



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Clonaje, secuenciación y localización intracelular de la isoenzima BB de la fosfoglicerato mutasa de rata

Jesús Mariano Ureña Bares



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

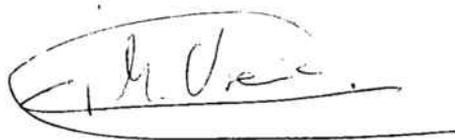
Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**CLONAJE, SECUENCIACION Y LOCALIZACION INTRACELULAR DE
LA ISOENZIMA BB DE LA FOSFOGLICERATO MUTASA DE
RATA**

JESUS MARIANO UREÑA BARES



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700081309

INDICE

Indice.	I
Abreviaturas.	VII
1. Introducción	1
1.1 Características generales.	2
1.2 Fosfoglicerato mutasas dependientes de cofactor.	6
1.2.1 Isoenzimas.	8
1.2.2 Transición isoenzimática a lo largo del desarrollo.	9
1.2.3 Localización intracelular.	11
1.2.4 Mecanismo de acción.	13
1.2.5 Fosforilación por tirosina-kinasas.	16
1.2.6 Patologías derivadas de baja actividad fosfoglicerato mutasa.	16
1.2.7 Clonaje de los cDNAs.	17
1.2.8 Estructuras primarias y secundarias.	17
1.2.9 Estructuras terciarias.	21
1.2.10 Estructuras cuaternarias.	22
1.2.11 Localización cromosómica.	23
1.3 Fosfoglicerato mutasas independientes de cofactor.	24
1.4 Bisfosfoglicerato mutasas.	27
1.5 Evolución de las fosfoglicerato mutasas.	30
Planteamiento y objetivos.	32
2. Materiales y Métodos	34
2.1. Materiales	35
2.1.1 Material Biológico	35
2.1.2 Productos Químicos	35

2.1.3	Tampones	36
2.1.4	Soluciones	37
2.1.5	Medios de Cultivo	38
2.2	Métodos aplicados al estudio de proteínas.	39
2.2.1	Extracción de proteínas.	39
2.2.2	Métodos cromatográficos.	39
2.2.3	Técnicas electroforéticos.	41
2.2.4	Concentración de proteínas.	44
2.2.5	Cuantificación de proteínas.	46
2.2.6	Determinación de actividades enzimáticas.	48
	Actividad fosfoglicerato mutasa.	48
	Actividad lactato deshidrogenasa.	50
	Actividad isocitrato deshidrogenasa.	51
	Actividad fosfatasa ácida.	52
2.3	Métodos inmunológicos.	53
2.3.1	Obtención y purificación de anticuerpos.	53
	Obtención del suero.	54
	Purificación de IgG.	54
	Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.	55
2.3.2	Técnicas de inmuno-blot.	56
	Dot-blot.	56
	Western-blot.	58
2.3.3	Inmunoinhibición enzimática.	59
2.3.4	ELISA.	61

	Determinación de la dilución óptima del conjugado.	61
	Límites de detección.	62
2.4	Métodos de localización intracelular	63
2.4.1	Inmunocitoquímica.	63
	A) Microscopía óptica.	63
	B) Microscopía electrónica.	65
2.4.2	Métodos de fraccionamiento subcelular	66
	A) Obtención de orgánulos.	66
	B) Purificación de núcleos.	68
2.5	Métodos de Biología Molecular.	70
2.5.1	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.	70
2.5.2	Obtención de DNA.	72
	Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala.	73
	Preparación de DNA plasmídico a gran escala.	74
	Ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio.	76
	Cromatografía de intercambio iónico en columnas QIAGEN.	76
	Obtención de DNA de cadena sencilla de M13.	77
2.5.3	Electroforesis ácidos nucleicos.	79
	Electroforesis de DNA.	79
	Electroforesis de RNA.	80
2.5.4	Digestiones ácidos nucleicos.	81
2.5.5	Titulación y amplificación de librerías	81
2.5.6	Screening de librerías de cDNA	82

	Transferencia a filtros de nitrocelulosa y tratamiento de los mismos.	83
	Hibridación de los filtros.	84
	Marcaje de la sonda.	86
	Lavados de los filtros.	87
	Revelado y aislamiento de los clones positivos.	88
2.5.7	Purificación de DNA de fago lambda.	88
2.5.8	Subclonaje de insertos aislados.	91
	Reacción de ligación.	93
	Transformación de células competentes.	93
2.5.9	Técnicas de secuenciación.	95
2.5.10	Análisis Northern-blot.	98
	Obtención del RNA.	99
	Electroforesis de RNA.	100
	Transferencia a filtro de nylon.	100
	Hibridación.	101
2.5.11	Análisis Southern-blot.	101
3.	Resultados.	103
3.1	Purificación de la fosfoglicerato mutasa-B de rata.	104
3.1.1	Extracción.	104
3.1.2	Precipitación.	104
3.1.3	Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa.	105
3.1.4	Cromatografía de adsorción en hidroxilapatita.	107

3.1.5	Cromatografía de afinidad en Cibacrom-Blue Sepharose-CI-6B.	109
3.1.6	Análisis de la proteína purificada.	111
	Electroforesis en SDS.	111
	Tabla de purificación.	112
	Determinación del peso molecular.	113
3.2	Resultados inmunológicos	114
3.2.1	Obtención de los anticuerpos.	114
	Detección de la reacción antígeno-anticuerpo.	115
	Determinación de la dilución óptima.	116
	Western-blot.	118
3.2.2	Inmunoinhibición actividad enzimática.	120
3.2.3	ELISA	122
3.2.4	Purificación IgG.	125
3.2.5	Purificación de los anticuerpos.	127
3.3	Localización intracelular.	130
3.3.1	Inmunocitoquímica.	130
	Microscopía óptica.	130
	Microscopía electrónica.	133
3.3.2	Fraccionamiento subcelular.	138
3.3.3	Obtención de núcleos puros.	139
3.4	Clonaje y secuenciación.	145
3.4.1	Aislamiento de clones positivos en librería de cerebro.	145
3.4.2	Secuenciación del cDNA.	150

3.4.3	Nuevo aislamiento de clones positivos en librería de corazón.	152
3.4.4	Secuencia completa del cDNA.	155
3.4.5	Comparación a nivel de diferentes cDNAs.	156
3.4.6	Comparación a nivel de secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas de la familia fosfoglicerato mutasa.	163
3.4.7	Predicción de estructura secundaria y distribución de cargas.	165
3.4.8	Predicción de punto isoeléctrico y peso molecular.	171
3.4.9	Comparación con otros puntos isoeléctricos y pesos moleculares de proteínas de la misma familia.	172
3.4.9	Northern-blot.	173
3.4.10	Southern-blot.	174
4.	Discusión.	175
4.1	Purificación de la PGM-B de rata.	176
4.2	Obtención y análisis de los anticuerpos.	178
4.3	Localización intracelular.	180
	Inmunocitoquímica de las isoenzimas fosfoglicerato mutasa.	181
	Discusión del posible significado funcional.	182
4.4	Clonaje y secuenciación.	184
5.	Conclusiones.	188
6.	Bibliografía.	191

ABREVIATURAS

En esta memoria se utilizan, además de las habituales en Bioquímica, las siguientes abreviaturas:

2,3-BPG	2,3 Bisfosfoglicerato
BPGM	Bisfosfoglicerato mutasa
BSA	Albúmina bovina sérica
Ci	Curie
CK	Creatin-kinasa
cpm	Cuentas por minuto
ddNTP	Dideoxinucleótido fosfato
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetracetato
ELISA	Enzyme linked immunosorbent analysis
kb	kilobase
kd	kilodalton
MES-K	Morfolinetanosulfonato de potasio
MOPS	Acido 3-(N-morfolin)-proanosulfónico
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Forma reducida del NAD ⁺
PAGE	Poliacrilamide gel electrophoresis
pb	Pares de bases
PEP	Fosfoenol piruvato
2-PG	2-fosfoglicerato
3-PG	3-fosfoglicerato
PGM	Fosfoglicerato mutasa
PGM-B	Isoenzima B de la PGM
PGM-M	Isoenzima M de la PGM
PIPES	N,N'-bis (2-etanosulfónico)-piperacina
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
RF	Replicative factor
RNasa	Ribonucleasa
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TDG	Tiodiglicol
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

1. INTRODUCCION

1.1. CARACTERISTICAS GENERALES

La glicólisis, o vía de Embden–Meyerhoff es la vía metabólica que lleva a cabo la degradación anaeróbica de la glucosa para producir ácido láctico, constituyendo uno de los mecanismos biológicos más primitivos de obtención de energía a partir de moléculas orgánicas. Ha sido conservado en todos los eucariotas, en todas las eubacterias y en la gran mayoría de las arqueobacterias con la única excepción de dos especies de bacterias termoacidófilas: *Sulfolobus solfataricus* y *Thermoplasma acidophilum* (Budgen y Danson, 1986; De Rosa et al., 1984; Fothergill–Gilmore y Watson, 1989).

Además de la glicólisis, existen otras vías de oxidación de las hexosas como la vía de Etner–Doudoroff, o la vía de las pentosas monofosfato, pero todas convergen en un mismo conjunto de reacciones conocido como la vía de las triosas (fig. 1.1) que transforman el gliceraldehido–3–fosfato en piruvato.

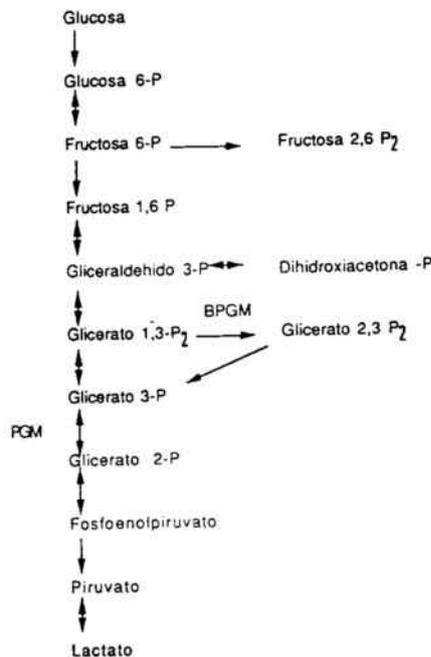


Figura 1.1. Esquema de la glicólisis con indicación de las enzimas estudiadas en este trabajo: PGM y BPGM.

Dentro de las reacciones que completan esta vía, la fosfoglicerato mutasa (PGM, E.C. 5.4.2.1) cataliza reversiblemente la interconversión entre el 3-fosfoglicerato y el 2-fosfoglicerato (Fig. 1.2). Esta reacción presenta un ΔG° de 1.06 Kcal/mol (Lehninger, 1982), y fué detectada por vez primera en 1935 por Meyerhoff y Kiesling trabajando con extractos de levadura y músculo, en los que observaron la presencia de isómeros ópticos del fosfoglicerato, concluyendo que correspondían al 3-fosfoglicerato (3-PG) y al 2-fosfoglicerato (2-PG).

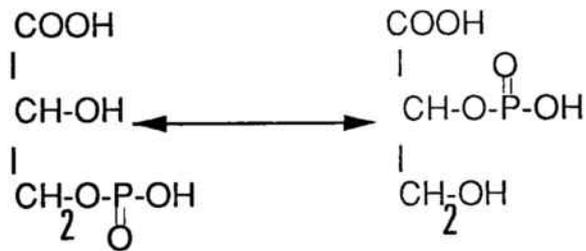


Figura 1.2. Esquema de la reacción catalizada por la fosfoglicerato mutasa.

Posteriormente, en 1949, Sutherland y colaboradores observaron que la reacción precisaba de un cofactor: el 2,3 bisfosfoglicerato (2,3-BPG) y propusieron un primer mecanismo de reacción.

En 1956, Grisolia describió la actividad de biosíntesis del 2,3-BPG, así como las diferencias existentes entre la enzima de mamíferos y de levadura. Dos años más tarde, en 1958, Ito y Grisolia describían una actividad fosfoglicerato mutasa procedente de plantas que no era activada por el 2,3 BPG, trabajo ampliado posteriormente por el mismo grupo (Fernández y Grisolia, 1960, Grisolia et al., 1961), determinando que correspondía a una enzima diferente de la descrita previamente en levadura y extracto de músculo esquelético.

Las primeras purificaciones descritas de la PGM se deben a Rodwell et al. (1956 y 1957), y a Torralba y Grisolia (1966), quienes además determinaron su peso molecular de forma bastante aproximada a como se ha publicado posteriormente.

El mecanismo de la reacción, aunque fué objeto de controversias en sus primeros estudios (Grisolia y Cleland, 1968; Chiba et al., 1970), fué elucidado por los estudios de Britton y col., (1972 a, b, 1973) que propusieron que la enzima de mamíferos catalizaba la reacción a través de un mecanismo del tipo ping-pong mediante la formación de un fosfoenzima intermediario.

Ommen y Cheung, describieron en 1974 la presencia de al menos tres formas isoenzimáticas de la fosfoglicerato mutasa en mamíferos, cuya distribución variaba a lo largo del desarrollo y en función del tejido estudiado. Así en las primeras etapas del desarrollo sólo observaban la presencia de la forma isoenzimática B (del inglés brain), mientras que en etapas posteriores se detectaba la presencia de la isoenzima M (muscle). En músculo cardíaco comprobaron la existencia de ambas isoenzimas, junto con una tercera de movilidad electroforética intermedia a la que denominaron MB. Este trabajo fué ampliado por Mezquita y Carreras (1981), quienes determinaron la presencia de isoenzimas en otros vertebrados, estudiaron la distribución filogenética de las PGM, y determinaron los organismos en que se encontraban PGM dependientes e independientes de cofactor.

Las tres formas isoenzimáticas de mamíferos fueron copurificadas por Bartrons y Carreras (1982), demostrando que las tres isoenzimas provenían de la combinación homo y heterodimérica de dos subunidades M y B.

La primera secuencia completa de aminoácidos obtenida corresponde a la forma de levadura y fué descrita por Fothergill y Harkins en 1982. Esta secuencia fué después confirmada por la secuenciación del cDNA correspondiente realizado por el mismo grupo (White et al., 1988). En cuanto a mamíferos, tras la demostración de la existencia de dos genes codificantes para las dos subunidades M y B (Fundele et al., 1981; Junien et al., 1982), se clonaron y secuenciaron los cDNA codificantes para la forma PGM-M humana (Shanske et al., 1987), PGM-B humana (Sakoda et al., 1988), PGM-M de rata (Castellà

et al., 1989), así como se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la isoenzima B humana (Blouquit et al., 1988). Se ha descrito además el clonaje y la secuenciación del gen correspondiente a la PGM de musculo esquelético humano (Tsujino et al., 1989; Castellà et al., 1990).

La actividad fosfoglicerato mutasa se localiza en todos los organismos que llevan a cabo la glicólisis salvo las excepciones antes mencionadas y es, por lo tanto, una actividad enzimática que presentan prácticamente todos los seres vivos. Aunque la reacción catalizada es la misma, se han descrito distintas enzimas con actividad fosfoglicerato mutasa, siendo la de mayor actividad catalítica la PGM. Esta enzima se presenta en dos formas: dependiente del 2,3-BPG e independiente del 2,3-BPG. Otra enzima con actividad mutasa es la 2,3 bisfosfoglicerato mutasa (BPGM), enzima cuya actividad mutasa es minoritaria respecto a sus actividades principales: síntesis y degradación del 2,3-BPG.

1.2 FOSFOGLICERATO MUTASAS DEPENDIENTES DE 2,3 BPG

Inicialmente fueron clasificadas como transferasas (E.C. 2.7.5.3) pero actualmente se clasifican como isomerasas (E.C. 5.4.2.1).

Necesitan la presencia del 2,3 BPG para llevar a cabo la reacción tal como fué observado por Sutherland y col. en 1949. Este tipo de PGM es el que presentan todos los vertebrados, así como numerosos tipos de invertebrados: Plelmintos, Anélidos, Moluscos, y dentro de los Artrópodos las clases Crustáceos e Insectos. Las PGM de Vertebrados son diméricas mientras que la única PGM de invertebrados estudiada: la del platelminto Fasciola hepatica se ha visto que es tetramérica. Dentro de los hongos encontramos también PGM dependientes de cofactor: Sacharomyces cerevissiae, Candida utilis, Penicillium janthinellum, las cuales son tetraméricas, o como es el caso de Schizosacharomyces pombe monoméricas (Price et al. 1985 a). Los protistas han sido poco estudiados en cuanto a la presencia de PGM, en realidad sólo Dyctiostelium discoideum, y Padina pavonia han sido analizados, y ambos presentan PGM dependientes de cofactor. Las bacterias muestran gran diversidad en cuanto a enzimas, y se encuentran organismos que han desarrollado tanto formas dependientes como independientes del cofactor. Entre los primeros están E.coli, Leuconostoc sp, Pseudomonas sp, y Flavobacterium sp, todos ellos gram negativos. Las PGM bacterianas son monoméricas o diméricas.

Las PGM dependientes del 2,3 BPG han sido estudiadas mucho más ampliamente que las independientes. El descubrimiento de la actividad PGM se realizó en extractos de levadura y de músculo esquelético de mamífero, ambas dependientes del 2,3 BPG y no fué hasta 1958 en que Ito y Grisolia describieron una actividad independiente de cofactor en germen de trigo.

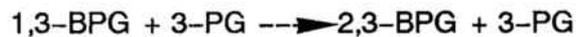
Las PGM dependientes del 2,3-BPG catalizan tres tipos de reacciones aunque en proporciones diferentes:

a) -Transferencia de grupo fosfato a partir de 2,3-BPG y 3-PG para dar lugar a 2-PG y 2,3-BPG



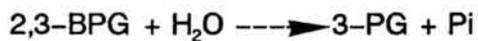
Es con mucho la actividad mayoritaria y la más importante en este tipo de enzimas. Está incrita en la via glicolítica tal como se representa en la figura 1.1

b) -Reacción de síntesis de 2,3-BPG a partir de 1,3-BPG y 3-PG



Esta reacción es minoritaria en este tipo de enzimas (Bartrons y Carreras, 1982) y es inhibida por producto.

-Reacción de degradación del 2,3-BPG



Tambien minoritaria, es activada por el 2-fosfoglicolato

Las constantes catalíticas para cada reacción son bastante diferentes (Leadlay et al., 1977; Rose, 1980; Bartrons y Carreras, 1982), siendo la actividad mutasa unas 1000 veces superior a las otras actividades. Las constantes de Michaelis conocidas son del orden de 100-200 μM para el 3-PG y del orden 0.3-0.5 μM para el 2,3-BPG (Rose, 1980; Bartrons y Carreras, 1982).

Estas enzimas son inhibidas por vanadato (Climent et al., 1981; Carreras et al., 1980), polifosfatos (Rose et al., 1980), mono y bisfosfonometil (McAleese et al., 1985, 1987), y por agentes modificadores de residuos de histidina (Carreras et al., 1982b), arginina (Borders y Wilson, 1976), lisina (Berrocal y Carreras, 1984) y cisteína (Berrocal y Carreras, 1987).

1.2.1 ISOENZIMAS

Aunque se ha postulado la existencia de isoenzimas en distintas especies, solamente en mamíferos han sido exhaustivamente estudiadas

Diederich et al., (1970), observaron una mayor sensibilidad a las sales de mercurio por parte de la PGM purificada de músculo esquelético respecto a la purificada de otros tejidos, sugiriendo la presencia de isoenzimas específicos de tejido. El mismo grupo determinó un aumento de la sensibilidad a las sales de mercurio durante el desarrollo embrionario en músculo esquelético (Grisolía et al., 1970).

La existencia de isoenzimas fué confirmada por Ommen y Cheung (1974) y los mismos demostraron la existencia de especificidad isoenzimática en tejidos de humanos. Adamson, en 1976 alcanzó los mismos resultados en tejidos de ratón, describiendo al mismo tiempo un cambio en el patrón isoenzimático de teratocarcinomas. La PGM activa resulta de la combinación homo y heterodimérica de dos tipos de subunidades: M (muscle) y B (brain). Así, el músculo esquelético posee la isoenzima MM, mientras que los restantes tejidos poseen la isoenzima BB (Chen et al., 1974; Prehu et al., 1984). En músculo cardíaco y fetal se observa la presencia simultánea de las tres isoenzimas MM, MB y BB. A pesar de que ambas isoenzimas difieren en la sensibilidad térmica y frente a los reactivos sulfhidrilo (Mezquita et al., 1981; Mezquita y Carreras, 1981), son muy similares entre sí. Las dos subunidades (M y B) poseen un peso molecular de 30000 y sus características inmunológicas son muy similares (Castellà et al., 1988).

La reciente determinación de la secuencia de aminoácidos y clonaje de los cDNA

de ambas subunidades (vease apartado 1.2.7) corroboran esta gran similitud. La diferente susceptibilidad a la inactivación por mercurio o tetrionato (la forma M es totalmente inhibida mientras que la forma B no es afectada) se debe al residuo de cisteina presente en el centro activo (Fothergill-Gilmore y Watson, 1989), que en el caso de la forma B es una serina y por lo tanto no es susceptible del ataque por reactivos tiólicos. Igualmente, ambas isoenzimas difieren en la estabilidad térmica, siendo la mas lábil la forma B (Mezquita et al., 1981).

Bartrons y Carreras copurificaron simultaneamente las tres isoenzimas de músculo cardíaco porcino, determinando unas Km respecto el 3 PG para las isoenzimas MM, MB y BB de 0.23, 0.11 y 0.12 mM respectivamente y para el 2,3 BPG de 0.5, 0.42 y 0.35 μ M. Las velocidades máximas determinadas en U/mol de enzima fueron: 137.000, 113.000 y 106.000 respectivamente.

Aunque en geles de poliacrilamida, las dos subunidades poseen la misma migración, en electroforesis de acetato de celulosa, debido a diferencias de punto isoelectrico, es posible diferenciarlas claramente. Así la isoenzima BB tiene una migración superior a la forma MM, mientras que la isoenzima MB posee una movilidad intermedia.

1.2.2 TRANSICION ISOENZIMATICA A LO LARGO DEL DESARROLLO

La distribución isoenzimática de la fosfoglicerato mutasa a lo largo del desarrollo en el músculo esquelético presenta una clara transición. Así en las primeras etapas del desarrollo embrionario, únicamente es detectada la forma BB. A partir del tercer mes de gestación en el caso humano y quince dias en el caso de la rata empieza a detectarse la forma M en forma del heterodímero MB. A partir del quinto mes de gestación en el caso humano, y de los veinte dias despues del nacimiento en la rata, se observa que en el músculo esquelético predomina de forma casi exclusiva la forma MM (Ommeng y Cheung, 1974; Adamson, 1976; Mezquita y Carreras, 1981). Esta transición ha sido observada tambien en tejidos en músculo esquelético y cardíaco de ratón (Adamson, 1976).

Análogamente, en neoplasias de cerebro se ha observado que hay un cambio isoenzimático de la forma BB a la forma MM (Ommen y Hermodson, 1975) que podría ser explicado por un incremento de las necesidades energéticas de la célula transformada.

Es significativo la homología existente entre la transición isoenzimática sufrida por la fosfoglicerato mutasa y otra enzima típicamente muscular: la creatina kinasa. La creatina kinasa presenta una forma específica de músculo (isoenzima M) y una forma que se expresa en el resto de tejidos (isoenzima B); en las primeras etapas del desarrollo, en músculo esquelético se encuentra la forma B, que es gradualmente sustituida por la forma M, de manera análoga a lo que ocurre para la PGM, y además en unos periodos de desarrollo muy parecidos (Eppemberger, 1966; Ommen y Cheung, 1974; Adamson, 1976). Las profundas analogías que se dan en la expresión de ambos genes, apoyan la idea de que el control de la expresión es muy parecido. Por esta razón es importante tener en cuenta los estudios que sobre la creatina kinasa se han llevado a cabo en los últimos años. El gen específico de músculo ha sido clonado (Jaynes et al., 1986) y se han estudiado regiones promotoras y "enhancer" (Jaynes et al., 1988). Análogamente ha sido descrito el clonaje del gen M de la PGM (Tsujino et al., 1989; Castellà et al., 1990 a).

En comparación con la creatina kinasa, los conocimientos sobre la regulación génica de la fosfoglicerato mutasa son muy inferiores. Recientes estudios (Castellà et al., 1990 c) realizados en tejidos adultos y en cultivos de células musculares en diferenciación demuestran que la regulación de la expresión selectiva de las isoenzimas MM y BB de la PGM se localiza a nivel de la transcripción. Es muy probable que se demuestre que se trata de dos genes específicos de músculo controlados por unos pocos factores diferenciadores específicos de músculo, como por ejemplo MyoD (Davis et al, 1987; Wright et al., 1989, Davis et al., 1990). En cultivos inervados se observa una transición isoenzimática que no se da en los cultivos no inervados (Martinuzzi et al., 1987). Resultados similares han sido obtenidos por Andrés et al. (1989) mediante electroforesis de las isoenzimas en tejidos adultos de rata. Aunque Castellà et al. (1990 c), estudiando la aparición de mRNA en células satélite musculares en diferenciación demuestran que la inervación no es necesaria para la formación de la isoenzima MM.

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha observado una transición isoenzimática acelerada por un tratamiento con hormonas tiroideas (Esteller et al., datos no publicados). Datos a tener en cuenta de cara al conocimiento final de la regulación de la transcripción de los genes de la PGM.

Respecto a los restantes tejidos, hay que señalar la presencia de la forma M en testículo adulto (Fundele et al., 1987), de forma parecida a lo que ocurre para la lactato deshidrogenasa, fosfoglicerato kinasa y enolasa (Goldberg, 1976; VandeBerg et al, 1976; Edwards y Grootegoed, 1983), con lo cual, la expresión en este tejido estaría regulada por factores específicos y presumiblemente diferentes de los del músculo esquelético.

1.2.3 LOCALIZACION INTRACEULAR

La distribución intracelular de las enzimas glicolíticas fué estudiada por primera vez por Siebert (1961), quien sugirió que la mayoría de las enzimas glicolíticas se localizaban también en los nucleos celulares de hígado. No obstante la metodología empleada comportaba probablemente la ruptura de muchos nucleos y alta contaminación citoplasmática de los mismos, por lo que su trabajo no fué considerado de relevancia. En 1975, Kuehl, en la descripción de purificación de nucleos de músculo esquelético que se ha utilizado en esta tesis, observó que una cierta proporción de lactato deshidrogenasa, piruvato kinasa y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa se localizaba también en nucleo. En 1985 se demostró la existencia de la lactato deshidrogenasa en nucleo con una función de "DNA binding protein" (en concreto como proteína desestabilizadora de unión al DNA de cadena sencilla) (Cattaneo et al., 1985; Grosse et al., 1986; Biocca et al., 1984; Calissano et al. 1985; Williams et al., 1985). Además Wistow et al. (1987), Chion et al. (1988) y Gosti et al. (1987) describieron funciones estructurales para la lactato deshidrogenasa, mientras que Hosokawa et al. (1988) publicaron la presencia de la lactato deshidrogenasa en matrices vesiculares (partículas extracelulares asociadas a la calcificación del cartílago). Fenómenos parecidos se describieron para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Grosse et al., 1986). Se encontró que la enolasa podía tener una función de heat-shock protein (Iida et al., 1985), y además Piatigorsky (1989) vió que era

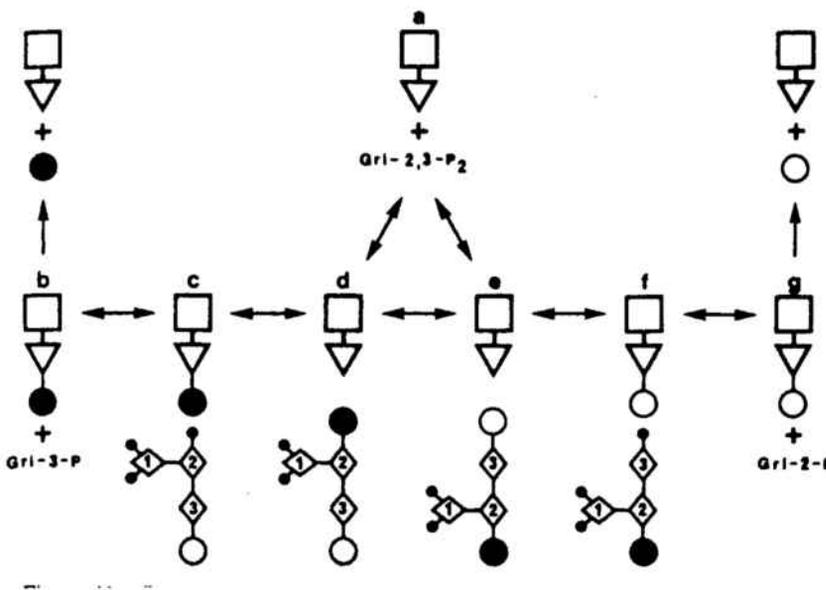
una proteína con función estructural en el cristalino de algunos animales. Otra enzima glicolítica, la piruvato kinasa, es al mismo tiempo una proteína de unión a hormonas tiroideas (Kato et al., 1989), mientras que la fosfoglicerato kinasa puede actuar también como un cofactor de la DNA polimerasa α (Jindal y Vishwanatha, 1990). Estos hechos sugerían que las enzimas glicolíticas podían tener una localización distinta de la meramente citosólica, así como que estas enzimas, proteínas muy antiguas desde un punto de vista evolutivo, probablemente podrían haberse adaptado a otras funciones celulares.

El hecho de que otras proteínas enzimáticas musculares, tales como la creatina kinasa, se encuentren unidas a los elementos contráctiles (Clarke et al., 1975; Walliman et al., 1977; Sumi y Kishino, 1983) conjuntamente con la presencia antes descrita de enzimas glicolíticas en núcleo, nos indujo a llevar a cabo la localización intracelular de la PGM no sólo para comprobar su presencia en otros orgánulos celulares diferentes al citosol (como ya había sido apuntado por Siebert), sino también su posible asociación específica a proteínas estructurales de músculo esquelético, ya que según lo descrito por Clarke y col. en 1975, existía una baja afinidad de la PGM por las proteínas estructurales musculares, pero no existían datos acerca de la localización subcelular de la PGM.

1.2.4 MECANISMO DE ACCION

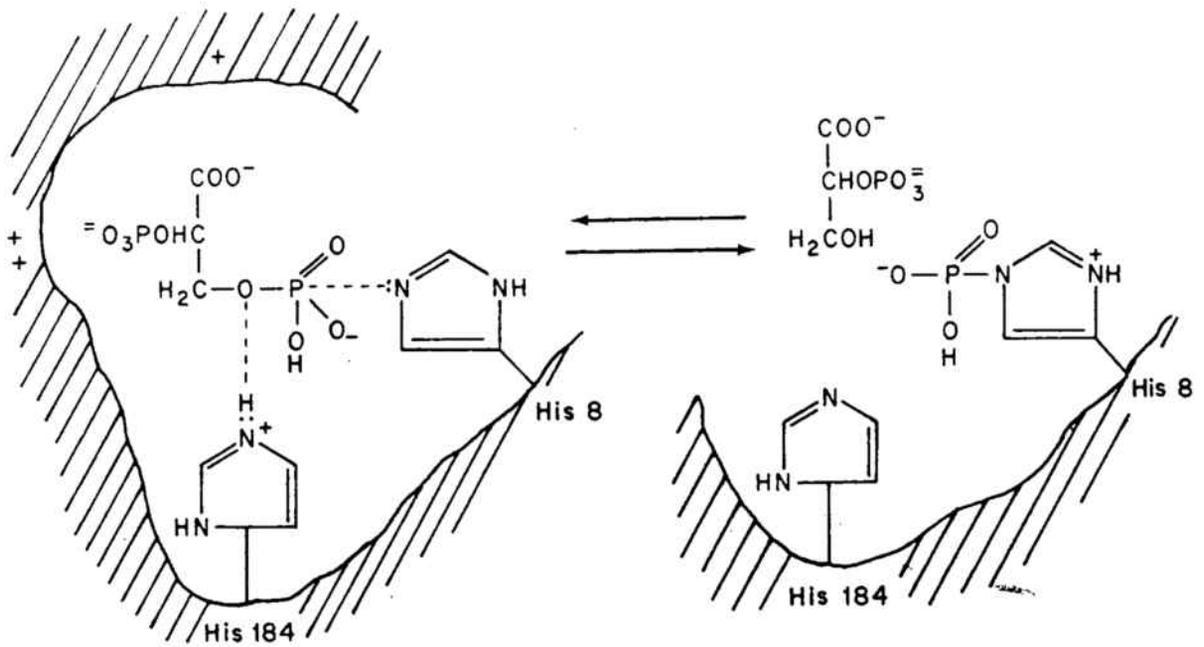
El mecanismo de reacción es del tipo ping-pong y ocurre a través de la formación de un fosfoenzima intermediario (Britton et al., 1972a; Winn et al., 1981; Fothergill-Gilmore y Watson, 1989). Un esquema de la secuencia de reacciones se representa en la figura 1.3. La enzima libre reaccionaría con el 2,3 BPG o con 1,3-BPG para formar el fosfoenzima, el cual es relativamente estable en ausencia de un aceptor adecuado (vida media aprox. 1-2 min, Britton et al 1972a). Los aceptores son glicerofosfatos, o análogos, que permiten o bien la formación de 2,3 BPG o bien la hidrólisis del Pi del fosfoenzima (como el 2-fosfoglicolato). Los productos de la transferencia dependerían de los aceptores presentes en el medio de reacción.

Figura 1.3 Esquema de la secuencia de reacciones de la PGM dependiente de cofactor. Los círculos grandes representan los grupos fosfatos. La nomenclatura es: Gri-2,3-P₂: 2,3-BPG; Gri-2-P: 2-PG; Gri-3-P: 3PG. (Tomado de Fothergill-Gilmore y Watson, 1989).



La figura 1.4 ilustra la reacción de formación del fosfoenzima. Una vez formada el fosfoenzima, la interacción en el centro activo con una molécula bien de 3-PGA o de 2-PGA produciría una molécula de 2,3 BPG nueva que podría de nuevo actuar para formar un nuevo fosfoenzima.

Figura 1.4 Esquema de la formación del fosfoenzima. (Tomado de Rose, 1980).



La histidina 185, actuaría como donante de protones necesarios para la reacción (Rose, 1980), liberándose 2-PGA o 3-PGA. Seguidamente las concentraciones de 2-PGA o 3-PGA que se unan al centro activo determinarán la dirección glicolítica o gluconeogénica de la reacción.

La actividad sintasa de la enzima sería explicada por un mecanismo similar. El 1,3-BPG se uniría al centro activo de tal forma que el fosfato del carbono 1 quedaría en una posición adecuada para ser transferido a la histidina-10. Una vez producida la transferencia del grupo fosfato, el grupo carboxilo sería repelido por la fosfohistidina. Al entrar una molécula de 3-PGA, el grupo hidroxilo 2' atacaría la fosfohistidina formando el producto 2,3 BPG. El hecho de que la reacción sea estimulada por el 3-PGA (Rapaport y Luebering, 1952) sería debido probablemente a un efecto de acción de masas favoreciendo la presencia de una molécula de 3-PGA en el centro activo. Las diferencias existentes en las constantes catalíticas para la reacción de BPGM y PGM serían probablemente debidas a diferencias en los pK_a de la histidina 185. La reacción de la fosfoglicerato mutasa requiere la transferencia de un protón, mientras que la reacción de síntesis del 2,3 BPG no, siendo por lo tanto independiente del pK_a de la His-185. Parece pues que en la evolución de las BPGM se han producido cambios que han incrementado la eficiencia de la reacción sintasa, alterando el pK_a de la histidina 185, y bajando consiguientemente la K_{cat} de la reacción mutasa.

La actividad fosfatasa sería explicada por la propia hidrólisis del fosfoenzima. El hecho de que el 2-fosfoglicolato estimule la actividad fosfatasa (Rose y Liebowitz, 1970) sería debido a la mimetización del 2-fosfoglicolato que le permitiría entrar en el centro activo, pero juntamente con una molécula de agua (al ser más pequeño que el fosfoglicerato), con lo que se transferiría el grupo fosfato de la histidina 10 a la molécula de agua (Rose, 1980).

1.2.5 FOSFORILACION DE LA PGM POR TIROSIN KINASAS

La PGM es una de las enzimas glicolíticas fosforilada por las tirosin kinasas asociadas con el factor de crecimiento epidérmico y con el receptor de insulina (Reiss et al., 1986; Sale et al., 1987). Así como también son fosforiladas por tirosin-kinasas la enolasa y la lactato deshidrogenasa. La explicación de este fenómeno no está clara, es posible que sea debido simplemente a un efecto inespecífico por ser todas ellas proteínas muy abundantes en la célula y tener residuos fosforilables accesibles, pero también es posible que tenga algún significado fisiológico. El hecho de que estas tres enzimas glicolíticas fosforilables, se localizan también en el núcleo celular abre nuevas expectativas respecto a la posible función de estas proteínas fosforiladas.

1.2.6 PATOLOGIAS DERIVADAS DE BAJA ACTIVIDAD PGM

Aunque las deficiencias de PGM han sido poco estudiadas, se han descrito casos de individuos con bajos niveles de actividad PGM muscular que podían mantener vidas normales con la excepción de la realización de ejercicio intenso. La viabilidad es posible gracias a la presencia de pequeñas cantidades de la isoenzima BB, cantidades de enzima que son suficientes para llevar a cabo la glicólisis aunque en un nivel muy inferior al normal. En concreto han sido publicados tres casos de individuos con bajos niveles de actividad PGM muscular (DiMauro et al., 1982; Bresolin et al., 1983; Kissel et al., 1985). Estas patologías son transmitidas de forma autosómica recesiva. El hecho de que hayan sido descritos pocos casos de deficiencias en PGM estriba en la absoluta dependencia que de esta reacción tiene la célula; la carencia de la misma, bloquea la glicólisis y por lo tanto la principal vía de obtención de energía. Una mutación que cause una ausencia total de actividad mutasa es letal para la célula y es seleccionada en contra, razón por la cual no se detectan mutantes carentes de la misma.

Actualmente está en estudio la posibilidad de la utilización de la PGM como posible marcador de enfermedades musculares y de infarto de miocardio (estudios que se están realizando actualmente en nuestro laboratorio, Carballo et al., 1990).

1.2.7 CLONAJE DE LOS cDNAs

En 1987, Shanske y col. clonaron el cDNA de la forma M humana. El cDNA que obtuvieron codificaba para una proteína de 253 aa. con una zona no codificante 5' de 35 nucleótidos y una zona no codificante 3' de 22 pb, presentando una señal de poliadenilación a 15 pb del extremo 3'. El mismo grupo, un año mas tarde, describió el clonaje del cDNA correspondiente a la forma B humana. A pesar de que las zonas codificantes de ambas isoenzimas humanas presentan una homología elevada (75 %) se observan grandes diferencias entre las zonas 3' no codificantes. La zona no codificante de la isoenzima B es 45 veces mayor que la de la forma M, hecho similar al observado para los cDNAs de la creatin-kinasa (Billadello et al., 1986). El clonaje del cDNA de la forma M de rata fué llevado a cabo en nuestro laboratorio (Castellà et al., 1989), al igual que el de la forma B de rata que es objeto de esta tesis. Los cDNAs correspondientes a la PGM-M de rata y humana presentan una homología del 87 %, con una secuencia "consensus" de iniciación de la traducción idéntica (Castellà et al, 1989). Los clones genómicos correspondientes a la forma M fueron publicados por Tsujino y col. (1989) y por Castellà y col. (1990). La comparación de las proteínas codificadas por estos cDNA reveló una homología del 75 % para ambas formas humanas. Una comparación detallada de estas proteínas puede encontrarse en la discusión de esta tesis.

