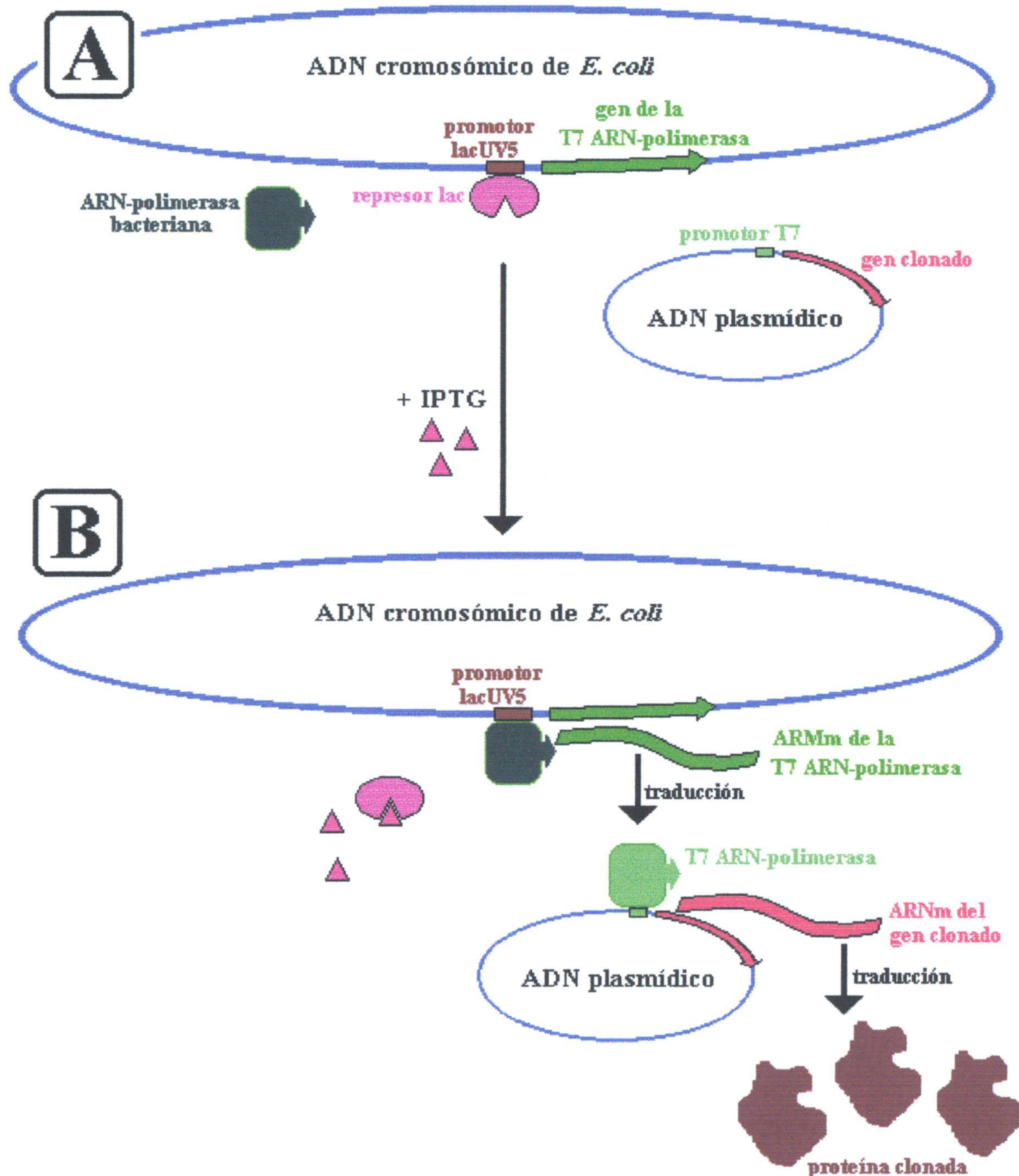


Fig. 3.5. Sistema de expresión T7. Explicación en el texto.

El funcionamiento del sistema de expresión T7 puede observarse en la figura 3.5. En la figura se observa el genoma bacteriano de una cepa apta para la expresión en este sistema, tal como la cepa BL21(DE3), que ha sido usada en este trabajo. Esta cepa porta en su genoma el ADN del bacteriófago lisogénico λ DE3, que contiene el gen de la T7-ARN-polimerasa bajo el control del promotor lacUV5, que es un derivado del promotor lac, inducible por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido). La cepa ha sido transformada con el plásmido de la familia pET (*plasmid for expression in T7*) donde se ha subclonado el gen que se desea expresar (en rojo), bajo el control del promotor T7.

En la parte superior de la imagen (A), se observa la situación antes de añadir el inductor IPTG. Ni la T7-ARN-polimerasa ni el gen clonado se expresan en absoluto, ya que el represor lac impide la transcripción de la T7-polimerasa.

Al añadir IPTG (B), se libera el represor, permitiendo a la ARN-polimerasa bacteriana iniciar la transcripción de la T7-ARN-polimerasa, que se expresa en el citoplasma 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.

Al ser la polimerasa del T7 mucho más eficaz que la bacteriana, el sistema de expresión basado en T7 presenta un rendimiento sorprendente, que puede llegar en algunos casos a que el 50% de la proteína expresada por la bacteria sea la deseada. A ello contribuye el hecho de que los plásmidos de la familia pET son de alto número de copia, encontrándose incluso centenares de copias en el interior de una célula bacteriana. Por todo ello, el sistema de expresión pET resulta adecuado para la expresión de la mayor parte de las proteínas, incluso de las que son tóxicas para la célula, ya que en ausencia de IPTG la expresión basal es prácticamente inexistente.

Para expresar las proteínas recombinantes subclonadas en vectores de la familia pET se ha utilizado generalmente el siguiente protocolo.

1.- Preamplificación del cultivo: se toma una colonia de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformada con el plásmido que se desee expresar, y se inoculan 3 ml de LB con ampicilina, incubando el cultivo a 37 °C y agitación durante unas 8 h. Pasado ese tiempo se toman 150 μ l del cultivo y se inoculan en 150 ml de LB con ampicilina, dejando incubar toda la noche a 37 °C y agitación.

2.- Obtención de un cultivo en fase exponencial y expresión. Se reparten los 150 ml de cultivo de la noche anterior en tres matraces conteniendo 1 L de LB con ampicilina cada uno, y se incuba con agitación hasta que se alcance la fase exponencial temprana ($Abs_{600} = 0.8 - 1$), momento en el cuál se añade IPTG hasta una concentración 100 μ M, para inducir la expresión de la T7-ARN-polimerasa y, por tanto, la expresión del gen recombinante. Se incuba a 37 °C durante 4 a 6 horas para expresar el gen. Finalizada la expresión, se recogen las células por centrifugación a 6000g durante 10 minutos y se almacenan a -80 °C hasta el momento de su purificación.

3.6.2. Purificación de las tiorredoxinas expresadas en *E. coli*

Para la purificación de las tiorredoxinas se ha utilizado el protocolo descrito en López-Jaramillo (1995), aunque con algunas modificaciones, entre las cuáles se incluye la adición de un inhibidor de proteasas y un pase por una columna de cambio iónico para eliminar la contaminación de ADN.

Las células correspondientes a 3 l de cultivo se resuspenden en 40 ml de Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, 300 mM de NaCl y 14 mM de mercaptoetanol (tampón de tiorredoxinas), suplementado con fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 1mM (inhibidor de proteasas), y se rompen por presión en una prensa French a 60 MPa. A continuación los restos celulares se separan por centrifugación durante 20 min. a 20000g. Si se trata de la Trx m o de los mutantes de ésta, se incluye un paso de calentamiento a 85 °C durante 10 min. La Trx f, por ser menos termorresistente, no se calienta. Las proteínas desnaturizadas se separan mediante 20 min. de centrifugación a 20000g. A continuación, se fracciona con sulfato amónico entre 40% y 85% de saturación. Las proteínas precipitadas son resuspendidas en el tampón de tiorredoxinas y se pasan por una columna de filtración en gel Sephadex G-50, equilibrada con el mismo tampón (figura 3.6). Las fracciones obtenidas son analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS; las que contienen tiorredoxina son recogidas, concentradas por diálisis frente a carboximetil-celulosa de alta viscosidad, hasta un volumen de 5 ml, dializadas frente a buffer fosfato 25 mM, pH 7.9, y pasadas por una columna de cambio iónico de DEAE-celulosa equilibrada en el mismo buffer, con un gradiente de 0 a 600 mM en NaCl, con el fin de eliminar las contaminaciones de ADN. La Trx sale al principio del gradiente completamente pura (figura 3.7). Se comprueba su pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción de plata.

3.6.3. Purificación de la FBPasa expresada en *E. coli*

La FBPasa cloroplastídica de guisante recombinante, expresada en *E. coli* BL21(DE3) fue purificada según el protocolo desarrollado por López-Jaramillo y colaboradores (Jacquot *et al.*, 1995).

Las células correspondientes a 3 l de cultivo se resuspenden en 40 ml de Tris-HCl 30 mM, pH 8, 1 mM de EDTA y 14 mM de mercaptoetanol, suplementado con fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 1mM (inhibidor de proteasas), y se rompen por presión en una prensa French a 60 MPa. Los restos celulares se separan por centrifugación durante 20 min. a 20000g, y el sobrenadante se calienta a 60 °C durante 5 min. Las proteínas desnaturizadas se eliminan por centrifugación a 20000g durante 15 min. A continuación, se fracciona con sulfato amónico entre 35% y 80% de saturación. Las proteínas precipitadas son resuspendidas en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.5, y se pasan por una columna de filtración en gel Sephadex G-100, equilibrada con el mismo tampón (figura 3.8). Las fracciones conteniendo actividad FBPasa se reúnen y se pasan a través de una columna de DEAE celulosa equilibrada en el mismo tampón acetato, eluyendo con un gradiente entre 0 y 600 mM en NaCl. La FBPasa eluye a una concentración de NaCl de alrededor de 300 mM (fig. 3.9). Se concentran las fracciones con actividad FBPasa frente a carboximetil-celulosa y se pasan por una columna de Sephacryl HR-200 para eliminar las impurezas de mayor peso molecular (fig. 3.10). Se obtiene la FBPasa prácticamente pura, según análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción de plata

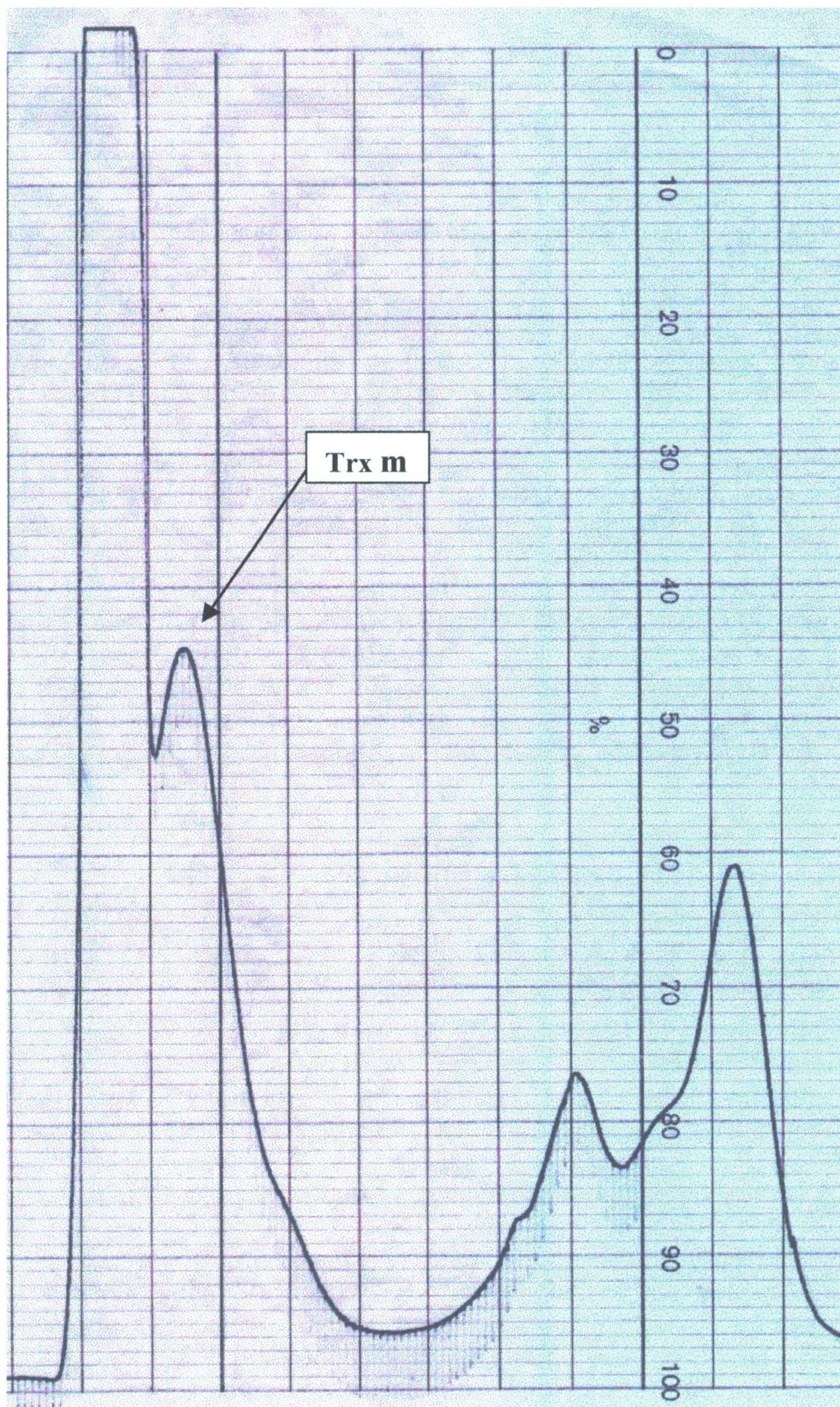


Fig. 3.6. Cromatograma del pase por Sephadex G-50 del extracto de bacterias conteniendo Trx m.

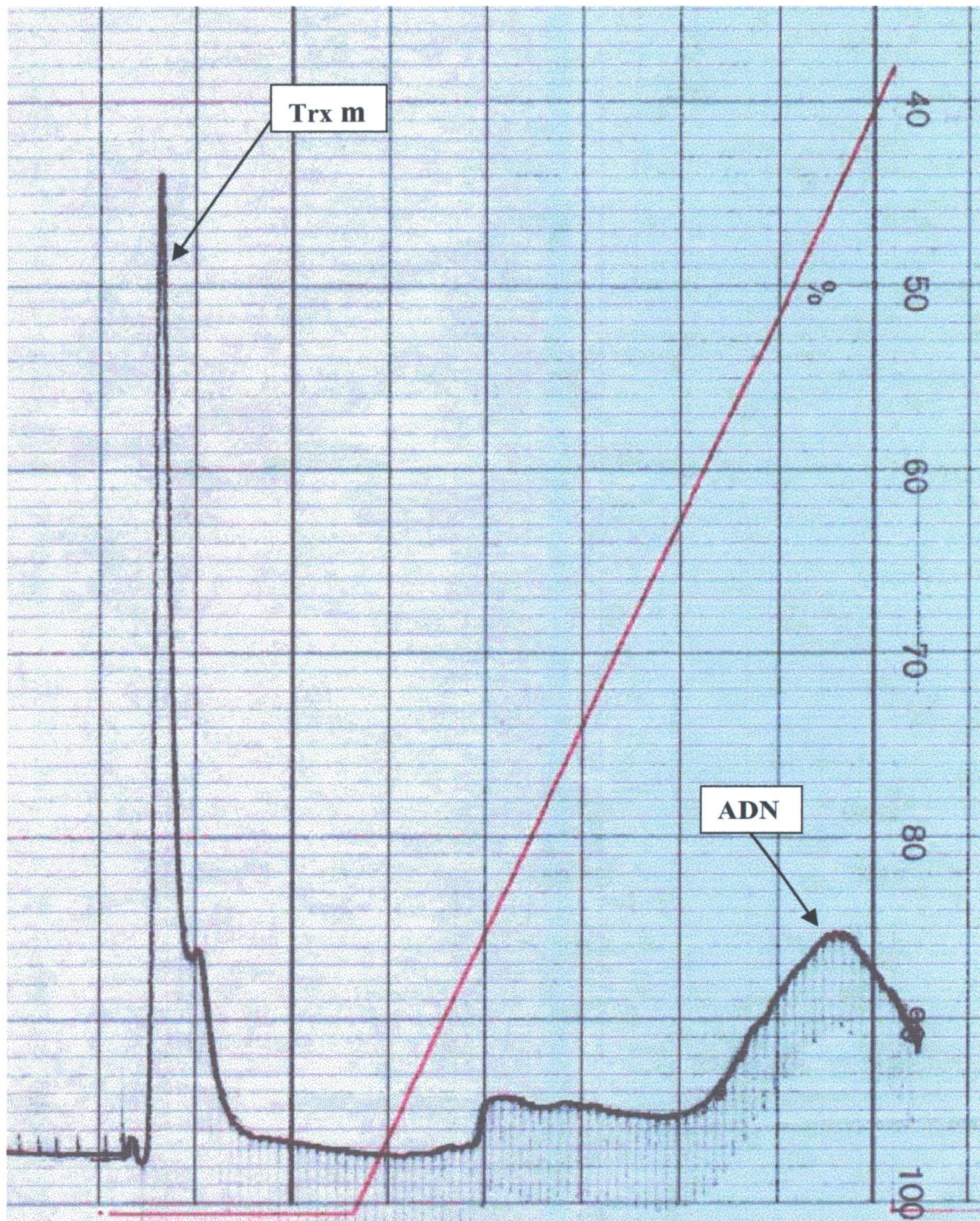


Fig. 3.7. Cromatograma del pase por DEAE-celulosa de las fracciones procedentes de G-50 conteniendo Trx m. Se observa que el ADN se separa, eluyendo de la columna a una alta concentración de NaCl.

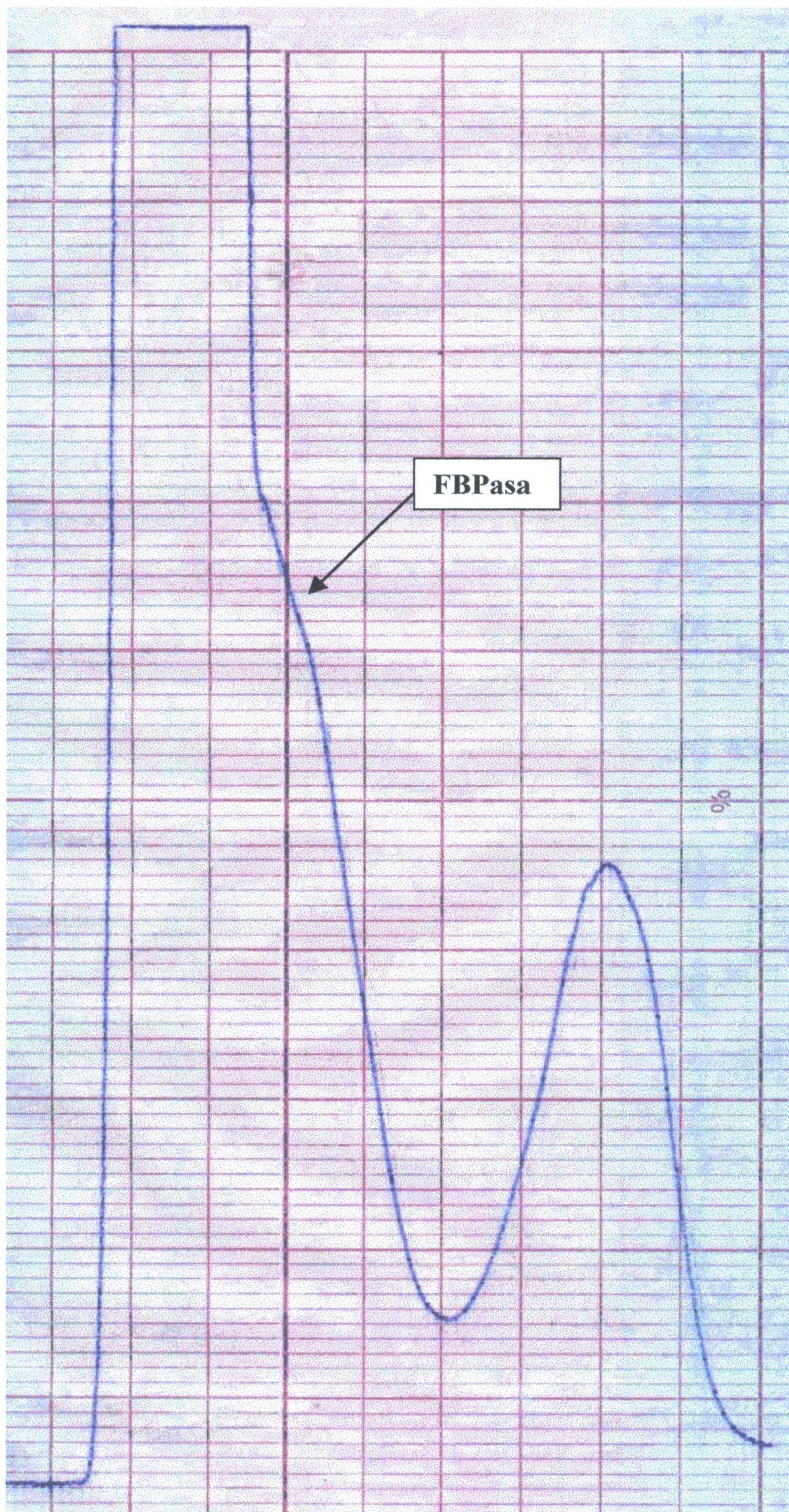


Fig. 3.8. Cromatograma del pase por Sephadex G-100 del extracto de bacterias conteniendo FBPasa.

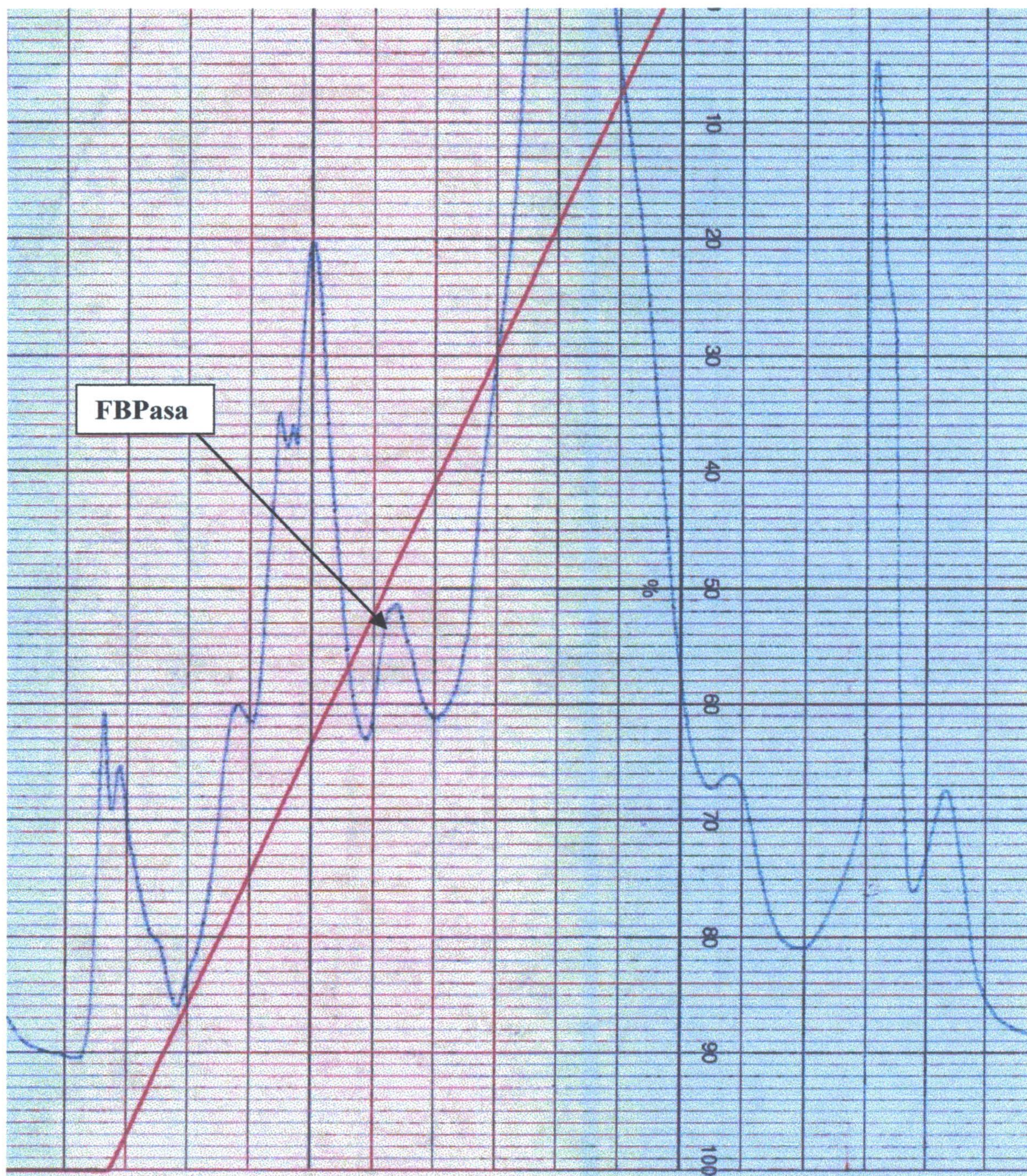


Fig. 3.9. Cromatograma del pase por DEAE-celulosa de las fracciones procedentes de G-100 conteniendo actividad FBPasa. La FBPasa sale a una concentración de sal aproximadamente de 300 mM.

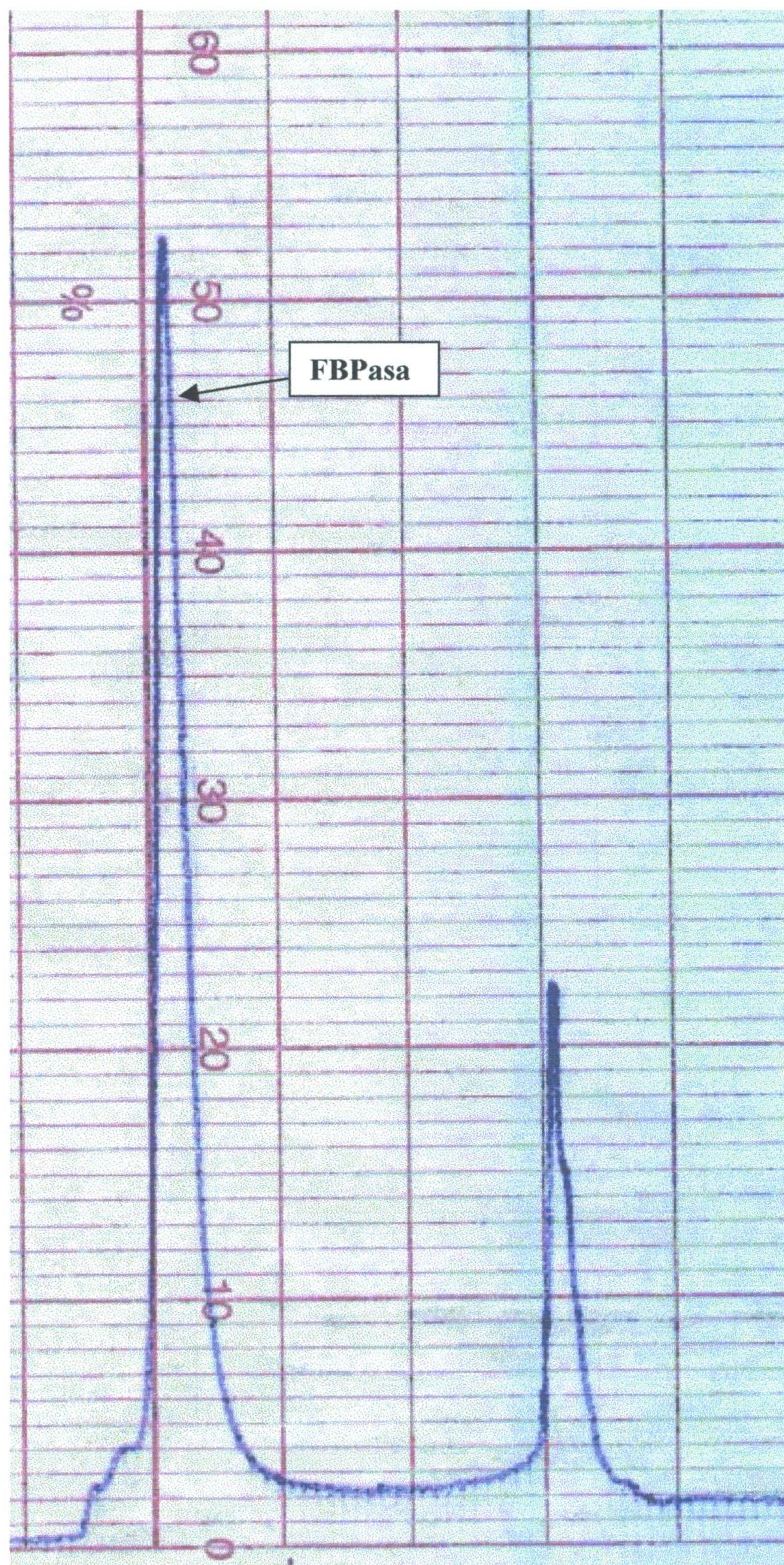


Fig. 3.10. Cromatograma del pase por Sephacryl HR-200 de las fracciones procedentes de DEAE-celulosa conteniendo actividad FBPasa.

3.6.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS ha sido la técnica utilizada en este trabajo como control de pureza y para determinar pesos moleculares. También se ha utilizado la electroforesis nativa (sin SDS) para la comparación de las movilidades electroforéticas de los distintos mutantes. Se ha empleado el equipo Miniprotean II de Bio-Rad, con el cuál se obtienen geles de pequeño tamaño (7 x 8 cm y 0.75 mm de grosor), que dan buenas separaciones con un ahorro de tiempo considerable. Los geles separadores se prepararon al 15% de acrilamida para trabajar con tiorredoxinas. El gel concentrador se hizo al 4%. En la tabla se detallan las proporciones para la elaboración de dos geles.

	gel separador (15%)	gel concentrador (4%)
Agua destilada	2.35 ml	6.1 ml
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	-	2.5 ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l
Acrilamida/Bis 30% ¹	5 ml	1.3 ml
Persulfato amónico 10%	50 μ l	50 μ l
TEMED ²	5 μ l	10 μ l

¹ Solución de acrilamida al 29.2% y N-N'-metilenbisacrilamida al 0.8%

² N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

En un gel de SDS-poliacrilamida las proteínas migran una distancia inversamente proporcional a su peso molecular, por lo que las proteínas mutantes y la forma salvaje aparecerán prácticamente a la misma altura, dado que las diferencias en los pesos moleculares son inapreciables.

Para caracterizar las tiorredoxinas mutantes, aprovechando que las mutaciones implicaban diferencias en la carga total de la proteína, se ha empleado la electroforesis nativa en geles de poliacrilamida sin SDS, en los cuáles la migración depende de la relación carga/masa de la proteína. Las proporciones son las mismas de la tabla, sustituyendo los volúmenes de disolución de SDS por agua destilada.

3.6.5. Medida de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteína en una disolución se ha empleado el kit de Bio-Rad basado en el cambio de color de un colorante en función de la cantidad de proteína presente en el medio (Bradford, 1976). La sensibilidad es del orden de 1 μ g. Presenta numerosas ventajas respecto al método clásico de Lowry, entre las que cabe destacar:

- Mayor facilidad de uso, ya que sólo requiere un reactivo y cinco minutos.
- El tiempo de incubación no es crítico a la hora de medir, ya que el complejo colorante-proteína es suficientemente estable.

- Es compatible con la mayoría de los tampones que normalmente se emplean, siendo minoritarios los que provocan interferencias.

Siempre se ha seguido el protocolo indicado para disoluciones de proteína de concentración menor a 25 $\mu\text{g/ml}$ (microensayo). Se prepara una curva patrón de seroalbúmina bovina en el mismo tampón que las proteínas a cuantificar (fig. 3.11). A 800 μl de disoluciones patrón o problema se añaden 200 μl de solución de reactivo colorante (azul brillante Coomassie G-250 en ácido fosfórico y metanol), agitando bien. Se espera 5 minutos y se mide su absorbancia a 595 nm. El color se mantiene estable durante al menos una hora.

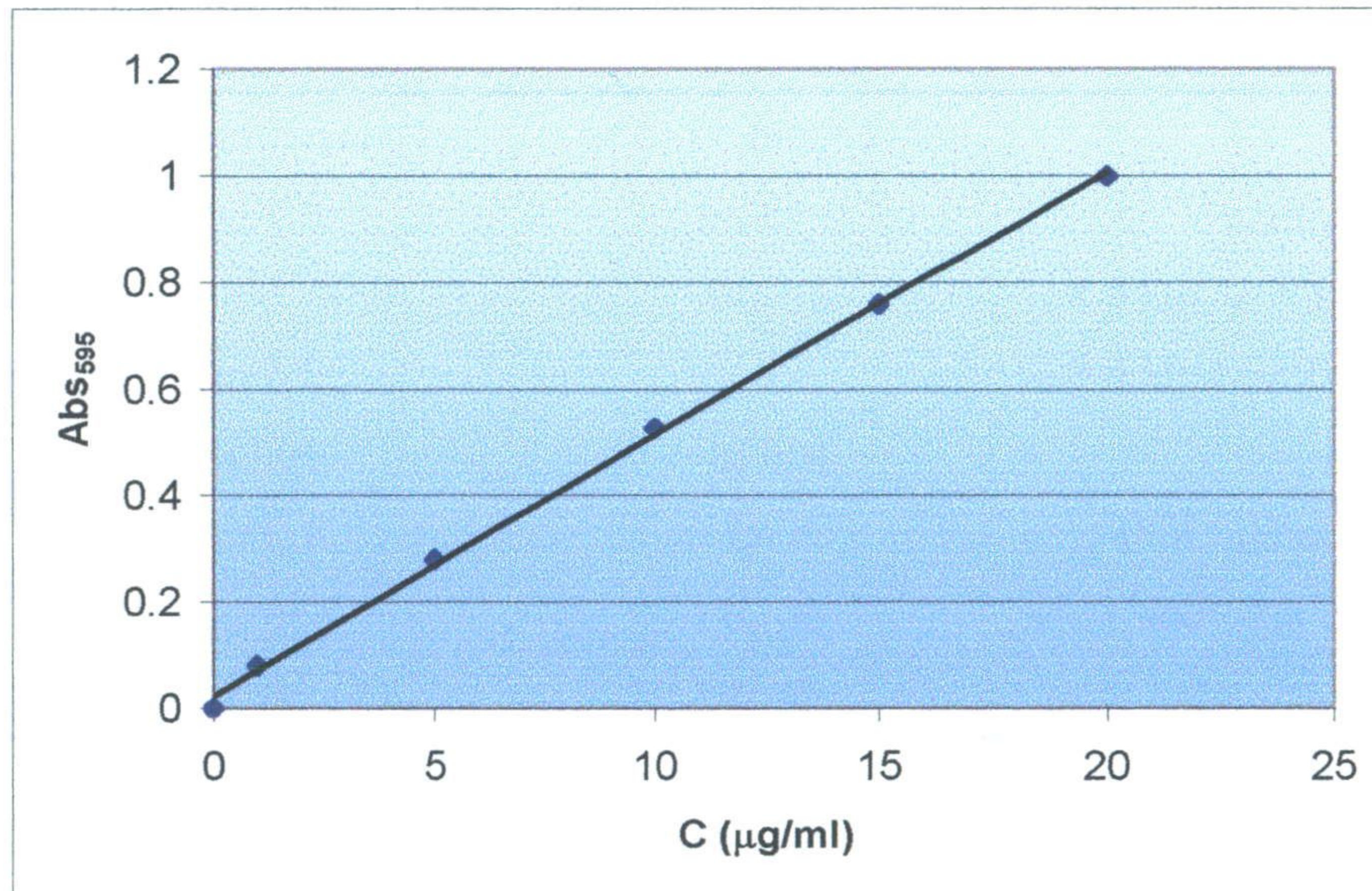


Fig. 3.11. Recta de calibrado típica del método de Bradford. Se representa la absorbancia a 595 nm frente a la concentración de seroalbúmina bovina, en $\mu\text{g/ml}$.

Para la determinación de la concentración de Trx durante los experimentos de diálisis en equilibrio (sección 3.8), se recurrió a la medida sencilla de la absorbancia de la disolución a 280 nm, empleando una recta de calibrado interno obtenida mediante disoluciones de concentración de Trx conocida, que fueron sometidas al mismo tratamiento que las muestras experimentales. Se obtuvo un comportamiento lineal en todos los intervalos de concentración de tiorredoxina empleados.

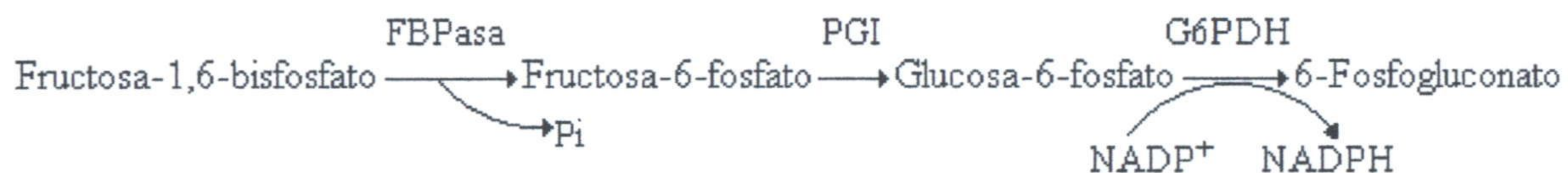
3.7. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE FBPasa POR TIORREDOXINA

Para estudiar la capacidad de activación de las tiorredoxinas mutantes y silvestres sobre la FBPasa se siguió el protocolo descrito por Prado *et al.* (1992). El ensayo se basa en el hecho de 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. En este ensayo la Trx, reducida por DTT (ditiotreitól), actúa como agente reductor, cediendo electrones a la FBPasa y activándola. Como el DTT también puede actuar directamente sobre la FBPasa, hay que realizar un blanco sin Trx y restarlo de los valores de activación obtenidos.

El ensayo se realiza en dos pasos:

1. Activación: En un volumen final de 100 μ l se incuban Trx y FBPasa en una mezcla de incubación (Tris-HCl pH 7.9 100 mM, DTT 2.5 mM, FBP 0.4 mM y CaCl_2 0.05 mM), durante 10 minutos a 28 °C.

2. Catálisis: Transcurridos los diez minutos de activación, la mezcla se pasa a una cubeta con 900 μ l de Tris-HCl pH 7.9 50 mM, MgCl_2 1 mM, FBP 0.36 mM, EGTA 0.02 mM, NADP 0.3 mM, fosfoglucosa-isomerasa (PGI) 1.4 unid. y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) 0.7 unid. Se mide la variación por minuto de la absorbancia a 340 nm producida por la aparición de NADPH, debida a la actividad FBPasa, según la cadena de reacciones enzimáticas acopladas:



Las dos reacciones enzimáticas auxiliares (PGI y G6PDH) son mucho más rápidas que la desfosforilación de la FBP por la FBPasa, por lo que se puede considerar que la medida espectrofotométrica de la concentración de NADPH frente al tiempo será función únicamente de la actividad FBPasa.

3.8. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE UNIÓN MEDIANTE DIÁLISIS EN EQUILIBRIO

La medida experimental del equilibrio de unión entre dos proteínas no es un tema sencillo. La mayor parte de los métodos empleados en la bibliografía para la medida de las constantes de unión, o *binding*, entre dos proteínas se basan en la medida de alguna magnitud -generalmente espectroscópica- que varía entre las formas libre y unida de cualquiera de las dos proteínas implicadas en la interacción (Bagshaw y Harris, 1985). Para ello, generalmente es necesario que una de las dos proteínas contenga algún cromóforo o fluoróforo como grupo prostético. Por desgracia, este no es el caso de la interacción entre la FBPasa y las Trxs, que son todas ellas proteínas formadas únicamente por cadenas polipeptídicas, cuyos espectros de absorbancia y fluorescencia no presentan diferencias evidentes entre las formas libre y unida que pudieran servir para determinar las concentraciones de ambas entidades.

Otros métodos de medida cuantitativa de la interacción entre proteínas se basan en medidas calorimétricas (ITC o *Isothermal Titration Calorimetry*) (Wiseman *et al.*, 1989) o de resonancia superficial de plasmon (SPR o *Surface Plasmon Resonance*) (Fägerstam *et al.*, 1990). Sin embargo, ambos métodos son sólo adecuados para interacciones sencillas, tales como las de estequiometría 1:1 ó 2:1. Interacciones más complicadas, como la de la FBPasa-Trx, que posee una estequiometría 4:1, no pueden ser estudiadas de forma adecuada mediante estos métodos, dado el gran número de parámetros que se han de ajustar mediante regresiones no lineales de los datos experimentales.

La mejor opción para el estudio de la interacción FBPasa-Trx, que ha sido empleada en este trabajo, es la diálisis en equilibrio, que se basa en la diferencia entre las masas moleculares de ambas proteínas (160 kDa para el tetrámero de FBPasa y 12 kDa para las Trxs). Estas se sitúan en soluciones separadas por una membrana cuyo punto de corte sea intermedio entre los tamaños de ambas proteínas, permitiendo medir así las concentraciones de Trx libre y unida a FBPasa, necesarias para los estudios del equilibrio de unión.

3.8.1. Dispositivo experimental

Para estudiar la unión de las Trxs a la FBPasa se ha empleado un dializador de equilibrio Dianorm (Weder *et al.*, 1971) con capacidad para 20 células de 1 ml de volumen por cada compartimento (fig. 3.12). Se usaron membranas Spectrapor de éster de celulosa, con un punto de corte nominal de 25 kDa.

La diálisis en equilibrio se basa en el uso de una membrana impermeable para una de las dos proteínas (la mayor, en este caso, la FBPasa), pero que permite el paso libre a la más pequeña (la Trx). Inicialmente se sitúa la FBPasa en uno sólo de los dos compartimentos de la célula, mientras que la Trx se sitúa a igual concentración en los dos compartimentos. Se deja que se alcance el equilibrio. Cuando éste se ha conseguido, la concentración de Trx libre en los dos compartimentos será idéntica, pero la concentración total en el compartimento que contiene FBPasa será mayor, debido a que aparecerá también Trx unida a la FBPasa, tal como se observa en la figura 3.13.

Conocida la concentración inicial de Trx y midiendo experimentalmente su concentración de equilibrio en el compartimento de la derecha, se podrán calcular las concentraciones de Trx libre y unida a FBPasa.

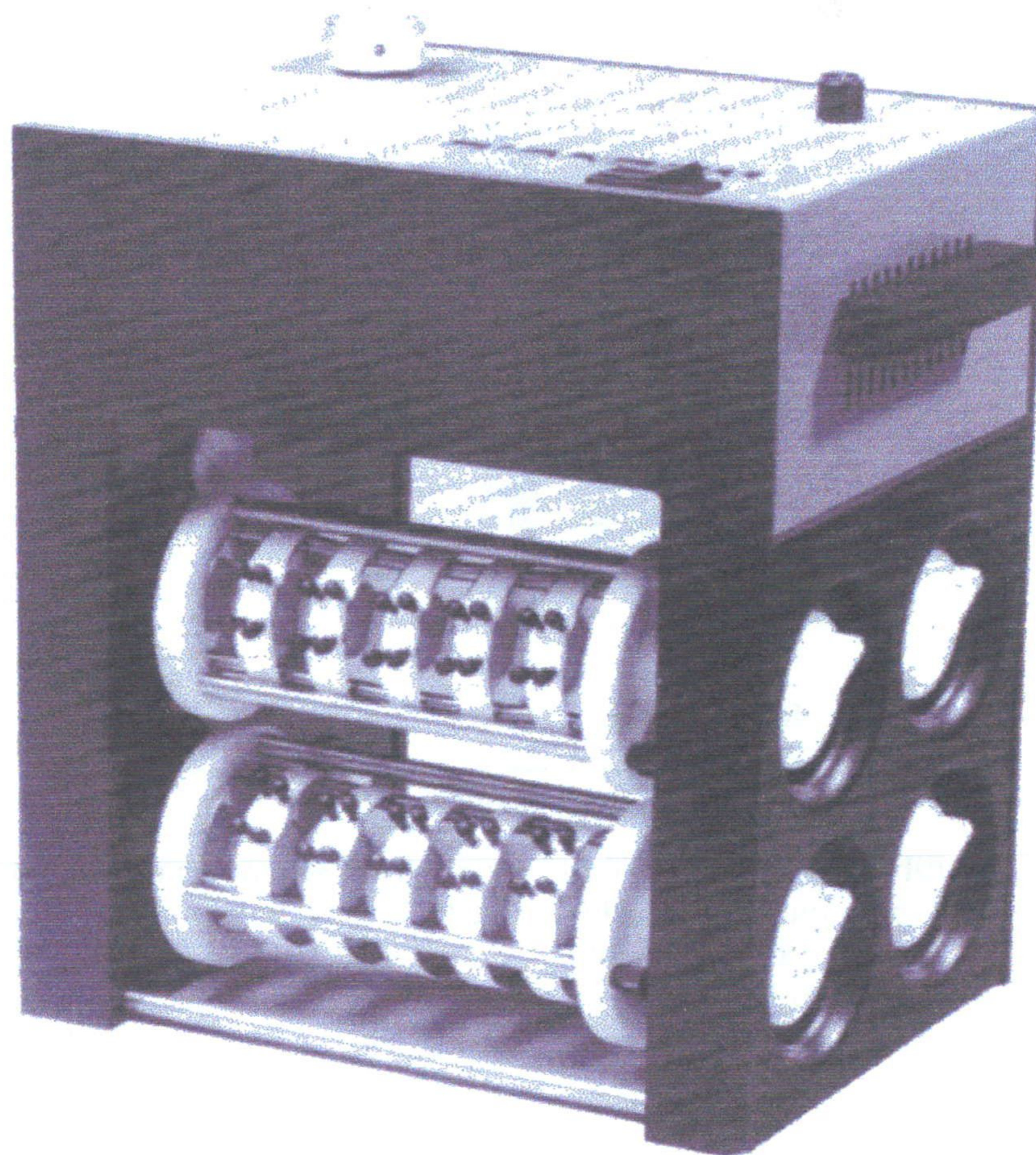


Fig. 3.12. Dializador de equilibrio Dianorm de veinte células empleado para las medidas de los parámetros de unión.

Los experimentos de diálisis en equilibrio se llevaron a cabo usando un volumen total de 1 ml en cada compartimento. Se utilizó un tampón de incubación semejante al utilizado en los estudios de activación (sección 3.7), aunque suplementado con 75 mM de NaCl, con objeto de aumentar la fuerza iónica del sistema para evitar el efecto Donnan (Van Holde, 1971 y sección 4.7.2).

Antes de comenzar el experimento, es necesario lavar las membranas dos veces con agua destilada, 30 minutos vez, para eliminar la disolución de azida sódica en la que están conservadas y sumergirlas en el buffer anterior durante al menos seis horas.

Se empleó una concentración de FBPasa constante de 0.625 μ M, equivalente a 100 μ g/ml y concentraciones de Trx variables entre 1 y 33 μ M (entre 12.5 y 400 μ g/ml). El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio fue de 6 horas, tal como se observó en experimentos previos, realizados situando Trx inicialmente en un único compartimento (sección 4.7.1).

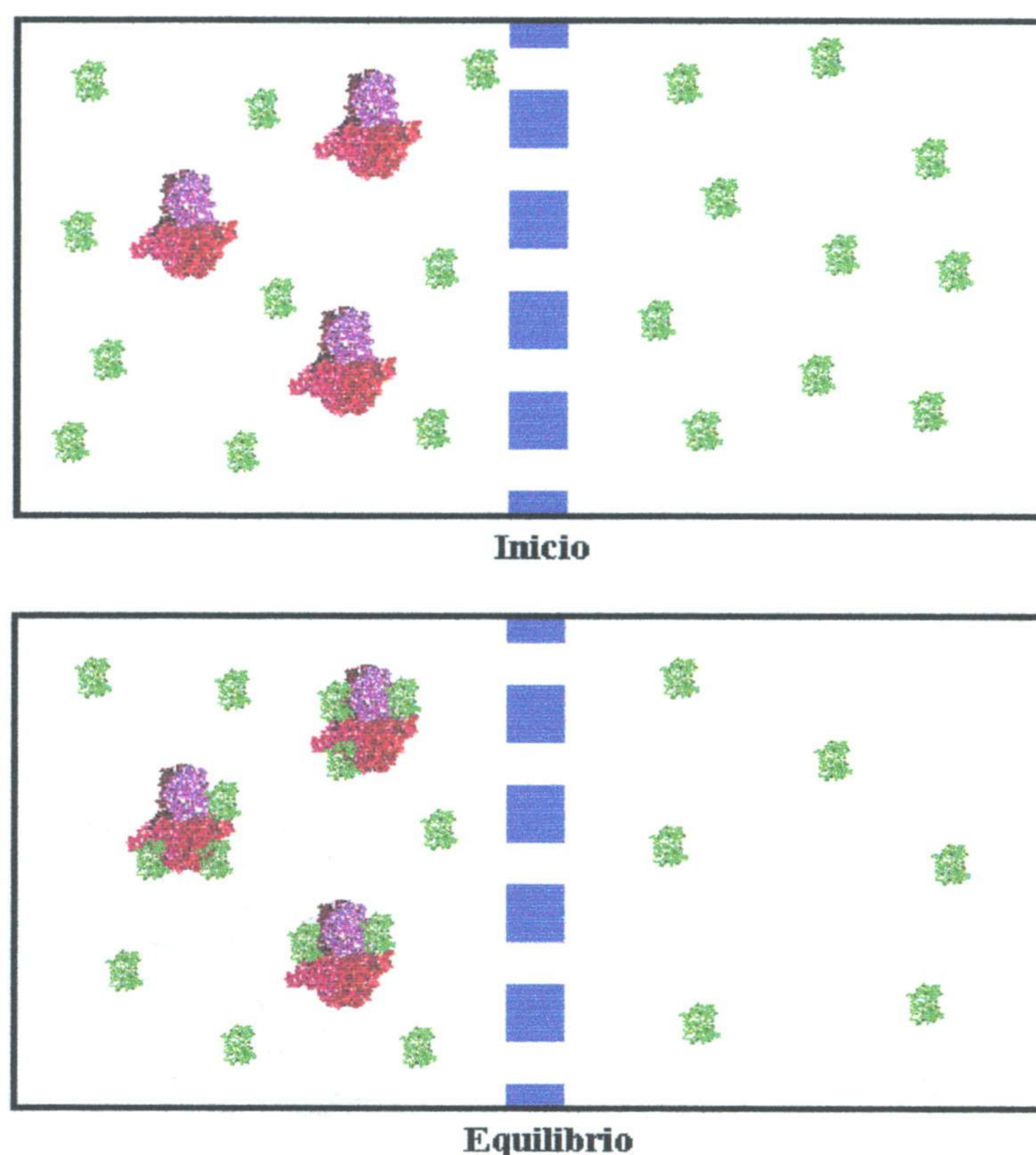


Fig. 3.13. Diálisis en equilibrio de la interacción FBPasa – Trx. Se emplea una membrana (en azul), impermeable a la FBPasa, pero que permite el paso de la Trx. Inicialmente las concentraciones de Trx son idénticas en ambos compartimentos. En situación de equilibrio se igualan las concentraciones de Trx libre, pero la concentración total será mayor a la izquierda, ya que será la suma de la Trx libre más la unida a la FBPasa.

Al finalizar cada experimento se midieron las concentraciones de Trx libre (C_F) y unida a FBPasa (C_B). Para evaluar la concentración de Trx libre, C_F , se determinó la concentración de Trx total en el compartimento de la derecha, mediante medida de la absorbancia de la disolución a 280 nm (sección 3.6.4). Se realizó una recta de calibrado interno situando concentraciones conocidas e iguales de Trx en ambos compartimentos, sin emplear FBPasa. La representación de la absorbancia a 280 nm frente a la concentración de Trx fue lineal en todos los rangos de concentración de Trx empleados. La concentración de Trx unida a FBPasa, C_B , se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$C_B = 2 C_0 - 2 C_F$$

Donde C_0 es la concentración de Trx situada inicialmente en cada compartimento.

A partir de la concentración de Trx unida, C_B , se puede calcular fácilmente la fracción de saturación de la FBPasa, θ , que es un parámetro adimensional definido como el cociente entre la cantidad de sitios de unión ocupados y la cantidad total de sitios de unión existentes. Así, si asumimos que cada tetrámero de FBPasa posee cuatro sitios de unión para Trx (uno por monómero), y llamamos C_{FBPasa} a la concentración de la forma tetramérica de FBPasa, la expresión para la fracción de saturación, θ , será:

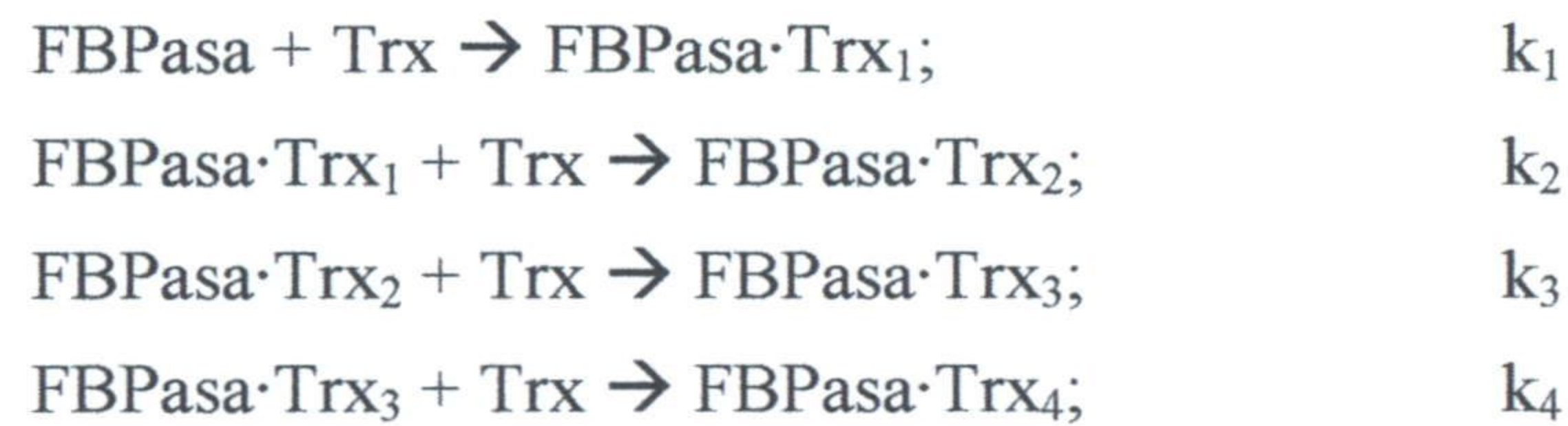
$$\theta = C_B / 4 C_{FBPasa}$$

3.8.2. Modelo matemático empleado para el ajuste de los datos de equilibrio

La mayoría de los modelos matemáticos existentes para la caracterización cuantitativa de la interacción entre una proteína y otra molécula (ligando), se basan en la obtención de la isoterma de unión. Esta es la curva que representa la fracción de saturación, θ , en función de la concentración de ligando libre, C_F . En nuestro caso, el ligando es otra proteína (la tioredoxina), pero el formalismo no difiere en absoluto del empleado para ligandos más pequeños.

Las formas de abordar el estudio de las isotermas de unión se dividen en tres grandes grupos principales, los modelos progresivos o de Adair, los modelos concertados o de Monod, Wyman y Changeaux (MWC) y los modelos secuenciales o de Koshland, Nemethy y Filmer (KNF).

Los modelos de Adair (Segel, 1975) se basan en asignar una constante microscópica de unión de valor diferente para cada ligando que se incorpora al complejo, según el siguiente esquema, para la interacción FBPasa - Trx:



Si la interacción es cooperativa o los sitios de unión son diferentes, las cuatro constantes tendrán diferente valor, mientras que si se trata de sitios idénticos e independientes, las cuatro constantes serían iguales.

Llamando x a la concentración de Trx libre, C_F , la ecuación para la isoterma de unión que se obtiene desarrollando el modelo de Adair es la siguiente:

$$\theta = \frac{k_1 x + 3k_1 k_2 x^2 + 3k_1 k_2 k_3 x^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 x^4}{1 + 4k_1 x + 6k_1 k_2 x^2 + 4k_1 k_2 k_3 x^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 x^4}$$

La ecuación que proporciona el modelo de Adair posee cuatro parámetros ajustables, las cuatro constantes microscópicas. El inconveniente principal de este modelo es que tiene un carácter fenomenológico, pero no explicativo. No se hace uso de ninguna información de tipo estructural sobre la interacción. Las constantes varían para cada Trx sucesiva que se une a la FBPasa, pero no se explica por qué lo hacen.

Los modelos concertados o de Monod-Wyman-Changeaux (Monod *et al.*, 1964) explican la variación de las constantes de unión suponiendo que la molécula de proteína central (la FBPasa en nuestro caso) puede adoptar dos conformaciones diferentes, que pueden denominarse con las letras R y T (de relajada y tensa), tomando las constantes de unión microscópicas para las dos formas, k_R y k_T , diferentes valores, y existiendo una constante de equilibrio para la conversión entre las dos formas, denominada usualmente L (figura 3.14).

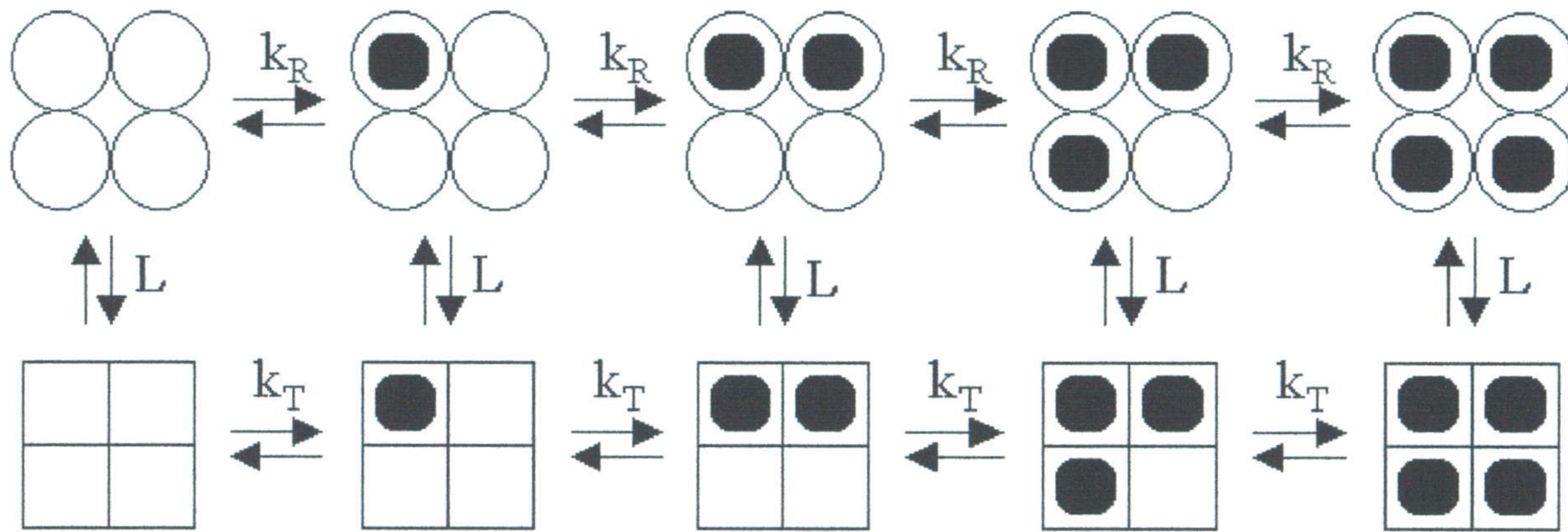


Figura 3.14. Modelo de Monod-Wyman-Changeaux para la interacción FBPasa - Trx.

La ecuación que se obtiene para la isoterma de unión, según el modelo MWC, es la siguiente:

$$\theta = \frac{\frac{k_R + Lk_T}{1 + L}x + 3\frac{k_R^2 + Lk_T^2}{1 + L}x^2 + 3\frac{k_R^3 + Lk_T^3}{1 + L}x^3 + \frac{k_R^4 + Lk_T^4}{1 + L}x^4}{1 + 4\frac{k_R + Lk_T}{1 + L}x + 6\frac{k_R^2 + Lk_T^2}{1 + L}x^2 + 4\frac{k_R^3 + Lk_T^3}{1 + L}x^3 + \frac{k_R^4 + Lk_T^4}{1 + L}x^4}$$

Como se observa, esta ecuación posee tres parámetros ajustables, que son las dos constantes de unión del ligando a la proteína, k_R y k_T y la constante de conversión entre las formas relajada y tensa, L. El principal inconveniente de los modelos MWC es que sólo contemplan la cooperatividad positiva, no siendo capaces de explicar la cooperatividad negativa; es decir, según estos modelos, la unión de un ligando a la macromolécula siempre facilita la entrada del siguiente. No puede empeorarla.

Por último, los modelos secuenciales de Koshland-Nemethy-Filmer (Koshland *et al.*, 1966) son los más adecuados para explicar las interacciones proteína-ligando, tanto con cooperatividad positiva como negativa. Se basan en el establecimiento de un modelo estructural que incluye la información conocida sobre la estructura del complejo macromolécula-ligando. A cada sitio de unión se le asigna una constante microscópica de unión, k , que puede ser igual o diferente para cada sitio. El modelo considera que, cuando una molécula de ligando se une a la proteína, los sitios de unión vacíos adyacentes se ven afectados según un parámetro de interacción, σ . Según la estructura de la macromolécula, se pueden asignar valores de σ diferentes o idénticos entre las subunidades.

Dado la estructura homotetramérica de la FBPasa cloroplastídica, el modelo estructural utilizado ha sido el que se observa en la figura 3.15, con cuatro constantes microscópicas de unión idénticas, k , (una por monómero), y dos parámetros de interacción entre subunidades diferentes, σ_A y σ_B , dado que la estructura de la FBPasa no es tetraédrica, sino cuadrangular.

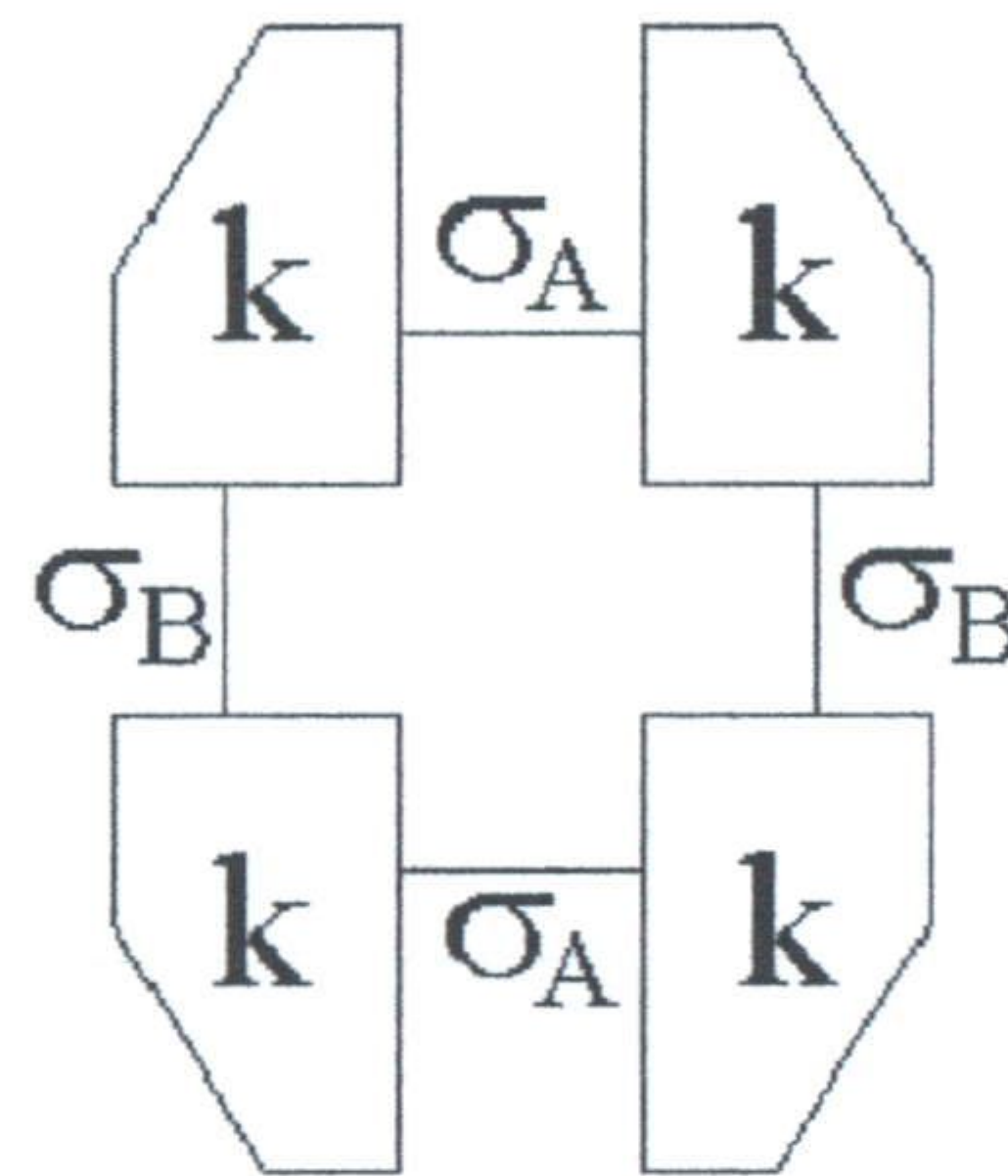


Figura 3.15. Modelo estructural de Koshland-Nemethy-Filmer para la interacción FBPasa - Trx.

La ecuación para la isoterma de unión que se obtiene del desarrollo del modelo estructural KNF propuesto, según el formalismo de Hess y Szabo (1979), es la siguiente:

$$\theta = \frac{\frac{k}{\sigma_A \sigma_B} x + \frac{(1 + \sigma_A + \sigma_B) k^2}{\sigma_A^2 \sigma_B^2} x^2 + \frac{3k^3}{\sigma_A^2 \sigma_B^2} x^3 + \frac{k^4}{\sigma_A^2 \sigma_B^2} x^4}{1 + \frac{4k}{\sigma_A \sigma_B} x + \frac{2(1 + \sigma_A + \sigma_B) k^2}{\sigma_A^2 \sigma_B^2} x^2 + \frac{4k^3}{\sigma_A^2 \sigma_B^2} x^3 + \frac{k^4}{\sigma_A^2 \sigma_B^2} x^4}$$

Que posee también tres parámetros ajustables experimentalmente, la constante microscópica de unión, k , y los dos parámetros de interacción entre subunidades, σ_A y σ_B .

Los valores para los parámetros que mejor ajustan los resultados experimentales han sido calculados mediante regresión no lineal de los datos de la fracción de saturación, θ , frente a la concentración de Trx libre, x , empleando el algoritmo iterativo de mínimos cuadrados de Marquardt, incluido en el paquete estadístico Statgraphics.

3.9. MEDIDA DEL POTENCIAL REDOX DE LAS TIORREDOXINAS

Con objeto de medir el potencial de oxidación-reducción de las Trxs silvestres y de los mutantes, se ha empleado el método de titulación por fluorescencia con monobromobimano (mBBr), basado en el descrito por Hutchison y Ort (1995) y modificado posteriormente por Hirasawa *et al.* (1999).

3.9.1. Fundamento teórico

El mBBr es capaz de unirse a los grupos tiol libres pertenecientes a las cisteínas de las proteínas reducidas, pero no reacciona con las cisteínas que están oxidadas en forma de puentes disulfuro. El mBBr libre no posee prácticamente fluorescencia, pero al unirse a los grupos tiol produce una intensa fluorescencia con un máximo de excitación a 380 nm y un máximo de emisión a 450 nm.

La reacción de reducción de la Trx implica la ganancia de dos electrones y dos protones, según la reacción:



Al aplicar la ecuación de Nernst, a 25 °C, se observa que el potencial de reducción, E, depende del pH, de la concentración de las formas reducida y oxidada de la Trx y de E°, que es el potencial normal de reducción del par Trx oxidada / Trx reducida, según:

$$E \text{ (mV)} = E^\circ - 30 \text{ Log} \frac{[\text{Trx-(SH)}_2]}{[\text{Trx-S}_2] [\text{H}^+]^2}$$

Despejando la concentración de H⁺, la dependencia con el pH queda de la forma:

$$E \text{ (mV)} = E^\circ - 60 \text{ pH} - 30 \text{ Log} \frac{[\text{Trx-(SH)}_2]}{[\text{Trx-S}_2]}$$

Se define el potencial en el punto medio, E_m, como el potencial redox que se obtiene cuando las concentraciones de Trx oxidada y reducida son iguales. En estas condiciones, el logaritmo de la expresión anterior se anula y queda:

$$E_m \text{ (mV)} = E^\circ - 60 \text{ pH}$$

Esto quiere decir que una representación del potencial en el punto medio, E_m , frente al pH, debe dar una recta de pendiente $-60 \text{ mV /unidad de pH}$, siempre que se lleven a cabo todos los experimentos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para calcular E_m a un pH determinado se realiza una titulación con mBBR, incubando distintas alícuotas de Trx en un tampón de pH constante y con distintos potenciales redox del ambiente, E_h . Para controlar el potencial redox del ambiente, E_h , se emplean distintas relaciones de DTT (ditiotreitól) oxidado y reducido, en suficiente concentración como para que forme una disolución amortiguadora de potencial redox. El DTT presenta una reacción de reducción análoga a la de la Trx:



Por lo que en un medio con una concentración determinada de DTT oxidado y DTT reducido, el potencial redox del ambiente, E_h , vendrá dado por:

$$E_h \text{ (mV)} = E^\circ - 60 \text{ pH} - 30 \text{ Log} \frac{[\text{DTT}_{\text{red}}]}{[\text{DTT}_{\text{ox}}]}$$

Siendo E° para el par $\text{DTT}_{\text{ox}} / \text{DTT}_{\text{red}}$ de $+90 \text{ mV}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, de forma que el valor de E_h cuando el pH de la disolución es 7.0 y las concentraciones de DTT oxidado y reducido son iguales, es de -330 mV . Una forma más operativa de la ecuación anterior es:

$$E_h \text{ (mV)} = -330 - 60(\text{pH} - 7) - 30 \text{ Log} \frac{[\text{DTT}_{\text{red}}]}{[\text{DTT}_{\text{ox}}]}$$

Ecuación que permite calcular el potencial redox del ambiente, E_h , si son conocidos el pH del medio y las concentraciones de DTT_{red} y DTT_{ox} .

Las cantidades de DTT oxidado y reducido necesarias para obtener un determinado potencial redox del ambiente E_h , fueron calculadas por Kosower y Kosower (1987) a partir de la expresión anterior y se detallan en la siguiente tabla. Se dan los potenciales del ambiente que se obtendrían para un pH de 7.0 . Para cualquier otro pH, es necesario realizar la corrección, restando 60 mV por cada unidad de pH.

Material y métodos

Potencial del ambiente, E_h , a pH 7.0, en función de las cantidades relativas de DTT oxidado y reducido. Se parte de disoluciones de DTT oxidado y reducido de igual concentración. Los valores tabulados son los volúmenes, en μl , necesarios de cada disolución para obtener 1 ml de buffer redox con E_h controlado (Kosower y Kosower, 1987).

Eh (mV)	Volumen de DTT reducido (μl)	Volumen de DTT oxidado (μl)
-220	0.2	999.8
-230	0.4	999.6
-240	1	999
-250	2	998
-260	4	996
-270	9	991
-275	13	987
-280	20	980
-285	30	970
-290	42	958
-295	61	939
-300	88	912
-305	124	876
-310	173.5	826.5
-315	237	763
-320	314	686
-325	404	596
-330	500	500
-335	596	404
-340	686	314
-345	763	237
-350	827	173
-355	876	124
-360	912	88
-370	956	44
-380	980	20
-390	991	9
-400	996	4
-410	998	2
-420	999	1

3.9.2. Procedimiento experimental

La secuencia de pasos necesaria para llevar a cabo una titulación con mBBr es la siguiente:

1. Preparación de las muestras. En 1 ml de volumen total se sitúan unos 150 μg de Trx (el conocimiento de la concentración exacta de proteína no es crítico, siempre que se use la misma cantidad en todas las muestras) en buffer de pH controlado y concentración total de DTT constante, variando la relación entre DTT_{ox} y DTT_{red} (es necesario determinar previamente la concentración total de DTT óptima). El buffer de pH se usó en una concentración de 100 mM (tampoco es un parámetro crítico), y se emplearon los siguientes buffers:

Intervalo de pH	Buffer
5 - 5.75	Acético / acetato
6 - 6.5	MES
6.75 - 7.5	MOPS
7.9 - 8.5	Tricina

2. Incubación de las muestras. Se realiza a 25 °C durante el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio redox (para que se igualen el potencial E del par Trx oxidada / Trx reducida y el potencial redox del ambiente E_h). Es necesario determinar el tiempo óptimo de incubación, que varía de una proteína a otra.

3. Reacción con mBBr. Se añaden 10 μl de mBBr altamente concentrado (Calbiochem Inc.) por muestra, y se deja incubar durante 20 min. en la oscuridad para que se produzca la reacción con los grupos tiol disponibles. Es necesario llevar a cabo la incubación en la oscuridad, ya que el mBBr libre es muy sensible a la luz.

4. Precipitación de las proteínas. Se añade a cada muestra 500 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en agua, y se deja incubar 30 min. en hielo y en la oscuridad para que precipiten las proteínas.

5. Recuperación del pellet. Se centrifugan las muestras durante 15 min. en una centrífuga de mesa a velocidad máxima. Se lava el pellet de proteínas con 500 μl de TCA al 1% en agua con objeto de eliminar el mBBr libre o unido a DTT que pudiera quedar en el pellet, y se centrifuga otra vez durante otros 15 min.

6. Resuspensión. Se resuspende cada pellet en 300 μl de Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, conteniendo 1% de SDS (dodecilsulfato sódico). Se agita al vórtex y se deja reposar 10 min. en la oscuridad.

7. Dilución y medida de la fluorescencia. Se añade a cada muestra 2.2 ml de Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, y se mide la fluorescencia de cada muestra, empleando una λ de excitación de 380 nm y una λ de emisión de 450 nm.

3.9.3. Tratamiento de los datos.

La fluorescencia de la muestra será tanto mayor cuanto más reducida esté la proteína. Es necesario restar a todas las medidas la fluorescencia de la muestra más oxidada, que puede deberse a los grupos tiólicos de las cisteínas aisladas (que no pueden formar puentes disulfuro), y dividir las por la fluorescencia de la muestra más reducida, que se considera que está completamente reducida y se le asigna una fracción de reducción del 100%.

Con ello, se determina la fracción de reducción, F_{red} , que varía entre 0 y 1 en función del potencial redox del medio, E_h . A partir de la ecuación de Nernst para la Trx, considerando que F_{red} , la fracción reducida, puede definirse como:

$$F_{red} = \frac{[Trx-(SH)_2]}{[Trx-S_2] + [Trx-(SH)_2]}$$

Y teniendo en cuenta que el pH es constante, haciendo $E = E_h$, se puede demostrar fácilmente que la ecuación que ajusta los datos de la fracción reducida, F , frente al potencial reductor del ambiente es:

$$F_{red} = \frac{1}{1 + 10^{\left(\frac{E_h - E_m}{30}\right)}}$$

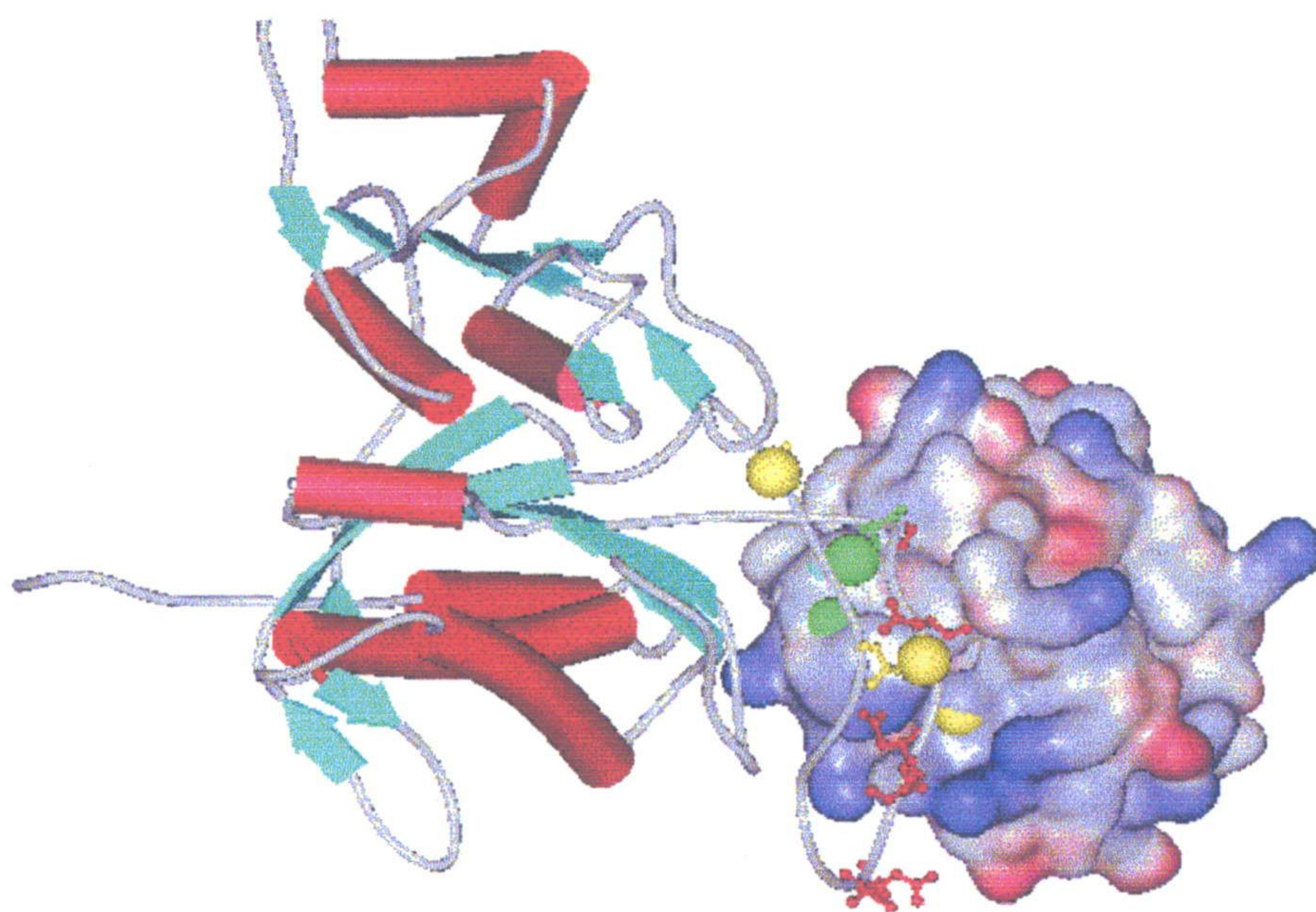
Esta ecuación tiende hacia $F_{red}=1$ cuando E_h es pequeño (ambiente reductor), y hacia $F_{red}=0$ cuando E_h es grande (ambiente oxidante). Los datos de F_{red} frente a E_h se pueden ajustar a esta ecuación mediante regresión no lineal por el método de mínimos cuadrados de Marquardt, obteniéndose como parámetro el potencial en el punto medio de la Trx al pH dado, E_m .

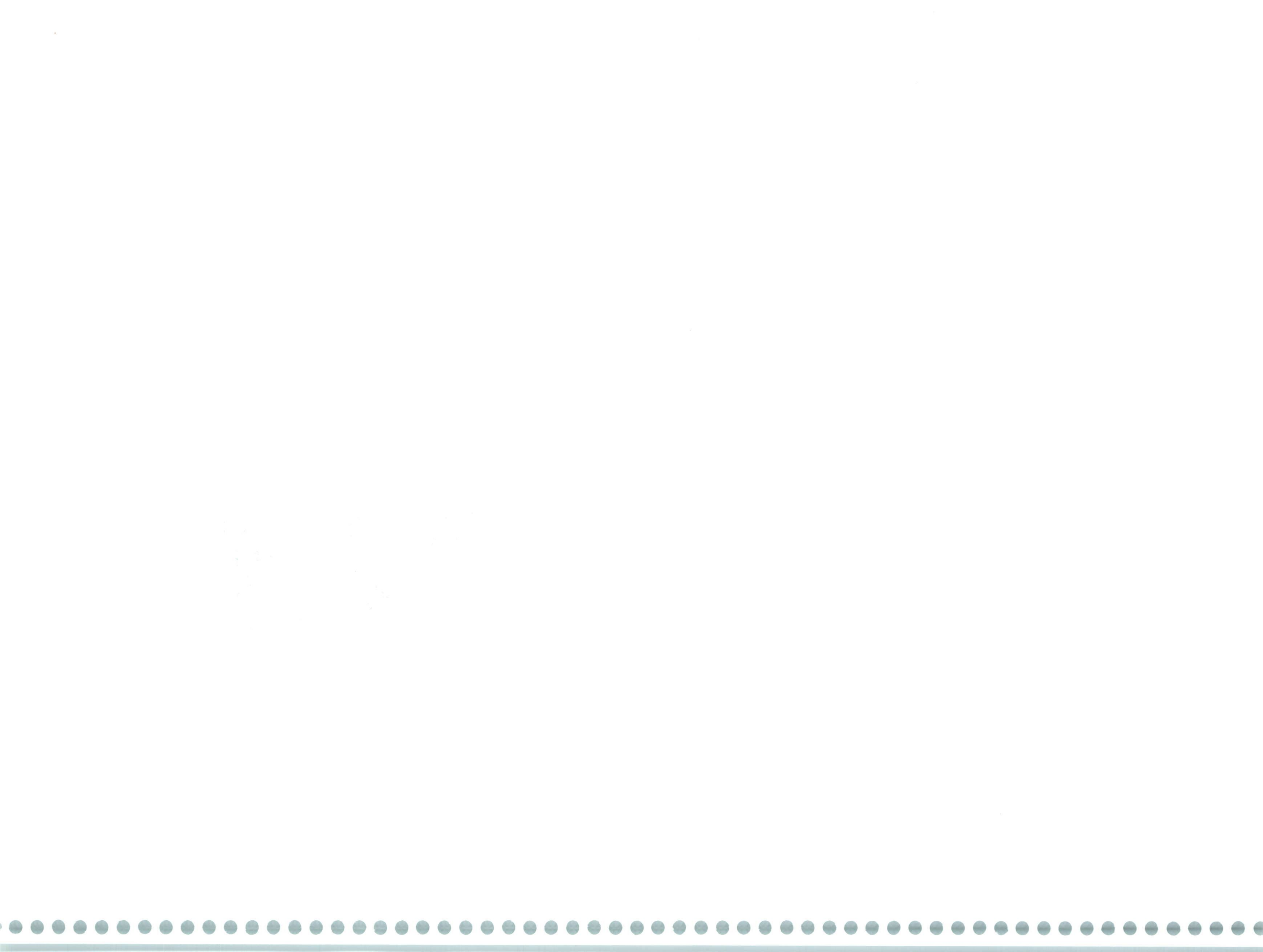
Se pueden medir los potenciales en el punto medio a distintos pHs. Si los datos obtenidos son correctos, una representación de E_m frente al pH debería de dar una línea recta de pendiente -60 mV /unidad de pH, como se ha visto anteriormente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es el turno ahora de adentrarnos en aguas menos conocidas, en realidad, en profundidades inexploradas donde el inmenso poder de la nueva tecnología planteará complicados problemas desconocidos hasta ahora para la humanidad.

G.J.V. Nossal, *Los límites de la manipulación genética*





4.1. RECONSTRUYENDO LA HISTORIA EVOLUTIVA DE LAS TIORREDOXINAS

El objetivo fundamental del presente trabajo es el estudio de la interacción entre las tiorredoxinas del cloroplasto y sus proteínas diana. Con objeto de determinar cuáles de los aminoácidos de las Trxs pueden ser los más importantes para su función y para el reconocimiento de otras proteínas, se llevará a cabo un estudio comparativo y evolutivo de las secuencias disponibles en los bancos de datos. Uno de los enigmas más intrigantes que aún está por resolver sobre las Trxs cloroplastídicas es el porqué de la multiplicidad de sus formas, es decir, la razón por la que las plantas necesitan dos Trxs distintas, m y f, para el funcionamiento del proceso fotosintético y la historia evolutiva que llevó a esta situación. La comparación de las secuencias conocidas de las diferentes Trxs quizás pueda arrojar algo de luz sobre este interesante problema. De los estudios comparativos también se podrá determinar cuáles son las diferencias entre las distintas formas de Trx. Se trata en esta sección el sugerente asunto de la evolución de las tiorredoxinas, que se relaciona con el origen evolutivo de las plantas superiores y, en realidad, de todas las demás formas de vida que habitan nuestro planeta.

4.1.1. Búsqueda de secuencias en las bases de datos

Con objeto de llevar a cabo los estudios filogenéticos, se revisaron las bases de datos Entrez y PIR, así como las secuencias completas disponibles para los organismos que han sido secuenciados hasta el día de hoy. Con fecha 15 de agosto de 1999, se hallaron en las bases de datos 224 entradas para tiorredoxina, clasificadas del siguiente modo:

Trxs	224	Eucariotas	121	Metazoos	36	Citoplasmáticas	32
				Hongos	9	Mitocondriales	4
Trxs	224	Bacterias	90	Plantas verdes	59	Citoplasmáticas h	25
				Rodofíceas	13	Cloroplastídicas m	21
				Otros eucariotas (Euglenozoos y Dictiostélidos)	4	Cloroplastídicas f	13
				Firmicutes (gram-positivas)	41		
				Espiroquetales	2		
				Proteobacterias (púrpuras no del azufre)	26		
				Clamidiales	3		
				Verdes no del azufre	3		
				Verdes del azufre	1		
				Cianobacterias	11		
Acuificales	2						
Halobacteriales	1						
		Arqueones	8				
		Virus	5				

No obstante, varias de las entradas están repetidas y corresponden al mismo organismo. Así, realmente sólo 2 Trxs virales han sido secuenciadas, aunque una de ellas (la del fago T4) aparece repetida cuatro veces en la base de datos. Entre las 32 Trxs citoplasmáticas animales, sólo existen 14 diferentes y una de ellas (la de *Canis familiaris*), muy fragmentaria. La Trx humana y sus distintos mutantes aparecen repetidas ocho veces.

Para los posteriores estudios filogenéticos se han empleado las secuencias que se detallan a continuación, que son una mayoría significativa de las que se encuentran en los bancos de datos. No se han empleado todas las disponibles porque, además de requerirse tiempos de computación más largos, cuanto más grande sea el número de secuencias empleado, mayor será el número de posibles árboles distintos y es más probable que el resultado no corresponda a la historia evolutiva real de las secuencias. Esto se explica porque el algoritmo proporciona el árbol evolutivo óptimo (el que implique un menor número total de mutaciones) y la historia real puede no corresponderse con este óptimo. A menor cantidad de secuencias, menos combinaciones son posibles y mayor será la probabilidad de que el árbol obtenido refleje la historia evolutiva real.

TRXS CITOPLASMÁTICAS DE METAZOOS

Nombre científico	Nombre común o clasificación	Referencia
<i>Homo sapiens</i>	Hombre	Tonissen & Wells (1991)
<i>Mus musculus</i>	Ratón común	Tagaya <i>et al.</i> (1989)
<i>Ovis aries</i>	Oveja	Droogmans <i>et al.</i> (1994)
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	Jones & Luk (1988)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca de la fruta	Salz <i>et al.</i> (1994)
<i>Caenorhabditis elegans</i> (2 Trxs distintas)	Gusano nematodo	Wilson <i>et al.</i> (1994)
<i>Geodia cydonium</i>	Esponja córnea	Wiens <i>et al.</i> (1999)

TRXS MITOCONDRIALES DE METAZOOS

Nombre científico	Nombre común	Referencia
<i>Homo sapiens</i>	Hombre	Miranda-Vizuite <i>et al.</i> (1998)
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata común	Spyrou <i>et al.</i> (1997)
<i>Mus musculus</i>	Ratón común	Miranda-Vizuite <i>et al.</i> (1997)
<i>Bos taurus</i>	Vaca	Watabe <i>et al.</i> (1997)

TRXS DE HONGOS Y DICTIOSTÉLIDOS

Nombre científico	Nombre común o clasificación	Referencia
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (2 Trxs distintas)	Levadura de fisión	Lyne <i>et al.</i> (1999) Wood <i>et al.</i> (1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3 Trxs distintas)	Levadura de panadería	Gan (1991) Feldmann <i>et al.</i> (1992)
<i>Emericella nidulans</i>	Moho (<i>Aspergillus</i>)	Le Marechal <i>et al.</i> (1992)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Moho	Cohen <i>et al.</i> (1994)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Moho mucoso o del limo	Wetterauer <i>et al.</i> (1992)

TRXS CITOPLASMÁTICAS DE PLANTAS Y ALGAS VERDES

Nombre científico	Nombre común o clasificación	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i> (5 Trxs distintas)	Hierba de Thales	Rivera-Madrid <i>et al.</i> (1995)
<i>Nicotiana tabacum</i> (2 Trxs distintas)	Tabaco	Brugidou <i>et al.</i> (1993)
<i>Brassica napus</i> (2 Trxs distintas)	Colza	Bower <i>et al.</i> (1996)
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Ishiwatari <i>et al.</i> (1995)
<i>Triticum durum</i>	Trigo duro	Gautier <i>et al.</i> (1998)
<i>Phalaris coerulescens</i>	Hierba canaria	Juttner <i>et al.</i> (1999)
<i>Lolium perenne</i>	Centeno perenne	Juttner <i>et al.</i> (1999)
<i>Secale cereale</i>	Centeno	Juttner <i>et al.</i> (1999)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Árbol del caucho	Chow (1999)
<i>Picea mariana</i>	Picea negra	Perry & Bousquet (1998)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Alga verde unicelular	Decottignies <i>et al.</i> (1991)

TRXS CLOROPLASTÍDICAS DE PLANTAS Y ALGAS VERDES

Nombre científico	Nombre común o clasificación	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i> f (2 Trxs distintas)	Hierba de Thales	Verdoucq & Meyer (1999)
<i>Pisum sativum</i> f	Guisante	Lepiniec <i>et al.</i> (1992)
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> f	Planta del hielo	Michalowski & Bohnert (1998)
<i>Brassica napus</i> f	Colza	Mora-Garcia <i>et al.</i> (1996)
<i>Spinacia oleracea</i> f	Espinaca	Kamo <i>et al.</i> (1989)
<i>Arabidopsis thaliana</i> m (3 Trxs distintas)	Hierba de Thales	Zhong <i>et al.</i> (1999) Lin <i>et al.</i> (1999)
<i>Oryza sativa</i> m	Arroz	Dyer <i>et al.</i> (1999)
<i>Zea mays</i> m	Maíz	Trevanion & Ashton (1995)
<i>Pisum sativum</i> m	Guisante	Lopez Jaramillo <i>et al.</i> (1994)
<i>Spinacia oleracea</i> m	Espinaca	Wedel <i>et al.</i> (1992)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> m	Alga verde unicelular	Stein <i>et al.</i> (1995)
<i>Triticum aestivum</i> m	Trigo común	Dyer <i>et al.</i> (1999)
<i>Brassica napus</i> m	Colza	Duek <i>et al.</i> (1996)

TRXS DE RHODOFICEAS

Nombre científico	Clasificación	Referencia
<i>Porphyra purpurea</i>	Alga roja bangial	Reith & Munholland (1995)
<i>Griffithsia pacifica</i>	Alga roja ceramial	Reynolds <i>et al.</i> (1994)
<i>Cyanidium caldarium</i>	Alga roja unicelular	Ohta (1997)

TRXS DE CIANOBACTERIAS

Nombre científico	Clasificación	Referencia
<i>Anabaena</i> sp. (2 Trxs distintas)	Nostocales	Gleason <i>et al.</i> (1985) Alam <i>et al.</i> (1989)
<i>Synechocystis</i> sp. (4 Trxs distintas)	Chroococcales	Kaneko <i>et al.</i> (1999)
<i>Synechococcus</i> sp. (<i>Anacystis</i>)	Chroococcales	Muller & Buchanan (1989)

TRXS DE BACTERIAS

Nombre científico	Clasificación	Referencia
<i>Halobacterium</i>	Halobacteriales	Ng <i>et al.</i> (1998)
<i>Aquifex aeolicus</i>	Aquificales	Deckert <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positivas	Chen <i>et al.</i> (1989)
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Gram-positivas	Cohen <i>et al.</i> (1993)
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Gram-positivas	Labudova <i>et al.</i> (1994)
<i>Mycoplasma capricolum</i>	Gram-positivas	Bork <i>et al.</i> (1995)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Gram-positivas	Himmelreich <i>et al.</i> (1996)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Gram-positivas	Fraser <i>et al.</i> (1995)
<i>Corynebacterium nephridii</i>	Gram-positivas	McFarlan <i>et al.</i> (1989)
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacterias	Holmgren (1968)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Enterobacterias	Kotani & Nakajima (1992)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Púrpura no del azufre	Miloso <i>et al.</i> (1993)
<i>Helicobacter pylori</i>	Púrpura no del azufre	Tomb <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Púrpura no del azufre	Clement-Metral <i>et al.</i> (1988)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Púrpura no del azufre	Johnson <i>et al.</i> (1988b)
<i>Chromatium vinosum</i>	Púrpura no del azufre	Johnson & Biemann (1997)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Púrpura no del azufre	Fleischmann <i>et al.</i> (1995)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Verde no del azufre	Biemann y Papayannopoulos (1994)
<i>Chlorobium limicola</i>	Verde del azufre	Mathews <i>et al.</i> (1987)
<i>Treponema pallidum</i>	Espiroquetales	Fraser <i>et al.</i> (1998)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Espiroquetales	Fraser <i>et al.</i> (1997)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Clamidiales	Kalman <i>et al.</i> (1999)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Clamidiales	Stephens <i>et al.</i> (1998)

4.1.2. Las tiorredoxinas de los Arqueones

Prácticamente la totalidad de la bibliografía publicada sobre tiorredoxinas comienza con palabras parecidas a las que siguen: "*Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas ubicuas que se encuentran en todos los organismos vivos*". Hoy día sabemos que esto no es cierto y, en adelante, será necesario cambiar las palabras introductorias, ya que se puede decir de forma definitiva que un reino entero de organismos, los Arqueones, no codifican verdaderas tiorredoxinas.

Los grandes proyectos de secuenciación a gran escala han comenzado a dar sus frutos, de forma que ya están disponibles para los investigadores los genomas completos de 6 Arqueones, 16 Eubacterias y 2 Eucariotas, la investigación de los cuáles ha dado origen a la ciencia emergente de la Genómica, que trata del estudio de la distribución y organización de los genes en los genomas de los organismos. Cuando se dispone del genoma completo de un organismo, se obtiene como consecuencia inmediata su proteoma, o conjunto de las proteínas que dicho organismo puede codificar. Los seis Arqueones cuyos genomas son completamente conocidos, junto con la fecha de compleción del genoma se detallan en la siguiente tabla.

Organismo	Fecha de conclusión de la secuenciación	Referencia
<i>Aeropyrum pernix K1</i>	19/6/1999	Kawarabayasi <i>et al.</i> (1999)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	17/12/1997	Klenk <i>et al.</i> (1997)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	17/11/1997	Smith <i>et al.</i> (1997)
<i>Methanococcus jannaschii</i>	30/1/1998	Bult <i>et al.</i> (1996)
<i>Pyrococcus abyssi</i>	12/6/1999	Heilig <i>et al.</i> (no publicado)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	19/6/1998	Kawarabayasi <i>et al.</i> (1998)

Ninguno de ellos codifica una proteína que pueda considerarse tiorredoxina, según la definición de la base de datos de motivos de proteínas, Prosite, aunque la mayoría de ellos codifican proteínas relacionadas, con centros activos parecidos a los de la tiorredoxina cuya única secuencia común es -CXXC-. El resto de las secuencias de estas moléculas casi no guarda homología con las demás tiorredoxinas de Eubacterias y Eucariotas, y tampoco parecen estar muy relacionadas entre sí, pudiéndose dividir en tres grupos según la secuencia de su centro activo. Por todas estas consideraciones, no parece adecuado considerarlas miembros de la familia de las tiorredoxinas, proponiéndose para ellas el nombre alternativo de "arqueotiorredoxinas".

Las arqueotiorredoxinas conocidas hasta la fecha pueden clasificarse en tres categorías:

Tipo I: Centro Activo -CPYC-

Tipo II: Centro activo: -CMPC-

Tipo III: Centro activo: -CPHC-

Pertenecen al Tipo I la Trx de *Aeropyrum pernix*, una gran proteína de 200 aminoácidos de longitud, así como la Trx 2 de *Archaeoglobus fulgidus* y la única Trx de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, estas dos últimas mucho menores. El tipo II incluye las Trx 3 y Trx 4 de *Archaeoglobus fulgidus*, mientras que al tipo III pertenecen la

única Trx de *Methanococcus jannaschii* y la Trx 1 de *Archaeoglobus fulgidus*. La secuencia -CPHC- característica de este grupo es la misma que la que presentan las proteín-disulfuro-isomerasas (PDI) de animales y plantas, aunque posiblemente sea una casualidad, ya que no existe homología en cuanto al resto de la molécula. Además de estos tres tipos, *Aeropyrum pernix* codifica otra gran proteína de 349 aminoácidos con una secuencia -WCGRC-, sin homólogos conocidos.

En cuanto a las dos especies de *Pyrococcus* secuenciadas, ninguna de ellas codifica nada que sea parecido a una tiorredoxina.

A continuación se incluyen las secuencias alineadas de las arqueotiorredoxinas de los tres grupos.

Arqueotiorredoxinas de Tipo I

A.pernix	MYASASPFTILQNIHSTPATIHPLRRPAS YLLGHI FDRQLRSTITGPLDPG
A.fulgidus2	-----
M.thermoaut.	-----
A.pernix	GVG VIRVEIDPELREILRKAASIVVEASTCCRIDYEGPVAEVLDPRELRE
A.fulgidus2	-----
M.thermoaut.	-----
A.pernix	MLDNCRVVIAFFYTPTCPYCRMLKPVFEEAARFYRGKALFAAVNLARFPFM
A.fulgidus2	-----MVFTSKYCPYCRAFEKVVERLMGELNGTVEFEVVDVDEKREL
M.thermoaut.	----MNVNIEVETSPTCPYCPMAIEVVDEAKKEFGDKIDVEKIDIMVDREK
A.pernix	SDALGIMGTFTIIAFVIRGREAGRLVGLMPPERLEAFVEAVLDAGGCV----
A.fulgidus2	AEKYEVLMLPTLVLADGDEVLGGFMGFADYKTAREAI LEQISAF LKPDYKN
M.thermoaut.	AIEYGLMAVPAIAINGVVRVFGAPSREELFEAINDEME-----

Arqueotiorredoxinas de Tipo II

A.fulgidus3	MDELELIRQKKLKEMMQKMSGEEKARKVLDSPVKLNS SNFDETLKNNENVV
A.fulgidus4	-----MERLNSERFREVIQSDKLVV
A.fulgidus3	VDFWAEWCMPCMKMIAPVIEELAKEYAGKVVFGKLN TDENPTIAARYGISAI
A.fulgidus4	VDFYADWCMPCRYISPILEKLSKEYNGEVEFYKLV DENQDVAFEYGIASI
A.fulgidus3	PTLI-----FFKKGKPV DQLV GAMPKSELKRWVQRNL--
A.fulgidus4	EYGIAS IPTVLFFRNGKVVGGFI GAMPESAVRAEIEKALGA

Arqueotiorredoxinas de Tipo III

A.fulgidus1	MPMVRKAAFYAI AVISGVLA AVVGNALYHNFNSDLGAQAKIYFFYS DS CPHC
M.jannaschi	-----MSKV KIELFTSPM CPHC
A.fulgidus1	REV KPYVEEFAKTHNLTWCNVAEMDANCSKIAQEFGIKYVPTLVIMDEEAHV
M.jannaschi	PAAKRVVEEVANEMPDAVEVEYINVMENPQKAMEY GIMAVPTIVINGDVEFI
A.fulgidus1	FVGSDEVRTAIEGMK-
M.jannaschi	GAPTKEALVEAIKKRL

Es interesante hacer notar que, además de los cuatro aminoácidos del centro activo, en las arqueotiorredoxinas se conserva una prolina que puede estar en situación equivalente a la Pro-76 de la tiorredoxina de *E. coli* (marcada con fondo verde en los alineamientos anteriores). Esta prolina está muy conservada en todas las tiorredoxinas, se encuentra en configuración *cis*, al comienzo de la hoja β -4, rodeada de aminoácidos hidrofóbicos y en interacción con el puente disulfuro que se forma en el centro activo cuando la tiorredoxina se encuentra oxidada, presuntamente estabilizándolo. Esto podría ser un indicador de que, a pesar de las secuencias escasamente relacionadas, las arqueotiorredoxinas podrían compartir elementos estructurales con las tiorredoxinas de los demás organismos.

4.1.3. Las tiorredoxinas bacterianas y de cianobacterias

La figura 4.1 muestra el árbol evolutivo, obtenido mediante CLUSTALW y PHYLIP, con el método de relaciones vecinales, a partir de las secuencias de tiorredoxinas bacterianas y de cianobacterias presentes en las bases de datos. Con objeto de estudiar sus relaciones evolutivas, se han añadido al árbol las Trxs m de guisante (*Pisum*) y del alga roja *Porphyra*, así como la Trx humana, la Trx 1 de la levadura *Saccharomyces* y la Trx h (citósolica) de *Arabidopsis thaliana*.

Se comprueba que las secuencias quedan distribuidas en dos grandes grupos. En la rama de la parte superior del árbol, que se podría llamar de las tiorredoxinas "típicamente bacterianas" se incluyen todas las Trxs de los Firmicutes (bacterias púrpuras no del azufre) y Enterobacterias, la mayoría de las Proteobacterias (bacterias Gram-positivas), excepto los Micoplasmas, la bacteria verde del azufre, *Chlorobium* y las Trxs m de algas y plantas superiores, que se engloban en un subgrupo junto con las Trxs de las cianobacterias *Synechocystis* (Trx 2), *Anabaena* (Trx 1) y *Synechococcus* (*Synechococcus* es el nombre genérico actualmente aceptado para *Anacystis nidulans*). Es interesante comentar que la cianobacteria *Synechocystis* codifica cuatro tiorredoxinas. De ellas, la única próxima a las Trxs m es la denominada Trx 2 en las bases de datos, mientras que Trx 1, que está emparentada con la Trx 2 de *Anabaena*, forman un subgrupo aparte, aunque dentro del grupo principal de tiorredoxinas típicamente bacterianas.

Las otras dos Trxs de *Synechocystis*, denominadas m1 y m2 en las bases de datos, no están directamente relacionadas con las tiorredoxinas m (ni en realidad, con ninguna otra Trx conocida, localizándose en una rama aparte del árbol), por lo que su clasificación actual como Trxs m es, sin ninguna duda, errónea. A modo de curiosidad, haremos notar que las Trxs de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Neisseria gonorrhoeae*, poseen exactamente la misma secuencia, indicando la estrecha proximidad de su filogenia, a pesar de que *Neisseria* no está clasificada actualmente como Enterobacteria, sino como Firmicute (en el árbol sólo se incluye el nombre de *E. coli*, en aras de una mayor claridad).

En la rama inferior se encuentra el segundo gran grupo de Trxs bacterianas, formado por las bacterias de los grupos Clamidiales y Espiroquetales, que se posicionan, en este estudio, junto con las de los Eucariotas. Las Proteobacterias forman un conjunto heterogéneo que se distribuye entre los dos grupos del árbol. Mientras que *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium nephridii* y las dos especies de *Streptomyces* se engloban en el grupo principal, las tres especies de *Mycoplasma* se engloban en el grupo de las Clamidiales-Espiroquetales, indicando posiblemente que el taxón Proteobacterias es polifilético. No parece que los Micoplasmas debieran englobarse en él, estando más relacionados con las Clamidas y Espiroquetas.

La bacteria verde no del azufre, *Chloroflexus*, se encuentra en un grupo aparte. De todas las tiorredoxinas estudiadas, la de *Chloroflexus* es la que más próxima se encuentra al hipotético ancestro común (localizada en la rama de menor longitud).

Así mismo, *Halobacterium* se localiza en otra rama única, alejada del resto de las bacterias, como cabe esperar de una especie cuya clasificación como Eubacteria o Arqueón es aún objeto de controversia. *Halobacterium* codifica una verdadera tiorredoxina, con centro activo -WCGPC- y de secuencia claramente homóloga a las demás bacterias, por lo que se confirma su identidad como Eubacteria, aunque se encuentre poco relacionada con los grandes grupos bacterianos.

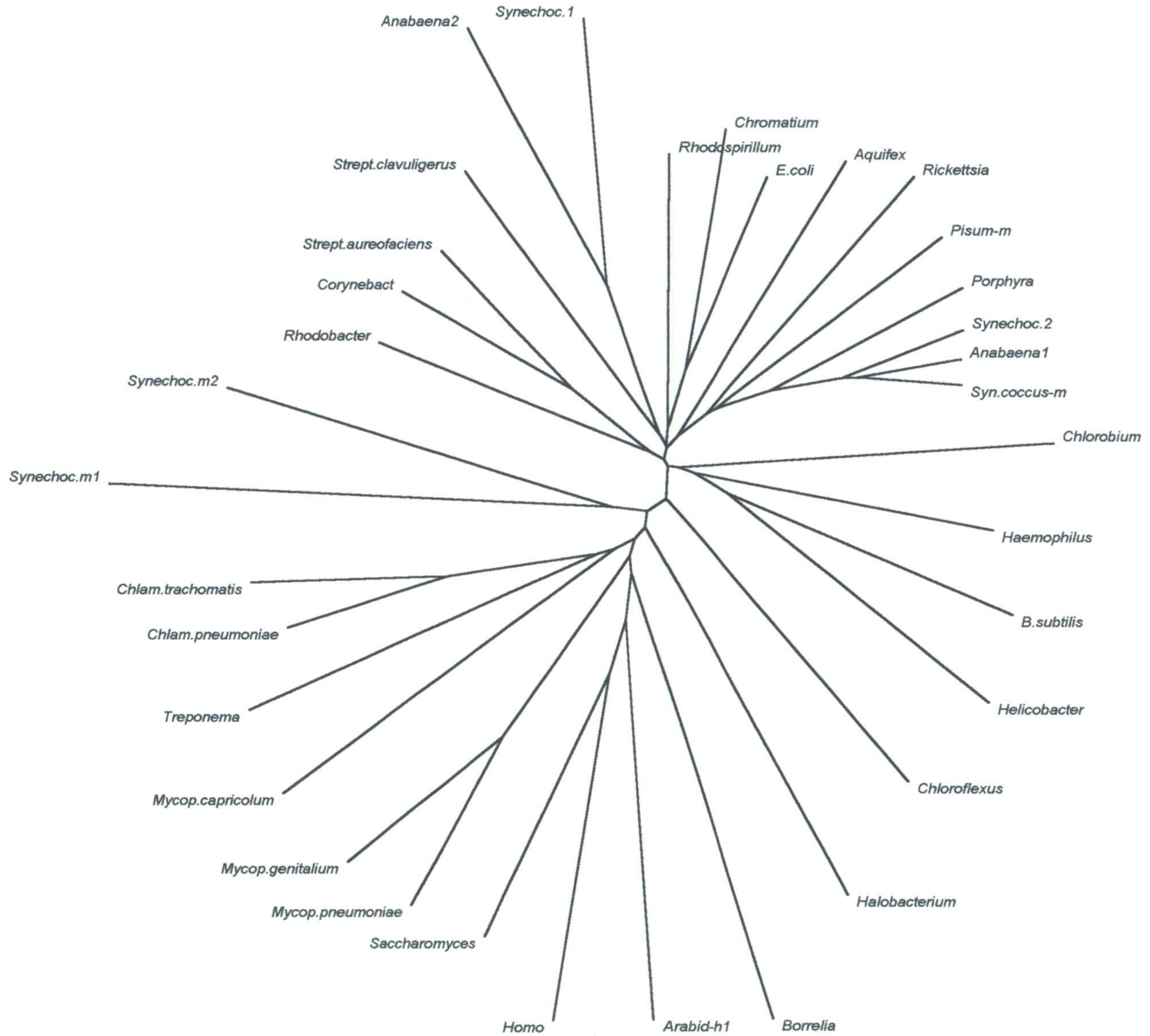


Figura 4.1. Arbol evolutivo de las tiorredoxinas bacterianas.

0.1

El alineamiento empleado para construir el árbol filogenético de las tiorredoxinas bacterianas es el que se muestra a continuación. La numeración es la de la Trx de *E. coli* y se muestran en rojo los residuos altamente conservados.

	1	10	20	30	34
<i>B. subtilis</i>	-----AIVKATDQSFSAETSEG-----	VVLADFWAPWCGP			
<i>Helicobacter</i>	-----SHYIELTEENFESTIKKG-----	VALVDFWAPWCGP			
<i>Haemophilus</i>	-----SEVLHINDADFESVNVNSDI---	PILLDFWAPWCGP			
<i>Chlorobium</i>	-----AGKYFEATDKNFQTEILDSDK---	AVXVDFWASWCGP			
<i>Anabaena1</i>	-----SAAAQVTDSTFKQEVLDSDV---	PVLVDFWAPWCGP			
<i>Syn. coccus-m</i>	-----SVAAAVTDATFKQEVLESSI---	PVLVDFWAPWCGP			
<i>Synechoc.2</i>	-----SATPQVSDASFKEVDLDSEL---	PVLVDFWAPWCGP			
<i>Porphyra</i>	-----SVS-QVTDASFQEVINNDL---	PVLVDFWAPWCGP			
<i>Pisum-m</i>	-----AVNEVQVVNDSSWDELVISET---	PVLVDFWAPWCGP			
<i>Rickettsia</i>	SCYNEITTLLEFDSNDINTTQRINMVNNVTDSSFKNEVLESDL---	PVMVDFWAEWCGP			
<i>Aquifex</i>	-----AGRVIELNEQNWEQEVLQSDK---	PVLVDFWAPWCGP			
<i>Anabaena2</i>	-----SKGVITITDAEFESEVLKAEQ---	PVLVYFWASWCGP			
<i>Synechoc.1</i>	-----S--LLEITDAEFEQETQGQTK---	PVLVYFWASWCGP			
<i>Strept. clav.</i>	-----AGVLKNVTDDTFEADV LKSEK---	PVLVDFWAEWCGP			
<i>Chromatium</i>	-----SDSIVHVTDDSFEEEVXKSPD---	PVLVDYWADWCGP			
<i>E. coli</i>	-----SDKI IHLTDDSFDTDVLKADG---	AILVDFWAEWCGP			
<i>Rhodospiril.</i>	-----KQVSDASFEEDVLKADG---	PVXVDFWAEWCGP			
<i>Corynebact</i>	-----ATVKVDNSNFQSDV LQSSE---	PVVVDFWAEWCGP			
<i>Strept. aure.</i>	-----GATVKVTNATFKSDVLESDK---	PVLVHFE GPWCGP			
<i>Rhodobacter</i>	-----STVPVTDATFDTEVRKSDV---	PVVVDFWAEWCGP			
<i>Chloroflexus</i>	-----AKPIEVHSDSDFAEKVLQSKT---	PVVVDFWAPWCGP			
<i>Synechoc. m2</i>	-----AVKKQFANFAEMLAGSPK---	PVLVDFYATWCGP			
<i>Halobacteri.</i>	-----ATDTAATTGTASPDEPLYVNGQTELDVTSND---	VVLADFYADWCGP			
<i>Homo</i>	-----VKQIESKTA FQEALDAAGD--	KLVVVDFSATWCGP			
<i>Saccharomyc.</i>	-----VTQLKSASEYDSAL-ASGD--	KLVVVDFFATWCGP			
<i>Arabid-h1</i>	-----ASEEGQVIACHTVETWNEQLQKANESKTLVVVDFFTASWCGP				
<i>Borrelia</i>	-----AISLTEEDFVVKVFDYKNDKEWSFRGDRPAI IDFYANWCGP				
<i>Mycop. pneum.</i>	-----VTEIKSLKQLGELFASNK---	VIIIDFWAEWCGP			
<i>Mycop. genit.</i>	-----VTEIRSLKQLEEIFSAKKN---	VIVDFWAAWCGP			
<i>Chlam. pneum.</i>	-----VKI---ISSENFDSFIASG-----	LVLVDFFAEWCGP			
<i>Chlam. trach.</i>	-----VQV---VSQENFADSIASG-----	LVLIDFFAEWCGP			
<i>Treponema</i>	-----ALLD--ISSGNVRKTIETNP----	LVI VDFWAPWCGS			
<i>Mycop. capri.</i>	-----FIMADI IKITSKEQFDKEIKEG-----	KVLVDFNATWCGP			
<i>Synechoc. m1</i>	-----VVAWTTRDQ SARNPMLAVNEDNFDNLVLQCPK---	PILVYFGAPWCGL			

	40	50	60	70	80	90	94
<i>B. subtilis</i>	CKMIAPVLEELDQEMGDKLKIVKIDVDENQETAGKYGVMSIPTLLVLKDGGEVVETS VGFK						
<i>Helicobacter</i>	CKMLSFPVIDELASEYEGKAKICKVNTDEQEELSAKFGIRSIPTLLFTKDGGEVVHQLVGVQ						
<i>Haemophilus</i>	CKMIAPVLDELAP EFAGKVKIVKMNVDDNQATPAQFGVRSIPTLLLIKNGQVVATQVGAL						
<i>Chlorobium</i>	CMMXGFPVIEQLADDYEGKAI IAKXNVDENPNIAGQYGXRSIPTMLIXKGGKVV DQMVGAL						
<i>Anabaena1</i>	CRMVAPVVDEIAQQYEGKIKVVKVNTDENPQVASQYGIRSIPTLMI FKGQKVD MVGAV						
<i>Syn. coccus-m</i>	CRMVAPVVDEIAQQYSDQVKVVKVNTDENPSVASQYGIRSIPTLMI FKGQQRVDTVVGAV						
<i>Synechoc.2</i>	CRMVAPVVDEISQQYEGKVKVVKLNTDENPNTASQYGIRSIPTLMI FKGQQRVDMVVGAV						
<i>Porphyra</i>	CRMVSPVVDAIAEEYESSIKVVKINTDDNPTIAAEYGIRSIPTLMI FKSGERVDTVIGAV						
<i>Pisum-m</i>	CRMIAPI IDELAKEYAGKIKCYKLNTE SPNTATKYGIRSIPTVLF FKN GERKDSVIGAV						
<i>Rickettsia</i>	CKMLIPI IDEISKE LQDKVKV LKMNI DENPKTPSEYGIRSIPTIMLFKNGEQKDTKI GLQ						
<i>Aquifex</i>	CRIIAPI IEEIAEELGDKVKVVKLNTDENPNIAMRYGIRAIPTI I LFKNGEVVDTRIGVQ						
<i>Anabaena2</i>	CQLMSPLINLAANTYS DRLKVVKLEIDPNPTTVKKYKVEGVPALRLVKGEQILDSTEGVI						
<i>Synechoc.1</i>	CRLMAPAIQAI AKDYGD KLKVLKLEVDPNPAAVAQCKVEGVPALRLFKNNELVMTHEGAI						
<i>Strept. clav.</i>	CRQIAPSLEAIT-EHGGQIEIVKLNIDQNPATAAKYGVMSIPTLN VYQGGEVVKTIVGAK						
<i>Chromatium</i>	CKMXAPVXDEIADEYAGRVKXAKXNXDENPNTPPRYGXRG IPTLMLFRGGEVEATKVGAV						
<i>E. coli</i>	CKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI DQNP GTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGAL						
<i>Rhodospiril.</i>	CRQXAPALEELATALGDKVTVAKINIDENPQTPSKYGVRGIPTLMI FKGQQAATKIGAL						
<i>Corynebact</i>	CKMIAPALDEIATEMAGQVKIAKVNIDENPELAAQFGVRSIPTLLMFKDGELAA NMVGA						

Resultados y discusión

Strept.aure. CKMVAPVLDEIANEYEGKVKVAKVNTDENPQLASQYGVRSIPTRLMFKGGEVAANMVGAA
 Rhodobacter CRQIGPALEELSKEYAGKVIVKVNVDENPESPAMLGVRGIPALFLFKNGQVVSNKVGA
 Chloroflexus CRVIAPILDKLAGEYAGRLTIKVNNTDDNVQYASQLGLKGLPTXVIFKDGREVGRLVGAR
 Synechoc.m2 CQMMAPILEQVGSHLRQQIQVVKIDTDKYPAIATQYQIQSLPTLVLFKQGGQPVHRMEGVQ
 Halobacterim CQMLEFVVETLAEQTD--AAVAKIDVDENQALASAYGVRGVPTLVLFADGEQVEEVVGLQ
 Homo CKMIKPFHSLSEKYSN-VIFLEVDVDDCQDVASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGFEFSGAN
 Saccharomyc. CKMIAPMIEKFAEQYSD-AAFYKLDVDEVSDVAQKAEVSSMPTLI FYKGGKEVTRVVGAN
 Arabid-h1 CRFIAPFFADLAKKLPN-VLFLKVDDELKSVASDWAIQAMPTFMFLKEGKILDKVVGAK
 Borrelia CKMLSPIFEKLSKYEENSIDFYKVDTDKEQDISSAIGVQSLPTILFIPVDGKPKVSVGFL
 Mycop.pneum. CKITGPEFAKAASEVST-VAFKVNVDQTDIAAAYKITSLSPTIVLFEKQEKHRAIGFM
 Mycop.genit. CKLTSPEFQKADEFSD-AQFVKVNVDHDTIAAAYNITSLSPTIVVFENGVEKKRAIGFM
 Chlam.pneum. CRMLTPILENLAAELPH-VTIGKINIDENSKPAETYEVSIIPTLILFKDNEVARVVGGLK
 Chlam.trach. CKMLTPIVLEALAAELPH-VTILKVDIDSSPRPAEQSVSSIIPTLILFKDKEEVERSVGLK
 Treponema CKMLGPFVLEEVESEVSGGVVIGKLNVDLNRQVAEEFKIMSIIPTLITFENGQKNKHIGFA
 Mycop.capri. CKMLAPILHDFAKKVDG-VKFLDVDVLDNRQVAEEFKIMSIIPTLITFENGQKNKHIGFA
 Synechoc.m1 CHFVKPELLNHLHGEWQEQLVCVEVNADVNLHLANAYRLKNLPTLILFNRRQVIQRLEDFR

	95	100	108
B.subtilis	PKE-----	ALQELVNKHL-----	
Helicobacter	TKV-----	ALKEQLNKLLG-----	
Haemophilus	PKT-----	QLANFINQHI-----	
Chlorobium	PKN-----	MIAKKIDEHIG-----	
Anabaena1	PKT-----	TLSQTLEKHL-----	
Syn.coccus-m	PKT-----	TLANTLDKHL-----	
Synechoc.2	PKT-----	TLASTLEKYL-----	
Porphyra	PKS-----	TLESTLNKYIS-----	
Pisum-m	PKA-----	TLSEKVEKYI-----	
Rickettsia	QKN-----	SLLDWINKSI-----	
Aquifex	PKERLNKWFSTFNNLWRLRPVLIPLLKPHVTSFGGPPPRKSFS		
Anabaena2	SKD-----	KLLSFLDTHLNN-----	
Synechoc.1	AKP-----	KLLELLKEELDFI-----	
Strept.clav.	PKA-----	ALLRPGVPR-----	
Chromatium	SKS-----	QLTAF LDSNX-----	
E.coli	SKG-----	QLKEFLDANLA-----	
Rhodospiril.	PKT-----	KLFEWVEASV-----	
Corynebact	PKS-----	RLADWIKASA-----	
Strept.aure.	PKT-----	RLAAFLDASL-----	
Rhodobacter	PKA-----	ALATWIASAL-----	
Chloroflexus	PEA-----	MYREIFDKVLAMA-----	
Synechoc.m2	QAA-----	QLIQQLQVFF-----	
Halobacteri.	DED-----	ALKDLIESYTE-----	
Homo	KEK-----	LEATINELV-----	
Saccharomyc.	PAA-----	IKQAIASNV-----	
Arabid-h1	KDE-----	LQSTIAKHLA-----	
Borrelia	QED-----	AFENIIKDFFGF-----	
Mycop.pneum.	PKA-----	KIVQLVSQ-----	
Mycop.genit.	PKT-----	KIIDL FNN-----	
Chlam.pneum.	DKE-----	FLTNLINKHA-----	
Chlam.trach.	DKD-----	SLIKLISKHQ-----	
Treponema	DKS-----	KILT LIQKNA-----	
Mycop.capri.	TPD-----	QLKNLID-----	
Synechoc.m1	VRED-----	LHRIREQIAVSLFSP-----	

El resultado principal de este estudio filogenético es la confirmación de que las tiorredoxinas m son de origen claramente procariótico, como ya se conoce desde hace algunos años (Hartman *et al.*, 1990). Estos autores, con un menor número de secuencias disponibles para llevar a cabo su estudio, dividían las Trxs bacterianas en tres grupos, el de los Firmicutes, el de las Cianobacterias y el de *Chlorobium*. Según mis resultados, no veo

necesidad alguna de distinguir entre los tres grupos, así que los reúno en un único grupo de Trxs típicamente bacterianas, junto con las Trxs m de algas y plantas superiores y las Trxs de Proteobacterias. Por otra parte, es necesario introducir un nuevo grupo, el de las tiorredoxinas Clamidiales-Espiroquetales, en el cuál se incluyen también los Micoplasmas y que está más relacionado con los Eucariotas que el anterior. Quizás la célula ancestral que dio origen al núcleo de los Eucariotas estaba relacionada estrechamente con los antepasados de Espiroquetas y Clamidas. Este resultado resulta especialmente interesante, ya que está en consonancia con la reciente teoría de Lynn Margulis (1996), que supone que las células Eucariotas se originaron por simbiosis permanente entre células bacterianas relacionadas con Espiroquetas y otros procariotas. Según Margulis, las Espiroquetas aportaron, entre otras cosas, la proteína que dio origen a las tubulinas, que resultan tan importantes por permitir el movimiento de los cilios y flagelos que impulsan a las células eucarióticas y formar el huso mitótico que permite la distribución equitativa de los cromosomas durante la reproducción mitótica. Quizás también aportaron a los Eucariotas las Trxs. Es una hipótesis especialmente interesante para planear futuros estudios.