1.2.8 ESTRUCTURAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DE LAS PGM

Actualmente se han determinado las secuencias de aminoácidos de las PGM de levadura (Fothergill y Harkins, 1982; White y Fothergill, 1988), PGM-M humana (Shanske et al. 1987), PGM-B humana (Sakoda et al., 1988; Blouquit et al., 1988), PGM-M de rata (Castellà et al., 1989), BPGM humana (Haggarty et al., 1983; Joulin et al., 1986), y BPGM de conejo (Yanagawa et al., 1986). Entre todas ellas existe una alta homología que en el menor de los casos es de un 50 % (PGM de levadura con respecto a la PGM de mamíferos). La figura 1.5 muestra la alineación de estas secuencias conocidas. Destaca la alta conservación que existe entre los aminoácidos esenciales para llevar a cabo la reacción. Así His 10, Arg 9, Arg 61, Glu 88, His 185 estan conservadas en todas las PGM

(la nomenclatura corresponde a la secuencia de la PGM humana).

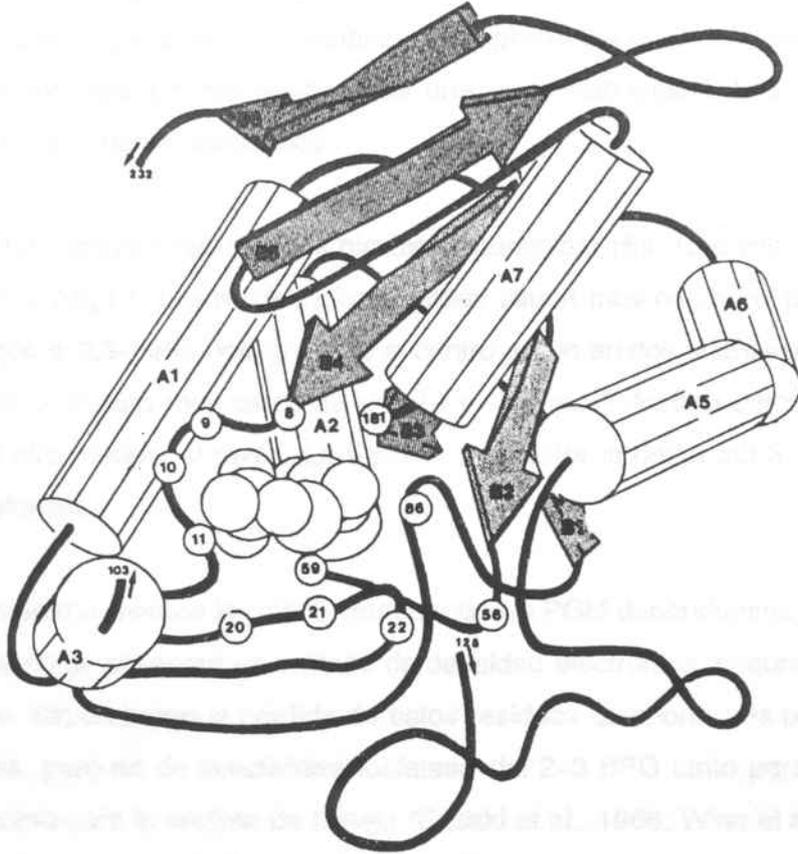
A partir de las secuencias de aminoácidos de las diversas PGM se han realizado diversos estudios informáticos sobre la posible estructura secundaria de las PGM. La predicción de este tipo de estructuras es prácticamente igual para todas las PGM de mamífero. Seis zonas de las PGM son candidatas a la presencia de estructura en hélice alfa (residuos 30–60, 100–115, 150–165, 180–200, 195–210, 230–250), mientras que la presencia de estructura beta es menos marcada. Para la PGM de levadura ha sido determinada su estructura secundaria por Fothergill y Harkis, y se representa en la figura 1.6.

Hay que añadir la homología en principio inesperada, existente con otra enzima relacionada con la glicólisis, la 6–fosfofructo–2–kinasa/fructosa 2,6 bisfosfatasa (PFK–2) (Tauler et al. 1987). Así a nivel del centro activo tanto del dominio bisfosfatasa de la PFK–2 (residuos 250–349) como de la PGM (residuos 1–108) existe una homología del 33 %, dato que apoya la idea de un origen común de ciertas enzimas glicolíticas.

Figura 1.5 Alineación de las secuencias de aminoácidos conocidas con anterioridad a esta tesis de las diferentes PGM. RP-M: PGM-M de rata; HP-M: PGM-M humana; HP-B: PGM-B humana; YP: PGM de levadura; MB: BPGM de ratón; HB: BPGM humana; RbB: BPGM de rata. (Según Castellà et al, 1989).



Figura 1.6 Representación de las estructuras terciaria de la PGM de levadura con indicación de las zonas con estructura en hélice alfa y en hoja beta. B: hoja beta; A: hélice alfa. (Fothergill-Gilmore y Watson, 1989).



1.2.9 ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA PGM

La estructura tridimensional de la PGM ha sido estudiada únicamente en levadura y fué determinada por Winn y col. en 1981, mostrando que la enzima estaba compuesta por cuatro subunidades idénticas. El esqueleto polipeptídico se pliega alrededor de un dominio sencillo con un núcleo de cadenas beta rodeado de alfa-hélices de forma parecida a lo encontrado para deshidrogenasas y kinasas (Campbell et al., 1974). Se localizó el centro activo utilizando proteína pura cristalizada en presencia de 3-PG, detectándose en una concavidad formada por los residuos de una única subunidad. Los cuatro centros activos aparecen libremente accesibles.

En el centro activo destacan dos histidinas paralelas: His-10 e His-185, así como la Arg 9, Ser 13, y Arg 61. Los modelos construidos sitúan muy cerca la His-10 y la His-185 indicando que el 2,3-BPG podría unirse al centro activo en dos orientaciones posibles: una con el grupo 3-fosfato muy cerca de His-10 y el grupo 2-fosfato cerca del amino de la hélice 7; y el otro modelo al revés. La figura 1.4 muestra la unión del 3-PG y el 2-PG a la enzima fosforilada.

Mención aparte merece la cola C-terminal de las PGM dependientes, formadas por 14 residuos, que no se observan en el mapa de densidad electrónica, seguramente por ser una cola flexible. Sin embargo la pérdida de estos residuos comporta una pérdida total de actividad mutasa, pero no de la actividad fosfatasa del 2-3 BPG tanto para la enzima de *S.cerevisiae* como para la enzima de conejo (Sasaki et al., 1966; Winn et al., 1981; Price et al., 1985b; Fothergill-Gilmore y Watson, 1989). La secuencia en levadura es: AAAGAAVANQGKK. Los primeros 6 residuos permiten flexibilidad, por lo que dicha cola puede adoptar una conformación que modula el acceso al centro activo. Una de las dos lisinas consecutivas puede compensar la carga negativa introducida por el sustrato, lo cual ayudaría a estabilizar el estado de transición. Por lo tanto las funciones que se hipotetizan para la cola C-terminal son:

-exclusión de H₂O del centro activo.

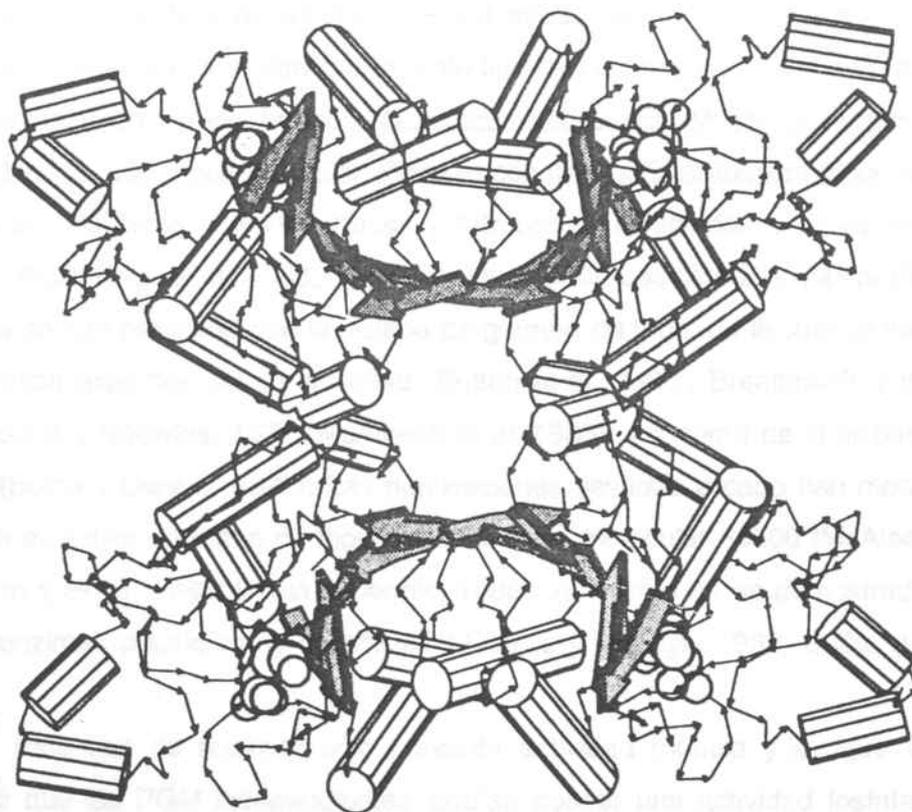
-estabilización del estado de transición, asegurando que la transferencia de fosfato ocurre solamente en ausencia de H₂O y previene la actividad fosfatasa.

-ayuda, mediante la estabilización de carga, a retener el complejo intermediario ya que el 2,3 BPG protege la PGM de conejo de la proteólisis pero no el 3-PG (Price et al., 1985b; Fothergill-Gilmore y Watson, 1989).

1.2.10 ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS PGM

La forma activa de las PGM dependientes de cofactor depende del organismo estudiado, así en *S.cerevisiae*, *C.utilis*, *P.janthinellum* y *E.hepatica* se trata de un tetrámero (Edelhoich et al., 1957; Price et al., 1983; Willets, 1980; Schulman y Valentino, 1982) (figura 1.7), en *S.Pombe* es un monómero (Hill y Atwod, 1976; Price y col., 1985a), en *E.coli*, *Zymomonas mobilis* e un dímero (D'Alessio y Josse, 1971; Pawluk et al., 1986; Cowgill y Pizer, 1956) y en mamíferos es también un dímero (Bartrons y Carreras, 1982). La disponibilidad de la estructura tridimensional de la PGM de levadura, así como la alta homología con las secuencias de mamíferos ha permitido explorar la naturaleza de los contactos que existen entre las subunidades en la enzima de levadura con detalle. Así los contactos existentes en la enzima de levadura serían de dos tipos: el primero implicaría los aminoácidos de la hoja beta-1 y de la hélice alfa-2, en la que estarían envueltos los residuos 56-88 aproximadamente; el segundo tipo de contactos implicaría a los aminoácidos que preceden a la hélice alfa-5 (residuos 141-146). Esta segunda zona, presenta una gran variación en las PGM de mamíferos, por lo que es posible que fuera la responsable de que la forma activa fuera dimérica y no tetramérica en estos casos, sin que esto afectara a la pérdida de actividad enzimática.

Figura 1.7 Estructura tetramérica de la PGM de levadura publicada por Fothergill-Gilmore y Watson, 1989).



1.2.11 LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LOS GENES PGM

En humanos, se ha llevado a cabo el estudio de la localización cromosómica de los genes de la PGM. Junien et al. (1982), mediante experimentos de dosis génica, averiguaron que el gen correspondiente a la PGM-B estaba en el cromosoma 10. Este trabajo fué completado por Castellà et al. (1990), al asignar el gen correspondiente a la forma M al cromosoma 7.

Este estudio se ha llevado a cabo también para la BPGM (Barichard et al., 1987), habiéndose determinado su localización en el cromosoma 7.

1.3 FOSFOGLICERATO MUTASAS INDEPENDIENTES DE COFACTOR

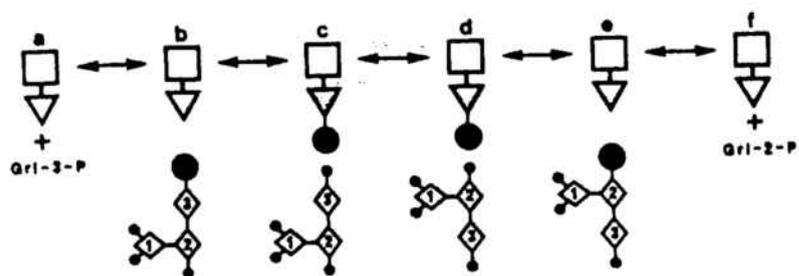
Estas enzimas llevan a cabo la reacción de transferencia del grupo fosfato por un mecanismo diferente al de las PGM dependientes. Han sido en general menos estudiadas que las pertenecientes al otro grupo. Este tipo de enzimas es el que se presenta en todas las plantas y en ciertos hongos: *N.crassa*, *A.Nidulans*, *Mucor plumbeus*, *Phycomyces blakesleanus*, *Rhizopus stolonifer*, *Pythium acanthium*, *Chaetomium globosum*, en los tipos Cnidarios, Poríferos, Equinodermos, y Artrópodos (Arácnidos y Miriápodos) (Grisolía y Joyce, 1959; Price et al., 1983; Carreras et al., 1980). Los estudios más profundos con esta enzima se han realizado con la aislada de germen de trigo, de la cual se han determinado numerosos aspectos de su actividad (Britton et al., 1971; Breathnach y Knowles, 1977; Gatehouse y Knowles, 1977; McAleese et al, 1985), así como de la enzima de aceite de ricino (Botha y Dennis, 1986). Las purificaciones llevadas a cabo han mostrado que esta enzima es activa en forma de monómero de peso molecular 60000 (McAleese et al, 1985; Johnson y Price, 1988; Botha y Dennis, 1986). Asimismo se ha demostrado la existencia de isoenzimas plasmáticos y citosólicos (Dennis y Miernyk, 1982; Botha y Denis, 1986)

Este tipo de enzimas sólo presenta actividad mutasa y aunque en principio se postuló que las PGM independientes podían poseer una actividad fosfatasa minoritaria, resultados recientes han descartado esta posibilidad (Graña et al., 1989). Estas enzimas carecen también de actividad de síntesis del 2,3 BPG y no están implicadas en su metabolismo.

El mecanismo de reacción por el cual se lleva a cabo la reacción es similar al de las fosfoglicerato mutasas dependientes del 2,3 BPG. Existen evidencias de la existencia de un fosfoenzima intermediario (Breathnach y Knowles, 1977), si bien el hecho de que su pH óptimo sea superior al caso de las enzimas dependientes (Grisolia et al., 1961), hace pensar que el fosfoenzima no se formaría a través de una fosfohistidina intermediaria.

Un esquema del mecanismo de reacción se presenta en la figura 1.8 (tomado de Fothergill-Gilmore y Watson, 1979).

Figura 1.8 Esquema del mecanismo de reacción de la PGM independiente de cofactor.



Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio, a partir de germen de maíz, han corroborado la presencia de dos isoenzimas de la BPGM independiente del 2,3-BPG. Se ha purificado la isoenzima citosólica a homogeneidad, y se ha determinado que posee un peso molecular de 64000 D. Las K_m respectivas para el 3-PG y el 2-PG son 324 + 13 y 369 + 20 μM , con un pH óptimo de 7.8 + 0.1. Esta enzima no ve afectada su actividad por la presencia de vanadato (hasta 1 mM) ni por tetrionato (hasta una concentración de 10 mM). Los estudios inmunológicos muestran ausencia de reacción antígeno-anticuerpo con PGM dependientes y con otras PGM independientes como la de Bacillus sp, arácnidos u hongos (Graña et al., 1989).

Los datos parciales de secuencia de aminoácidos y de la secuencia de cDNA, corroboran las diferencias estructurales existentes entre las PGM dependientes e independientes de cofactor (Graña et al., 1990).

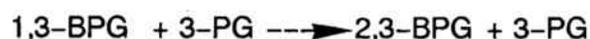
1.4 BISFOSFOGLICERATO MUTASAS

La bisfosfoglicerato mutasa (E.C. 2.7.5.4) cataliza la síntesis y degradación del 2,3 bisfosfoglicerato, presentando además una actividad monofosfoglicerato mutasa de orden bastante menor. Se encuentra principalmente en eritrocitos, donde el 2,3 BPG ejerce una importante función fisiológica al modular la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (Rapaport y Luebering, 1950 y 1952; Brewer y Eaton, 1971) disminuyéndola y facilitando la liberación del oxígeno en los tejidos periféricos de humanos y de otros vertebrados (Chanutin y Curnish, 1967; Benesch et al., 1968; Benesch y Benesch, 1969). Algunos mamíferos como artiodáctilos: gato, cabra y oveja así como civetas, hienas y leones, presentan concentraciones muy bajas de 2,3 BPG (Rapaport y Guest, 1941; Harkness et al., 1969; Bartlett, 1970; Bunn et al., 1974). Los eritrocitos de gato en particular presentan niveles de BPGM muy bajos. La explicación a este fenómeno radica en que las hemoglobinas de estos animales tienen una afinidad por el oxígeno muy baja con lo cual la liberación de éste en los tejidos periféricos no plantea problema; en caso de stress hipóxico, estos organismos sintetizan una hemoglobina sensible al 2,3 BPG, y con una alta afinidad por el O₂ (Fothergill-Gilmore y Watson, 1989)

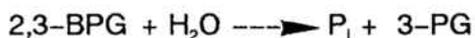
Estas enzimas aparecen en los anfibios donde ya ejercen la función descrita, pero no se encuentran en peces y su aparición evolutiva es relativamente reciente.

Las tres reacciones que catalizan esta enzimas tienen en común la transferencia de un grupo fosforilo (Rosa et al., 1975; Sasaki et al, 1975):

a) –Actividad bisfosfoglicerato sintasa



b) –Actividad bisfosfoglicerato fosfatasa



c) –Actividad fosfoglicerato mutasa



La primera actividad, 2,3-BPG sintasa, es la más importante y es fuertemente inhibida por el producto al competir con el sustrato tal como fué demostrado por Rapaport y Luebering en 1952.

La segunda actividad, 2,3 BPG fosfatasa, es activada por iones inorgánicos como fosfatos y sulfitos (Rose y Liebowitz., 1970; Sasaki et al., 1975), y también por el 2-fosfoglicolato (Hass y Miller, 1975; Kappel y Hass, 1976; Rose y Salon, 1979). Es inhibida por el producto 3 PG cuando el 2,3 BPG se encuentra en una concentración inferior a la fisiológica (Rose y Liebowitz, 1970).

La tercera actividad, fosfoglicerato mutasa, es muy baja y utiliza el 2,3 BPG como cofactor (Rose y Liebowitz, 1970; Ikura et al, 1976).

Aunque el tejido donde se presenta en una mayor proporción esta enzima es el eritrocito, también ha sido detectada actividad BPGM en otros tejidos (Carreras et al., 1981). La proteína ha sido purificada por diferentes autores a partir de eritrocitos (Ikura et al., 1976; Narita et al., 1979; Rose y Dube, 1976). Posteriormente se demostró que la BPGM podía formar heterodímeros con las formas B y M de la monofosfoglicerato mutasa in vitro. (Rosa et al. 1984; Pons y Carreras, 1985; Pons et al., 1985; Tauler et al., 1986; Prehu et al., 1988). Pons et al. (1985) han propuesto que las combinaciones heterodiméricas de la subunidad de la BPGM de eritrocito (forma E) con las subunidades de la monofosfoglicerato mutasa M y B daría lugar a las diferentes actividades BPGM

específicas de tejido. Así la forma ME sería específica de músculo esquelético, y la forma BE sería la que se encontraría en el resto de tejidos, mientras que el homodímero EE sería específico de hematíe.

Esta enzima ha sido exhaustivamente estudiada en hematies de mamífero, La forma activa es un dímero de peso molecular 58000, ha sido determinada la secuencia de aminoácidos de la BPGM humana (Haggarty et al., 1983), igualmente han sido clonados y secuenciados los cDNA correspondientes a las formas humana y de conejo (Joulin et al., 1986, Yanagawa et al., 1986). En ambos casos corresponde a una proteína de 258 aa, presentando una homología de más del 90 % entre ambas especies. Es de destacar la alta homología existente entre éstas enzimas y las monofosfoglicerato mutasas dependientes del 2,3 BPG que es del orden del 50 % en cuanto a composición de aminoácidos. Probablemente es debido a un origen común y se trataría de genes parálogos (Dobzhansky, 1978).

Ha sido aislada, a partir de tejido no eritrocitario, una bisfosfoglicerato fosfatasa que no tiene actividad mutasa ni sintasa (Chiba y Sasaki, 1978). Esta enzima no es estimulable por el 2-fosfoglicolato y probablemente no es homóloga de las PGM.

1.5 EVOLUCION DE LAS PGM

Las enzimas glicolíticas son proteínas con tasas de evolución lentas, que oscilan entre el 4 % y el 6 % cada 100 millones de años (Fothergill–Gilmore, 1986). Esta tasa de evolución es comparable con la del citocromo C que es una de las proteínas más conservadas en todos los organismos, lejos de otras proteínas como la anhidrasa carbónica, las ribonucleasas A y la tripsina con velocidades de evolución mucho más altas (Dayhoff, 1978; Fothergill–Gilmore, 1986). Este dato está de acuerdo con las diferencias observadas en el caso de las PGM de rata y humana (4%), y *Sacharomyces* y humana (50 % de divergencia). Teniendo en cuenta la distribución filogenética de las distintas PGM, puede asegurarse que la divergencia entre las BPGM y las monofosfoglicerato mutasas se produjo entre la radiación teleosteos–anfibios y la radiación anfibios–reptiles, es decir entre 400–300 millones de años (entre el Carbonífero y el Triásico), ya que los anfibios utilizan el 2,3 BPG como regulador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, no así los teleosteos. La evolución sufrida habría sido de tipo paráloga, es decir por duplicación de un gen ancestral que habría ido cambiando hasta formar dos proteínas con actividades enzimáticas principales diferentes. Por el mismo argumento se sugiere que la divergencia entre la PGM–M y la PGM–B se habría producido más tarde, entre la radiación de los reptiles y los diversos órdenes de mamíferos, es decir entre los 300 y los 100 millones de años. Sin embargo, la tasa de evolución sería algo superior, ya que las diferencias encontradas son mayores de lo que cabría esperar asumiendo una tasa de evolución de 5 % cada 100 millones de años.

La falta de datos de secuencias de proteínas hace difícil el establecer hipótesis evolutivas en cuanto a las PGM independientes del 2,3 BPG. Así como parece seguro que todas las PGM dependientes del 2,3 BPG son proteínas homólogas provenientes de un único gen ancestral común, la falta de datos publicados de secuencias de PGM independientes del 2,3 BPG, hace que no pueda asegurarse lo mismo. Es posible que se trate de varios genes que han aparecido en momentos distintos de la evolución, o bien que sean todos provenientes del mismo gen. Llama la atención el que dentro del Phylum Artrópodos, la Clase Insectos y Crustaceos presenten PGM dependientes del 2,3 BPG y la Clase Miriápodos y Arácnidos presenten PGM independientes. Igualmente es paradójico

que los Equinodermos (organismos Deuterostomos, ya próximos a los Procordados y Cordados y según algunos autores antecesores de estos) presenten PGM independientes de cofactor. Cabe la hipótesis de dos genes ancestrales: uno que codificaría para una PGM independiente y otro para una PGM dependiente, que a lo largo de la evolución se habrían mantenido hasta que se hubiera perdido una copia en algún grupo evolutivo, como las plantas y los Cordados. Las sondas de PGM independientes proveniente de *Zea mays* de la cual ya se dispone en nuestro laboratorio, ayudará sin duda a resolver numerosas cuestiones referentes a la evolución de las PGM, al poderse experimentar la hibridación por Southern-blot con DNAs de diferentes especies.

PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

Esta tesis se inscribe dentro de una línea de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Bioquímica de la Facultad de Medicina desde hace varios años, que tiene como objetivo la elucidación del control de la expresión diferencial de las isoenzimas de la fosfoglicerato mutasa, en función del tejido y del estado de desarrollo.

En el momento del inicio del trabajo experimental, se habían descrito la existencia de isoenzimas primarios de la PGM (MM, MB y BB) provenientes de la combinación homo y heterodimérica de dos subunidades M y B (Bartrons y Carreras, 1982), así como su distribución diferencial a lo largo del desarrollo y del tejido estudiado (Mezquita y Carreras, 1981). El estudio del control de su expresión, requería el clonaje de los cDNA codificantes para ambas subunidades, para el posterior estudio de las regiones reguladoras. Se determinó como objetivo principal de esta tesis el clonaje y la secuenciación del cDNA codificante por la forma B de la PGM de rata para lo cual se diseñó una estrategia consistente en :

- purificación de la PGM B de rata
- obtención de los anticuerpos policlonales correspondientes
- screening de una librería de expresión de rata adecuada con los anticuerpos policlonales.
- secuenciación de los clones positivos.

Posteriormente, debido a la reacción cruzada existente entre los anticuerpos, se decidió abordar el clonaje de la PGM-B de rata mediante una sonda correspondiente al cDNA de la isoenzima muscular.

Asimismo, los datos publicados por otros grupos sobre localización intracelular de diferentes enzimas glicolíticas, hacían especialmente interesante, este estudio, por cuanto

parecía que la localización subcelular de estas enzimas no tenía por que ser exclusivamente citosólica. Por lo tanto se definió como objetivo paralelo de esta tesis la localización intracelular de las isoenzimas de la PGM en diferentes tejidos de rata utilizando para ello los anticuerpos fabricados para el clonaje. Los objetivos concretos en este caso fueron:

- fraccionamiento subcelular de diferentes tejidos y determinación de actividades enzimáticas e inmunorreactividad en los distintos orgánulos.

- inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica y electrónica.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo han sido empleados los siguientes materiales biológicos:

Rattus norvegicus variedad Sprague Dawley, machos adultos de peso comprendido entre 200 y 250 g. Ha sido la especie estudiada en esta traabajo, ha servido como fuente de tejido para la purificación de la proteína, localización intracelular y clonaje y secuenciación del cDNA correspondiente.

Oryctolagus cuniculus (conejo), raza New Zeland, ha sido la especie inmunizada con la proteína, para la obtención de anticuerpos contra la misma.

Escherichia coli K12. Se han utilizado diferentes cepas, ha servido como huesped de plásmidos y bacteriófagos recombinantes. Las diferentes cepas son descritas exhaustivamente en el apartado 2.5

Plásmidos y bacteriófagos. Han sido los vectores utilizados en la manipulación de las moléculas de DNA. Se describen exhaustivamente en el apartado 2.5

2.1.2 PRODUCTOS QUÍMICOS

Todos los productos utilizados en este trabajo han sido de calidad analítica, Merck o Sigma. Caso de ser de marca diferente se especifica en el apartado correspondiente. Las enzimas y sustratos glicolíticos han sido Boehringer. Los productos utilizados en Biología Molecular han sido de calidad especial para Biología Molecular, Boehringer, Sigma o Pharmacia, en caso contrario se especifica la marca en el apartado correspondiente.

2.1.3 TAMPONES

Tampón carbonato: Carbonato sódico 0.1 M, pH 9.6, azida sódica 0.02 %.

GIT: Isoctiocianato de guanidina (Fluka) 4M, acetato sódico 0.025M pH 6.0. Filtrado a través de poro de 0.8 μ m. Se añade 2-mercaptoetanol 0.83 %.

PBS: NaCl 0.14 M, KCl 0.026 M, disuelto en tampón fosfatos 20 mM, pH 7.2 – 7.4.

PBLS: PBS conteniendo Tween 20, 0.05 %.

SM: NaCl 0.1 M, MgSO₄ 0.2 %, Tris 50 mM pH 7.5, Gelatina 0.01 %. Se autoclava para esterilizar.

STET: NaCl 0.1 M, EDTA 1mM, Tris 10 mM pH 8.0, Triton X-100 5 %. Se prepara a partir de soluciones madre estériles.

SSC x 20: NaCl 3M, Citrato trisódico dihidratado 0.3 M, pH 7.0. Se autoclava para esterilizarlo.

SSPE x 20: NaCl 3.6 M, NaH₂PO₄ 0.2 M, EDTA 20 mM, pH 7.7. Se autoclava para esterilizarlo.

TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0. Se prepara 50 veces concentrado. Se autoclava.

TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH variable: 7.4, 8.0. Se utiliza autoclavado.

TBE: Tris-borato 50 mM, pH 8.5, EDTA 1 mM. Se prepara 10 veces concentrado. Se filtra para esterilizar a través de filtro de 0.22 μ m.

TBS: NaCl 0.15 M, Tris-HCL 50 mM, pH 7.4.

TFB: KCl 100 mM, MnCl₄·H₂O 45 mM, CaCl₂ 10 mM, hexamina de cobalto 3 mM, disuelto en MES-K 10 mM, pH 6.2.

2.1.4 SOLUCIONES

Cloroformo/isoamílico: 24 volúmenes de cloroformo por un volumen de alcohol isoamílico.

Denhardt's 5 x: Polivinilpirrolidona 0.1 %, BSA 0.1 %, ficoll 0.1 %. Se prepara concentrado x 50 ó x 100, y se filtra a través de un poro de 0.22 µm.

DNA de esperma de salmón: Se prepara a una concentración de 10 mg/ml, se hace pasar por una jeringa hipodérmica para romper las moléculas grandes y se filtra a través de 0.22 µm.

Fenol equilibrado: 250 g de fenol (BRL) se le añade 0.250 mg de hidroxiquinoleína, y se satura con un volumen de Tris 1 M pH 8.0, se extrae la fase acuosa, y se repite la extracción dos veces con un volumen de Tris 0.1 M pH 8.0.

Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico: 100 ml de fenol equilibrado, 96 ml de cloroformo, 4 ml de alcohol isoamílico.

Formamida desionizada: 1 l de formamida, 100 g de resina Ag 501-X8 (Bio Rad), se agita durante una hora y se filtra a través de Whatman 3 MM.

IPTG: Isopropil-β-D-galactopiranosido 100 mM en agua estéril, filtrado (0.22 µm).

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido al 2 % en dimetil formamida.

Todos los reactivos utilizados para Biología Molecular eran antes esterilizados

mediante autoclavado o filtración.

2.1.5 MEDIOS DE CULTIVO

LB: Bactotripton (Difco) 1 %, extracto de levadura (Difco) 0.5 %, NaCl 0.5 %; pH 7.5. Autoclavado.

SOB: Bactotripton (Difco) 2 %, extracto de levadura (Difco) 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, pH 7.4. Autoclavado.

YT: Bactotripton (Difco) 0.8 %, extracto de levadura (Difco) 0.5 %, NaCl 0.5 M, pH 7.4. Autoclavado.

2YT: Bactotripton (Difco) 1.6 %, extracto de levadura (Difco) 1 %, Na Cl 0.5 %, pH 7.4. Autoclavado.

Medio sólido con agar o agarosa: Cualquiera de los medios indicados conteniendo agar o agarosa a 1.5 %.

Medio "soft" agar o agarosa: Cualquiera de los medios indicados conteniendo 0.7 % agar o agarosa.

2.2 METODOS APLICADOS AL ESTUDIO DE PROTEINAS

2.2.1 PREPARACION DE EXTRACTOS DE TEJIDOS

La extracción de proteínas se ha realizado a partir de tejidos congelados en N₂ líquido. Usualmente la extracción se ha llevado a cabo mediante la adición de tres volúmenes por gramo de tejido de la solución:

Tris-HCl	20mM
EDTA	1mM
2-Mercaptoetanol	1mM
pH 7.4	

A continuación se homogeneizaba utilizando un aparato Sorvall-Omnimixer modelo 17106 (DuPont Instruments) a 3000-5000 rpm durante 3 min. El material no soluble se eliminó mediante centrifugación a 8000 g durante 1 h a 4 °C.

Los extractos así preparados se utilizaban para la determinación de actividades enzimáticas, cuantificación de proteínas, y para la purificación de la fosfoglicerato mutasa. Se prepararon diversos extractos procedentes principalmente de cerebro, músculo, corazón, hígado y riñón.

2.2.2 SEPARACIONES CROMATOGRAFICAS

Han sido utilizadas tres tipos de cromatografías en la purificación de proteínas: cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa, cromatografía de adsorción en hidroxilapatita y cromatografía de afinidad en Cibacron-blue Sepharose CL-6B.

Todos los procesos cromatográficos se desarrollaban en cámara fría (4 °C)

a) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa

A continuación se describe la preparación de las columnas. Las condiciones concretas de cada proceso cromatográfico se exponen en el apartado de resultados.

La resina (DE–Celulosa P–23 Whatman), se trata con 20 volúmenes (peso/volumen) de HCl 0.5 M durante 2 horas. Seguidamente se lava en Buchner con agua destilada y desionizada hasta que el pH es próximo a 4. A continuación es tratada con 20 volúmenes de NaOH 0.5 M durante 1 hora. Se lava, también en Buchner, hasta que el pH de salida es de 7.5. En este punto, el pH se ha de acidificar utilizando HCl hasta que sea igual a 4. Se desgasifica en un kitasato utilizando una bomba de vacío, se eleva el pH hasta 7.5 utilizando Tris 1 M, y se equilibra con el tampón Tris–HCl 20 mM, EDTA 1 mM, 2–mercaptoetanol 1 mM, pH 7.4. El equilibrado se lleva a cabo primero en Buchner y a continuación en columna a un flujo de 40 ml/h. Se consideraba que la columna estaba empaquetada cuando había sido lavada con un mínimo de 20 volúmenes de tampón.

En este tipo de cromatografías las columnas empleadas han sido de 3 cm de diámetro por 30 cm de largo

b) Cromatografía en hidroxilapatita

La resina (hidroxilapatita, Bio–Rad) se preparaba tratando con 20 volúmenes de tampón fosfato 10 mM, pH 6.9, durante 30 minutos, una cantidad de resina variable entre los 10 y 15 gramos para una columna de 1.5 x 15 cm. Transcurrido este periodo, se eliminaba el tampón por decantación, arrastrando consigo los finos de la resina. Se añadía de nuevo tampón y este proceso se repetía 6 veces. A continuación se empaquetaba la resina en la columna y se equilibraba con 20 vol del mismo tampón a un flujo de 15 ml/h.

c) Cromatografía de afinidad en Cibacrom Blue–Sephrose CL–6B

El Cibacrom Blue es un compuesto capaz de establecer numerosas interacciones con moléculas complejas como deshidrogenasas o transferasas. La resina (Sephrosa CL–6B con Cibacrom, Pharmacia), era pesada y aproximadamente 6 g se hidrataban con 10 vol de tampón Tris–HCl 10mM, 2–mercaptoetanol pH 7.4, dejándose en reposo durante 24

h a temperatura ambiente, cambiando varias veces el tampón.. Se desgasifica mediante una bomba de vacío y se empaqueta en una columna de 20 x 1.5 cm. Se lava con una solución de NaCl 2 M para eliminar las moléculas unidas labilmente al conjunto Cibacron-Sepharosa. Seguidamente se equilibraba con el tampón a un flujo de 10 ml/h.

2.2.3 TECNICAS ELECTROFORETICAS

a) Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE)

Basada en el método de Laemmli (1970), este método emplea el SDS (Sodio Dodecil Sulfato) como detergente que desnaturaliza y apantalla la carga intrínseca de las proteínas. Este detergente se une en una cantidad constante a las proteínas (1.4 g de SDS/g proteína), las rodea, confiriéndoles a todas las proteínas una misma relación carga/masa. La migración, depende, pues de la cantidad de SDS unido a la proteína, la cual, a su vez depende de la masa de la misma. La separación, se produce en consecuencia, en función del peso molecular de las proteínas, no actuando, pues, la carga.

El método de Lemmli, utiliza además, dos geles: en primer lugar un gel concentrador de ancho poro, bajo pH (6.5), y baja fuerza iónica; en segundo lugar emplea un gel de poro estrecho (varía del 10% al 18% según el tamaño de las proteínas a separar), pH elevado (8.5) y alta fuerza iónica. En este segundo gel, denominado gel separador es donde se realiza la separación de las moléculas propiamente dicha. El resultado final es un aumento muy importante de la resolución gracias a que en el primer gel se produce una concentración de las diferentes proteínas en orden de movilidad electroforética, que intensifica la resolución proporcionada por el gel separador.

b) Preparación del gel y desarrollo de la electroforesis

En esta tesis se han utilizado geles de poliacrilamida al 12%, muy apropiados para el tamaño de las proteínas con las que se ha trabajado (20 - 80 kD). Los geles concentradores han sido siempre al 3% de acrilamida.

Composición del gel separador: Tris-HCl 380 mM, pH 8.8, SDS 0.1%, acrilamida 12%, bisacrilamida 0.302%, persulfato amónico 0.03%, TEMED (Merck) 0.025%.

Composición del gel concentrador: Tris-HCl 120 mM, pH 6.5, SDS 0.1%, acrilamida 3%, bisacrilamida 0.15%, persulfato amónico 0.02% y TEMED 0.025%. Este gel se prepara una vez que el gel separador está montado y polimerizado (la polimerización se produce a causa del persulfato amónico y el TEMED necesitando alrededor de 1 hora). Se deposita justo encima del gel separador y se coloca un peine de material inerte que conforma el pozo donde se depositará la muestra.

A las muestras se les añade un volumen de tampón de carga que contiene: Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 8% y azul de bromofenol al 0.024%. A continuación se hierve la muestra 3 min , y queda lista para la aplicación en la electroforesis.

Como tampón de electroforesis se ha utilizado Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8.3, SDS 0.1 %.

El campo eléctrico aplicado ha sido de 20 mA durante la migración en el gel concentrador, la intensidad se doblaba (40 mA) cuando el frente llegaba al gel separador, por lo que el voltaje resultante iba aumentando desde 120 V iniciales hasta 200 V. En este punto se modificaban las condiciones. Se mantenía constante el voltaje a 200 y el amperaje iba bajando hasta 20 mA aproximadamente que coincidía con la llegada del frente de azul de bromofenol al final del gel.

c) Tinción y destinción del gel

Según las cantidades de proteínas que esperamos se puede utilizar la tinción con Coomassie Blue (detecta hasta 1 μ gramo de proteína por banda), o bien la tinción argéntica (Ohsaba y Ebata 1983) que detecta aproximadamente 10 veces menos proteína.

La tinción con Coomassie Blue se ha realizado sumergiendo el gel durante una hora

en una solución que contenía Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio Rad) 0.25%, metanol 45% (v/v), y ácido acético glacial 9.2% (v/v). A continuación, se decoloraba con una solución de metanol 45 % y acético al 10%.

La tinción argéntica implicaba la eliminación en una primera fase del SDS. Para ello, se efectuaba un primer baño del gel en metanol durante 2 horas, seguido de un baño en agua destilada durante una hora. Este proceso se repetía dos veces. Se dejaba toda la noche el gel en una solución de metanol al 50%, y a la mañana siguiente se volvían a repetir los mismos lavados.