4.1.4. Las tiorredoxinas eucarióticas

El árbol evolutivo obtenido a partir de las secuencias de tiorredoxinas eucarióticas, mediante el mismo método que el anterior, se muestra en la figura 4.2. Se perfilan dos grupos bien diferenciados, las tiorredoxinas de origen claramente procariótico (las cloroplastídicas m y las mitocondriales) y las de origen claramente eucariótico (las citosólicas de plantas, animales, hongos y eucariotas inferiores).

Respecto a las procarióticas, se observa que el grupo de las Trxs m de plantas y algas verdes (*Chlamydomonas*) está estrechamente relacionado con las Trxs de algas rojas (*Cyanidium*, *Porphyra* y *Griffithsia*). Estas últimas están codificadas por el genoma cloroplastídico (Reynolds *et al.*, 1994), mostrando así evidencias de su origen. En algún momento de la evolución entre las algas rojas y las algas verdes sucedió la traslocación del gen de la Trx m, que pertenecía a la bacteria ancestral que dio origen al cloroplasto, del genoma cloroplastídico al nuclear, donde se le añadió un péptido de tránsito. Un intrón situado entre las secuencias codificadoras del péptido de tránsito y de la proteína madura en la Trx m de guisante permanece como reliquia evolutiva de esta modificación (Sahrawy *et al.*, 1999). ¿Por qué ocurrió esta traslocación del genoma plastídico al nuclear? Está claro que la traslocación de genes de los orgánulos al núcleo debe suponer alguna ventaja evolutiva, porque ha ocurrido en varias ocasiones. Una de las posibles ventajas es que la regulación de la expresión es más eficaz en el núcleo, donde numerosos factores de transcripción actúan regulando la expresión de los diferentes genes necesarios para cada estado metabólico de la célula. Otra posible explicación es que el acortamiento del genoma plastídico favorezca la velocidad de replicación de los cloroplastos, permitiendo un mayor número de cloroplastos por célula y favoreciendo así la fotosíntesis. Por último, podría existir una selección positiva para los rasgos que determinen un mayor control del hospedador sobre el simbionte, cuya utilidad es evidente.

El otro gran grupo de Trxs de origen procariótico son las Trxs mitocondriales. En la actualidad sólo se conocen las secuencias de cinco proteínas mitocondriales, todas ellas de animales (Miranda-Vizueté *et al.*, 1998), aunque se sabe desde hace tiempo que las mitocondrias de plantas también poseen Trxs específicas. Estas han sido localizadas en extractos proteicos mitocondriales de patata (Bodenstein-Lang *et al.*, 1989), pero sus genes aún no han sido localizados. Uno de los resultados del presente estudio es que la

clasificada como Trx 1 del genoma del nematodo *Cenorhabditis elegans* (el único Metazoo cuyo genoma ha sido completamente secuenciado hasta el momento) es claramente una Trx mitocondrial y se sitúa en el árbol evolutivo junto a sus homólogas de mamíferos.

La otra tiorredoxina hallada en el genoma de *Cenorhabditis* (la Trx 2) es citosólica y se encuentra próxima a la de la mosca de la fruta, *Drosophila*. Otro resultado interesante es la verificación de que las tiorredoxinas mitocondriales son de origen procariótico y están más relacionadas con las tiorredoxinas m cloroplastídicas que con el resto de las de origen eucariota. Este hecho era presumible ya que, del mismo modo que el cloroplasto ancestral portaba la Trx m en su genoma, también la mitocondria ancestral debía de tener una tiorredoxina, aunque podría haber ocurrido que se perdiera o incluso que otra tiorredoxina eucariota hubiera evolucionado adquiriendo un péptido de tránsito y ocupando la mitocondria. Los resultados de este estudio demuestran que nada de esto ocurrió, sino que la historia de la Trx mitocondrial corrió paralela a la de la Trx m cloroplastídica. Se podría incluso predecir que los Eucariotas más ancestrales aún codifiquen una tiorredoxina en su genoma mitocondrial, al igual que sucede con la Trx m en los cloroplastos de las algas rojas. El estudio de las Trxs mitocondriales no ha hecho nada más que empezar y posiblemente nos esperan interesantes resultados sobre este tema en un futuro próximo.

En cuanto a la parte superior del árbol filogenético, es decir, las tiorredoxinas eucarióticas, nos encontramos con varios grupos diferenciados. El más numeroso en cuanto a secuencias disponibles es el de las Trxs citosólicas vegetales (las Trxs h y sus parientes). Hay que hacer notar que, para la construcción del árbol se ha utilizado una única secuencia de Trx h para cada organismo, cuando se disponía de varias de ellas en las bases de datos. Así, de las cinco Trxs h de *Arabidopsis thaliana* y de las dos de *Nicotiana tabacum*, sólo aparece una de ellas en el diagrama. Las Trxs h se ordenan en el diagrama prácticamente en orden evolutivo, partiendo de la proteína de *Chlamydomonas*, seguida por la conífera *Picea*, y por las Magnoliofitas, excepto que existe un pequeño error de orden en la aparición de *Brassica* (una dicotiledónea), antes que las monocotiledóneas *Oryza* y *Triticum*, para después acabar de nuevo con las dicotiledóneas *Arabidopsis* y *Nicotiana*.

La abundancia de isoformas de la Trx h en vegetales se ha convertido en uno de los enigmas más intrigantes de la biología vegetal. Las cinco Trxs h de *Arabidopsis thaliana* se expresan activamente y han sido detectadas a nivel de ARN_m, por lo que no se trata de pseudogenes en proceso de deriva evolutiva. Es de notar que muchas de las Trxs h poseen un centro activo extraño -WCCP- (por ejemplo, tres de las cinco Trxs h de *Arabidopsis* y las cuatro Trxs h conocidas para el género *Brassica*), lo que sugiere que poseen funciones diferentes a las Trxs convencionales. Hasta ahora, ninguna función concreta ha sido demostrada definitivamente para las Trxs h, salvo las ya conocidas para las Trxs procariotas (reducción de ribonucleótidos, por ejemplo). El resto de las posibles funciones de las Trxs h sólo se pueden, por ahora, conjeturar.

La tiorredoxina de *Hevea* empleada para el estudio filogenético no es una Trx h real y por eso no aparece donde le correspondería (*Hevea* es una dicotiledónea). Se trata de una tiorredoxina muy modificada que aparece en el látex y cuyo centro activo es -WCIPS-, por lo que ha perdido la segunda cisteína, aunque el resto de su secuencia delata su ascendencia de Trx h. También se encuentran muy relacionadas con las Trxs h, aunque igualmente evolucionadas, las proteínas responsables de la auto-incompatibilidad del polen en las plantas herbáceas (Li *et al.*, 1995); se encuentran representadas en el diagrama por las Trxs de *Phalaris*, *Secale* y *Lolium*. Estas Trxs se expresan únicamente en las anteras de los estambres y en la superficie de los granos de polen y poseen una secuencia

característica de Trx h, unida a una secuencia polimórfica hipervariable en su extremo amino. Son responsables de impedir la autofecundación de la planta. Hasta el momento, sólo han sido descritas en la familia Poáceas.

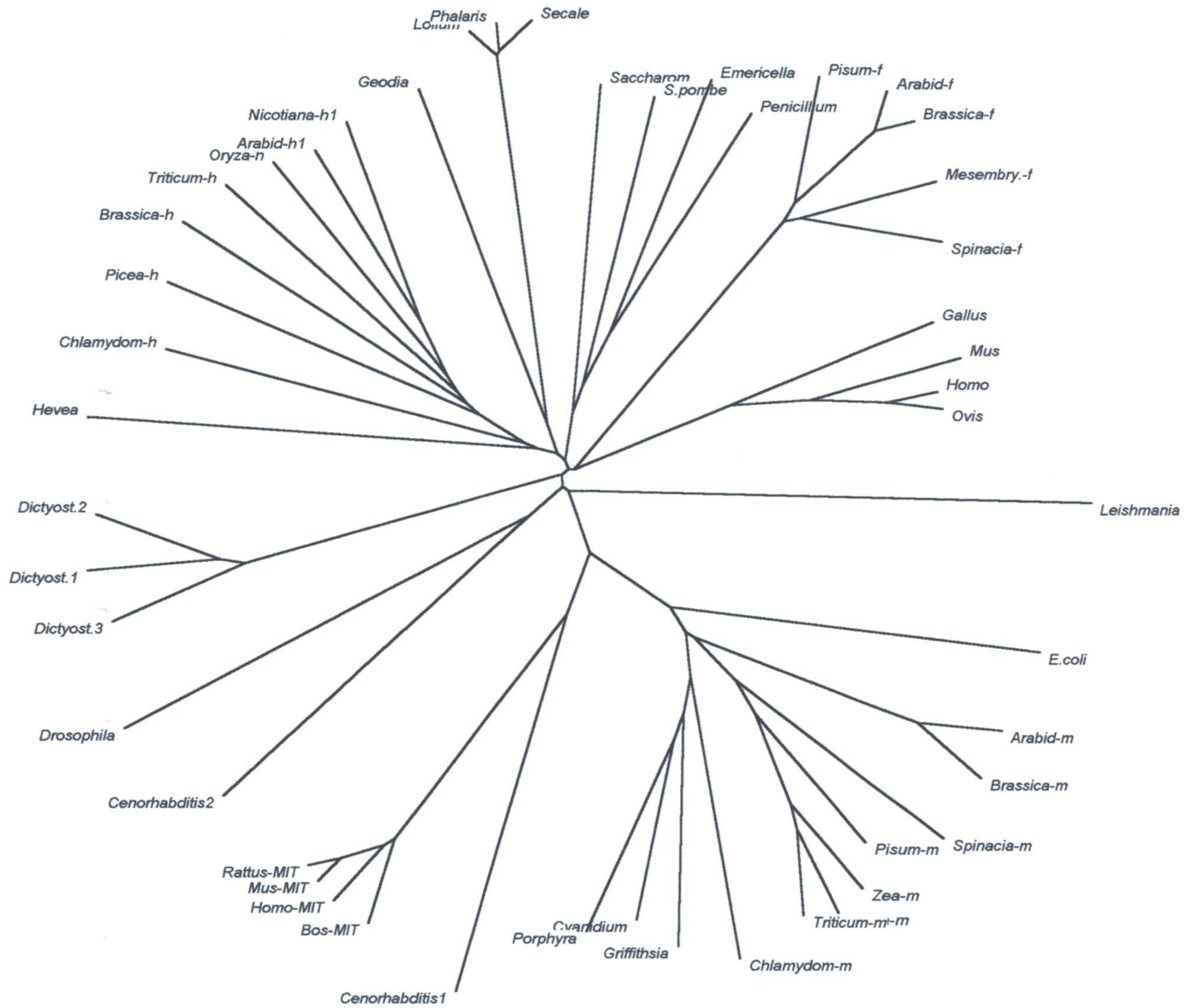


Figura 4.2. Arbol evolutivo de las tiorredoxinas eucarióticas.

El segundo grupo de tiorredoxinas vegetales de origen eucariótico es el de las Trx f del cloroplasto. Se trata de un grupo bastante homogéneo cuyas secuencias están muy conservadas, aunque todas las Trxs f secuenciadas hasta hoy son dicotiledóneas, lo que podría enmascarar su variación. Las Trxs f son de origen claramente eucariótico. Presumiblemente, al principio se trataba de proteínas relacionadas con las Trxs h, que adquirieron, a lo largo de la evolución, un péptido de tránsito al cloroplasto, tras lo cual divergieron de forma excepcionalmente rápida, porque las secuencias de las Trxs f apenas recuerdan ya a las de las Trxs h progenitoras. Posiblemente, cabe esperar que los cloroplastos de vegetales inferiores no posean Trx f. Hasta el momento no se ha encontrado una Trx f en *Chlamydomonas* (aunque esto no quiere decir que no exista). Quizás las algas rojas carezcan también de Trx f. Sería otra línea de trabajo interesante para estudiar en un futuro.

Un tercer grupo de tiorredoxinas eucariotas son las correspondientes a Hongos y Levaduras. Aparecen en un grupo bien definido, que se localiza en el diagrama entre las Trxs h y las Trxs f de vegetales (*Emericella* es el nombre genérico actual para el moho anteriormente denominado *Aspergillus nidulans*). Los hongos (al menos las levaduras) también poseen varias tiorredoxinas (tres en el genoma totalmente secuenciado de *Saccharomyces cerevisiae*) y dos, por ahora, en el de *Schizosaccharomyces pombe*), aunque el grado de homología entre ellas es bastante grande.

Las tiorredoxinas de animales aparecen distribuidas en varias zonas del gráfico. Por un lado, los vertebrados forman un grupo compacto cuyas secuencias están próximas a las de las Trxs f de plantas. Sin embargo, las Trxs de invertebrados (*Cenorhabditis* y *Drosophila*) aparecen en otro grupo aislado. Esto puede deberse a una evolución especialmente rápida para el caso de las Trx de invertebrados, que da lugar a secuencias escasamente relacionadas, por lo que el algoritmo las coloca en un grupo aparte. Aún peor es el caso de la Trx de la esponja *Geodia*, que aparece sorprendentemente en el diagrama relacionada con las Trxs de auto-incompatibilidad de las herbáceas. Esto podría estar de acuerdo con la idea que apuntan algunos autores de que el taxón Metazoos (animales) es polifilético, teniendo los Poríferos (esponjas) un origen diferente al del resto de los animales. Sin embargo, la aparición de *Drosophila* y *Cenorhabditis* en una rama aparte sólo puede ser interpretada como un artefacto del método. Recordemos que todos los métodos de cálculo de distancias genéticas presuponen la existencia de un "reloj molecular", es decir, asumen que todas las secuencias evolucionan a la misma velocidad. Si las proteínas de un grupo de organismos, por la razón que sea, evolucionan a una velocidad superior a la normal, aparecerá más distante de su antecesor en un árbol filogenético de lo que debería estar en realidad.

Por último, la presencia de Eucariotas inferiores origina dos ramas independientes en el diagrama. Una de ellas es la de los Dictiostélidos o Mixamebas, llamados comúnmente mohos mucosos o mohos del fango. En la actualidad se considera un taxón aparte con características a medio camino entre las de los Hongos y las de los Metazoos. Las tres tiorredoxinas representadas pertenecen a la misma especie, *Dyctiostelium discoideum*. La última rama del árbol filogenético (y la más alejada del antecesor común) está ocupada por *Leishmania*, un Protoctista Euglenozoo parásito.

A continuación se incluye el alineamiento de las secuencias de Trxs eucarióticas empleado para realizar el árbol filogenético. Se muestra también la estructura secundaria de las tiorredoxinas, basada en la estructura conocida para la proteína humana y se representan en rojo los aminoácidos conservados en todas las tiorredoxinas eucarióticas.

Cabe señalar que los aminoácidos que se conservan en todas las Trxs eucariotas están conservados también en las procariotas y constituyen las señas de identidad de las tiorredoxinas.

Homo	-----
Ovis	-----
Mus	-----
Gallus	-----
Arabid-f	-----TVN
Brassica-f	-----TVN
Pisum-f	-----
Mesembry.-f	-----ESE
Spinacia-f	-----E
Arabid-h1	-----AS
Nicotiana-h1	-----AANDATSS
Oryza-h	-----AA
Triticum-h	-----AAAATATTTAAATAAAV
Brassica-h	-----AATAEVI
Picea-h	-----
Chlamydom-h	-----
Hevea	-----ETQEQQ
Phalaris	-----GGCVGKDRGIVEDKLDF
Secale	-----GGCVGKGRSIVEEKLDF
Lolium	-----GGCVGKDRSIVEDKLDF
Geodia	-----
Emericella	-----G
Penicillium	-----
S.pombe	-----
Saccharom.	-----
Dictyost.1	-----
Dictyost.2	-----
Dictyost.3	-----
Cenorhabdit2	-----LKR
Drosophila	-----
Leishmania	-----
Arabid-m	-----EAQ
Brassica-m	-----EAQ
Oryza-m	-----QCS
Triticum-m	-----KCK
Zea-m	-----QSK
Pisum-m	-----
Spinacia-m	-----KAS
Cyanidium	-----
Porphyra	-----
Griffithsia	-----
Chlamydom-m	-----RSV
E.coli	-----
Mus-MIT	-----AQRLLLGRFLTSVISRKPPQGVWASLTSKTLQTPQYNAGGLTVMPSPARTVHTTR
Rattus-MIT	-----AQRLLLRRFLTSVISRKPPQGVWASLTSTSLQTPPYNAGGLTGTPSPARTEFHTTR
Homo-MIT	-----AQRLLLRRFLASVISRKPSQGQWPPLTSKALQTPQCS PGGLTVTPNPARTIYTTR
Bos-MIT	-----AQRLLLRRFLTSIISGKPSQSRWAPVASRALKTPQYSPGYLTVTPSQARS IYTTR
Cenorhabdit1	-----TQLRHFSHG-----AS-----

	1	10	20	30	40	50																													
	$\beta 1$	$\alpha 1$	$\beta 2$	$\alpha 2$																															
Homo	----VKQIESKTAFQEALDAAGD--	KL	VV	DF	SAT	WCGPCKMIKPF	FFHSLSEKYS-NVIF																												
Ovis	----VKQIESKYAFQEALNSAGE--	KL	VV	DF	SAT	WCGPCKMIKPF	FFHSLSEKYS-NVVF																												
Mus	----VKLIESKEAFQEALAAAGD--	KL	VV	DF	SAT	WCGPCKMIKPF	FFHSLCDKYS-NVVF																												
Gallus	----VKSVDNLADFEAELKAAGE--	KL	VV	DF	SAT	WCGPCKMIKPF	FFHSLCDKFG-DVVF																												
Arabid-f	VSVGQVTEVDKDTFWPIVKAAGE--	KL	VV	LD	MYTQ	WCGPCKVIAP	KYKALSEKYD-DVVF																												
Brassica-f	VSVGQVTEVDKDTFWPIVKAAGE--	KI	VV	LD	MYTQ	WCGPCKVIAP	KYKALSEKYE-DVVF																												
Pisum-f	----KVTEVNKDTFWPIVNAAGD--	KT	VV	LD	MFTK	WCGPCKVIAP	LYEELSQKYL-DVVF																												
Mesembry.-f	TLVGKVTEVDKDTFWPIANGAGD--	KP	VV	LD	MYTQ	WCGPCKVMA	PKYQELAEKLL-DVVF																												
Spinacia-f	AIVGKVTEVNKDTFWPIVKAAGD--	KP	VV	LD	MFTQ	WCGPCKAMAP	KYEKLAEEYL-DVIF																												
Arabid-h1	EEGQVIACHTVETWNEQLQKANESKTL	VV	VD	FTAS	WCGPCR	FIAPI	FFADLAKKLP-NVLF																												
Nicotiana-h1	EEGQVFGCHKVEEWNEYFKKGVETKKL	VV	VD	FTAS	WCGPCR	FIAPI	LADI AKKMP-HVIF																												
Oryza-h	EEGVVIACHNKDEFDAQMTKAKEAGKV	VI	ID	FTAS	WCGPCR	FIAPI	VFAEYAKKFP-GAVF																												
Triticum-h	GPGEVISVHSLAQWMTQIEEANAANKL	VV	ID	FTAS	WCGPCR	IMAPI	FADLAKKFP-AAVF																												
Brassica-h	PAGEVIACHTVEDWNNKLKAAKESNKLI	VI	ID	FTAV	WC	PPCR	FIAPI	FVELAKKHL-DVVF																											
Picea-h	AEGNVFACHSTEGWRSKLQEAIDTKRL	VA	VD	FTAT	WCGPCR	VIGP	VFVELSKKFP-EIFF																												
Chlamydom-h	-GGSVIVIDSKAAWDAQLAKGKEEHKPI	IV	VD	FTAT	WCGPCK	MIAPI	LFETLSNDYAGKVI																												
Hevea	AKSRVVKVDSVESWDFYVTQANNQGCPI	VV	HF	FTAS	WC	IP	SVAMNPF	FEELASAYP-DVLF																											
Phalaris	KGGNVHVITTKEDWDQKIAEANKDGGKI	VV	AN	FSAS	WCGPCR	VIAPI	VYAEMSKTYP-QLMF																												
Secale	KGGNVHVITTKEDWDQKIEEANKDGGKI	VV	AN	FSAS	WCGPCR	VVAP	VYAGMSKTYP-QLMF																												
Lolium	KGGNVHVITTKEDWDQKVAEANKDGGKI	VV	AN	FSAS	WCGPCR	VIAPI	VYAEMSKTYP-QLMF																												
Geodia	----VNFLKTKADFDQALKDAG--	DKL	VV	ID	FTAS	WCGPC	QRIAP	KYVEMAKEFP-DVIF																											
Emericella	ASEHVPPITSKAEFQEKVLNAKG---	FV	VD	CFAT	WCGPCK	AIAP	TVEKFAQTYT-DASF																												
Penicillium	---GVTPIKSVAEYKEKVTDATG---	PV	VD	FHAT	WCGPCK	AIAP	ALEKLSEHT-GIQF																												
S.pombe	----VKQVSDSSEFKSIVCQDK---	L	VV	DF	FAT	WCGPCK	AIAP	KFEQFSNTYS-DATF																											
Saccharom.	----VTQLKSASEYDSALASGDK---	L	VV	DF	FAT	WCGPCK	MIAPI	MIEKFAEQYS-DAAF																											
Dictyost.1	-SNRVIHVSSCEELDKHLRDER-----	VV	DF	SAV	WCGPC	RAIS	PF	FEKLSNEFI-TFTF																											
Dictyost.2	--SRVIHISSNEELDKHLQAER-----	L	V	DF	SA	WCGPC	RAIS	PF	FEKLSNEFV-TFTF																										
Dictyost.3	--SKVIHVTSNEELDKYLQHQ-----	VV	DF	SA	E	WCGPC	RAIAP	V	FDKLSNEFT-TFTF																										
Cenorhabdit2	CNFKNQVKYFQSDFEQLIRQHPE--	KI	I	L	D	F	YAT	WCGPCK	AIAP	LYKELATTHKG-IIF																									
Drosophila	----ASVRTMN-DYHKRIEAADD--	KL	I	V	L	D	F	YAT	WCGPCK	EMEST	VKSLARKYSSKAVV																								
Leishmania	---PFTEVYGVEQFRDIANDPT----	L	T	V	V	C	F	S	A	V	WCGPCK	T	IEKDLDR	LYEFA-SVRF																					
Arabid-m	DTATGIPVNDSTWDSLVLKADE---	P	V	F	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	M	I	D	P	I	V	N	E	L	A	Q	Y	A	G	Q	F	K	F						
Brassica-m	DTATGIPVNDSTWESLVLKADE---	P	V	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	M	I	D	P	I	V	N	E	L	A	Q	Y	T	G	K	I	K	F							
Oryza-m	NVVDEVVVADEKNWDSMVLGSEA---	P	V	L	V	E	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	I	A	P	V	I	D	E	L	A	K	E	Y	V	G	K	I	K					
Triticum-m	NVVDEVIVVADEKNWDMVIACES---	P	V	L	V	E	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	I	A	P	V	I	D	E	L	A	K	D	Y	V	G	K	I	K					
Zea-m	NAVDEVVVADEKNWDGLVMACET---	P	V	L	V	E	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	I	A	P	V	I	D	E	L	A	K	D	Y	A	G	K	I	T	C				
Pisum-m	-AVNEVQVNDSSWDELVIIGSET---	P	V	L	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	I	A	P	I	D	E	L	A	K	E	Y	A	G	K	I	K						
Spinacia-m	EAVKEVQDVNDSGWKEFVLQSSE---	P	S	M	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	K	L	I	A	P	V	I	D	E	L	A	K	E	Y	S	G	K	I	A	V				
Cyanidium	---PSPIQVTDFSEFEKEVVNSEK---	L	V	L	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	I	S	P	V	I	D	E	L	A	Q	E	Y	V	E	Q	V	K	I				
Porphyra	----SVSQVTDASFQEVINNDL---	P	V	L	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	V	S	P	V	V	D	A	I	A	E	E	Y	E	S	S	I	K	V				
Griffithsia	---LSISQVIDTSFHEEVINSRQ---	P	V	L	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	R	M	I	A	S	T	I	D	E	I	A	H	D	Y	K	D	K	L	K	V				
Chlamydom-m	VVRAEAGAVNDDTFKNVLESSV---	P	V	L	V	D	F	W	A	P	WCGPCK	R	I	I	A	P	V	V	D	E	I	A	G	E	Y	K	D	K	L	K	C				
E.coli	--SDKI IHLTDDSFDTDVLKADG---	A	I	L	V	D	F	W	A	E	W	C	G	P	C	K	M	I	A	P	I	L	D	E	I	A	D	E	Y	Q	G	K	L	T	V
Mus-MIT	VCLTTFNVQDGPDFQDRVVNSET---	P	V	V	V	D	F	H	A	Q	W	C	G	P	C	K	I	L	G	P	R	L	E	K	M	V	A	K	Q	H	G	K	V	V	M
Rattus-MIT	VCSTTFNVQDGPDFQDRVVNSET---	P	V	V	V	D	F	H	A	Q	W	C	G	P	C	K	I	L	G	P	R	L	E	K	M	V	A	K	Q	H	G	K	V	V	M
Homo-MIT	ISLTTFNIQDGPDFQDRVVNSET---	P	V	V	V	D	F	H	A	Q	W	C	G	P	C	K	I	L	G	P	R	L	E	K	M	V	A	K	Q	H	G	K	V	V	M
Bos-MIT	VCSTTFNIQDGPDFQDRVVNSET---	P	V	V	V	D	F	H	A	Q	W	C	G	P	C	K	I	L	G	P	R	L	E	K	V	V	A	K	Q	H	G	K	V	V	M
Cenorhabdit1	----VFDIDSVEDFTEKVIQSSV---	P	V	I	V	D	F	H	A	E	W	C	G	P	C	Q	A	L	G	P	R	L	E	E	K	V	N	G	R	Q	G	S	V	L	L

	60	70	80	90	100
	$\beta 3$	$\alpha 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\alpha 4$
Homo	LEVDVD	-DCQDVASECEVKCMPTF	QFFKKGQKV-GEFSGAN-KEKLEATINELV-----		
Ovis	LEVDVD	-DCQDVAAECEVKCMPTF	QFFKKGQKV-SEFSGAN-KEKLEATINELI-----		
Mus	LEVDVD	-DCQDVAADCEVKCMPTF	QFYKKGQKV-GEFSGANNKEKALTSITEYS-----		
Gallus	IEIDVD	-DAQDVATHCDVKCMPTF	QFYKNGKKV-QEFSGAN-KEKLEETIKSLV-----		
Arabid-f	LKLDCNPNRPLPKELGIRVV	PTFKILKDNKVV-KEVTGAK-YDDLVAAIETARSAASG-			
Brassica-f	LKLDCNPNRPLAKELGIRVV	PTFKILKDNQVV-KEVTGAK-YDDLVAAIETARSASSSG			
Pisum-f	LKLDCNQDNKSLAKELGIKVV	PTFKILKDNKIV-KEVTGAK-FDDLVAIIDTVRSS----			
Mesembry.-f	LKLDCNQENKPLAKELGIRVV	PTFKILKGGKIV-DEVTGAK-FDKLVAAIEAARSS----			
Spinacia-f	LKLDCNQENKTLAKELGIRVV	PTFKILKENSVV-GEVTGAK-YDKLLEAIIQAARSS----			
Arabid-h1	LKVDTD	-ELKSVASDWAIQAMPTFMFLKE	GKIL-DKVVGAK-KDELQSTIAKHLA-----		
Nicotiana-h1	LKVDVD	-ELKTVSAEWSVEAMPTFVFIKD	GKEV-DRVVGAK-KEELQQTIVKHAAPATVT		
Oryza-h	LKVDVD	-ELKEVAEKYNVEAMPTFLFIKD	GAEA-DKVVGAR-KDDLQNTIVKHVGATAAS		
Triticum-h	LKVDVD	-ELKPIAEQFSVEAMPTFLFMKE	GDVK-DRVVGAI-KEELTTKVGLHAAA----		
Brassica-h	FKVDVD	-ELATVAQEFDVQAMPTFVYMKGEEKL	-DKVVGAA-KEEIEAKLLKHSQVAAA-		
Picea-h	LKVDVD	-ELRDVAQEWVDEAMPTFIFIKD	GKAV-DKVVGAK-KDDLKVAALAAAATTT		
Chlamydom-h	LKVDVD	-AVAAVAEAAGITAMPTFHVYKD	GVKA-DDLVGAS-QDKLKALVAKHAAA----		
Hevea	LAVDVD	-EVKEVASKLEVKAMPTFVLMKD	GAQI-DRLVGAN-PEEIRKRIGGFAQSIRVA		
Phalaris	LTIDVD	-DLVDFSSTWDIRATPTFFFLKNG	QQI-DKLVGAN-KPELEKKVQALGDGS---		
Secale	LTIDVD	-DLMDFSSTWDIRATPTFFFLKNG	QQI-DKLVGAN-KPELEKKVQALGDGS---		
Lolium	LTIDVD	-DLMDFSSTWDIRATPTFFFLKNG	QLI-DKLVGAN-RPELEKKVQALGDGS---		
Geodia	YKVDVD	-ENDETAEAEKIQAMPTFKFYKS	GKALSDYVQGAN-EAGLREKIKKNK-----		
Emericella	YQIDVD	-ELSEVAAELGIRAMPTFLLFKD	GQKV-SDVVGAN-PGALEAGIKALLA-----		
Penicillium	YKVDVD	-ELSEVAASNGVSAMPTFHFYK	GGERN-EEVKGAN-PAAIQAGVKAILE-----		
S.pombe	IKVDVD	-QLSEIAAEAGVHAMPSEFFLYK	NGEKI-EEIVGAN-PAKLEASIKANL-----		
Saccharom.	YKLDVD	-EVSDVAQKAEVSSMPTLIFYK	GKKEV-TRVVGAN-PAAIKQAIASNV-----		
Dictyost.1	LHVDID	-KLNPHPIVSKIKSVPTFHFYR	NGSKV-SEFSGAS-ESILRSTLEANK-----		
Dictyost.2	VHVDID	-KLSGHPIVKEIRSVPTFYFYR	NGAKV-SEF-----		
Dictyost.3	VHVDID	-KVNTHPIGKEIRSVPTFYFYV	NGAKV-SEFSGAN-EATLRSTLEANI-----		
Cenorhabdit2	CKVDVD	-EAEDLCSKYDVKMMPTFIFTK	NGDAI-EALEGCV-EDELQKQVLEHVSAQ---		
Drosophila	LKIDVD	-KFEELTERYKVRSMPTFVFLR	QNRRL-ASFAGAD-EHKLTNMMAKLVKA----		
Leishmania	AKVDAD	-NNTDIVSKCRMQLPTEMLVR	AGQML-GYVIGAD-LAQLKAKIREEANKS---		
Arabid-m	YKLNTD	-ESPATPGQYGVRISPTIMI	FVNGEKK-DTIIIGAVSKDTLATSINKFL-----		
Brassica-m	FKLNTD	-DSPATPGKYGVRISPTIMI	FVKGEKK-DTIIIGAVPKTTLATSIDKFLQ-----		
Oryza-m	CKVNTD	-DSPNIATNYGIRSIPVLM	FKNGEKK-ESVIGAVPKTTLATIIDKYVSS----		
Triticum-m	CKVNTD	-DCPNIASTYGIRSIPVLM	FKDGEKK-ESVIGAVPKTTLCTIIDKYIGS----		
Zea-m	CKVNTD	-DSPNVASTYGIRSIPVLI	FKGGEKK-ESVIGAVPKSTLTTLIDKYIGSS---		
Pisum-m	YKLNTD	-ESPNTATKYGIRSIPVLF	FFKNGERK-DSVIGAVPKATLSEKVEKYI-----		
Spinacia-m	TKLNTD	-EAPGIATQYNIRSIPVLF	FFKNGERK-ESIIGDVSKYQL-----		
Cyanidium	VKINTD	-ENPSISAEYGIRSIPTL	MFKDGKRV-DTVIGAVPKSTLTNALKKY-----		
Porphyra	VKINTD	-DNPTIAAEYGIRSIPTL	MIFKSGERV-DTVIGAVPKSTLESTLNKYIS-----		
Griffithsia	VKVNTD	-QNPTIATEYGIRSIPVMI	FINGKKV-DTVVAVPKLTLNLTLOKHLKST---		
Chlamydom-m	VKLNTD	-ESPNVASEYGIRSIPIM	VFKGGKCC-ETIIIGAVPKATIVQTVEKYLN-----		
E.coli	AKLNID	-QNPGTAPKYGIRGIPTL	LLFKNGEVA-ATKVGALSQKQLEFLDANLA-----		
Mus-MIT	AKVDID	-DHTDLAIEYEVSAVPTV	LAIKNGDVV-DKFVGIKDEDQLEAFLKKLIG-----		
Rattus-MIT	AKVDID	-DHTDLAIEYEVSAVPTV	LAIKNGDVV-DKFVGIKDEDQLEAFLKKLIG-----		
Homo-MIT	AKVDID	-DHTDLAIEYEVSAVPTV	LAMKNGDVV-DKFVGIKDEDQLEAFLKKLIG-----		
Bos-MIT	AKVDID	-DHTDLALEYEVSAVPTV	LAMKNGDVV-DKFVGIKDEDQLEAFLKKLIG-----		
Cenorhabdit1	AKINVD	-HAGELAMDYGISAVPTV	VFAFKNGEKI-SGFSGVLDDDEQLDDFIEDVLAA----		

Los aminoácidos conservados ya fueron estudiados por Eklund, Gleason y Holmgren (Eklund *et al.*, 1991) hace casi una década, quienes analizaron, además, el papel que cumple cada uno de ellos en la estructura-función de las tiorredoxinas. En primer lugar, obviamente, se conserva la secuencia del centro activo -WCGPC-. La glicina y la prolina entre las dos cisteínas contribuyen a mantener una conformación característica del centro activo, principal responsable del elevado potencial reductor de la tiorredoxina. El triptófano-30 (numeración de la Trx humana) se encuentra muy expuesto al medio y debe influir también en la conformación del centro activo. Este triptófano se encuentra en interacción mediante un puente de hidrógeno con el aspártico-59, que también está ampliamente conservado.

La secuencia -PTF- al comienzo de la hoja β -4 también está muy conservada. Estos aminoácidos se encuentran en interacción directa con el centro activo y deben contribuir a la estabilidad de la molécula oxidada. El clúster hidrofóbico previo al centro activo, que constituye la hoja β -2, en la cuál se encuentra el aspártico-25 (que interacciona directamente con el centro activo), también está ampliamente conservado. Esta hoja β -2 se une directamente a la hoja β -4, contribuyendo a mantener la estabilidad de la estructura en lámina β que forma el núcleo de la proteína. Por último, el papel de la prolina-39 y de las dos glicinas, 82 y 90, es estructural. La prolina-39 provoca un doblamiento en la larga hélice α -2, contribuyendo a mantener la conformación del centro activo, que se encuentra al comienzo de esta hélice. Las dos glicinas se encuentran en sendos giros entre elementos estructurales, donde contribuyen por su pequeño volumen a mantener la estructura cerrada de estos giros. La glicina-82 separa las hojas β -4 y β -5, mientras que la glicina-90 separa la hoja β -5 de la hélice α -5. La figura 4.3 muestra estos elementos estructurales comunes a todas las tiorredoxinas.

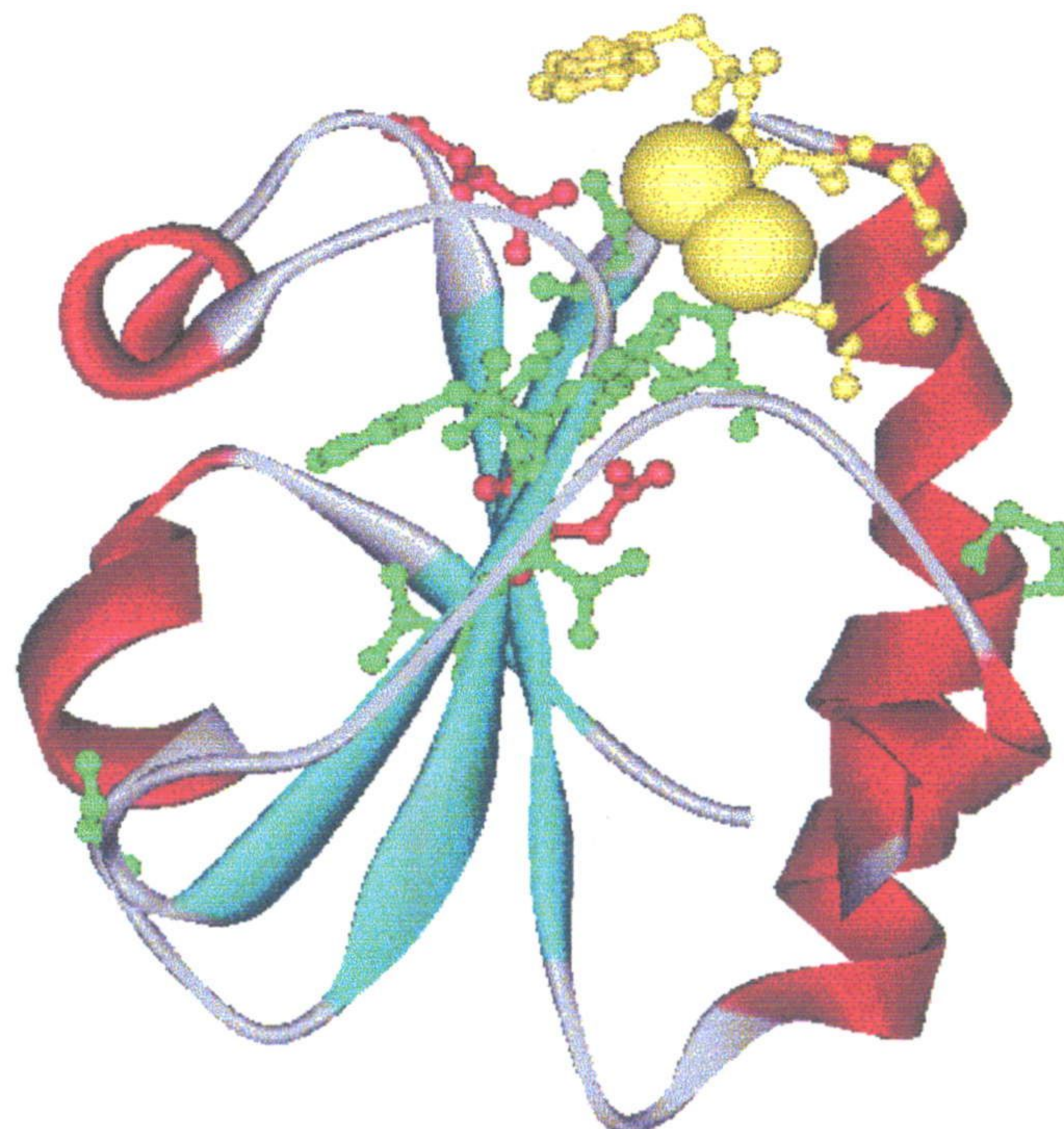


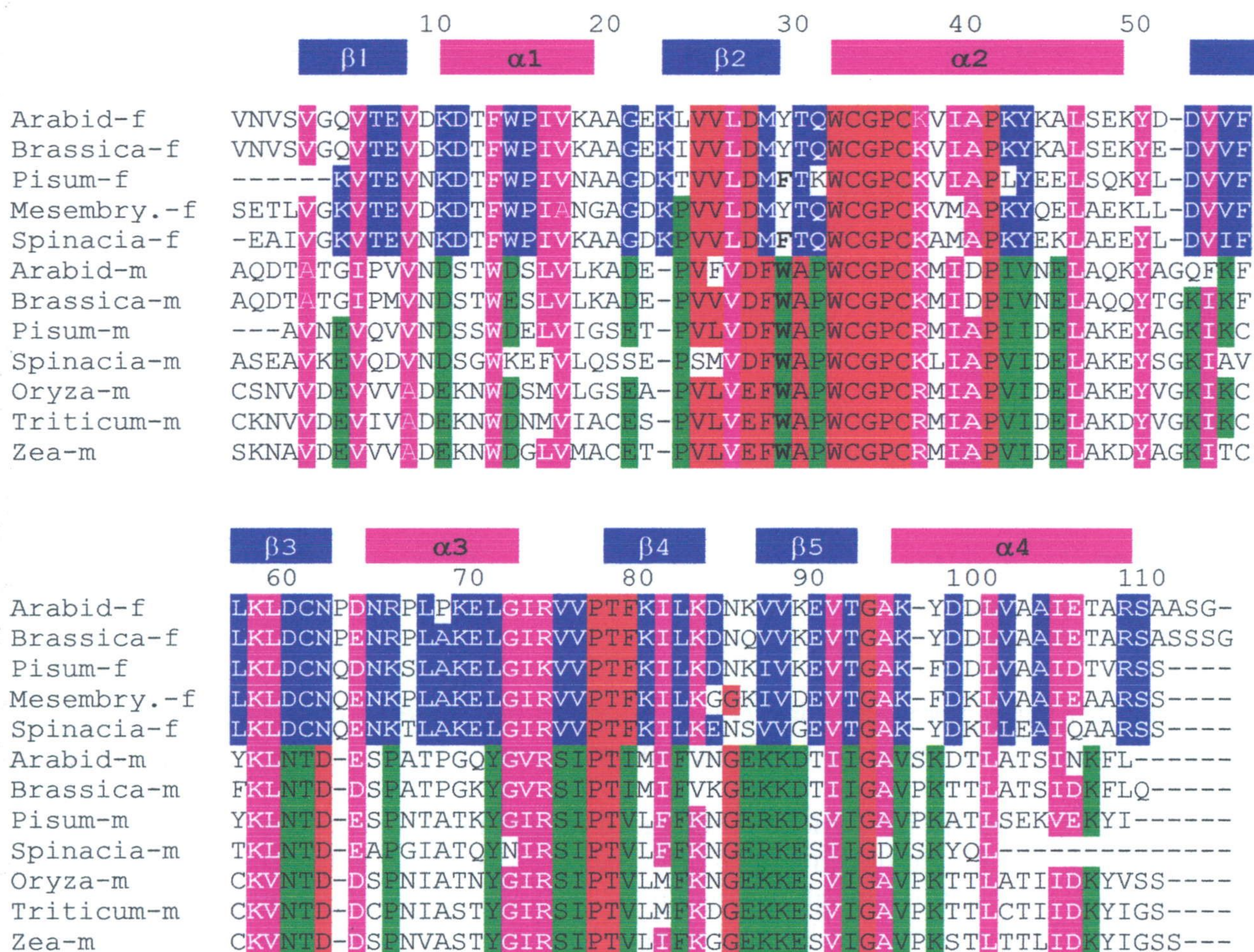
Figura 4.3. Aminoácidos conservados en las tiorredoxinas. La estructura es un modelo para la Trx m de guisante oxidada. En **amarillo** se muestra la secuencia del centro activo -WCGPC-. En **verde** se representan los aminoácidos conservados, excepto los dos aspárticos 25 y 59, que se muestran en **rojo**. Se observa que los aminoácidos conservados son los que interaccionan directamente con el centro activo, excepto la prolina-39 y las dos glicinas, 82 y 90, que poseen un papel estructural.

4.1.5. Aminoácidos conservados en las distintas tiorredoxinas cloroplastídicas

En este trabajo interesa especialmente estudiar la diferencia entre las tiorredoxinas cloroplastídicas m y f. ¿Cuáles son sus señas de identidad?, ¿qué es lo que permite que una tiorredoxina se comporte como f o como m?. Se intentará responder a estas preguntas mediante estudios comparativos de sus secuencias.

Se incluyen a continuación los alineamientos de las tiorredoxinas cloroplastídicas usadas para los estudios evolutivos anteriores, que incluyen todas las secuencias conocidas hasta el momento. Los aminoácidos se han coloreado como sigue: en rojo los conservados en las Trxs de todos los organismos, en rosa los comunes para las secuencias de las Trxs cloroplastídicas, f y las m. Cabe esperar que éstos sean los responsables de las propiedades comunes a ambos tipos de Trxs cloroplastídicas como, por ejemplo, la interacción con la ferredoxin-tiorredoxin-reductasa, que reduce a ambas proteínas. En azul y en verde se representan los conservados únicamente en las Trxs f o en las Trxs m, respectivamente. Estos son los presuntamente responsables de las diferencias de reactividad entre ambos tipos de proteínas, las señas de identidad que determinan si una Trx es f o m.

Se ha usado un criterio "amplio" de conservación de aminoácidos. Así el cambio de un aminoácido con carga positiva por otro con la misma carga no se ha considerado variación; ni los intercambios, muy frecuentes, entre los aminoácidos alifáticos, valina, leucina e isoleucina. La numeración del alineamiento corresponde a la Trx m de guisante, que tendrá mayor importancia a lo largo de este trabajo.



Las cinco Trxs f conocidas corresponden a dicotiledóneas, mientras que las siete Trxs m proceden de dicotiledóneas (cuatro) y de monocotiledóneas (tres). Esto podría explicar por qué las Trxs f parecen más homogéneas, con un mayor número de aminoácidos comunes a todas ellas. No obstante, posiblemente haya algo de verdad en la idea de que las Trxs f están más conservadas que las m ya que, si consideramos únicamente las cuatro Trxs m dicotiledóneas, éstas presentan más variabilidad que las f.

Las posiciones más interesantes donde se encuentran semejanzas o diferencias entre las tiorredoxinas f y m se discuten detalladamente a continuación (numeración de Trx m de guisante):

Posición 10: Es una carga negativa en Trxs m, al igual que en el grupo de Trxs "típicamente bacterianas", mientras que es una carga positiva en las Trxs f y en las de animales superiores. No suele tener carga en los restantes grupos de Trxs.

Posición 11: Es una carga negativa en las Trxs f y en las de hongos, mientras que es una carga positiva (lisina) o una serina en las Trxs m. No suele tener carga en las Trxs h.

Posición 14: Es un triptófano en las Trxs f y una carga negativa en las m. También suele ser triptófano en las Trxs h.

Posición 15: Es una prolina en las Trxs f, lo que provocaría un doblez en la zona central de la hélice α -1. Ningún otro grupo de tiorredoxinas posee una prolina en esta posición, siendo un rasgo típico de las Trxs f.

Posición 21: Es glicina para las Trxs f, como para la mayoría de las Trxs eucariotas y una carga negativa para las Trxs m, al igual que para las bacterianas y las mitocondriales.

Posiciones 22-23: La posición 22 es una lisina en las Trxs f, como en la mayoría de las eucarióticas y las del grupo Clamidiales-Espiroquetales, mientras que las Trxs m tienen un hueco en esta posición, que corresponde al comienzo de la hoja β -2. Como la mayoría de las tiorredoxinas típicamente bacterianas, suplen esta carencia con una prolina en posición 23.

Posición 28: Es una metionina en las Trxs f, siendo un elemento distintivo único de este grupo. Todas las demás tiorredoxinas conocidas suelen tener fenilalanina, como las Trxs m.

Posición 29: Es triptófano en las Trxs m, como en todo el grupo de Trxs "típicamente bacterianas", mientras que es fenilalanina o tirosina en las Trxs f, como en el grupo de las Trxs Clamidiales-Espiroquetales-Eucarióticas.

Posición 30: Es una treonina en las Trxs f, lo que es un elemento distintivo de este grupo. Todas las demás Trxs, incluidas las m, tienen una alanina.

Posición 31: Es una de las posiciones claves para distinguir entre los diferentes tipos de Trxs. Suele ser una glutamina en las Trxs f (excepto en la de guisante, donde es una lisina). Curiosamente, también es una glutamina en las Trxs mitocondriales. Sin embargo, es una prolina en las Trxs m, como en las típicamente bacterianas. Es una serina en las Trxs h de plantas y en la esponja *Geodia*. Por último, es una treonina en las Trxs animales y de

hongos. Es el último aminoácido antes del centro activo y puede influir enormemente en las propiedades de éste.

Posiciones 42-43: Las Trxs f tienen una lisina en la posición 42 y una tirosina en 43. En las Trxs m estas posiciones están ocupadas por aminoácidos alifáticos pequeños, valina e isoleucina, como en las típicamente bacterianas. Curiosamente, las Trxs mitocondriales y las Trxs h también tienen una carga positiva en 42, pero se trata de una arginina.

Posición 53: Es una lisina en las Trxs m, como en todas las típicamente bacterianas y las mitocondriales, mientras que es una carga negativa en las Trxs f. Las demás tiorredoxinas eucarióticas no suelen tener carga en esta posición.

Posición 55: Es una lisina en las Trxs m, como en las típicamente bacterianas, mientras que suele ser un aminoácido alifático pequeño en las Trxs f y eucarióticas, así como en el grupo de las Clamidiales-Espiroquetales.

Posiciones 56-57: Muchas Trxs m poseen cisteínas en una de estas posiciones o en las dos, siendo un rasgo distintivo del grupo de las Trxs m, mientras que en las Trxs f corresponden a una fenilalanina y una leucina. En la mayoría de las otras tiorredoxinas están ocupados por grupos hidrófobos, como en las Trxs f.

Posición 60: Es un ácido aspártico en las Trxs f, como en la mayoría de las Trxs del grupo Clamidiales-Espiroquetales-Eucariotas, mientras que es una asparagina en las m, como en todas las del grupo de tiorredoxinas bacterianas típicas.

Posición 61: Es una cisteína en todas las Trxs f conocidas, donde constituye una característica única del grupo, mientras que es una treonina en las Trxs m y en muchas Trxs bacterianas. Muchas otras Trxs tienen una valina o una isoleucina en esta posición.

Posición 62: Es una asparagina en las Trxs f, lo que constituye otra característica única del grupo, ya que en todas las demás Trxs conocidas se trata de un aspártico. Además, las Trxs f poseen un aminoácido extra en esta posición, al final de la hoja β -3, lo que es otro rasgo típico. Este aminoácido extra es una glutamina o una prolina.

Posición 63: En todas las Trxs m es un aminoácido cargado negativamente, de especial importancia, como veremos en las próximas secciones. También es una carga negativa en las Trxs f, pero el aminoácido extra insertado en la posición anterior hace que tengan orientación espacial muy diferente, como se verá en la próxima sección. Las Trxs de todos los demás grupos son análogas a la Trx m en esta posición.

Posición 64: De nuevo, esta es una posición importante para distinguir entre los distintos grupos de Trxs. Es una asparagina en las Trxs f y también en muchas Trxs típicamente bacterianas, lo que constituye el único caso de parecido entre las Trxs f y las bacterianas. Es una cisteína en los animales superiores y en la Trx m de trigo; en las demás Trxs m es una serina, aunque está menos conservada. Es una leucina o una valina en las Trxs h y en las de Hongos y Dictiostélidos. Por último, es una histidina en las Trxs mitocondriales.

Posición 65: Igual de variable que la anterior. Es una carga positiva en las Trxs f y en muchas Trxs h. Es una prolina en las Trxs m y en muchas típicamente bacterianas. Es una glutamina en los animales y una treonina en las mitocondriales.

Posiciones 67 a 71: Las Trxs f poseen la secuencia muy conservada -LAKEL-, que constituye quizás su señal de identidad más llamativa. En las Trxs m, como en otras Trxs, es bastante variable, estando sólo conservada una tirosina en posición 71 (que también está presente en las Trxs bacterianas), lo que constituye una diferencia con las Trxs f y, quizás, una alanina en 68, común con las Trxs f. En las Trxs mitocondriales esta región también está muy conservada, apareciendo la secuencia -LAIEY-, a medio camino entre las Trxs f y las Trxs m. La posición 70, que es una lisina en la Trx m de guisante, tendrá especial importancia en las secciones siguientes.

Posiciones 72 a 74: Estas posiciones son típicamente comunes a todas las Trxs cloroplásticas, siendo su secuencia -GIR-, relacionada con las Trxs típicamente bacterianas, donde suele ser -GVR-. Resulta curioso que ninguna de las Trxs eucarióticas posean esta secuencia, aunque las Trxs de auto-incompatibilidad de las herbáceas poseen -DIR- y las de los Dictiostélidos -EIR-. Esto podría representar el primer caso claro de evolución convergente a nivel molecular. Por alguna razón las Trxs del cloroplasto, como las de sus antepasados bacterianos, necesitan tener la secuencia -GIR- en esta zona de la molécula. Las Trxs f la habían perdido a lo largo de su camino evolutivo, que pasaba por un estado en el que eran Trxs citosólicas, por lo que debieron adquirirlo otra vez cuando entraron de nuevo al cloroplasto. Esto sería, entonces, un caso de evolución convergente. La arginina-74 constituye una protuberancia muy notoria en la superficie de las tiorredoxinas cloroplásticas, por lo que presumiblemente está relacionada con las interacciones con otras moléculas. Tendrá un especial interés más adelante en este trabajo.

Posiciones 75-76: Estas dos posiciones constituyen casi la "huella dactilar" que permite asignar una Trx a uno u otro grupo, ya que permanecen muy conservadas para cada grupo, pero varían ampliamente de unos a otros. Así tenemos que es -VV- en las Trxs f (únicamente en ellas). Para las Trxs m es -SI-. Para las típicamente bacterianas, es -GI- o -SI-. El grupo de las Clamidias-Espiroquetas-Micoplasmas tiene -SI- o -SL-. Para las Trxs de animales superiores, -CM-. Para las Trxs de otros animales presenta una mayor variación: -AM- para *Geodia*, -MM- para *Cenorhabditis*, -SM- para *Drosophila*. -AM- para todas las Trxs h y para las de hongos. -AT- para las Trxs de auto-incompatibilidad de las herbáceas. -SV- para los Dictiostélidos y -AV- para las Trxs mitocondriales.

Posición 79: Esta posición permite discriminar entre Trxs eucarióticas y procarióticas, ya que es una fenilalanina en todas las eucarióticas, incluidas las Trxs f, y un aminoácido alifático, valina, leucina o isoleucina, en todas las de procariotas, incluidas las Trxs m, las mitocondriales y el grupo de las Clamidiales-Espiroquetales-Micoplasmas. Esta regla sólo presenta tres excepciones entre todas las secuencias estudiadas: la Trx eucariota de *Saccharomyces*, que tiene una leucina, y las bacterianas de *Clorobium*, que tiene una metionina y *Streptomyces aureofaciens*, que presenta una arginina.

Posición 80: Es una lisina en las Trxs f, lo que es un caso único entre todas las Trxs. En el resto varía ampliamente, aunque nunca tiene carga, excepto en la esponja *Geodia*, donde es también una lisina. En la mayoría de los casos, incluidas las Trxs m, es una leucina o una metionina. En los animales superiores es una glutamina.

Posición 82: Esta posición es una fenilalanina altamente conservada en las Trxs m y en el resto de las procarióticas, excepto en las mitocondriales. En las Trxs f y en el resto de las eucarióticas es más variable, aunque suele ser un aminoácido hidrofóbico pequeño (leucina en el caso de todas las Trxs f).

Posición 84: Esta posición es una carga negativa en las Trxs f y en las Trxs h, mientras que suele ser una asparagina u otro aminoácido sin carga en el caso de las procarióticas, incluyendo las Trxs m y las mitocondriales. Es una carga positiva en animales superiores.

Posición 85: Esta posición es una glicina conservada en todas las Trxs conocidas, situada en el giro entre las hojas β -4 y β -5, excepto en las Trxs f, donde es una asparagina, constituyendo una de las señas de identidad de este grupo de tiorredoxinas.

Posiciones 86 a 89: Esta es una zona característica de las Trxs m, que tiene la secuencia -EKKE-, es decir, dos cargas positivas juntas, flanqueadas por otras dos cargas negativas. Las lisinas pueden estar sustituidas por argininas y los glutámicos por aspárticos. Se puede decir que es la seña de identidad de las Trxs m, ya que las distingue incluso de sus homólogas bacterianas más relacionadas, que suelen tener dos aminoácidos hidrófobos en las dos posiciones centrales, 87 y 88. Lo mismo sucede con las Trxs f que, curiosamente, suelen tener dos cargas positivas en los extremos, aunque no tan conservadas, con la secuencia consenso -KVVK-, que es casi opuesta a la que presentan las Trxs m.

Posición 90: Es un ácido glutámico en las Trxs f, en las de animales y en las de Hongos y una carga positiva en las Trxs h, en las mitocondriales y en las del grupo Clamidiales-Espiroquetales-Micoplasmas. Es un aminoácido polar sin carga (treonina o serina) en las Trxs m y en las típicamente bacterianas.

Posición 92: Es una treonina en las Trxs f, una serina en las de animales superiores y un aminoácido hidrófobo pequeño en el resto (isoleucina para todas las Trxs m y valina para todas las Trxs h y mitocondriales).

Posición 95: Es una lisina en todas las Trxs f, en las mitocondriales y en la mayoría de las Trxs h. Es una asparagina en los animales y en las Trxs de auto-incompatibilidad de las herbáceas, mientras que es una valina o un aminoácido equivalente en todas las Trxs m y en las típicamente bacterianas. Es de notar que las Clamidias (pero no las Espiroquetas ni los Micoplasmas) poseen una lisina en esta posición.

Posiciones 96-98: En este caso, las Trxs m y las bacterianas poseen una hélice α -4 con un aminoácido más en su extremo amino (posición 96), que casi siempre es prolina, seguido de una carga positiva (lisina) en posición 97. Por el contrario, las Trxs f, como las del grupo Clamidiales-Espiroquetales, poseen un hueco en la posición 96 y una carga negativa (aspártico) en la 98. Las tiorredoxinas mitocondriales tienen tres cargas negativas (-DED- o -DDE-). Las de animales y las Trxs h poseen también un hueco en 96 y una carga negativa en 98, pero tienen además una carga positiva en 97, que en el caso de las Trxs f está ocupado por un aminoácido aromático.

Posición 106: Esta posición está ocupada por una carga positiva (lisina) en todas las Trxs m y en las mitocondriales, mientras que las Trxs eucarióticas no poseen carga alguna. En

esta zona terminal de la molécula las secuencias son más variables y es difícil (y poco significativo) intentar trazar correspondencias entre las diversas tiorredoxinas.

En un estudio previo semejante a éste, Jacquot *et al.* (1997), partiendo únicamente de dos secuencias para Trxs f y cinco para Trxs m, llegaron a la conclusión de que los rasgos característicos de las Trxs f eran Met-28, Thr-30, Cys-61, Asn-62, Gln-"62 bis", Lys-69, Lys-80 y Asn-86. Mi estudio coincide con ellos en los cuatro primeros casos y en las dos lisinas, pero añadiría, según mis resultados, la Lys-10, el Asp-11, la Pro-15 (un rasgo único), el Asp-53 (otro rasgo único), la Asn-64, la secuencia -LAKEL entre la 67 a la 71, la Arg-85 y la Thr-92, mientras que eliminaría la Gln-"62 bis" y la Asn-86, que han demostrado no estar conservadas en todas las Trxs f. Sí sería un rasgo típico de las Trxs f poseer un aminoácido extra después de la posición 62 (el bucle entre la hoja β -3 y la hélice α -3 es un residuo más largo), que puede ser glutamina o prolina.

En cuanto a las Trxs m, Jacquot *et al.* señalaban Val-17, Pro-65, Tyr-71 y Phe-82 como rasgos característicos. No estoy de acuerdo con el primero, puesto que las Trxs f también presentan valina en esta posición, ni con la Phe-82, puesto que el resto de las Trxs bacterianas también posee fenilalanina en esta posición. Sí estoy de acuerdo con la Pro-65 y la Tyr-71, y añadiría, sobre todo, la secuencia -EKKE- o sus análogos en cargas, en las posiciones 86 a 89, que es claramente exclusiva de las Trxs m. Es muy difícil distinguir entre las Trxs m y las típicamente bacterianas, porque están muy relacionadas. Las Trxs f poseen muchos más rasgos únicos distintivos.

4.2. MODELO TEÓRICO PARA LA INTERACCIÓN TIORREDOXINA – FBPasa

Se trata en este apartado de proponer un modelo tridimensional para la interacción entre las Trxs cloroplastídicas y la FBPasa fotosintética. Los modelos basados en comparación de secuencias de aminoácidos pueden aportar algunas pistas sobre qué residuos son los más importantes para la función de la molécula (serán presuntamente los que están más conservados en las secuencias). Sin embargo, para caracterizar la interacción a nivel molecular, es necesario llevar a cabo modelos tridimensionales de las estructuras, ya que, por ejemplo, sólo los aminoácidos situados en la superficie de la proteína pueden estar implicados en interacciones con otras moléculas y, por otra parte, la distribución de cargas y aminoácidos hidrófobos en la superficie de la molécula real, tridimensional, puede ser diferente de la que sugiere su secuencia de aminoácidos a simple vista. Se requiere un modelo espacial para cualquier estudio de interacciones moleculares.

Nos centramos en la interacción entre Trxs y FBPasa de guisante, ya que es la planta modelo que se ha utilizado tradicionalmente en nuestro laboratorio, y disponíamos de los clones para la manipulación y expresión de todas las proteínas necesarias.

El principal problema con el que nos encontramos es que no se conocen experimentalmente las estructuras de las moléculas que nos interesan en este trabajo, a pesar de que las Trxs f y m de espinaca han sido cristalizadas, aunque no publicadas. Sin embargo, sí se han elucidado las estructuras de moléculas estrechamente relacionadas. Es el caso de las tiorredoxinas de *E. coli*, humana y la Trx h de *Chlamydomonas*, cuyas estructuras están disponibles en las bases de datos de coordenadas tridimensionales, así como la FBPasa cloroplastídica de espinaca y citosólica de cerdo, a partir de las cuales se pueden modelar las estructuras de las proteínas que nos interesan. Puesto que las tiorredoxinas, a pesar de las diferencias en sus secuencias, poseen una estructura tridimensional muy característica y conservada, los modelos de las tiorredoxinas f y m de guisante serán suficientemente fiables como para poder emprender investigaciones tan complicadas como las que se requieren en el estudio de interacciones proteína-proteína.

4.2.1. Modelos de las tiorredoxinas m y f de guisante

López-Jaramillo (1995) ya obtuvo modelos teóricos para las tiorredoxinas f y m de guisante. No obstante, en los últimos años ha habido una multiplicación de los datos estructurales sobre distintas tiorredoxinas, por lo que merecía la pena obtener modelos mejorados, basados en datos más recientes, especialmente en el caso de la Trx f. Estos se han obtenido mediante el programa SWISS-MODEL (Peitsch, 1995). Los modelos nuevos están basados en las siguientes coordenadas:

Para la tiorredoxina m de guisante:

Código PDB	Proteína	Fecha
1XOA	Trx oxidada de <i>E. coli</i> (RMN)	(11 – 95)
2TIR	Trx oxidada de <i>E. coli</i> (Rayos X)	(1 – 93)
1THO	Trx oxidada de <i>E. coli</i> (Rayos X)	(1 – 93)
1THX	Trx humana (Rayos X)	(7 – 95)
1TOF	Trx h de <i>Chlamydomonas</i> (RMN)	(5 – 96)

Para la tiorredoxina f de guisante:

Código PDB	Proteína	Fecha
1AIU	Trx humana red. mutante D60N (Rayos X)	(25 – 97)
1TRS	Trx oxidada de <i>E. coli</i> (RMN)	(5 – 95)
1AUC	Trx humana (Rayos X)	(8 – 97)
1ERV	Trx humana red. mutante C73S (Rayos X)	(2 – 96)
3TRX	Trx h de <i>E. coli</i> (RMN)	(12 – 90)

Los modelos nuevos suponen una mejora respecto de los de López-Jaramillo de 1995, ya que están basados en estructuras más recientes, de proteínas con las cuáles las dos tiorredoxinas m y f poseen una mayor identidad de secuencias. En concreto, el modelo de la tiorredoxina f permite apreciar cómo la tercera cisteína está claramente localizada en la cara del centro activo y expuesta al medio, hecho que no quedaba del todo aclarado en los modelos de 1995. Los modelos obtenidos pueden observarse en la figura 4.4.

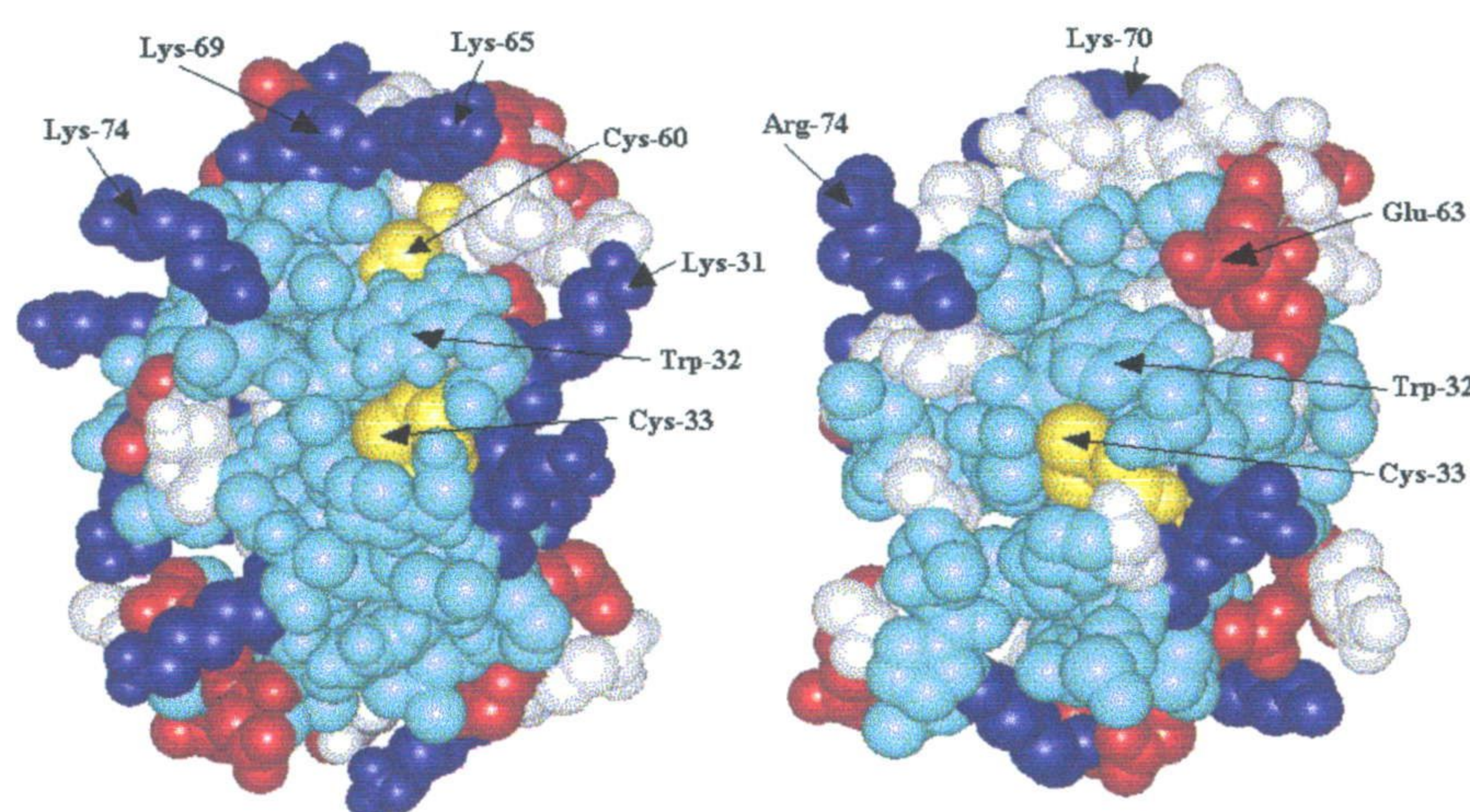


Fig. 4.4. Nuevos modelos tridimensionales de la tiorredoxina f (izquierda) y m (derecha) de guisante

Puesto que no ha habido nuevos datos para estructuras de FBPasas, como modelo para la FBPasa cloroplastídica de guisante se utilizó el obtenido por López-Jaramillo (1995) basado en la proteína homóloga de espinaca. Este modelo tiene la desventaja de que el “bucle-170”, que es la zona de interacción con la Trx, no estaba muy bien resuelto en la estructura de espinaca, por lo que cabe esperar que el modelo de la de guisante no sea muy fiable en esta zona de la molécula, que es la que más nos interesa. En cualquier caso, se trata de una zona muy flexible y expuesta al medio, por lo que presumiblemente se adaptará y cambiará su estructura durante la interacción con la Trx, cambiando los ángulos de sus enlaces, de forma que se minimice la energía. Todo esto se ha tenido en cuenta a la hora de desarrollar el modelo de interacción. En lugar de imaginar una FBPasa rígida, se han probado diferentes conformaciones espaciales, tomando la que mejor se adapta a la superficie de la tiorredoxina.

4.2.2. Predicciones de *docking* mediante el programa GRAMM

Con objeto de realizar una primera aproximación predictiva al problema de la interacción entre la FBPasa y las tiorredoxinas, se han realizado estudios de predicción del *docking* entre ambas moléculas empleando el programa GRAMM.

Se han llevado a cabo dos tipos de estudios, estudios de *docking* geométrico (Katchalski-Katzir *et al.*, 1992) y estudios de *docking* hidrofóbico (Vakser y Aflalo, 1994).

En ambos tipos de estudios, se utilizaron los modelos para las moléculas completas de Trx de guisante, ya sea f o m, junto con el modelo para la secuencia del “bucle-170” de la FBPasa de guisante, desde la Pro-149 hasta la Gly-167. Los estudios experimentales demuestran que esta secuencia interacciona fuertemente con la FBPasa (Hermoso *et al.*, 1996), de modo que cabía esperar que GRAMM predijera la zona de la Trx implicada en esta interacción.

Los resultados para el *docking* geométrico entre la FBPasa y la Trx f se muestran en la figura 4.5. En la parte superior, se muestran las 10 mejores predicciones (de menor energía), y en la parte inferior las 25 mejores (las predicciones de la 11 a la 25 se muestran en color blanco). En ambos casos, a la izquierda se muestra la cara del centro activo, donde se localiza el surco hidrofóbico y, a la derecha, la cara opuesta al mismo.

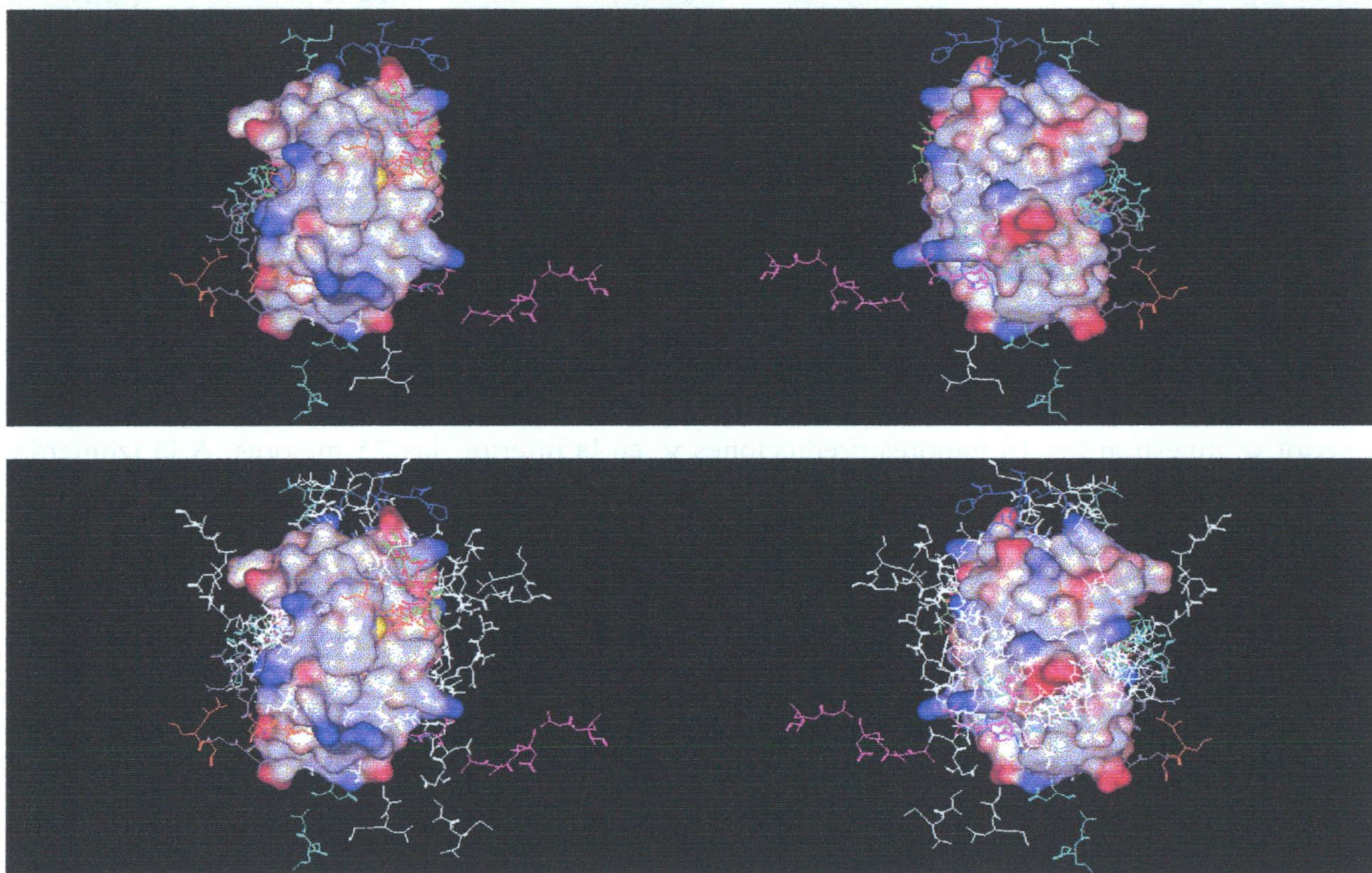


Fig. 4.5. Predicciones de GRAMM para el *docking* geométrico de Trx f y FBPasa. En la parte superior se muestran las 10 mejores predicciones y, en la inferior, las 25 mejores. A la izquierda, visión desde la cara del centro activo; a la derecha, desde la cara opuesta. La Trx se muestra como superficie, con los colores denotando el potencial eléctrico (azul para las cargas positivas, rojo para las negativas). La cisteína-33 del centro activo se muestra en amarillo. Para el “bucle-170” de la FBPasa se ha utilizado una representación de líneas, cada una de ellas correspondiente a un enlace químico. Las 10 mejores predicciones se han coloreado y las 15 siguientes aparecen en blanco.

Respecto al *docking* geométrico FBPasa - Trx m, los resultados de GRAMM se muestran en la figura 4.6. Igual que en el caso de la Trx f, se muestran en la parte superior las 10 mejores predicciones y, en la inferior, las 25 primeras, visualizándose la cara del centro activo a la izquierda y la cara opuesta a la derecha.

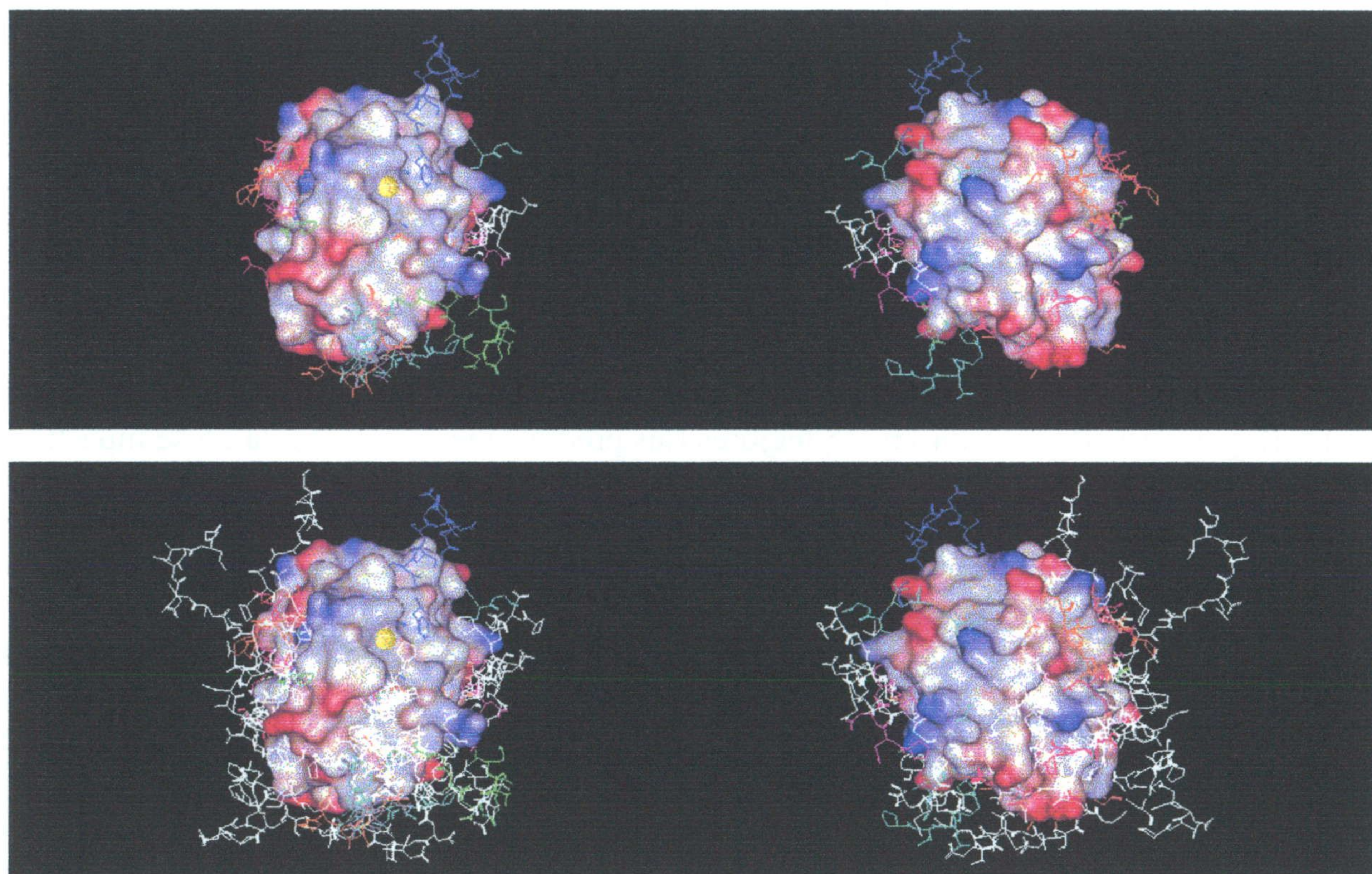


Fig. 4.6. Predicciones de GRAMM para el *docking* geométrico de Trx m y FBPasa. En la parte superior se muestran las 10 mejores predicciones y, en la inferior, las 25 mejores. A la izquierda, visión desde la cara del centro activo; a la derecha, desde la cara opuesta. Las convenciones empleadas para las representaciones son las mismas que para la figura 4.5.

Así mismo, se han realizado predicciones de *docking* hidrofóbico. Dado que la presunta zona de interacción de las tiorredoxinas con sus proteínas diana es un surco hidrofóbico, rodeado de aminoácidos cargados, sería de esperar que las predicciones del algoritmo para *docking* hidrofóbico se correspondieran algo más con las reales que las obtenidas mediante el método de *docking* geométrico. Los resultados para la interacción Trx f -FBPasa se muestran en la figura 4.7 y para la interacción Trx m - FBPasa en la figura 4.8.

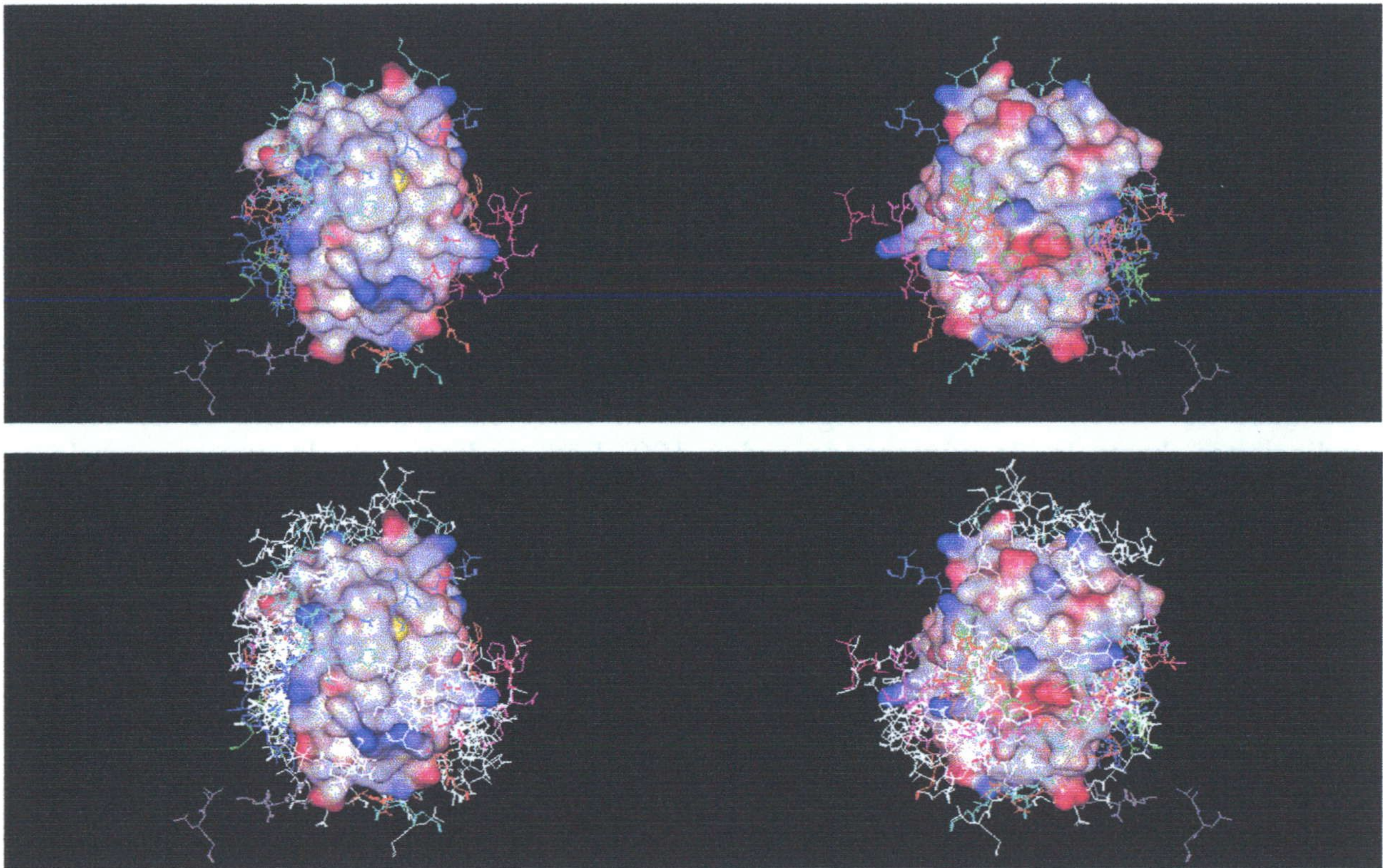


Fig. 4.7. Predicciones de GRAMM para el *docking* hidrofóbico de Trx f y FBPasa. Las convenciones empleadas son las mismas que para las figuras anteriores.

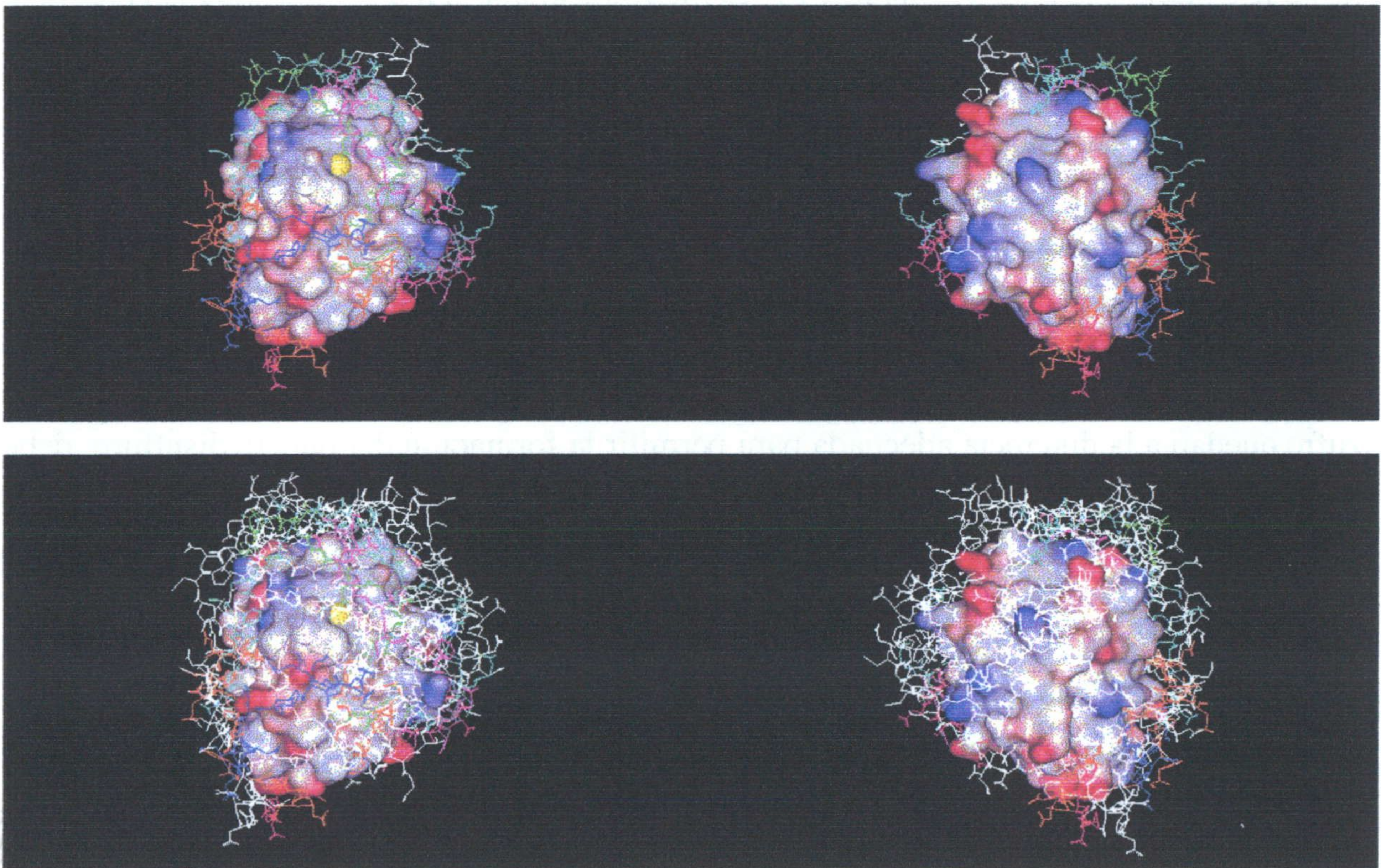


Fig. 4.8. Predicciones de GRAMM para el *docking* hidrofóbico de Trx m y FBPasa. Las convenciones empleadas son las mismas que para las figuras anteriores.

Los resultados de las predicciones mediante GRAMM son algo confusos. En primer lugar, se observa que las posiciones del “bucle-170” están distribuidas a lo largo de toda la superficie de la Trx, sin que exista una zona de unión privilegiada. Esto indicaría que las predicciones son, en general, bastante poco fiables.

Para la interacción FBPasa - Trx f, ninguna de las posiciones predichas por GRAMM para el “bucle-170” se ajusta al surco hidrófobo localizado en la cara del centro activo de la Trx, excepto alguna de las últimas predicciones en el caso del método de *docking* hidrofóbico. Antes bien, la mayor parte de las posiciones se localizan en la cara opuesta de la Trx f (que es mayoritariamente hidrofílica) y en las caras laterales entre ambas. Estos resultados no sufren variaciones significativas al tener en cuenta un mayor número de predicciones, hasta la de número de orden 100. Las predicciones de mayor energía se acumulan en la cara opuesta y en los laterales, dejando el surco hidrófobo prácticamente vacío.

Para el caso de la interacción FBPasa - Trx m los resultados son algo más esperanzadores, puesto que bastantes de las predicciones encajan a lo largo del surco hidrófobo, si bien en posiciones algo desplazadas de lo que cabría esperar. Como es de suponer, esto es más evidente en el caso del método de *docking* hidrofóbico, puesto que este algoritmo confiere predominancia a las zonas de la molécula ricas en aminoácidos hidrófobos. Con el método del *docking* geométrico, ninguna de las 10 primeras predicciones se ajusta al surco, pero varias de las comprendidas entre la 11 y la 25 lo hacen. Este resultado podría indicar cierta predominancia de las fuerzas hidrofóbicas en la unión de la FBPasa al surco de la Trx m, idea que coincide con los resultados obtenidos más adelante en este trabajo. Sin embargo, al igual que en el caso de la Trx f, las posiciones predichas para el “bucle-170” se distribuyen ampliamente por toda la superficie de la Trx m, sin que exista una zona de la misma que esté más claramente implicada en la interacción.

Lo que es más, tanto para la Trx f como para la Trx m, muchas de las predicciones (posiblemente la mayoría) se sitúan en la cara opuesta al centro activo, donde se sabe que es imposible que la interacción ocurra, debido a que resultados experimentales demuestran que debe existir un puente disulfuro entre la Cys-33 de la Trx y la Cys-153 del “bucle-170” de la FBPasa (Brandes *et al.*, 1993; López-Jaramillo, 1995), enlace que no podría formarse si la interacción ocurriera en la cara opuesta al centro activo.

Ya que en ninguna de las predicciones realizadas por GRAMM los dos átomos de azufre quedan a la distancia adecuada para permitir la formación del puente disulfuro, debe concluirse que las predicciones realizadas por el programa no son suficientemente buenas en este caso. No es de extrañar que no se prediga la formación del puente disulfuro, puesto que el algoritmo de cálculo de *docking* implementado por GRAMM no contempla dicha posibilidad. Los resultados son tan poco fiables debido, además, a que se trata el “bucle-170” como si fuera una estructura rígida, aún cuando cabe esperar que posea una alta flexibilidad para adaptarse a la superficie de la Trx.

Estos resultados permiten concluir que los programas de predicción de interacciones entre proteínas aún dejan bastante que desear, lo que ya era conocido al inicio del presente trabajo. Si se desea proponer un modelo tridimensional realmente operativo para la interacción entre la FBPasa y las Trxs, es necesario recurrir a otras consideraciones teóricas específicas para la interacción entre estas dos proteínas y respaldadas por hechos experimentales, sin confiar en lo que predicen los programas de *docking* generalistas, como GRAMM.

4.2.3. Modelos teóricos de interacción de las Trxs con el “bucle-170” de la FBPasa

Basándonos en los datos estructurales de los complejos de la Trx humana con los péptidos de NFκB y Ref1, así como de la Trx de *E. coli* con la ADN-polimerasa del fago T7, se han realizado modelos teóricos para la interacción de las Trxs cloroplastídicas de guisante con el “bucle-170” de la FBPasa, considerando los supuestos que se enumeran a continuación. Todas estas suposiciones están basadas en observaciones experimentales.

1. Las tiorredoxinas interactúan con otras proteínas preferentemente a través del surco hidrofóbico situado en la cara del centro activo, flanqueado de aminoácidos cargados (Quin *et al.*, 1995 y 1996; Doublie *et al.*, 1998). Se postula que la zona de unión de las Trxs cloroplastídicas a la FBPasa también debe coincidir con este surco hidrofóbico.

2. Las estructuras tridimensionales reales de las tiorredoxinas f y m de guisante se ajustan bien a los modelos obtenidos mediante SWISS-MODEL. Cabe esperar que esto sea cierto, dado el alto grado de conservación de la estructura en todas las Trxs cuyas coordenadas tridimensionales son conocidas.

3. La FBPasa interactúa con las tiorredoxinas f y m a través de los 19 aminoácidos localizados en el bucle-170 (desde Pro-149 hasta Gly-167 para la enzima de guisante), tal como demostraron Hermoso *et al.* (1996). Esta interacción incluye la formación de un enlace disulfuro entre la Cys-33 de la Trx y la Cys-153 de la FBPasa (Brandes *et al.*, 1993; López-Jaramillo, 1995).

4. El “bucle-170” de la FBPasa es una zona altamente flexible que presuntamente cambia su conformación durante la interacción con la Trx. Esto debe ser cierto, ya que la estructura detallada del bucle homólogo en la FBPasa de espinaca no pudo ser resuelta detalladamente, precisamente debido a que cada subunidad de FBPasa en el cristal presentaba una conformación diferente en esta zona (Villeret *et al.*, 1995).

En base a estos supuestos, utilizando el programa de visualización molecular WebLab Viewer, se ha situado un modelo del péptido de 19 aminoácidos del “bucle-170” de la FBPasa de guisante, en interacción con el modelo de la Trx f obtenido según se describe en el apartado 4.2.1, ajustando sus posiciones manualmente. El péptido de la FBPasa encaja perfectamente en el surco de la Trx f, tal como se muestra en la figura 4.9. El modelo se ha realizado con el extremo amino del péptido en la parte superior del dibujo, según la orientación del complejo con Ref1, y en dirección inversa al complejo con NFκB.

Del estudio del modelo, se desprende la siguiente información acerca de los aminoácidos implicados en las interacciones:

Aminoácido de la FBPasa	Aminoácido de la Trx f	Tipo de enlace
Asp-151	Lys-96	Electrostático
Cys-153	Cys-33	Puente disulfuro
Leu-154	Surco hidrofóbico	Hidrofóbico
Pro-155	Surco hidrofóbico	Hidrofóbico
Phe-157	Trp-32	Hidrofóbico
Gly-158	Surco hidrofóbico	Hidrofóbico
Asp-159	Lys-74	Electrostático
Asp-163	Lys-69	Electrostático
Asp-164	Lys-65	Electrostático
Thr-161	Gln-62	Puente de hidrógeno

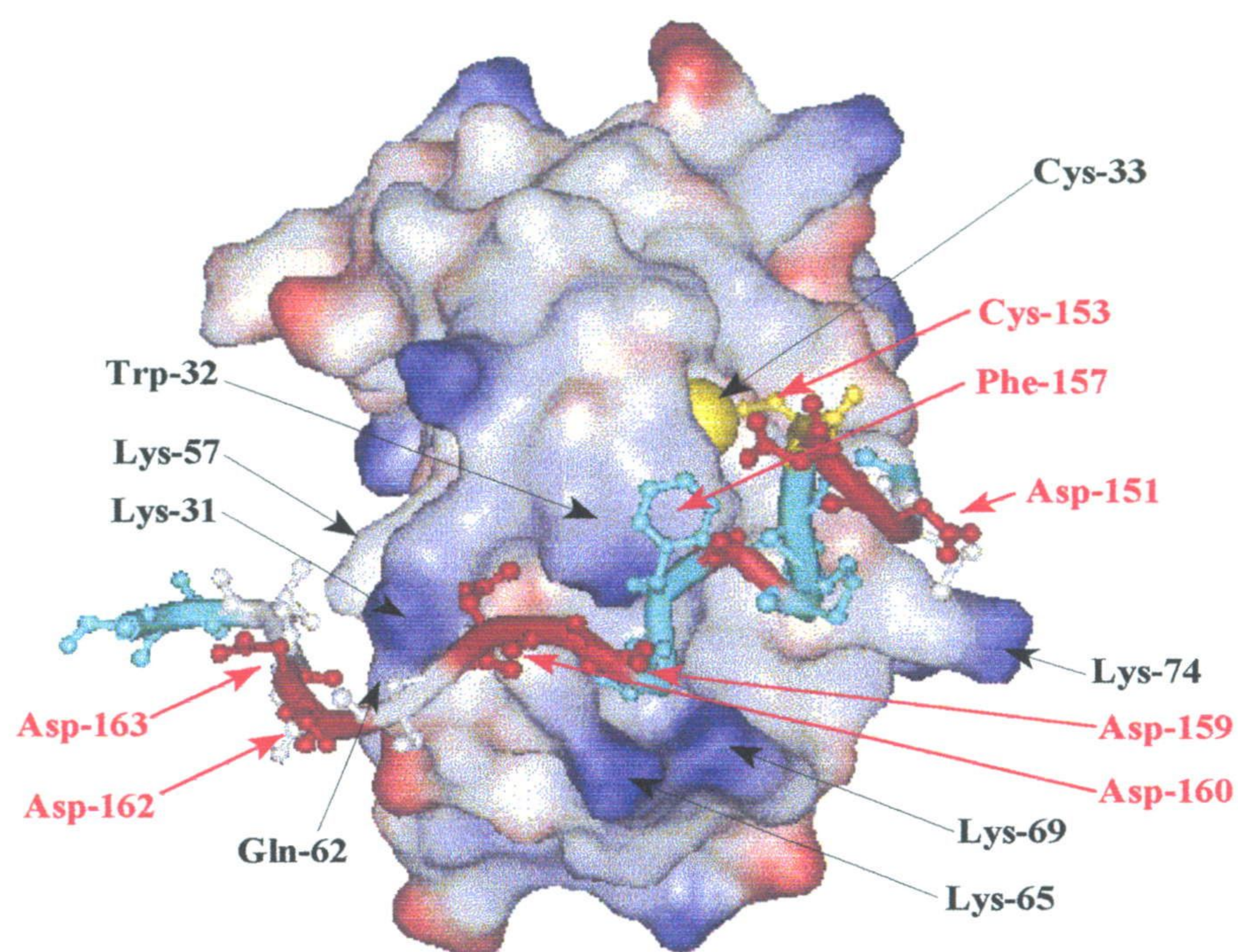


Fig. 4.9. Modelo de interacción de la Trx f de guisante con el péptido de la FBPasa. Para la primera, se muestra la superficie con la distribución de potencial electrostático. Para el péptido se muestran las cadenas laterales con el siguiente código de colores: rojo para los restos ácidos, amarillo para la cisteína-153 y celeste para los hidrófobos.

De los siete restos ácidos del péptido de la FBPasa, cuatro se pueden encontrar interaccionando mediante fuerzas electrostáticas, como sugerían Hermoso *et al.* (1996). Además, existen varias interacciones de tipo hidrófobo con el surco de la Trx. Los puentes de hidrógeno son difíciles de asegurar en este modelo teórico, ya que se trata de enlaces muy direccionales que requerirían datos estructurales reales. Se supone que las conformaciones de las cadenas laterales de los distintos aminoácidos son bastante flexibles en la molécula real, de modo que se pueden orientar hacia direcciones concretas que resultarían difíciles de predecir sin una etapa de optimización teórica de energías, que no ha sido llevada a cabo. Aún así, nos arriesgamos a predecir la formación de algún puente de hidrógeno entre la glutamina-62 de la tiorredoxina f y la treonina-161 de la FBPasa. Ambos son restos con gran tendencia a la formación de enlaces de hidrógeno, que quedan muy juntos en el espacio.

Ya que la Trx m de guisante también es capaz de unirse a la FBPasa cloroplastídica, el modelo debería servir, del mismo modo, para explicar esta unión. La comparación de ambos modelos permitirá estudiar las semejanzas y diferencias que presenta la interacción de la FBPasa con ambas Trxs cloroplastídicas. Se ha realizado la modelización también con la Trx m, con éxito semejante. Los resultados se muestran en la fig. 4.10.

Los enlaces cuya formación se predice por el modelo de interacción FBPasa - Trx m son los siguientes:

El menor número de enlaces posibles podría explicar perfectamente la mayor debilidad de la interacción de la FBPasa con la Trx m respecto de la f. Por otra parte, exceptuando la diferencia en los enlaces electrostáticos, la geometría del bucle de la FBPasa encaja perfectamente en el surco de la Trx m, al igual que lo hacía en el caso de la Trx f.

Las diferencias en cuanto a los enlaces quedan en evidencia en cuanto se comparan las secuencias de ambas tiorredoxinas (fig. 4.11).

Se aprecia que las lisinas 66 y 96 de la Trx f que, según el modelo, forman enlaces electrostáticos con la FBPasa, se encuentran sustituidas en la m, con lo que desaparece la posibilidad de la formación de enlaces. La segunda de ellas podría quizás quedar sustituida por la Lys-105 de la Trx m, que queda relativamente cerca en la conformación tridimensional. De todos modos, la intervención de ésta en la formación del enlace es, cuanto menos, dudosa. Presuntamente estas dos lisinas estarían implicadas en la especificidad FBPasa – Trx f.

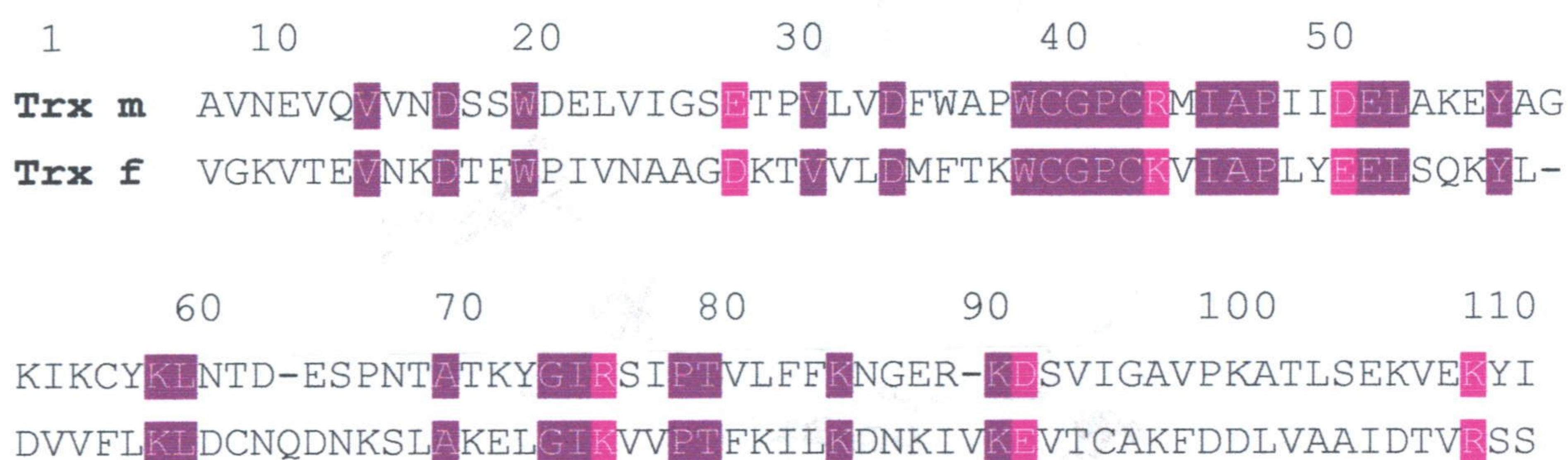


Fig. 4.11. Alineamiento de las secuencias de las Trxs m y f de guisante.

4.2.4. Modelos teóricos de interacción de las Trxs con la FBPasa completa

En base a los modelos obtenidos en el apartado anterior para la interacción del “bucle-170” con las Trxs, se procedió a la realización de modelos teóricos tridimensionales para la unión de las Trxs a la FBPasa completa. Estos se obtuvieron mediante el programa WebLab Viewer, utilizando los modelos para la subunidad de la FBPasa completa y de las Trxs, ajustando sus posiciones de forma manual hasta que coincidieran con las predicciones obtenidas en el epígrafe anterior.

Los resultados se muestran en las figuras 4.12 y 4.13 para la interacción de la FBPasa con Trx f y Trx m, respectivamente.

Se observa que la subunidad de la FBPasa se ajusta perfectamente a ambas Trx, sin necesidad de cambiar siquiera la conformación del “bucle-170” respecto de la obtenida mediante SWISS-MODEL. El bucle se ajusta correctamente en el seno del surco hidrófobo de las Trxs.

El ajuste es mejor en el caso de la Trx f, como cabe esperar a la vista de los modelos del apartado anterior, estando las cargas negativas del “bucle-170” en perfecta interacción con una zona de la Trx f muy rica en cargas positivas y que incluye todas las cargas positivas consideradas en el apartado anterior.

Aminoácido de la FBPasa	Aminoácido de la Trx m	Tipo de enlace
¿Asp-151?	¿Lys-105?	¿Electrostático?
Cys-153	Cys-36	Puente disulfuro
Leu-154	Surco hidrófobo	Hidrófobo
Pro-155	Surco hidrófobo	Hidrófobo
Phe-157	Trp-32	Hidrófobo
Gly-158	Surco hidrófobo	Hidrófobo
Asp-159	Arg-74	Electrostático
Asp-163	Lys-70	Electrostático

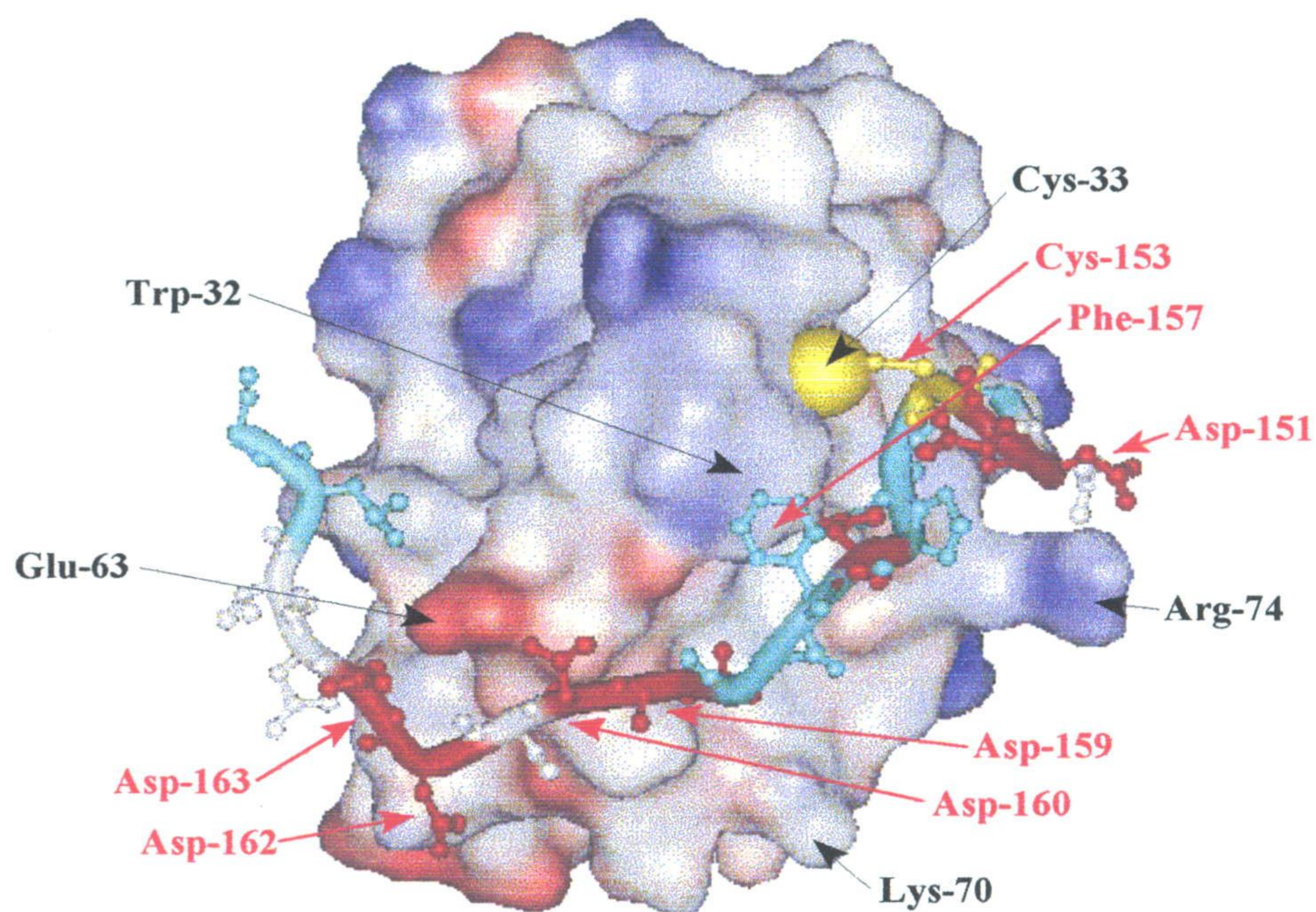


Fig. 4.10. Modelo de interacción entre la Trx m de guisante y el péptido de la FBPasa.

En general, se observa que se forma un menor número de enlaces (sobre todo de tipo electrostático) en el caso de la interacción con la Trx m. De los cuatro enlaces salinos claros que se formaban con la Trx f, uno no existe y otro resulta más que discutible.

Además, la Gln-62 es sustituida por un ácido aspártico, por lo que la formación del presunto puente de hidrógeno resulta algo dudosa. En esta zona, la molécula de Trx m posee una alta concentración de carga negativa, ya que al ácido aspártico-62 se une un ácido glutámico-63. Esta concentración de carga negativa debería repeler, más que atraer, al “bucle-170”, que presenta dos aminoácidos cargados negativamente en posición complementaria.

En cuanto a los enlaces de tipo hidrofóbico, no se presentan diferencias apreciables, ya que ambas tioredoxinas poseen un gran número de restos hidrófobos en el surco, en parecidas posiciones.

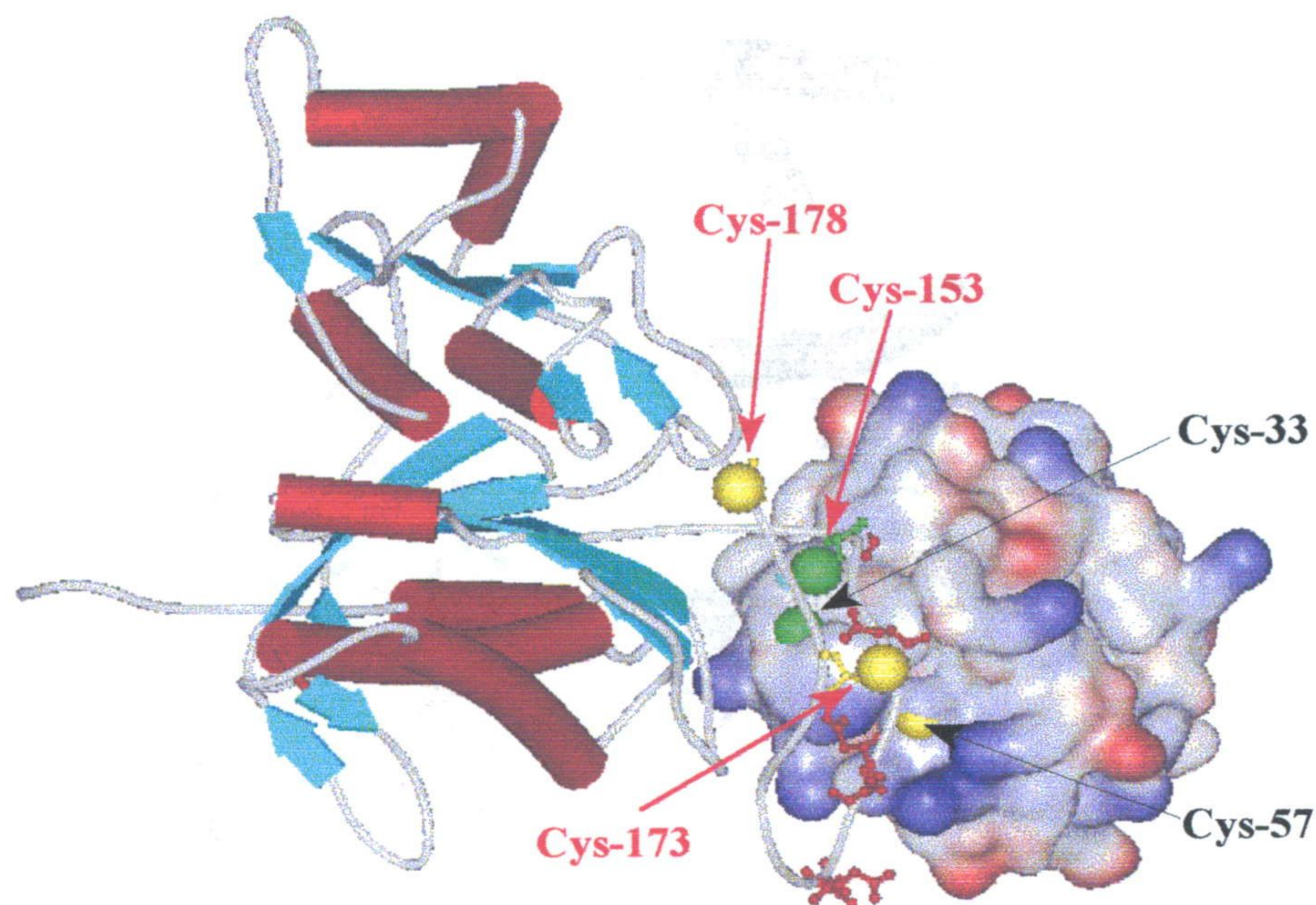


Fig. 4.12. Modelo teórico para la interacción FBPasa - Trx f de guisante. Para la primera se muestra la estructura terciaria de una subunidad, indicando los elementos de la estructura secundaria. Para la Trx f, se muestra su superficie coloreada según el potencial electrostático. Se indica la posición de las cisteínas, con etiquetas rojas para la FBPasa y negras para la Trx. Las dos cisteínas implicadas en el ataque redox inicial se muestran en verde. Los aminoácidos cargados negativamente del "bucle-170" se han representado en rojo. La Cys-36 de la Trx f queda en el interior de la estructura y no puede observarse en la figura.

La Cys-153 de la FBPasa se une mediante un enlace disulfuro mixto a la Cys-33 de la Trx f, teniendo esta zona de la molécula una configuración especialmente adecuada para que se produzca el ataque de la Cys-33 sobre el enlace disulfuro presuntamente formado entre la Cys-153 y la Cys-178 de la FBPasa oxidada.

Un resultado inesperado es la gran proximidad que existe entre la Cys-57, localizada en el seno del surco hidrófobo de la Trx f, y la Cys-173 de la FBPasa, que permitiría la posible formación de un puente disulfuro entre ambas. La Cys-57 está conservada en todas las Trxs f conocidas y la Cys-173 de la FBPasa también se halla conservada en las FBPasas cloroplastídicas, indicando su posible trascendencia para la interacción.

Los resultados de López-Jaramillo (1995) indicaban una posible implicación de la Cys-173 en el juego de oxidación-reducción, ya que el mutante de FBPasa C178S es activable por Trx, al igual que el mutante C173S (no así el mutante C153S, que no es activable, demostrando así que la Cys-153 es el blanco primario para la Cys-33 de la Trx). Los resultados de nuestro modelo indican que es posible la formación de un puente disulfuro mixto entre la Cys-173 y la Cys-57 de la Trx f. Este segundo enlace disulfuro mixto podría sumarse a la fuerte interacción existente entre ambas proteínas y podría tener una participación en el mecanismo de la activación redox, vinculada a un cambio conformacional en la FBPasa. Sería interesante comprobar, en futuros experimentos, el papel de estas dos cisteínas en el juego de oxidación-reducción.