La tinción se hace sumergiendo el gel durante 15 minutos en una solución colorante que consta de nitrato de plata 0.2%, amoníaco 0.34% y hidróxido sódico 0.2%. Esta solución era preparada al momento. Seguidamente se lavaba el gel con agua destilada durante 5 mlñ, y se revelaba con una solución que contenía ácido cítrico 0.005% y formaldehído 0.019 %, hasta que aparecían las bandas de proteína (aproximadamente 10 min). Completado el revelado, el gel se fijaba en una solución de metanol al 45%, acético al 10%, durante 2 horas, transcurridas las cuales, el gel podía guardarse en una solución de glicerol al 10%.

d) Electroforesis preparativa

Se ha realizado electroforesis preparativas como alternativa al último paso de la purificación de la fosfoglicerato mutasa cerebral. En esta electroforesis, el grosor del gel era de 4 mm en lugar de 1 mm utilizado para el caso de las electroforesis analíticas. La composición del gel era idéntica al caso de las electroforesis analíticas, así como el tratamiento de las muestras y el desarrollo electroforético. La tinción se llevaba a cabo mediante el tratamiento con una solución de acetato sódico 4 M durante 20 min. El acetato sódico contrastaba las proteínas de tal forma que sobre fondo negro e iluminación oblicua, podían visualizarse las bandas de proteínas que permanecen transparentes mientras el gel de poliacrilamida se vuelve blanco, permitiendo que pudieramos recortar la banda que nos interesase para proceder a su posterior electroelución.

E) Electroelución de bandas de proteínas

Para la electroelución de bandas de proteína se ha utilizado un aparato Isco modelo 1750. La banda de poliacrilamida era recortada y depositada en un pozo diseñado a tal fin. En el otro pozo del dispositivo se fijaba una pequeña membrana de diálisis (32/32 Visking) donde queda la proteína eluída. Comunicando ambos pozos hay tampón de electrofoerisis Tris 12mM, glicina 95mM, pH 8.3, SDS 0.5%, para disminuir la cantidad de sales y de SDS que quedarán en el eluído. Se aplica una corriente de 150 V y al cabo de 2 horas se recogen 200 μ l del eluído. Se repite la extracción a las 4 h y a las 6 horas.

La muestra así purificada queda concentrada en un volumen relativamente pequeño de tampón.

F) Electroforesis en acetato de celulosa de isoenzimas fosfoglicerato mutasa

Los diferentes isoenzimas de la fosfoglicerato mutasa pueden ser distinguidas en base a su distinta movilidad electroforética en soportes de acetato de celulosa, utilizando tampón veronal (barbital sódico), como tampón de electroforesis. Concluida la migración a 250 V durante 1h 30 min, se realiza una tinción específica de actividad enzimática de acuerdo con lo descrito por Andrés y col. (1989).

La isoenzima MM, presenta la movilidad mas baja debido a su más elevado punto isoelectrico, seguida de la isoenzima MB y la isoenzima BB, la cual por presentar un punto isoelectrico más bajo es la de más alta movilidad electroforética.

2.2.4 CONCENTRACION DE PROTEINAS

a) Liofilización

La liofilización de proteínas se ha llevado a cabo utilizando un liofilizador marca Telstar. La muestra previa diálisis frente a agua destilada y desionizada, se congelaba y

era depositada en la cámara de liofilización, donde se aplicaba el vacío y una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se hacía el vacío. En estas condiciones el agua en que estaba disuelta la proteína se sublima, y se consigue la liofilización en un plazo dependiendo del volumen inicial entre 4 y 24 horas.

b) Diálisis inversa con polietilen glicol.

La muestra a tratar se depositaba en una membrana de diálisis Visking 32/32 y se enterraba en un recipiente conteniendo Polietilen glicol 6000. Debido al efecto osmótico provocado, el agua sale de la membrana de diálisis, concentrando de esta manera la proteína hasta el volumen deseado.

c) Precipitación de proteínas.

Usualmente se ha realizado la precipitación para la concentración de proteínas mediante adición de sulfato amónico saturado hasta alcanzar una concentración final del 80 % (después de procesos cromatográficos en los que la muestra queda muy diluída generalmente). También se ha empleado la precipitación fraccionada para la purificación parcial de la fosfoglicerato mutasa. A tal fin se ha aplicado la fórmula de Dawson y Elliot (1969):

$$V_s = \frac{C_f - C_i}{100 - C_f}$$

Donde: V_s es el número de volúmenes de sulfato amónico saturado que hemos de añadir, C_f es la concentración final que queremos tener de sulfato amónico en tantos por ciento, y C_i es la concentración inicial que tenemos de sulfato amónico en tantos por ciento.

Esta fórmula nos permite conocer la cantidad de sulfato amónico a añadir en una precipitación fraccionada.

2.2.5 CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Para la cuantificación de proteínas han sido empleados tres métodos, dependiendo de la sensibilidad que se necesitara y de la posible interferencia con el método de cuantificación de los solutos presentes en la muestra. Así en muestras concentradas como extractos tisulares se ha empleado el método de Biuret de acuerdo con las modificaciones hechas por Mokrash y McGilvery (1956). En muestras diluidas, como por ejemplo las últimas etapas de purificaciones, se ha empleado el método de Lowry (1951) modificado por Bensadown y Weinstein (1976). La determinación de los extractos nucleares se ha realizado mediante el método de Sedmak y Grossberg (1978) debido a las interferencias producidas por elementos del tampón de disolución.

a) Método de Biuret

Este método se basa en la reacción del sulfato alcalino con compuestos que tienen dos o más enlaces peptídicos dando un complejo de coloración violeta. La intensidad del color obtenido es una medida del número de enlaces peptídicos presentes en la proteína (Plummer, 1981).

Las muestras se diluían en agua hasta un volumen de 1 ml. Se añadían 2 ml de reactivo de Biuret cuya composición para un litro es: 797 ml NaOH 10.5 M, 167 ml de sulfato de cobre al 1% y 44 ml de amoníaco al 25%. Paralelamente se construía una recta patrón con BSA de 0 a 2 mg/ml que era tratada con la misma solución. Se agitaban los tubos, se dejaba reposar durante 10 min y se leía la absorbancia a 540 nm. La concentración se calculaba interpolando el valor obtenido para nuestra muestra en la recta patrón construida para tal fin.

b) Método de Lowry.

Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína

tal como sucede en el ensayo del biuret y la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína. La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y cambiará según la clase de proteína (Plummer, 1981)

Se utilizan los siguientes reactivos:

A-Carbonato sódico al 2% diluido en NaOH 0.1 M.

B-Sulfato cúprico pentahidratado al 1 %.

C-Tartrato sódico-potásico al 2%.

D-Reactivo de Folin-Ciocalteus Merck.

Las muestras se diluyen en agua hasta un volumen final de 500 μ l. Paralelamente se prepara una recta patrón con BSA de 0 a 300 μ g/ml. Se añade a cada tubo 2.5 ml de una solución preparada a partir de 10 vol del reactivo A, 0.1 vol del reactivo B y 0.1 vol del reactivo C. y se deja 10 min a temperatura ambiente. A continuación se añade 0.1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, y se agita inmediatamente. Se deja reposar durante 30 min y se lee la absorbancia a 725 nm. La concentración de proteínas se determina por interpolación en la recta patrón.

c) Método de Sedmak y Grossberg

Este método está basado en la reacción del azul de Coomassie con las proteínas, formando un compuesto de color azul que permite la cuantificación en un rango de 0.5–50 μ g/ml.

Se diluyen las muestras en 1 ml de agua, se construye una batería de tubos que conformarán la recta patrón con BSA desde 0 a 500 μ g/ml. A cada tubo se le añade 2 ml del reactivo formado por ácido perclórico al 1.9 % y Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0.06%. Se deja reposar durante 10 min y se lee la absorbancia a 620 nm. Igualmente la concentración de proteínas se determina por interpolación en la recta patrón.

2.3.DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

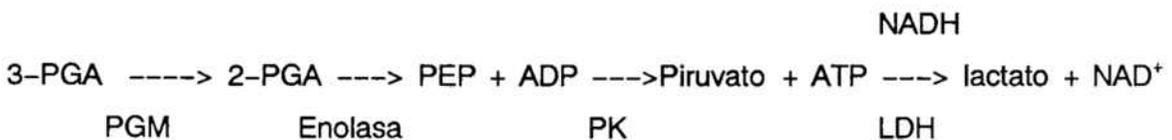
En el trabajo experimental, han sido determinadas las siguientes actividades enzimáticas: fosfoglicerato mutasa, lactato deshidrogenasa, fosfatasa ácida y isocitrato deshidrogenasa. A continuación se describen los protocolos empleados.

Actividad fosfoglicerato mutasa

La actividad fosfoglicerato mutasa se ha determinado basicamente según el método descrito por Beutler y Stratton (1975), en el que se acopla la actividad fosfoglicerato mutasa a la oxidación del NADH a través de la reacción de la lactato deshidrogenasa. En los casos en que no era necesaria una gran sensibilidad metodológica como por ejemplo a lo largo de procesos de purificación, se ha empleado el método descrito por Sutherland y col (1949) modificado por Grisolia y Carreras (1975) en el que se acopla la actividad fosfoglicerato mutasa a la formación de fosfoenolpiruvato.

Ensayo de la actividad PGM por oxidación de NADH

La actividad PGM que da como resultado la formación de 2-PGA es acoplada a una actividad enolasa, piruvato kinasa y lactato deshidrogenasa, según el esquema:



La oxidación del NADH era registrada espectrofotométricamente a partir de la disminución de absorbancia a 340 nm de longitud de onda. Aplicando la ley de Beer-Lambert: $E = \epsilon dc$; donde ϵ es el coeficiente de absorción molar del NADH = $6.22 \times 10^{-3} \text{ cm l M}^{-1}$, d es la distancia recorrida por la onda electromagnética en centímetros (cm) y c es la concentración del NADH en moles por litro (M). A partir de esta fórmula puede determinarse el decremento producido en la concentración de NADH, que se corresponde

determinarse el decremento producido en la concentración de NADH, que se corresponde con el incremento dado en la concentración de 2-PGA. Teniendo en cuenta que 1 U = 1 $\mu\text{mol} / \text{min}$, puede fácilmente determinarse la actividad fosfoglicerato mutasa ensayada.

Protocolo

En la cubeta del espectrofotómetro se mezclan:

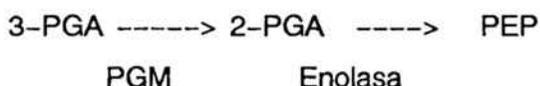
Tris HCl pH 7.4	50 mM
EDTA	0.5 mM
KCL	50 mM
MgCl ₂	10 mM
ADP.Mg ²⁺	2.5 mM
NADH	0.120 mM
3-PGA	5 mM
2,3 BPG	0.25 mM
LDH	0.52 U
Enolasa	0.03 U
Piruvato kinasa	0.16 U

Se registra una línea base durante 5 min, se añade la muestra convenientemente diluida y se registra el decremento de absorbancia por minuto, a partir de la cual, y aplicando la fórmula antes descrita puede calcularse la actividad enzimática.

Ensayo de la actividad PGM por formación de PEP

Este método presenta la ventaja de una mayor rapidez y facilidad en su realización, y el inconveniente de una menor sensibilidad y precisión en sus resultados.

Se basa en la cuantificación de PEP formado a partir de la reacción:



La producción de PEP puede cuantificarse a partir del incremento de absorbancia a 240 nm.

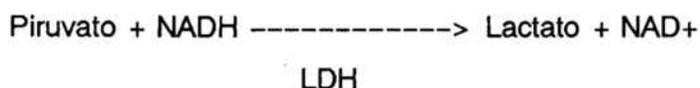
Las condiciones del ensayo eran:

Tris-HCl pH 7.4	33 mM
3-Fosfoglicerato (sal disódica)	20 mM
2,3-Bisfosfoglicerato	0.25 mM
MgSo4	3.3 mM
Enolasa	0.4 U

Realizada una línea base, se añadía la muestra (usualmente no diluída, debido a las características del método) y se registraba el incremento de absorbancia a 240 nm. En las condiciones descritas una unidad de fosfoglicerato mutasa, provocaba una variación de absorbancia de 0.025/minuto (determinado experimentalmente).

Actividad lactato deshidrogenasa

La actividad lactato deshidrogenasa se ha cuantificado según el método descrito por Vassault (1983). Está basado en la reacción:



Se cuantifica espectrofotometricamente la oxidación del NADH a 340 nm de longitud de onda.

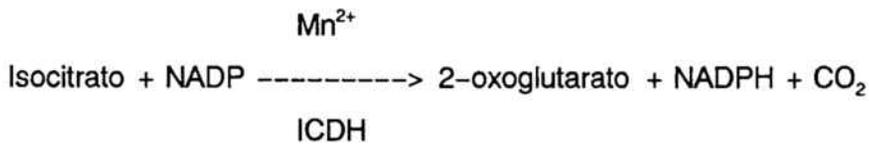
Las condiciones del ensayo son:

Tris-HCL pH 7.2	80 mM
NaCl	200 mM
NADH	0.2 mM
piruvato	1.6 mM

El cálculo de las actividades se realizaba a partir de los datos del apartado de determinación de la fosfoglicerato mutasa (es decir el coeficiente de extinción molar del NADH).

Actividad isocitrato deshidrogenasa

La actividad isocitrato deshidrogenasa se ha determinado según el método descrito por Goldberg (1983). El método se basa en la reacción



Midiendose la reducción del NADP por el incremento de absorbancia a 340 nm

Las condiciones del ensayo en cubeta son :

Trietanolamina clorhidrato pH 7.3	65 mM
Isocitrato	6.7 mM
NADP	0.42 mM
Mn ²⁺	1.67 mM

Actividad fosfatasa ácida

Determinada a partir del método descrito por Moss (1983), este procedimiento se basa en la hidrólisis del 4-nitrofenil fosfato, que por acción de la fosfatasa ácida se convierte en 4-nitrofenol + Pi. Esta reacción puede seguirse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm. El coeficiente de extinción molar del 4-nitrofenol es de $1.85 \text{ l mM}^{-1} \text{ mm}^{-1}$.

Las condiciones del ensayo eran:

Tampón citrato pH 4.9	37.5 mM
4-nitrofenil fosfato	6.3 mM

A 1 ml de esta solución se añadía 0.2 ml de muestra, se incubaba durante 30 min a 37 °C, y se paraba la reacción con 4 ml de NaOH 0.1 M. A continuación se determinaba la absorbancia a 405 nm (Bergmeyer, 1983).

2.3 METODOS INMUNOLOGICOS

2.3.1 OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS

Aproximadamente 100 μg de proteína pura (el criterio de pureza ha sido la presencia de una sola banda en la electroforesis PAGE tiñiendo con Coomassie Blue), dializada frente a agua destilada y desionizada y liofilizado fueron redisueltos en 1 ml de NaCl 0.14 M y posteriormente emulsionados con 1 ml de coadyuvante completo de Freund (Gibco), justo antes de su inyección en el animal, haciendo la mezcla de los dos componentes mediante dos jeringas conectadas entre si. El adyuvante es una solución salina que contiene aceites minerales y bacterias muertas que no desencadenan ninguna reacción inmunológica, pero se argumenta que la utilización del adyuvante presenta una serie de ventajas:

–aumenta la respuesta inmunológica a causa de las bacterias muertas que activan el sistema inmunológico humoral y celular.

–la liberación del antígeno se hace lentamente, ya que está emulsionado, evitando un posible "shock" por hipersensibilidad.

En nuestro caso hemos utilizado cinco conejos de raza New Zeland. El protocolo utilizado es una modificación del descrito por De Marcuzzi y Lindsay (1985). Cada animal es inyectado con esta emulsión mediante 20 microinyecciones intradérmicas de 100 μl cada una, distribuidas por el dorso previamente afeitado y limpiado con alcohol. A los 21 días y a los 42 días se repite la inmunización. Después de la tercera inyección se extraía una pequeña cantidad de sangre para determinar la existencia de anticuerpos específicos a los 10, 13, 17 y 21 días. Se determina asimismo cuando aparece el pico máximo de anticuerpo (usualmente a los 10 días). El tercer día después de la extracción, los animales son inyectados de nuevo, y diez días después se realiza un sangría. Posteriores inyecciones de recuerdo de periodicidad mensual se hacen para recuperar el suero del animal a los diez días siguientes.

Obtención del suero

La extracción de sangre del conejo se hace por la vena de la oreja, previamente limpiada con alcohol. Se frota la oreja con xilol (actúa de vasodilatador), se corta con un bisturí la vena y se deja fluir la sangre a un vial de vidrio. La sangre obtenida se deja 2 h a temperatura ambiente y una noche a 4 °C para permitir la retracción del coágulo. Se centrifuga a 2000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se recoge y se incuba a 56 °C para inactivar el sistema del complemento. Después se alicuota y se guarda a -80 °C evitando posibles descongelaciones que hacen bajar el título. También puede guardarse a 4 °C por periodos de hasta 1 mes.

Es necesario también hacer una extracción y purificación del suero del animal antes de ser inmunizado, que se utilizará como control.

Purificación de inmunoglobulinas G.

El suero se hace pasar por una columna de intercambio iónico donde se unen todas las proteínas séricas excepto la fracción pura de IgG que es eluida directamente. Incrementando la fuerza iónica del tampón de elución se eluyen las restantes inmunoglobulinas, las beta-globulinas y el resto de proteínas séricas por este orden.

Protocolo.

1. El suero, se precipita con sulfato amónico al 40% y se deja una noche a 4 °C . Después de centrifugar a 3000 rpm en una centrifuga Sorvall RC-4B, el sedimento se resuspende en 4 ml de PBS y se dializa frente a tampón fosfato 10 mM pH 7.4

2. El dializado se hace pasar por una columna de DEAE-Celulosa DE-52 (Whatman) de dimensiones 15 x 1.5 cm, y previamente equilibrada con el tampón de diálisis, a un flujo de 15 ml/h; se recogen 2 ml por tubo y se registra el perfil de proteína midiendo la absorbancia a 280 nm. Después de la salida del primer pico de proteína que contiene las IgG se dejan pasar aún unos 10 ml del mismo tampón . A continuación se

realiza una elución con tampón fosfatos 30 mM pH 7.2, eluyéndose las otras inmunoglobulinas. Si se quiere recuperar el resto del material, se realiza una tercera elución con fosfatos 30 mM pH 7.2, NaCl 150 mM.

3. Las fracciones obtenidas, se dializan y se alicuotan, habiéndose guardado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Purificación de los anticuerpos por cromatografía de afinidad.

La purificación de los anticuerpos, bien de la fracción de IgG o bien del suero, se consigue por cromatografía de afinidad en Sepharose activada con CNBr y con el antígeno acoplado a la resina. Cuando se hace pasar la mezcla de inmunoglobulinas por esta columna, sólo los anticuerpos específicos del antígeno quedan retenidos. A continuación desplazando el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo, podemos recuperar el anticuerpo purificado. Seguidamente se describe el método utilizado, el cual ha sido puesto a punto a partir de las instrucciones del fabricante y de la experiencia propia.

1. Acoplamiento del antígeno a la resina

En primer lugar hay que realizar el acoplamiento del antígeno a la resina. Se pesa la cantidad necesaria de resina Sepharose 4-B CNBr (Pharmacia) sabiendo que 1 g de resina rinde 3.5 ml de volumen final. Se lava en Buchner la resina con HCl 1 mM (200 ml/g) durante 15 min. Paralelamente, se disuelve la proteína que va a ser fijada en tampón de acoplamiento: NaHCO_3 0.1 M, pH 8.3, NaCl 0.5 M sabiendo que se necesitan 5 mg de proteína por ml final de columna. Se mezcla la resina y la proteína 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando suavemente de vez en cuando. Después se bloquean los grupos activos remanentes mediante transferencia de la mezcla al tampón con agente bloqueante: glicina 0.2 M pH 8.8 durante 16 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o 2 h a temperatura ambiente.

Se lava el exceso de proteína adsorbida en primer lugar con tampón de

acoplamiento, seguidamente con acetato sódico 0.1 M pH 4.0, NaCl 0.5 M y por último de nuevo con tampón de acoplamiento. En este punto el conjugado ya está listo y puede montarse la columna o bien guardarse en cámara fría.

Purificación de los anticuerpos de la muestra.

Se prepara una columna de 10 cm x 1 cm de diámetro con la resina previamente acoplada al antígeno. Se lava exhaustivamente la resina con PBS pH 7,2.

La muestra (fracción de IgG) es dializada frente a PBS a 4 °C y contiene entre 30 – 50 mg de proteína en 6 – 10 ml de PBS. Se aplica la muestra a la columna a un flujo de 3 ml /h y se recicla hasta tres veces para asegurar que el anticuerpo se une al antígeno. Se realiza una primera elución con PBS y se recoge en fracciones de 1 ml el primer pico de proteína. Se lava la columna con 10 ml de PBS y se hacen pasar 4 ml de glicina-HCl 0.1 M , pH 2,8. Se recogen fracciones de 0.5 ml en tubos Eppendorf conteniendo 30 μ l de Tris 1 M para neutralizar el pH. Este segundo pico contiene los anticuerpos purificados, los cuales son dializados frente a PBS. Para conocer exactamente los tubos en que se ha eluido el anticuerpo es necesario hacer un experimento de inmunoblot con todos los tubos.

2.3.2 TECNICAS DE INMUNO-BLOT

Dot-Blot

El antígeno (puro o en extracto) es fijado al papel de nitrocelulosa, bien mediante aplicación directa con micropipeta, seguido de secado de la muestra y consiguiente fijación, o bien mediante el uso de un aparato diseñado a tal fin, el cual acoplado a una bomba de vacío acelera el proceso de fijación del antígeno, evitando de esta manera el tiempo de secado. A continuación el antígeno se incuba con una solución de anticuerpo, previa saturación de las uniones inespecíficas bien con BSA, bien con leche en polvo al 5%. Tras

la incubación con el anticuerpo se aplica alguna técnica de detección del complejo antígeno anticuerpo. En nuestro caso esta técnica ha sido la incubación con un segundo anticuerpo preparado contra las cadenas constantes de las inmunoglobulinas de conejo y conjugado con peroxidasa. Después se hace reaccionar la peroxidasa, acoplado una reacción en la cual el compuesto cambia de color por acción del proceso redox. Este compuesto ha sido la diaminobenzidina. A continuación se describe el protocolo utilizado en los experimentos de esta tesis.

Protocolo

1.-Se ha utilizado un aparato "Hibri-Dot" marca BRL el cual era acoplado a una bomba de vacío. Se disponía un papel de nitrocelulosa de 0.45 μm Bio-Rad, sobre un papel de filtro para asegurar el vacío. Se conectaba el vacío y se aplicaban entre 10 – 20 μl de muestra. A continuación se lavaba con tampón TBS dos veces cada aplicación.

2.-Se desconectaba el vacío, se abría el dispositivo y el papel de nitrocelulosa era lavado durante 20 min con TBS cambiando dos veces el tampón.

3.-Se saturaban las uniones inespecíficas con leche en polvo marca Molico Sveltesse, al 5% en TBS durante 1 hora.

4.-Tras dos baños con TBS de 10 min, se incubaba con el anticuerpo convenientemente diluido en TBS + leche en polvo al 3 %. La incubación se hacía durante un mínimo de 2 horas y frecuentemente toda la noche.

5.-De nuevo se hacían dos baños con TBS de 10 min, y se incubaba con el segundo anticuerpo unido a peroxidasa (ATOM P217) a una dilución 1/ 500 en TBS + leche en polvo al 3% durante 1 hora.

6.-Tras dos baños en TBS de 10 min, se sumergía el papel de nitrocelulosa en la solución de revelado que contenía: diaminobenzidina (Sigma) 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, H_2O_2 (Merck) 4 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Al cabo de unos 5 min aparecían las reacciones positivas teñidas de color rojo.

Todo el proceso se realizaba a temperatura ambiente.

Western-Blot

La técnica de Western-Blot consiste en una separación de las proteínas mediante electroforesis en SDS-PAGE, transferencia de dichas proteínas a filtro de nitrocelulosa, y detección de las bandas con anticuerpo. Esta técnica permite determinar la especificidad de los anticuerpos, detecta la reactividad de una o más bandas de diferente peso molecular frente a los anticuerpos que se quieran probar, así como posibles reacciones cruzadas, etc. El protocolo utilizado ha sido el siguiente:

-Electroforesis SDS-PAGE según lo descrito en el apartado 2.2.3.

-Electrotransferencia a filtro de nitrocelulosa Bio-Rad 0.45 μm . Para la electrotransferencia se ha utilizado un aparato "Trans-Blot" de Bio Rad. Se realiza dentro de una cámara que contiene tampón Tris 20 mM, glicina 150 mM, pH 8.3 y metanol al 20%. Dentro de esta cámara se coloca el soporte que contiene en la dirección cátodo-ánodo: tres papeles de filtro Whatman 3 MM, gel, nitrocelulosa, tres papeles de filtro Whatman 3MM. Se aplica una diferencia de potencial de 60 V que dan un amperaje que varía desde 0.2 A a 0.5 A de principio a fin de transferencia, durante 3 horas. Este proceso se hace en cámara fría.

-Al cabo de las tres horas las proteínas están transferidas y fijadas a la nitrocelulosa. Las condiciones descritas son óptimas para las proteínas con las que se ha trabajado en nuestros experimentos, es decir de peso molecular entre 20 y 80 kD. No se transfieren en su totalidad, bajo estas condiciones proteínas de peso molecular mayor de 100 kD.

-A continuación se puede repetir el proceso descrito para los dot-blots en cuanto a la saturación, incubación y detección. Alternativamente se describe un segundo método de detección basado en los experimentos de inmunocitoquímica y que ha sido utilizado en los experimentos de Western-Blot realizados con núcleos purificados:

-Tras la saturación e incubación con el anticuerpo (o antisuero o fracción de IgG), se prepara una solución con proteína A (de Staphylococcus aureus) conjugada con oro coloidal de acuerdo con lo descrito por Roth (1982).

Esta solución es diluída en PBS conteniendo BSA 3% de tal manera que de una absorbancia de 0.4 a 525 nm. El tratamiento del filtro de nitrocelulosa incubado con el anticuerpo con esta solución permite la detección inmediata de las bandas de proteínas reaccionantes con el anticuerpo. Normalmente se incubaba el filtro durante 1 hora con esta solución, procediéndose después al secado. Si se desea incrementar la resolución de la técnica puede hacerse una amplificación con plata una vez que el filtro está ya seco.

Si es necesario, se puede amplificar la detección mediante tratamiento con plata.

Amplificación con plata

El filtro se pone en cuarto oscuro durante 5 minutos en una solución de tampón citrato 25 mM, pH 3.5 conteniendo hidroquinona 0.84%. A continuación se sumerge durante 4 min en tampón citrato 25 mM, pH 3.5 conteniendo hidroquinona 0.84%, lactato de plata (Fluka) 0.11 % . Después se hace una fijación con fijador fotográfico, y puede secarse de nuevo el filtro. Presenta el inconveniente de aumentar mucho la señal de fondo con la consecuente formación de artefactos.

2.3.3. INMUNOINHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Esta técnica se basa en el efecto inhibitor de la actividad enzimática que supone la adición de un anticuerpo dirigido contra la enzima, dado que se forma un complejo o inmunoprecipitado que secuestra la enzima de la preparación. Se realiza mediante la adición de cantidades crecientes de anticuerpo a la fracción enzimática que se quiere analizar y la observación de la inhibición creciente que se ocasiona. Sirve para determinar la especificidad del anticuerpo para la enzima.

Protocolo

-Se diluye la enzima a estudiar para encontrar una actividad medible a escala 0.5 o 1 en el espectrofotómetro. Esta dilución se hace en un tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, en el caso de la fosfoglicerato mutasa, que puede contener o no un 5% de polietilen glicol 600 (PEG). Se ha descrito que el PEG favorece la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo. Sin embargo en nuestros experimentos hemos visto que no había diferencias significativas entre la adición o no de PEG.

-Se preparan diluciones del suero que se quiere estudiar. Estas diluciones se hacen en suero no inmune. En nuestro caso las diluciones han sido:

<u>μl antisuero</u>	<u>μl suero no inmune</u>
0	25
5	20
10	15
15	10
20	5
25	0

-Sobre estos 25 μ l se adicionan 10 μ l de la muestra enzimática y se incuban 1 h a 37 °C. Después, se ponen los tubos en hielo 5 min y se centrifugan a 4 °C, 5 min.

-El sobrenadante se recupera y se mide la actividad enzimática. Se construye una gráfica donde se representa en abscisas los μ l de antisuero añadido y en ordenadas la actividad enzimática observada respecto a la actividad enzimática máxima (sin inhibición).

2.3.4. ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA

Se trata de un ensayo muy sensible que consiste en unir el antígeno a un soporte sólido, dejarlo reaccionar con el anticuerpo problema, y una vez eliminado el exceso de este, detectar la cantidad de anticuerpo unido al antígeno mediante una reacción colorimétrica. El soporte sólido son placas de microtitulación de cloruro de polivinilo (Dyanatech) en forma de U donde tiene lugar el ensayo.

Protocolo

El método utilizado es el descrito por Craig et al (1980).

1-Determinación de la dilución óptima de conjugado.

En primer lugar se determina la dilución óptima del conjugado que va a ser empleado en el ensayo. El conjugado es una preparación comercial de IgG de cabra anti-IgG de conejo unida a fosfatasa alcalina (Sigma).

Cada uno de los pozos de la placa se recubre con 500 μg de antígeno en 200 μl de tampón carbonato. Se incuba en cámara húmeda toda la noche a 37 °C y se deja secar a 45 °C. Para aumentar la fijación de la proteína al soporte de polivinilo, se añaden 150 μl /pozo de una solución que contiene isopropanol 25% y acético 10% y se deja 30 min a temperatura ambiente. Cada uno de los pozos se lava 6 veces con tampón PBLIS. A continuación se añaden 200 μl de gelatina 3% en PBLIS a cada pozo y se deja 2 h a 37 °C para saturar los centros de unión a proteína remanentes. También puede utilizarse para esta función leche en polvo (Molico Sveltesse Nestle) al 5%. en PBLIS.

Después de hacer 6 lavados mas con PBLIS se añaden 200 μl /pozo de suero diluído en PBLIS (se prueban las diluciones 1/50, 1/125 y 1/500), y se deja incubar 4 h en cámara húmeda a 37 °C. Se vuelve a lavar 6 veces con PBLIS que elimina el anticuerpo en exceso y se incuba con 200 μl de conjugado, diluyendo a la mitad con PBLIS y comenzando por

1/125, 1.5 h en cámara húmeda a 37 °C.

Finalmente se añaden 200 μ l/pozo de solución sustrato 4-nitrofenilfosfato (Sigma). 1 mg/ml en dietanolamina 1 M pH 9.8. La placa se incuba 20–30 min a temperatura ambiente y seguidamente se para la reacción añadiendo a cada pozo 50 μ l de NaOH 2 M. La fosfatasa alcalina actúa sobre el sustrato dando un compuesto coloreado que se detecta leyendo la absorbancia a 405 nm, en un aparato Uniscan (Titertek).

Los resultados se representan gráficamente.

Una vez calculada la dilución óptima del conjugado, normalmente a 1/500, se puede continuar haciendo los análisis y titulaciones de los anticuerpos, variando la cantidad de proteína fijada al soporte o bien la dilución del suero. Para cada una de las diluciones del antisuero se preparan dos hileras de pozos, una para el test (antígeno, anticuerpo y conjugado) y otra para el control (anticuerpo y conjugado).

2. Límites de detección.

En este caso los pozos de la placa se recubren con diferentes concentraciones de antígeno. Se hacen 8 diluciones a partir de una concentración inicial de antígeno de 2 μ g/200 μ l en tampón carbonato diluyendo 1/2 cada vez. El tratamiento es el mismo que el expuesto en el apartado anterior, incubando diferentes diluciones de suero en PBLs en cada hilera y el conjugado diluido 1/500. Se hace siempre una hilera control sin antígeno. Es necesario encontrar la concentración de antígeno que satura la reacción, es decir la cantidad límite que no permite aumentar la coloración resultante.

2.4 METODOS DE LOCALIZACION INTRACELULAR

2.4.1 INMUNOCITOQUIMICA

A) MICROSCOPIA OPTICA

En este trabajo se han utilizado las técnicas de inmunocitoquímica para abordar el estudio de la localización intracelular de la fosfoglicerato mutasa. Se ha utilizado la microscopía óptica como una primera aproximación para pasar a continuación al estudio mediante microscopía electrónica.

La inmunocitoquímica mediante microscopía óptica aplica estrategias parecidas a las explicadas en los apartados de Western-Blot y Dot-Blot ya que la finalidad es la misma: la detección de un complejo antígeno-anticuerpo mediante reacciones como la peroxidasa, la fluoresceína o la proteína A unida a oro coloidal. En nuestro caso hemos utilizado de forma exclusiva la detección mediante complejos de proteína A unida a oro coloidal, amplificando en algunos casos con lactato de plata.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

-Obtención del tejido (músculo y cerebro), inmersión en 2-metil butano (Merck) y congelación inmediata en N₂ líquido. El 2-metil butano tiene la función de proteger el tejido de posibles rupturas durante la congelación.

-Realización de cortes en criostato de 5 - 10 μm de sección a -20 °C. Los cortes se depositan sobre portas gelatinizados y se dejan secar durante 30 min a temperatura ambiente. La gelatinización se realiza sumergiendo los portas en una solución de gelatina 0.45%, CrK(SO₄).12 H₂O 0.15%. y secándolos después durante una noche a 37 °C.

-Postfijación opcional con acetona 15 min, 4 °C.

-Lavados con PBS: 3 x 10 min.

-Bloqueo de las uniones inespecíficas: Incubación durante 1 hora en ovoalbúmina 0.5%.

-Lavados con PBS : 2 x 5 min.

-Incubación con: anticuerpo, fracción de IgG o antisuero, diluidos en ovoalbúmina 0.5 %. La incubación se hace durante un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

-Lavados con PBS: 2 x 5 min.

-Incubación con proteína A - oro coloidal de 0.14 nm de diámetro (Roth, 1982), diluída en PBS hasta una absorbancia a 540 nm de 0.4. 1 h a temperatura ambiente.

-Lavados con PBS: 2 x 5 min.

-Fijación con glutaraldehído (2.5%). 10 min.

-Lavados con agua destilada: 2 x 2 min.

-Secado y opcionalmente amplificación con plata según lo descrito en el apartado 2.3 en lo referente a la detección en Western-Blots.

-Deshidratación con alcoholes crecientes (70%, 90%, 95%, 100%, xilol, xilol/eucaliptol), y montaje en DPX.

En todos los casos se realizaron los controles correspondientes a incubación con suero no inmune y con suero preadsorbido con anticuerpo puro, ambos a las mismas diluciones que el antisuero.

B) MICROSCOPIA ELECTRONICA

La microscopía electrónica se ha utilizado para la detección intracelular de la fosfoglicerato mutasa después de los primeros resultados proporcionados por la microscopía óptica. La estrategia de detección empleada ha sido la misma: proteína A – oro coloidal amplificando y contrastando con osmio y acetato de uranilo.

Protocolo

–Se ha trabajado siempre con ratas macho Sprague–Dawley anestesiadas, que eran perfundidas a través del ventrículo cardíaco izquierdo con solución salina equilibrada.

–A continuación se perfundía con 3 % paraformaldehído y 0.1 % glutaraldehído en tampón fosfatos 0.1 M pH 7.4.

–El tejido se extraía y era cortado en piezas pequeñas y se sumergía en la misma solución de fijación durante 2 h a temperatura ambiente.

–Las piezas se lavaban en el mismo tampón conteniendo NH_4Cl 50 mM durante 20 minutos, repitiendo los lavados tres veces, consiguiendo bloquear los grupos aldehído libres.

–La inclusión en Lowicryl K4M se llevaba a cabo a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ de acuerdo con Roth y col (1981). A partir de aquí, se obtenían secciones semi–finas que se depositaban en gradillas Parlodion de carbón.

–Las secciones ultrafinas incluidas en Lowicryl K4M eran procesadas de manera similar a lo descrito para la microscopía óptica. En primer lugar las gradillas se depositaban sobre una gota que contenía 0.5% albúmina en PBS durante 5 min.

–Se transferían a gotas de anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad diluido en PBS y conteniendo 0.5 % de ovoalbúmina durante 2 h a temperatura ambiente.

-Las rejillas eran lavadas con PBS (2 x 3 min) e incubadas durante 60 min con proteína A-oro coloidal diluída en PBS conteniendo BSA 1 %, Tween 20 0.075 % y Tritón X-100 0.075 %, (la mezcla daba una absorbancia de 0.4 a 525 nm).

-Las rejillas eran secadas tras 2 lavados con PBS y agua destilada y finalmente eran contrastadas con acetato de uranilo y acetato de plomo..

La especificidad del marcaje fué comprobada mediante los siguientes controles:

-sustitución de los anticuerpos por suero pre-inm,une de conejo.

-preadsorción de los anticuerpos con PGM purificada.

-incubación de las secciones con complejos proteína A-oro coloidal exclusivamente.

2.4.2 TECNICAS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

A) OBTENCION DE ORGANULOS

El estudio de la localización intracelular de la fosfoglicerato mutasa, ha requerido el empleo de técnicas de fraccionamiento subcelular que permiten la separación de los distintos componentes celulares para un estudio posterior de la presenmcia o ausencia en esas fracciones de los compuestos de interés.

El método seguido para obtener las diferentes subfracciones celulares es una modificación puesta a punto por nosotros a partir del método descrito por Walker y Dow (1982), que a su vez es una modificación del método de Smith (1967), basado en la centrifugación diferencial.

En primer lugar se hacía una centrifugación a 2300 x g (5000 rpm, rotor SS-34) durante 45 min en una centrífuga Sorvall RC5B a 4 °C. El sedimento de esta centrifugación contiene mayoritariamente núcleos, miofibrillas, membranas y en general todo el material no soluble en el tampón de extracción.

El sobrenadante era nuevamente centrifugado a 35000 x g (19000 rpm, rotor SS-34), durante 45 min y se obtenía un sedimento que contiene mitocondrias, lisosomas y peroxisomas.

Finalmente, se hace una centrifugación a 100000 x g (33000 rpm, rotor 50 Ti), durante 60 min en una ultracentrífuga Beckman L8-80M, que permitía obtener un sedimento que contenía microsomas, y en el caso del músculo retículo sarcoplásmico. El sobrenadante constituía la fracción citosólica.

Las fracciones obtenidas eran dializadas frente al tampón de extracción. A continuación eran congeladas y descongeladas tres veces para romper las membranas (caso de núcleos, mitocondrias,...). y con el material obtenido, se cuantificaba actividades enzimáticas y se analizaban por Western-Blot o bien por Dot-Blot.

Es necesario decir, que las fracciones así obtenidas no son muy puras, y en el caso de la fracción nuclear, ésta está tan contaminada por otros elementos celulares, que no es posible discernir a cual de ellos se debe el efecto observado. Por esta razón, los núcleos celulares fueron purificados mediante la técnica de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, pues era necesario comprobar la presencia de la PGM en esta fracción. Debido a la ausencia en cantidades significativas de PGM en fracciones mitocondrial y microsomal, no se han aplicado estrategias de purificación a homogeneidad de estos orgánulos.

B) PURIFICACION DE NUCLEOS.

La purificación a homogeneidad de nucleos celulares se ha llevado a cabo para confirmar la presencia de PGM en estos orgánulos. Se ha utilizado el método de centrifugación en gradiente de sacarosa a partir de métodos descritos en la bibliografía, con algunas variantes puestas a punto por nosotros.

Nucleos de cerebro y de hígado

Los núcleos de cerebro se han purificado a partir de método descrito por Piña et al. (1984), el cual es a su vez una modificación del de Thompson et al. (1973) introduciendo algunas modificaciones. El protocolo seguido ha sido el siguiente:

–Obtención del tejido fresco: aproximadamente unos 20g (unos 12 animales si se quiere obtener núcleos de cerebro y unos tres animales si se quiere obtener núcleos de hígado). Se deja en solución CM + 1M sacarosa a 0 °C.

La solución CM está compuesta por: 1mM cacodilato sódico, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1% TDG, 10mM butirato sódico, pH 6.5. Antes de usar la solución se añade PMSF 0.1 mM (solución madre 100mM en isopropanol).

–Homogenización en Dounce de 150 μm (Thomas Scientific Apparatus, USA). a 0 °C, en solución CM + 1M sacarosa (4 vol/peso tejido).

–Filtración a través de gasa.

–Adición de 2.5 volúmenes de CM + 2.4 M sacarosa. La concentración final de sacarosa es 2 M

–Ultracentrifugación a 64000 x g (22000 rpm, rotor SW 28), 30 min, 4 °C, en una ultracentrífuga Beckman L8–80M.

-Deshecho del sobrenadante y redisolución del sedimento en tampón STM (Tris 50 mM, pH 7.4, MgSO₄ 5 mM, sacarosa 250 mM). Este tampón es isotónico con el medio intranuclear y contiene magnesio que es esencial para el mantenimiento de la estructura del núcleo. Es por lo tanto idóneo para la resuspensión de los núcleos purificados.

Los núcleos en este punto estaban purificados a homogeneidad y presentaban ausencia de marcadores citoplasmáticos como la actividad fosfatasa ácida o la isocitrato deshidrogenasa. El control realizado por microscopía de contraste de fases, mostraba ausencia de partículas celulares. Sin embargo se puede repetir una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones de velocidad, temperatura, tiempo, y concentración de sacarosa para asegurar la ausencia de cualquier contaminante citoplasmático.

Estos núcleos eran lisados, mediante la adición de EDTA 10 mM, y se congelaban y descongelaban tres veces consecutivas. El producto resultante era analizado por Western-Blot, Dot-Blot, y se cuantificaban diferentes actividades enzimáticas.

Núcleos de músculo esquelético y corazón.

Los núcleos de músculo han sido purificados a partir del método descrito por Kuehl (1975), pero utilizando tampón CM + 1M sacarosa para la homogenización, la cual se hacía en homogenizador tipo Polytron. Se añadía sacarosa disuelta en CM hasta alcanzar una concentración final de 2 M y se ultracentrifugaba en las mismas condiciones que las descritas para cerebro. El pellet era redisoluelto en tampón STM, y se determinaban actividades enzimáticas y reactividad antigénica frente a anticuerpo anti-fosfoglicerato mutasa de la misma manera que lo descrito para el caso de cerebro e hígado.

La pureza de los núcleos era controlada por microscopía de contraste de fases, y la medición de marcadores como la isocitrato deshidrogenasa y la fosfatasa ácida.

2.5 TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.5.1.CEPAS Y PLASMIDOS UTILIZADOS

Las cepas bacterianas utilizadas, han sido derivados de *E.coli* K 12, concretamente han sido las cepas siguientes:

-**DH5 α F'** rec A⁻:F' endA1 hsdR17(r⁻m⁺) supE44 thi⁻1 recA1 gyrA96 relA1 P80lacZ M15 (lacZYA-argF)U169

-**JM109** recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 (lac-proAB) F' (traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q lacZ M15)

-**Y1088** supE supF metB trpR hsdR⁻ hsdM⁺ tonA21 strA lacU169 proC::Tn51 pMC9.

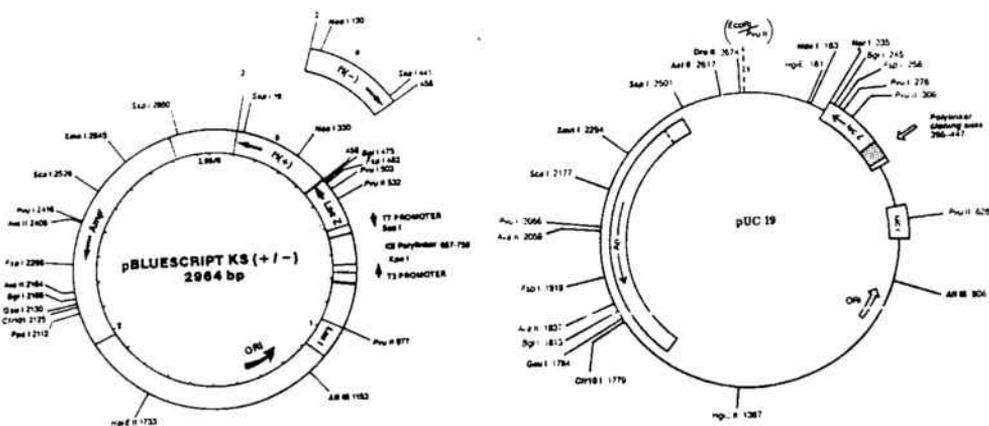
-**Y1090** lacU169 proA⁺ lon araD139 strA supF trpC22::Tn10 pMc9

Los plásmidos utilizados han sido:

-pUC 19

-Bluescript KS (+/-)

A continuación se representan los mapas de restricción de ambos plásmidos.



Los bacteriófagos utilizados han sido: lambda gt11, M13 mp18 y M13 mp19

Las cepas DH5 α F' y JM109 son útiles para ser infectadas por el fago filamentoso M13 al contener el factor F o pili necesario para la infección por M13. Las cepas Y1088 y Y1090 se utilizan para la propagación y el mantenimiento del bacteriófago lambda gt11. La cepa Y 1088 al ser deficiente en el sistema de restricción (hsdR-) y normal en el sistema de modificación (hsdM+), es idónea para el crecimiento de librerías de lambda gt11, evitando el peligro de la ruptura del DNA recombinante. Después de haber crecido el DNA recombinante en esta cepa y haber sido convenientemente modificado, la propagación se realizaba en la cepa Y1090, la cual tiene un sistema de restricción activo.

La cepa DH5 α F' se ha utilizado en el subclonaje del cDNA de la PGM. es una cepa derivada de DH1 (Hanahan, 1983) . Se ha utilizado la cepa comercial DH5 α F' (BRL) que presenta gran eficiencia en la transformación (recA1, endA1, gyrA, thi-1, hsdR17, supE44), de restricción negativa (rk-) y modificación positiva (mk+). Al no contener el marcador lacIq, que codifica para la superproducción de la proteína represora del operon lac, no es necesario añadir inductor (IPTG) al medio, para que el gen de la β -galactosidasa (lacZ) esté activado.

El plásmido pUC19 ha sido utilizado para el subclonaje del cDNA de la PGM B de rata. Es un plásmido de *E.coli* empleado como vehiculo de clonaje (Yanisch-Pevron et al., 1985). Consta de una molécula de doble cadena de DNA de 2686 pb . Mantiene el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBR322, así como parte de la región lac de M13 mp19, incluyendo el oligonucleótido sintético de 54 pb que presenta 13 dianas de restricción.

El plásmido Bluescript KS (+/-) ha sido utilizado también como vector de subclonaje. Es un fagémido derivado de pUC19 que consta de 2964 pb. Contiene un origen de fago f1, un origen colE1 y dos promotores: T3 y T7 flanqueando un nuevo polilinker que contiene 21 dianas de restricción . Contiene el promotor de lacZ para la selección por color o inducción de proteínas de fusión con IPTG . La designación KS indica que el polilinker está orientado de tal forma que la transcripción del gen de la β -galactosidasa ocurre

através del eje delimitado por la diana Kpn1 primero y Sac1 después. Permite la liberación de DNA de cadena sencilla gracias al origen de replicación f1, via infección con fago **helper** . La forma (+) contiene la cadena codificante para la β -galactosidasa y la cadena (-) contiene la cadena complementaria no codificante. Asimismo presenta resistencia a ampicilina.

Los fagos filamentosos M13 mp18 y mp19 han sido utilizados como vectores de suclonaje y como vectores de secuenciación por el método dideoxi de Sanger (1977). Constan de una cadena circular de DNA de 7250 pb. La forma de doble cadena, aparece como intermediaria durante la replicación del DNA, liberándose de la célula en forma de cadena sencilla. Las formas M13mp son derivadas de las construcciones originales de Messing et al (1983). Las formas mp18 y mp19 difieren sólo en la orientación del polilinker de 54 pb que contienen. El polilinker consta de 13 dianas de restricción.

El bacteriófago lambda gt11 ha sido utilizado para la construcción de la librería de cDNA de cerebro de rata cedida por L.de Lecea (1990). Lambda gt 11 es un vector de inserción de 43.7 kB de longitud, presenta una única diana de clonaje EcoR1 localizada en lacZ que permite la expresión de una proteína de fusión si la secuencia clonada está en la misma pauta de lectura que lacZ. Es un vector usado comunmente para screening inmunológico, permite el clonaje de insertos de DNA de hasta 7.2 kB.. Los fagos recombinantes presentan un fenotipo lac-. Es necesario que la bacteria huesped presente un genotipo supF (supresión de la mutación ambar que traduce el codon AUG por tirosina).

2.5.2 OBTENCION DE DNA.

Los métodos de obtención de DNA han sido los descritos por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989). Basicamente se han utilizado dos métodos de obtención de DNA uno para gran escala (aproximadamente para 500 ml de cultivo de bacterias), válido para DNA plasmídico y doble cadena de M13, y otro pensado para pequeña escala (abreviadamente: miniprep) a partir de unos 3 ml de cultivo de bacterias. igualmente válido para plásmidos y cadena doble de M13. Se describe tambien el método utilizado para la preparación de

cadena sencilla de M13, necesaria para la secuenciación del DNA.

Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala (MINIPREPS).

Se ha utilizado basicamente el método basado en la lisis alcalina. Este método lisa las bacterias, con una solución que contiene SDS y NaOH (el SDS desnatura las proteínas de la bacteria y el NaOH desnatura el DNA plasmídico y cromosómico). La mezcla es neutralizada con acetato potásico, haciendo que el DNA plasmídico se renaturalice rápidamente. La mayor parte del DNA bacteriano y las proteínas precipitan (debido al SDS que forma un complejo con el potasio) y se eliminan por centrifugación. El DNA plasmídico es concentrado mediante precipitación con etanol y en el caso de preparaciones a gran escala es purificado mediante centrifugación en gradiente de densidad de CsCl o alternativamente en columnas comerciales de intercambio iónico (QIAGEN).

El protocolo seguido ha sido el siguiente.

1. Se incubaban las células huéspedes conteniendo el plásmido a purificar a 37 °C durante una noche en 3 ml de medio de cultivo (LB o 2YT) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina o 12 µg/ml de tetraciclina en función de la resistencia a antibiótico que contuviera el plásmido.

2. Se distribuía el cultivo en tubos eppendorf y se centrifugaba en una microfuga Heraeus a 13000 rpm (12000 g) durante 10 min a 4 °C.

3. El pellet era resuspendido en 100 µl de una solución que contenía: Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, lisozima 5 mg/ml. Se dejaba a temperatura ambiente durante 5 min.

4. A continuación se añadían 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M y SDS 1%, dejándose durante 10 min en hielo.

5. Se adicionaban a cada tubo eppendorf 150 μ l de acetato potásico 3 M conteniendo 11.5 % de ácido acético y se dejaba 5 min en hielo.

6. Tras una centrifugación de 10 min a 4 °C a 12000 rpm, se tomaba el sobrenadante.

7. Se hacía un extracción con fenol, seguida de una extracción con cloroformo, y la fase acuosa resultante de las dos extracciones era precipitada con acetato sódico 0.3 M (se añadía 1/10 del volumen a precipitar de acetato sódico 3 M dando una concentración final de 0.3 M).

8. Se centrifugaba durante 15 min a 4 °C a 13000 rpm, el pellet era lavado con etanol 70%, vuelto a centrifugar 5 min, y el nuevo pellet resultante era secado en un aparato Speed-Vuc (Savant Instruments).

9. El resultado final era redissuelto en 50 μ l de TE, y analizado por electroforesis en agarosa. Este DNA servía normalmete para las digestiones con enzimas de restricción.

Las "minipreps" de doble cadena de M13 se hacían de forma idéntica, omitiendo el antibiótico en el cultivo y utilizando preferentemente 2YT como medio de cultivo. Se hacía una infección con 10 μ l de bacteria, crecida durante toda la noche, de la cepa adecuada (DH5 α F') y sobrenadante de un cultivo de M13 (10 μ l) o con una placa de crecimiento retardado de M13.

Preparación de DNA plasmídico a gran escala

El método utilizado es el descrito por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989). En primer lugar se hace una amplificación del plásmido con cloramfenicol, antibiótico que al inhibir la síntesis de proteínas impide el crecimiento celular pero no la replicación del DNA plasmídico, obteniendose una alta relación DNA plasmídico/células. Después se hace un

tratamiento similar al descrito para las minipreps y se purifica finalmente por ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio o por columnas de intercambio iónico.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Se inoculaban 500 ml de medio de cultivo conteniendo el antibiótico adecuado (ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$) con 25 ml de bacteria crecida hasta una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. El cultivo se mantenía a 37 °C durante 2.5 h exactamente, punto en el cual la absorbancia a 600 nm era de 0.4. En este punto se añadía cloramfenicol hasta una concentración de 34 $\mu\text{g/ml}$. Se mantenía durante 12 –16 h.
2. El cultivo era centrifugado a 4000 rpm durante 15 min en un rotor Sorvall GS-3. El pellet era redissuelto en 20 ml de una solución que contenía: Tris-HCl 25 mM pH 8, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM conteniendo lisozima 1 mg/ml.
3. Tras 5 min de reposo, se añadían 20 ml de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M, SDS 1 %. Se mantenía a temperatura ambiente durante 15 min.
4. Se añadían 15 ml de la solución : ácido acético 11.5 % y acetato potásico 5 M 60%. Tras agitación se mantenía en hielo durante 15 min.
5. Se centrifugaba a 4000 rpm, 4 °C en un rotor Sorvall GS-3 durante 15 min.
6. El sobrenadante era precipitado con 0.6 vol de isopropanol, durante 10 min a temperatura ambiente..
7. A continuación se centrifugaba a 5000 rpm, durante 15 min en el mismo rotor y a temperatura ambiente.
8. El pellet obtenido de esta centrifugación era lavado con etanol al 70%, secado y redissuelto en 3 ml de TE. En este punto podía procederse ya a la ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (a) o a la cromatografía de intercambio iónico en columnas

QIAGEN (b).

a) Ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio.

Se han utilizado tubos Beckman Quick-Seal par el rotor Beckman Ti70. La solución conteniendo la muestra era enrasada con TE hasta un volumen igual a 25 ml. A continuación se añadía 25 g de cloruro de cesio (1 g/ml de solución).

Se adicionaba seguidamente 0.8 ml de una solución de bromuro de etidio por cada 10 ml de solución de DNA + Cloruro de Cesio.

El tubo era llenado totalmente con aceite de parafina (Merck) y sellado.

Se ultracentrifugaba a 45000 rpm durante 42 h a 20 °C.

Tras la ultracentrifugación se visualizaban dos bandas localizadas en el centro del gradiente, siendo la banda inferior la correspondiente al DNA plasmídico, ésta era extraída con la ayuda de una aguja hipodérmica.

Seguidamente se procedía a la eliminación de bromuro de etidio disuelto con el DNA. A la solución conteniendo el DNA se añadía un volumen de 1-butanol saturado con agua, se agitaba y se centrifugaba a 1500 rpm durante 3 min en una centrífuga de sobremesa. La fase acuosa era extraída y se repetía el proceso durante 6 veces. Hecho esto, se eliminaba el CsCl por diálisis frente a TE, el DNA se precipitaba después con dos volúmenes de etanol, y el DNA que se recuperaba era redisoluto en 1 ml de TE. Se cuantificaba midiendo la absorbancia a 260 nm.

b) Cromatografía de intercambio iónico en columnas QIAGEN.

Qiagen es el nombre comercial de una resina de intercambio aniónico ligada covalentemente a una matriz de gel de sílice que presenta una cubierta hidrofílica para prevenir la adsorción inespecífica. Esta resina ha sido desarrollada por Qiagen inc. Studio

City, California, USA. El DNA es purificado siguiendo una estrategia cromatográfica y la calidad resultante es equiparable a la obtenida mediante la ultracentrifugación en cloruro de cesio.

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

-Se equilibraba la columna con 5 ml de un tampón que contenía: NaCl 400 mM, MOPS 50 mM, etanol 15 %, pH 7.0.

-Se adsorbía el DNA a purificar a un flujo de 2 ml/min, el DNA está disuelto en NaCl 0.8 M, MOPS 80 mM, pH 7.0. Estas columnas admiten como máximo 500 μ g de DNA.

-Se lavaba la columna con 20 ml de un tampón compuesto por: NaCl 1 M, MOPS 50 mM, etanol 15 %, pH 7.00. De ésta manera se eliminaban proteínas, RNA, fenol y otros posibles contaminantes.

-Finalmente el DNA era eluído con 5 ml del tampón : NaCl 1.5 M, MOPS 50 mM, etanol 15 %, pH 7.5.

El producto eluído, era precipitado con isopropanol (0.8 vol) 30 min en hielo. Después de centrifugar, era lavado con etanol 70 %, secado y redisolto en TE.

Obtención de DNA de cadena sencilla de M13.

La secuenciación de DNA por el método dideoxi de Sanger (1977) puede realizarse a partir de DNA de doble cadena, desnaturalizandolo, o bien, preferiblemente a partir de DNA de cadena única. Esto último es preferible, ya que las reacciones de polimerización tienen lugar a partir del único modelo posible y no hay interferencias de la otra cadena de DNA. El resultado final es una mayor resolución, definición, nitidez y también un mayor número de bases en la lectura de la autorradiografía de la electroforesis. Por tanto una gran ventaja de utilizar M13 era la posibilidad de obtener DNA de cadena sencilla.

El procedimiento utilizado ha sido sencillo, en primer lugar se parte de sobrenadante de un cultivo de M13, y se precipitan los fagos con polietilenglicol, a continuación se separan las proteínas del DNA con fenol seguido de cloroformo, y el resultado es precipitado con etanol.

El protocolo ha sido:

-Se crecía en 3 ml de 2 YT, 10 μ l de DH5 α F' con una placa de crecimiento retardado de M13, o bien con 10 μ l de un sobrenadante de M13. Este último obtenido por centrifugación de un cultivo de DH5 α F' o JM109 infectado previamente con M13. El cultivo se realizaba a 37 °C durante 7 horas.

-Se centrifugaba 1.5 ml del cultivo a 12000 rpm, durante 15 min. Se eliminaba el sedimento (células bacterianas), y se repetía la centrifugación para asegurar la total ausencia de material bacteriano.

-A 1.2 ml de sobrenadante se añadían 320 μ l de una solución de Polietilenglicol 6000 al 20%, NaCl 2M. Se agitaba y dejaba a temperatura ambiente durante 15 min.

-Se centrifugaba 15 min a 12000 rpm. El pellet, absolutamente libre de polietilenglicol (punto crítico) era redissuelto en 100 μ l de TE.

-Se realizaba una extracción con fenol (1/1) seguida de una con cloroformo (1/1).

-El resultado era precipitado con etanol y acetato sódico 0.3 M, lavado con etanol 70 % y redissuelto en 15 μ l de TE.

Con éste protocolo se obtenía aproximadamente 1.2 μ g de DNA suficiente para llevar a cabo las cuatro reacciones de secuencia.

2.5.3 ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

De manera rutinaria se han separado, identificado y analizado los ácidos nucleicos por electroforesis en geles de agarosa.

La movilidad electroforética de los ácidos nucleicos en los geles de agarosa es proporcional a la masa de los mismos, ya que la influencia de otros parámetros no es considerable. Siendo el campo eléctrico constante, la velocidad de migración dependerá sólo del peso molecular de las moléculas del DNA, ya que cuanto mayor sea el tamaño de éstas, mayor será el efecto de tamiz molecular que sufriran estas moléculas a su paso por los poros del gel de agarosa, y por lo tanto la distancia recorrida al final del proceso electroforético será menor,

En las moléculas de RNA es algo mas complejo, debido a las estructuras secundarias que forma el RNA en el espacio y que puede conducir a que moléculas con pesos moleculares parecidos tengan movilidades electroforéticas totalmente diferentes. Para obviar este problema, el RNA puede ser desnaturalizado de diferentes maneras. En ésta trabajo se ha utilizado de forma exclusiva la desnaturalización en presencia de formaldehido y formamida, calentándolo a 65 °C durante 10 min. Seguidamente se pone en hielo, para impedir una renaturalización, y la electroforesis se realiza en presencia de formaldehido en el gel de agarosa y en el tampón de recorrido. El protocolo seguido ha estado basado en el método de Hod et al., (1984).

a) **Electroforesis de DNA.**

El protocolo seguido para las electroforesis de DNA ha sido el siguiente:

-Se preparaba el gel de agarosa, normalmente al 1%, disolviendo 0.5 g de agarosa en 50 ml de TAE. Se funde la agarosa y se deja enfriar hasta unos 50 °C aproximadamente. Cuando la agarosa está a esta temperatura, se deposita en la cubeta.

-Una vez gelificada, se llena la cubeta de electroforesis con tampón TAE,

hasta conseguir que el gel esté totalmente sumergido. Puede añadirse bromuro de etidio a una concentración de 0.6 $\mu\text{g/ml}$, al tampón y al gel, lo cual permite la visualización directa de las moléculas.

-Las muestras se cargan disueltas en tampón de carga, que normalmente se prepara 6 veces concentrado. En éste trabajo hemos empleado el siguiente concentrado: 0.25% Azul de bromofenol, 0.25% xileno de cianol, sacarosa 40/.

-Se aplica una corriente que varía entre 50 y 100 mA durante 30-60 min.

-Acabado el tiempo, el gel puede teñirse con bromuro de etidio (en caso de que no esté incorporado al gel), y la visualización se realiza en un transiluminador a una longitud de onda de 300 nm. Las bandas correspondientes al DNA se ven fluorescentes por acción del bromuro de etidio intercalado entre las bases nitrogenadas.

Alternativamente se han llevado a cabo electroforesis de DNA utilizando TBE en lugar de TAE. Esto se ha hecho para visualizar DNA de cadena sencilla de M13. En este caso, además el gel se preparaba al 0.7% de agarosa.

b) Electroforesis de RNA.

El protocolo seguido para las electroforesis de RNA ha sido el siguiente:

-Se preparaba el gel disolviendo 1.5 g de agarosa en 35 ml de agua. Una vez fundida la agarosa, se dejaba enfriar hasta unos 50 °C y se añadía 5 ml de tampón borato (concentrado 10 veces (0.5 M ácido bórico, 50 mM borato sódico, 10 mM citrato trisódico, pH 7.2), y 10 ml de formaldehído. Dejábase gelificar en un recipiente adecuado para la formación del gel horizontal.

-Se sumergía el gel en la cubeta de electroforesis, cubriéndose con tampón borato (1) conteniendo formaldehído al 10%.

-Las muestras eran preparadas como sigue: 10 μ l de RNA conteniendo 0.1–10 μ g de RNA, se le añadía 5 μ l de formamida desionizada y 2,5 μ l de formaldehído. Se calentaba a 65 °C 20 min y se mantenía en hielo al menos 5 min para impedir la renaturalización. Se añadía tampón de carga: glicerol 40%, azul de bromofenol 0.25%, disuelto en tampón borato.

-Se aplicaba una corriente de 50–100 V durante 1 h aproximadamente.

-El gel era teñido, sumergiendolo en acetato amónico 0.5 M conteniendo bromuro de etidio 0.6 μ g/ml, durante 1 h. Podía desteñirse con agua destilada, si había mucha fluorescencia inespecífica.

2.5.4 DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones con enzimas de restricción se han llevado a cabo, en presencia del tampón apropiado para cada enzima (A,B,H,M,L), a 37 °C, y con tiempos variables, siempre superiores a 1 h. Se ha tenido en cuenta la necesaria dilución de al menos 10 veces del enzima, debido a la presencia de glicerol que puede inhibir la actividad.

2.5.5 TITULACION Y AMPLIFICACION DE LIBRERIAS DE cDNA

En este trabajo se han utilizado genotecas construídas en lambda gt11. Para titular el stock de fagos conteniendo la librería se hacían diferentes diluciones en SM de los fagos (en un rango de 10^{-2} a 10^{-8}), y se incubaba 1–10 μ l de cada una de estas diluciones con 0.1 ml de un cultivo bacteriano de la cepa adecuada (Y1090 o Y1088). Este cultivo era un crecimiento a saturación , centrifugado y redisolto en $MgSO_4$ 10 mM. Se incubaban las bacterias más el fago a 37 °C durante 30 min para permitir la adsorción del fago a las paredes de la bacteria (esta adsorción era mejorada si se crecía la bacteria en presencia de maltosa, pues la activación del operon de la maltosa implica la síntesis de un receptor que es reconocido por el fago lambda). Seguidamente, el conjunto fago mas bacteria era mezclado con top–agar fundido y mantenido a 45 °C suplementado con magnesio 10 mM, y el conjunto era depositado sobre una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo

apropiado. Al día siguiente, se contaban las calvas de lisis formadas, y teniendo en cuenta las diluciones y el volumen de fagos, se determinaba el número de partículas infectivas de fago por mililitro.

Si el título de la genoteca era inferior a 10^{-8} pfu/ml, se realizaba una amplificación de la misma.

Para amplificar la librería se mezclaban 1.7×10^9 cel con 57000 fagos, un número de tubos variable entre 25 y 30. Se incubaba 20 min a 37°C , se mezclaba con top-agar y se cultivaba en placas de Petri de 15 x 15 mm. Se dejaba crecer durante 8 horas a 42°C y se añadía 12 ml de SM, se dejaba agitando toda la noche a 4°C , y al día siguiente se extraía el SM, donde habían quedado disueltos los fagos, se añadía cloroformo al 5 %, agitándose durante 15 min para matar las posibles bacterias que pudieran quedar, se centrifugaba al $4000 \times g$ 5 min a 4°C y se guardaba en alicuotas a 4°C con cloroformo al 0.3 %.

2.5.6 SCREENING O RASTREO DE LIBRERIAS DE cDNA EN LAMBDA-gt11

El método utilizado para el rastreo de librerías ha sido básicamente el descrito por Wahl y Berger (1987). En todos los casos hemos utilizado DNA como sonda para aislar los posibles clones positivos que pudiera haber en la librería. Una vez conocido el título de la librería, hay que realizar la extensión de la misma, para ello es necesario calcular el número de pfu (plaque forming units), que es necesario extender, para tener una alta probabilidad de encontrar como mínimo un clon positivo. Este cálculo se hace a partir de la ecuación (Clarke y Carbon, 1976)

$$N = \ln(1-P)/\ln(1-n)$$

siendo:

N: n de clones que hay que estudiar

P: probabilidad de hallar el clon que nos interesa.

n: fracción proporcional del RNA total que representa el clon que buscamos,

es decir, n varía en función de la abundancia relativa del RNA codificado por nuestro gen

Para un RNA abundante: $n = 1.5 \times 10^{-2}$ y $N = 3.1 \times 10^2$

Para un RNA moderadamente abundante, $n = 4 \times 10^{-4}$ y $N = 1.2 \times 10^4$

Para un RNA raro, $n = 4 \times 10^{-5}$ y $N = 1.2 \times 10^5$

Para un RNA muy raro, $n = 5 \times 10^{-6}$ y $N = 9.2 \times 10^5$

Sabiendo que un RNA se considera teóricamente abundante cuando hay una 10000 copias por célula, moderadamente abundante cuando hay unas 1000, raro en el caso de unas 10 y muy raro cuando solo hay una, siendo todas estas consideraciones generalizadas para un tipo de célula hipotético, con unas 21000 especies diferentes de RNA, representando una célula típica de mamífero.

Tal como se desprende de las consideraciones anteriores, se necesita una genoteca inicial de 10^6 recombinantes para asegurar estadísticamente la representación del RNA de cualquier gen.

Después de calcular el número de pfu que hay que extender, y conociendo el título de la genoteca, se procede a la extensión del primer screening. Para calcular el número de placas de Petri que se necesitan, se tiene en cuenta que en placas de 9 cm de diámetro, caben 2000 pfu, para poder ser estudiadas en un primer screening. En placas de Petri de 15 cm de diámetro, se multiplica la superficie por 2.5, es decir 30000.

La extensión se hace de forma idéntica a la descrita en el apartado 2.5.5 y se incuba a 42 °C durante 7 horas (momento en que empiezan a aparecer las calvas), entonces se ponen en hielo y se procede a la transferencia

Transferencia a filtros de nitrocelulosa y tratamiento de los mismos.

Se han utilizado filtros de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, 0.45 μm).

–Se numeran los filtros y se colocan con pinzas encima de la placa de Petri

donde estan los fagos. Se dejan 1 min para conseguir la transferencia del material fágico.

-Con una aguja impregnada con tinta se marcan tres puntos asimétricos sobre las placas de Petri y los filtros para poder, después de la hibridación, orientar e identificar las colonias positivas.

-A continuación, los filtros se ponen encima de papel de filtro Whatman 3 MM impregnado de las siguientes soluciones durante el tiempo indicado (precaución con la parte que contiene el material fágico hacia arriba).

-1 min en NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M para desnaturalizar el DNA

-2 min en Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0, NaCl 1.5 M.

-2 min en 2 x SSC para neutralizar

Se dejan secar los filtros y se mantiene a 90 °C durante 1 h 30 min, para conseguir la fijación del DNA a la nitrocelulosa.

Hibridación de los filtros

La hibridación se ha realizado en todos los casos utilizando como sonda DNA de diferentes longitudes y homologías. Así se han utilizado sondas de 0.4 kb, 0.8 kb, 0.9 kb y 1.7 kb. Las sondas se marcan con ³²P mediante el sistema Random Primed (Boehringer Mannheim), a partir de la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (1983).

Que un DNA hipotético pueda hibridar con otro DNA, depende de la homología existente entre ellos, y de las condiciones experimentales en que se realiza la hibridación. Para calcular estas condiciones, hay que tener en cuenta el concepto de T_m (melting temperature), que es la temperatura a la cual un 50% de la doble cadena de DNA se encuentra en la forma disociada. Para un DNA típico, la gráfica que relaciona la reasociación con la temperatura, muestra una curva con un máximo de reasociación a una

temperatura aproximadamente igual a $T_m - 25\text{ }^\circ\text{C}$ (Hames y Higgins, 1985). Además de la temperatura, otros parámetros que afectan a la velocidad de reasociación son: la concentración de sal, la homología existente entre ambas cadenas (aproximadamente un 10% de mismatch reduce la velocidad de reasociación en un factor de 2), la longitud del fragmento, y la concentración de formamida. Todos estos parámetros están recogidos en la ecuación desarrollada experimentalmente por Casey y Davidson en 1977, y que nos permite determinar las condiciones óptimas de hibridación (Wahl et al, 1987)

$$T_m = 81.5 + 16.6 \text{ Na} + 0.41 (\text{G+C}) - 500/L - 0.62 (\% \text{ formamida})$$

Siendo:

L: n de pb de la sonda

Na: concentración del ión sodio en las mezclas de hibridación o lavado. Esta concentración depende de la concentración del tampón SSC y del fosfato sódico que se utiliza. Así en el caso de utilizar 25 mM de fosfato sódico en la mezcla de hibridación, la Na resulta ser $\text{SSC} \times 0.195$.

% formamida: es el porcentaje de este producto en la mezcla de hibridación. Se ha comprobado experimentalmente que la presencia de formamida en la mezcla de hibridación disminuye la temperatura de hibridación.

(G+C): es el tanto por uno de la suma de estas dos bases en la secuencia total de la sonda. Caso de desconocerlo, se considera que es el 50%.

La hibridación se realiza normalmente en condiciones de poca estringencia ($25\text{ }^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m), mientras que los lavados se realizan normalmente en condiciones de máxima estringencia ($5\text{ }^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m).

El protocolo que se ha seguido para la hibridación ha sido el siguiente:

-En primer lugar se prehibridaban los filtros a razón de 0.1 ml/cm² con la mezcla de prehibridación:

Formamida 50%

Denhardt's 5x

DNA esperma de salmón (Boehringer) 150 µg/ml

SSPE 5x

SDS 0.1%

La prehibridación se realizaba durante 8 horas a 42 °C

-La hibridación se realiza en el mismo medio en presencia de sonda marcada (1000000 cpm /ml) durante una noche a 42 °C.

En estas condiciones, las hibridación se realiza a unos 25 °C por debajo de la T_m (condiciones óptimas de hibridación).

Marcaje de la sonda

Como se ha explicado, se ha seguido el procedimiento de Feinberg y Vogelstein (1983), comercializado por Boehringer. A un DNA previamente desnaturalizado, añade una mezcla de todos los posibles hexanucleótidos que actuaran como cebadores para la síntesis de la cadena complementaria, para lo cual se añade la enzima Klenow (DNA polimerasa I sin actividad 5'--3' exonucleásica)y, y nucleótidos (uno de ellos marcado radiactivamente). En nuestro caso hemos empleado citosina marcada con ³²P en posición α. El protocolo seguido es el siguiente:

-Se desnaturalizan 20-100 ng de DNA disueltos en 10 µl, calentando a 100 °C durante 5 min, y se deja enfriar 5 min en hielo.

-Se añaden 20 µmoles dGTP,dTTP,dATP, 2 µl del tampón de mezcla de reacción que contiene: tampón HEPES 200 mM pH 6.6, la mezcla de hexanucleótidos 1.78 mg/ml, 2-mercaptoetanol 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 5 mM.

-Se añaden 4 μ l de α -³²P dCTP (3000 Ci/mmol) y 5 unidades de DNA polimerasa I (Klenow).

-Se incuba a 37 °C durante 2 horas. La reacción se para con 2 μ l de EDTA 0.5 M, pH 8.0, y 10 min a 65 C.. El α -³²P dCTP no incorporado se separa de la sonda marcada mediante una columna de Sephadex G-50 en una jeringa de 1 ml y equilibrada con 6xSSC.

Hemos obtenido rendimientos de marcaje entre un 40-60% de incorporación.

Lavados de los filtros

Según la homología existente entre las sonda y el DNA a hibridar, los lavados se hacen en diferentes condiciones de estringencia. En el caso de homología entre un 90 y un 100%, los filtros se lavan en los siguientes baños que corresponden a una temperatura final de 10 °C por debajo de la T_m:

- 15 min en una solución SSC 2x, SDS 0.1 %. Temperatura ambiente.
- 15 min en una solución SSC 1x, SDS 0.1 %. 42 °C.
- 15 min en una solución SSC 0.5x, SDS 0.1 %, 42 °C.
- 15 min en una solución SSC 0.2 %, SDS 0.1 %, 56 °C.
- 20 min en una solución SSC 0.1 %, SDS 0.1 %, %/ °C.

En el caso de homologías inferiores, hay que hacer los lavados a una estringencia menor

Después, se secan ligeramente los filtros (si se secan totalmente, no pueden volverse a rehibridar) y se exponen en autorradiografía en una película Agfa Curix RP2, desde unas pocas horas a varios días en función de la intensidad de la señal radiográfica esperada.

Los filtros pueden ser reutilizados, eliminando la sonda hibridada, lo cual se consigue calentando durante 10 min a 100 °C en una solución que contiene SSC x 0.1 y SDS 0.1%. Se comprueba por autorradiografía que no queda ninguna señal.

Revelado y aislamiento de clones positivos

Tras la autorradiografía, el film se revela, y se superpone en la placa de Petri correspondiente haciendo coincidir las marcas de tinta, pudiéndose detectar así la marca positiva. Esta se recupera con una pipeta Pasteur y se extrae todo el cilindro del medio que la contiene. Se deposita en un tubo eppendorff numerado, con 1 ml de SM mas dos gotas de cloroformo, para matar las bacterias huespedes. Se agita con vortex y se deja una noche a 4 °C para eluir el fago.

Rescreening

Se hace necesario purificar los clones obtenidos mediante un segundo rastreo o rescreening. Para hacerlo, se titula de nuevo cada uno de los clones haciendo diversas diluciones y extendiendo tal y como se explica en el apartado 2.5.5. Conseguida la dilución óptima se procede de forma idéntica a lo descrito para el primer screening. Este proceso se repite hasta que se obtiene una población totalmente positiva en una placa.

Los clones purificados pueden guardarse a 4 °C en 1 ml SM con 2 gotas de clorofomo durante tiempo indefinido.

2.5.7 PURIFICACION DE DNA DE FAGO LAMBDA

Obtenidos los clones positivos en el rastreo, se hace necesario la purificación a gran escala de DNA de estos fagos, para así aislar el inserto que contiene el DNA recombinante, y poder subclonar en otro vector mas facilmente manipulable.

Hemos seguido, basicamente el método descrito por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989):

-Se mezclaban 8×10^7 pfu de fago con 1.6×10^{10} bacterias (normalmente Y1090), y se dejaba infectar 20 min a 37 °C.

-Se inoculaban 800 ml de LB (suplementado con MgSO_4 10 mM y ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$). Se mantiene a 37 °C durante 2 horas. Se miraba la absorbancia a 600 nm.

-Se medía la absorbancia cada 45 min y cuando se producía una bajada brusca de la absorbancia, se considera que se ha producido la lisis por parte del fago (esto ocurre a las 7 u 8 horas).

-Se añadían 10 ml de cloroformo para matar las células bacterianas y se mantenía en agitación durante 30 min.

-Se le añadía al cultivo NaCl hasta una concentración final de 1 M.

-Se centrifuga en tubos estériles, a 8000 rpm en un rotor GS-3 a 4 °C, 20 min.

-Al sobrenadante se le añadía PEG 6000 hasta una concentración final del 10 %.

-Se dejaba una noche en cámara fría para permitir la precipitación del material fágico.

-Se centrifugaba a 10000 rpm , 30 min, 4 °C, rotor GS3.

-El pellet era redisolto en 4 ml de SM

-Se realizaba una extracción con cloroformo/alcohol isoamilico (24:1)

-El material extraído se depositaba encima de dos cojines de CsCl, uno de densidad 1.6 (1.6 ml), y uno superior de densidad 1.4 (4ml). Se utilizaban tubos Screw/tap de 10 ml para rotor Ultracentrífuga Beckman 50 Ti.

-Se ultracentrifuga a 35000 rpm, 3h, 22 C. Rotor 50 Ti.

-El fago tiene una densidad = 1.5 y bandea en la interfase. Se extrae la banda correspondiente al fago y se añade CsCl a concentración saturante hasta un volumen final de 3 ml.. Encima de esta capa, en un nuevo tubo, se depositan 4 ml de CsCl de densidad = 1.6; y encima se depositan 2.5 ml de CsCl densidad 1.3.

-Se ultracentrifugaba a 35000 rpm, 2 horas, 22 °C, rotor 50 Ti.

-Se extraía la banda que quedaba en la interfase.

El resultado podía guardarse a 4 °C como stock de fagos. De aquí podía extraerse el DNA por un método como el que sigue:

-160 μ l del stock de fagos se le añadían 16 μ l de Tris 2 M, 8 μ l de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y 160 μ l de formamida desionizada.

-Se agitaba con vortex y se dejaba 2 h a temperatura ambiente, se añadían 160 μ l de agua esteril y 1000 μ l de etanol frio.

-Se dejaba precipitar 20 min a temperatura ambiente, se centrifugaba, el pellet se lava con etanol al 70%. Se seca mediante Speed-Vuc y se resuspendía en 200 μ l de TE.

-Tras una extracción con fenol, clorofomo y precipitación con etanol, el resultado es DNA, altamente purificado, y listo para ser sometido a digestiones con endonucleasa de restricción para liberar el inserto correspondiente.

Un método alternativo utilizado ha sido mediante la utilización de la ultracentrifugación para sedimentar las partículas fágicas. El protocolo seguido ha sido:

-Tras la obtención de la lisis de 50 ml de cultivo preparado tal como se describe en el apartado anterior (6-8 h), se añadían unas gotas de cloroformo para romper las células supervivientes. Tras agitación de 15 min, se centrifugaba en un rotor Sorvall SS-34 durante 10 min a 10000 rpm.