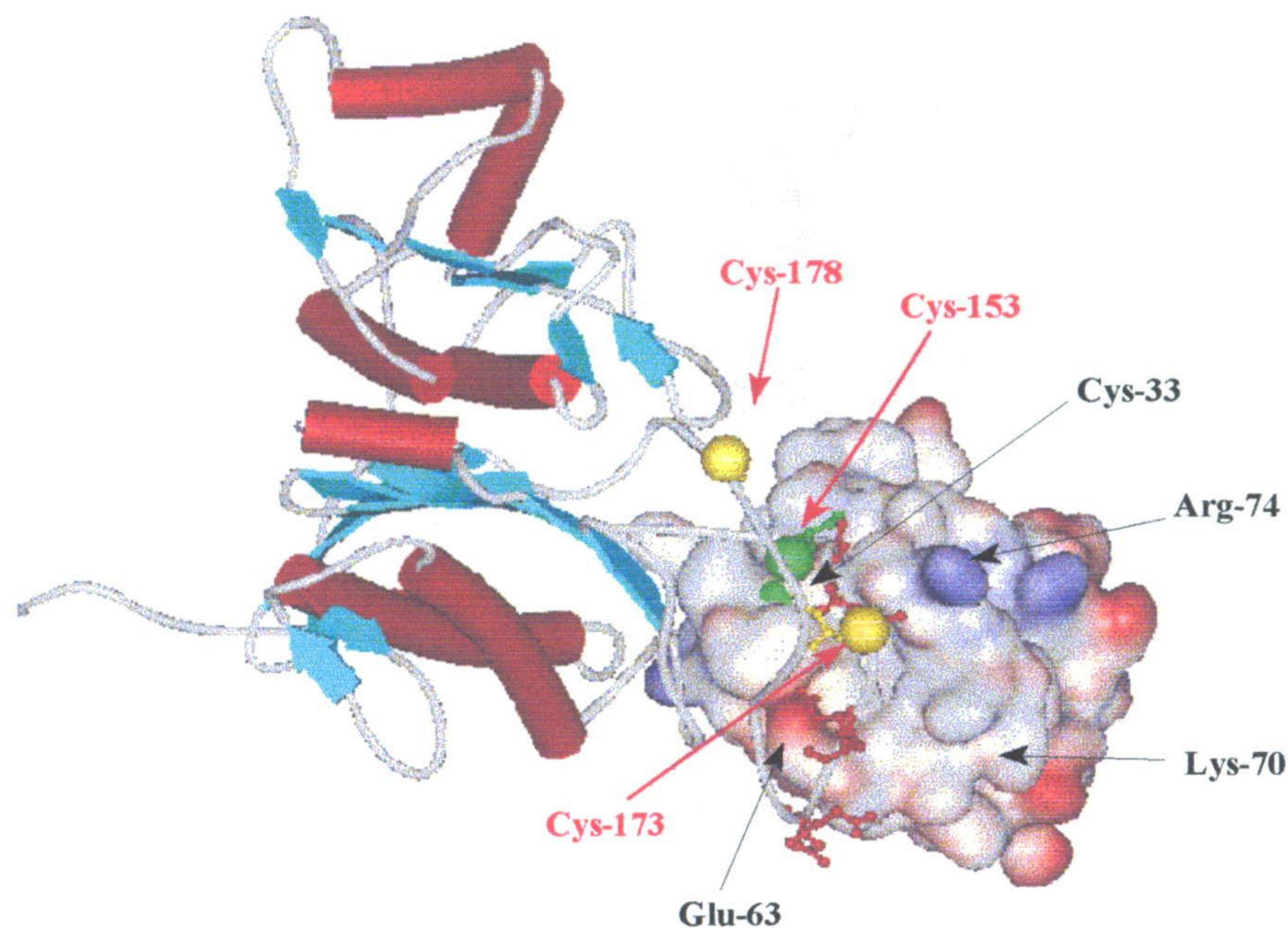


Fig. 4.13. Modelo de interacción de la Trx m con la subunidad de la FBPasa cloroplastídica. Se usan las mismas convenciones que en la fig. 4.12. Se muestra además la localización de los aminoácidos de Trx m objeto de las mutaciones realizadas más adelante en este trabajo.

Respecto al modelo para la interacción FBPasa - Trx m, se observa que, en general, el “bucle-170” se adapta peor a la forma del surco hidrofóbico de esta Trx. La mayoría de las cargas positivas superficiales existentes en la Trx f han desaparecido en el caso de la m. Aparece el Glu-63, provocando una alta densidad de carga negativa en la zona de interacción y la tercera cisteína (Cys-57 de la Trx f) está ausente.

A la vista de los resultados, cabe esperar que la interacción de la FBPasa con la Trx f posea fundamentalmente un carácter electrostático, aunque con una importante contribución hidrofóbica. Por el contrario, la interacción con la Trx m es prácticamente hidrofóbica, existiendo únicamente posibilidades para la formación de dos enlaces electrostáticos. Es interesante hacer notar que, pese a la idea ampliamente aceptada en la actualidad de que la interacción FBPasa - Trx es fundamentalmente electrostática, Plá y López-Gorgé, en fecha tan temprana como 1980, obtuvieron resultados experimentales que apostaban por una interacción de tipo hidrofóbico.

Los modelos teóricos propuestos contemplan ambas posibilidades, dando una explicación estructural tanto para el carácter fundamentalmente electrostático de la interacción FBPasa - Trx f, como para las contribuciones de carácter hidrofóbico que son comunes a ambos casos.

Cabe preguntarse cómo se organizan las tioredoxinas en la estructura cuaternaria del complejo con la FBPasa tetramérica. En base a los modelos de subunidades expuestos anteriormente, se ha modelado la estructura cuaternaria de este complejo, que aparece en la figuras 4.14 y 4.15, para el caso de la interacción FBPasa - Trx f.

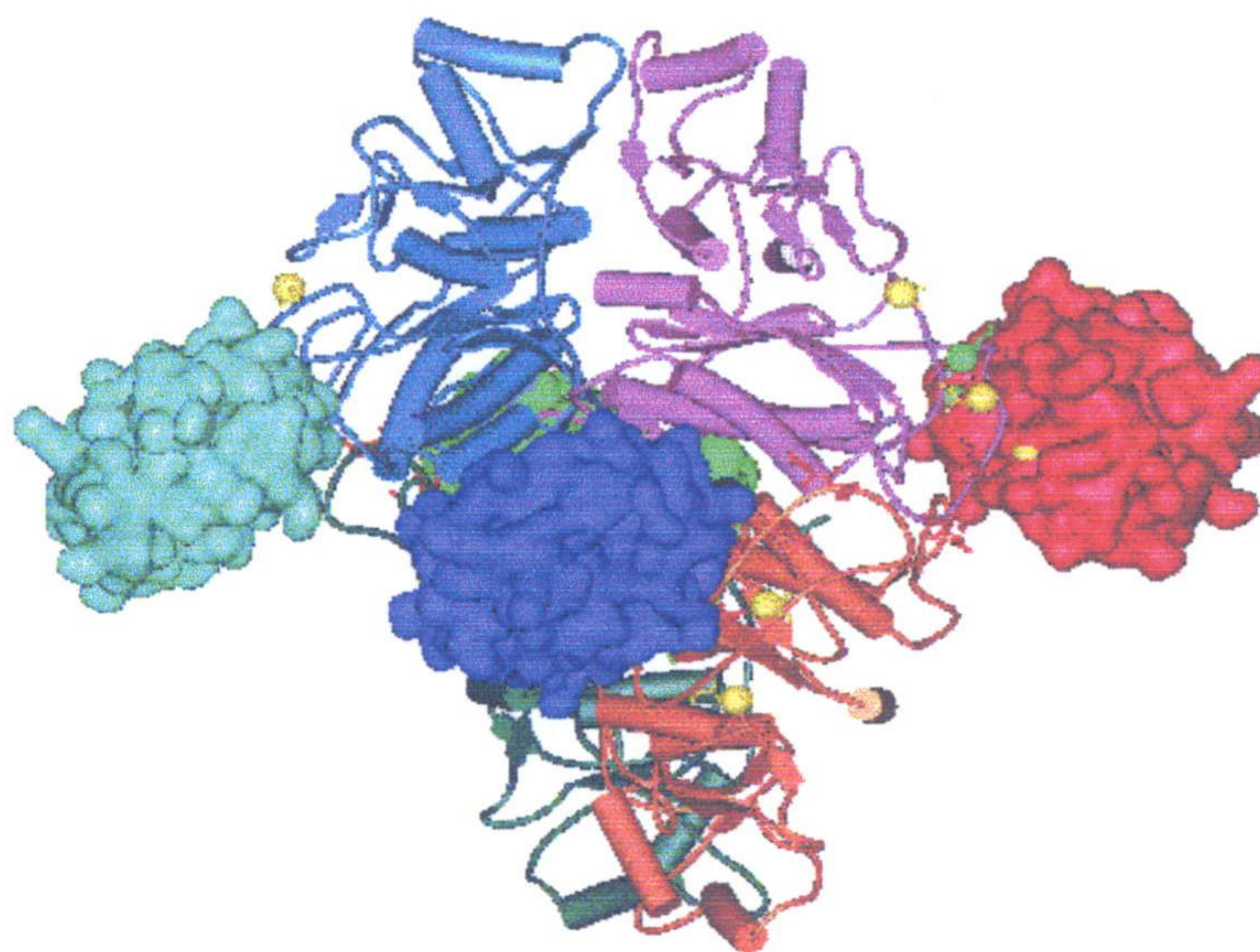


Fig. 4.14. Modelo teórico para la estructura cuaternaria del complejo formado por el tetramero de FBPasa y cuatro moléculas de Trx f, orientado con el eje cristalográfico X perpendicular a la superficie del papel (ver figura 1.7). Se representa cada subunidad del complejo de un color diferente. La FBPasa aparece en la forma alostérica S. No se conoce si esta es la forma real en la que se presenta la FBPasa activada por Trx, por lo que el ángulo formado entre los dos dímeros de FBPasa podría ser diferente en el complejo real.

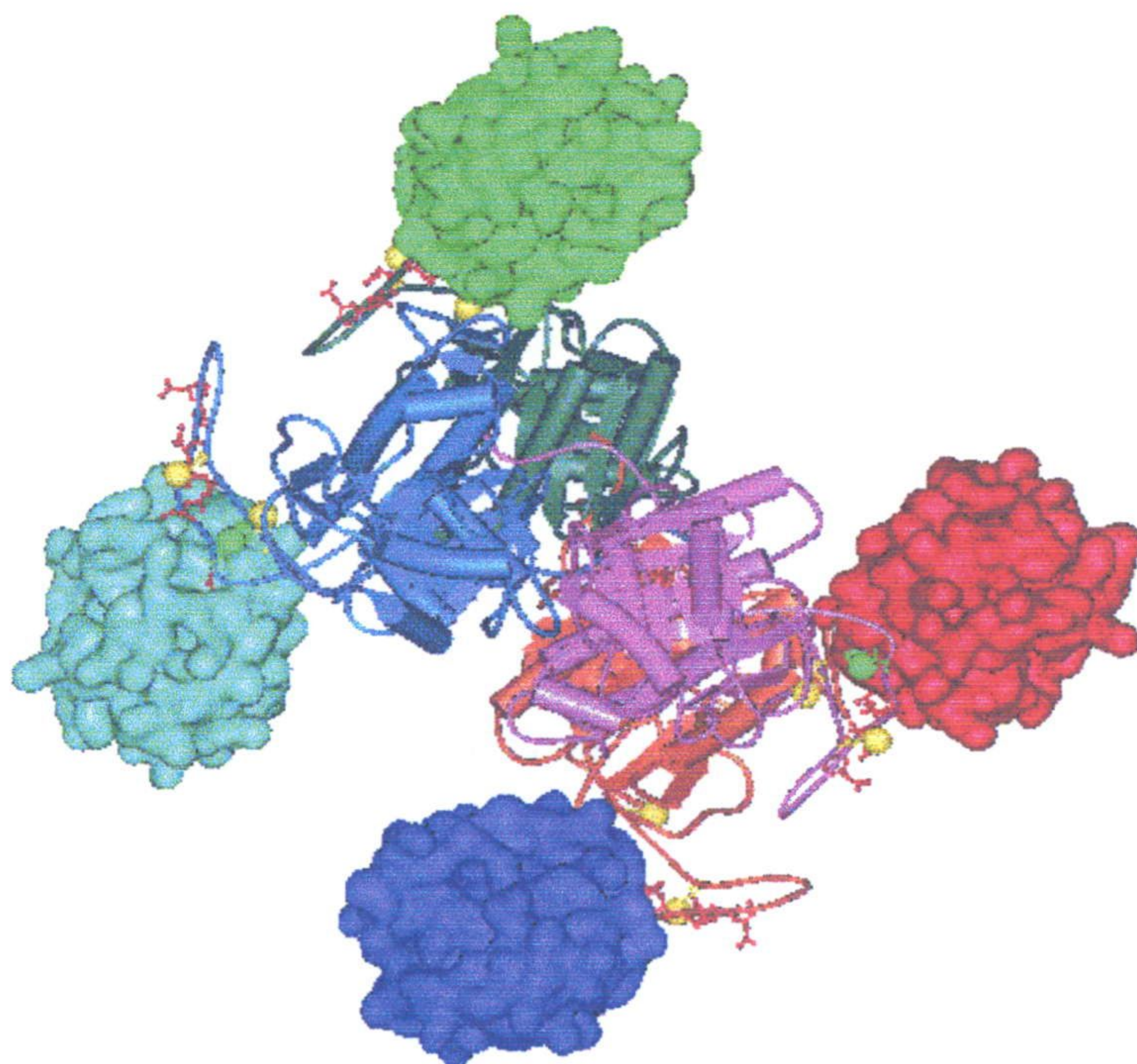


Fig. 4.15. El mismo modelo para el complejo FBPasa - Trx f de la figura anterior, representado con el eje cristalográfico Z perpendicular al papel, para permitir apreciar mejor la simetría de la estructura cuaternaria.

4.2.5. Elección de los aminoácidos a mutar

Con objeto de hallar confirmación experimental para los modelos teóricos propuestos, se decidió realizar estudios de mutagénesis dirigida sobre algunos aminoácidos presuntamente implicados en la interacción.

Dada la disponibilidad en nuestro laboratorio del plásmido conteniendo el gen de la Trx m de guisante (pMI) y la facilidad para la expresión y purificación de ésta, unidas al hecho de que la activación de la FBPasa por la Trx m es aún objeto de controversia, se prefirió realizar los estudios de mutagénesis sobre la Trx m. Se eligieron los aminoácidos Glu-63 y Arg-74 como presuntamente interesantes a la hora de estudiar la interacción con la FBPasa. Las razones para esta elección se detallan a continuación.

La arginina-74 ocupa una posición conservada en todas las tiorredoxinas cloroplastídicas. En la mayoría de las Trxs procariotas, así como en las Trxs m, esta posición está ocupada por una arginina, mientras que en las Trxs de origen eucariota se trata de una lisina. Este aminoácido constituye una notable protuberancia en la estructura, que se localiza en la cara del centro activo. Por lo tanto, es un candidato notable para la interacción con otras proteínas. En nuestro modelo teórico de interacción, este aminoácido está implicado en el enlace electrostático que puede formarse con mayor claridad entre la Trx m y la FBPasa. En base al modelo, cabe esperar que una mutación por un residuo neutro o ácido disminuya la unión a FBPasa; por tanto, se decidió mutarlo por ácido glutámico, para obtener el mutante R74E.

El ácido glutámico-63 ocupa una posición muy interesante. En las Trxs f existe un aminoácido extra, glutamina o prolina, entre las posiciones 62 y 63, que hace que el bucle entre la hoja β -3 y la hélice α -3 sea un poco más largo, provocando que la estructura local de las tiorredoxinas f y m sea muy distinta en esta zona. La glutamina-62 parece formar un enlace de hidrógeno con el bucle de la FBPasa, en el caso de la Trx f. Sin embargo, en la Trx m la posición equivalente en el espacio la ocupa el glutámico-63, que queda notablemente cerca de los ácidos aspárticos 162 y 163 de la FBPasa, por lo que la Trx m presentaría bastante repulsión a la FBPasa en esta zona (figura 4.10). Se sustituirá este residuo por glutamina, que es el aminoácido presente en esta zona en la Trx f, obteniéndose el mutante E63Q. Cabe esperar que esta mutación favorezca la interacción.

Además de estas dos mutaciones, se emplearán en este trabajo otros dos mutantes disponibles en nuestro laboratorio, que fueron realizados por la Dra. Sahrawy para un trabajo anterior (López-Jaramillo *et al.*, 1997). Se trata de dos mutantes de Trx m en la posición correspondiente a la Lys-70, K70E y K70Q. Esta lisina-70, correspondiente a la Lys-69 en la Trx f, forma uno de los dos únicos enlaces electrostáticos putativos, según nuestro modelo, de forma que su mutación por un aminoácido neutro o por uno con carga negativa cabría esperar que disminuyera la unión.

4.3. OBTENCIÓN DEL MUTANTE TRX m E63Q

Para obtener el mutante E63Q (Trx m de guisante, con el glutámico-63 sustituido por glutamina), se llevó a cabo la mutagénesis mediante el procedimiento de doble PCR (sección 3.4.9), sobre el gen de la tiorredoxina m de guisante contenido en el plásmido pMI. Parte de la secuencia de ADN de éste se observa en la figura 4.16.

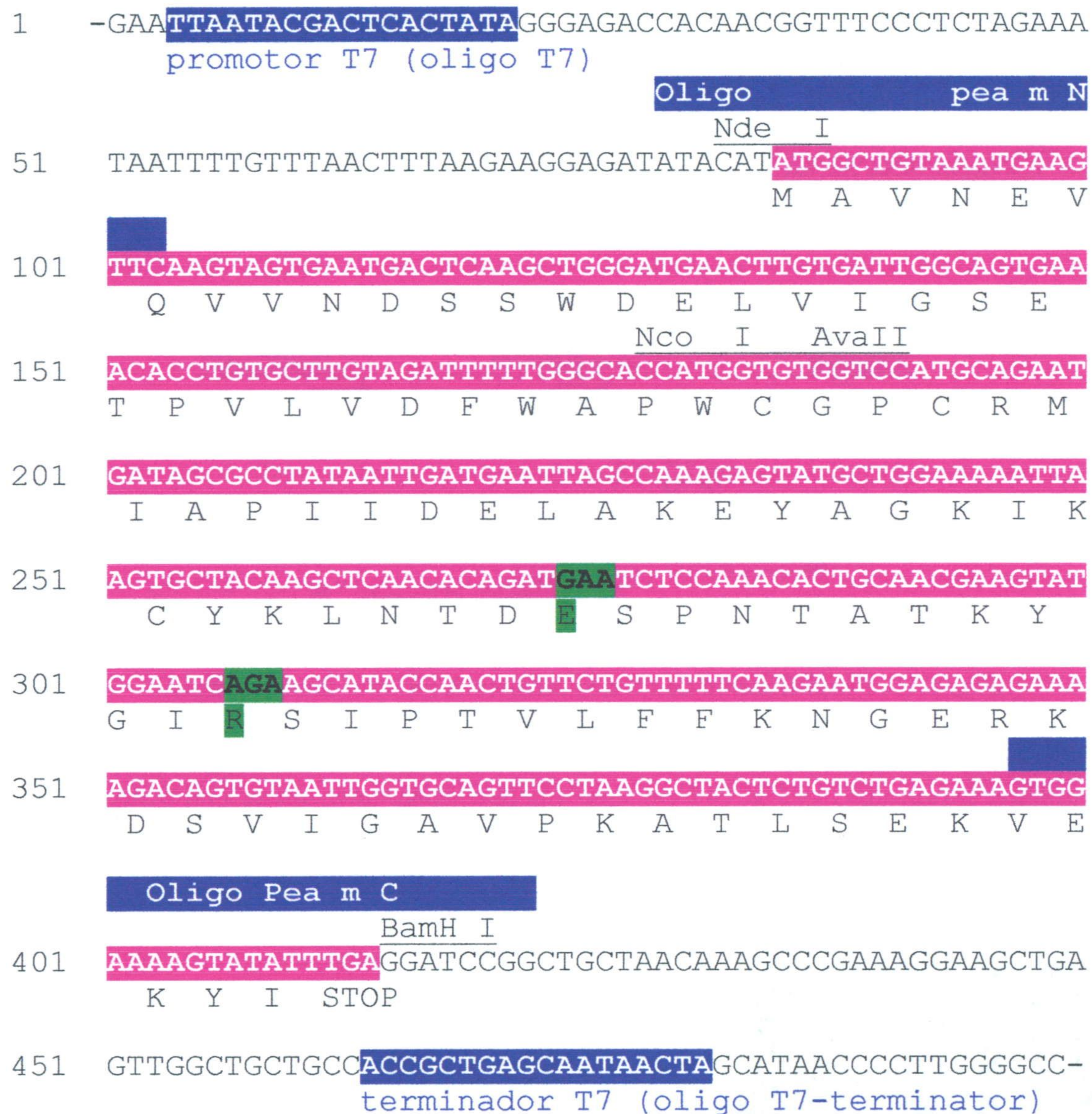


Fig. 4.16. Parte de la secuencia del plásmido pMI que codifica la tiorredoxina m de guisante. Se representa en rosa el gen de la tiorredoxina m y en azul los oligos propios del plásmido pET12a que flanquean el sitio de subclonación (T7 y T7-terminator) y los oligos específicos del inserto de tiorredoxina m (Pea m N y Pea m C). Se indican, igualmente, los sitios de corte de algunas enzimas de restricción. Se resaltan en verde el glutámico-63 y la arginina-74, objeto de las mutaciones en este trabajo.

Para llevar a cabo la mutagénesis se diseñaron los oligos Td E-63 (directo) y Td 63E/Q (inverso), cuyas secuencias se observan en la figura 4.17.

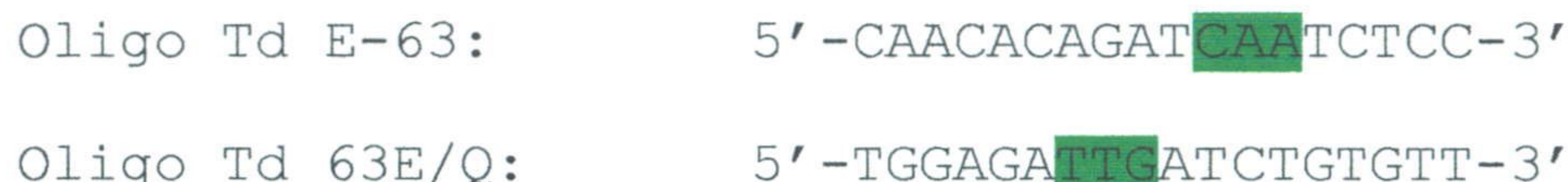


Fig. 4.17. Secuencias de los oligos diseñados para la mutagénesis del mutante E63Q. Se muestra en verde el codón mutado.

Se llevó a cabo la primera reacción de PCR empleando como molde el plásmido pMI y como cebadores los oligos Pea m N y Td 63 E/Q, por un lado, y Td E-63 y Pea m C, por otro, amplificándose así las dos mitades del inserto mutado, tal como se aprecia en la figura 4.18. La secuencia de reacción fue de 5 min. de precalentamiento a 94 °C, seguido de 30 ciclos formados por 1 min a 94 °C, 1 min y 30 seg a 52 °C y 1 min a 72 °C, para acabar con 5 min. de extensión final a 72 °C.

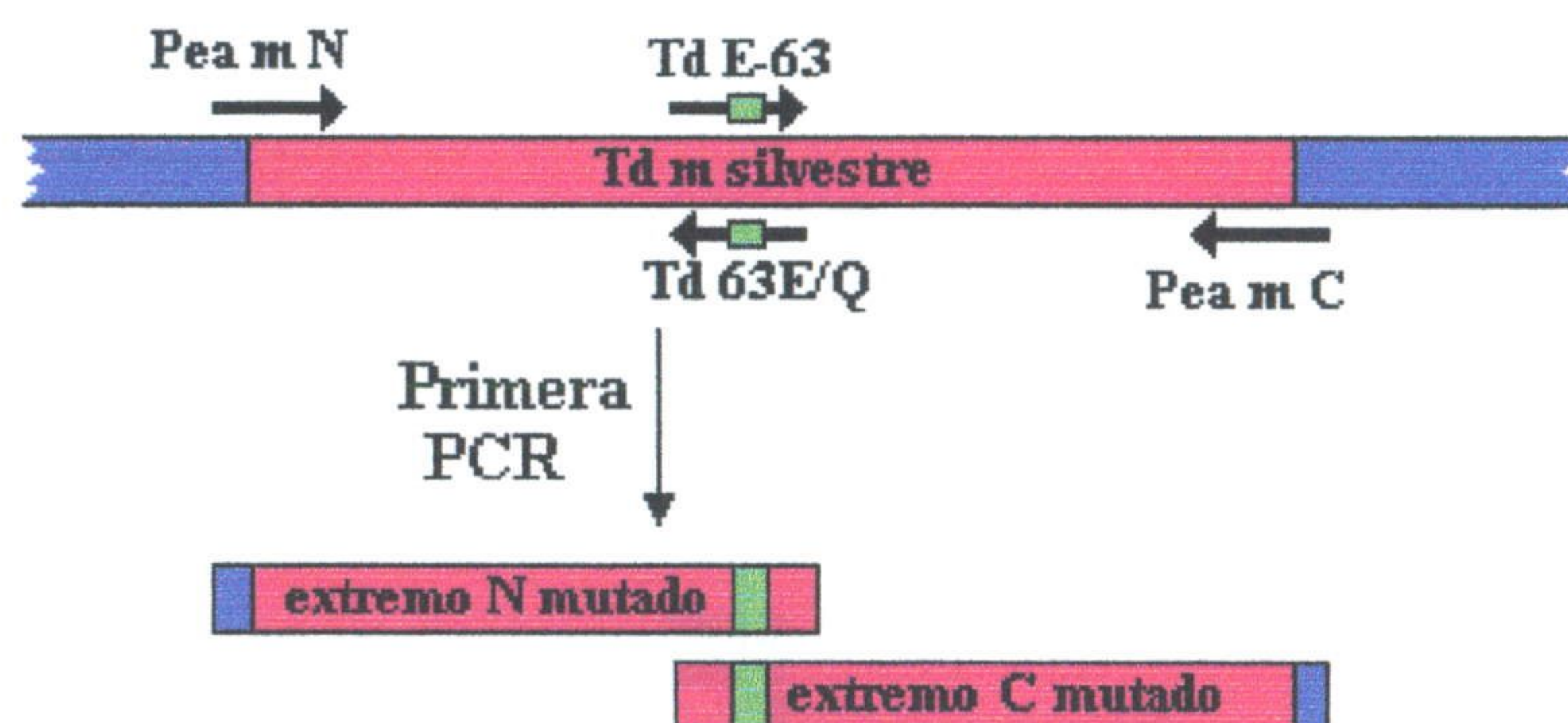


Fig. 4.10. Amplificación de las dos mitades del inserto mutado E63Q.

Se obtuvieron únicamente las bandas correspondientes a las dos mitades de inserto con los tamaños esperados, 195 y 147 pb, que pueden observarse en la electroforesis en agarosa al 3% de la figura 4.19. Fueron purificadas mediante extracción de las bandas con fenol (sección 3.3.3), para eliminar el pMI y los oligos, antes de llevar a cabo la segunda PCR.

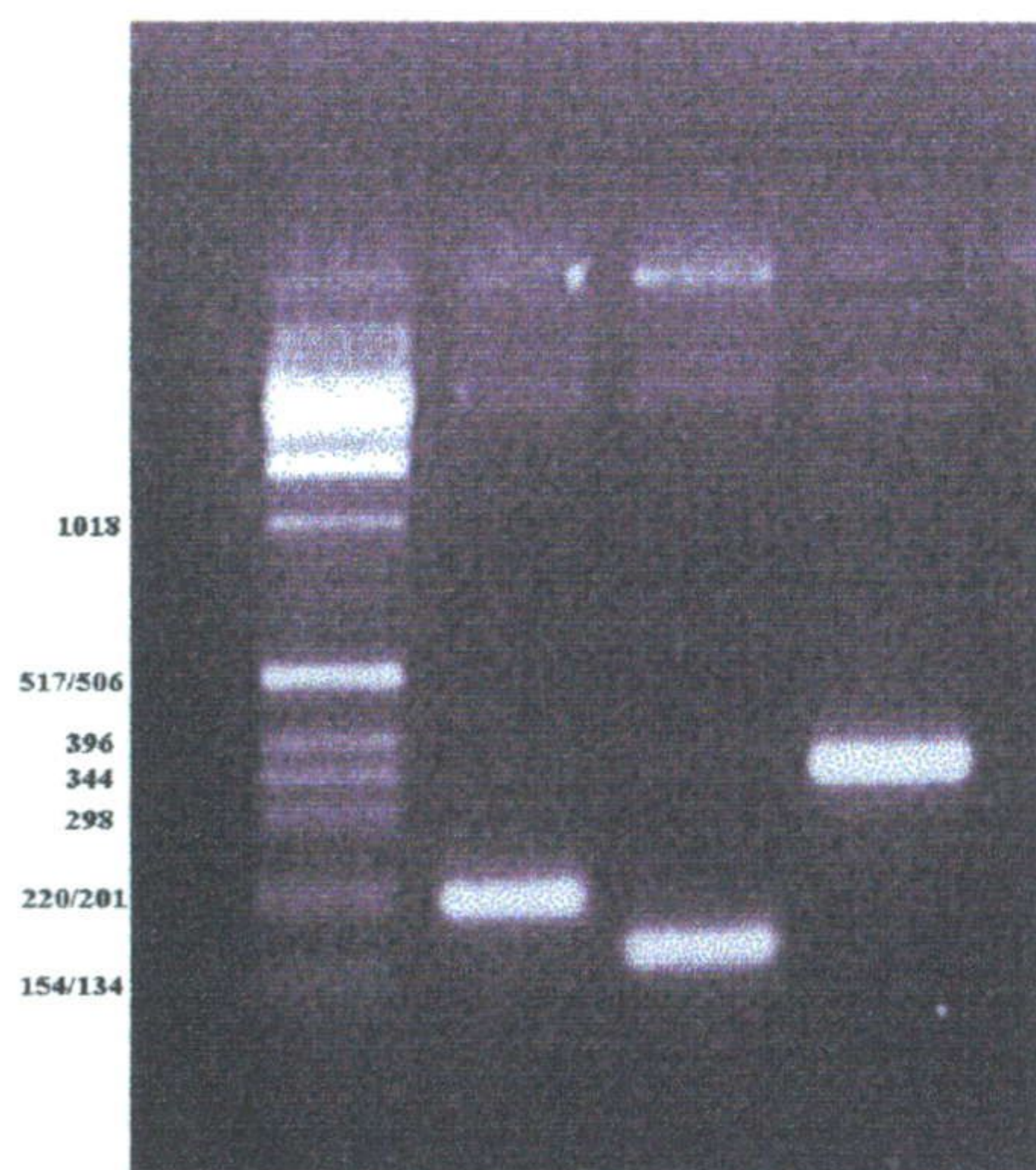


Fig. 4.19. Electroforesis en agarosa al 3%, mostrando las mitades de inserto y el inserto completo. Se indica el tamaño de los marcadores de peso molecular.

- Calle 1: Marcadores PM X.
- Calle 2: Mitad 63-amino (195 pb).
- Calle 3: Mitad 63-carboxilo (147 pb).
- Calle 4: Inserto completo, tras la 2ª PCR (340 pb)

La segunda PCR fue llevada a cabo empleando las dos mitades de inserto como moldes y los oligos de los extremos, Pea m N y Pea m C, como cebadores. La secuencia de reacción fue idéntica y se obtuvo una única banda de 340 pb, como se esperaba. Dicha banda puede observarse en la figura 4.19. Fue extraída del gel y purificada con fenol-cloroformo.

Una vez obtenido el inserto mutado, el siguiente paso consistió en subclonarlo en el vector pET12a. Para ello, el inserto mutado purificado y el plásmido pET12a, obtenido mediante minipreparación a partir de 3 ml de cultivo de *E. coli* transformada (sección 3.4.1), tuvieron que ser cortados con las enzimas de restricción Nde I y BamH I (sección 3.4.6).

El protocolo para llevar a cabo la doble digestión fue el siguiente: se mezclan en un tubo Eppendorf 12 μ l de buffer de restricción D 10x (Promega), 10 μ l del ADN a cortar, 10 unidades de Nde I (Promega) y agua destilada hasta un volumen total de 120 μ l. Tras 2 h incubando a 37 °C, se añaden otras 5 unid. de Nde I y 10 unid. de BamH I (Boehringer-Mannheim), tras lo cual se incuba a 37 °C durante otras 6 h.

Una vez finalizada la digestión, se realizan electroforesis en agarosa al 1.5% para el inserto cortado y al 0.8% para el plásmido cortado. Se extraen las bandas y se purifican con fenol-cloroformo, antes de ponerlas a ligar.

La ligación se llevó a cabo empleando ligasa del fago T4 (Boehringer-Mannheim), en un volumen total de 20 μ l y usando una relación molar inserto:vector de 3 a 1. Se dejó incubando 48 h a 15 °C.

Una vez concluida la reacción de ligación, se transformó una alícuota de células de *E. coli* competentes de alta capacidad de transformación (JM109), con los 20 μ l de mezcla de ligación. Tras una noche de crecimiento, aparecieron en la placa unas cuantas colonias resistentes a ampicilina. Se amplificó cada una de ellas en 3 ml de medio LB y se realizaron minipreparaciones de los plásmidos que contenían. Se analizaron por electroforesis en agarosa al 0.8% y uno de los de peso molecular adecuado (igual al del plásmido pMI) se escogió para posterior análisis (sección 4.5.1), demostrando ser el mutante E63Q.

La secuencia completa de obtención del mutante Trx m E63Q se muestra en la figura 4.20.

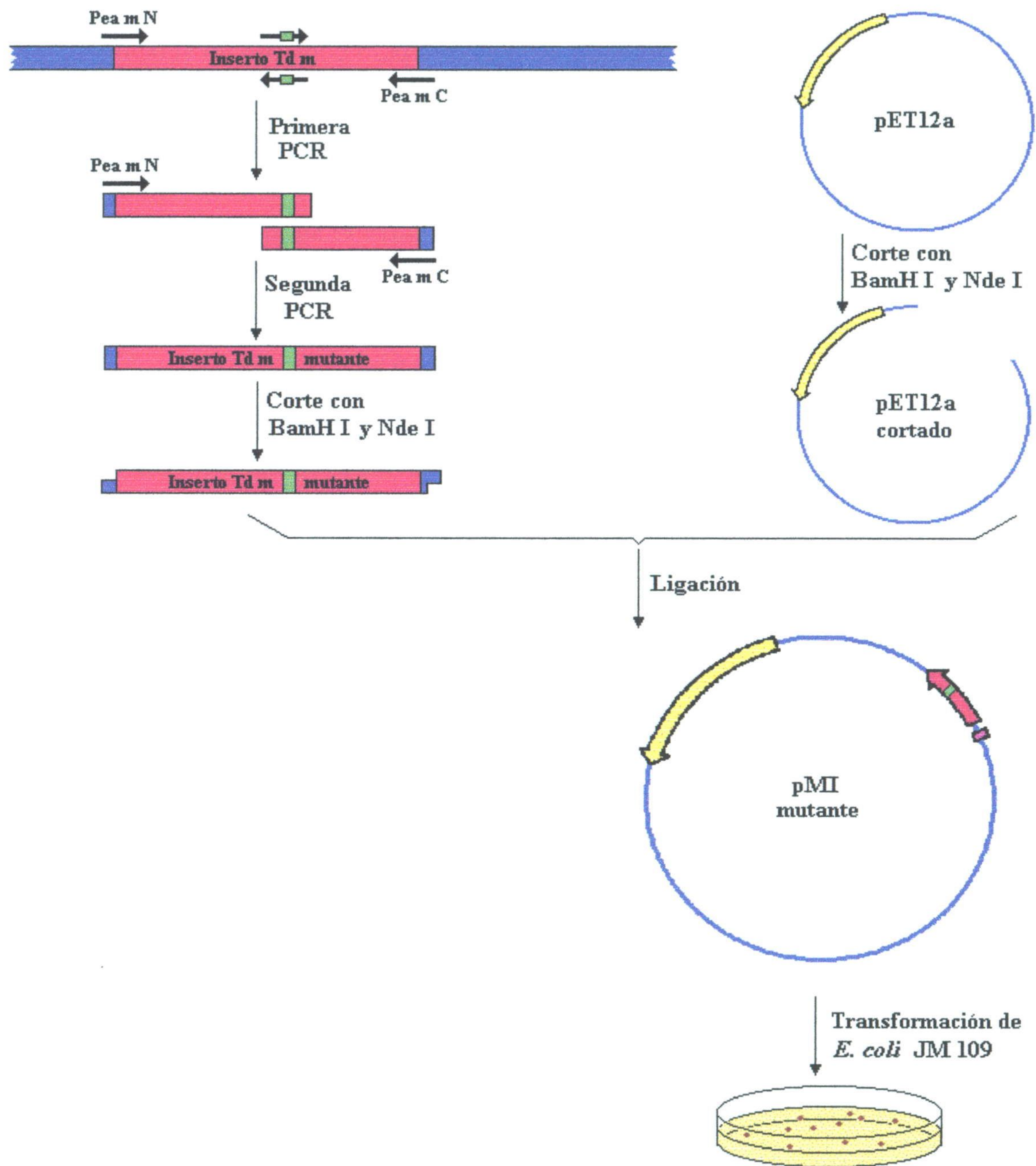


Fig. 4.20. Secuencia de obtención del mutante Trx m E63Q. Explicación en el texto.

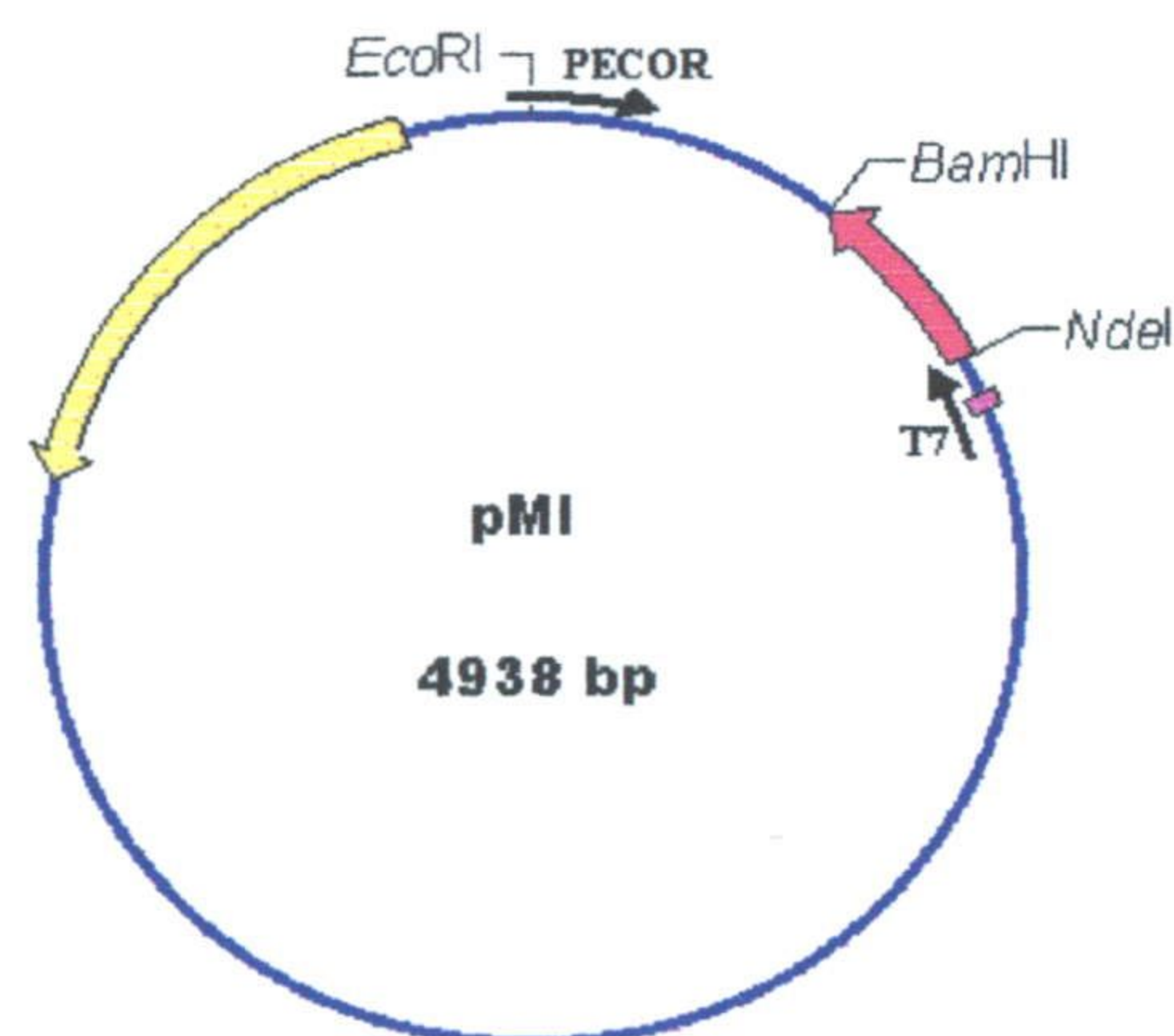
4.4. OBTENCIÓN DEL MUTANTE TRX m R74E

Los sucesivos intentos de obtener el mutante R74E mediante el mismo método anterior resultaron infructuosos, quizás debido a que la doble digestión del inserto con BamH I y Nde I resulta muy poco eficaz, por lo que la posterior ligación es muy difícil, al existir poca cantidad de extremos cohesivos. Ello estaba confirmado experimentalmente por la aparición de ligaciones inespecíficas, que daban lugar a colonias de *E. coli* conteniendo plásmidos anómalos (la ligasa del fago T4 es capaz de ligar también extremos romos, aunque preferentemente liga extremos cohesivos si estos existen).

La poca eficacia de la doble digestión con BamH I y Nde I podía deberse a dos factores. En primer lugar, podría ser debida a que los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción estaban situados muy cerca de los extremos del inserto (las enzimas de restricción son tanto menos eficaces cuanto más cerca está su sitio de reconocimiento del final de la cadena de ADN). En segundo lugar, y más probablemente, el fallo podría estar en que las dos enzimas requieren buffers muy diferentes para funcionar de forma óptima, por lo que la doble digestión debía llevarse a cabo de la forma descrita en el apartado anterior (un total de 8 h de digestión y un gran volumen de reacción) obteniéndose un rendimiento muy bajo.

Para vencer ambas dificultades, se decidió abordar el problema mediante otra estrategia similar a la anterior, pero empleando otros oligonucleótidos como cebadores, de forma que se obtuviera un inserto flanqueado por varios pares de bases en sus extremos, con objeto de hacer más eficaz la digestión, al quedar los lugares de reconocimiento de las enzimas más alejados de los extremos. Además, se diseñó un oligo que permitía sustituir el corte con BamH I por un corte con la enzima de restricción EcoR I, cuyo buffer óptimo es el mismo que el de Nde I y resulta además muy eficaz (fue una de las primeras enzimas de restricción de tipo II en ser descubierta).

Para ello, en lugar del oligo Pea m N, se empleó el oligo T7, separado 75 pb del sitio de reconocimiento de Nde I. Así mismo, en lugar del oligo Pea m C, se diseñó un oligo nuevo, denominado PECOR, que se apareaba con el plásmido pMI en un lugar alejado 510 pb del sitio de reconocimiento de BamH I, y que incluía una secuencia de reconocimiento para EcoR I (fig. 4.21).



Oligo PECOR:

EcoR I

5' -CTTCAAGAATTCTCATGTTT-3'

Oligo T7:

5' -TTAATACGACTCACTATA-3'

Oligo Td R-74:

5' -TATGGAATCGAAAGCAT-3'

Oligo Td74R/E:

5' -TATGCTTTCGATTCCAT-3'

Fig. 4.21. Oligos empleados para la mutagénesis de R74E. Los oligos PECOR y T7 se emplean en lugar de Pea m C y Pea m N, permitiendo obtener un inserto mucho mayor, más fácil de purificar y de digerir con enzimas de restricción. Se indica su situación en el plásmido pMI.

Se realizó la primera PCR empleando los oligos T7 y Td 74R/E (inverso), por un lado y Td R-74 (directo) y PECOR, por otro y la misma secuencia de reacción anterior, obteniéndose así las dos mitades de inserto: T7-74-amino (307 pb) y 74-carboxilo-PECOR (624 pb), que pueden observarse en la figura 4.22.

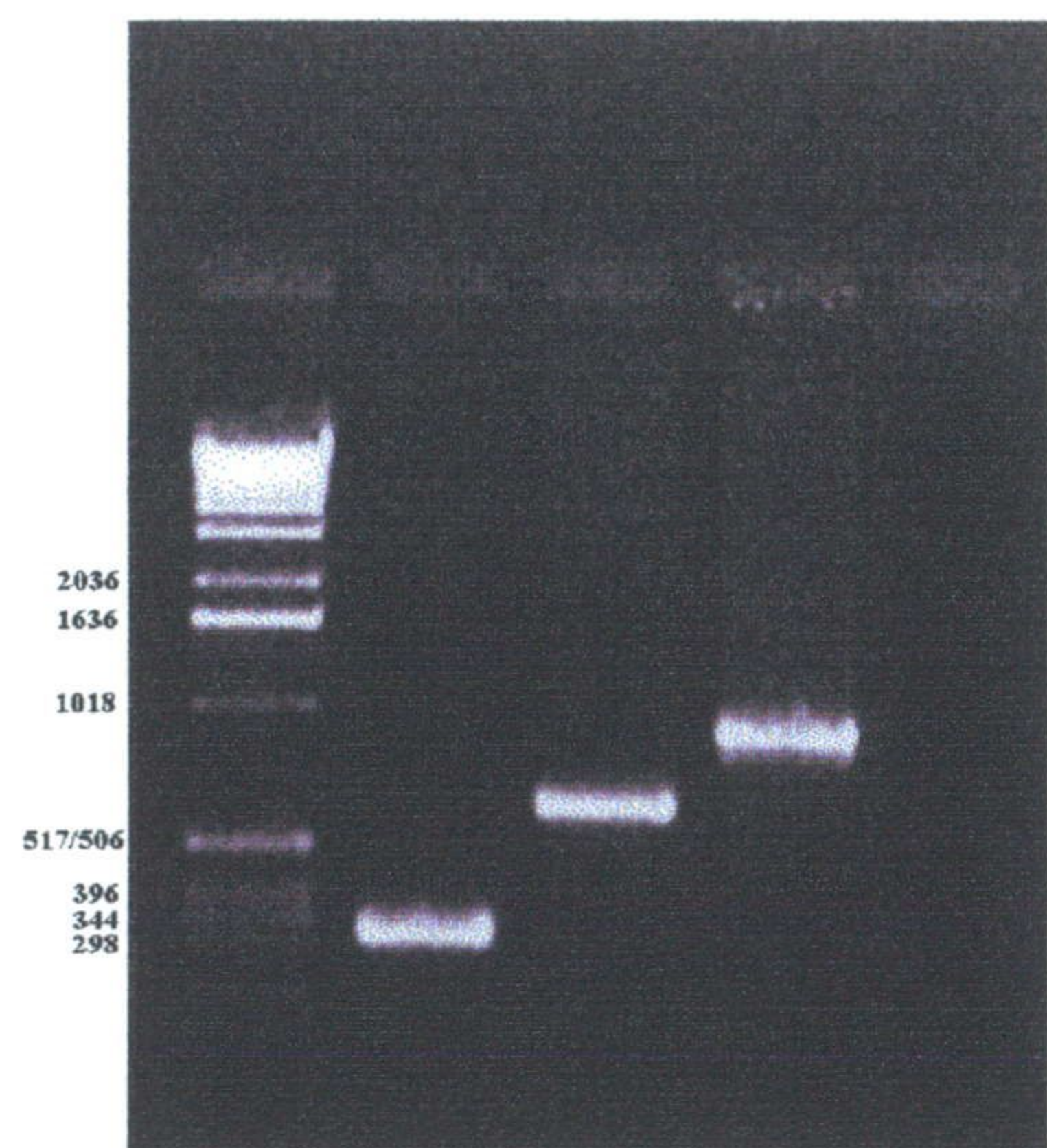


Fig. 4.22. Electroforesis en agarosa al 1.5%, mostrando las mitades de los insertos y el inserto completo:

Calle 1: Marcadores PM X.
Calle 2: Mitad T7-74-amino (307 pb).
Calle 3: Mitad 74-carboxilo-PECOR (624 pb).
Calle 4: Inserto completo T7-74-PECOR, tras la segunda PCR (930 pb).

Ambos fragmentos se extrajeron de un gel de agarosa al 1.5% y se purificaron con fenol-cloroformo, antes de llevar a cabo la segunda PCR. La segunda PCR se llevó a cabo empleando las dos mitades como moldes y los oligos PECOR y T7 como cebadores. Se empleó el mismo protocolo de reacción que para el caso de E63Q, excepto que la temperatura de hibridación (T_m) se bajó hasta 38 °C y se dejó un tiempo de hibridación de 2 min y 30 s, en lugar de 1 min y 30 s. Esto se hizo así, porque con las condiciones anteriores, la PCR no se llevaba a cabo de forma correcta. Apareció entonces una única banda observable en la figura 4.22, que se purifica con fenol-cloroformo a partir de un gel al 1.5% en agarosa.

El inserto completo, con un tamaño de 930 pb, así como el vector pET12a, se digirieron con EcoR I y Nde I, empleando para ello 50 μ l totales de mezcla de restricción, conteniendo 5 μ l de buffer H 10x de Boehringer-Mannheim, 5 unid. de EcoR I y 5 unid. de Nde I, más 10 μ l del ADN a cortar. Se dejó 1 h y 30 min a 37 °C, tras lo cual se purificó mediante extracción a partir de sendos geles de agarosa al 1.5% (inserto) y al 0.8% (vector).

Se ligó según el mismo protocolo seguido para el mutante anterior, obteniéndose varias colonias, de las cuáles se extrajeron los plásmidos, uno de las cuáles, del tamaño adecuado, se escogió para su análisis, demostrando ser el plásmido conteniendo el mutante R74E.

La secuencia completa de obtención del mutante Trx m R74E se muestra en la figura 4.23.

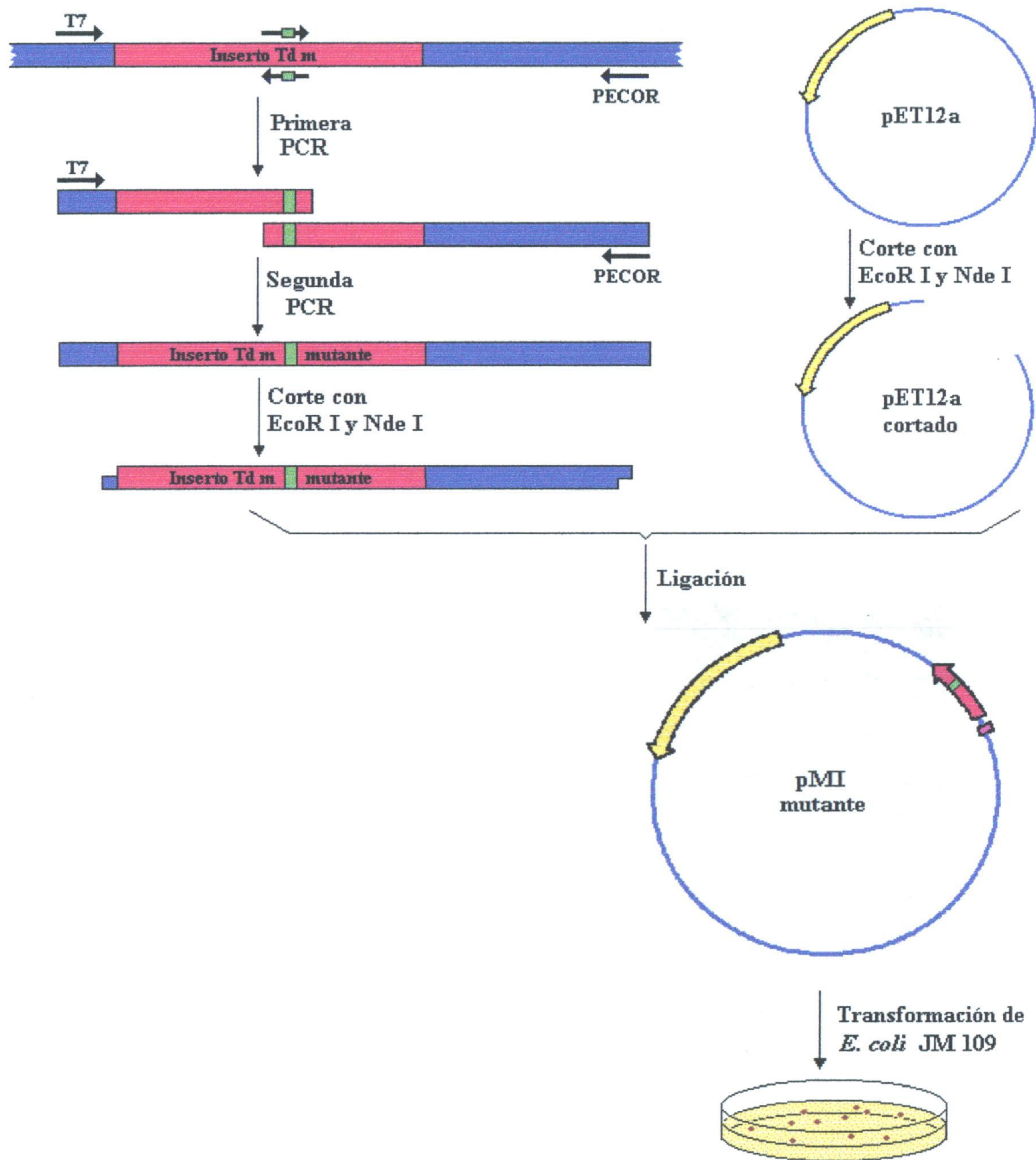


Fig. 4.23. Secuencia de obtención del mutante Trx m R74E. Explicación en el texto.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES.

4.5.1. Comprobación de los plásmidos mutantes.

La identidad de los plásmidos mutantes obtenidos, denominados respectivamente pE63Q y pR74E, fue confirmada mediante cuatro tipos de análisis:

1. PCR empleando los oligos específicos Pea m N y Pea m C.
2. Corte de los plásmidos con Nco I.
3. Corte de los plásmidos con Ava II.
4. Secuenciación de los plásmidos.

Los tres primeros métodos indican únicamente si el plásmido contiene un inserto de tiorredoxina, pero no permiten distinguir entre la forma salvaje y los mutantes. El último método permite tener la completa seguridad de que se han obtenido los mutantes.

En primer lugar se llevó a cabo un análisis por PCR de los dos mutantes, el plásmido pMI salvaje y el plásmido pET12a, empleando los oligos de la tiorredoxina, Pea m N y Pea m C. La figura 4.24 muestra la electroforesis al 1.5% del resultado. Los mutantes y la Trx m salvaje dan un inserto de 330 pb, mientras que el pET12a no produce ninguna banda.

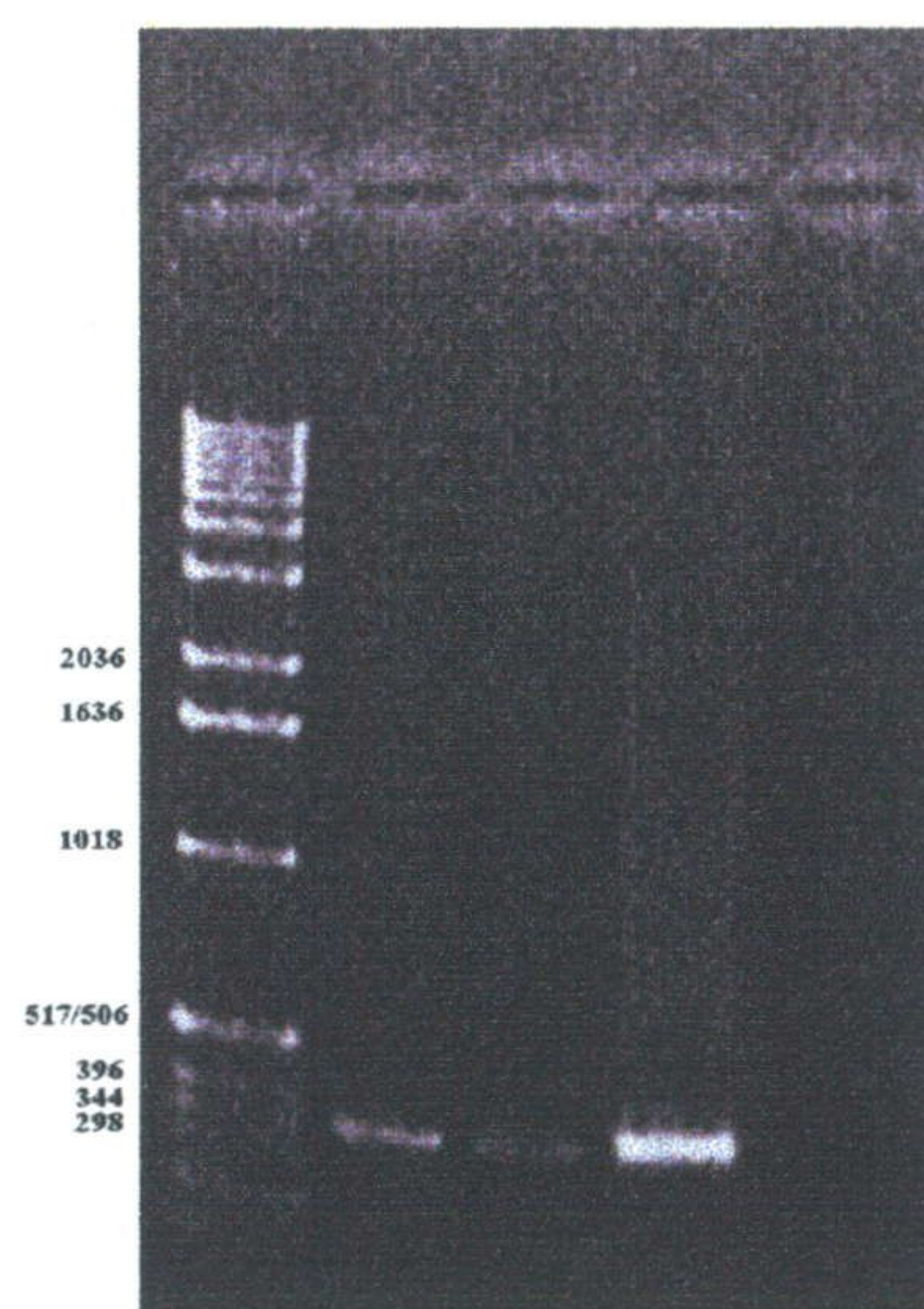


Fig. 4.24. Electroforesis al 1.5% mostrando los resultados del PCR. Los mutantes y el pMI dan bandas de tiorredoxina (330 pb), mientras que el pET12a no da banda alguna.

Calle 1: Marcadores PM X.
Calle 2: pE63Q.
Calle 3: pR74E.
Calle 4: pMI
Calle 5: pET12a

En segundo lugar se cortaron los cuatro plásmidos anteriores con la enzima de restricción Nco I. Esta corta al gen de la tiorredoxina m y a los mutantes una sola vez, cerca de su centro activo, mientras que no corta al pET12a. La figura 4.25 muestra la electroforesis al 0.8% del resultado. Se observa que los plásmidos mutantes y el pMI se cortan y abren, dando una única banda de 4938 pb. El pET12a, sin embargo, permanece sin abrir, por lo que aparecen las tres bandas típicas correspondientes a las formas superenrolladas del plásmido.

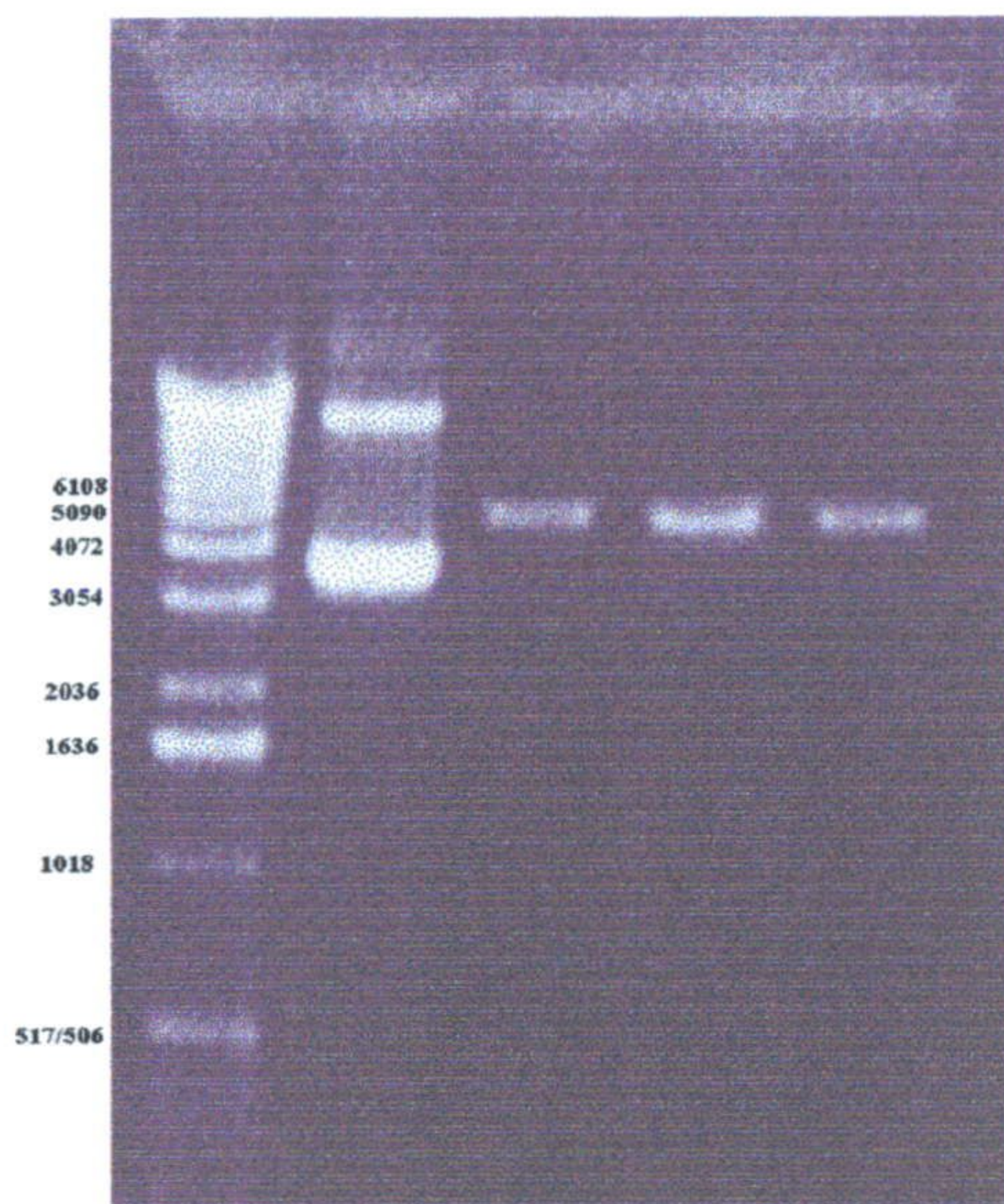


Fig. 4.25. Electroforesis al 0.8% mostrando los resultados del corte con Nco I. Los mutantes y el pMI dan una única banda abierta a 4938 pb, mientras que el pET12a no se corta y aparecen las tres bandas correspondientes al plásmido superenrollado.

Calle 1: Marcadores PM X.
 Calle 2: pET12a.
 Calle 3: pE63Q.
 Calle 4: pR74E.
 Calle 5: pMI

En tercer lugar se cortaron los cuatro plásmidos con la enzima Ava II, la cuál corta al pET12a en ocho sitios diferentes, dando lugar a ocho fragmentos de restricción cuyas longitudes pueden verse en la siguiente tabla. El inserto de tiorredoxina m introduce un nuevo punto de corte (fig.4.26), por lo que los mutantes y el pMI dan lugar a 9 fragmentos, de tamaños fácilmente distinguibles, lo que permite su identificación.

pET12a	pMI y mutantes:
1746	1746
1745	1372
	635
303	303
279	279
249	249
222	222
88	88
42	42

Fragmentos de restricción de los plásmidos pET12a y pMI con Ava II. Se muestran en rojo las diferencias que permiten comprobar la identidad de los plásmidos.

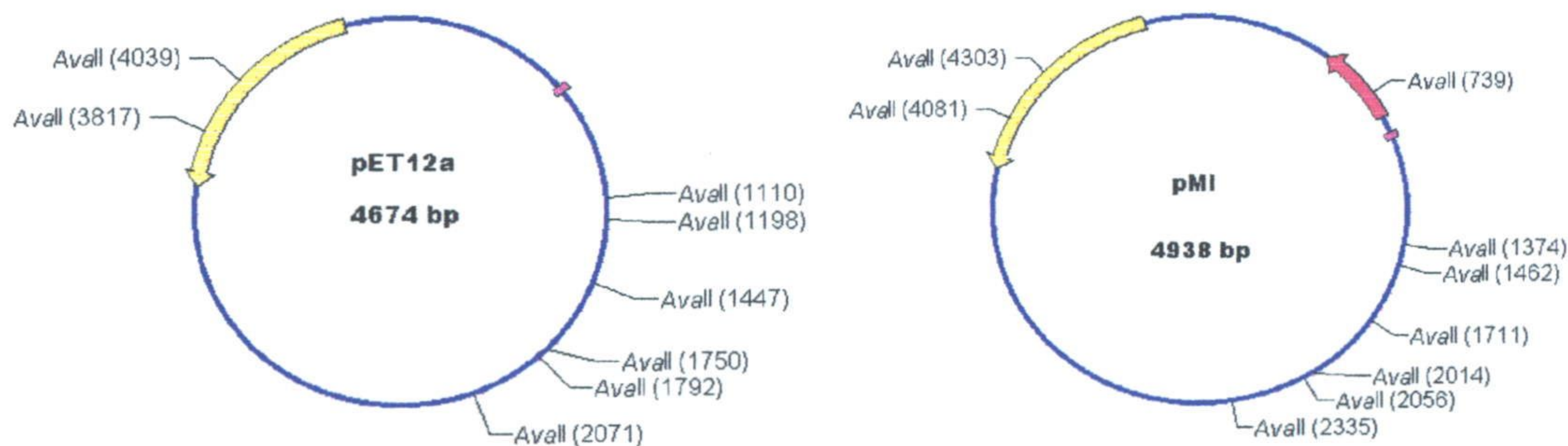


Fig. 4.26. Mapas de restricción con Ava II para pET12a y pMI. En este último, se observa el noveno sitio de corte, en el centro del inserto del gen de la Trx m.

En el caso del pET12a, el resultado de la digestión con Ava II muestra una única banda clara, a 1745/1746 pb (ambos tamaños se confunden), junto con otras seis bandas de tamaños menores de 300 pb, que no se distinguen muy bien en un gel al 1.5%. Por el contrario, la digestión del pMI y de los mutantes dará tres bandas mayores de 300, una a 1746, idéntica a la del pET12a, junto con otras dos bandas nuevas, a 1372 y a 635 pb, que permiten identificar positivamente si el plásmido analizado incluye el inserto de tiorredoxina en el lugar correcto. La figura 4.27 muestra la electroforesis del resultado de las digestiones de los cuatro plásmidos, comprobándose las identidades de los mutantes.

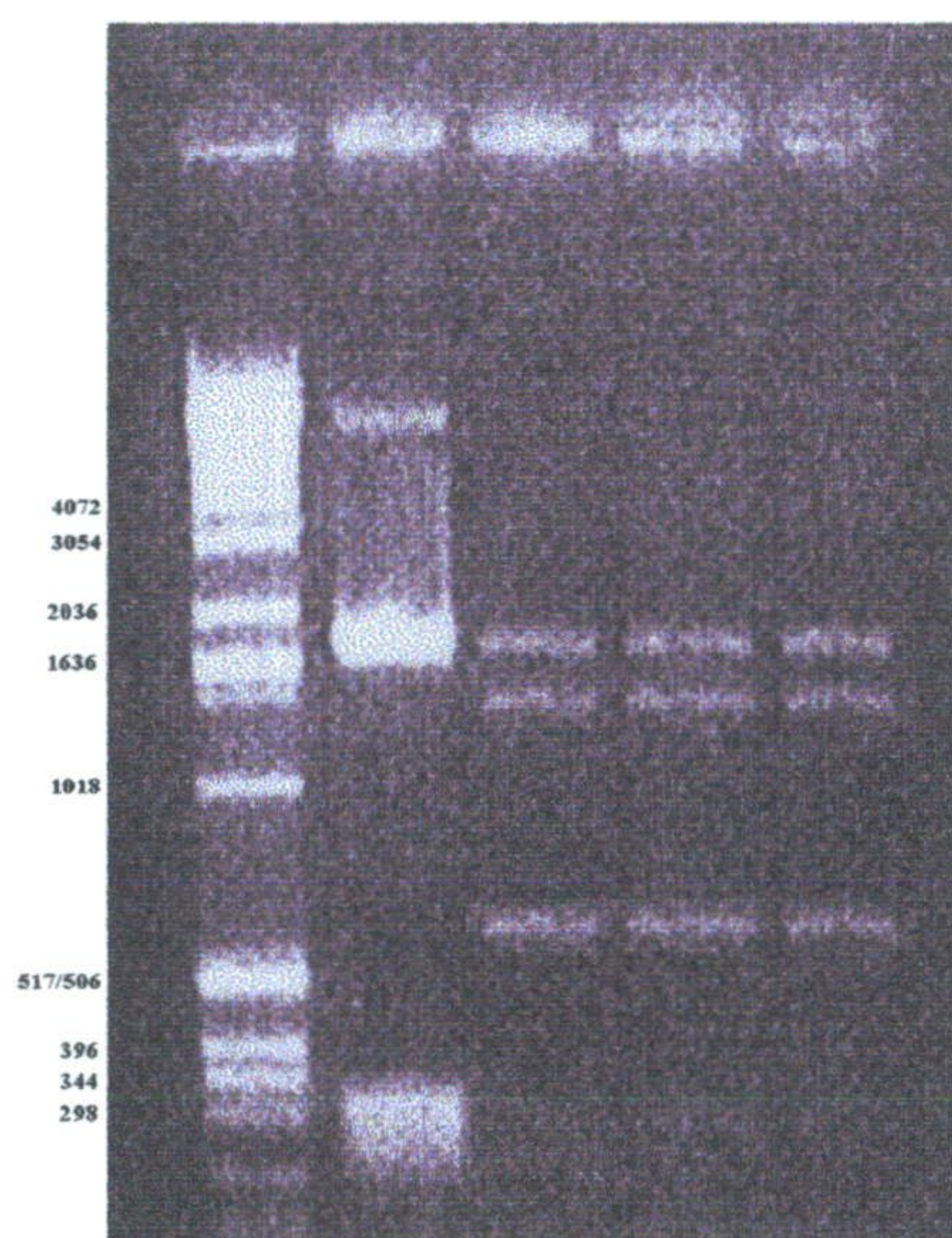


Fig. 4.27. Electroforesis al 1.5% mostrando los resultados del corte con Ava II. Los mutantes y el pMI dan dos bandas a 1372 y 635 pb, que no aparecen en el pET12a.

Calle 1: Marcadores PM X.
 Calle 2: pET12a
 Calle 3: pE63Q.
 Calle 4: pR74E.
 Calle 5: pMI

Una vez comprobada la identidad de tiorredoxina de los plásmidos pE63Q y pR74E, fueron enviados a secuenciar al Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, comprobándose así finalmente que habían recibido la mutación correcta (fig. 4.28).

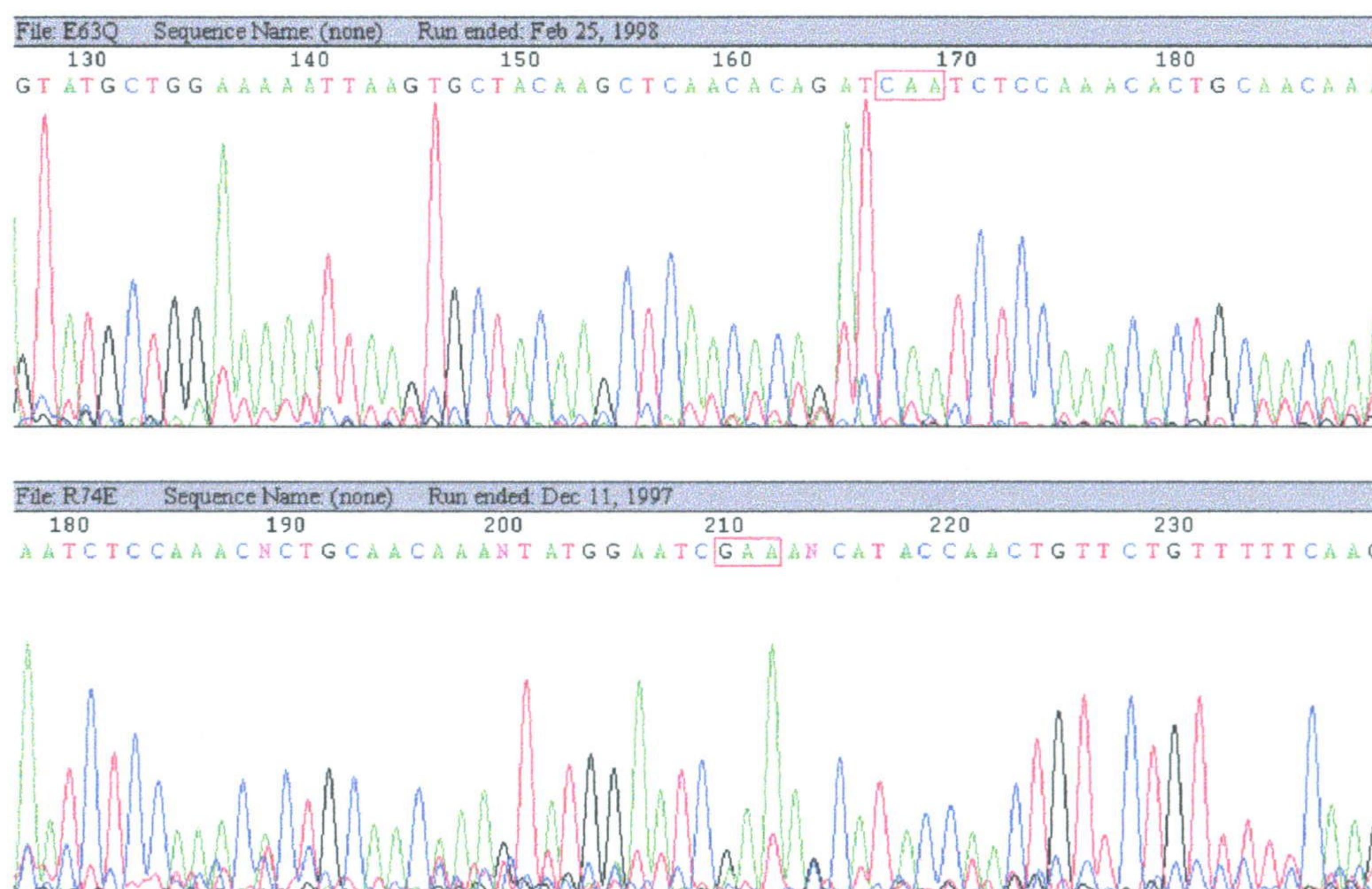


Fig. 4.28. Secuenciación de los plásmidos mutantes. Se remarcan en rojo las mutaciones deseadas.

4.5.2. Expresión, purificación y caracterización electroforética de las proteínas mutantes.

Los plásmidos mutantes pE63Q y pR74E, así como la Trx m silvestre y los mutantes K70Q y K70E, fueron expresados en cultivos de 3 litros de LB con ampicilina, según se detalla en la sección 3.6.1, tras lo cual las proteínas mutantes así obtenidas fueron purificadas según el protocolo descrito por López-Jaramillo (1995) para la Trx m salvaje (ya que se comprobó que la termoestabilidad de los mutantes era semejante a la de ésta última). El protocolo fue modificado según se detalla en la sección 3.6.2 y a continuación.

Tras el pase por la columna de filtración en gel Sephadex G-50, se obtiene una proteína pura que da una única banda por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y tinción de plata. Sin embargo, estudios espectrofotométricos permitieron comprobar que existía contaminación de ADN bacteriano, lo cual podía influir en los experimentos posteriores (particularmente, en la diálisis en equilibrio). Así pues, se modificó el protocolo de purificación para la Trx m empleado anteriormente en nuestro grupo, para incluir un pase final por una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa, equilibrada en buffer fosfato 25 mM a pH 7.9, eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 600 mM. Las tiorredoxinas prácticamente no se fijan a la DEAE-celulosa y salen con el lavado de la columna, mientras que las impurezas de ADN eluyen a una concentración de sal entre 300 y 450 mM.

Las proteínas puras se sometieron a electroforesis nativa en ausencia de SDS, comprobándose así su distinta relación carga/masa. El mutante E63Q, con menor carga negativa que la tiorredoxina m salvaje, migra bastante menos en la electroforesis, llevada a cabo a pH 8.8 y con una concentración de acrilamida del 7.5%. El mutante R74E, ya que su carga negativa es mayor que la de la forma silvestre, presenta una mayor migración, aunque las diferencias con la Trx m silvestre en este caso son sorprendentemente pequeñas. Como cabe esperar, los mutantes K70Q y K70E, migran más que la Trx m silvestre. La forma K70E es la que más migra de todas las estudiadas (fig. 4.29).

Las diferencias más interesantes son, sin duda, las que se presentan en la interacción con la FBPasa cloroplastídica, que se detallan en las siguientes secciones.

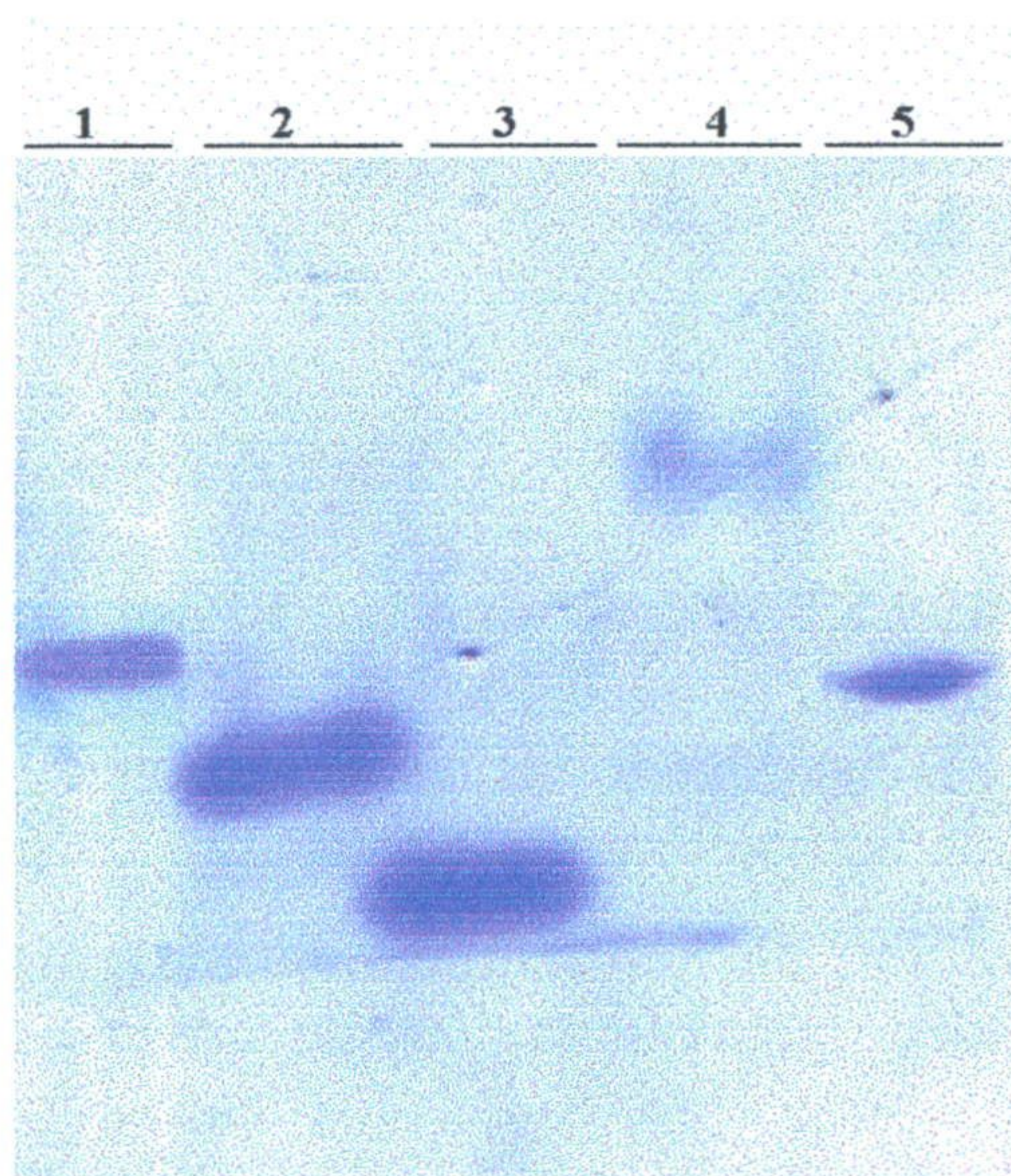


Fig. 4.29. Electroforesis nativa (sin SDS) al 7.5% de acrilamida y pH 8.8 de la Trx m nativa (calle 1) y de los cuatro mutantes, K70Q (calle 2), K70E (calle 3), E63Q (calle 4) y R74E (calle 5), mostrando sus diferentes movilidades electroforéticas.

4.6. MEDIDA DE LA CAPACIDAD DE ACTIVACIÓN DE LAS TIORREDOXINAS SOBRE LA FBPasa

Se llevaron a cabo medidas de la capacidad de activación de la FBPasa por distintas concentraciones de tiorredoxina (sección 3.7). Se emplearon para ello, además de la forma silvestre y los dos mutantes obtenidos en este trabajo, E63Q y R74E, los dos mutantes disponibles en nuestro laboratorio gracias a anteriores experiencias, K70Q y K70E.

Las medidas de activación se efectuaron con una concentración de FBPasa constante de 1.6 $\mu\text{g/ml}$ y utilizando concentraciones crecientes de tiorredoxina desde 0.1 hasta 18 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se muestran en la figura 4.30

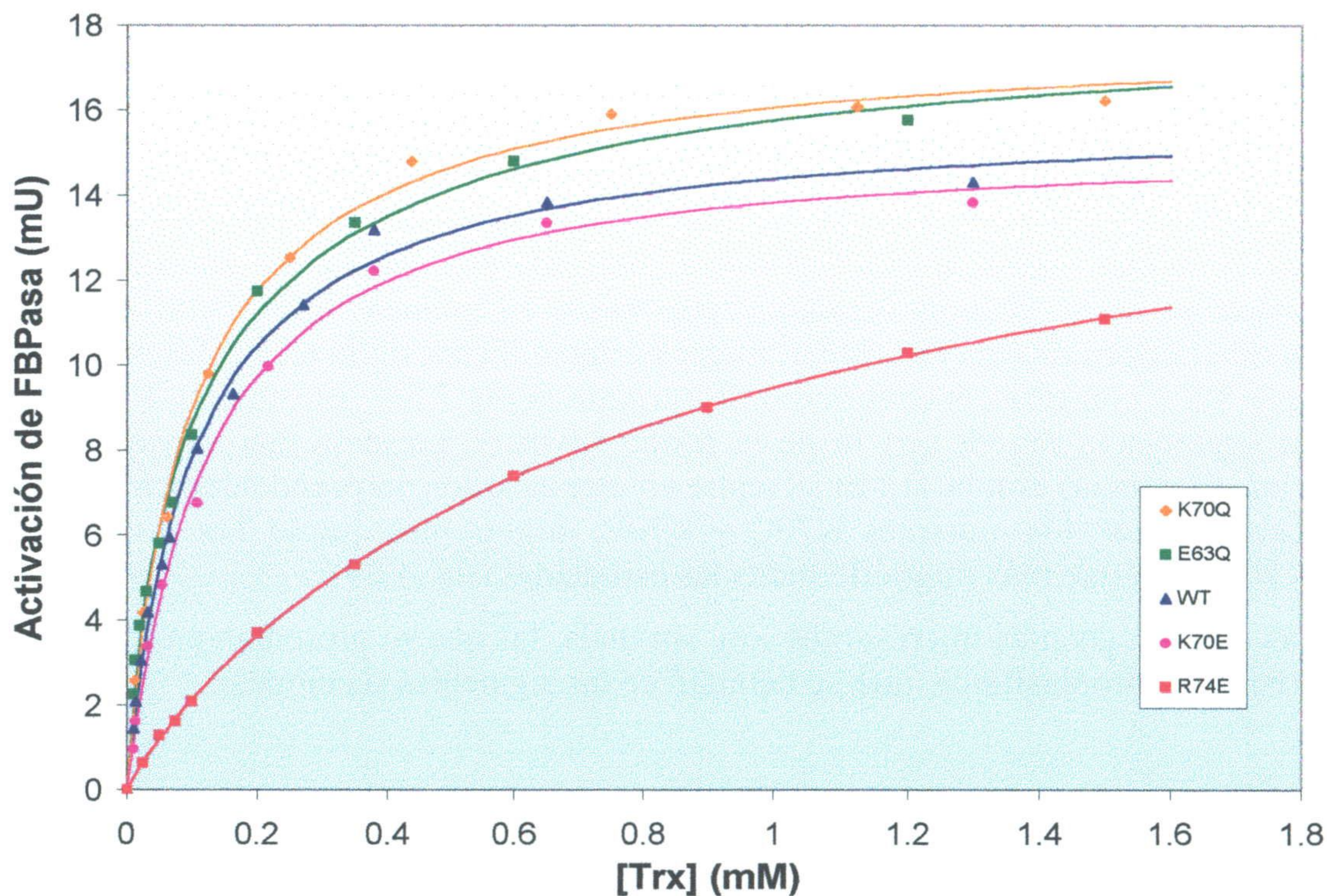


Figura 4.30. Curvas de activación de FBPasa en función de la concentración de tiorredoxina

Se observa claramente que los dos mutantes R74E y K70E activan a la FBPasa peor que la Trx m silvestre (WT en la figura), mientras que los dos mutantes K70Q y E63Q son más eficaces que la Trx m silvestre en la activación de FBPasa. De todas las mutaciones, la R74E es la que afecta más radicalmente a la capacidad de activación.

Con objeto de cuantificar la capacidad de activación de los distintos mutantes, se llevó a cabo una representación de Lineweaver-Burk (representación de inversos), ajustándose los datos a una cinética de Michaelis-Menten en todos los casos, sin desviaciones apreciables de la linealidad, como se observa en la figura 4.31.

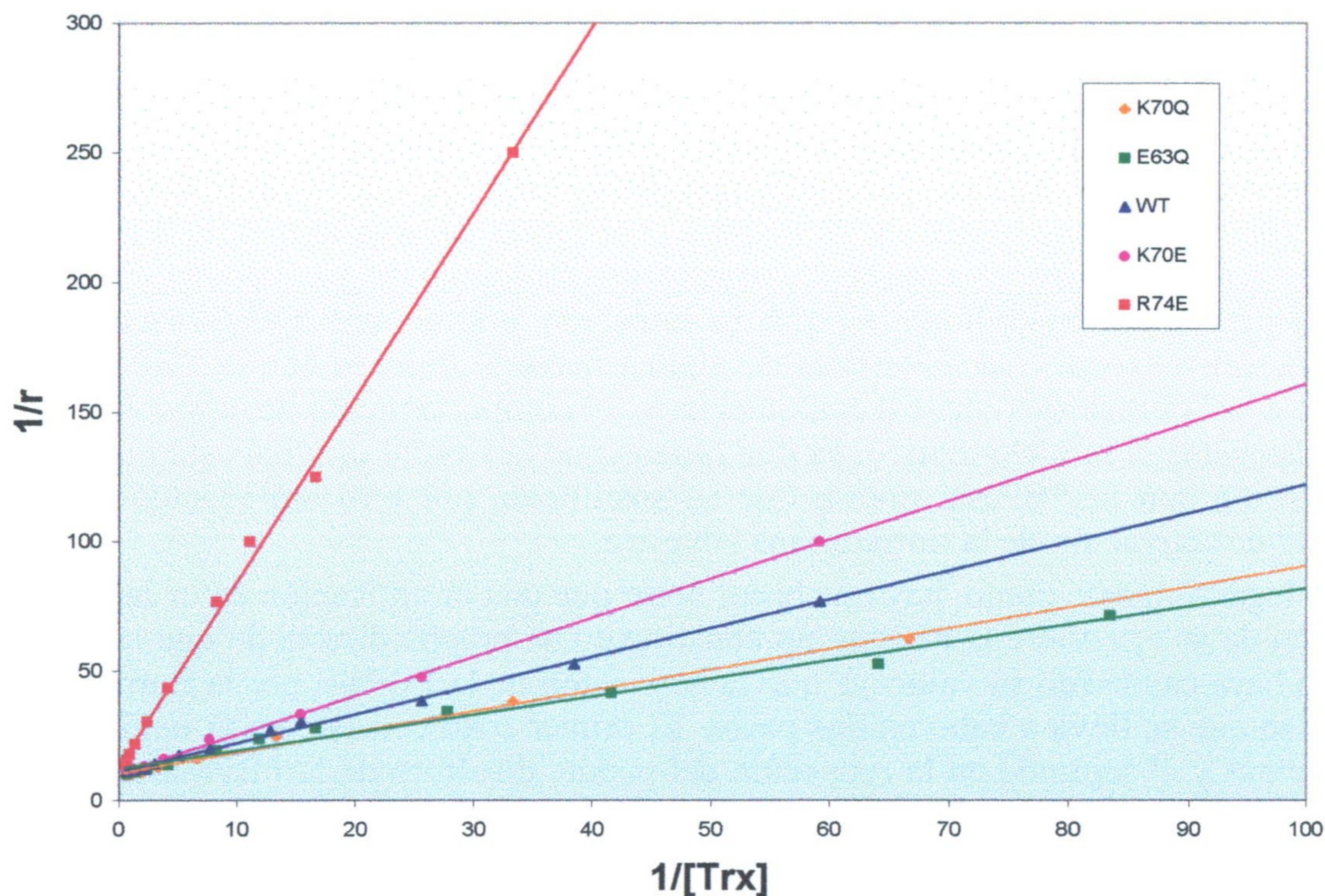


Fig. 4.31. Representación de Lineweaver-Burk de los datos de activación. Se comprueba que la activación de FBPasa por todas las formas de Trx m sigue una cinética michaeliana pura, como se observa también en la forma hiperbólica de las líneas de la figura 4.30.

Los datos pueden ajustarse a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$r = \frac{r_{\max} [\text{Trx}]}{K_{0.5} + [\text{Trx}]}$$

Donde $K_{0.5}$ representa la concentración de tiorredoxina necesaria para conseguir una activación de FBPasa igual a la mitad de la activación máxima. El inverso de $K_{0.5}$ es una medida de la capacidad de activación, ya que cuanto menor sea $K_{0.5}$, menor concentración de Trx será necesaria para conseguir activar la FBPasa hasta una actividad dada. Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla:

Proteína	$K_{0.5}$ (μM)	r_{\max} (mU)	$K_{0.5}^{-1}$ (μM) (capacidad de activación)
R74E	0.556	12.5	1.8
K70E	0.145	15.5	6.9
Trx m WT	0.100	14.6	10
K70Q	0.077	13.1	13.0
E63Q	0.057	15.5	18.0

Se observa que los mutantes R74E, K70E y E63Q se comportan de acuerdo a las predicciones del modelo. Los dos primeros poseen menor capacidad de activación que la Trx m silvestre, mientras que el último tiene una capacidad de activación mejorada. Sorprendentemente, el mutante K70Q consigue activar a la FBPasa más que la forma silvestre. Esto es un resultado inesperado, ya que cabría suponer que la sustitución de una carga positiva por un aminoácido neutro perjudicaría a la interacción. Este hecho podría explicarse gracias a la tendencia a formar puentes de hidrógeno de la glutamina. Quizás se formen uno o varios puentes de hidrógeno entre este aminoácido y la FBPasa, que estabilicen la unión tanto o más que la carga positiva original, mejorando así la capacidad de activación. Otra posibilidad es que la mutación origine una reorganización de la estructura a nivel local, que favorezca de alguna manera la unión con la FBPasa, quizás haciendo a la Trx más flexible. En cualquier caso, el comportamiento de la mutación K70Q también respalda el modelo teórico, ya que prueba que la Lys-70 original está implicada en la interacción con la FBPasa, puesto que su sustitución por otro aminoácido cambia la capacidad de activación de la tiorredoxina silvestre.

Llegados a este punto, hay que hacer notar que una modificación en la capacidad de activación de la Trx sobre la FBPasa no constituye una prueba directa de que la constante de unión haya cambiado su valor, ya que la activación de la FBPasa por la tiorredoxina es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos. El primer paso consiste en la unión entre las dos proteínas y el segundo en la reducción del puente disulfuro de la FBPasa por parte de la tiorredoxina (figura 4.32). Una disminución en la capacidad de activación podría deberse a cualquiera de los dos factores, de modo que la diferencia puede localizarse en la distinta afinidad de la molécula por la FBPasa o en el potencial reductor de la tiorredoxina, que podría cambiar debido a la introducción de la mutación, aunque el aminoácido mutado no esté directamente implicado en la interacción con la FBPasa. El modelo predice que los aminoácidos mutados están implicados en el reconocimiento Trx - FBPasa y sólo sería válido si las diferencias en la capacidad de activación se deben a diferencias en la constante de unión y no a diferencias en el potencial redox.

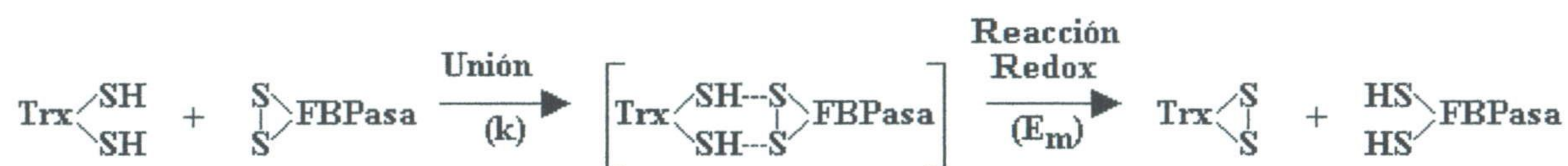


Fig. 4.32. Proceso de activación de la FBPasa por Trx, en dos pasos. En el primer paso se produce el reconocimiento y unión entre la Trx reducida y la FBPasa oxidada, formándose el complejo FBPasa-Trx en un proceso que está regido por la constante de unión, k. En el segundo paso, se produce una reorganización electrónica en el seno del complejo que da lugar a la FBPasa reducida y a la Trx oxidada, que se liberan. Esta segunda etapa es un proceso redox, regido por la diferencia entre los potenciales de reducción de la Trx y la FBPasa.

En realidad, el potencial reductor de la tiorredoxina es mucho mayor del que cabría esperar a la vista de su secuencia de aminoácidos (Gane *et al.*, 1995) y esta anomalía aún no ha sido correctamente explicada. Se ha especulado con el hecho de que el potencial redox de la Trx podría verse afectado por la situación del centro activo en el extremo amino de la larga hélice α -2, que posee un intenso momento dipolar, así como por la distribución de aminoácidos cargados alrededor del centro activo, que podrían tener un papel en la estabilización del grupo tiolato en la forma reducida (Gane *et al.*, 1995).

Sin embargo, estudios experimentales indican que la mutagénesis de estos residuos cargados (Jacobi *et al.*, 1997) no afecta en gran medida al potencial redox, demostrando que su valor anómalo es el resultado de la interacción entre distintos factores que aún no se comprenden en su totalidad. Los únicos residuos que han demostrado afectar en gran medida al potencial redox de la Trx son los dos residuos intermedios del centro activo, Gly-34 y Pro-35 (Mössner *et al.*, 1998), así como el Asp-25 (de Lamotte-Guery *et al.*, 1991), que interacciona directamente con el centro activo.

La mayoría de resultados experimentales apuntan al hecho de que los potenciales redox de las tiorredoxinas silvestres son todos ellos de magnitud comparable, a pesar de las diferencias en sus secuencias (Mora-García *et al.*, 1998; Salamon *et al.*, 1995; Hirasawa *et al.*, 1999), lo cuál apoya la idea de que las mutaciones puntuales no producen cambios importantes en el potencial de reducción. Sin embargo, sería deseable obtener confirmación experimental de que el potencial reductor de las tiorredoxinas estudiadas no se ve afectado por los cambios en los aminoácidos mutados.

Por otra parte, sería igualmente deseable estudiar la interacción entre la FBPasa y las distintas formas de tiorredoxina mediante algún método que permita determinar únicamente su constante de unión, en lugar de mediante métodos, como la medida de la capacidad de activación, que sólo ponen de manifiesto propiedades emergentes que pueden ser resultado de la interacción entre varios factores independientes.

Los efectos de la unión y del potencial de reducción pueden estudiarse por separado. El proceso de unión puede estudiarse mediante diálisis en equilibrio, ya que el equilibrio de distribución transmembrana únicamente depende de la concentración de tiorredoxina libre a ambos lados de la membrana y no se ve afectado por cambios en el potencial redox del centro activo de la tiorredoxina. Por otra parte, las posibles diferencias en el potencial de reducción, pueden estudiarse mediante métodos de titulación redox de las tiorredoxinas, similares a los que se han efectuado ya para otras proteínas (Hutchison y Ort, 1995; Salamon *et al.*, 1995). Ambos estudios serán abordados en las próximas secciones de este trabajo.

Si las diferencias en la capacidad de activación medidas para las tiorredoxinas mutantes respecto de la silvestre se deben a su diferente capacidad de *binding*, y sus potenciales redox permanecen constantes, entonces nuestro modelo teórico habría sido validado experimentalmente.

4.7. ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE UNIÓN MEDIANTE DIÁLISIS EN EQUILIBRIO

Con objeto de determinar experimentalmente si los cambios en la capacidad de activación de los mutantes de tiorredoxina m sobre la FBPasa se deben a diferencias en la capacidad de reconocimiento e interacción con la misma, como predice nuestro modelo teórico, se procedió a determinar los parámetros del equilibrio de unión entre las dos proteínas, abordando este dificultoso problema mediante el método de diálisis en equilibrio.

La diálisis en equilibrio resulta el método más adecuado para determinar la unión o *binding* entre la FBPasa y las distintas tiorredoxinas, ya que se hace aprovechamiento de la gran diferencia existente entre las masas moleculares de las proteínas interaccionantes (160 kDa para el tetrámero de FBPasa y tan sólo 12 kDa para las tiorredoxinas).

Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 28 °C, con una membrana de éster de celulosa de 25 kDa de punto de corte nominal, según se describe en el apartado 3.8.

4.7.1. Determinación del tiempo necesario para que se establezca el equilibrio

Los estudios preliminares que deben realizarse en cualquier estudio de diálisis en equilibrio, deben servir para comprobar si la membrana es adecuada (es decir, impide el paso de la proteína grande, pero permite el paso de la pequeña), y determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

Para ello se realizaron una serie de experimentos colocando inicialmente distintas concentraciones de Trx, desde 25 hasta 200 µg/ml, en el compartimento de la derecha, y únicamente buffer en el comportamiento de la izquierda (sin utilizar FBPasa). Se midió la concentración de Trx a ambos lados de la membrana a diferentes tiempos. El resultado se muestra en la figura 4.33.

Se observa cómo las concentraciones a ambos lados de la membrana se van igualando. Se puede considerar que se han igualado a partir de las 6 horas de experimento. Todos los experimentos posteriores se realizaron con un tiempo de incubación de 6 horas.

Paralelamente, se llevaron a cabo experimentos similares colocando FBPasa (100 µg/ml) en el compartimento de la izquierda y buffer en el de la derecha, midiendo la concentración final en ambos compartimentos. En todos los casos la concentración final en el compartimento de la derecha fue despreciable, pudiendo considerarse que la FBPasa no atraviesa la membrana de 25 kDa, por lo que ésta resulta adecuada para los experimentos.

Otros experimentos, llevados a cabo con una membrana de 100 kDa de punto de corte nominal, no mostraron diferencias significativas por lo que, presumiblemente, esta membrana sería tan adecuada como la de 25 kDa.

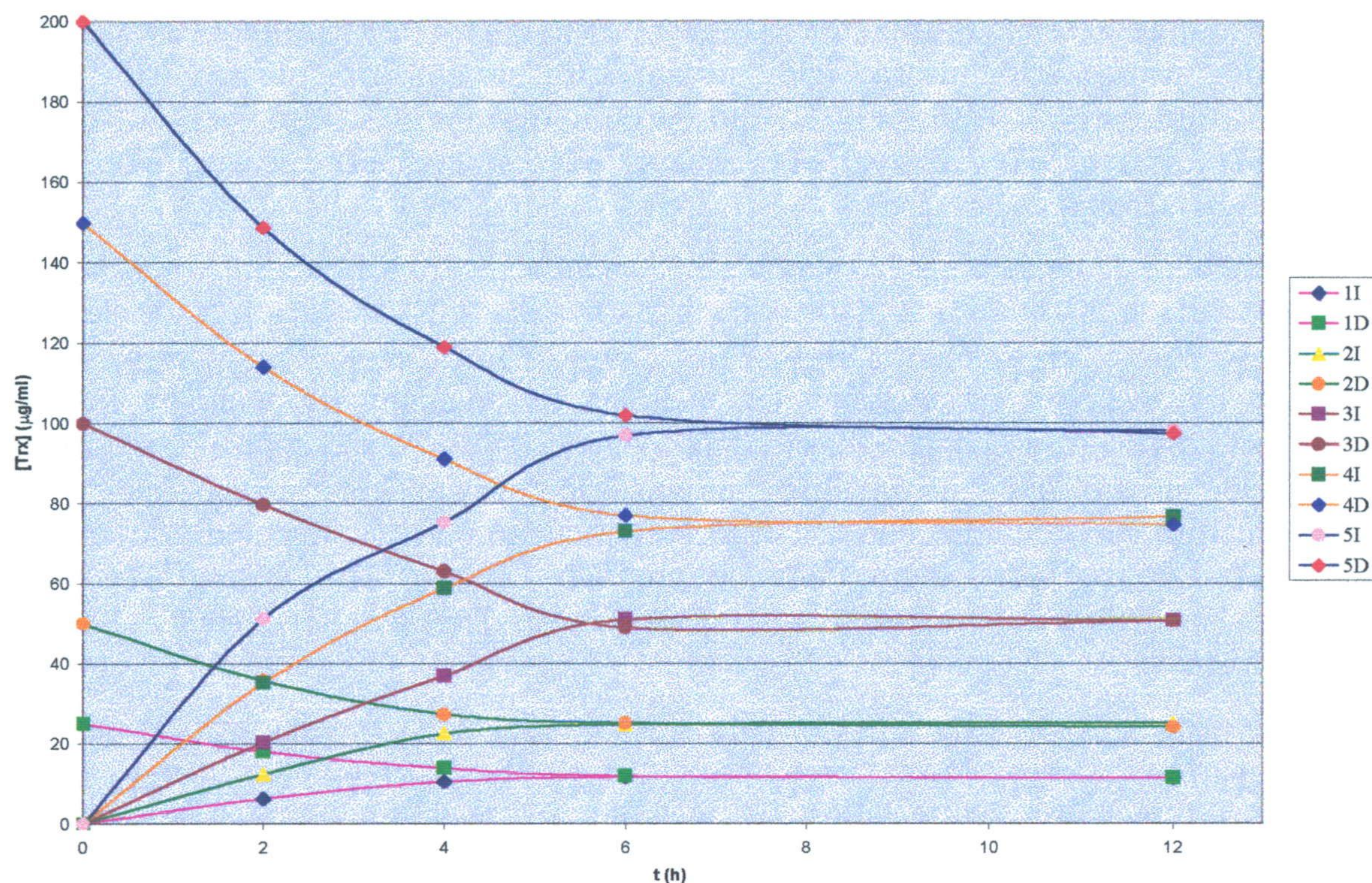


Fig. 4.33. Experimento para determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Se muestran las concentraciones en los dos compartimentos de cada célula, izquierdo (I) y derecho (D) para cinco concentraciones iniciales distintas.

4.7.2. Estudio y minimización del efecto Donnan

En los experimentos diseñados para determinar los parámetros de la interacción, que implicaban el uso de FBPasa y Trx simultáneamente, se utilizó inicialmente una concentración constante de FBPasa (100 µg/ml) en el compartimento de la izquierda, y concentraciones variables de Trx, en igual concentración inicial a ambos lados de la membrana, con objeto de partir de una situación de *quasi*-equilibrio. De este modo nos asegurábamos de que el equilibrio se había establecido al cabo de las seis horas que duraba el experimento. Cabe esperar que la unión FBPasa - Trx sea un proceso rápido, que se realiza en unas pocas fracciones de segundo. Así, el establecimiento del equilibrio de diálisis está limitado por la difusión de la Trx entre un lado y otro de la membrana. Por lo tanto, partiendo de concentraciones iniciales de Trx iguales a ambos lados, se facilita el establecimiento de este equilibrio.

Cuando se llevan a cabo experimentos con FBPasa y Trx, puesto que la FBPasa es una macromolécula altamente cargada (con una carga negativa predicha de -14 por monómero a pH 7.9 y una carga total por tetrámero de -56) que no puede atravesar la membrana y la Trx m es un soluto cargado también negativamente, se puede producir un equilibrio afectado por efecto Donnan (Van Holde, 1971). Este efecto consiste en que el compartimento de la izquierda, donde se encuentra la FBPasa, queda afectado con un exceso de carga negativa, lo que hace que las concentraciones de Trx libre no se igualen en el equilibrio, puesto que aparece una fuerza eléctrica de repulsión sobre la Trx que tiende a mantenerla en el compartimento de la derecha. Este efecto Donnan es difícil de cuantificar de forma teórica, por lo que conviene minimizarlo en los experimentos para no enmascarar los resultados del equilibrio de unión.

Para minimizar los resultados del efecto Donnan es necesario llevar a cabo los experimentos empleando un buffer con una fuerza iónica relativamente alta. Sin embargo, dado que la interacción FBPasa - Trx posee componentes electrostáticos, no conviene emplear una fuerza iónica excesivamente elevada, a riesgo de hacer que estas interacciones electrostáticas desaparezcan.

Con objeto de determinar la fuerza iónica adecuada para los experimentos, se realizó una experiencia empleando distintas concentraciones de NaCl en el buffer, desde 0 hasta 100 mM. Se utilizó una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de FBPasa en el compartimento de la izquierda, e iguales concentraciones iniciales de Trx en cada compartimento. Se usaron tres valores distintos para la concentración inicial de Trx: 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados pueden verse en la figura 4.34. Se muestran únicamente las concentraciones finales de Trx en el compartimento de la derecha. En el de la izquierda no se pueden medir directamente, puesto que este compartimento contiene también FBPasa. No obstante, se podrían determinar por diferencia respecto de la cantidad de Trx total (50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente).

Se observa que para buffers con bajas fuerzas iónicas la concentración final de Trx en el compartimento de la derecha es mayor que en el de la izquierda, debido al efecto Donnan de repulsión electrostática. El efecto es bastante acusado. Así, para una concentración inicial de 100 $\mu\text{g/ml}$ en cada compartimento, si no se emplea NaCl la concentración final a la derecha es de 122 $\mu\text{g/ml}$, mientras que a la izquierda sería tan sólo de 78 $\mu\text{g/ml}$, incluyendo ésta tanto la Trx libre como la unida a FBPasa. Si no se tuviera en cuenta la existencia del efecto Donnan, podría parecer que la FBPasa repele a la Trx, más que unirse a ella.

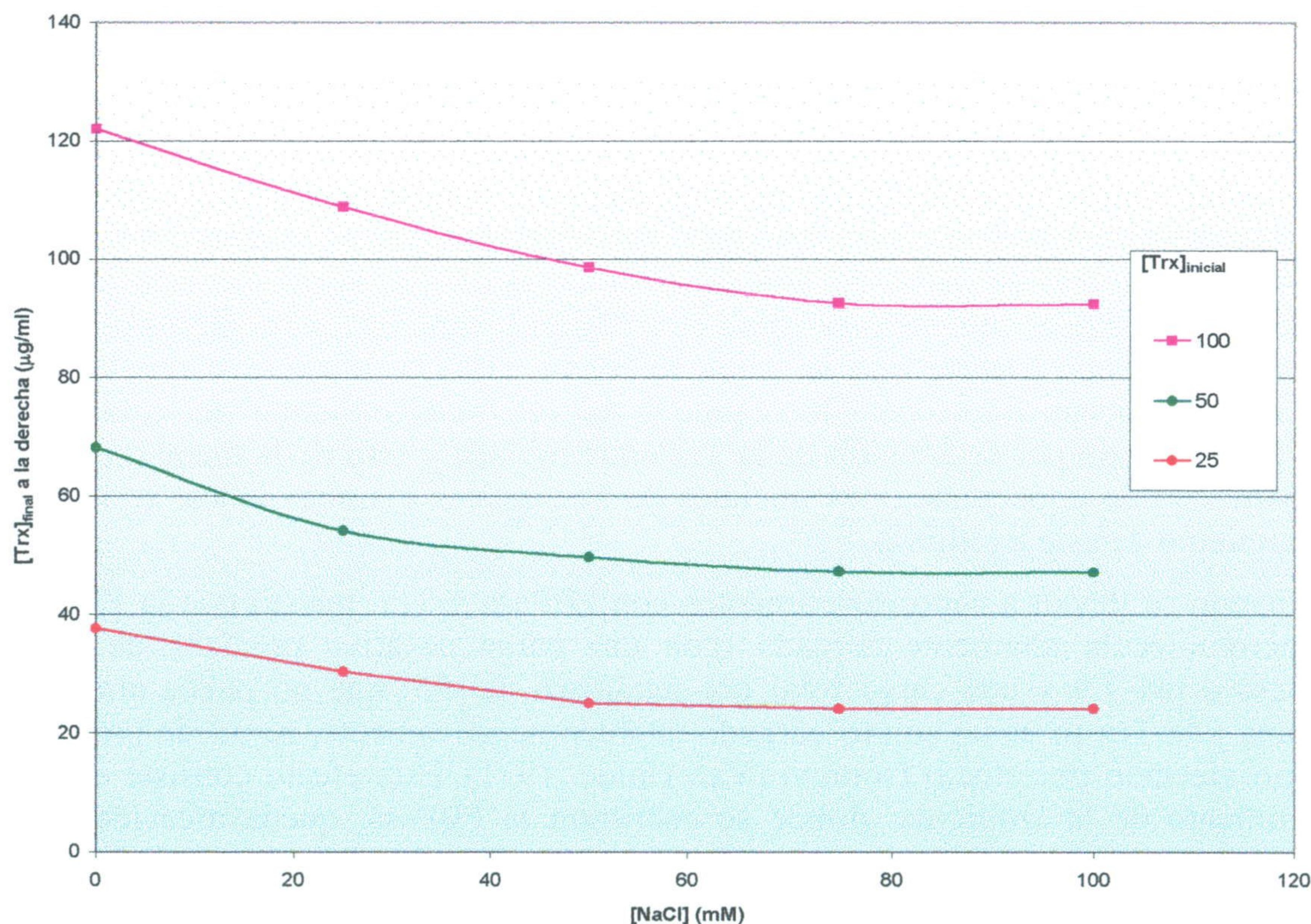


Fig. 4.34. Estudio de la minimización del efecto Donnan mediante la fuerza iónica del buffer.

Afortunadamente, se observa que para concentraciones de NaCl mayores de 75 mM, la concentración final de Trx a la derecha se mantiene estable, indicando que el efecto Donnan se ha minimizado. En estas condiciones se puede calcular la fracción de saturación para la interacción FBPasa - Trx. En todos los experimentos posteriores se utilizó un buffer 75 mM en NaCl. Cabe esperar que esta fuerza iónica no sea suficiente como para impedir la formación de los enlaces electrostáticos entre ambas proteínas, de acuerdo con los resultados de otros experimentos realizados en nuestro laboratorio (Ocón Garrido, 1999).

4.7.3. Obtención de las isothermas de unión para la Trx m silvestre y los mutantes

Para llevar a cabo las posteriores medidas de diálisis en equilibrio, conducentes a la determinación de la isoterma de unión para cada forma de Trx m, se realizaron experimentos empleando una concentración constante de 100 $\mu\text{g/ml}$ de FBPasa en el compartimento de la izquierda, y concentraciones variables de Trx, en igual concentración inicial, a ambos lados de la membrana.

Simultáneamente, y con objeto de poder determinar de forma precisa la concentración final de Trx, se llevaron a cabo experimentos empleando únicamente Trx a ambos lados de la membrana, pero no FBPasa, que permitieran establecer una recta de calibrado interno. Las concentraciones finales se determinaron midiendo la absorbancia de la disolución final a 280 nm. La representación de la absorbancia frente a la concentración (recta de calibrado) fue lineal en el intervalo de Trx utilizado en todos los casos (figura 4.35).

Las concentraciones iniciales de Trx empleadas variaron desde 12.5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 400 $\mu\text{g/ml}$, equivalentes a un intervalo de concentraciones entre 1 y 33 μM .

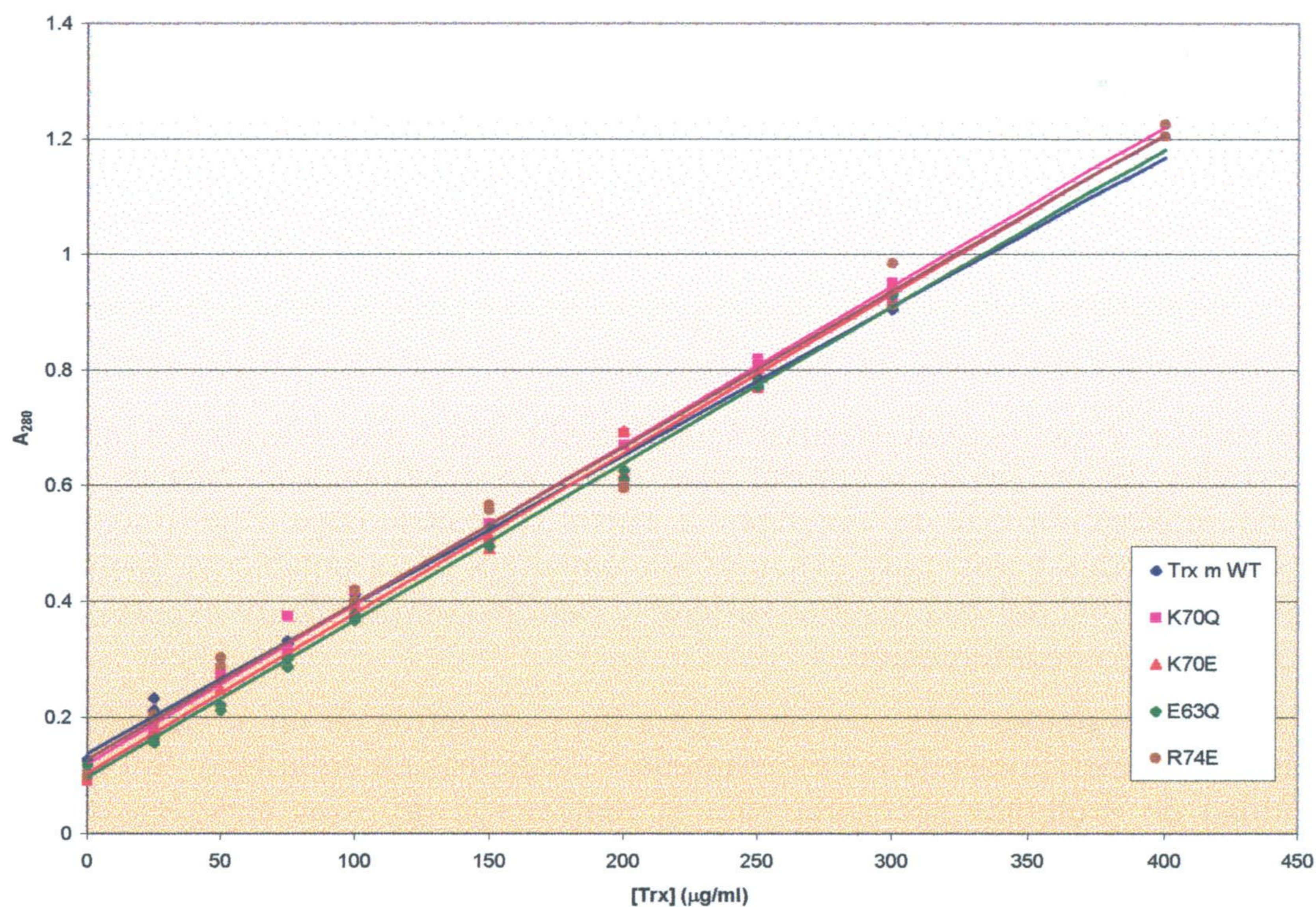


Fig. 4.35. Rectas de calibrado interno para la absorbancia a 280 nm en función de la concentración de Trx. La Trx m silvestre y todos los mutantes presentan el mismo comportamiento.

Para cada condición experimental se determinó la concentración final de Trx libre en el compartimento de la derecha, C_F . A partir de ella, y según las ecuaciones estudiadas en la sección 3.8.1, se calculó la concentración de Trx unida a FBPasa, C_B y la fracción de saturación, θ .

Los resultados para el caso de la Trx m silvestre y los cuatro mutantes se muestran en la figura 4.36, donde se representan las fracciones de saturación, θ , frente a las concentraciones de Trx libre, C_F ; es decir, las isotermas de unión a 28 °C para estas interacciones.

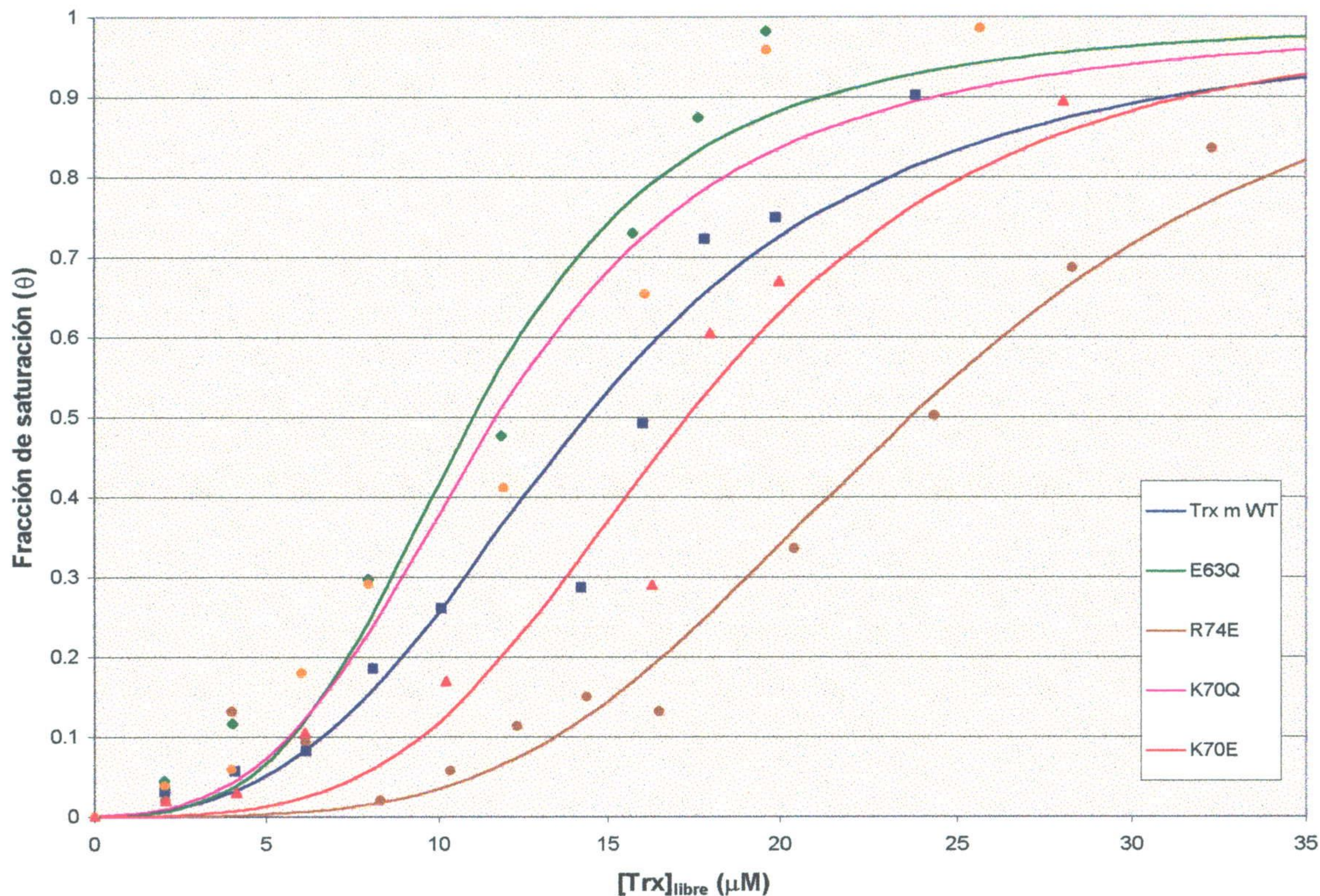


Fig. 4.36. Isotermas de unión para las interacciones FBPasa - Trx m silvestre y mutantes.