-Se eliminaba el pellet, y el sobrenadante era incubado durante 1 h a 37 °C con 50 µg de DNAsa (Boehringer) y 250 µg de RNAsa.

-Se ultracentrifugaba a 28000 rpm durante 2 h en un rotor Beckman SW28.

-El pellet era redissuelto en 200 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0

-Tras dos extracciones con fenol, dos con cloroformo, y precipitación con etanol, se centrifugaba 15 min a 4 °C, se lavaba el pellet con etanol al 70 %, se secaba en Speed-Vac, y se resuspendía el pellet en 100 µl de TE.

El DNA obtenido era igualmente de una alta calidad, era cortado perfectamente con las enzimas de restricción, y por lo tanto era útil para el subclonaje. Este método presenta la ventaja de una mayor rapidez sobre el anterior descrito.

2.5.8 SUBCLONAJE DE LOS INSERTOS AISLADOS

Obtenido el DNA de lambda, se hace necesario el aislamiento del inserto del fago recombinante y el clonaje del mismo en un vector versátil. En nuestro trabajo, los insertos se han subclonado en M13 mp18 y M13 mp19, en pUC 19 y en Bluescript.

El inserto se digería con la enzima Eco R1, y se sometía la digestión a electroforesis en agarosa al 1%. La banda correspondiente al inserto se recortaba con un bisturí, y se eluía el DNA de la agarosa mediante el procedimiento comercializado por Bio

101 Inc (San Diego, USA) denominado Gene-Clean (marca registrada). Este procedimiento se basa en la adsorción del DNA a una matriz de sílice (glassmilk). En primer lugar se disuelve la agarosa y el DNA calentando a 50 °C en presencia de NaI 4M, seguidamente se añade a la mezcla de reacción la matriz silíceica, donde queda unido el DNA y separado de la agarosa. Tras unos lavados con una solución alcohólica, se calienta a 50 °C en presencia de TE, disolviéndose el DNA en el TE. Con este procedimiento se obtiene un DNA de una pureza suficiente para realizar reacciones de ligación, digestiones, etc.

El protocolo seguido era el siguiente:

-La banda recortada, era incubada a 50 °C, con 4 vol de NaI 6M, durante 5 min.

-Una vez disuelta la agarosa, se le añadían 5 μ l de glassmilk, se agitaba con vortex 1 min, y se dejaba a 0 °C durante 5 min.

-Se centrifugaba en microcentrifuga Heraeus durante 5 min, y se eliminaba el sobrenadante.

-El pellet era redisolto en la solución de lavado New Wash (600 μ l), y vuelto a centrifugar durante 5 seg. El sobrenadante era eliminado y se repetía el proceso.

-Finalmente se redisolvió el pellet en 15 μ l de TE, se calentaba a 50 °C durante 3 min para facilitar la disolución del DNA en TE, se centrifugaba durante 30 seg, para eliminar la matriz de sílice y el sobrenadante contenía el DNA listo para la reacción de ligación.

Paralelamente se preparaba el vector, para lo cual 250 nm de vector intacto eran digeridos con la enzima apropiada (Eco R1 en la mayoría de los casos). Tras la digestión, se hacía una extracción con fenol, seguida de una extracción con cloroformo y una con éter. Se precipitaba con etanol a -80 °C durante 1 hora, y tras lavar con etanol 70%, secar y redissolver en TE, se cuantificaba y quedaba el DNA listo para la reacción de ligación.

Reacción de ligación

Para las reacciones de ligación, se procuraba poner en exceso 3 veces más moléculas de inserto que de vector. El número de moléculas se calculaba a partir de la concentración de DNA de cada una de las especies, y del peso molecular de cada DNA.

La mezcla de reacción se hacía en un volumen final de 20 μ l totales, y contenía además de las dos especies de DNA, ATP 0.5 mM, DTT 1 mM, BSA 100 μ g/ml, juntamente con tampón de reacción: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, MgCl₂ 10 mM. Añadíanse 1 U de T4 DNA ligasa (Boehringer) y se completaba la reacción a 16 °C durante 16 horas.

Se incorporaba como controles de la reacción de ligación:

-vector cortado, que era religado mediante esta reacción. En el caso de M13 se incorporaba 1 ng de vector cortado.

-DNA de lambda cortado con diferentes enzimas de restricción: 100 ng. Tras la reacción, podía comprobarse mediante electroforesis, la presencia de una sola banda de DNA correspondiente al peso molecular de lambda.

Concluido el tiempo de la reacción, el producto resultante podía ser utilizado directamente en la transformación.

Transformación de células competentes.

Una vez construido el vector recombinante, se procedía a la transformación de células huésped, que portarían de esta manera el nuevo DNA recombinante. Estas células han de ser tratadas previamente para convertirlas en competentes (es decir para poder asimilar DNA extraño). El tratamiento consistía básicamente en tratar las células con una solución de CaCl₂, el cual permeabiliza la membrana plasmática permitiendo la entrada de material genético foráneo.

El método utilizado, ha sido el descrito por Hanaham (1983).

Se crecían células DH5 α F' rec A- hasta una absorbancia a 600 nm igual a 0.6, y se paraba el crecimiento a 0 °C durante 15 min.

Se centrifugaba el cultivo a 600 x g durante 15 min y se redisolvió en 1/3 del volumen de tampón TFB

Se mantenían a 0 °C durante 15 min.

Se centrifugaba de nuevo a 600 x g durante 15 min.

Las células eran de nuevo redisueltas en 1/12.5 del volumen original de TFB.

Para incrementar la eficiencia de transformación, se añadía por cada 200 μ l de células, 7 μ l de la solución Dnd (DTT 1 M, DMSO 90 % v/v, acetato potásico 10 mM). Se dejaban 10 min en hielo, y se añadían nuevamente 7 μ l de solución Dnd. Tras 10 min en hielo, las células quedaban a punto para ser utilizadas, o bien podían guardarse congeladas mediante N₂ líquido a -80 °C. Sin embargo la experiencia de esta tesis aconseja la no congelación de las células y su preparación para cada experimento.

Transformación con DNA fágico.

En las condiciones descritas, 1 μ l de la mezcla de ligación se incubaba durante 40 min en hielo con 200 μ l de células. Seguidamente se hacía un shock térmico de 90 seg a 42 °C se dejaba nuevamente en hielo.

Se preparaba un tubo a 45 °C con 3 ml de Top-Agar, 50 μ l de X-gal disuelto en dimetil formamida a una concentración de 20 mg/ml, y 200 μ l de un cultivo crecido hasta saturación de DH5 α F'. Al conjunto se añadían 50 μ l o 150 μ l de células transformadas, y se depositaba sobre una placa de Petri con medio de cultivo 2YT. Se incubaba a 37 °C.

La detección de los clones recombinantes se hacía gracias al compuesto X-gal. La infección de células deficientes en β -galactosidasa (gal-), como las DH5 α F' por un fago intacto que contiene el gen Lac Z codificante para la β -galactosidasa, complementa el fenotipo de las células huésped. Así las células que se han convertido en gal+ son capaces de metabolizar el X-gal en un pigmento de color azul. Al contrario los fagos M13 que han insertado un fragmento de DNA en el "polilinker" de clonaje situado en el lac Z, no pueden dar a la célula huésped el fenotipo gal+. De esta forma, las calvas de crecimiento retardado aparecen azules para un fago salvaje y blancas para un fago recombinante. Hay que añadir, que cuando se utiliza la citada cepa, no es necesario añadir el inductor del operón lac IPTG, dado que estas células al no contener el gen lac Iq, que codifica para la superproducción del represor del operón lac, presentan el operón lac inducido de forma constitutiva.

Transformación con DNA plasmídico.

El protocolo seguido es muy similar al descrito para el caso de DNA de M13. Tras el shock térmico, al conjunto se le añadían 800 μ l de medio de cultivo, y se incubaba a 37 °C durante 30 min. Seguidamente se preparaba un tubo con 3 ml de Top-Agar, 50 μ l de X-gal y se cultivaban diferentes cantidades de células transformadas (50, 100, 200... μ l), sobre placas de medio de cultivo con ampicilina 50 μ g/ml. Se incubaba toda la noche a 37 °C.

La detección, siendo idéntica a lo descrito en el anterior apartado, presenta la ventaja de que sólo aquellas células que hayan incorporado un plásmido van a poder crecer, debido a la necesaria resistencia al antibiótico que deben poseer y que solo presentaran aquellas que hayan incorporado un plasmido

2.5.9 TECNICAS DE SECUENCIACION

Se ha utilizado el método del bloqueo de la elongación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Ese método, elonga un cebador (o "primer") en el sentido de la región a secuenciar mediante el fragmento Klenow de la DNA polimerasa o

bien mediante la polimerasa de T7. Las secuencias nucleóticas se determinan gracias a la detención de la polimerización debida a un bloqueante: los dideoxinucleótidos, análogos modificados de los nucleótidos que aunque pueden incorporarse a la cadena, impiden que la polimerasa siga añadiendo nucleótidos y elongando. Se realizan cuatro reacciones, cada una de las cuales utiliza un bloqueante (dideoxinucleótido) distinto: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP, y además se incorpora un nucleótido marcado radiactivamente (en nuestro caso α -³⁵S-ATP). Tras las reacciones, se separan las moléculas por electroforesis, y los diferentes tamaños, de las distintas moléculas formadas, nos permiten determinar la secuencia nucleotídica.

Esta técnica, presupone la existencia de un DNA de cadena sencilla, o bien de un DNA desnaturalizado que pueda servir como molde para la actuación de la polimerasa (si el DNA es de doble cadena no desnaturalizado, no puede tener lugar la reacción).

La preparación de DNA de cadena sencilla de M13 se realiza como se ha descrito en el apartado 2.7.2. Esto implica el subclonaje del fragmento a secuenciar en M13.

Puede partirse de DNA de doble cadena que se desnaturaliza mediante tratamiento con NaOH 0.4 M (concentración final) durante 10 min, que se neutraliza con acetato sódico pH 4.5 hasta alcanzar una concentración final de 0.45 M. A continuación se precipita con etanol. El resultado final es redisolto en agua destilada.

Una vez en el DNA está preparado se realiza la hibridación del cebador o "primer" a la cadena a secuenciar. Este primer es complementario de la secuencia adyacente al polilinker o zona de clonaje presente en M13. En M13 existen varias zonas complementarias de diferentes primers o cebadores, que pueden servir como inicio de la elongación de la cadena complementaria. En esta tesis hemos utilizado el denominado "primer universal" presente también en los plásmidos pUC y Bluescript.

DNA	10 μ l
primer	2 μ l
tampón:	2 μ l

(Tris-HCl 200 mM, pH 7.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 250 mM)

Se incubaba a 60 °C durante 10 min y se mantenía a temperatura ambiente un mínimo de 10 min.

Realizado esto, se añadía

labelling mix	3 μ l
α - ³⁵ S dATP	1 μ l (=10 μ Ci)
T7 polimerasa 1.5 U/ μ l	2 μ l

La composición del labelling mix es:

dGTP 7.5 μ M
ddCTP 7.5 μ M
dTTP 7.5 μ M

Se incubaba a temperatura ambiente durante 5 min.

Tras este paso, se tomaban 5 μ l y se pasaban a 4 tubos conteniendo cada uno de ellos 2.5 μ l de cada una de las mezclas de terminación las cuales constan de 80 μ M de cada uno de los deoxinucleótidos mas 8 μ M del dideoxinucleótido correspondiente. Estas cuatro reacciones se desarrollaban durante 5 min a 37 °C.

A continuación las reacciones se paraban mediante 5 μ l de la solución Stop: 95% formamida, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05%, xileno de cianol 0.05 %.

En este punto las muestras podían ser desnaturalizadas a 80 °C durante 2 min y cargadas directamente en el gel de secuencia.

Electroforesis de secuenciación.

Se ha utilizado el aparato comercializado por LKB Macrohor 2010 unit. Se

preparaba un gel de poliacrilamida al 6 % conteniendo Urea 41 % en tampón TBE. El gel era de una anchura de 0.4 mm.

Tras 30 min de preelectroforesis, se cargaban las muestras y se sometían a una corriente de 2000 V durante 2 horas (con lo que la separación efectuada permitía la lectura de unos 200 nucleótidos). Las mismas condiciones de corriente durante 7 horas permitían la lectura de hasta 540 nucleótidos.

Concluída la electroforesis, se realizaba la fijación del gel sumergiéndolo durante 20 min en acético 10 %, metanol 10 %.. Acto seguido se exponía autorradiográficamente durante unas 16 horas como mínimo. Tras revelar la placa radiográfica, la superposición de las diferentes longitudes recorridas por las moléculas formadas en las cuatro reacciones de secuencia y detectadas por la radioactividad incorporada permitían la determinación de la secuencia nucleotídica del DNA

2.5.10 ANALISIS NORTHERN-BLOT

El análisis mediante Northern-blot consiste en la hibridación de RNA, previamente separado por electroforesis y transferido a filtro de nitrocelulosa y fijado al mismo, con una prueba específica que puede ser DNA de diferente longitud, o bien oligonucleótidos de diferente tamaño. En los trabajos correspondientes a esta tesis, hemos utilizado sondas de DNA de longitudes: 800 – 1700 pb. Según las condiciones de estringencia en que realicemos la hibridación, la sonda reconocerá aquellos RNA con los que mantiene una alta homología. En nuestro caso, utilizando como sonda los cDNA clonados, podíamos detectar los RNA mensajeros complementarios de dichos cDNA. Dicha técnica puede servir además para la cuantificación de mRNA en diferentes tejidos, o estadíos del desarrollo.

Los pasos de que consta esta técnica son: obtención del RNA, separación de las diferentes moléculas del mismo por electroforesis, transferencia a filtro de nitrocelulosa o nylon, fijación, prehibridación, hibridación, lavados en condiciones crecientes de estringencia y autorradiografía.

Obtención del RNA

Se ha utilizado el método descrito por McDonald et al (1987), donde se describe el método de Chirgwin (1979) con una modificación original de Glisin (1974). Se emplea el tiocianato de guanidina en la homogenización, el cual es un potente agente desnaturante de proteínas, efecto que es aumentado mediante la adición de 2-mercaptoetanol en el medio de homogenización, consiguiéndose no solo la inactivación de las RNAsas (paso clave en toda purificación de RNA) sino también la desnaturación del resto de proteínas celulares. A continuación, se emplea la ultracentrifugación en un cojín de cloruro de cesio para sedimentar las moléculas de RNA presentes en el homogenado. El RNA presente en el pellet está libre de proteínas y de otras moléculas de ácidos nucleicos. El protocolo seguido ha sido el siguiente:

- 2 g de tejido eran homogenizados con 8 ml de tampón GIT, filtrado por poro de 0.22 μm y se añadía 2-mercaptoetanol al 0.83 % justo antes de usar. La homogenización se hacía en Polytron a velocidad media.

- Se centrifugaba 10 min a 10.000 rpm en un rotor Sorvall SS-34, y se eliminaba el pellet resultante, correspondiente a material insoluble.

-Se depositaba la muestra en tubos de ultracentrífuga conteniendo un cojín de CsCl 5.7 M. Se equilibraban los tubos y se realizaba la ultracentrifugación a 20 °C, a 32.000 rpm, en un rotor Beckman SW41 (correspondía a 175.000 g) durante 22 h.

- Se eliminaba el sobrenadante y el pellet era redisuelto en 100 μl de acetato sódico 0.3 M, pH 6.0. Podía hacerse en este punto una extracción con fenol y cloroformo, aunque esto no aumentaba el grado de purificación del RNA. El resultado era precipitado con etanol y se redisolvió en 100 μl de agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (este tratamiento consistía en añadir DEPC al 0.1 %, y tras una noche de reposo, se autoclavaba).

Electroforesis de RNA

Se sometía el RNA a electroforesis en gel de agarosa con formaldehído como agente desnaturizante. Se ha seguido el método descrito por Hod et al (1984), el cual realiza una electroforesis al 0.7 % de agarosa en tampón borato (0.05 M ácido bórico, 5 mM borato sódico, 1 mM citrato sódico, pH 8.0), conteniendo formaldehído al 10 % (v/v). Las muestras son tratadas con formaldehído (1/4 del volumen de muestra) y formamida desionizada (1/2 del volumen de muestra), se calientan 5 min a 60 °C y se mantienen en hielo 5 min más, a continuación se añade un volumen de tampón de carga (glicerol 40 %, azul de bromofenol 0.4 %, disuelto en tampón bórico). La electroforesis se realiza a 60 V durante 12–15 horas, y se utilizaba como tampón de electroforesis tampón borato conteniendo formaldehído al 10 %.

Tras la electroforesis, el resultado podía ser visualizado mediante tinción durante 2 h con acetato amónico 0.5 M conteniendo 0.6 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, después se lavaba con agua destilada hasta que eran visualizadas las bandas. Normalmente en los experimentos de Northern–blot se incluían algunos carriles control que eran teñidos tras la electroforesis, mientras que el resto de los carriles eran transferidos a filtro de nylon.

Transferencia a filtro de nylon

En los experimentos de Northern–blot de éste trabajo se ha utilizado como membrana de transferencia Gene–Screen (NEN Research Products DuPont). La transferencia se realizaba tratando el gel NaOH 50 mM durante 40 min, Tris–HCl 0.1 M pH 7.4 durante 30 min y fosfato sódico 25 mM pH 6.5 durante 30 min. Igualmente la membrana era tratada 30 min con fosfato sódico 25 mM, pH 6.5. La transferencia se llevaba a cabo durante 20 h utilizando fosfato sódico 50 mM pH 6.5, conteniendo formaldehído al 10 % (v/v). Finalizada la transferencia, el RNA era fijado a 80 °C durante 2 h.

Hibridación

Se ha utilizado el método descrito por Goodridge (1984). La prehibridación se realizaba a 42 °C en formamida al 50 %, tampón PIPES x 2, SDS 0.5 %, y DNA de esperma de salmón 100 µg/ml. La prehibridación se llevaba a cabo en 8 horas, y se añadía a la misma solución de hibridación 10⁶ cpm de sonda marcada por random primer tal y como se describe en el apartado 2.5.6 teniendo la precaución de desnaturalizar la sonda previamente a su adición a la mezcla de prehibridación. Se iniciaba la hibridación a 65 °C durante 15 min y se continuaba a 42 °C toda una noche.

Tras la hibridación se sometía la membrana a lavados de estringencia creciente tal como se describe en el apartado 2.5.6 y se exponía autorradiografiicamente. El revelado de la autorradiografía constituía el resultado del experimento.

2.5.11 ANALISIS SOUTHERN-BLOT

El análisis por Southern-blot consiste en la hibridación de un DNA problema con una sonda determinada para comprobar la homología existente entre ambos DNAs en función de la hibridación resultante. Se puede aplicar a DNA genómico o bien a cualquier DNA procedente de plásmido, fago, etc. Los pasos en que se divide el experimento son similares al caso del Northern-Blot: electroforesis, transferencia, hibridación, lavados autorradiografía y revelado. La referencia original se debe a E.M. Southern (1975).

La electroforesis se lleva a cabo en gel de agarosa tal como se describe en el apartado 2.5.3. A continuación se desnaturalizaba el DNA con HCl 0.25 M durante 10 min, seguido de dos tratamientos idénticos de 30 min con NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M. Se neutralizaba con tres tratamientos idénticos con Tris-HCl 0.3 M, pH 7.5, NaCl 3 M.

La transferencia se efectuaba utilizando SSC x 10 por capilaridad durante una noche. El filtro utilizado en los experimentos de esta memoria era nitrocelulosa. La fijación del DNA a la membrana se conseguía en 2 h a 80 °C.

La mezcla de prehibridación contenía: formamida 50 %, Hepes 50 mM pH 7.0, Denhardt's x 1, SDS 0.1 % y 200 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón. La prehibridación duraba 4 h y era seguida de la adición de 10^6 cpm de sonda marcada radioactivamente por el sistema random primer descrito en el apartado 2.5.6.

Los lavados eran realizados en condiciones de estringencia creciente tal como se describe en el apartado 2.5.6. Igualmente se efectuaba la exposición autorradiográfica y el revelado correspondiente.

3. RESULTADOS

3.1 PURIFICACION DE LA FOSFOGLICERATO MUTASA DE CEREBRO DE RATA

La primera parte de esta tesis ha consistido en la purificación de proteína correspondiente a la fosfoglicerato mutasa de cerebro de rata. La estrategia de purificación seguida se determinó a partir de los trabajos de Bartrons y Carreras (1982) en la copurificación de los tres isoenzimas de la fosfoglicerato mutasa a partir de músculo cardíaco. Para la purificación de la PGM B de rata se probaron dos tejidos en los cuales se encuentra de forma exclusiva dicha isoenzima: hígado y cerebro. La estrategia seguida rinde una proteína libre de contaminación en SDS-PAGE teñido con plata si se parte de cerebro. Sin embargo, partiendo de hígado y con el mismo protocolo de purificación, se observan numerosas bandas al final del proceso (datos no mostrados). Ello nos llevó a elegir el cerebro como fuente de proteína, a pesar del inconveniente que suponía el bajo peso de este órgano (1.8 g como media /animal adulto) y la necesidad de partir de al menos 100 g de tejido en cada purificación.

La estrategia seguida consistía en una extracción de las proteínas solubles en medio neutro, precipitación fraccionada con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa, cromatografía de adsorción en hidroxilapatita y cromatografía de afinidad en Cibacrom-blue Sepharose CL-6B.

3.1.1. EXTRACCION DE PROTEINAS SOLUBLES

Partiendo de 100 g de cerebro aproximadamente (unos 60 animales), se añadian 3 vol de tampón Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.4. Se homogenizaba tal como se describe en el apartado 2.2.1, y se centrifugaba a 7000 rpm en un rotor GS-3 durante 1 hora. El sobrenadante constituía la fracción I.

3.1.2 PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO AMONICO

Se probó la precipitación total de proteínas del extracto con sulfato amónico a diferentes concentraciones. De esta manera se determinó el porcentaje de sulfato amónico adecuado para obtener la máxima concentración de actividad fosfoglicerato mutasa. El

intervalo óptimo determinado fué el comprendido entre el 45 % y el 75 %.

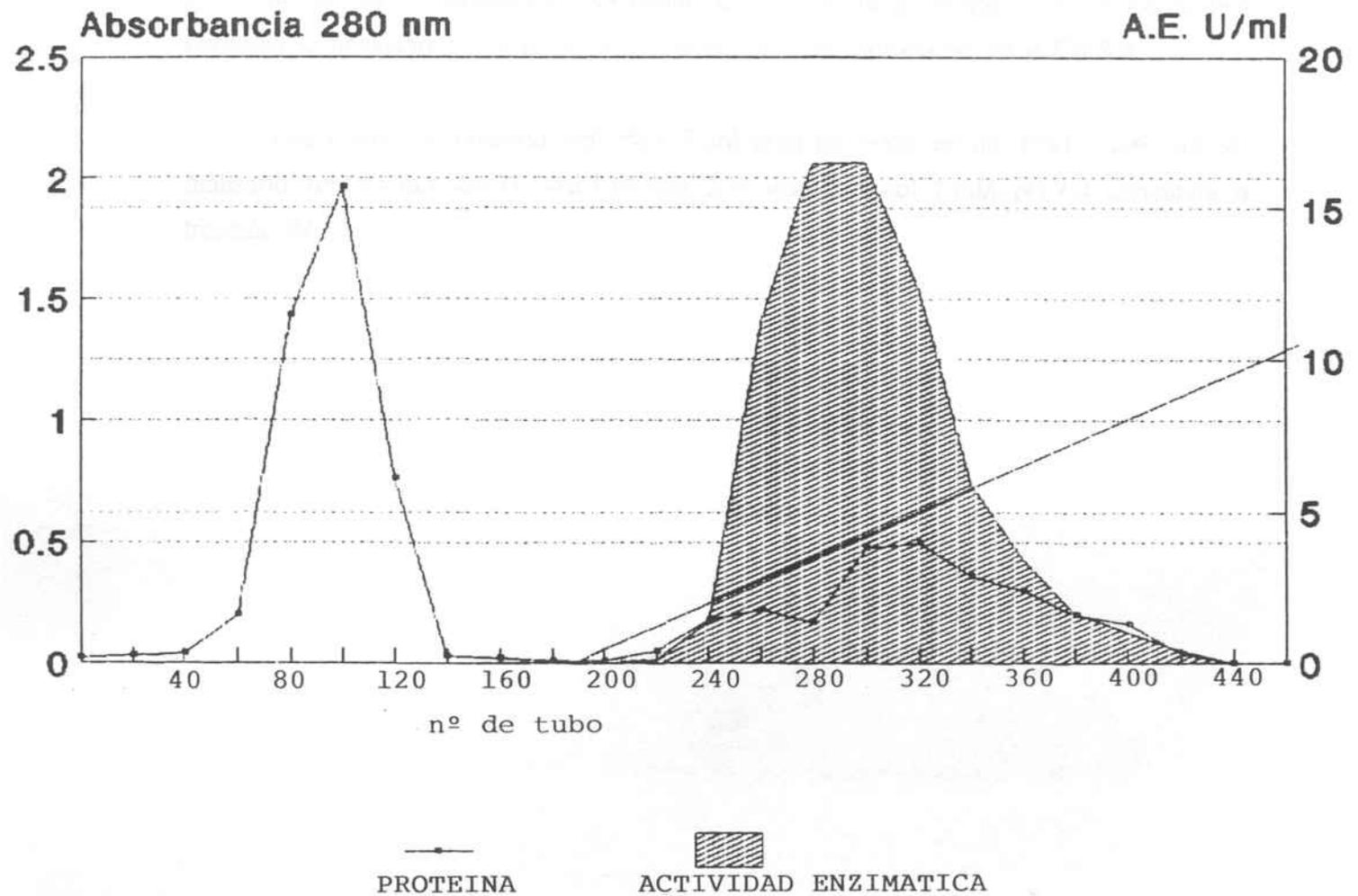
La fracción I, era precipitada con sulfato amónico al 45 % (0.818 vol de sulfato amónico saturado) . Se dejaba reposar durante 3 horas y se centrifugaba en idénticas condiciones a las descritas en el apartado 3.1. El sobrenadante era de nuevo precipitado con sulfato amónico al 75 % (1.2 vol) y se dejaba reposar de nuevo durante 3 horas. Se repetía la centrifugación anteriormente descrita y el pellet era redissuelto en el tampón de extracción. Tras diálisis exhaustiva, el resultado constituía la fracción II.

3.1.3 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE- CELULOSA

La fracción II conteniendo aproximadamente 20 mg/ml de proteína en un volumen de 50 ml era aplicada a una columna de DEAE-Celulosa P23 (Whatman) equilibrada con el mismo tampón de extracción y preparada como se describe en el apartado 2.2.2. La muestra entraba a un flujo de 40 ml/h y se recogían fracciones de 3 ml. La elución de la columna se hacía con el mismo tampón Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.4 hasta que la absorbancia a 280 nm era inferior a 0.05. Seguidamente se aplicaba un gradiente de NaCl de 0-350 mM de 600 ml en total. Al incrementar la fuerza iónica del tampón, la fosfoglicerato mutasa se eluía tal como se representa en el perfil cromatográfico (Fig 3.1)

Las fracciones conteniendo actividad PGM se recogía en un "pool", el cual era precipitado con sulfato amónico al 80 %. A esta concentración precipita toda la actividad fosfoglicerato mutasa tal como se comenta en el apartado 3.1.2. Se dejaba una noche en reposo y se centrifugaba en las condiciones descritas en el apartado 3.1.1. El pellet era redissuelto en tampón fosfatos 10 mM, pH 6.9 y tras diálisis exhaustivas frente a este tampón, constituía la fracción III.

Figura 3.1. Perfil cromatográfico de la columna de DEAE-celulosa. Las fracciones conteniendo actividad PGM (tubos 250-360) fueron reunidas en un "pool" que tras precipitación y diálisis constituyó la fracción III. El gradiente de NaCl se aplicó entre las fracciones 190 y 440.



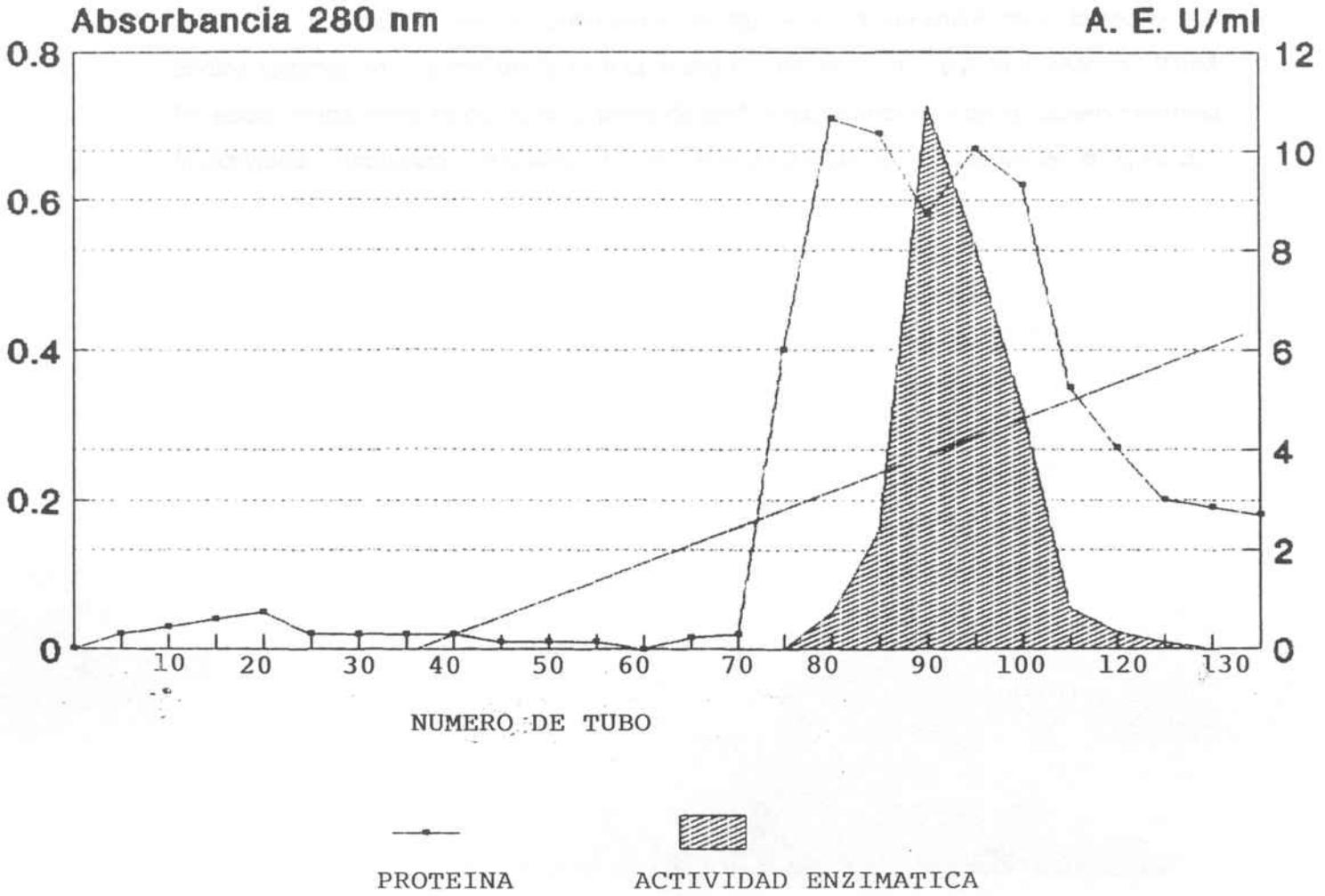
3.1.4 CROMATOGRAFIA DE ADSORCION EN HIDROXILAPATITA

La fracción III conteniendo unos 150 mg de proteína en unos 40 ml de tampón era aplicada a una columna de hidroxilapatita (Bio-Rad) de 15 x 1.5 cm equilibrada con el tampón fosfatos 10 mM pH 6.9, a un flujo de 15 ml/h.

La elución se realizaba con el mismo tampón hasta que la absorbancia a 280 nm era inferior a 0.05. A continuación se aplicaba un gradiente de tampón fosfatos entre 10–200 mM. En estas condiciones se eluían dos picos de proteínas, uno de los cuales contenía la actividad PGM. El perfil cromatográfico se representa en la Fig 3.2.

Los tubos conteniendo actividad PGM eran reunidos en un "pool" que tras ser diálizado frente a tampón Tris-HCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.4, constituía la fracción IV.

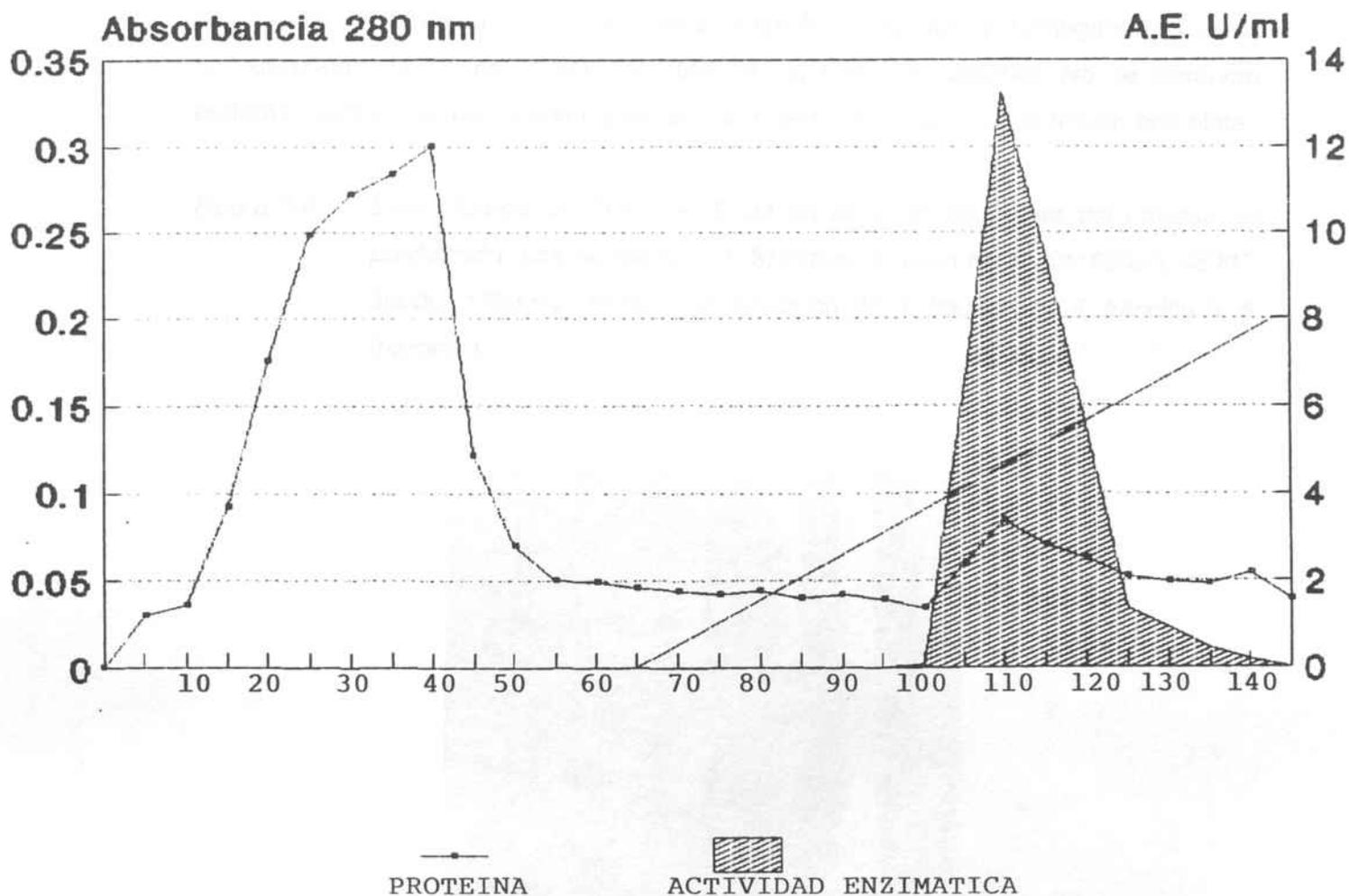
Figura 3.2 Perfil cromatográfico de la columna de hidroxilapatita. El gradiente se aplicó entre los tubos 35 y 130. Los tubos 85-102 se reunieron en un "pool" que constituyó la fracción IV. .



3.1.5 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN CIBACROM BLUE SEPHAROSE CL-6B

La fracción IV que contenía unos 12 mg de proteína en 100 ml de tampón era aplicada a una columna de Cibacron-Blue Sepharose CL-6B de 10 x 1.5 cm equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.4 a un flujo de 5 ml/hora. Se hacía una primera elución con el tampón de equilibrado hasta que la absorbancia era menor de 0.02 a 280 nm. A continuación se aplicaba un gradiente de 2-fosfoglicolato sódico (Sigma) de 0-2 mM de 70 ml total y seguidamente 35 ml de 2-fosfoglicolato 2 mM. En estas condiciones se obtenían 2 picos de proteínas, el segundo de los cuales contenía la actividad fosfoglicerato mutasa. El perfil cromatográfico se representa en la figura 3.3.

Figura 3.3. Perfil cromatográfico de la columna de Cibacrom Blue–Sepharose CL–6B. El gradiente de 2–fosfoglicolato se aplicó entre los tubos 65–140. Los tubos 102–122 se reunieron en un "pool" que constituyó la fracción V.



3.1.6 ANALISIS DE LA PROTEINA PURIFICADA

Electroforesis en SDS

Una alícuota de cada una de las fracciones de la purificación se sometió a electroforesis en SDS-PAGE en las condiciones descritas en el apartado 2.2.3. El resultado se muestra en la figura 3.4 donde puede verse la purificación a homogeneidad de la fosfoglicerato mutasa de cerebro de rata con el protocolo descrito. No se observan proteínas contaminantes ni con tinción con azul de Coomassie ni en la tinción con plata.

Figura 3.4. Electroforesis en SDS-PAGE de las distintas fracciones del proceso de purificación. Los carriles son: 1, Standard de peso molecular 69000, 45000, 30000, 17000; 2, fracción V; 3, fracción IV; 4, fracción III; 5, fracción II; 6, fracción I.

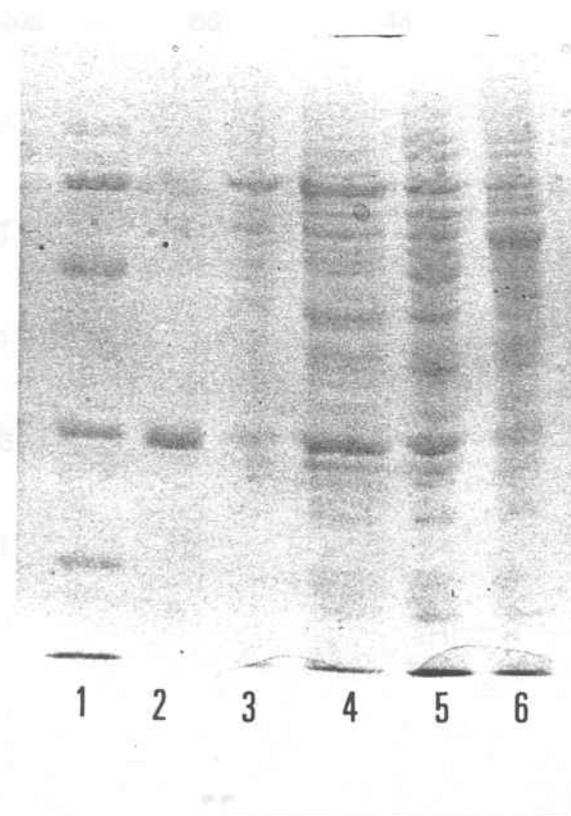


Tabla de purificación

La tabla 3.1 esquematiza el proceso de purificación. Se confeccionó analizando las alícuotas de las fracciones 1–6. Se determinó la concentración de proteínas (método de Lowry apartado 2.5) y la actividad fosfoglicerato mutasa hasta NADH (apartado 2.2.6). Los resultados indican que se obtuvo una purificación de unas 105 veces con un rendimiento del 8.7 %.

Tabla 3.1

Tabla de purificación de la fosfoglicerato mutasa B

	FI	FII	FIII	FIV	FV
Volumen (ml)	200	56	44	100	20
Proteína (mg/ml)	7.9	18.56	3.25	0.11	0.066
Proteína Total (mg)	1580	1041	143.12	11.52	1.32
Act.Enz. (U/ml)	11.57	39.28	29.79	6.29	10.15
Act.Enz. Total (U)	2314	2200	1311	629	203
Act Esp (U/mg)	1.46	2.11	9.16	54.6	153.78
Purificación		1.44	6.27	37.39	105.32
Rendimiento %		95	56.6	27.18	8.7

Determinación del peso molecular

El peso molecular de la fosfoglicerato mutasa purificada se ha determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS migrando en paralelo una solución standard que contenía una mezcla de proteínas de peso molecular conocido. La interpolación en la gráfica de la figura 3.5 de la distancia recorrida por nuestra proteína purificada, donde en ordenadas se representa el peso molecular de las proteínas standard y en abscisas la distancia recorrida, permitió la determinación del peso molecular de la subunidad B. Hay que recordar que esta metodología permite la determinación del peso molecular de la subunidad y no de la proteína.

El peso molecular así determinado es de 29000 D, siendo por tanto el peso molecular de la proteína nativa de 58000 D.

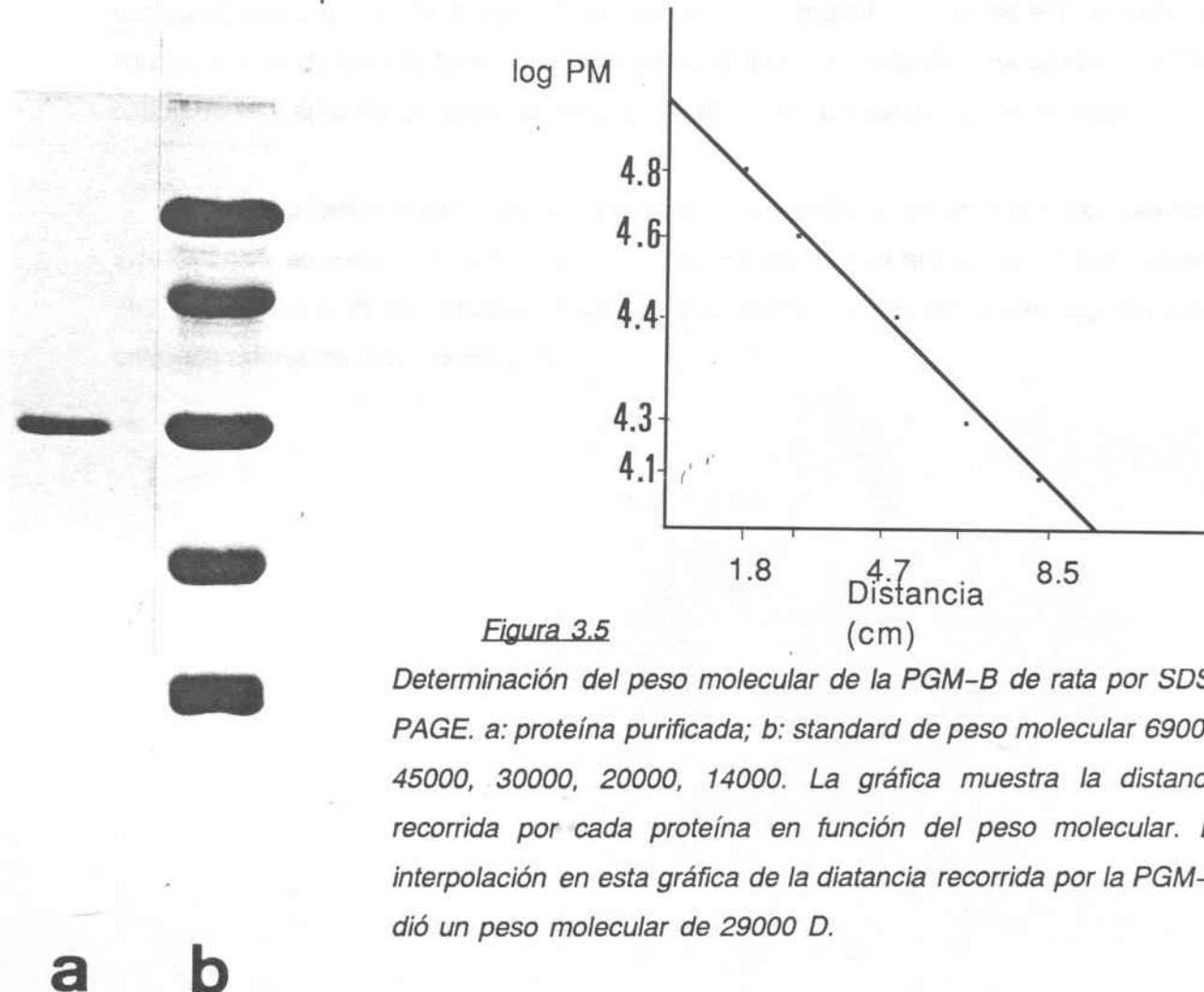


Figura 3.5

Determinación del peso molecular de la PGM-B de rata por SDS-PAGE. a: proteína purificada; b: standard de peso molecular 69000, 45000, 30000, 20000, 14000. La gráfica muestra la distancia recorrida por cada proteína en función del peso molecular. La interpolación en esta gráfica de la distancia recorrida por la PGM-B dió un peso molecular de 29000 D.

3.2 RESULTADOS INMUNOLOGICOS

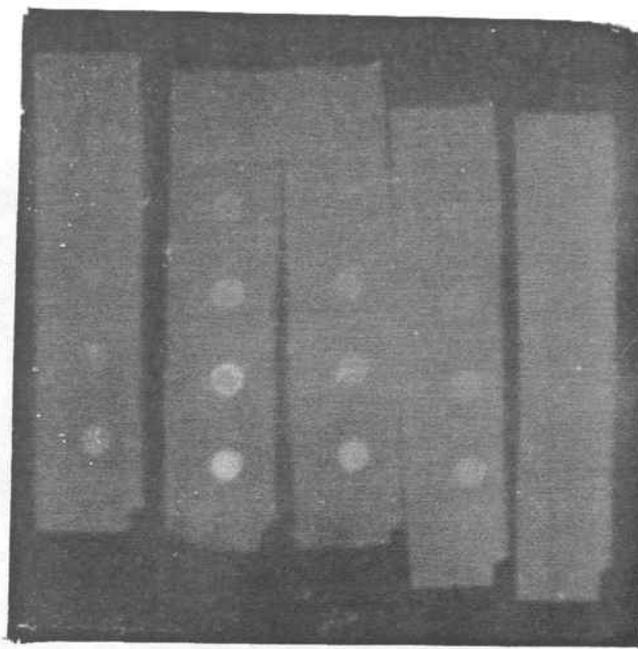
A partir de los sueros obtenidos de los conejos inmunizados tal como se describe en el apartado 2.3.1, se realizaron experimentos de dot-blot para comprobar la presencia de reacción antígeno-anticuerpo en estos sueros. Estos experimentos permitieron conocer además la especificidad de los anticuerpos, la existencia de diferencias entre sueros de diferentes conejos y comparar los diferentes días de sangría de cada animal.

Mediante un aparato de dot-blot, se fijaron cantidades crecientes de proteína pura a un filtro de nitrocelulosa. A partir de una solución de PGM-B 0.2 mg/ml, se realizaron soluciones en serie. Se aplicaron 100 μ l de proteína conteniendo respectivamente 3, 16, 80, 400 y 2000 μ g de proteína pura. Se adicionó un control negativo consistente en lactato deshidrogenasa comercial a una concentración de 2.5 mg/ml. Los filtros eran hibridados con los sueros de los diferentes conejos y distintos días. Se realizaba una dilución 1/50 de cada suero, y además se hacía un control negativo con un suero no inmunizado.

Los resultados pueden verse en la figura 3.6, donde se observa que hay reacción inmunológica en todos los sueros inmunizados, siendo la mas alta la del conejo número 789. Los controles dieron resultado negativo, y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes días de sangría.

Figura 3.6 Inmunodot de los cuatro conejos inmunizados con PGM-BB.

- | | |
|-----------|------------------|
| 1. Conejo | 769. |
| 2. " | 789. |
| 3. " | 791. |
| 4. " | 936. |
| 5. " | Suero no inmune. |

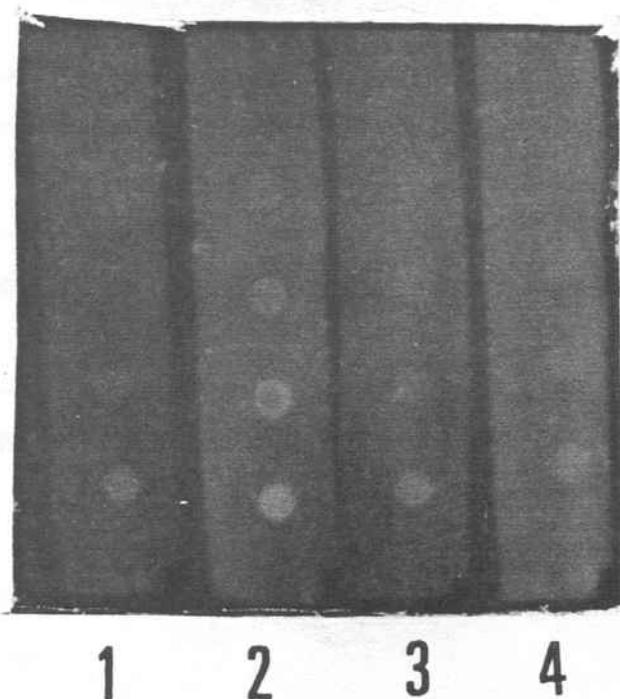


1 2 3 4 5

Seguidamente se determinó la dilución óptima del antisuero 789. para ello, una tira de nitrocelulosa de las mismas características del experimento anterior fué hibridada con diferentes diluciones de suero: 1/25, 1/50, 1/100, y 1/500. El resultado puede verse en la figura 3.7, donde puede apreciarse que la dilución óptima es 1/50

Figura 3.7 Inmunodot con diferentes diluciones de antisuero.

1. Dilución 1/25.
2. Dilución 1/50.
3. Dilución 1/100.
4. Dilución 1/500



A continuación se determinó la especificidad de los anticuerpos mediante Western-blot. Se realizó mediante SDS-PAGE la separación de las proteínas solubles de extracto de músculo, cerebro, hígado y corazón, además se probó PGM-M comercial purificada a partir de conejo, así como PGM-B purificada según lo descrito en el apartado 3.1 y como control negativo se dispuso lactato deshidrogenasa comercial. Se realizó la transferencia a filtro de nitrocelulosa y se hibridó a una dilución 1/50 con el antisuero del conejo número 789. El resultado, que se muestra en la figura 3.8, fué el reconocimiento por parte del citado antisuero de una banda de 29000 correspondiente a la PGM. Se observa la presencia de reacción cruzada con la PGM-M (única forma presente en músculo), con lo que quedaba demostrada la reacción cruzada entre los anticuerpos de la PGM-M y B (Castellà et al., 1988). Asimismo se observa la presencia de reacción antígeno-anticuerpo con la PGM-M de conejo comercializada por Boehringer. No se observó reacción con la lactato deshidrogenasa. Se demostraba por tanto:

-el reconocimiento de una única banda de proteína por parte del antisuero. Esta banda corresponde al peso molecular de la PGM.

-la presencia de reacción cruzada entre las formas M y B de la PGM, de manera que tanto los antisueros ant-M y anti-B reconocían ambas formas.

-la reactividad contra PGM-M de otra especie (conejo) filogenéticamente próxima a la rata, sugiriendo la similitud relativa entre ambas proteínas.

-la ausencia de reacción con otras proteínas de diferente peso molecular, así como con la lactato deshidrogenasa, lo cual permitía contemplar una alta especificidad de los anticuerpos.

Figura 3.8 Western-blot de extractos de diferentes tejidos con el antisuero 789 diluido 1/50. Los tejidos son:

1. Músculo esquelético 120 μg .
2. Cerebro 110 μg .
3. Hígado 120 μg .
4. Corazón 100 μg .
5. PGM-B pura 5 μg .

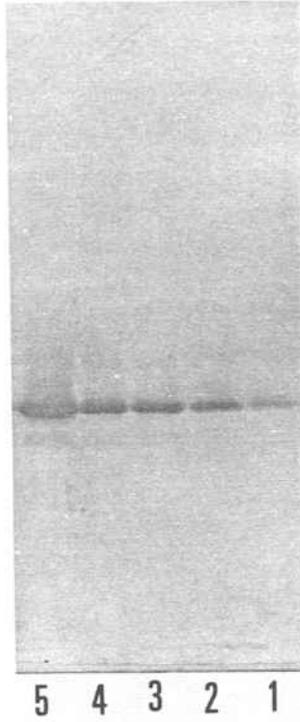
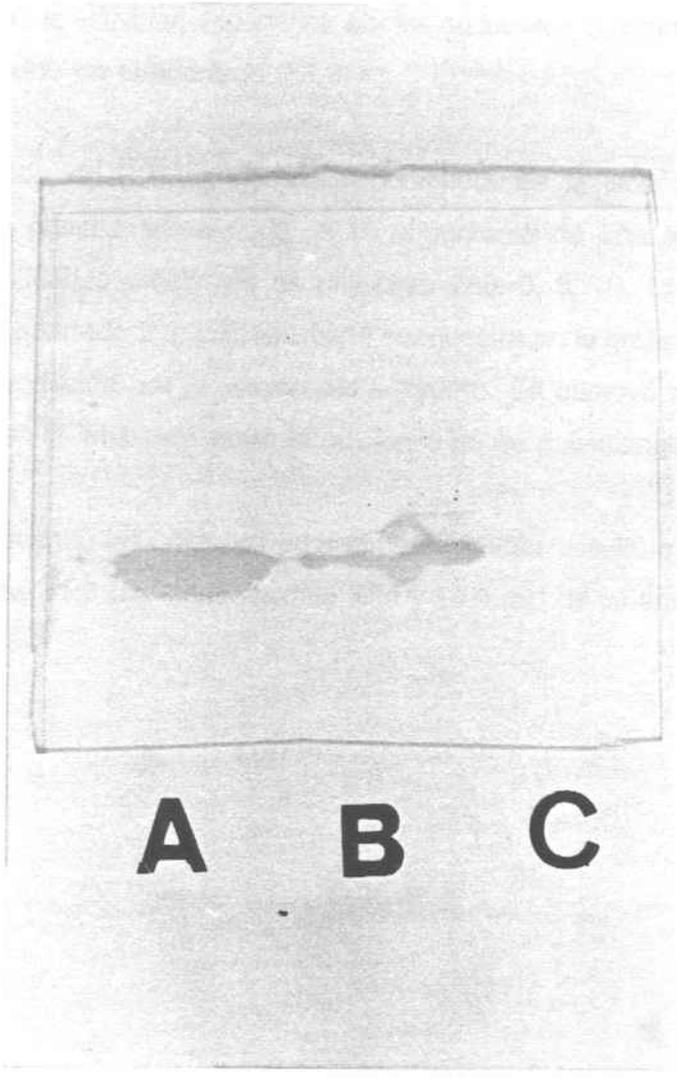


Figura 3.9 Western-blot de A: PGM-conejo comercial 25 μ g; B: PGM-B pura 5 μ g; C: lactato deshidrogenasa comercial 30 μ g.



3.2.2 INMUNOINHIBICION DE LA ACTIVIDAD PGM

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos se llevó a cabo un experimento de inhibición de la actividad enzimática por los antisueros obtenidos contra la PGM-BB tal como se describe en el apartado 2.3.3.

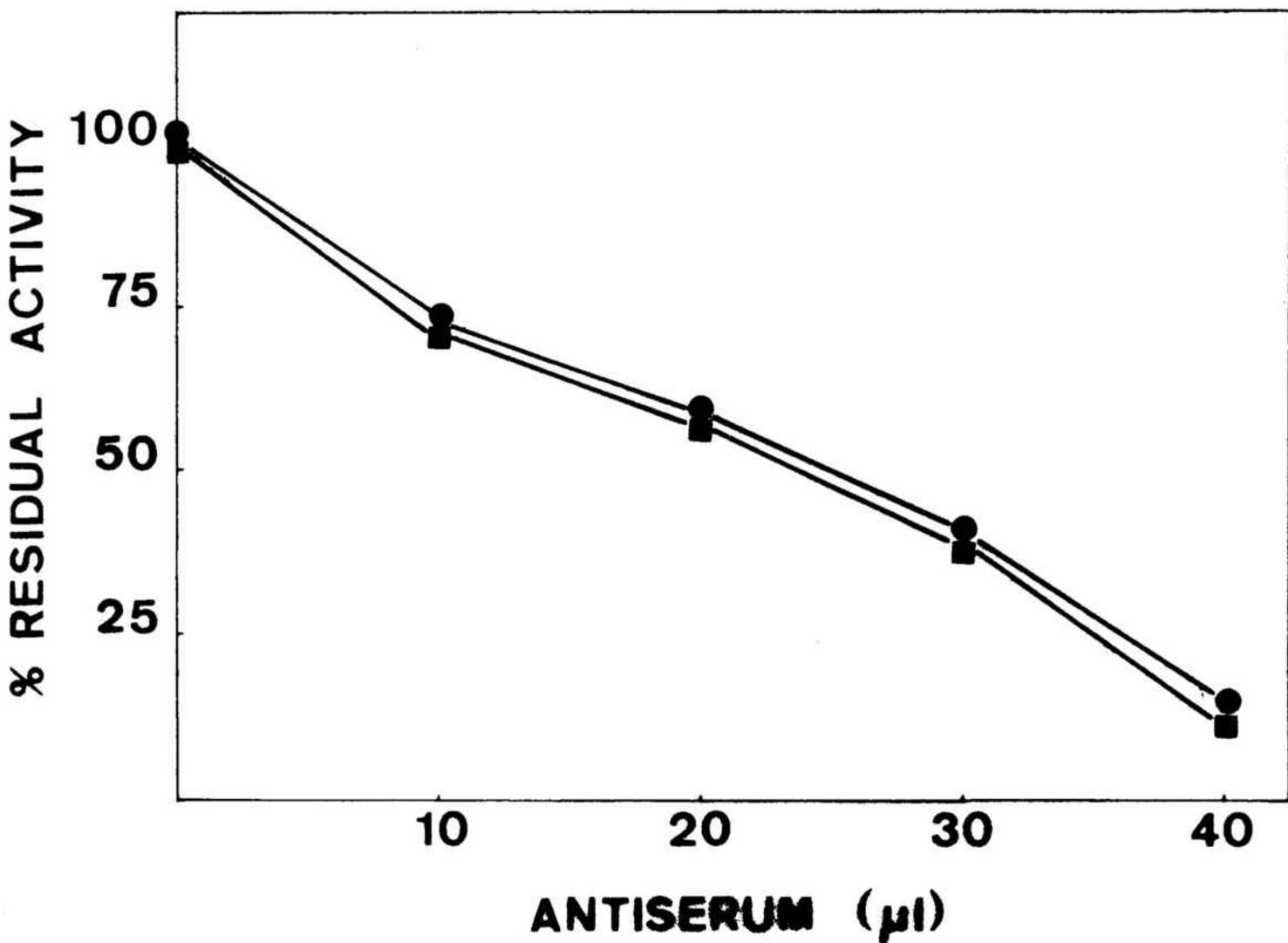
Se partió de PGM purificada, disponiendo de la isoenzima MM y BB, ambas purificadas en nuestro laboratorio. A 10 μl conteniendo una actividad de 500 U/ml se añadieron cantidades crecientes de antisuero 789: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 μl tal como se describe en el apartado 2.3.3. El resultado se muestra en la gráfica 3.9 donde puede verse la inhibición producida por la adición del antisuero. Se observó que no había diferencias significativas en la inhibición entre la adición o no de polietilenglicol.

Cuantificando las unidades de enzima de inhibía, resultó que 1 μl de antisuero anti-BB neutralizaba 11.7 mU de isoenzima MM y 10.0 mU de isoenzima BB.

Figura 3.9 Inmunoinhibición de la actividad PGM por el antisuero correspondiente al conejo 789.

● : Actividad PGM-MM

■ : Actividad PGM-BB.



3.2.3 TESTS DE ELISA

El análisis de los antisueros obtenidos se realizó mediante los tests de ELISA que se exponen a continuación. En primer lugar, se determinó la dilución óptima del conjugado con tres diluciones diferentes de antisuero, que a su vez permitía detectar la dilución óptima de este. En segundo lugar se determinó la cantidad mínima y máxima que reconocían las dos diluciones del antisuero óptimas, y en tercer lugar se estudió la relación existente entre la proteína fijada y la respuesta del método.

Dilución óptima del conjugado.

Realizado en las condiciones descritas en 2.3, con 500 ng de proteína pura, se determinó una dilución óptima del conjugado de 1/125.

Detección límite del antígeno

Para determinar la cantidad mínima y máxima de antígeno que era detectada por este método, se realizaron diferentes diluciones del antígeno fijado al soporte.

Se fijaron cantidades decrecientes de proteína desde 2 μ g hasta 1 ng. Se probó la dilución del antisuero 1/100 y 1/200, y se trabajó con una dilución constante del conjugado de 1/125.

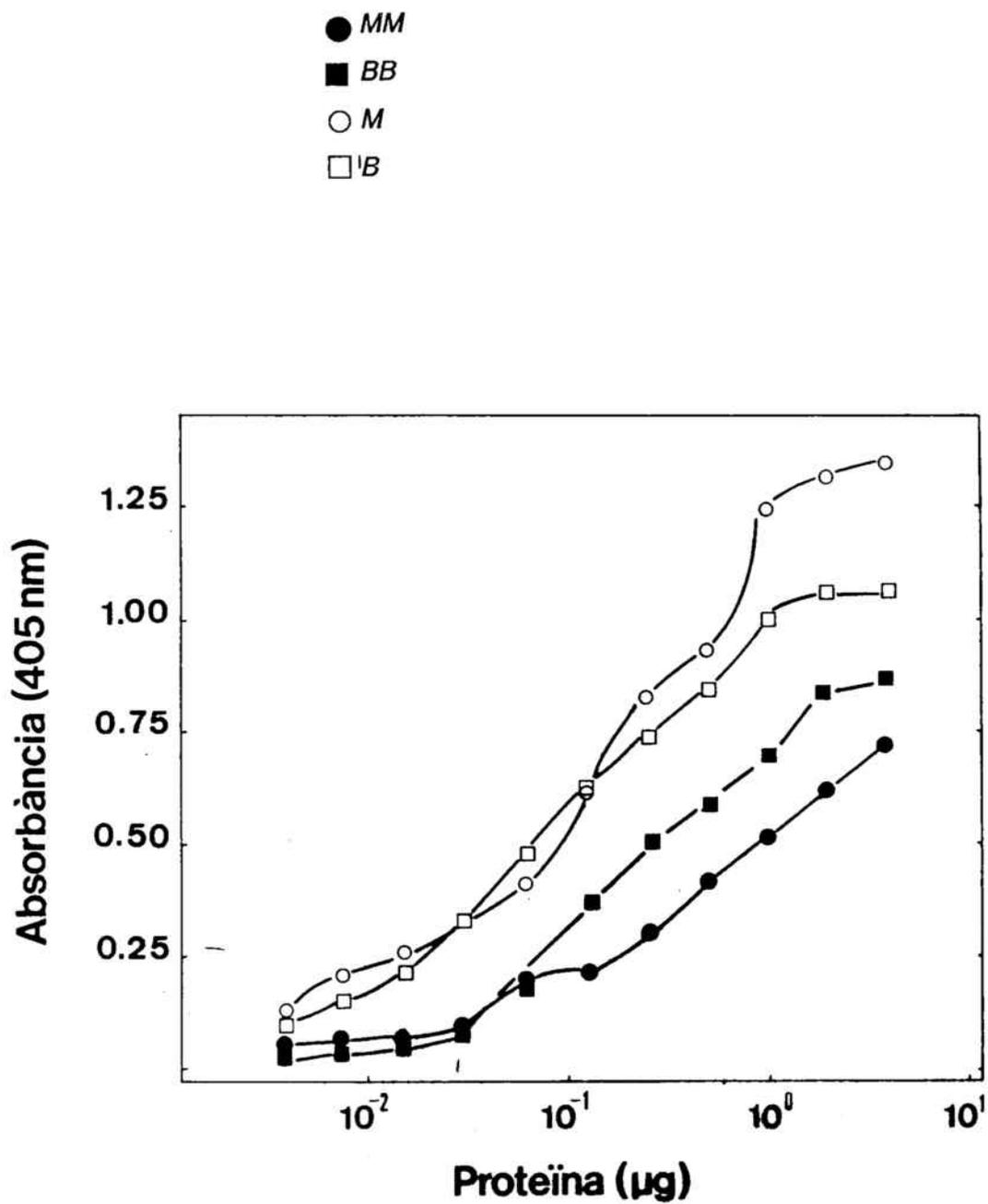
El resultado mostró una disminución de la absorbancia a medida que iba disminuyendo la cantidad de proteína fijada pudiéndose llegar a detectar 1 ng de proteína.

Test ELISA de las preparaciones de PGM

Los sueros obtenidos, se probaron frente a los dos isoenzimas MM y BB, así como también contra los monómeros M y B.

El resultado se muestra en la figura 3.11. Se observa una fuerte reacción cruzada entre ambos tipos de antígeno, siendo prácticamente idéntica entre las formas M y B. La reacción contra los monómeros es algo superior que en el caso de las formas nativas, lo cual podría explicarse por la presencia de algún determinante antigénico que quedaría no accesible al anticuerpo por la dimerización. Igualmente se observa un reconocimiento lineal por encima de los 50 ng de proteína.

Figura 3.11 Test ELISA frente a diferentes cantidades de proteína pura.



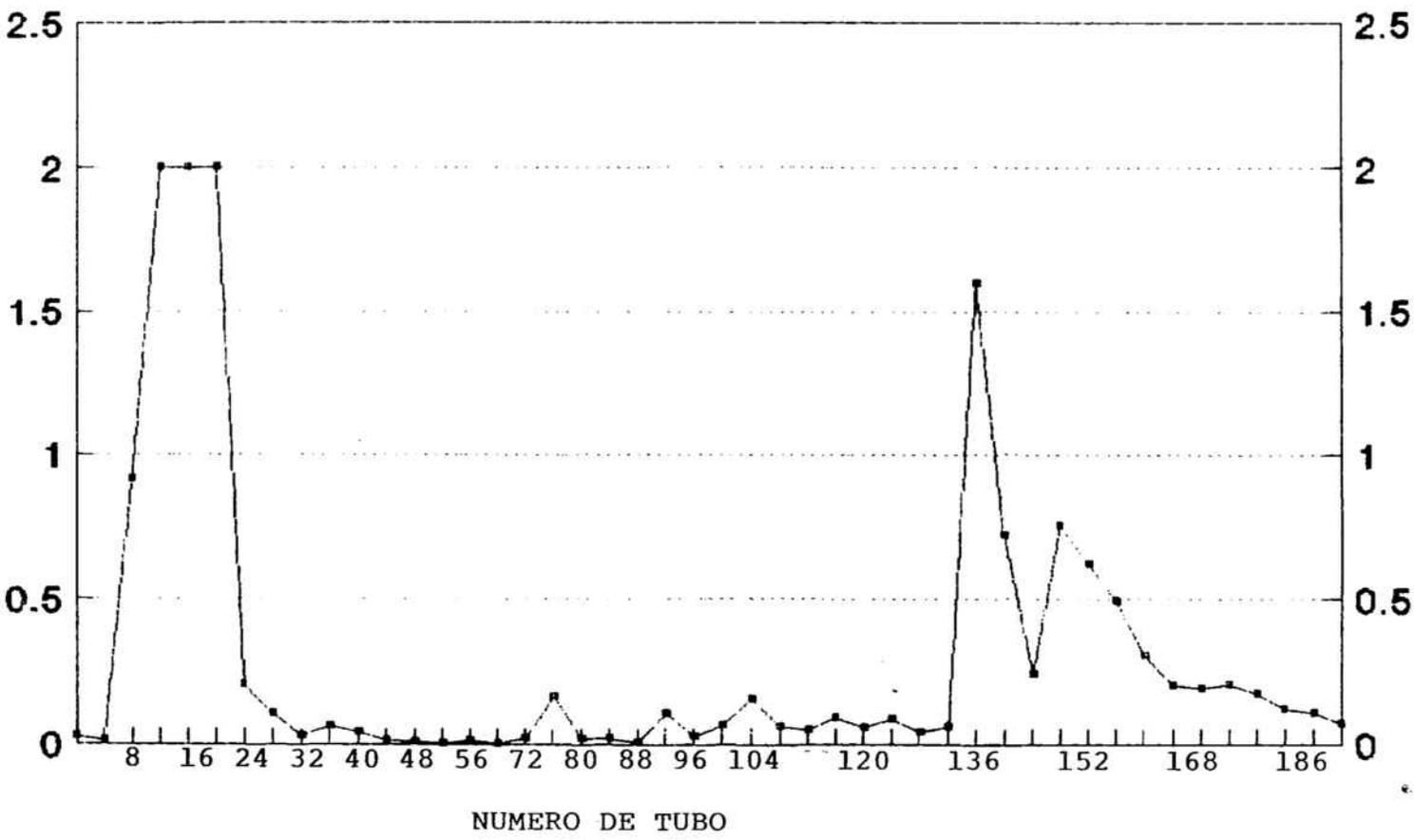
3.2.4 PURIFICACION DE LA FRACCION DE IgG

La purificación de la fracción de los sueros conteniendo los anticuerpos totales del suero o fracción de IgG se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa DE-52 tal como se describe en el apartado 2.3.1.

Partiendo de 5 ml de suero, se precipitaba con sulfato amónico al 40 % y el sedimento se resuspendía en 4 ml de PBS; se dializaba exhaustivamente frente a tampón fosfatos 15 mM pH 7.4 y se aplicaba la muestra a una columna de DE-52 equilibrada con el mismo tampón, la elución se hacía con el mismo tampón a 15 ml/h. El pico de proteína resultante de esta elución contenía las IgG. El resto de material se eluye con tampón fosfatos 30 mM pH 7.4 obteniéndose el resto de inmunoglobulinas y las beta-globulinas.

El perfil cromatográfico se muestra en la figura 3.12. El pool correspondiente a las IgG correspondía a los tubos 6-24 y contenía un volumen de 40 ml con una concentración de proteínas de 8 mg/ml aproximadamente.

Figura 3.12 Purificación de la fracción de IgG por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. El primer pico de proteína (tubos 6-24) corresponde a la fracción de IgG.



3.2.5 PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOIS ESPECIFICOS ANTI PGM-BB

Utilizando la cromatografía de afinidad, se consiguió purificar los anticuerpos específicos anti PGM-BB procedentes de los antisueros iniciales.

Tras la fijación de la proteína a la columna, se realizó la cromatografía tal como se describe en el apartado 2.3.1.

Se partió de 8.5 ml de antisuero, que fué precipitado con un volumen igual de sulfato amónico saturado (50 %). El material precipitado fué redisolto en PBS y dializado exhaustivamente frente a tampón PBS. El volumen resultante: 10 ml se aplicó a la columna de Sepharose-CNBr conteniendo 15 mg de antígeno PGM-BB acoplado y equilibrada con PBS. La muestra se recircularizó un total de cuatro veces, se lavó exhaustivamente con PBS y se eluyeron los anticuerpos con glicina 0.1 M pH 2.5. El perfil proteico de la cromatografía puede verse en la figura 3.13. En las fracciones 31, 39 se encuentran los anticuerpos purificados.

Para comprobar en que fracciones se encontraban los anticuerpos, se hizo un inmuno-blot con una alícuota de cada fracción. El resultado puede verse en la figura 3.14, donde se comprueba efectivamente la presencia de anticuerpo en las fracciones 31-39.

Figura 3.13 Perfil cromatográfico de la columna de afinidad Sepharose-CNBr acomplexada con PGM-BB. Los tubos 31-39 contenían el anticuerpo purificado como se demuestra en la figura 3.14.

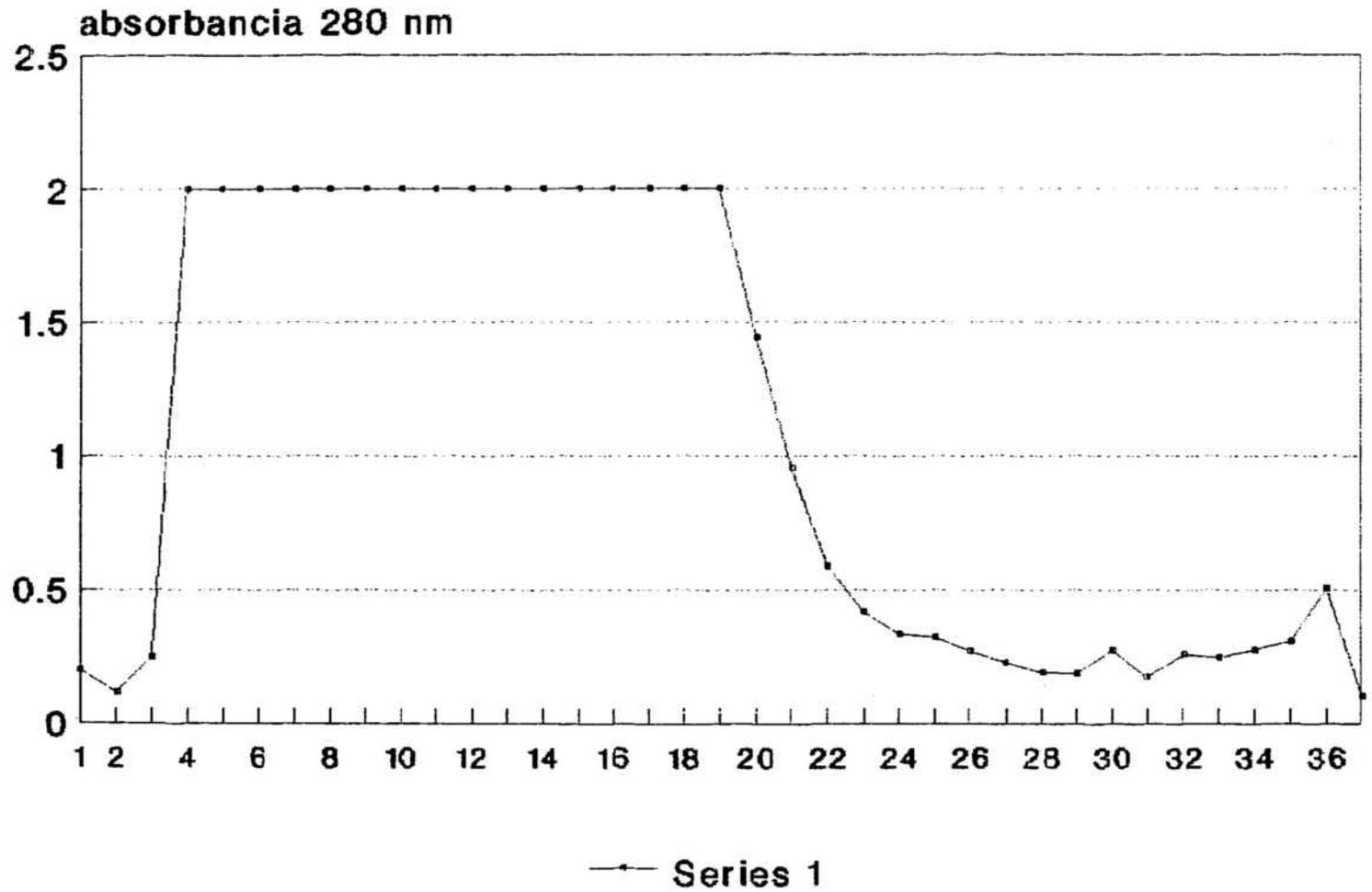
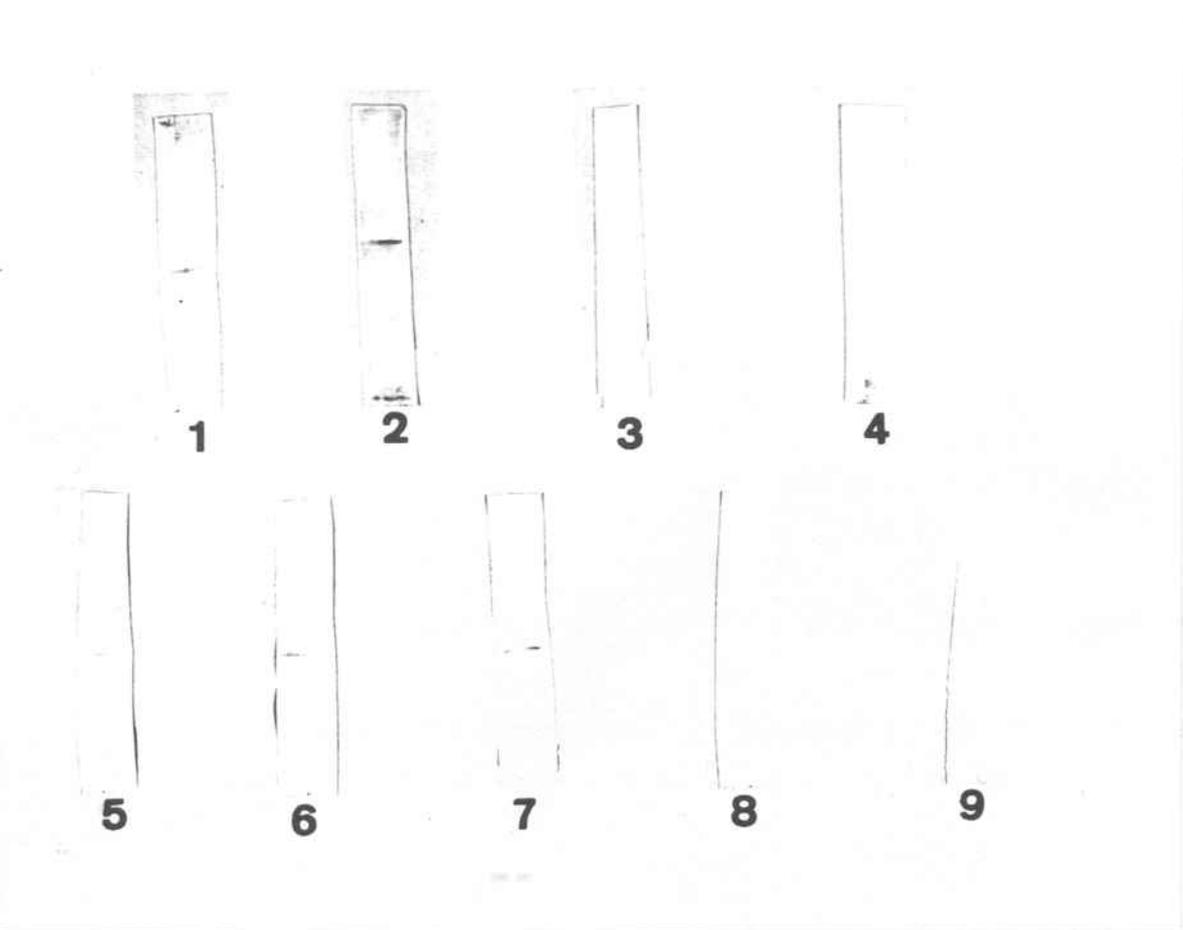


Figura 3.14 Western-blot de las diferentes fracciones de la columna de purificación del anticuerpo anti PGM-BB.