El gran error experimental inherente al método hace que los puntos aparezcan bastante desviados de las líneas de ajuste. Así pues, los resultados numéricos para los parámetros de interacción que se obtengan a partir de estos datos experimentales no pueden ser considerados como muy exactos. Sin embargo, sí es posible la comparación entre los mismos, lo cuál debería resultar suficiente para la comprobación experimental de nuestro modelo teórico de interacción.

Para obtener resultados más confiables para los parámetros de unión sería necesario realizar numerosas repeticiones de los experimentos de diálisis en equilibrio. Sin embargo, la gran cantidad de proteínas necesaria para la realización de estos experimentos, y la necesidad de purificarlas hasta completa homogeneidad, hace que la realización de un gran número de repeticiones de estos ensayos resulte prohibitiva.

4.7.4. Análisis numérico de los resultados

Los datos obtenidos para las isotermas de unión, se ajustaron a un modelo de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) con constantes de unión, k , idénticas para cada subunidad, y dos parámetros distintos de interacción entre subunidades, σ_A y σ_B , uno para cada pareja de subunidades, como se estudió en la sección 3.8.2 (figura 4.37).

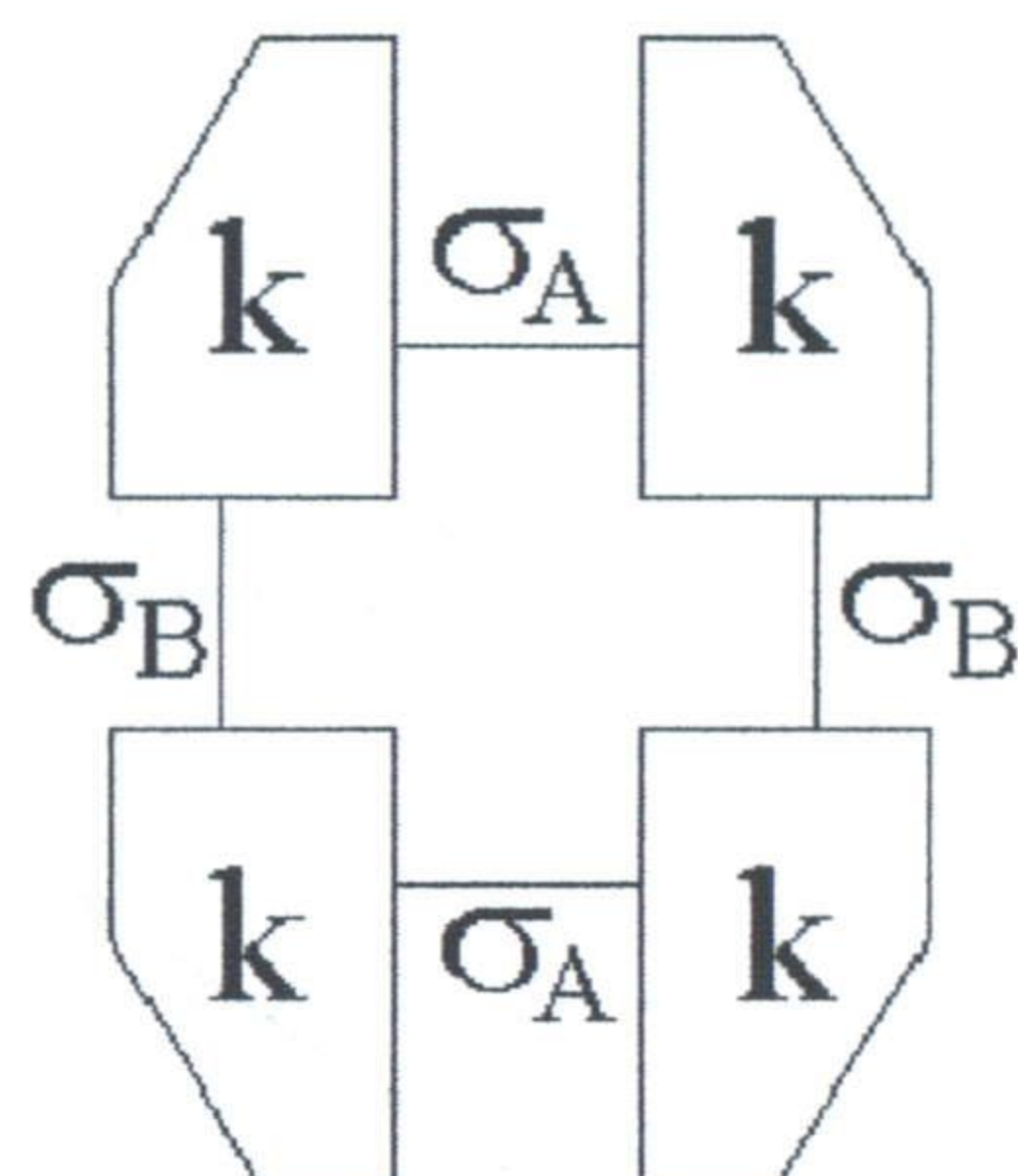


Figura 4.37. Modelo estructural KNF empleado para el ajuste de los datos de las isotermas de unión para la interacción FBPasa - Trx.

El ajuste se llevó a cabo mediante el algoritmo de mínimos cuadrados no lineales de Marquardt con el paquete estadístico Statgraphics. Los resultados para los parámetros de la interacción se resumen en la siguiente tabla.

Parámetros experimentales para el modelo de interacción KNF de la FBPasa con la Trx m silvestre y los mutantes.

Proteína	k (μM^{-1})	σ_A	σ_B
E63Q	75	6,6	100000
K70Q	65	3,7	160000
Trx m WT	53	2,9	200000
K70E	47	14	49000
R74E	28	53	8700

Se comprueba que los valores para las constantes de unión, k , se correlacionan con las capacidades de activación sobre la FBPasa. Los dos mutantes que más capacidad de activación poseen, E63Q y K70Q, también poseen las mayores constantes de unión, mientras que los dos mutantes que poseen menor capacidad de activación que la Trx m silvestre también poseen constantes de unión menores. El orden en que aparecen las constantes de unión es el mismo que para las capacidades de activación.

Este resultado es una confirmación experimental indiscutible para el modelo de interacción propuesto. Según esto, las diferencias en las capacidades de activación de los distintos mutantes residen en sus distintas constantes de unión.

Con objeto de estudiar si las variaciones en las constantes de unión explican perfectamente las diferencias en las capacidades de activación, se representaron estas últimas frente a la constante de unión calculada para cada mutante. El resultado se observa en la figura 4.38.

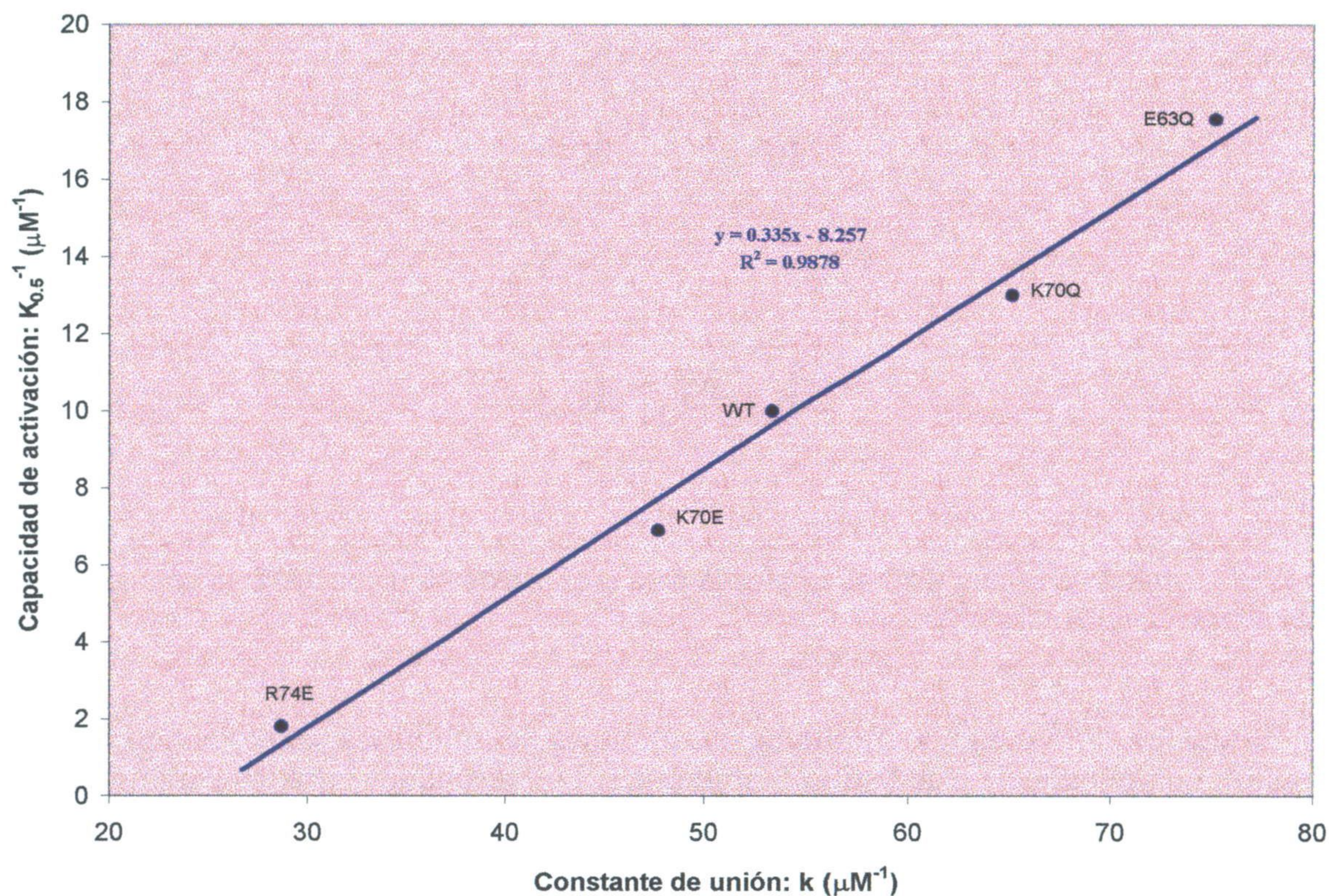


Fig. 4.38. Correlación entre las constantes de unión y las capacidades de activación de los diferentes mutantes de Trx m.

Se observa que existe una correlación perfecta entre las capacidades de activación de los diferentes mutantes y sus constantes de unión, calculadas mediante el modelo KNF. El valor de R^2 para la correlación es de 0.98, lo que indica que, al fin y al cabo, la capacidad de activación es un excelente predictor para la constante de unión.

Conviene insistir en este punto en la complejidad de la interacción entre las cuatro subunidades de esta enzima tetramérica, que se manifiesta no sólo en la regulación de la FBPasa por su modulador Trx, sino también en la cinética frente al sustrato, fructosa-1,6-bisfosfato. Efectivamente, según Giudici-Orticoni *et al.* (1990) esta cinética no puede explicarse de acuerdo con la ecuación de Adair, ni con modelos de tipo MWC o KNF, sino más bien a través de un mecanismo de transferencia de información entre cada subunidad y las tres restantes.

Respecto a los valores para los parámetros de interacción entre subunidades, σ_A y σ_B , hay que decir que sus valores son bastante diferentes de un mutante a otro, lo que parece bastante contradictorio, ya que cabría esperar que dependieran principalmente de la estructura de la FBPasa y de los posibles enlaces que se pudieran formar o romper entre las subunidades de la misma al ir uniéndose las moléculas de Trx. Sin embargo, estos

parámetros son mucho más sensibles que la constante k a los errores experimentales, que son bastante elevados con el método utilizado, por lo que sus valores no son muy confiables.

No obstante, una cosa sí se puede decir con seguridad, y es que uno de los dos parámetros de interacción es mucho mayor que el otro. Esto ocurre en todas las formas mutantes e indica que las interacciones entre los dos pares de subunidades de la FBPasa son de muy distinta intensidad.

Esto concuerda plenamente con los resultados experimentales de Lázaro *et al.* (1975), que demostraban que el tetrámero de FBPasa se escinde fácilmente a altos pHs en un par de dímeros, en los cuáles los dos monómeros están muy fuertemente enlazados, de forma que es muy difícil que sufran una posterior separación. Esto prueba que existe una interacción bastante fuerte entre cada pareja de estas subunidades, mientras que la interacción existente entre los dos pares de dímeros es bastante más débil.

El significado físico de los parámetros de interacción, σ , es el siguiente. Si los monómeros estuvieran separados, cada uno tendría una constante de unión, k , cuyos valores serían exactamente iguales. Al estar formado el tetrámero, la unión de una molécula de Trx a un monómero hace que se modifiquen las constantes de unión de los monómeros adyacentes, según el factor σ correspondiente. Según nuestros datos, se puede decir que una de las subunidades adyacentes prácticamente no se ve afectada por la entrada de la molécula de Trx (presuntamente la que forma el dímero estable con ella), mientras que la otra (posiblemente la perteneciente al otro dímero) cambia en gran medida el valor de su constante de unión, favoreciéndose la entrada de la siguiente molécula de Trx (dado que los valores de σ son mayores que 1).

Se ha comprobado que la unión de Trx a FBPasa protege a esta última frente a la separación en dímeros que ocurre a altos pHs y que la formación del complejo FBPasa - Trx constituye, no sólo un paso previo a la modulación reductiva de la enzima, sino también un mecanismo adicional de regulación fina de la actividad enzimática (Häberlein y Vogeler, 1995; Hermoso *et al.*, 1997). Esto se explica por el gran valor de σ_B , que prueba que la entrada de una Trx afecta en gran medida a la interacción con la otra subunidad, presuntamente reforzando las fuerzas de atracción y estabilizando así la forma tetramérica de la FBPasa.

4.8. MEDIDAS DE LOS POTENCIALES DE REDUCCIÓN DE LA TIORREDOXINA m SILVESTRE Y DE LOS MUTANTES

Con objeto de completar la caracterización bioquímica de los cuatro mutantes de Trx m, y para comprobar que las mutaciones realizadas no afectan al potencial redox de las proteínas estudiadas, se realizaron medidas de potencial redox de todas las formas de Trx m, experimentos que fueron realizados en el laboratorio del Dr. David B. Knaff (Texas Tech University).

Las medidas fueron realizadas mediante titulaciones con monobromobimano (mBBr), tal como se describe en la sección 3.9. Este método fue aplicado por primera vez a las proteínas fotosintéticas por Hutchison y Ort (1995), quienes utilizaban una etapa de extracción con diclorometano para separar las proteínas del DTT sin reaccionar. Posteriormente, fue mejorado por Hirasawa *et al.* (1999), sustituyendo la extracción por una precipitación con ácido tricloroacético (TCA), mucho más cuantitativa.

En todas las medidas se emplearon 150 μg de Trx por muestra, realizándose alrededor de 18 medidas a diferentes valores de E_h para cada titulación, a una temperatura constante de 25 °C. Además, se realizaron medidas para cada forma de Trx m en el intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 8.5.

4.8.1. Determinación de la concentración de DTT óptima

En primer lugar, se realizaron ensayos para determinar la concentración total óptima de DTT a emplear en las subsiguientes medidas. La combinación de las formas oxidada y reducida de DTT actúa en estos experimentos como buffer de oxidación-reducción, manteniendo el potencial redox del medio, E_h , a un valor constante.

Si se emplea una concentración demasiado baja, el equilibrio tardará más tiempo en alcanzarse y es posible que nunca llegue a hacerlo (para que se alcance es necesario que la concentración de DTT empleada sea mucho mayor que la de proteína, con objeto de que permanezca prácticamente constante).

Por el contrario, si la concentración total de DTT empleada es demasiado grande, éste podrá reaccionar con el mBBr (por supuesto, el DTT reducido posee grupos tiol libres), eliminándolo del medio y haciendo que no esté disponible para unirse a la proteína. Esto provocará una disminución en la fluorescencia medida cuando el potencial del ambiente sea muy reductor (para valores muy negativos de E_h).

Para estudiar el efecto de la concentración total de DTT sobre la fluorescencia medida, se llevaron a cabo experimentos con la Trx m silvestre a pH 7.0, con tres valores distintos para el potencial del ambiente (-280, -300 y -330 mV), usando concentraciones totales de DTT comprendidas entre 1 y 20 mM. Los resultados se muestran en la figura 4.39.

Se utilizó en estos experimentos un tiempo de incubación de 2 horas, para asegurarnos que se alcanza el equilibrio. Las tiorredoxinas son moléculas que intercambian electrones con mucha facilidad y rapidez (Hirasawa *et al.*, 1999), por lo que un tiempo de 2 horas es suficiente para la mayoría de las Trxs que se han medido, frente a otras enzimas redox, como la FBPasa o la fosforribuloquinasa, que necesitan tiempos de incubación mayores. Incluso el potencial de reducción de la NADP-malato-deshidrogenasa no ha

podido ser medido empleando este método, porque los tiempos de incubación necesarios para alcanzar el equilibrio son mayores de 24 horas y, en ese intervalo, la proteína se desnatura. La velocidad de intercambio de electrones es tan rápida en las tiorredoxinas, que se emplean en pequeñas cantidades como catalizadores redox para disminuir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio durante la medida de potenciales redox de otras enzimas fotosintéticas (Hirasawa *et al.*, 1999).

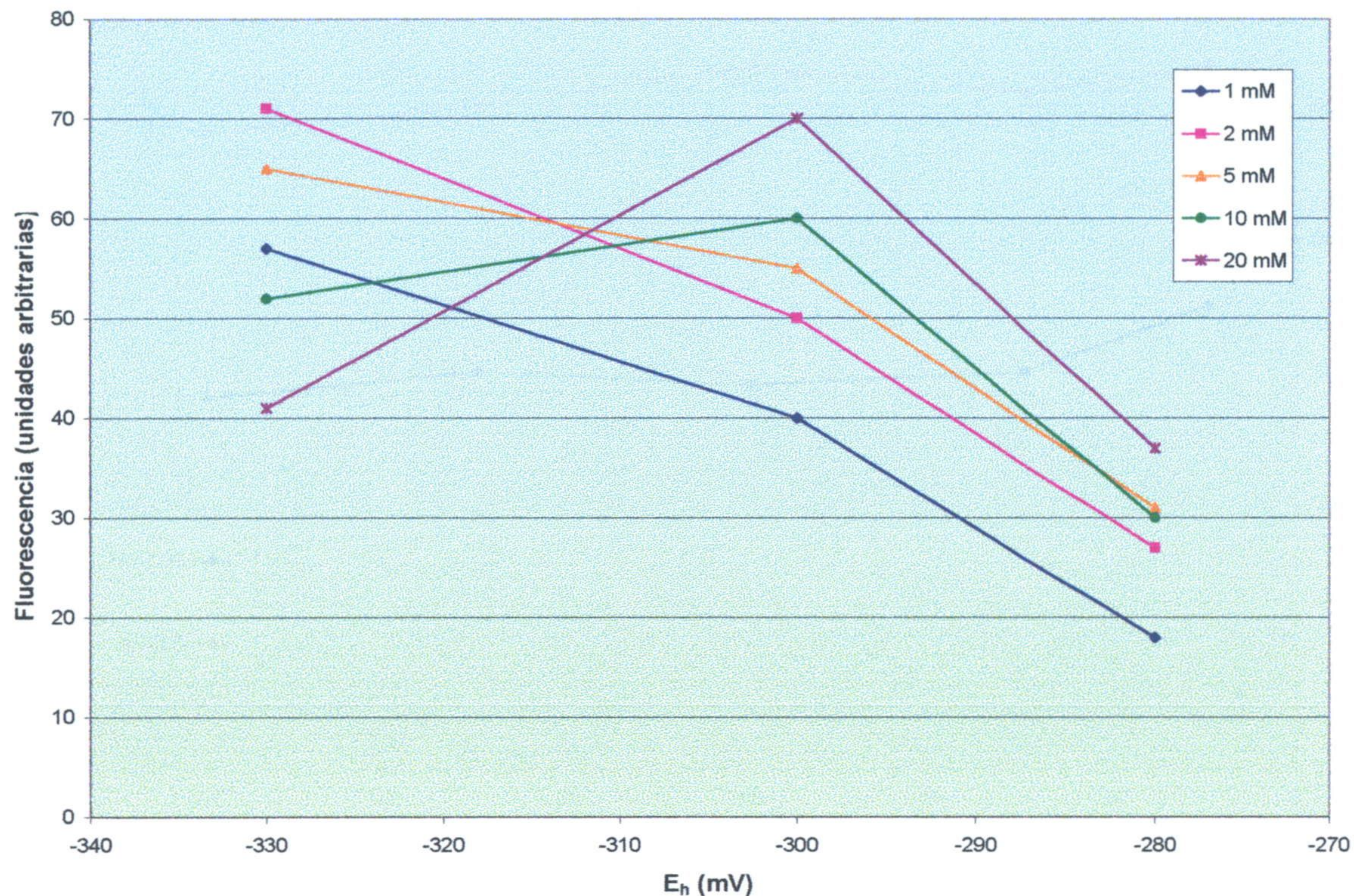


Figura 4.39. Efecto de la concentración de DTT sobre la fluorescencia medida para tres valores diferentes del potencial redox del ambiente. La concentración total óptima de DTT es 2mM.

Se observa una disminución de la fluorescencia para valores reductores de E_h a concentraciones de DTT de 5 mM o mayores, lo que se debe a la reacción del mBBR con el DTT reducido, comentada anteriormente. El valor óptimo para la concentración total de DTT es de 2 mM, que coincide con el empleado para las Trxs cloroplastídicas de espinaca (Hirasawa *et al.*, 1999). Así pues, en las siguientes medidas, se empleó siempre una concentración de DTT de 2 mM.

4.8.2. Determinación del tiempo de incubación óptimo

A continuación se realizaron experimentos con vistas a la determinación del tiempo de incubación óptimo. Como se ha explicado antes, un tiempo demasiado corto provocará que no se haya conseguido alcanzar el equilibrio redox, por lo que las medidas de fluorescencia no serán correctas. Por el contrario, un tiempo de incubación demasiado largo, además de provocar un aumento en el tiempo de realización del experimento, podría provocar la desnaturalización de las proteínas, ya que se lleva a cabo la medida a una temperatura de 25 °C.

Se emplearon tiempos de incubación comprendidos entre 10 minutos y 2 horas, realizándose medidas de la fluorescencia para la Trx m silvestre a dos valores distintos de E_h (-300 y -330 mV), y con una concentración total de DTT de 2 mM.

Los resultados pueden observarse en la figura 4.40.

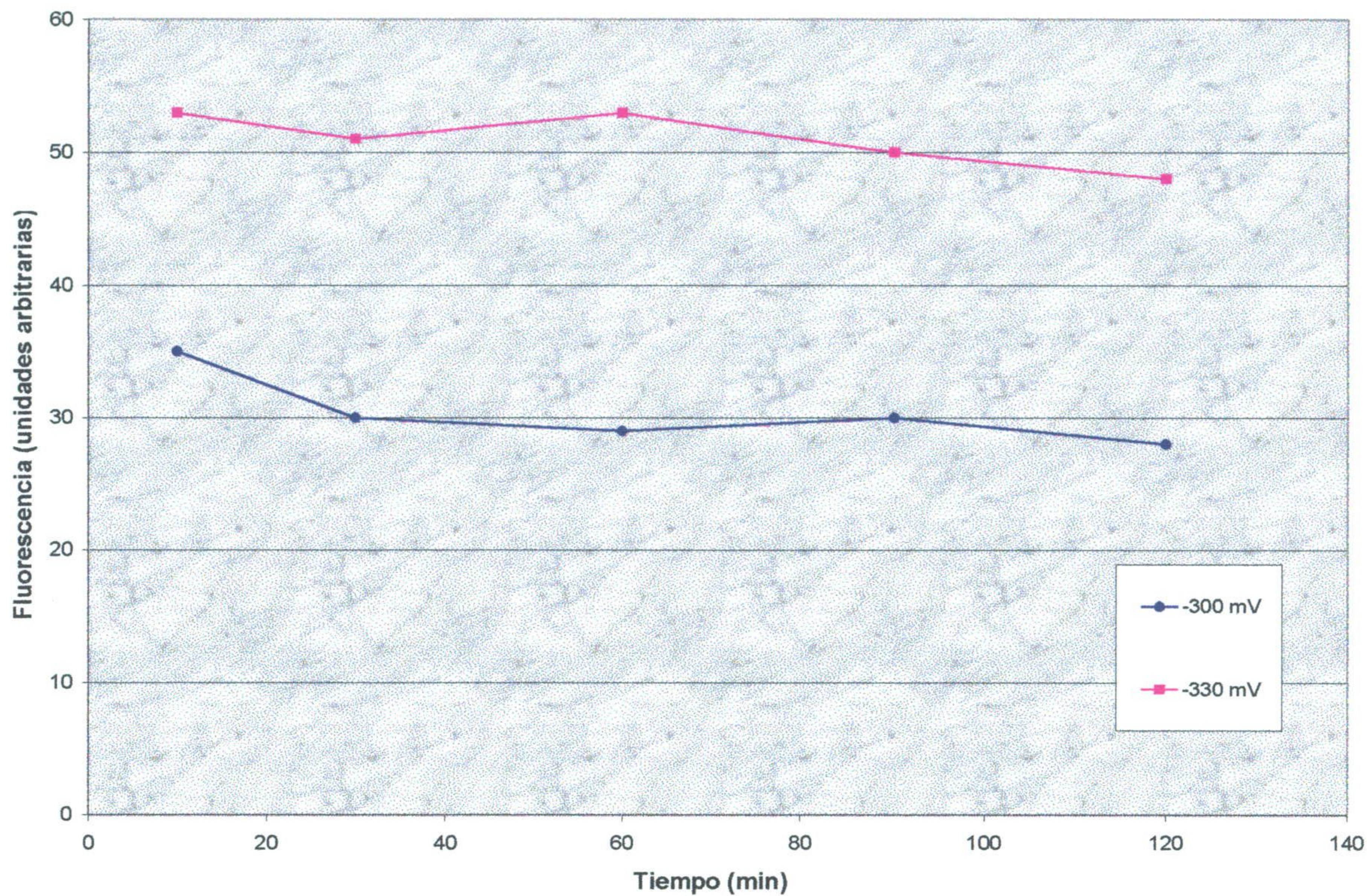


Fig. 4.40. Determinación del tiempo de incubación óptimo.

Se comprueba que la fluorescencia se mantiene bastante constante con el tiempo, tal como cabe esperar de una proteína bastante termorresistente como es la Trx m. Sólo se observa una pequeña disminución para tiempos mayores de 90 minutos, no muy acusada. Se consideró que la fluorescencia se mantiene estable a partir de los 30 minutos de incubación, por lo que éste es el valor que se eligió para todos los ensayos posteriores.

4.8.3. Determinación de los potenciales en el punto medio (E_m) de la Trx m y de los mutantes, a diferentes valores de pH.

A continuación se realizaron las titulaciones de todas las proteínas estudiadas, utilizándose un tiempo de incubación de 30 minutos, una concentración total de DTT 2 mM y valores para el potencial del ambiente comprendidos entre -240 y -370 mV.

Las figuras 4.41 a 4.45 muestran los resultados de las titulaciones para las distintas Trxs y para los diferentes valores del pH estudiados.

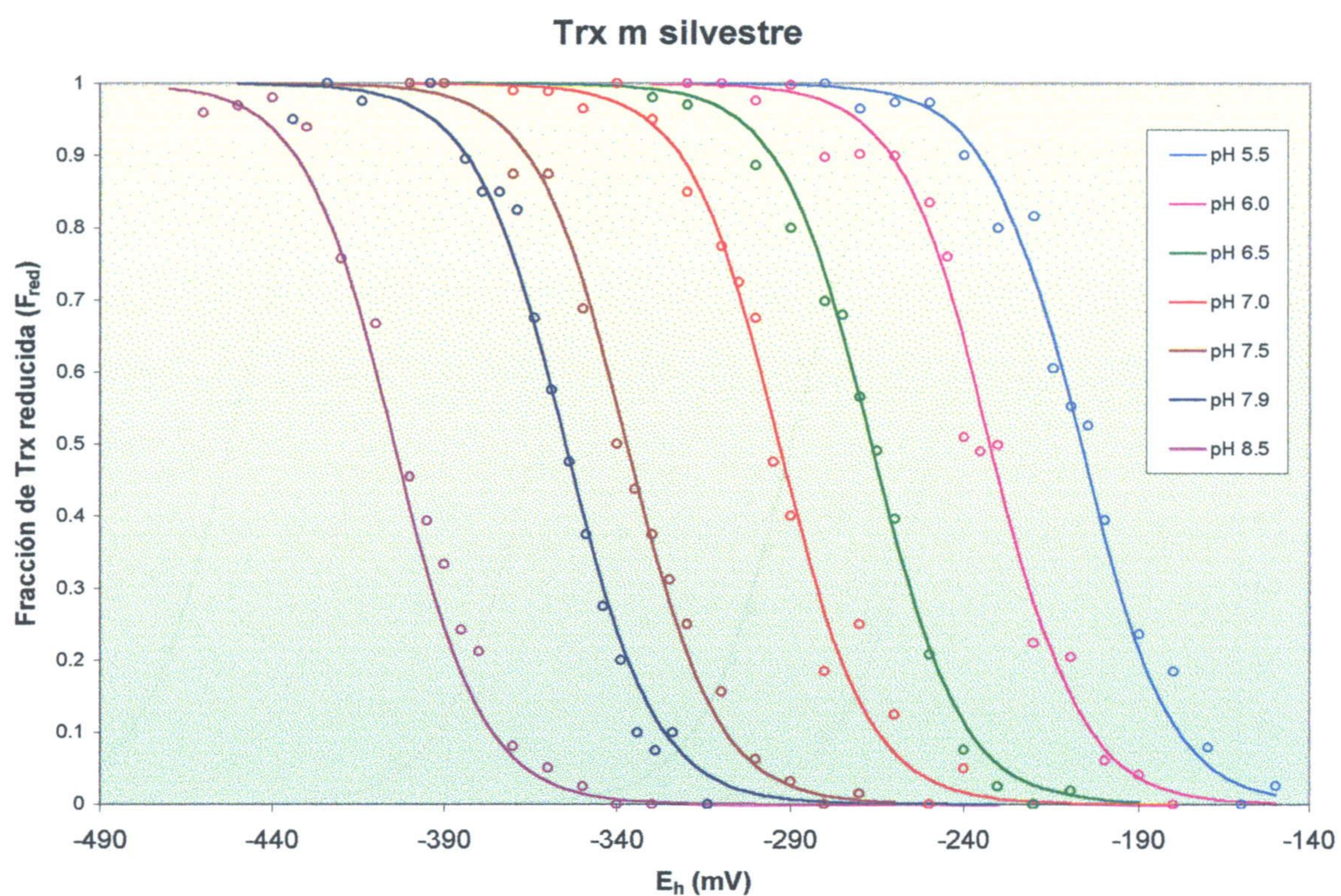


Fig. 4.41. Titulaciones redox para la Trx m silvestre.

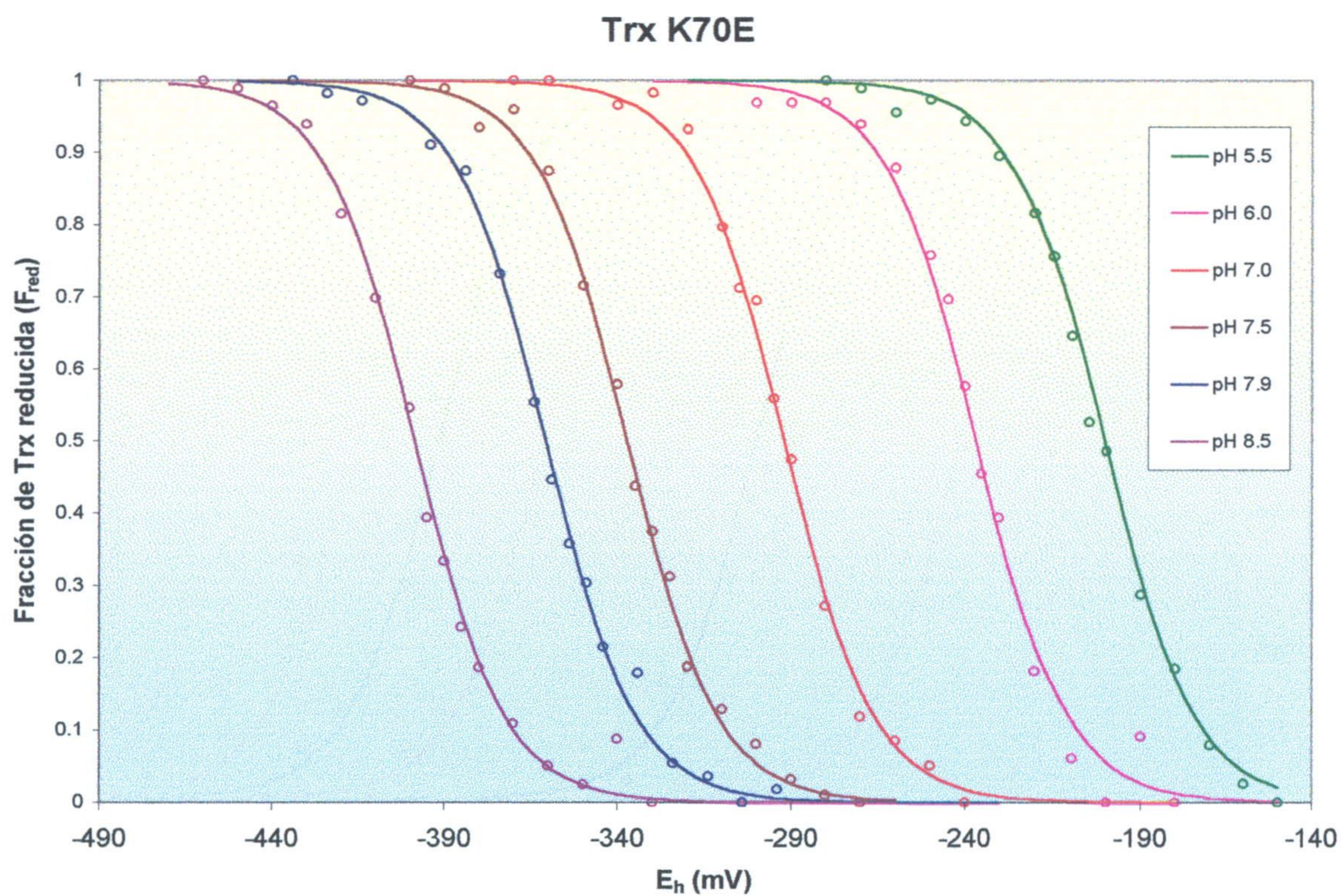


Fig. 4.42. Titulaciones redox para el mutante de Trx m K70E.

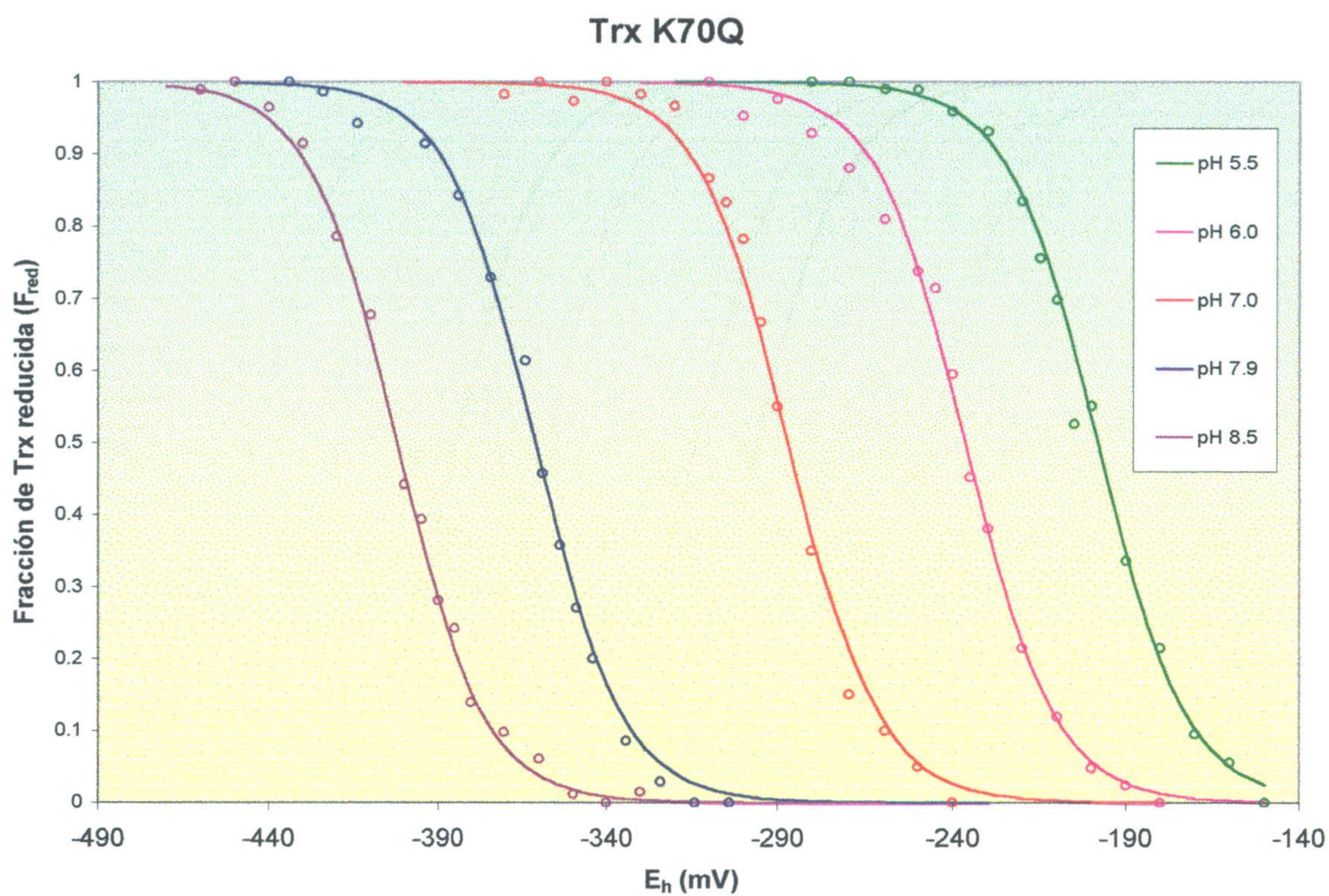


Fig. 4.43. Titulaciones redox para el mutante de Trx m K70Q.

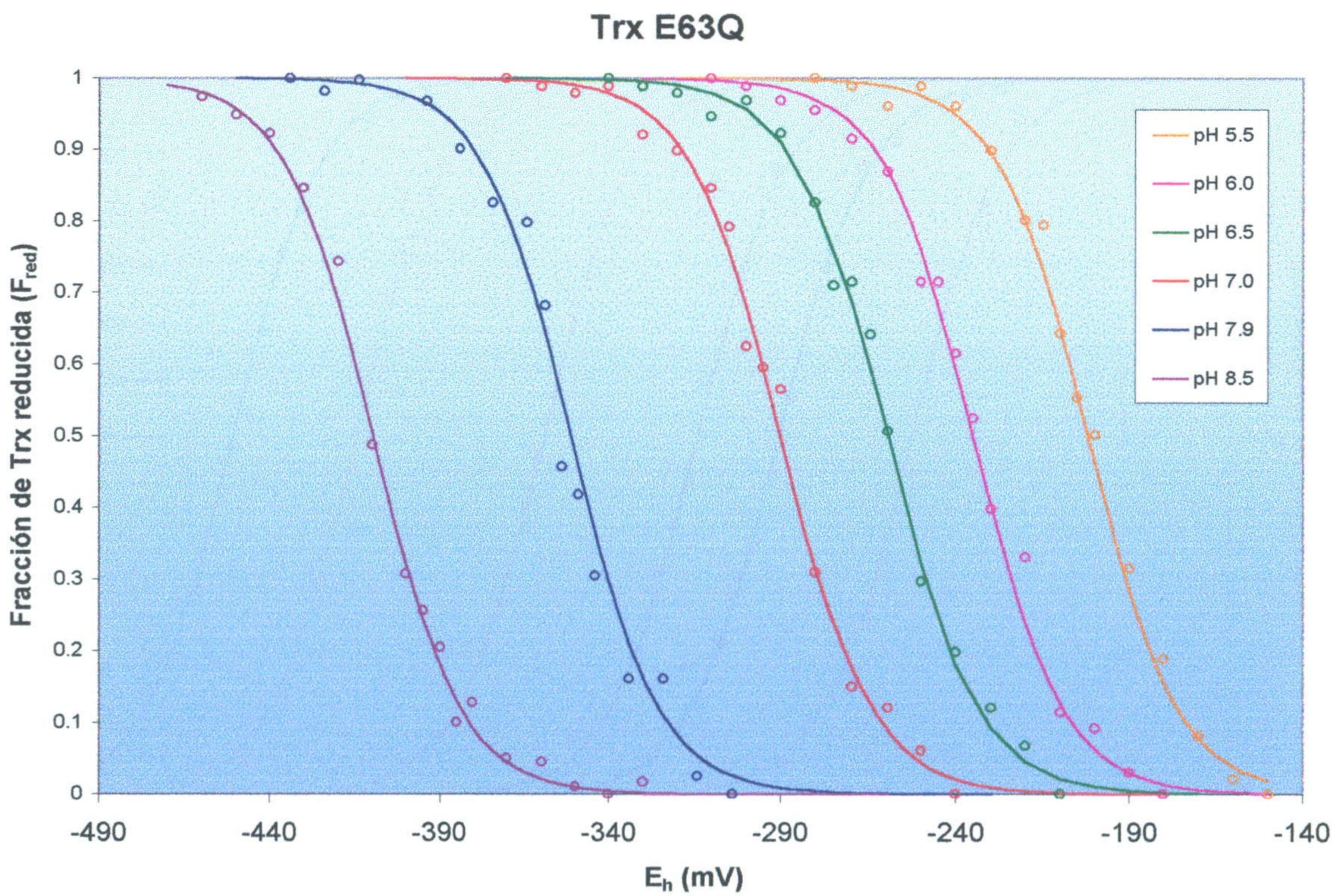


Fig. 4.44. Titulaciones redox para el mutante de Trx m E63Q

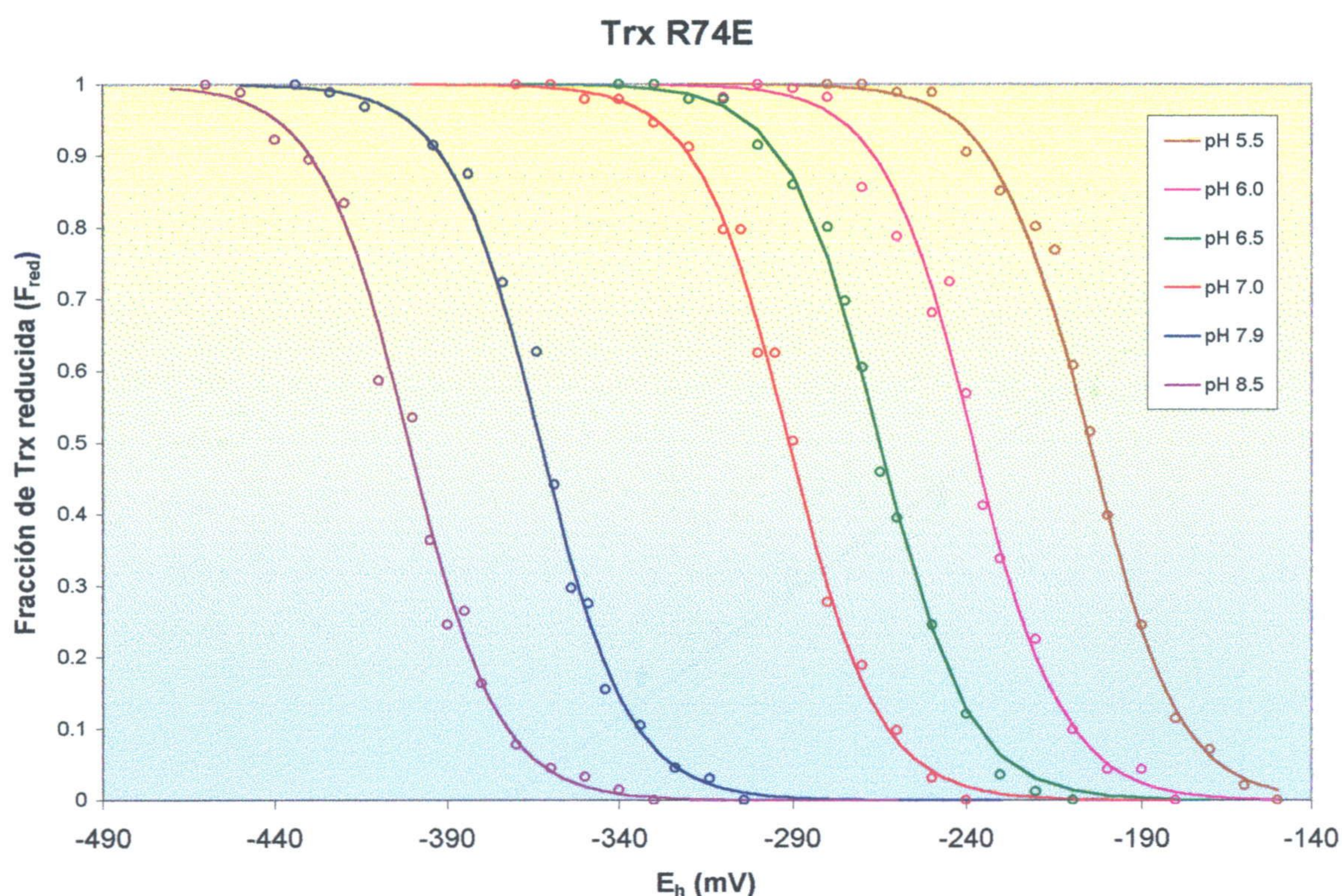


Fig. 4.45. Titulaciones redox para el mutante de Trx m R74E.

Como cabe esperar, se observa que todas las titulaciones se ajustan perfectamente a una ecuación de Nernst con un sólo potencial redox, con intercambio de dos electrones, como corresponde a un único puente disulfuro.

Los valores experimentales obtenidos para el potencial de reducción en el punto medio, E_m , a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Nernst mediante el algoritmo de Marquardt, se resumen en la siguiente tabla (E_m en mV):

Potenciales de reducción en el punto medio, E_m (mV), para la Trx m silvestre y los mutantes					
pH	Trx m WT	K70Q	K70E	E63Q	R74E
5.5	-207	-198	-200	-202	-205
6.0	-232	-236	-237	-235	-238
6.5	-267	no det.	no det.	-260	-265
7	-293	-287	-292	-292	-291
7.5	-337	no det.	no det.	no det.	no det.
7.9	-355	-361	-361	-351	-363
8.5	-404	-402	-399	-410	-401

A partir de estos datos, se puede realizar la representación de E_m frente al pH, con objeto de comprobar si los resultados son coherentes y de comparar los potenciales de las distintas formas de Trx m. El resultado se puede observar en la figura 4.46. Todos los puntos se han ajustado a una única línea recta, puesto que no existen diferencias significativas entre ellos.

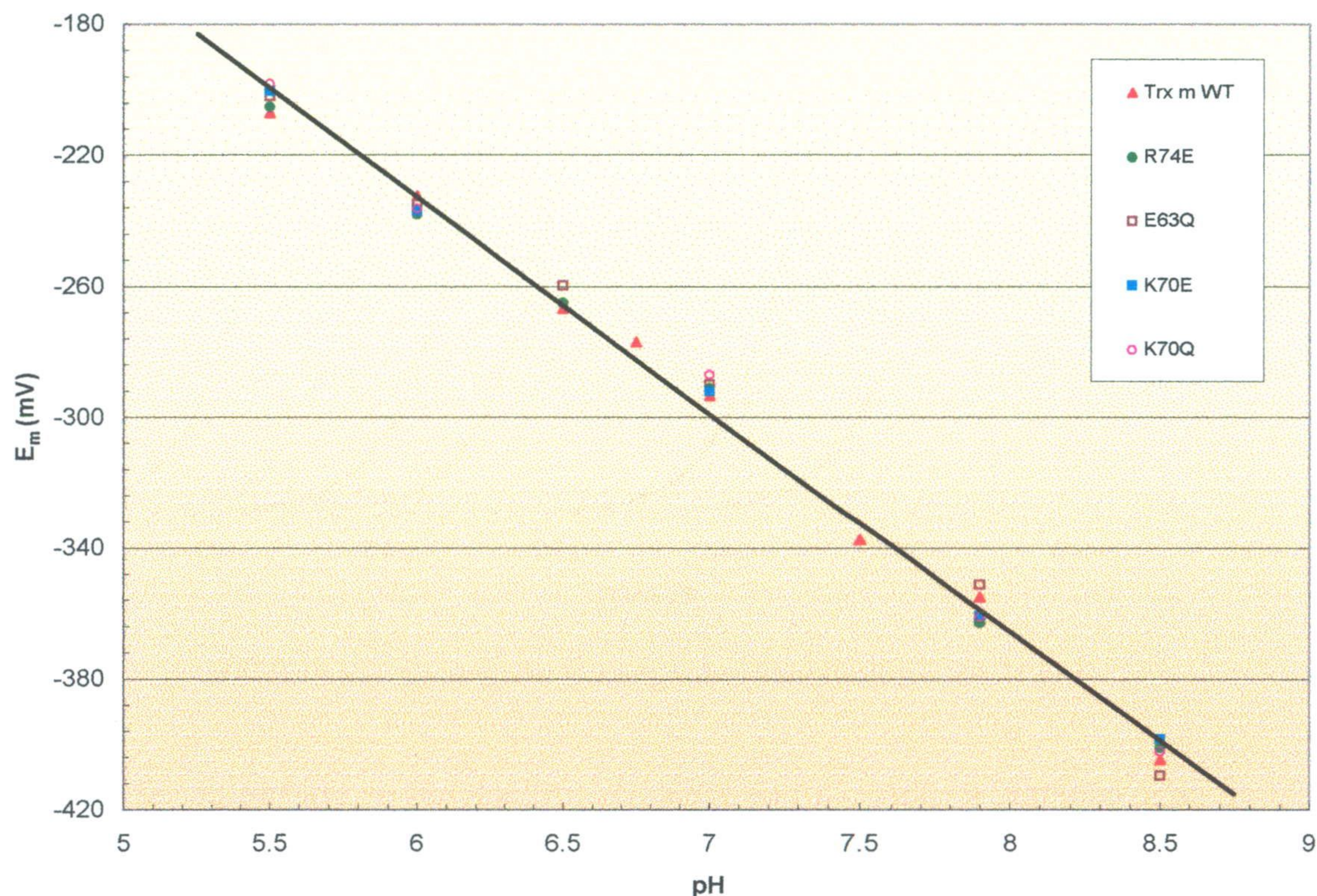


Fig. 4.46. Variación de los potenciales en el punto medio, E_m , con el pH. Se han ajustado todos los puntos, tanto los de la Trx m silvestre como los de los cuatro mutantes, a una sola recta.

La pendiente experimental de la recta obtenida por ajuste lineal de todos los potenciales en el punto medio es de -63.1 mV, próxima al valor teórico de -60 mV. El coeficiente de regresión, R^2 , es de 0.994.

La principal conclusión que se obtiene es que no existe ninguna diferencia significativa entre los potenciales de reducción de los distintos mutantes. Esto termina de corroborar nuestro modelo de interacción.

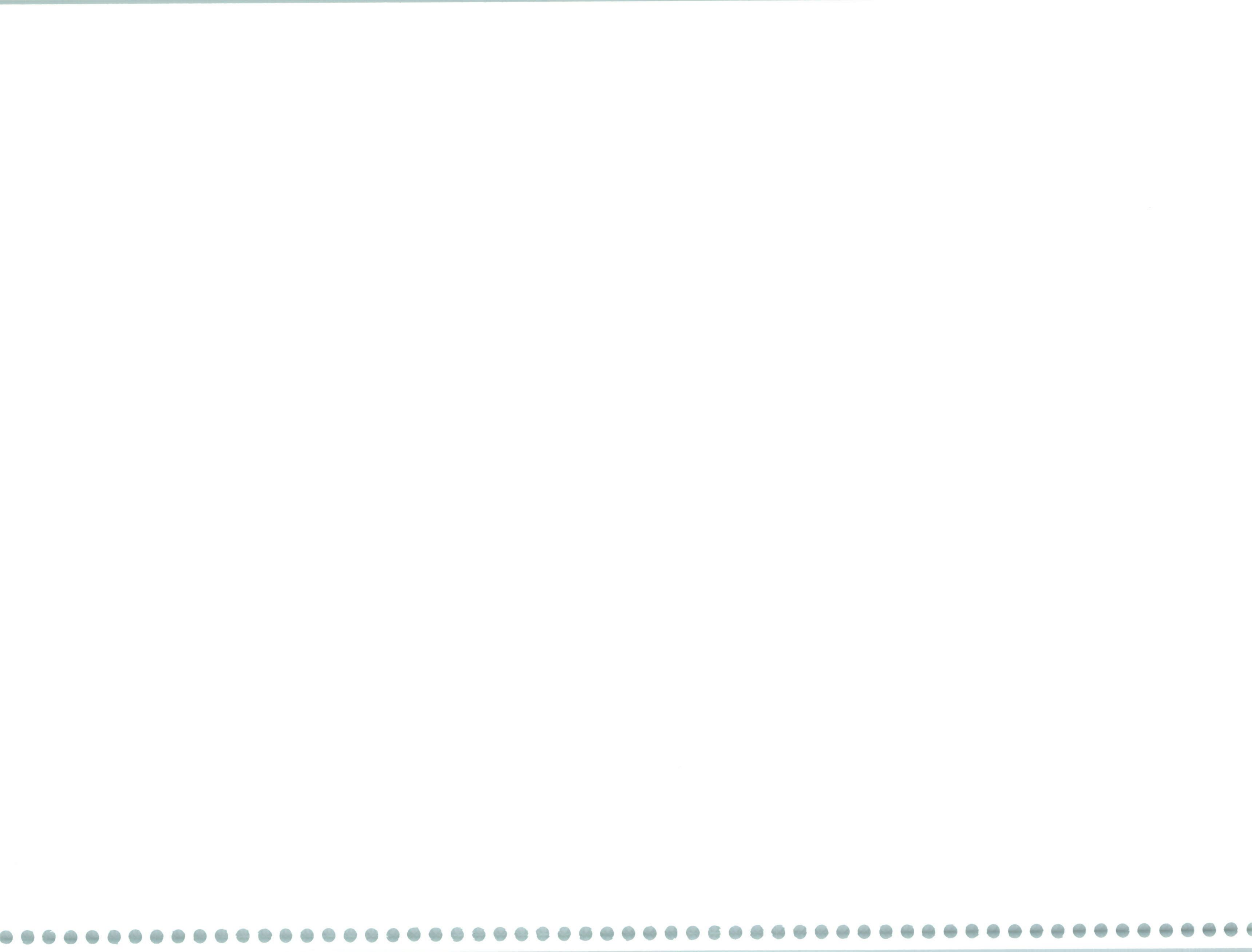
Así, se ha comprobado que las mutaciones, como cabía esperar a la vista del modelo teórico, producen diferencias en la capacidad de activación de la FBPasa respecto a la forma silvestre de la Trx m, y que estas diferencias no se deben a cambios en los potenciales de reducción de las Trxs mutantes, que permanecen constantes, sino a cambios en la capacidad de reconocimiento y en la constante de unión para la interacción entre las dos moléculas.

Por otra parte, el valor del potencial de reducción en el punto medio a pH 7.0 está en torno a -300 mV, coincidiendo con el determinado por Hirasawa *et al.* (1999) para las Trx m de espinaca y *Chlamydomonas reinhardtii*. Usando voltametría cíclica, Salamon *et al.* (1995) determinaron para las Trxs f y m de espinaca un valor bastante distinto de -210 mV, aunque el método que emplearon, que implicaba el uso de un electrodo recubierto por una membrana formada por una bicapa de fosfolípidos, adolece de grandes errores experimentales. Rebeille y Hatch (1986) hallaron para la Trx m de maíz un valor de -300 mV, determinando los niveles de las formas oxidada y reducida de Trx m por titulación con N-etil-maleimida, según el método de Scheibe (1981). Holmgren (1968) dio para la Trx de *E. coli* un potencial redox en el punto medio de -260 mV, aunque la determinación se basaba en un equilibrio con el par $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$, al que asignaba un valor de -305 mV, mayor que el valor aceptado en la actualidad de -320 mV.

Sorprende que, a pesar de las diferencias en las secuencias, todas las Trx m de diferentes orígenes cuyos potenciales de reducción han sido determinados coincidan aproximadamente en el valor del mismo.

Para la Trx f de espinaca, Hirasawa *et al.* (1999) determinaron un valor de -290 mV, ligeramente menos reductor. Según esto, la Trx m tendría mayor capacidad reductora que la Trx f. Puesto que la Trx f es capaz de activar a la FBPasa mucho más eficazmente que la Trx m (López Jaramillo, 1995), se concluye que la constante de unión para la interacción entre la Trx f y la FBPasa ha de ser mucho mayor que para la interacción FBPasa - Trx m, puesto que, aún con menor potencial reductor, la capacidad de activación de la Trx f es mayor.

Esto constituye una prueba más de que la capacidad de activación de las Trxs sobre sus enzimas diana no depende tanto del valor de sus potenciales reductores como de la constante de unión para las interacciones correspondientes.