1. Antisuero 1/50
2. Antisuero precipitado sulfato amónico 1/20.
3. tubo columna número 31, 1/15.
4. " 32
5. " 35
6. " 37
7. " 39
8. " 19
9. " 28



3.3 LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA PGM

La localización intracelular de la PGM se llevó a cabo aplicando dos estrategias diferentes y complementarias

Se aplicó un primer abordaje con técnicas de inmunocitoquímica aprovechando los anticuerpos que ya habíamos preparado contra la PGM-BB y contra la PGM-MM (Castellà et al., 1988). Los resultados obtenidos fueron complementados con un abordaje de fraccionamiento subcelular. Ambas técnicas ofrecieron un resultado que para su confirmación obligó a una ulterior purificación de núcleos celulares que seguidamente se expondrá.

3.3.1 INMUNOCITOQUIMICA.

En un primer abordaje se utilizó la microscopía óptica para la detección de la PGM bien en citoplasma, asociada a membranas o en núcleo. A continuación se utilizó la microscopía electrónica para localizar aquellas estructuras celulares que dieran reacción anti-PGM. Se utilizó el antisuero en la detección con microscopía óptica y el anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad en la localización con microscopía electrónica.

Microscopía óptica

Se obtuvieron cortes en el criostato de 5 μm de sección. Tal como se describe en el apartado 2.4.1, se incubaron con antisuero 1/50, y se detectó con proteína A-oro coloidal. El resultado puede verse en la figura 3.15, donde se vé marcaje en el citoplasma de todas las células, y también en el núcleo. No se observa marcaje asociado a membranas.

El marcaje es uniforme en los dos tipos celulares estudiados: músculo y cerebro, no observándose diferencias cuantitativas entre ellos. Debido a la poca información que se

pudo sacar de esta técnica, no se profundizó en estos estudios, pasándose inmediatamente a técnicas de microscopía electrónica. Se presentan solamente los resultados de microscopía óptica de cerebro.

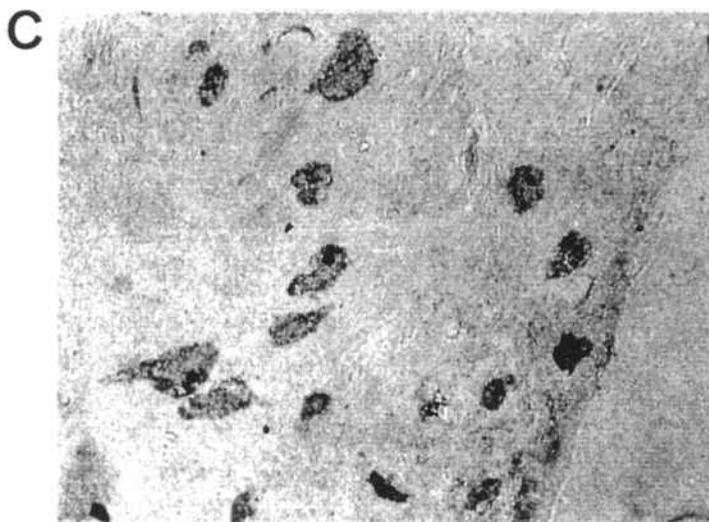
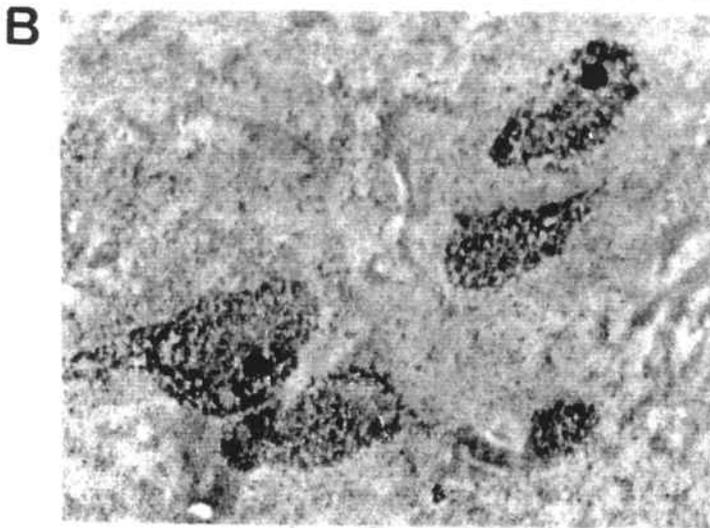
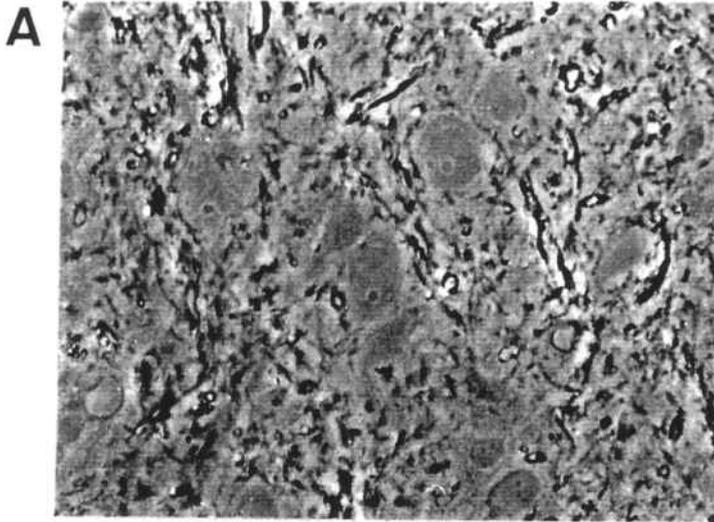
Se observa marcaje claramente en todo el cuerpo celular, siendo positivo tanto el citoplasma como el núcleo.

Figura 3.15 Resultados de microscopía óptica con cortes semifinos de sustancia negra de cerebro de rata.

A: control con suero no inmune, 900 x.

B: antisuero 1/50, 1250 x.

C: antisuero 1/50, 900 x.



Microscopía electrónica

Partiendo de cortes ultrafinos de secciones incluídas en Lowicryl de músculo, cerebro, hígado y corazón, incubados con anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad, se obtuvieron las observaciones fotografiadas en la figura 3.16–3.18.

La figura 3.16 muestra el resultado obtenido para cerebro, se observa marcaje específico en citoplasma y también en núcleo: no se detecta marcaje específico en mitocondrias, lisosomas ni retículo endoplasmático. Los diferentes tipos celulares que se observan y que han sido estudiados son neurona y células gliales.

La figura 3.17 presenta el resultado obtenido con músculo esquelético. En éste caso el marcaje se localiza en citoplasma, así como en núcleo. En el citoplasma, el marcaje no está asociado a estructuras típicamente musculares como miofibrillas, viéndose marcaje distribuido alatoriamente por el citoplasma. No hay marcaje asociado a orgánulos citoplasmáticos como mitocondrias, lisosomas, etc. El marcaje obtenido en núcleo no es específico de estructura nuclear sino que está distribuido alatoriamente.

La figura 3.18 es el resultado obtenido con hígado y con corazón como órganos de estudio. El marcaje, distribuido de forma similar a los anteriores tejidos, está localizado en citoplasma y núcleo, no asociado específicamente a ninguna estructura citoplasmática ni nuclear, y se presenta ausencia de marcaje en orgánulos subcelulares. En el caso del corazón que es un órgano de características intermedias en cuanto a la presencia de la PGM se refiere, el resultado es similar al resto de tejidos en cuanto a la presencia de reacción antígeno–anticuerpo, hay marcaje en citosol y núcleo, y no se observa asociación específica con ninguna estructura subcelular.

Figura 3.16. Inmunocitoquímica de la PGM en cortes de cerebro incluidos en Lowicryl.

A: Micrografía de cortex que muestra células neuronales y astrogliales.

3400 x.

B: Area nuclear neuronal a mayor aumento. 28000 x.

C: Area nuclear astrocítica a mayor aumento. 28000 x.

D: Célula de oligodendroglía.

nN, nucleo neuronal; aN, nucleo astrocítico; oN, nucleo de oligodendroglía.

Bars: 5 μ m A, 0.5 μ m en B; 1 μ m en D.

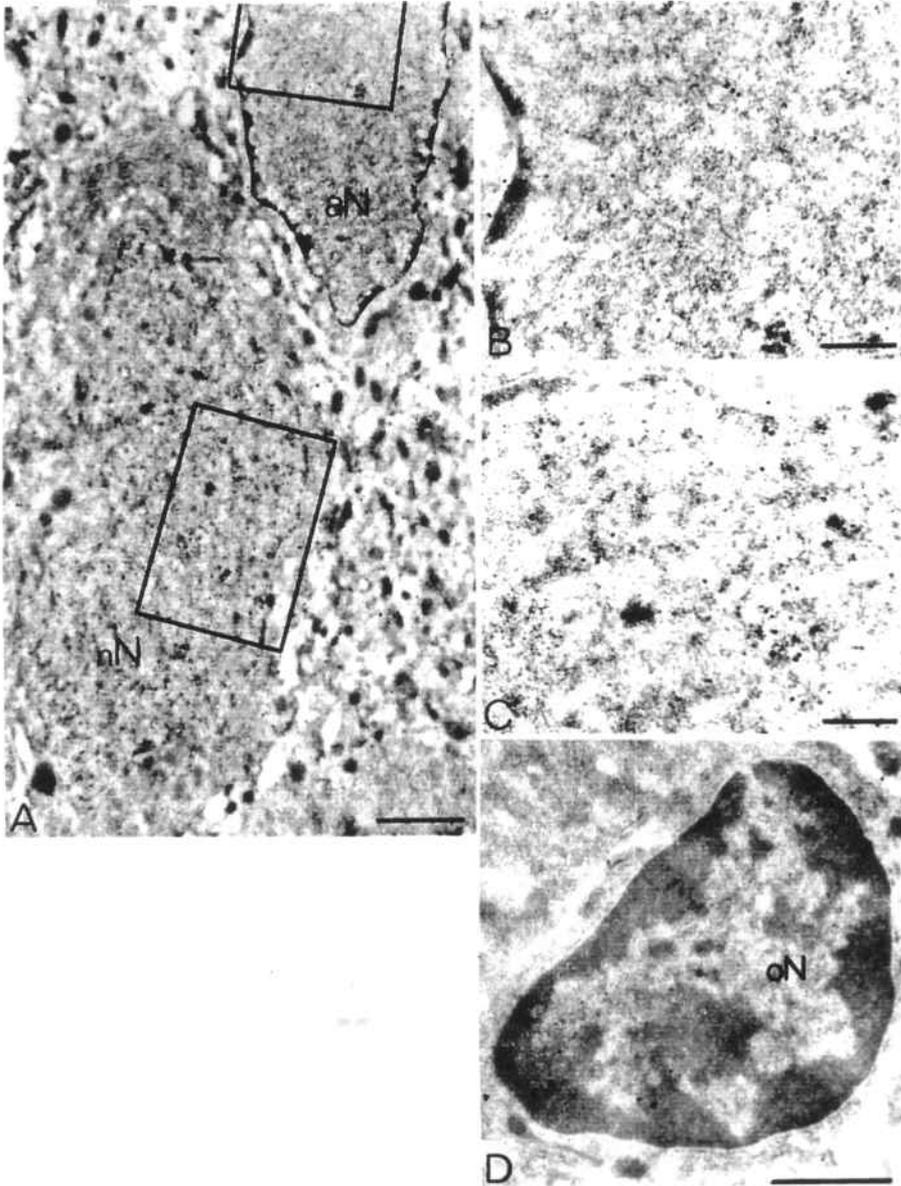


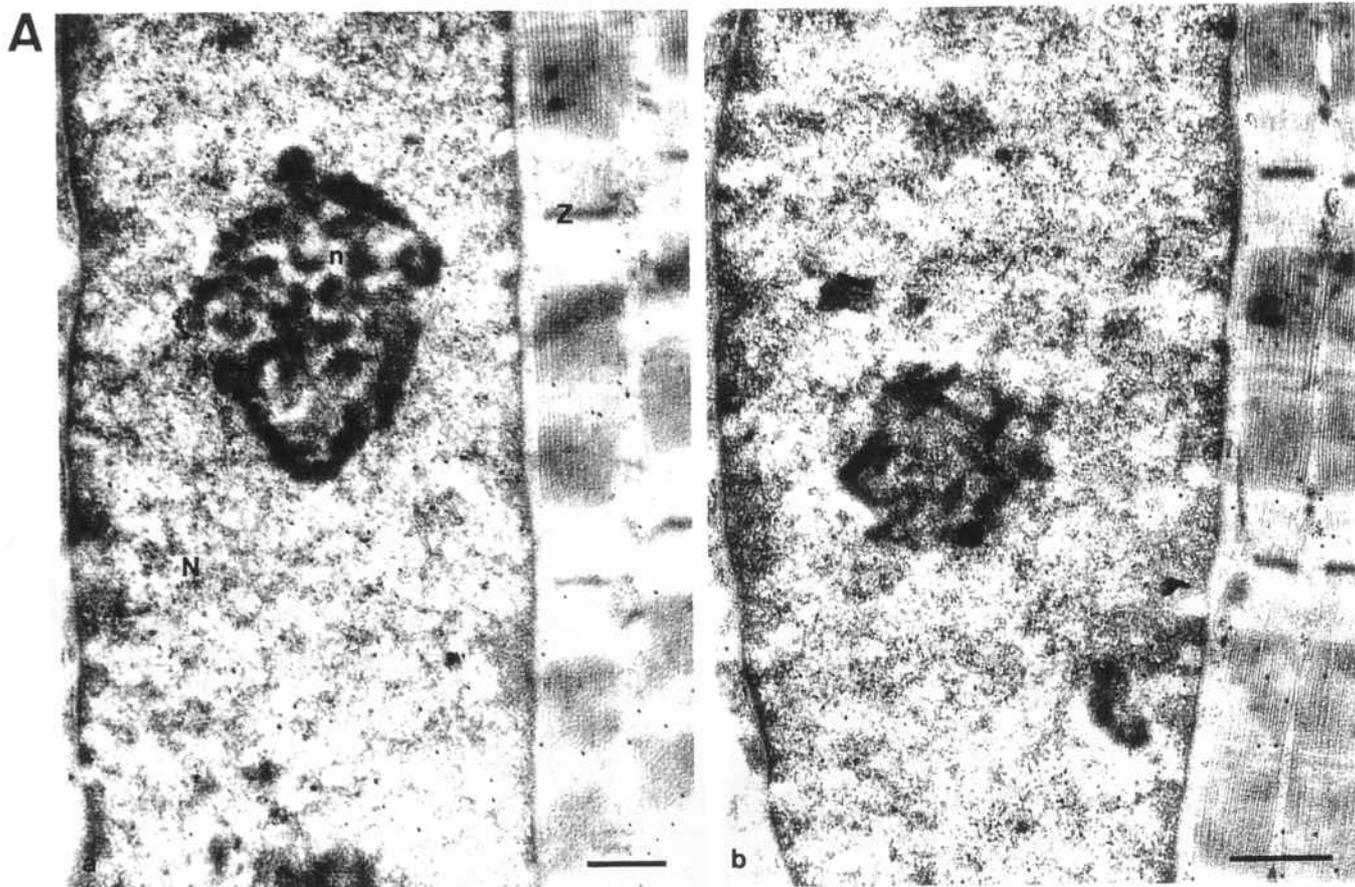
Figura 3.17 Inmunocitoquímica de la PGM en secciones de músculo esquelético incluidas en Lowicryl.

A: N: núcleo.

n: nucleolo.

Bars: 0.5 μ m

a: 22000 x; b: 30000 x.



B: Preparaciones control.

a. suero no inmune.

b. anticuerpos preincubados con PGM purificada.

El marcaje no específico está rodeado de círculo.

N: nucleo

n: nucleolo.

Z: linea Z.

Bars 0.5 μ m

a: 26000 x.

b: 32000 x.

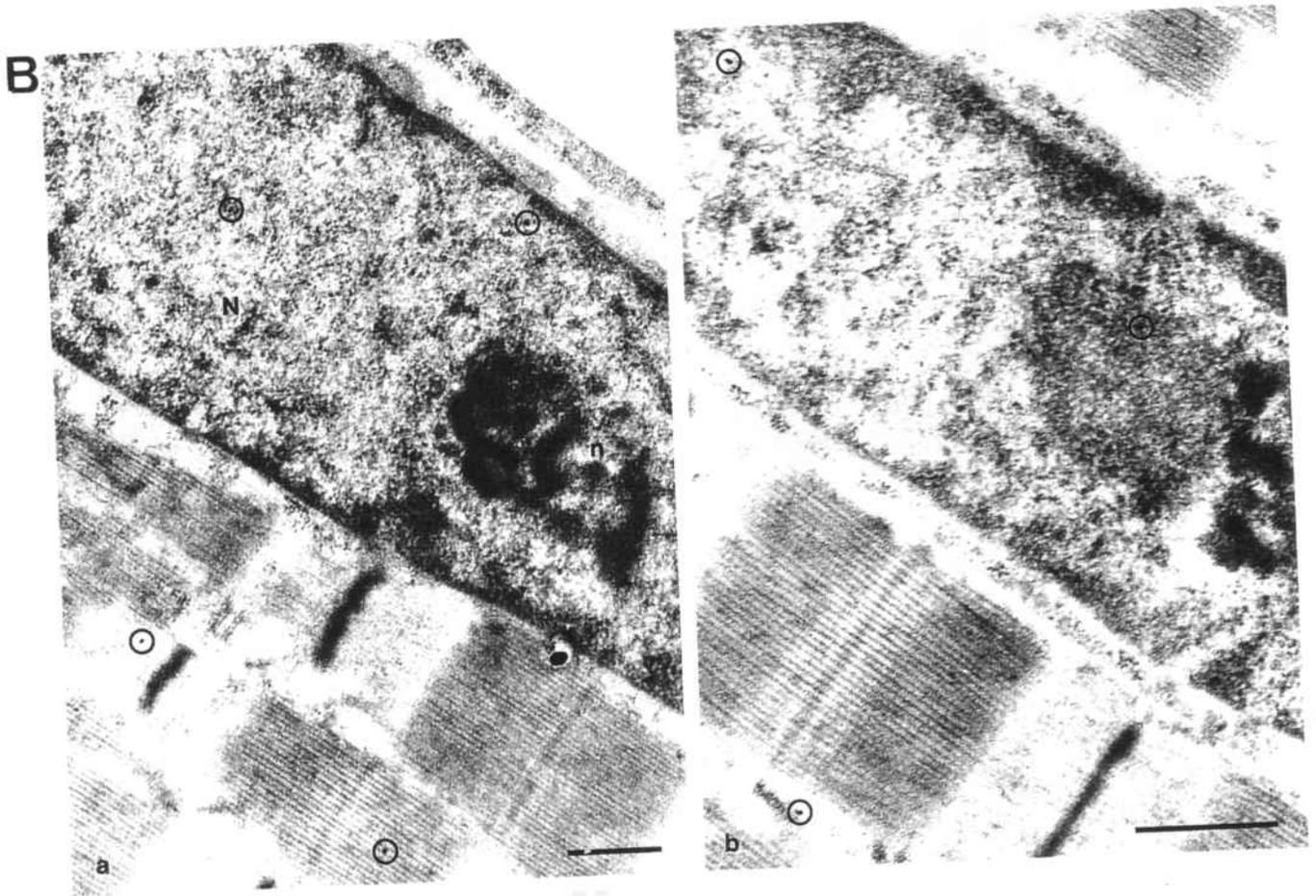
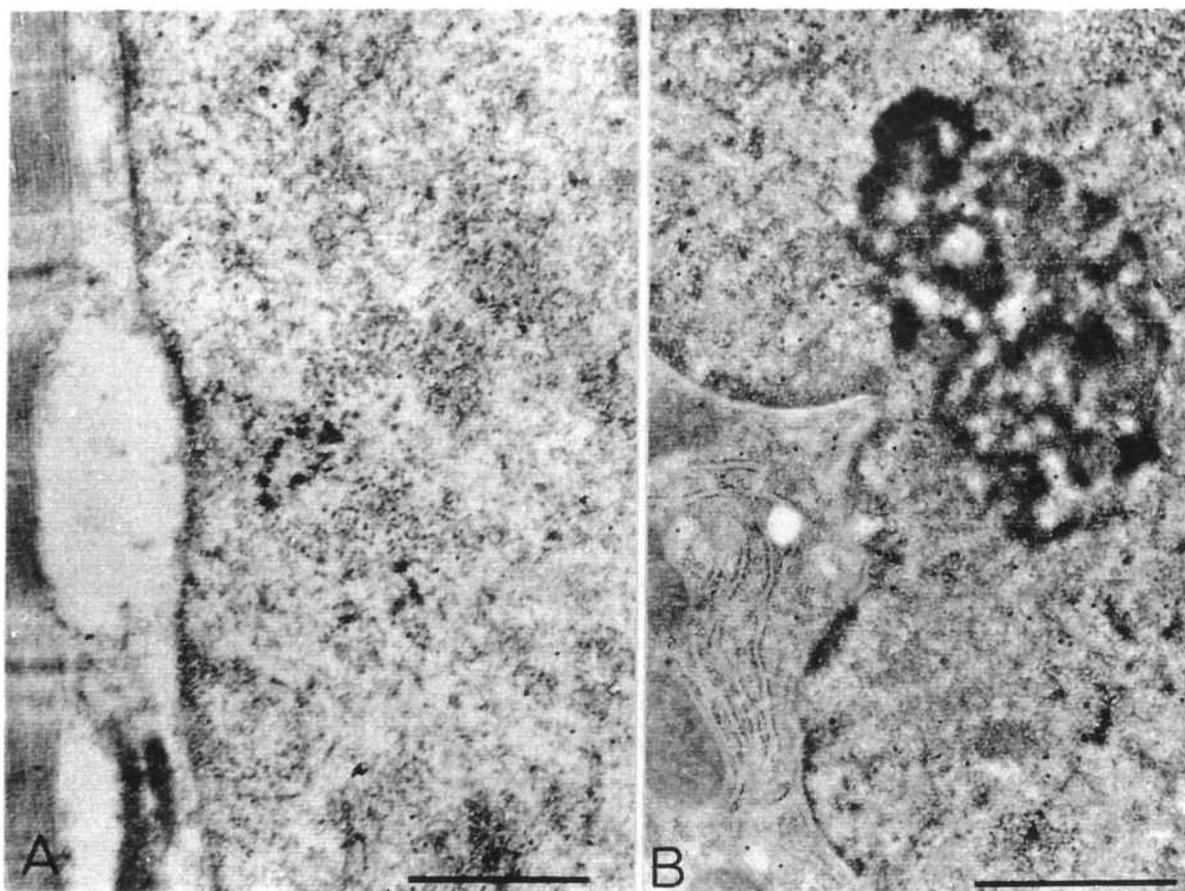


Figura 3.18 Inmunocitoquímica de la PGM en cortes incluidos en Lowicryl de A: corazón 25000 x; B: hígado 27000 x. Bars: 1 μ m.



3.3.2 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

De acuerdo con lo descrito en el apartado 2.4.2, se obtuvieron fracciones : nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica de músculo esquelético y cerebro. La tabla 3.2 muestra los valores encontrados de actividades PGM en las distintas fracciones. Se observó una presencia significativa de actividad PGM en ambas fracciones nucleares, si bien la mayor parte de esta actividad se encontraba como era de esperar en la fracción citosólica.

Tabla 3.2 Actividades enzimáticas en distintas fracciones de orgánulos de3 cerebro (A) y de músculo esquelético (B).

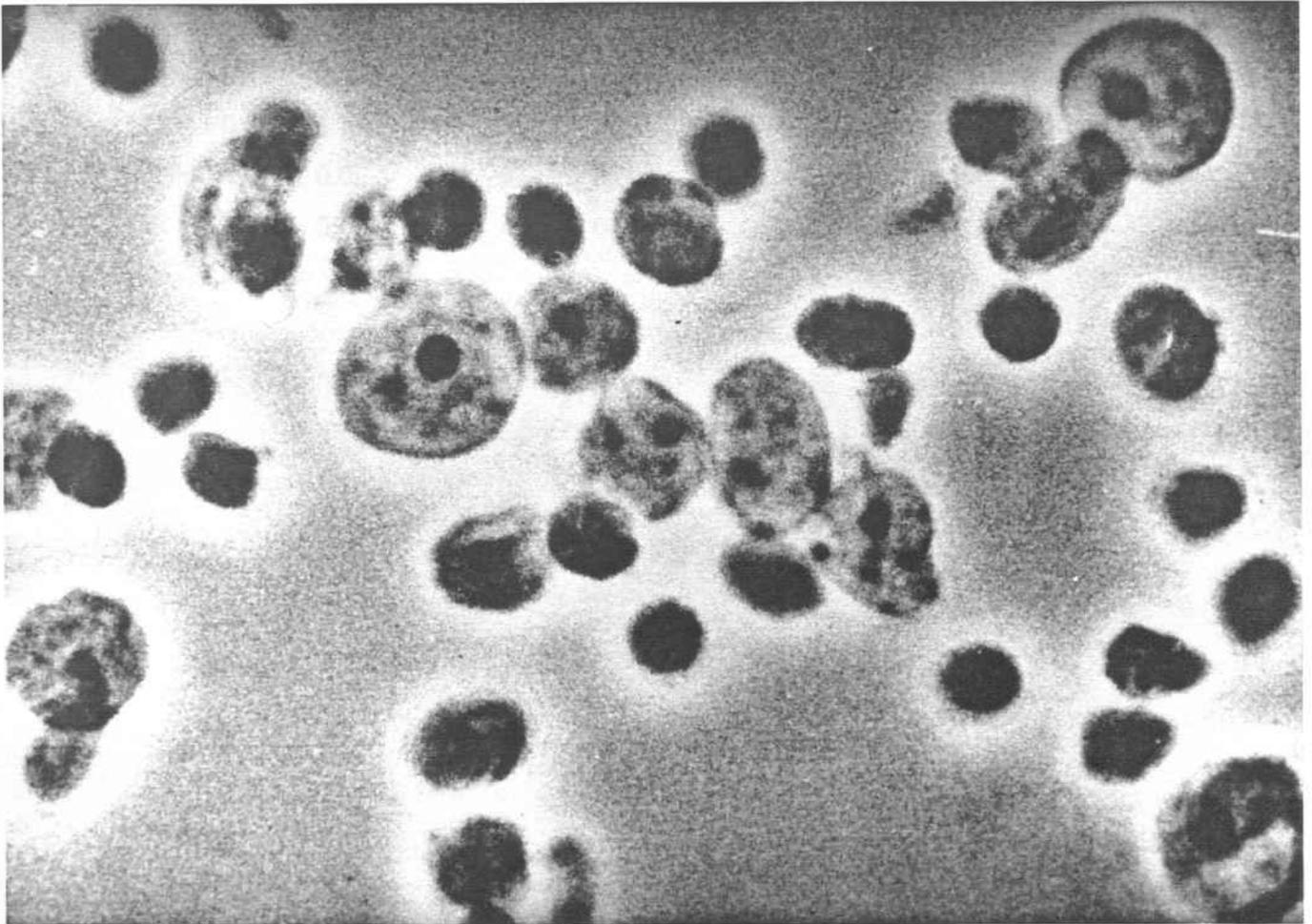
A)	<u>Fracción</u>	<u>Actividad Total (U)</u>	<u>% Actividad Total</u>
	Citosol	110.02	82.49
	Nuclear	19.36	14.5
	Mitocondrial	2.64	1.97
	Microsomal	1.42	1.06

B)	<u>Fracción</u>	<u>Actividad Total (U)</u>	<u>% Actividad Total</u>
	Citosol	1618	95.64
	Nuclear	62.1	3.67
	Mitocondrial	11.64	0.71
	Microsomal	---	---

3.3.3 OBTENCION DE NUCLEOS PUROS

La presencia de actividad PGM significativa en las fracciones nucleares del fraccionamiento subcelular nos llevó a purificar nucleos celulares tal como se describe en el apartado 2.4.2. Se obtuvieron nucleos puros de cerebro, músculo esquelético, hígado y corazón. La figura 3.19 muestra la fotografía en microscopía de contraste de fases de fases de los nucleos obtenidos de cerebro.

Figura 3.19. Microscopía de contraste de fases 400 x de los nucleos de cerebro purificados. Los nucleos grandes son neuronales mientras que los pequeños corresponden a los de células gliales.



La tabla 3.3 muestra los valores de las actividades enzimáticas determinadas encontrados para cada tipo celular. Destaca el hecho de la presencia significativa de actividad PGM, y la ausencia de actividad enzimática de los controles negativos utilizados (fosfatasa ácida e isocitrato deshidrogenasa).

Tabla 3.3 Actividades enzimáticas encontradas en los diferentes nucleos purificados comparadas con la correspondiente actividad de la fracción citosólica.

N:nucleos purificados; C:citosol

PGM:fosfoglicerato mutasa; LDH:lactato deshidrogenasa; ICDH:isocitrato deshidrogenasa; PA:fosfatasa ácida.

	CEREBRO			MUSCULO			CORAZON			HIGADO		
	N	C	%	N	C	%	N	C	%	N	C	%
PGM	0.19	2.02	9	2.4	9.3	25	0.18	1.26	14	0.15	0.8	8
LDH	0.01	1.44	0.6	0.24	3.2	7.5	0.02	0.48	4.1	--	--	--
ICDH	--	0.02	-	--	0.006	-	--	--	--	--	--	--
PA	--	0.02	-	--	0.025	-	--	--	--	--	--	--

Las figuras 3.20 y 3.21 muestran los resultados obtenidos en los experimentos de Western-Blot llevados a cabo utilizando los diferentes tipos nucleares purificados. Se utilizó anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad y proteína-A acomplejada con oro coloidal para la detección.

La figura 3.20 muestra el resultado obtenido para el músculo esquelético dando reacción positiva y reconocimiento de una proteína de 30 KD de peso molecular tanto el extracto citosólico como la purificación de nucleos.

La figura 3.21 muestra los resultados obtenidos para cerebro y corazón. El cerebro presenta de forma exclusiva la forma BB de la PGM, mientras que el corazón presenta las tres isoenzimas: MM, MB y BB. Se detecta reacción inmunológica con varias bandas de alto peso molecular (entre 70 y 100 KD), y ausencia de reacción con ninguna banda de peso molecular parecido al del monómero de la PGM, en el caso de los nucleos de cerebro. Curiosamente, en los nucleos de corazón, se observa reacción inmunológica con la proteína de 30 kD (como en el caso del músculo esquelético), con las bandas de alto peso molecular (70-100 KD) al igual que en el caso de cerebro, y con una banda de peso molecular intermedio (55-60 KD) que no se da en ninguno de los anteriores casos.

La figura 3.22 presenta la electroforesis en acetato de celulosa con tinción específica PGM. Se observa que en cada tejido, la isoenzima detectada en los nucleos purificados, se corresponde con la isoenzima detectada en los extractos citosólicos.

Figura 3.20 Western-blot con extracto y nucleos purificados de músculo esquelético.
1-Nucleos purificados músculo 160 μ g.
2-Extracto músculo 120 μ g.
3-Electroforesis de extracto de músculo 120 μ g.
4-Standard de peso molecular: 65000, 45000, 30000, 17000, 16000.
5-Nucleos purificados músculo 160 μ g.
6-Extracto músculo. 120 μ g.
1 y 2 fueron hibridados con anticuerpo purificado.
5 y 6 fueron hibridados con fracción de IgG.

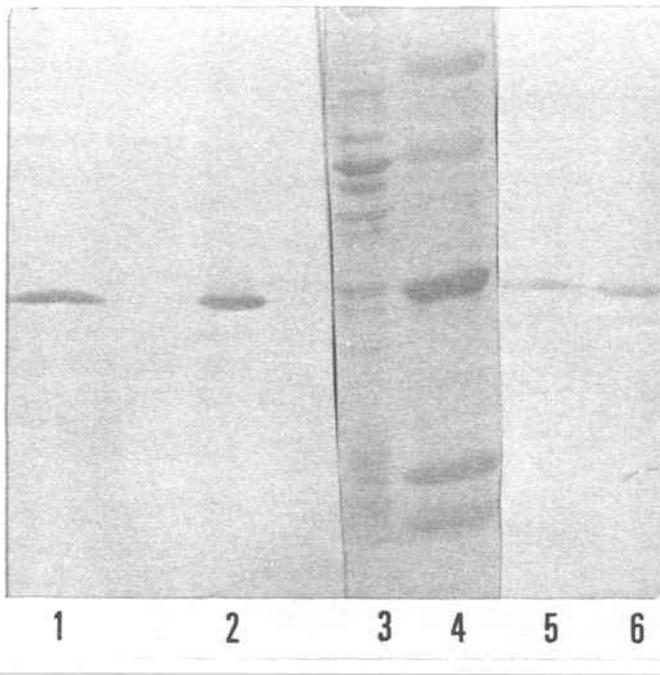


Figura 3.22 Western-blot con nucleos purificados de cerebro y de corazón. Se observa reacción con una proteína de 30 kD en el caso de nucleos de corazón, así como con bandas de alto peso molecular que son las únicas que se observan en el caso de los nucleos de cerebro.

1-Lactato deshidrogenasa 100 μ g.

2-nucleos cerebro 500 μ g.

3-nucleos corazón 300 μ g.

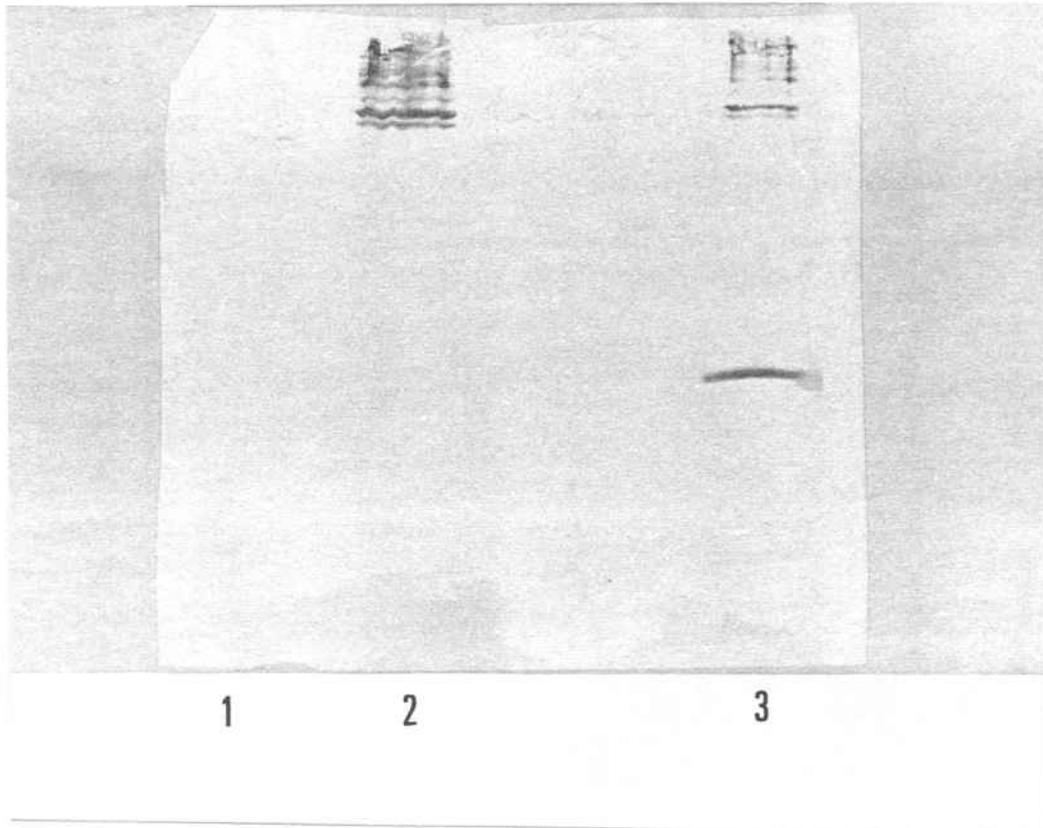


Figura 3.23. Electroforesis de acetato de celulosa de extractos de tejidos y de nucleos purificados. mU: miliunidades de actividad enzimática.

1-Extracto de cerebro, 3 mU.

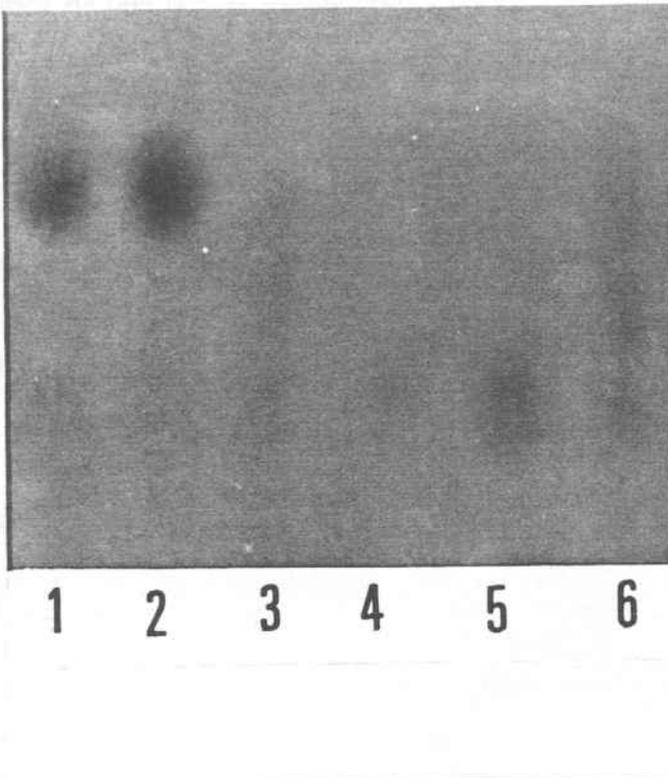
2-Nucleos de cerebro, 1.63 mU.

3-Nucleos de corazón, 1.00 mU.

4-Nucleos músculo esquelético 1.13 mU.

5-Extracto músculo esquelético 2.5 mU.

6-Extracto de corazón. 2 mU.



3.4 CLONAJE Y SECUENCIACION DE LA FOSFOGLICERATO MUTASA DE CEREBRO DE RATA

3.4.1 AISLAMIENTO DE CLONES POSITIVOS EN UNA LIBRERIA DE cDNA CEREBRO.

Para poder aislar el cDNA de la PGM-B de rata, decidimos realizar un screening de una libreria de cDNA construida a partir de mRNA de cerebro de rata, tejido donde se expresa de forma exclusiva la forma B, y donde era de esperar que los clones positivos correspondientes a la PGM que obtuvieramos fueran correspondientes a la forma B. Para ello dispusimos de una libreria construida en lambda gt-11 a partir de mRNA de cerebro de rata cedida por el Dr. L. de Lecea de Barcelona. Como sonda decidimos utilizar el cDNA correspondiente a la forma M de rata que previamente había sido aislado por nuestro grupo (Castellà et al., 1989). En estas condiciones, esperábamos que los clones que se aislaran fueran los correspondientes a la PGM-B, pues las posibilidades de falsos positivos eran escasas con este abordaje.