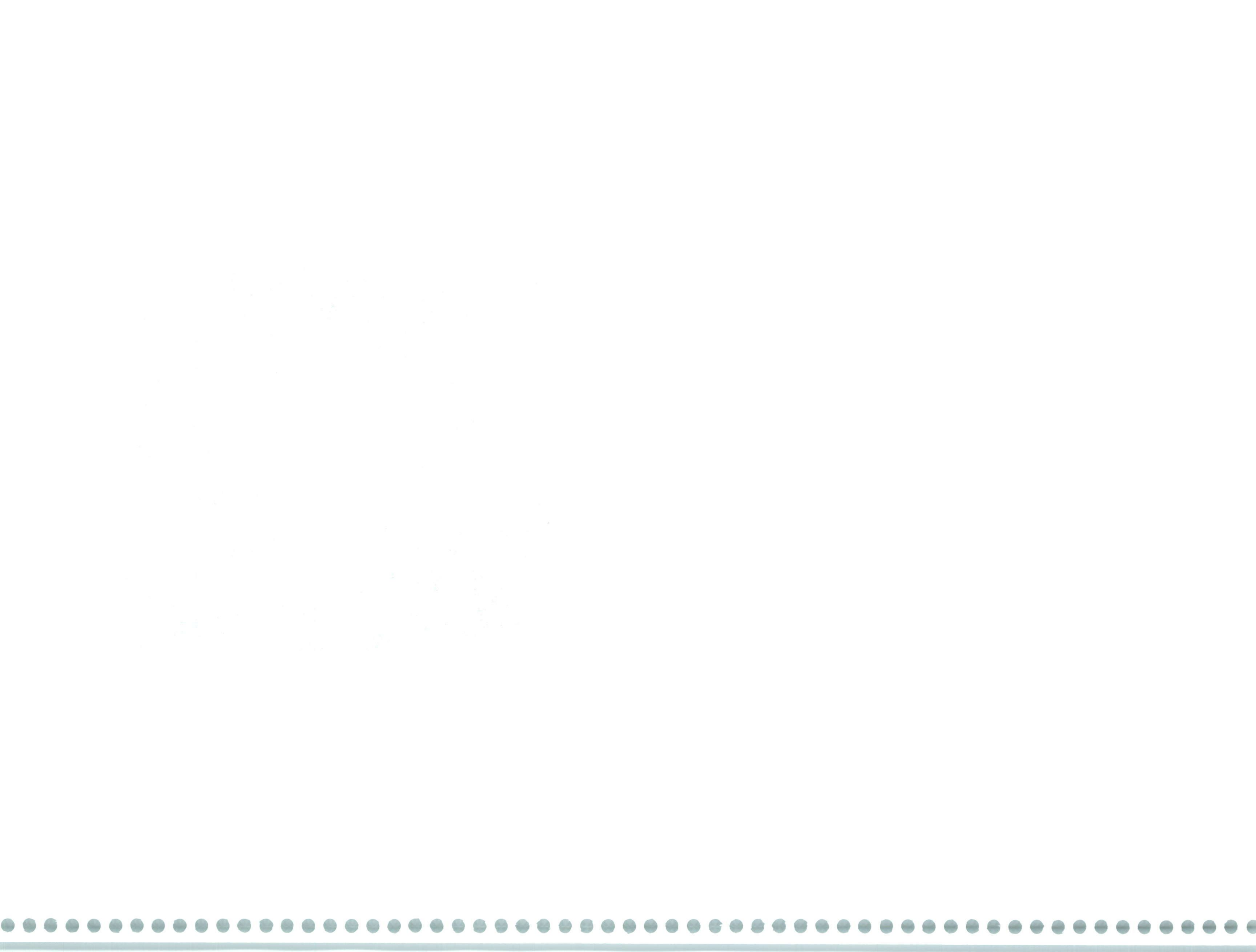


5. CONCLUSIONES

La mejor teoría no es aquella que nos proporciona un mayor número de respuestas, sino aquella que nos permite formular un mayor número de nuevas preguntas.

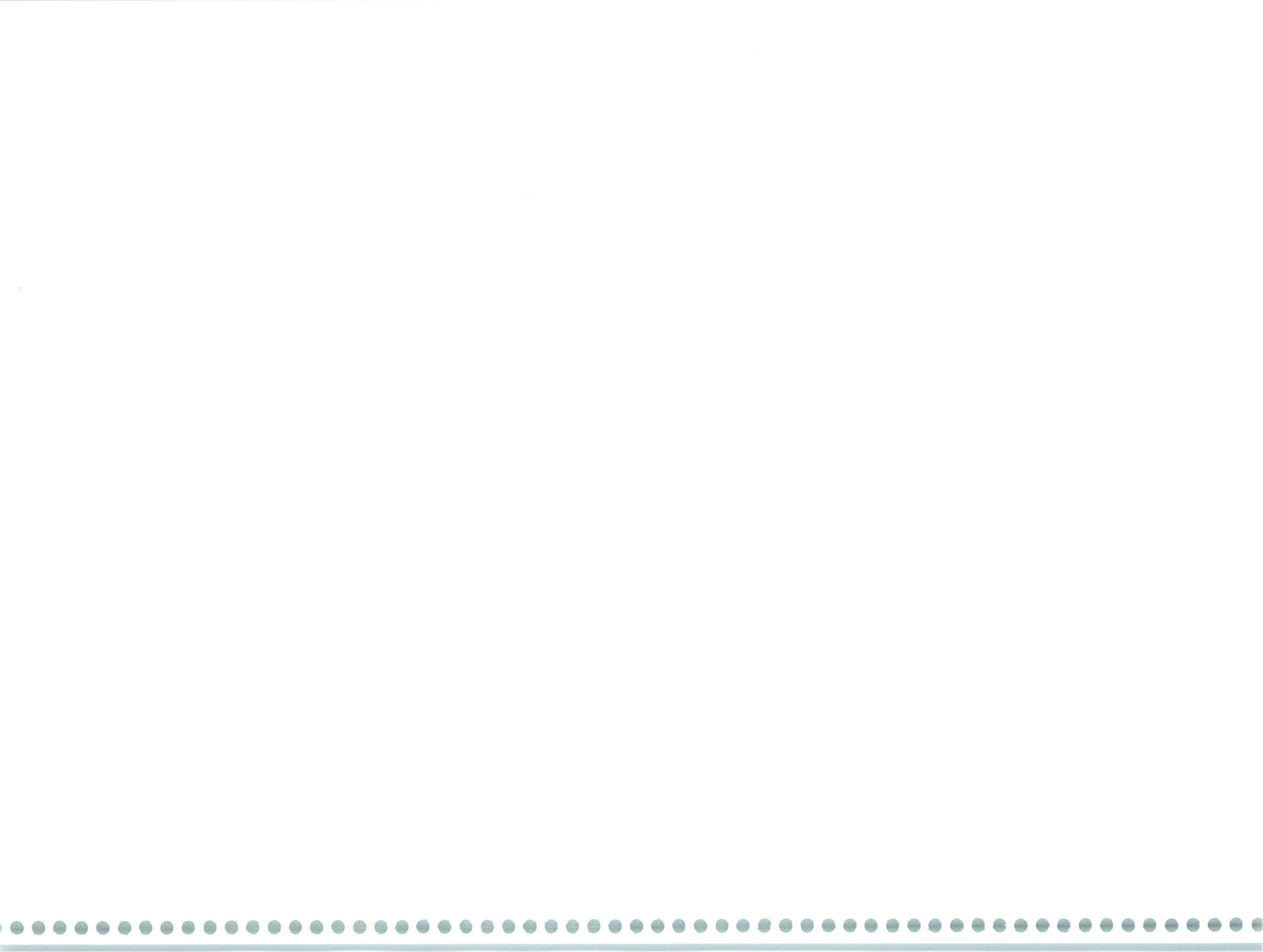
Niels Bohr





A continuación, se enumeran las conclusiones del presente trabajo.

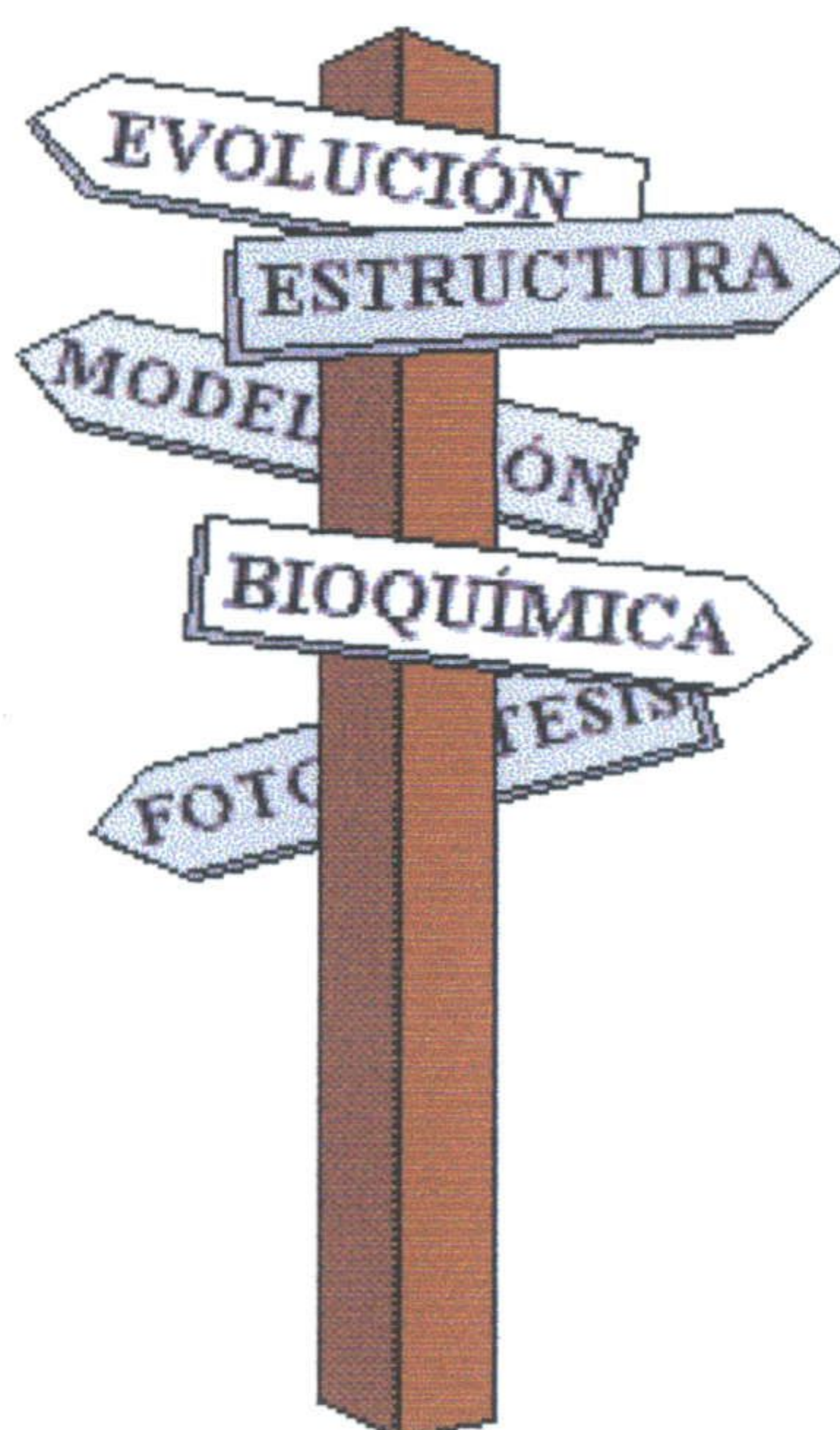
1. El estudio evolutivo de las secuencias de las tiorredoxinas prueba que tanto las tiorredoxinas m cloroplastídicas como las mitocondriales están relacionadas con las tiorredoxinas bacterianas, demostrando su origen común. Las tiorredoxinas bacterianas pueden dividirse en dos grandes grupos: el de las tiorredoxinas típicamente bacterianas, que incluye a las tiorredoxinas m cloroplastídicas, y el de las Clamidiales-Espiroquetales, que está más relacionado con las tiorredoxinas eucarióticas. Los Arqueones no codifican verdaderas tiorredoxinas en su genoma, sino proteínas relacionadas que se han denominado arqueotiorredoxinas.
2. Los aminoácidos que distinguen a las tiorredoxinas f del resto de las tiorredoxinas conocidas son: Lys-10, Asp-11, Pro-15, Met-28, Thr-30, Asp-53, Cys-61, Asn-62, Asn-64, Arg-85, Thr-92, la secuencia ⁶⁷LAKEL⁷¹ y un aminoácido extra situado a continuación de la Asn-62. Por el contrario, los aminoácidos que distinguen a las tiorredoxinas m del resto de las tiorredoxinas son Pro-65, Tyr-71 y la secuencia ⁸⁶EKKE⁸⁹ (o sus análogos en cargas).
3. La tiorredoxina interacciona con sus proteínas diana fundamentalmente a través de un surco hidrófobo, localizado en la cara del centro activo y que se encuentra rodeado de aminoácidos cargados. Este surco está conservado en todas las tiorredoxinas cuya estructura se ha elucidado y posee gran versatilidad a la hora de reconocer péptidos diana.
4. Se ha propuesto un modelo molecular tridimensional para la interacción entre la FBPasa y las tiorredoxinas f y m de guisante, que hace uso del concepto del surco hidrófobo citado previamente. Este modelo ha sido comprobado experimentalmente mediante medidas de la capacidad de activación, de los parámetros del equilibrio de unión y de los potenciales de reducción de las tiorredoxinas.
5. El modelo de interacción incluye tanto interacciones de carácter electrostático como de carácter hidrofóbico, mejorando así la idea predominante hasta la fecha de que sólo son importantes las interacciones electrostáticas en la unión FBPasa - tiorredoxina.
6. Los mutantes de la Trx m de guisante R74E y K70E provocan una disminución en la capacidad de activación de la tiorredoxina sobre la FBPasa. Este descenso en la activación de la FBPasa se debe a la disminución en la constante de unión, y no a diferencias en el potencial de reducción. Por el contrario, los mutantes K70Q y E63Q provocan una mejora en la capacidad de activación de la tiorredoxina sobre la FBPasa, lo que se debe al aumento en la constante de unión y no a diferencias en el potencial de reducción.
7. Se concluye que las diferencias en la capacidad de activación de las tiorredoxinas sobre sus proteínas diana se deben, sobre todo, a sus diferentes constantes de interacción y, en menor medida, a diferencias en los potenciales redox.



6. BIBLIOGRAFÍA

¡Datos, Watson, necesito datos! No se puede construir una casa sin ladrillos.

Sir Arthur Conan Doyle, *Estudio en escarlata*



Handwritten text, possibly a signature or name, located in the center of the page.



- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J. y Curran, T.** (1990). Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249: 1157-1161.
- Aiazzi, M. y Bozzi, M.L.** (1963). Fructose-1,6-bisphosphatase in *Echinopsis species*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 39: 1200-1201.
- Alam, J., Curtis, S., Gleason, F.K., Gerami-Nejad, M. y Fuchs, J.A.** (1989). Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of an unusual thioredoxin gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 171: 162-171.
- Andersen, J.F., Sanders, D.A.R., Gasdaska, J.R., Weichsel, A., Powis, G. y Montfort, W.** (1997). Human thioredoxin homodimers: regulation by pH, role of aspartate 60, and crystal structure of the aspartate 60 → asparagine mutant. *Biochemistry* 36: 13979-13988.
- App, A.A., y Jagendorf, A.T.** (1964). Purification of alkaline fructose diphosphatase from *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 85: 427-434.
- Bagshaw, C.R. y Harris, D.A.** (1987). Measurement of ligand binding to proteins. In: *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry. A practical approach.* (D.A. Harris, ed.), Bashford JRL Press, Oxford, UK, pp 90-113.
- 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.
- Bannister, A. J., Cook, A. y Kouzarides, T.** (1991). In vitro DNA binding activity of Fos/Jun and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. *Oncogene* 6: 1243-1250.
- Bassaham, J.A. y Krause, G.H.** (1969). Free energy changes and metabolic regulation in steady-state photosynthetic carbon reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 189: 207-221.
- Biemann, K. y Papayannopoulos, I.A.** (1994). Amino acid sequencing of proteins. *Acc. Chem. Res.* 27: 370-378.
- Blombäck, B., Admson, L., Hessel, B., Holmgren, A., Hogg, D. y Procyk, R.** (1986). Thioredoxin and glutaredoxin systems: structure and function. En Holmgren, A., Braden, C.I., Jörnvall, H., Sjöerg, B.M. (ed.). pp. 357-367. Raven Press, New York.
- Bodenstein-Lang, J., Buch, A. y Follman, H.** (1989). Animal and plant mitochondria contain specific thioredoxins. *FEBS Lett.* 258: 22-26.
- Bork, P., Ouzounis, C., Casari, G., Schneider, R., Sander, C., Dolan, M., Gilbert, W. y Gillevet, P.M.** (1995). Exploring the *Mycoplasma capricolum* genome: a minimal cell reveals its physiology. *Mol. Microbiol.* 16 (5): 955-967.
- Bortman, S.J., Trelease, R.N. y Miernyk, J.A.** (1981). Enzyme development and glyoxyme characterization in cotyledons of cotton seeds. *Plant Physiol.* 68: 82-86.

Bower, M.S., Matias, D.D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S.J. y Goring, D.R. (1996). Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase. *Plant Cell* 8: 1641-1650.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brandes, H.K., Larimer, F.W., Geck, M.K., Stringer, C.D., Schürmann, P., Hartman, F.C. (1993) Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. *J. Biol. Chem.* 268 (25): 18411-18414.

Brandes, H.K., Larimer, F.W. y Hartman, F.C. (1996). The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin f. *J. Biol. Chem.* 271 (7): 3333-3335.

Brauer, M., Sanders, D. y Stitt, M. (1990). Regulation of photosynthetic sucrose synthesis: a role for calcium? *Planta* 182: 236-243.

Brown, D. y Kershaw, K.A. (1986) Isolation and characterization of two enzymes capable of hydrolizing fructose-1,6-bisphosphate from the lichen *Peltigera rufescens*. *Plant Physiol.* 82: 462-467.

Brugidou, C., Marty, I., Chartier, Y. y Meyer, Y. (1993). The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. *Mol. Gen. Genet.* 238 (1-2): 285-293.

Buchanan, B.B., Schürmann, P. y Wolosiuk, R.A. (1976). Appearance of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity on conversion of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from dimer to monomer form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 970-978.

Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. y Schürmann, P. (1979). Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends Biochem.* 4: 93-96.

Buchanan, B.B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 341-374.

Buchanan, B.B., Adamidi, C., Lozano, R.M., Yee, B.C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R. y Frick, O.L. (1997). Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5372-5377.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.D., Geoghagen, N.S., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D.T., Utterback, T., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Hurst, M.A., Roberts, K.M., Kaine, B.B., Borodovsky, M., Klenk, H.P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. y Venter, J.C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273 (5278): 1058-1073.

- Bunik, V., Raddatz, G., Lemaire, S., Meyer, Y., Jacquot, J.P. y Bisswanger, H.** (1999). Interaction of thioredoxins with target proteins: role of particular structural elements and electrostatic properties of thioredoxins in their interplay with 2-oxoacid dehydrogenase complexes. *Protein Sci.* 8: 65-74.
- 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 different features from those of the leaf chloroplast enzyme. *Planta* 193: 494-501.
- Casadaban, M.J. y Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138: 179-207.
- Chen, N.Y., Zhang, J.J. y Paulus, H.** (1989). Chromosomal location of the *Bacillus subtilis* aspartokinase II gene and nucleotide sequence of the adjacent genes homologous to *uvrC* and *trx* of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2931-2940.
- Chow, K.S.** (1999). Cloning of a thioredoxin h cDNA from the Rubber Plant. *Plant Physiol.* 120 (1): 339.
- Clement-Metral, J.D., Holmgren, A., Cambillau, C., Joernvall, H., Eklund, H., Thomas, D. y Lederer, F.** (1988) Amino acid sequence determination and three-dimensional modelling of thioredoxin from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* Y. *Eur. J. Biochem.* 172: 413-419.
- Cohen, S. N., Chang, A.C. y Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110-2117.
- Cohen, G., Yanko, M., Mislovati, M., Argaman, A., Schreiber, R., Av-Gay, Y. y Aharonowitz, Y.** (1993). Thioredoxin-thioredoxin reductase system of *Streptomyces clavuligerus*: sequences, expression, and organization of the genes. *J. Bacteriol.* 175: 5159-5167.
- Cohen, G., Argaman, A., Schreiber, R., Mislovati, M. y Aharonowitz, Y.** (1994). The thioredoxin system of *Penicillium chrysogenum* and its possible role in penicillin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 176 (4): 973-984.
- Cooper, A.J.L.** (1983). Biochemistry of sulfur containing aminoacids. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 187-222.
- Corkmack, B.** (1991). En Current Protocols in Molecular Biology. Wiley and sons. pp 8.5.7. – 8.5.9.
- Cromlich, J.A., y Roeder, R.G.** (1989). Human transcription factor III C (TFIIIC). *J. Biol. Chem.* 264: 18100-18109.

Cséke, C., Balogh, A. y Farkas, G.L. (1981). Redox modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anacystis nidulans* and its uncoupling by phage infection. *FEBS Lett.* 126: 85-88.

Cséke, C. y Buchanan, B.B. (1986). Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, 853: 43-63.

Danon, A. y Mayfield, S. (1994). Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* 266: 1717-1719.

Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olson, G.J. y Swanson, R.V. (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358.

Decottignies, P., Schmitter, J.M., Dutka, S., Jacquot, J.P. y Miginiac-Maslow, M. (1991). Characterization and primary structure of a second thioredoxin from the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 198: 505-512.

de Lamotte-Guery, F., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Stein, M., Minard, P. y Jacquot, J.P. (1991). Mutation of a negatively charged aminoacid in thioredoxin modifies its reactivity with chloroplastic enzymes. *Eur. J. Biochem.* 196: 287-294

de Lamotte-Guéry, F., Pruvost, C., Minard, P., Delsuc, M.A., Miginiac-Maslow, M., Schmitter, J.M., Stein, M. y Decottignies, P. (1997). Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein Eng.*, 10: 1425-1432.

Demple, B. (1998). A bridge to control. *Science* 279: 1655-1656.

Doublet, S., Tabor, S., Long, A.M., Richardson, C.C. y Ellenberger, T. (1998). Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature (London)* 391: 251-258.

Droogmans, L., Cleuter, Y., Wollman, E.E., Kettmann, R. y Burny, A. (1994). Nucleotide sequence of ovine thioredoxin cDNA. *DNA Seq.* 4 (4): 277-279.

Droux, M., Jacquot, J.P., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J.C., Crawford, N.A., Yee, B.C. y Buchanan, B.B. (1987). Ferredoxin-thioredoxin-reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C4, c3 and cyanobacterial species. *Arch. Biochem. Biophys.* 252: 426-439.

Duek, P.D., Mora-Garcia, S. y Wolosiuk, R.A. (1996). *Brassica napus* chloroplast thioredoxin m. *Direct submission to the EMBL Data Library.*

Dugaickzyc, A., Boyer, H.W. y Goodman, H.M. (1975). Ligation of EcoR I endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96: 171-184.

- Dyer, T.A., Catley, M.A., Robertson, E.J. y Dunford, R.P.** (1999). The thioredoxins m and f of plants and their role in the redox regulation of chloroplast enzymes. *In press*.
- Eklund, H., Gleason, F.K. y Holmgren, A.** (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: structure, function and genetics*. 11: 13-28.
- El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., Marker, A.J., Colosia, A.D., d'Angelo, G., Fraser, 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.
- Fägerstam, L.G., Frostell, A., Karlsson, R., Kullman, M., Larsson, A., Malmqvist, M. y Butt, H.** (1990). Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *J. Mol. Recognit.* 3: 208-214.
- Feldmann, H., Mannhaupt, G. y Vetter, I.** (1992). Yeast hypothetical thioredoxin-like protein in tup1 5' region. *Direct Submission to EMBL/GENBANK/DDBJ Data Banks*.
- Felsenstein, J.** (1989). PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Fisher, W.K. y Thompson, E.O.P.** (1983). Amino acid sequence studies on sheep liver fructose-bisphosphatase II. The complete sequence. *Aust. J. Biol. Sci.* 36: 235-250.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C.** (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
- Florencio, J., Yee, B.C., Johnson, T.C. y Buchanan, B.B.** (1988). An NADP/thioredoxin reductase system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* 266: 496-507.
- Florencio, J., Gadal, P. y Buchanan, B.B.** (1993). Thioredoxin-linked activation of the chloroplast and cytosolic forms of *Chlamydomonas reinhardtii* glutamine synthetase. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 644-655.
- Forman-Kay, J.D., Clore, G.M., Wingfield, P.T. y Gronenborn, A.M.** (1991). High resolution 3D structure of reduced recombinant human thioredoxin in solution. *Biochemistry*, 30: 2685.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta,**

R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. y Woese, C.R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209: 457-463.

Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, J.L., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison III, C.A. y Venter, J.C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397-403.

Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., Vugt, R.V., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fujii, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O. y Venter, J.C. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586.

Fraser, C.M., Norris, S.J., Weinstock, G.M., White, O., Sutton, G.G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E.K., Clayton, R., Ketchum, K.A., Sodergren, E., Hardham, J.M., McLeod, M.P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J.K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M.D., Fujii, C., Garland, S., Hatch, B., Horst, K., Roberts, K., Watthey, L., Weidman, J., Smith, H.O. y Venter, J.C. (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 281: 375-388.

Fuchs, R. y Blakesley, R. (1983). Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Meth. Enzymol.* 100: 3-38.

Gan, Z.R. (1991). Yeast thioredoxin genes. *J. Biol. Chem.* 266: 1692-1696.

Gane, P.J., Freedman, R.B. y Warwicker, J. (1995). A molecular model for the redox potential difference between thioredoxin and DsbA, based on electrostatic calculations. *J. Mol. Biol.* 249: 376-387.

Gasdaska, J.R., Berggren, M. y Pavis, G. (1995). Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ.* 6: 1643-1650.

Gautier, M.F., Lullien-Pellerin, V., de Lamotte-Guery, F., Guirao, A. y Joudrier, P. (1998). Characterization of wheat thioredoxin h cDNA and production of an active *Triticum aestivum* protein in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 252 (2): 314-324.

Geck, M.K., Larimer, F.W. y Hartman, F.C., (1996). Identification of residues of spinach thioredoxin f that influence interactions with target enzymes. *J. Biol. Chem.* 271 (40): 24736-24740.

- Genovesio-Taverne, J.C., Jetzer, Y., Sauder, U., Hohenester, E. Hugnet, C., Jansonius, J.N., Gardet-salvi, L. y Schürmann, P.** (1991). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the spinach chloroplast thioredoxin f. *J. Mol. Biol.* 222: 459-461.
- Gibson, J.L., Chen, J.H., Tower, P.A. y Tabita, F.R.** (1990). The form II fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase genes form part of a large operon in *Rhodobacter sphaeroides*: primary structure and insertional mutagenesis. *Biochemistry* 29: 8085-8093.
- 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.
- Glazer, A.N., Gindt, Y.M., Chan, C.F. y Sauer, K.** (1994). Selective disruption of energy flow from phycobilisomes to photosystem I. *Photosynt. Res.* 40: 167-173.
- Gleason, F.K., Whittaker, M.M., Holmgren, A. y Joernvall, H.** (1985). The primary structure of thioredoxin from the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. 7119. *J. Biol. Chem.* 260: 9567-9573.
- Gleason, F.K.** (1996). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120: purification and kinetics of redox modulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 334 (2): 277-283.
- González-Porqué, P., Baldestein, A. y Reichard, P.** (1970). Purification of a thioredoxin system from yeast. *J. Biol. Chem.* 245: 2363-2370.
- Goswami, A. y Rosenberg, I.N.** (1987). Thioredoxin stimulates enzymatic outer ring monodeiodination of reverse triiodo-tyrosine. *Endocrinology* 121: 1937-1945.
- Grippio, J.F., Tienrungrroj, W., Dahmer, M.K., Housley, P.R. y Pratt, W.B.** (1983). Evidence that the endogenous heat stable glucocorticoid receptor activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 258: 13658-13664.
- Gronenborn, A., Clore, G.M., Louis, J.M. y Wingfield, P.T.** (1999). Is human thioredoxin monomeric or dimeric? *Protein Sci.* 8: 426-429.
- Guex, N. y Peitsch, M.C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdbviewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18 (15): 2714-2723.
- Häberlein, I. y Vogeler, B.** (1995). Completion of the thioredoxin reaction mechanism: kinetic evidence for protein complexes between thioredoxin and fructose 1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1253 (2): 169-174.
- Hahn, D. y Kück, U.** (1994). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 104: 1101-1102.

- Hamilton, W.D.O., Harrison, D.A. y Dyer, T.A.** (1988) Sequence of the *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Nucleic Acids Res.* 16: 8707.
- Hartman, H., Syvanek, M. y Buchanan, B.** (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. *Mol. Biol. Evol.* 7 (3): 247-254.
- Hermoso, R., Fonollá, J., de Felipe, M.R., Vivó, A., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López-Gorgé, J.** (1992). Double immunogold localization of thioredoxin f and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. *Plant. Physiol. Biochem.* 30 (1): 39-46.
- Hermoso, R., Castillo, M., Chueca, A., Lázaro, J.J. y López-Gorgé, J.** (1996). Binding site of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase involved in the interaction with thioredoxin. *Plant Mol. Biol.* 30: 455-465
- Hermoso, R., Lázaro, J.J., Chueca, A., Sahrawy, M. y López-Gorgé, J.** (1997). Purification and binding features of a pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase domain involved in the interaction with thioredoxin f. *Physiol. Plant.* 105: 756-762.
- Hertig, 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.
- Hertig, C. y Wolosiuk, R.A.** (1983). Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 258: 984-988.
- Hess, V.L. y Szabo, A.** (1979). Ligand binding to macromolecules. Allosteric and sequential models of cooperativity. *J. Chem. Educ.* 56: 289-293.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.C. y Herrmann, R.** (1996). Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24: 4420-4449.
- Hirasawa, M., Droux, M., Gray, K.A., Boyer, J.M., Davis, D.J., Buchanan, B.B. y Knaff, D.** (1988). Ferredoxin-thioredoxin-reductase: properties of its complex with ferredoxin. *Biochem. Biophys. Acta* 935: 1-8.
- Hirasawa, M., Schürmann, P., Jacquot, J.P., Manieri, W., Jacquot, P., Keryer, E., Hartman, F.C. y Knaff, D.** (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry* 38: 5200-5205.
- Holmgren, A.** (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem* 6: 475-484.
- Holmgren, A. y Soderberg, B.O.** (1970). Crystallization and preliminary crystallographic data for thioredoxin from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 54: 387-390.
- Holmgren, A. y Roberts, G.** (1976). *FEBS Lett.* 71: 261.
- Holmgren, A.** (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 237-271.

- Holmgren, A.** (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966.
- Höög, J.O., vonBahr-Lindström, H., Josephson, S., Wallace, B., Kushner, S.R., Jörnvall, H. y Holmgren, A.** (1985). Nucleotide sequence of the thioredoxin gene from *Escherichia coli*. *Biosci. Rep.* 4: 917-923.
- Horsnell, P.R. y Raines, C.A.** (1991). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 17: 185-186.
- Hutchison, R. y Ort, D.** (1995). Measurement of equilibrium midpoint potentials of thiol/disulfide regulatory groups on thioredoxin-activated chloroplast enzymes. *Methods in Enzymol.* 252: 220-228
- Innis, M.A., Myamo, K.B., Gelfand, D.H. y Brow, M.A.D.** (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9436-9440.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J.** (ed) (1990). En PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc. 482 pp.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F.** (1981). Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids. Res.* 9: 2989-2998.
- Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T. Hayashi, H y Chino, M.** (1995). Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195: 456-463.
- Jacobi, A., Huber-Wunderlich, M., Hennecke, J., Glockshuber, R.** (1997). Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. Influence of electrostatic interactions on stability and redox properties. *J. Biol. Chem.* 272: 21692-21699.
- Jacquot, J.P.** (1984). Post-translational modifications of proteins in higher plant chloroplasts: enzyme regulation by thiol-disulfide interchange. *Physiol. Veget.* 22: 487-507.
- Jacquot, J.P., López-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.** (1997a). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.* 136: 543-570.
- Jacquot, J.P., López-Jaramillo, J., Miginiac-Maslow, M., Lemaire, S., Cherfils, J., Chueca, A. y López-Gorgé, J.** (1997b). Cysteine 153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 401: 143-147.

Johnson, R.S. y Biemann, K. (1987). The primary structure of thioredoxin from *Chromatium vinosum* determined by high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 26: 1209-1214.

Johnson, R.S., Mathews, W.R., Biemann, K. y Hopper, S. (1988a). Amino acid sequence of thioredoxin isolated from rabbit bone marrow determined by tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 263: 9589-9597.

Johnson, T.C., Yee, B.C., Carlson, D.E., Buchanan, B.B., Johnson, R.S., Mathews, W.R. y Biemann, K. (1988b). Thioredoxin from *Rhodospirillum rubrum*: primary structure and relation to thioredoxins from other photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* 170: 2406-2408.

Joint, I.R., Morris, I. y Fuller, R.C. (1972). Purification of a complex of alkaline fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 247: 9607-9611.

Jones, S.W. y Luk, K.C. (1988). Isolation of a chicken thioredoxin cDNA clone: thioredoxin mRNA is differentially expressed in normal and Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263: 9607-9611.

Juttner, J.A., Baumann, U., Olde, D.A., Bian, X. y Langridge, P. (1999). Self-incompatibility in the grasses: an update. *In press*.

Katchalski-Katzir, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Friesem, A.A., Aflalo, C. y Vakser, I. A. (1992). Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2195-2199.

Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R.W. y Stephens, R.S. (1999). Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genet.* 21:385-389.

Kamo, M., Tsugita, A., Wiessner, C., Wedel, N., Bartling, D., Herrmann, R.G., Aguilar, F., Gardet-Salvi, L. y Schürmann, P. (1989). Primary structure of spinach-chloroplast thioredoxin f. Protein sequencing and analysis of complete cDNA clones for spinach-chloroplast thioredoxin f. *Eur. J. Biochem.* 182 (2): 315-322.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3: 109-136.

Katti, S.K., Lemaster, D.M. y Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212: 167-184.

Katti, S.K., Lemaster, D.M. y Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212: 167-184.

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Yoshizawa, T., Nakamura, Y., Robb, F.T., Horikoshi, K., Masuchi, Y., Shizuya, H. y Kikuchi, H. (1998). Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 5 (2): 147-155.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Kubota, K., Nakamura, Y., Nomura, N., Sako, Y. y Kikuchi, H. (1999). Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic Crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* 6: 83-101.

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. y Lipscomb, W.N. (1990a). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose-6-phosphate, AMP and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5243-5247.

Ke, H., Thorpe, C.M., Seaton, B.A., Lipscomb, W.N. y Marcus, F. (1990b). Structure refinement of fructose-1,6-bisphosphatase and its fructose-2,6-bisphosphate complex at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212: 513-539.

Ke, H., Liang, J.Y., Zhang, Y. y Lipscomb, W.N. (1991a). Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose-1,6-bisphosphate complex (R form). *Biochemistry* 30 (18): 4412-4420.

Ke, H., Zhang, Y., Liang, J.Y. y Lipscomb, W.N. (1991b). Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose-1,6-bisphosphate at 2.1 Å resolution. *Proc. Natl. 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.

Kelly, C.J., Zimmerman, G. y Latzko, E. (1982). Fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzymol.* 90: 371-378.

Kemmink, J., Darby, N.J., Dijkstra, K., Nilges, M. y Creighton, T.E. (1996). Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear ¹³C/¹⁵N NMR spectroscopy. *Biochemistry* 35 (24): 7684-7691.

Khayat, E. y Daie, J. (1991). Purification of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and immunological analysis of light/dark modulation in sugarbeet leaves. *Suplemento Plant. Physiol.* 96: 84.

Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. y Venter, J.C. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390 (6658): 364-370.

Klotz, I.M. (1973). Physicochemical aspects of drug-protein interactions: a general perspective. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 226: 18-35.

Knaff, D.B. (1989). The regulatory role of thioredoxin in chloroplasts. *Trends Biochem. Sci.* 12: 433-434.

Korn, A.P. y Burnett, R.M. (1991). Distribution and complementarity of hydrophobicity in multisubunit proteins. *Proteins* 9: 37-55.

Koshland, D.E. Jr., Nemethy, G. y Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 1: 365-385.

Kosower, N.S. y Kosower, E.M. (1987). Thiol labelling with bromobimanes. *Methods Enzymol.* 143: 76-84.

Kossmann, J., Müller-Röber, B., Dyer, T., 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 chloroplast. *Planta* 188: 7-12.

Kotani, H. y Nakajima, K. (1992) Cloning and sequence of thioredoxin gene of *Salmonella typhimurium* LT2. *Nucleic Acids Res.* 20: 1424.

Krebs, H.A. (1964). Gluconeogenesis. *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B*, 159: 545-564.

Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, J.A.M. y Latzko, E. (1988). Stromal free calcium concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* 86: 423-428.

Labudova, O., Nemethova, M., Turna, J. y Kollarova, M. (1994). PCR cloning and sequencing of the coding portion of the thioredoxin-encoding gene from *Streptomyces aureofaciens* BMK. *Gene* 138 (1): 263-264.

- Labudova, O., Nemethova, M., Turna, J. y Kollarova, M.** (1994). PCR cloning and sequencing of the coding portion of the thioredoxin-encoding gene from *Streptomyces aureofaciens* BMK. *Gene* 138 (1): 263-264.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamotte-Guery, F., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Stein, M., Minard, P. y Jacquot, J.P.** (1991). Mutation of a negatively charged amino acid in thioredoxin modifies its reactivity with chloroplastic enzymes. *Eur. J. Biochem.* 196: 287-294.
- Larsson, A., Holmgren, A. y Bratt, I.** (1988). Thioredoxin and glutathione in cultured fibroblasts from human cases with 5-oxoprolin-uria and cystinosis. *FEBS Lett.* 87: 61-64.
- Laurent, T.C., Moore, E.C. y Reichard, P.** (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239: 3436-44.
- 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, F.** (1975). Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts: molecular weight transitions of the purified enzyme. *Plant Sci. Lett.* 5: 49-55.
- Lehninger, A.L.** (1988). Principios de bioquímica. Ed. Omega. Barcelona. pp. 645-679.
- Le Marechal, P., Hoang, B.M., Schmitter, J.M., Van Dorsselaer, A. y Decottignies, P.** (1992). Purification, properties and primary structure of thioredoxin from *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* 210 (2): 421-429.
- LeMaster, D., Springer, P.A. y Unkefer, C.J.** (1997). The role of the buried aspartate of *Escherichia coli* thioredoxin in the activation of the mixed disulfide intermediate. *J. Biol. Chem.* 272 (48): 29998-30001
- Lepiniec, L., Hodges, M., Gadal, P. y Crétin, C.** (1992). Isolation, characterization and nucleotide sequence of a full-length pea cDNA encoding thioredoxin f. *Plant. Mol. Biol.* 18: 1023-1025.
- Levings, C.S. III y Siedow, J.N.** (1995). Regulation by redox poise in chloroplasts. *Science* 268: 695-696.
- Li, D., Stevens, F.J., Schiffer, M. y Anderson, L.E.** (1994). Mechanism of light modulation: identification of potential redox-sensitive cysteines distal to catalytic site in light-activated chloroplast enzymes. *Biophys. J.* 67: 29-35.
- Li, X., Nield, J., Hayman, D. y Langridge, P.** (1995). Thioredoxin activity in the C terminus of *Phalaris* S protein. *Plant J.* 8 (1): 133-138.

Lin, X., Kaul, S., Shea, T.P., Fujii, C.Y., Shen, M., VanAken, S.E., Barnstead, M.E., Mason, T.M., Bowman, C.L., Ronning, C.M., Benito, M., Carrera, A.J., Creasy, T.H., Buell, C.R., Town, C.D., Nierman, W.C., Fraser, C.M. y Venter, J.C. (1999). *Arabidopsis thaliana* chromosome II BAC F9O13 genomic sequence. *In press*.

Lloyd, J.C., Raines, C.A., John, U.P. y Dyer, T.A. (1991). The chloroplast FBPase gene of wheat: structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 225: 209-216.

López-Jaramillo, F.J., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Prado, F.E. y López-Gorgé, J. (1994). Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m. *Plant. Physiol.*, 105: 1021-1022.

López-Jaramillo, F.J. (1995). Estructura-función en el mecanismo de acción de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica: efecto modulador de la tiorredoxina. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.

López-Jaramillo, F.J., Chueca, A., Jacquot, J.P., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Sahrawy, M. y López-Gorgé, J. (1997). High-yield expression of pea thioredoxin m and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation. *Plant Physiol.* 114: 1169-1175.

López-Jaramillo, F.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: 155-163.

Lyne, M.H., Rajandream, M.A., Barrell, B.G., Hunt, C. y Aves, S. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* thioredoxin I. *Direct Submission to EMBL/GENBANK/DDBJ Data Banks*.

Mandel, M y Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

Marcus, F., Edelstein, I., Reardon, L. y Hienrikson, R.L. (1982). Complete 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 the light regulated chloroplast enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5379-5383.

Marcus, F. y Harrsch, P.B. (1990). Amino acid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 279: 151-157.

Margulis, L. (1970). *The origin of eukaryotic cells*. Yale Univ. Press. New Haven USA.

- Margulis, L.** (1970). The origin of eukaryotic cells. Yale Univ. Press. New Haven USA.
- Margulis, L.** (1996). Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 1071-1076.
- Mark, D.F. y Richardson, C.C.** (1976). *Escherichia coli* thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 780-784.
- Marre, E., Cornaggia, M.P., Alberghina, F. y Bianchetti, R.** (1965). Substrate level as a regulation factor of the synthesis of fructokinase, hexokinase and other carbohydrate-metabolizing enzymes in higher plants. *Biochem. J.* 97: 20P.
- Matthews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.L., Yodoi, J. y Hay, R.T.** (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NFκB by reduction of a disulfide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* 20: 3821-3830.
- Mathews, W.R., Johnson, R.S., Cornwell, K.L., Johnson, T.C., Buchanan, B.B. y Biemann, K.** (1987). Mass spectrometrically derived amino acid sequence of thioredoxin from *Chlorobium*, an evolutionarily prominent photosynthetic bacterium. *J. Biol. Chem.* 262: 7537-7545.
- McDonell, M.W., Simon, M.N y Studier, F.W.** (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110: 119-146.
- McFarlan, S.C., Hogenkamp, H.P.C., Eccleston, E.D., Howard, J.B. y Fuchs, J.A.** (1989). Purification, characterization and revised amino acid sequence of a second thioredoxin from *Corynebacterium nephridii*. *Eur. J. Biochem.* 179: 389-398.
- Michalowski, C.B. y Bohnert, H.J.** (1998). A cDNA for thioredoxin f precursor from the common ice plant. *Direct submission to the EMBL Data Library*.
- Miloso, M., Limauro, D., Alifano, P., Rivellini, F., Lavitola, A., Gulletta, E., Bruni, C.B.** (1993). Characterization of the rho genes of *Neisseria gonorrhoeae* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 175: 8030-8037.
- Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J.A. y Spyrou, G.** (1997). Mouse mitochondrial thioredoxin precursor (MT-TRX). *Direct Submission to EMBL/GENBANK/DDBJ Data Banks*.
- Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J.A. y Spyrou, G.** (1998). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a human thioredoxin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243 (1): 284-288.
- Mittard, V., Morelle, N., Brutscher, B., Simorre, J.P., Marion, D., Stein, M., Jacquot, J.P., Lirsac, P.N. y Lancelin, J.M.** (1995). ¹H, ¹³C, ¹⁵N-NMR resonance assignments of oxidized thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using

- Mittard, V., Blackledge, M., Stein, M., Jacquot, J.P., Marion, D. y Lancelin, J.M.** (1997). NMR solution structure of oxidized thioredoxin h from the eukariotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 243: 374-383.
- Monod, J., Wyman, J. y Changeaux, J.P.** (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12: 88-118.
- Moore, E.C., Reichard, P. y Thelander, L.** (1964). Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239: 344-3452.
- Moore, B.G. y Tischer, R.G.** (1965). Biosynthesis of extracellular polisaccharides by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Can. J. Microbiol.* 11: 877-885.
- Mora-García, S.E.F., Rodríguez-Suárez, R.J. y Wolosiuk, R.A.** (1996). *Brassica napus* chloroplast thioredoxin f. *Direct submission to the EMBL Data Library*.
- Mora-García, S.E.F., Rodríguez-Suárez, R. y Wolosiuk, R.A.** (1998). Role of electrostatic interactions on the affinity of thioredoxin for target proteins. Recognition of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by mutant *Escherichia coli* thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 273 (26): 16273-16280.
- Mössner, E., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R.** (1998). Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.* 5: 1233-1244.
- Muller, E.G.D. y Buchanan, B.B.** (1989). Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.* 264: 4008-4014.
- Nakamura, H., Herzenerg, A.L., Yodoi, J., Padilla, A. y Holmgren, A.** (1995). Poster n° 37. 4th International Conference on thioredoxins and related proteins. Kassel. Agosto 1995.
- Navarro, F. y Florencio, F.J.** (1996). The cyanobacterial thioredoxin gene is required for both photoautotrophic and heterotrophic growth. *Plant Physiol.* 111 (4): 1067-1075.
- Newman, G.W., Balcewicz-Sablinska, M.K., Guarnaccia, J.R., Remold, H.G. y Silberstein, D.S.** (1994). Opposing regulatory effects of thioredoxin and eosinophil cytotoxicity-enhancing factor on the development of human immunodeficiency virus 1. *J. Exp. Med.* 180 (1): 359-363.
- Ng, W.V., Ciufu, S.A., Smith, T.M., Bumgarner, R.E., Baskin, D., Faust, J., Hall, B., Loretz, C., Seto, J., Slagel, J., Hood, L. y DasSarma, S.** (1998). Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic Archaeon: megaplasmid or minichromosome? *Genome Res.* 8: 1131-1141.
- Nishizawa, A.N. y Buchanan, B.B.** (1981). Enzyme regulation in C-4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin linked fructose diphosphatase and seduheptulose bisphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.* 256: 6119-6126.

- Nossal, N.G.** (1983). Prokaryotic DNA replication systems. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 581-615.
- Ocón Garrido, M.E.** (1999). Modificación química de los enlaces implicados en la interacción de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica con la tiorredoxina f. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- O'Hara-Mays, E.E. and Capwell, J.C.**, (1993). Miniprep for chloroplast DNA isolation. *Microchemical Journal* 47: 245-250.
- Ohta, N.** (1997). Analysis of a plastid gene cluster reveals a close relationship between *Cyanidioschyzon* and *Cyanidium*. *J. Plant Res.* 110: 235-245.
- Park, J. y Churchich, J.E.** (1992). Interaction of thioredoxin with oxidized aminobutyrate aminotransferase. Evidence for the formation of a covalent intermediate. *FEBS Lett.* 310: 1-4.
- Peitsch, M.C.** (1995) Protein modeling by e-mail. *Bio/technology* 13: 658-.
- Perry, D.J. y Bousquet, J.** (1998). Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes. Development, characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics* 149 (2): 1089-1098.
- Plá, A. y López-Gorgé, J.** (1980). Thioredoxin/fructose-1,6-bisphosphatase affinity in the enzyme activation by the ferredoxin-thioredoxin system. *Bio. Biophys. Acta* 636: 113-118.
- Porque, P.G., Baldesten, A. y Reichard, P.** (1970). The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J. Biol. Chem.* 245: 2371-2364.
- Prado, F.E., Lázaro, J.J. y López-Gorgé, J.** (1991). Regulation by Ca^{2+} of a cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaves. *Plant Physiol.* 96: 1026-1033.
- Prado, F.E., Lázaro, J.J., Hermoso, R., Chueca, A. y López-Gorgé, J.** (1992). Purification and properties of pea (*Pisum sativum* L.) thioredoxin f, a plant thioredoxin with unique features in the activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Planta* 188: 345-353.
- Qin, J., Clore, G.M. y Gronenborn, A.** (1994). The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure* 2: 503-521.
- Qin, J., Clore, G.M., Poindexter-Kennedy, W., Huth, 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, G.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.

- Racker, E. y Schroeder, E.A.R.** (1958). Reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1 phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and sedoheptulose-1,7-diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 74: 326-344.
- Raines, C.A., Lloyd, J.C., Willingham, N.M., Potts, S. y Dyer, 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 reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *Eur J. Biochem* 205 (3): 1053-1059.
- Raines, C.A., Lloyd, J.C. y Dyer, T.A.** (1999). New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, an important but neglected Calvin cycle enzyme. *J. Exp. Bot.* 50: 1-8.
- Rebeille, F. y Hatch, M.D.** (1986). Regulation of NADP-malate dehydrogenase in C4 plants: effect of varying NADPH to NADP ratios and thioredoxin redox state on enzyme activity in reconstituted systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (1): 164-170.
- Reche, A., Lázaro, J.J., Hermoso, R. Chueca, A. y López-Gorgé, J.** (1997). Binding and activation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by homologous thioredoxins m and f. *Physiol. Plant.* 101: 463-470.
- Reichard, P.** (1993). The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 8383-8386.
- Reith, M. y Munholland, J.** (1995). Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 333-335.
- Reynolds, A.E., Chesnick, J.M., Woolford, J. y Cattolico, R.A.** (1994). Chloroplast encoded thioredoxin genes in the red algae *Porphyra yezoensis* and *Griffithsia pacifica*: evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* 25: 13-21.
- Rivera-Madrid R., Maestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.P., Decottignies, M., Miginiac-Maslow, M. y Meyer, Y.** (1995). Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5620-5624.
- Rodríguez-Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, 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., Chueca, A., Hermoso, R. y López-Gorgé, J.** (1990). Effects of alcohols on the association of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to tylakoid 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. y Wolosiuk, R.A.** (1993) Sequence of a cDNA encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed. *Plant Physiol.* 103: 1453-1454.
- Rogers, D.T., Hiller, E., Mitsock, L. y Orr, E.** (1988). Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263: 6051-6057.
- Ruelland, E. y Miginiac-Maslow, M.** (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci.* 4: 136-141.
- Russel, M. and Model, P.** (1985). Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 29-33.
- Russel, M. and Model, P.** (1986). The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation and characterization of mutant thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 261: 14997-15005.
- Russel, M., Model, P. y Holmgren, A.** (1990). Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *J. Bacteriol.* 172 (4): 1923-1929.
- Russel, M.** (1995). Thioredoxin genetics. *Methods Enzymol.* 252: 264-274.
- 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 Sci.* 106: 81-89.
- Sahrawy, M., Hecht, V., López-Jaramillo, F.J., Chueca, A., Chartier, Y. y Meyer, Y.** (1996). Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxins 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: 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.
- Salamon, Z., Tollin, G., Hirasawa, M., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.L., Knaff, D. y Schürmann, P.** (1995). The oxidation-reduction properties of spinach thioredoxins f and m and of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1230: 114-118
- Salz, H.K., Flickinger, T.W., Mittendorf, E., Pellicena-Palle, A., Petschek, J.P. y Brown Albrecht, E.** (1994). The *Drosophila* maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development. *Genetics* 136: 1075-1086.

- Scala, J., Patrick, C. y Macbeth, G.** (1968). Fructose-1,6-bisphosphatase (fructose-1,6-diphosphatase) of castor bean endosperm and leaf: properties and partial purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 127: 576-584.
- Schallreuter, K.U., Pittelkow, M.R., Wood, J.M.** (1989). EF-hands calcium binding regulates the thioredoxin reductase/thioredoxin electron transfer in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 1311-1316.
- Scheibe, R.** (1981). Thioredoxin m in pea chloroplasts: concentration and redox state under light and dark conditions. *FEBS Lett.* 133: 301-304.
- Scheibe, R.** (1990). Light/dark modulation: regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Bot. Acta.* 103: 323-334.
- Schmidt, A.** (1981). A thioredoxin activated fructose-1,6-bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *Planta* 152: 101-104.
- Schürmann, P., Roux, J. y Salvi, L.** (1985). Modification of thioredoxin specificity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by substrate and Ca^{2+} . *Physiol. Vég.* 23 (5): 813-818.
- Schürmann, P.** (1995). Ferredoxin:thioredoxin system. *Methods Enzymol.* 252: 274-283.
- Segel, I.H.** (1975). Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. J. Wiley & sons. New York.
- Smeekens, 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.
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H.-M., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicare, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Safer, H., Patwell, D., Prabhakar, S., McDougall, S., Shimer, G., Goyal, A., Pietrovski, S., Church, G.M., Daniels, C.J., Mao, J.-i., Rice, P., Nolling, J. y Reeve, J.N.** (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179 (22), 7135-7155.
- Söderberg, B.O., Sjöberg, B.M., Sonnerstam, U. y Braden, C.I.** (1978). Three dimensional structure of thioredoxin induced by bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5827-5830.
- Soulie, J.M., Riviere, M., Baldet, P. y Ricard, J.** (1991). Kinetics of the conformational transition of the spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase induced by fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 195: 671-678.
- Springgate, C.F. y Stachow, C.S.** (1972). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Rhodospseudomonas palustris*. I. Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 1-12.

- Springgate, C.F. y Stachow, C.S.** (1972). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Rhodospseudomonas palustris*. I. Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 1-12.
- 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.
- Staples, C.R., Ameyibor, E., Fu, W., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.L., Schürmann, P., Knaff, D.B. y Johnson, M.K.** (1996). The function and properties of the iron-sulfur center in spinach ferredoxin: thioredoxin reductase: a new biological role for iron-sulfur clusters. *Biochemistry*, 35: 11425-11434.
- Stein, M., Jacquot, J.P., Jeannette, E., Decottignies, P., Hodges, M., Lancelin, J.M., Mittard, V., Schmitter, J.M. y Miginiac-Maslow, M.** (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* thioredoxins: structure of the genes coding for the chloroplastic m and cytosolic h isoforms, expression in *Escherichia coli* of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. *Plant Mol.Biol.* 28: 487-503.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C.J., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W.P., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V. y Davis, R.W.** (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282: 754-759.
- Stitt, M. y Heldt, H.W.** (1985). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. Intracellular metabolite distribution and properties of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in leaves of *Zea mays* L. *Planta* 164: 178-188.
- Stitt, M., Herzog, B. y Heldt, H.W.** (1985). Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. Modulation of the spinach leaf cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase activity *in vitro* by substrate, products, pH, magnesium, fructose-2,6-bisphosphate, adenosin monophosphate and dihydroxyacetone phosphate. *Plant Physiol.* 79: 590-598.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. y Dubendorff, J.W.** (1990). Use of T7 RNA-polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185: 10-89.
- Tabor, S., Huber, H.E. y Richarson, C.C.** (1987). *Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.* 262: 16212-16223.
- Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K.I., Yokota, T., Wakasugi, H. y Yodoi, J.** (1989). ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin, possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* 8: 757-764.
- Thelander, L. y Reichard, P.** (1979). Reduction of ribonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 133-158.

Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Wathley, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karpk, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M. y Venter, J.C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.

Tonissen, K.F., Robins, A.J. y Wells, J.R.E. (1989). Nucleotide sequence of a cDNA encoding rat thioredoxin. *DNA Seq.* 4: 277-279.

Tonissen, K.F. y Wells, J.R.E. (1991). Isolation and characterization of human thioredoxin-encoding genes. *Gene* 102: 221-228.

Tonissen, K.F. y Wells, J.R.E., Cock, I., Perkins, A., Orozco, C. y Clarke, F. (1993). Site-directed mutagenesis of human thioredoxin. Identification of cysteine 74 as critical to its function in the early pregnancy factor system. *J. Biol. Chem.* 268: 22485-22489.

Toriyama, K., Hanaoka, K., Okada, T. y Watanabe, M. (1998). Molecular cloning of a cDNA encoding a pollen extracellular protein as a potential source of a pollen allergen in *Brassica rapa*. *FEBS Lett.* 424 (3): 234-238.

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

Trevanion, S.J. y Ashton, A.R. (1995). Cloning of a full-length cDNA clone for thioredoxin-m from maize. *Plant Physiol.* 110: 337.

Tsugita, A., Maeda, K. y Schürmann, P. (1983). Spinach chloroplast thioredoxins in evolutionary drift. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115 (1): 1-7.

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

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

Van Holde, K.E. (1971). *Physical Biochemistry*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, USA.

Verdoucq, L. y Meyer, Y. (1999). Characterisation of the *Arabidopsis thaliana* thioredoxin f family. *In press*.

Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y. y Lipscomb, W.N. (1995). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å Resolution. *Biochemistry* 34: 4299-4306.

Viswanathan, P.N. y Krishnan, P.S. (1962). Role of alkaline fructose-1,6-bisphosphatase in plants. *Nature* 193: 166-167.

Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y. y Lipscomb, W.N. (1995). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å Resolution. *Biochemistry* 34: 4299-4306.

Viswanathan, P.N. y Krishnan, P.S. (1962). Role of alkaline fructose-1,6-bisphosphatase in plants. *Nature* 193: 166-167.

Watabe, S., Hiroi, T., Yamamoto, Y., Fujioka, Y., Hasegawa, H., Yago, N. y Takahashi, S.Y. (1997). SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 249 (1): 52-60.

Wedel, N., Clausmeyer, S., Herrmann, R.G., Gardet-Salvi, L. y Schürmann, P. (1992). Nucleotide sequence of cDNAs encoding the entire precursor polypeptide for thioredoxin m from spinach chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 18 (3): 527-533.

Weder, H.G., Schildknecht, J. y Kesselring, P. (1971). A new equilibrium dialyzing system. *Amer. Lab.* 10: 15-21.

Weichsel, A., Gasdaska, J.R., Powis, G. y Montfort, W.R. (1996). Crystal structures of reduced, oxidized and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* 4 (6): 735-751.

Wetterauer, B., Jacquot, J.P. y Veron, M. (1992). Thioredoxins from *Dictyostelium discoideum* are a developmentally regulated multigene family. *J.Biol.Chem.* 267: 9895-9904.

Wiens, M., Koziol, C., Hassanein, H.M.A., Steffen, R., Schroeder, H.C., Batel, R. y Mueller, W.E.G. (1999). 17 β -estradiol-dependent regulation of chaperone function and telomerase activity in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mar. Biol.* In press.

Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laister, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., McMurray, A., Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Roopra, A., Saunders, D., Shownkeen, R., Smaldon, N., Smith, A., Sonnhammer, E., Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J. y Wohldman, P. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368: 32-38.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. y Li, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heat of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179: 131-137.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Wollman, E.E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J.P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Rober, P., Galibert, F., Bertoglio, J. y Fradelici, D. (1988).

Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A. y Hagelin, K. (1993). The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* 7: 622-637.

Wood, V., Barrell, B.G. y Rajandream, M.A. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* thioredoxin II. *Direct Submission to EMBL/GENBANK/DDBJ Data Banks.*

Xia, T.H., Bushweller, J.H., Sodano, P., Billetet, O., Björnberg, A., Holmgren, A. y Wüthrich, K. (1992). NMR structure of oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin: comparison with reduced *E. coli* glutaredoxin and functionally related proteins. *Protein Sci.* 1: 310-321.

Youle, R.J. y Huang, A.H.C. (1976). Development and properties of fructose-1,6-bisphosphatase in the endosperm of castor-bean seedlings. *Biochem. J.* 154: 647-652.

Zhang, Y., Liang, J.Y., Huang, S. y Lipscomb, W.N., (1993a). Crystal and molecular structure of the human liver fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the allosteric inhibitor AMP or ZMP at 2.3 Å resolution. PDB entry 1FTA. *To be published.*

Zhang, Y., Liang, J.Y., Huang, S., Ke, H. y Lipscomb, W.N., (1993b). Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 32: 1844-1857.

Zhang, R., Chen, L., Villeret, V. y Fromm, H.J. (1995) Glycine 122 is essential for cooperativity and binding of Mg²⁺ to porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 270 (1): 54-58.

Zheng, M., Aslund, F. y Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-1721.

Zhong, J., Ma, P., Parnell, L.D., Chen, C.N. and Chen, E.Y. (1999). BAC T5L23 from *Arabidopsis thaliana* chromosome IV, position 19 cM. *In press.*

Zimmerman, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. (1976). Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 70: 361-367.

Zimmerman, G., Kelly, G.J. y Latzko, E. (1978). Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 253: 5952-5956.

ANEXO I.

Reactivos y disoluciones de uso común utilizados en este trabajo

Fenol neutro (para 100 ml)

Fenol 100 g
Tris-HCl 1 M pH 8.0
Agua 95 ml

Colocar en un Erlenmeyer con agitación magnética. Cada cierto tiempo se deja decantar, se saca la fase acuosa y se mide el pH hasta que llegue a 8.0. Se va agregando Tris-HCl 50 mM pH 8.0 hasta conseguirlo.

GTE

Tris-HCl 25 mM pH 8.0
EDTA 10 mM
Glucosa 50 mM

TAE 50X (para 1 L)

242 g tris
57.1 ml ácido acético glacial
37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
H₂O c.s.p. 1 L

TBE 10X (para 1 L)

10 g Tris
55 g ácido bórico
40 ml EDTA 0.5 M pH 8.0