La libreria fué amplificada según se describe en el apartado 2.5.5 presentando un título de 1.1×10^{11} pfu/ml.

Se plaqueó un total de 400.000 clones de esta libreria y se utilizó el cDNA completo (800 pb) de la forma M como sonda.

Tras un primer screening se aislaron 17 clones positivos (la figura 3.24 muestra 4 de ellos), que fueron recultivados y sometidos a dos experimentos de rescreening, para eliminar falsos positivos y para aislar los autenticos clones que hibridaban.

El resultado, fué la confirmación de tres clones positivos (B1, B2, B3).

Figura 3.24 Imagen del resultado del primer screening con la señalización de cuatro de los 17 positivos.

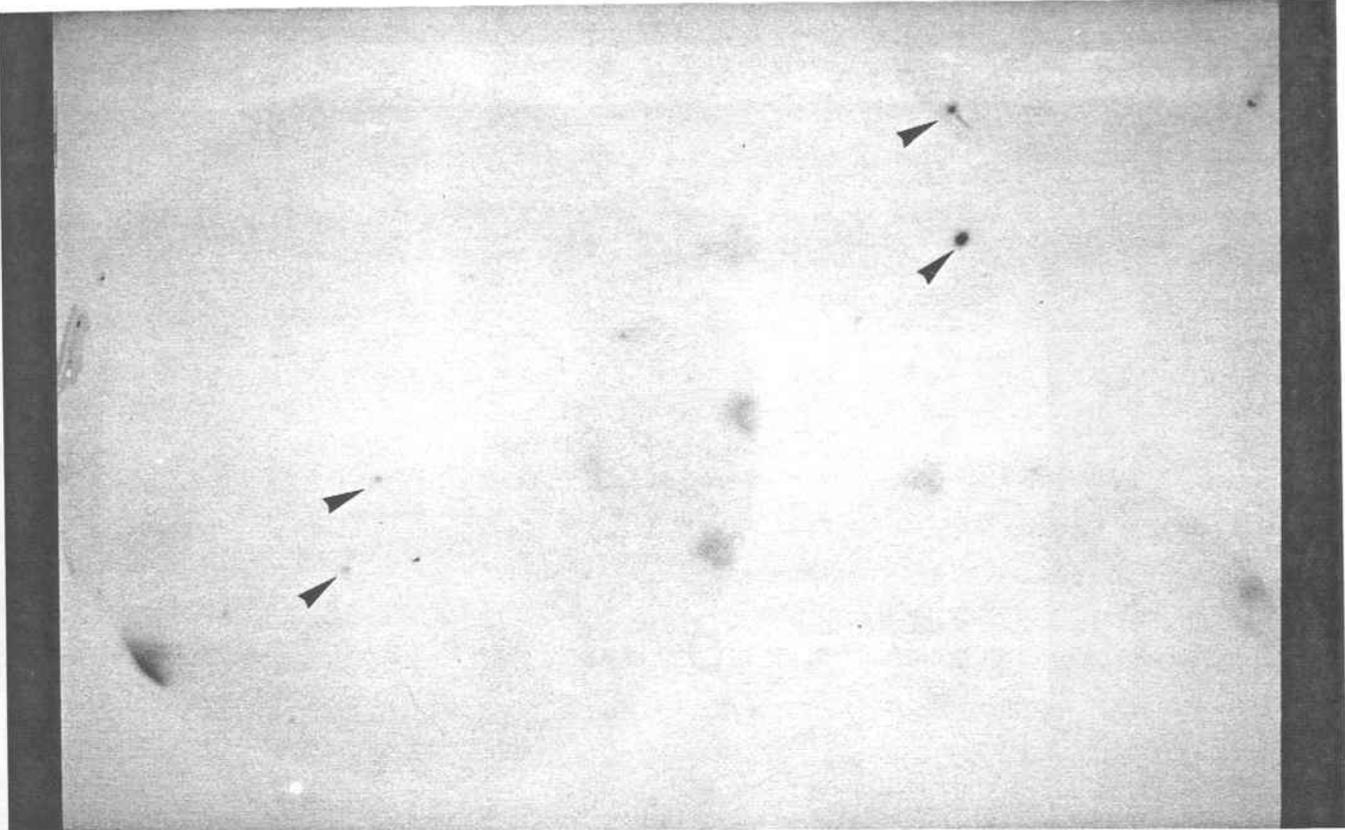


Figura 3.25 Imagen del priemr rescreening de cuatro positivos.

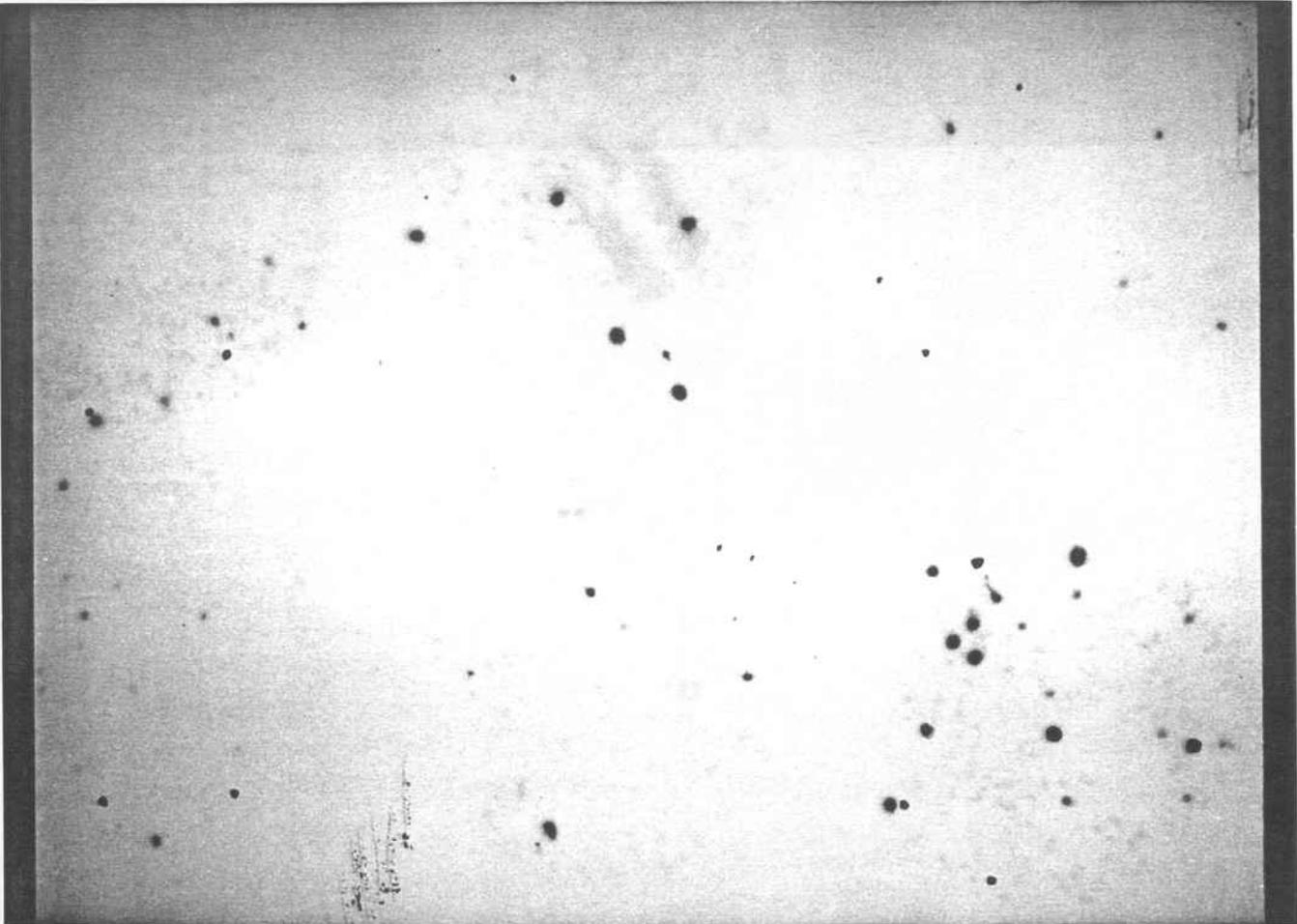
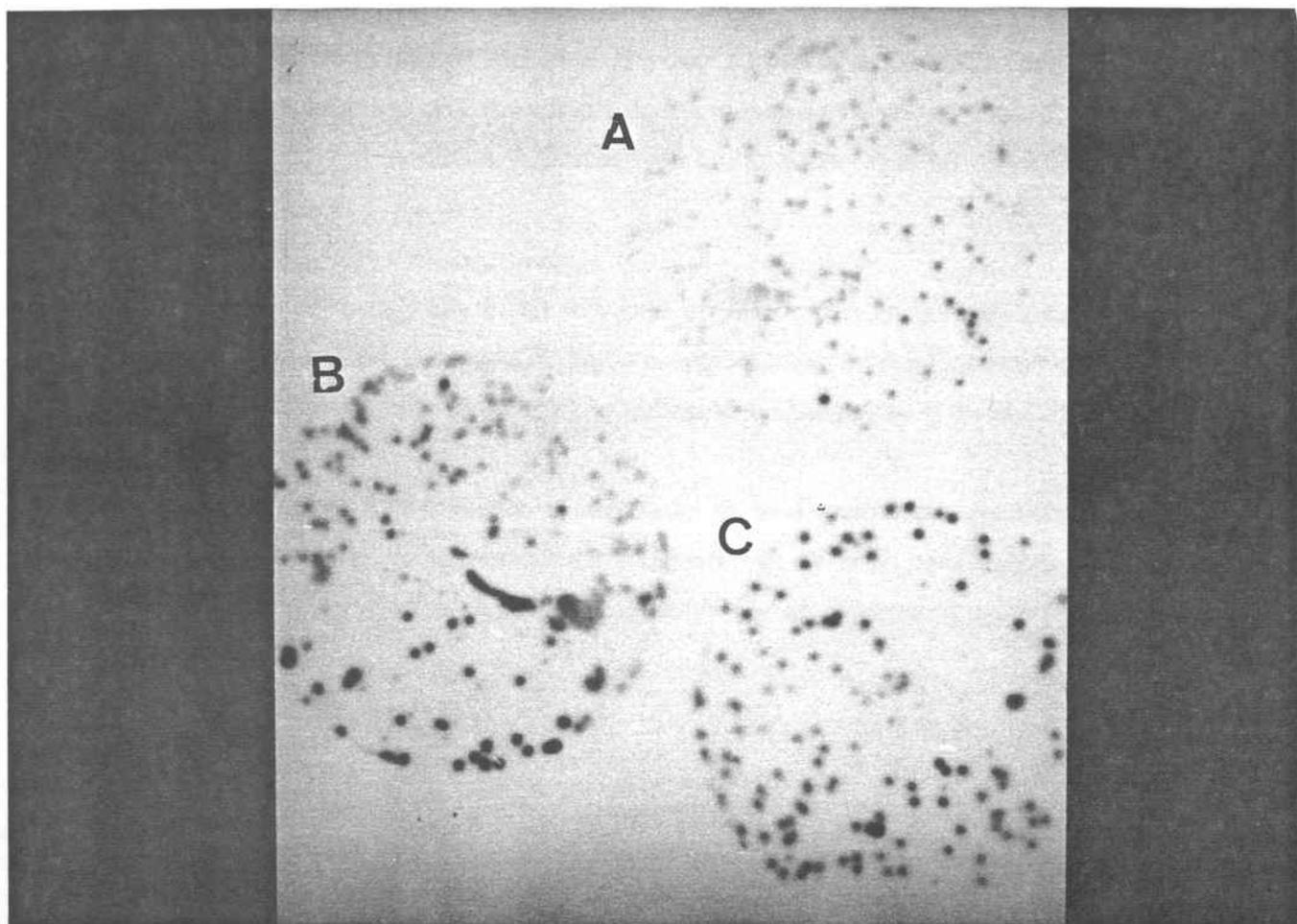


Figura 3.26. Imagen del segundo rescreening. B y C fueron tomados como positivos, mientras que C se consideró falso positivo,



Tras el aislamiento de estos clones, se procedió a la purificación a gran escala del DNA de lambda correspondiente a cada clon. Se utilizó el método descrito en el apartado 2.5.7.

El DNA purificado del clon B1, fué sometido a digestión con Eco RI, en las condiciones descritas en 2.5.4 y liberó un fragmento de 1.7 kB de longitud. Dicho fragmento se extrajo del gel mediante el proceso de Gene-Clean que se describe en el apartado 2.5.2.

El inserto del clon B1 se subclonó en M13 mp18 en las condiciones descritas en 2.5.8, obteniéndose una serie de fagos recombinantes en orientaciones complementarias (2.5.8). Asimismo, este fragmento se subclonó en Bluescript y en pUC19.

La figura 3.27 muestra el resultado de la digestión del subclonaje de M13 con diferentes enzimas de restricción; estas digestiones sirvieron para caracterizar este inserto y permitieron construir el mapa de restricción que se representa en la figura 3.28.

Figura 3.27. Digestión con diferentes enzimas de restricción del inserto subclonado en M13. X: Xba I; B: Bam HI; E: Eco RI; P: Pst I; H: Hind III.

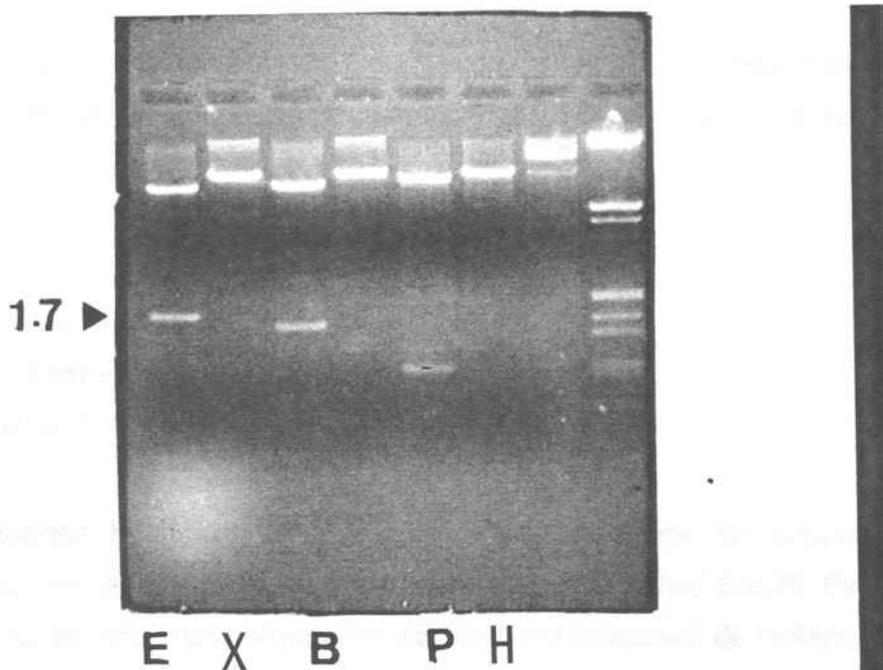
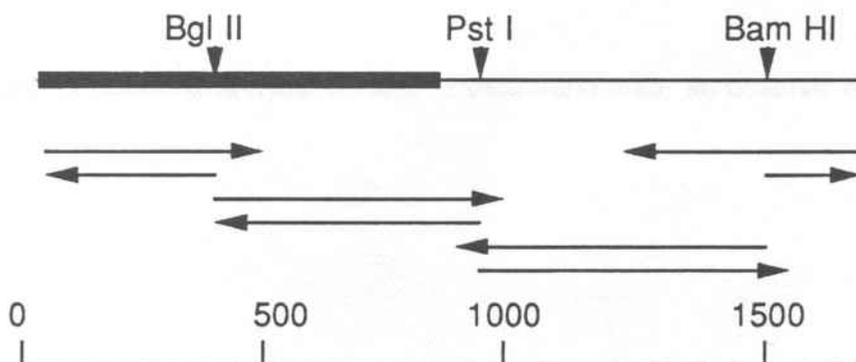


Figura 3.28. Mapa de restricción construido a partir de las digestiones de la figura 3.27, con esquematización de la estrategia de secuenciación seguida. Las flechas indican los subclones obtenidos con la longitud de la secuencia que se podría leer.



3.4.2 SECUENCIACION DEL cDNA

A partir del mapa de restricción, se diseñó una estrategia de secuenciación consistente en la obtención de los subclones correspondientes a los fragmentos de las siguientes digestiones:

- Eco RI-PstI.
- Pst I-Eco RI.
- Bgl II-Bam HI.
- Eco RI-Bgl II.

De las digestiones BgIII-Bam HI y Eco RI-Bgl II obtuvimos los subclones correspondientes a las dos orientaciones, mientras que de las digestiones Eco RI-Pst I y Pst I-Eco RI, solamente se obtuvo una orientación, si bien era la adyacente de la diana Pst I al primer universal de M13.

Teniendo en cuenta que de cada subclon podíamos determinar la secuencia de unas 540 bases, el solapamiento de las diferentes secuencias obtenidas, nos permitió construir la secuencia completa correspondiente al fragmento aislado. La figura 3.28 muestra esta estrategia de secuenciación. Como vector de estos subclones se utilizó M13 mp19.

La secuencia obtenida correspondiente a este fragmento, se observa en la figura 3.29.

Figura 3.29. Secuencia completa obtenida para el clon B1 mediante la estrategia representada en la figura 3.28. La superposición de las secuencias obtenidas para cada subclon permitió la construcción de la secuencia total.

```

G GCT GCC TAC AAG CTG GTG CTG ATC CGG CAT GGC GAG AGC GCC TGG          47
AAC CTG GAG AAC CGC TTC AGC GGC TGG TAC GAT GCC GAC CTG AGC CCA          95
GGG GGC CAC GAG GAG GCG AAG CGC GGC GGG CAG GCG TTG CGA GAT GCT          143
GGC TAT GAG TTT GAC ATC GTC TTC ACC TCT GTG CAG AAG AGA GCA ATC          191
CGC ACC CTC TGG ACA GTC CTG GAT GCC ATT GAC CAG ATG TGG TTG CCA          239
GTG GTA CGG ACC TGG CGT CTC AAT GAG CGA CAC TAT GGG GGA CTA ACA          287
GGT CTC AAT AAA GCA GAG ACT GCT GCT AAG CAT GGT GAG GCA CAG GTA          335
AAG ATC TGG AGA CGA TCT TAC GAT GTC CCG CCA CCT CCA ATG GAG CCT          383
GAT CAT CCC TTC TAC AGC AAC ATC AGC AAG GAC CGC AGG TAC GCA GAC          431
CTT ACT GAG GAC CAG CTA CCC TCC TGT GAG AGC CTG AAG GAT ACT ATT          479
GCC AGG GCA CTG CCC TTC TGG AAT GAA GAA ATT GTT CCC CAG ATC AAG          527
GAG GGG AAA GGG GTC TTG ATT CCT GCC CAT GGC AAC AGC TAC GGG GGC          575
ATT GTC AAG CAT CTG GAG GGT CTG TCA GAA GAG GCC ATC ATG GAG CTG          623
AAC CTG CCA ACT GGT ATA CCC ATC GTC TAT GAA CTG GAC AAG AAC TTG          671
AAG CCC ATC AAG CCC ATG CAG TCT CTG GGA GAT GAA GAG ACG GTG CGT          719
AAA GCC ATG GAA GCT GTG GCT GCT CAG GGC AAG GTG AAG AAG TGA aqq          767

cgggggggggggctctctgcccgaacccctctctccctgcttcttctctgctctctgcaacct          830
cccctgcacctgccacactgactacatcttttaqgatcttcaqtttaagttgtagctgcaqata          893
ggacctgtggctcccattctctcttttagtattttatccccgggacccactctctctctgagatc          956
tagtcagaaagaaacccctctggggctgcaggctcttgggtccatacccagggaaggctcccctgtc          1019
ccgggagagaggtttgagtagatagtaattatatacccccttagctcttctgtttactaagggtctg          1082
cttaqgaaagaggtctgggagggctgtatctggttatgacaaatqaggaagagagctgtgtctcc          1145
agttttgtccctggaacctgtccctgcaactcttcccacaaatagggttaactggggcctagttcat          1208
tccatgqagaggtgaaatqaaacctctctccqgattasaaagacctactttctctctgacccct          1271
aggacgctgctggcccagaaaggttgggaaacagctcttgcacacctctctctctctctctctct          1334
cttttccaaataaaatataataataataataataataataataataataataataataataata          1397
gttggagctctaaaggtggtcccccgaagaaagagccattctctcagatcaaatgggataaactcc          1460
ttgtacctcttctctgttttggatccccctttgctcttcttttctaaagaggttgaagcccttqst          1523
cctctccaaaggttttgtctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct          1586
gggttccagagctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct          1649
ctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct          1658

```

Por comparación de esta secuencia con la homóloga humana, vimos que carecía de las dos primeras bases correspondientes al codon iniciador Metionina (AT), así como de la zona 5' no traducida. Por lo tanto este clon estaba incompleto.

Para obtener un clon completo del cDNA de la PGM-B, se secuenciaron los otros dos clones positivos del screening (B2, B3), pero mostraron que ambos eran incompletos.

3.4.3 NUEVO AISLAMIENTO DE CLONES POSITIVOS EN UNA LIBRERIA DE CORAZON

A la vista de estos resultados, se utilizó una nueva librería, en este caso construida a partir de mRNA de corazón de rata en lambda gt11 y amablemente cedida por el Dr. B. Nadal-Ginard de Boston. El corazón, como se explica en el apartado 1.2 es un tejido donde se encuentran las tres isoenzimas de la PGM: BB, MB y MM, con lo cual en una librería de cDNA tendríamos representados los cDNAs M y B. Debido a la alta homología existente entre ambas subunidades, era muy probable que utilizando como sonda el inserto del clon B1, obtuviéramos una colección de positivos mezcla de M y B. Para discernir entre estos clones diseñamos la siguiente estrategia de clonaje:

-Se hizo un primer screening con la sonda B1 completa. Se obtuvieron clones correspondientes a las subunidades M y B (además de los falsos positivos habituales en todo primer screening)

-Se realizó un segundo rescreening con la zona 3' no codificante del clon B1 correspondiente al fragmento Pst1-Eco R1. Al corresponder este fragmento a la zona 3' no traducida de la PGM-B, ausente en la PGM-M, podíamos eliminar los presuntos clones M.

-El tercer rescreening se llevó a cabo utilizando el fragmento de 380 pb resultante de la digestión Eco R1-Bgl II. De esta manera eliminábamos aquellos clones que no tuvieran una zona 5' lo suficientemente importante. Contábamos con una alta

probabilidad de obtener clones B con un presencia significativa de zona 5'.

El resultado de estos experimentos fué la obtención de tres clones: H4, H17, H18, que daban reacción positiva con todos los fragmentos ensayados.

Se obtuvo DNA fágico de esto tres clones positivos. La digestión con Eco R1 de estos DNAs se muestra en la figura 3.30 donde puede verse que el clon 17 es el de mayor tamaño (1.7 kb), y era por lo tanto el candidato óptimo a contener el extremo 5'.

Se subclonó dicho fragmento en M13 mp19 en orientaciones complementarias y se secuenciaron ambas orientaciones. El resultado se presenta en la figura 3.31 donde puede observarse la zona 5' que no se había obtenido con el clon B1 de la librería de cerebro.

Conjuntamente con los resultados del anterior clonaje, construimos la secuencia completa correspondiente al cDNA de la PGM-B de rata. El resultado se muestra en la figura 3.32. La longitud total es de 1697 pares de base, la zona codificante comprende desde el nucleótido 39 hasta el 797, codifica para una proteína de 254 aminoácods cuya secuencia se muestra también en la figura 3.32.

Figura 3.30. Digestión con Eco R1 de los fagos obtenidos del screening de la librería de corazón. 1-H4; 2-H17; 3-H18.

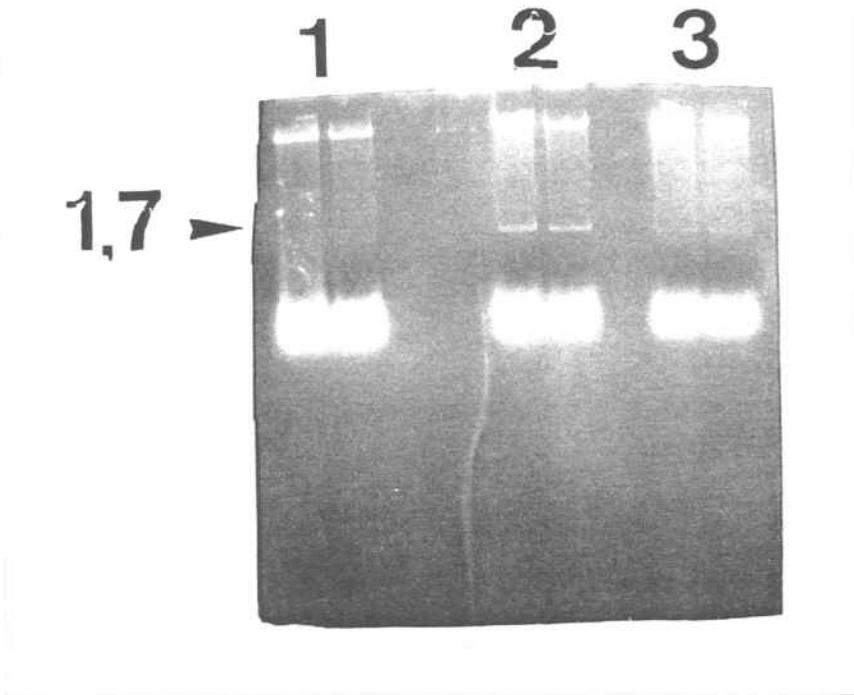


Figura 3.31. Secuencia obtenida para el fago H17 una vez subclonado en M13.

5' cagcgatcctcagttactgccgcatctctgccggtcgtcATG GCT GCC TAC AAG CTG GTC CTG
 ATC CGG CAT GGC GAG AGC GCC TGG AAC CTG GAG AAC CGC TTC AGC GGC
 TGG TAC GAT GCC GAC CTG AGC CCA GCG GGC CAC GAG GAG GCG AAG CGC
 GGC GGG CAG GCG TTG CGA GAT GCT GGC TAT GAG TTT GAC ATC GTC TTC ACC
 TCT GTG CAG AAG AGA GCA ATC

Figura 3.32. *Secuencia completa para la el cDNA de la PGM-B de rata, con representación de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la misma.*

	agcgatcctcagttactgccgcatctctgccggtcgtc	38
ATG GCT GCC TAC AAG CTG GTG CTG ATC CGG CAT GGC GAG AGC GCC TGG		86
M A A Y K L V C I R H G E S A W		
AAC CTG GAG AAC CGC TTC AGC GGC TGG TAC GAT GCC GAC CTG AGC CCA		134
N L E N R F S G W Y D A D L S P		
GCG GGC CAC GAG GAG GCG AAG CGC GGC GGG CAG GCG TTG CGA GAT GCT		182
A G H E E A K R G G Q A L R D A		
GGC TAT GAG TTT GAC ATC GTC TTC ACC TCT GTG CAG AAG AGA GCA ATC		230
G Y E F D I V F T S V Q K R A I		
CGC ACC CTC TGG ACA GTC CTG GAT GCC ATT GAC CAG ATG TGG TTG CCA		278
R T L W T V L D A I D Q M W L P		
GTG GTA CCG ACC TGG CGT CTC AAT GAG CGA CAC TAT GGG GGA CTA ACA		326
V V R T W R L N E R H Y G G L T		
GGT CTC AAT AAA GCA GAG ACT GCT GCT AAG CAT GGT GAG GCA CAG GTA		374
G L N K A E T A A K H G E A Q V		
AAG ATC TGG AGA CGA TCT TAC GAT GTC CCG CCA CCT CCA ATG GAG CCT		422
K I W R R S Y D V P P P P M E P		
GAT CAT CCC TTC TAC AGC AAC ATC AGC AAG GAC CGC AGG TAC GCA GAC		470
D H P F Y S N I S K D R R Y A D		
CTT ACT GAG GAC CAG CTA CCC TCC TGT GAG AGC CTG AAG GAT ACT ATT		518
L T E D Q L P S C E S L K D T I		
GCC AGG GCA CTG CCC TTC TGG AAT GAA GAA ATT GTT CCC CAG ATC AAG		566
A R A L P F W N E E I V P Q I K		
GAG GGG AAA GGG GTC TTG ATT CCT GCC CAT GGC AAC AGC TAC GGG GGC		614
E G K G V L I P A H G N S Y G G		
ATT GTC AAG CAT CTG GAG GGT CTG TCA GAA GAG GCC ATC ATG GAG CTG		662
I V K H L E G L S E E A I M E L		
AAC CTG CCA ACT GGT ATA CCC ATC GTC TAT GAA CTG GAC AAG AAC TTG		710
N L P T G I P I V Y E L D K N L		
AAG CCC ATC AAG CCC ATG CAG TCT CTG GGA GAT GAA GAG ACG GTG CGT		758
K P I K P M Q S L G D E E T V R		
AAA GCC ATG GAA GCT GTG GCT GCT CAG GGC AAG GTG AAG AAG TGA agg		806
K A M E A V A A Q G K V K K *		
cgaggaggcggactcctgccctgaacacctctctccctgcttggctcctcctcctgcacct	869	
cccctgcacctgccacactgactacatctttaggatcttcagtttaagttgtagctgcagata	932	
ggacctgtggctcccattctccttttagtattttatccccggcaccactccttcatagaatc	995	
tagtcagaagaagacctctggggctgcaggctcttgggtccatatccagggacggctccctgtt	1058	
acaggagagagttgagtagatagtaattatatcccccttagctcttggttactaagggtctg	1121	
cttaggaagaaggtcgggaggactgtatgtggtatgaccaatgaggagagaagctgtggtcc	1184	
agtttggctccctggaacctgtcctgcactcttcccacaattaggtaactggggcctagtc	1247	
tccagtgagagtgaaatgaacctcatgccgattaaaaagacctactttctctcctgacct	1310	
aaggacgtcgtggccctagaaggtgggaacagctctgtcaagtctatgtgtgtaacattta	1373	
ttttacaaaaataaagtatatatcatatatacagcacaaaagcaacgaggttgctagtgcca	1436	
ggtgagagtcctaagtggtcaccagaaaaaaagccattcctcagatcaaatgggataaactcc	1499	
ttgtacctctgtgtgttttggatcccccttgccttgtttgttaagaggtgaagccccctgat	1562	
catgtccaaggttttgtcttcaactgtctgaatcatgtttccagctgcttgacctactgtgt	1625	
gggttcagaactcgtttgggcataaacaactaagctcttccagtcagtataataaaggagtg	1688	
atgtgcaat	1697	

3.4.4 COMPARACION ENTRE LOS cDNAs DE LAS DIFERENTES PGM CON LA PFGM-B DE RATA

A) COMPARACION CON LA PGM-B HUMANA

La figura 3.33 (páginas 157 y 158) muestra la alineación de las secuencias de las PGM-B humana y de rata a partir del inicio de traducción. Las homologías en la zona codificante son del 90.7 %, mientras que en la zona no codificante desciende hasta un 64 %..

B) COMPARACION CON LA PGM-M DE RATA

La figura 3.33 (página 160) muestra la alineación de secuencias de los cDNAs de la PGM-B y la PGM-M de rata en sus zonas codificantes; presentando una homología del 73.5 %.

PGM-B rata

PGM-M rata

1 AGCGATCCTCAGTTACTGCCGCATCTCTGCCGGTCGTCATGGCTGCCTACAAGCTGGTGC
 ||| || || || |||| | ||||| || || || ||

1 CGCG TC CC CTGCC CACCATGGCCACCCACCCCTAGTAA

61 TGATCCGGCATGGCGAGAGCGCCTGGAACCTGGAGAACCCTTCAGCGGCTGGTACGATG
 || |||| || || ||||| | ||||| ||||| || | ||||| ||||

40 TGGTCCGCCACGGTGAAGCTCATGGAACCAAGAGAACCCTTCTGTGGCTGGTTGATG

121 CCGACCTGAGCCCAGCGGGCCACGAGGAGCGGAAGCGCGGGCCAGGCGTTGCGAGATG
 | || ||||| || || ||||| ||||| || | || | |||||

100 CAGAACTGAGTGAGAAGGGGGCAGAGGAGCCAAAGCGGGGGCCACTGCCATCAAAGATG

181 CTGGCTATGAGTTTGACATCGTCTTACCTCTGTGCAGAAGAGAGCAATCCGCACCTCT
 | ||||| ||||| || || || ||||| ||||| || || ||||| |||||

160 CCAAGATAGAGTTTGACATCTGCTACACGTCGGTCTGAAGCGGGCTATCCGCACCTTT

241 GGACAGTCTGGATGCCATTGACCAGATGTGGTTGCCAGTGGTACGGACCTGGCGCTCTCA
 |||| ||||| || | ||||| ||||| ||||| || ||||| |||||

220 GGACCATCCTGGATGTTACGGACCAAAATGTGGTGCCCGTGGTGCACCTGGCGCCTCA

301 ATGAGCGACACTATGGGGACTAACAGGTCTCAATAAAGCAGAGACTGTGCTAAGCATG
 ||||| ||||| || || || || ||||| || ||||| ||||| |||||

280 ATGAGCGGCACTATGGAGGTCTCACGGGCTCAATAAGGCTGAGACGGCTGCAAAGCATG

361 GTGAGGCACAGGTAAGATCTGGAGACGATCTTACGATGTCCCGCCACCTCCAATGGAGC
 | |||| ||||| ||||| || || || || ||||| || |||||

340 GGGAGGACAGGTAAGATCTGGAGGCTTCTTTGACACCCCGCCA CACCTATGGAGC

421 CTGATCATCCCTTCTACAGCAACATCAGCAAGGACCGCAGGTACGCAGACCTTACTGAGG
 | || || |||| | ||||| || || || || || || || || || ||

399 AGAAACACAACACTACTACGCTCCATCAGCAAGGATCGGCGCTATGCAGGCTTGAAGCCTG

481 ACCAGCTACCTCCTGTGAGAGCCTGAAGGATACTATTGCCAGGGCACTGCCCTTCTGGA
 | |||| || ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||

459 AGGAGTGCCTACCTGTGAGAGCCTCAAGGACACCATGCCCCGGGCTCTGCCCTTCTGGA

541 ATGAAGAAATGTTCCCGAGATCAAGGAGGGGAAAGGGTCTTGATTCTGCCCATGGCA
 |||| || || | || |||| |||| || || | || | ||||| ||

519 ATGAGGAGATCGCACCTAAGATTAAGGCTGGCAAGAGAGTCTTATTGCAGCCCATGGGA

601 ACAGCTACGGGGCATTGTCAAGCATCTGGAGGTCTGTGAGAAGAGGCCATCATGGAGC
 |||| | ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||

579 ACAGCCTCGAGGCATTGTCAAGCATCTGGAAGGATGTCAGACCAGGCCATCATGGAAC

661 TGAACCTGCCAAGTGGTATACCCATCGTCTATGAACTGGACAAGAAGTGAAGCCCATCA
 |||| |||| || || || |||| || |||| || || || || || || || ||

639 TGAATCTGCCACCGGAATCCCATTTGTGTATGAGCTGAACCAGGAGCTGAAGCCACCA

721 AGCCCATGCAGTCTCTGGGAGATGAAGAGACGGTGCCTAAAGCCATGGAAGCTGTGGCTG
 ||||| || ||||| ||||| || || || ||||| |||||

699 AGCCCATGAGGTTCTTGGGAGACGAAGAGACAGTTCGGAAGGCCATGGAGGCTGTGGCTG

781 CTCAGGCAAGGTGAAGAAGTGAAGGCGAGGAGCGGACTCCTGCCCTGAACACCTCTC
 | |||| || || ||||| | | | ||||| ||

759 CCCAGGAAA GCA AAGTGAGAGTGGGTGGCGGAATTC

841 TCCCTGCTTGTTCCTGCCTCCTGCACCTCCCTGCACCTGCCACACTGACTACATCTTT

C) COMPARACION CON LA PGM-M HUMANA

La figura 3.34 (página 162) es la alineación de las secuencias de la PGM-B de rata , con la PGM-M humana en la zona codificante, con una homología del 73.3 %.

3.4.5 COMPARACION A NIVEL DE SECUENCIA DE PROTEINAS DE LAS PGM

La figura 3.35 muestra alineadas las secuencias de aminoácidos de las monofosfoglicerato mutasas secuenciadas hasta el momento actual.

rb: PGM-B de rata

hb: PGM-B humana

rm: PGM-M de rata

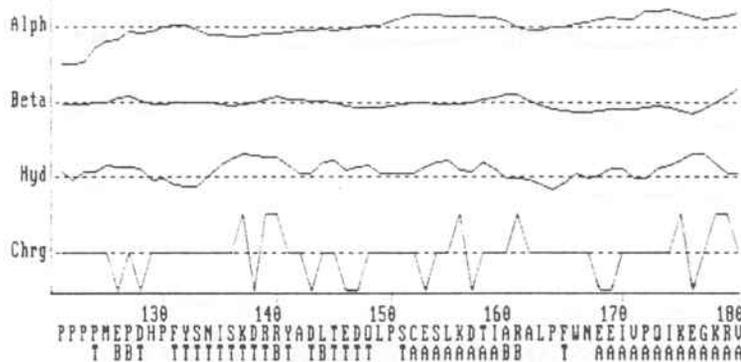
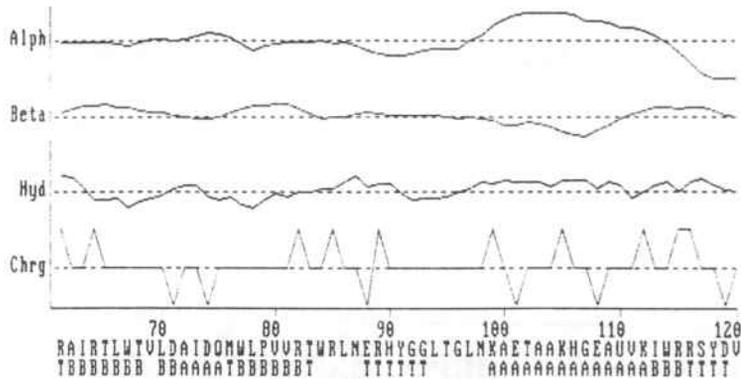
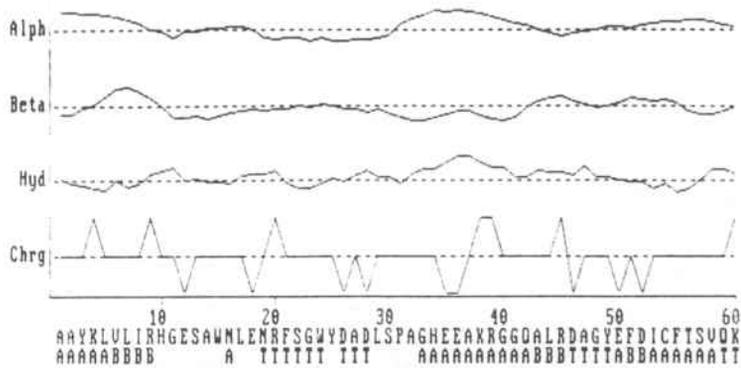
hm: PGM-M humana

y: PGM de levadura

3.4.6 PREDICCIÓN ESTRUCTURA SECUNDARIA Y DISTRIBUCIÓN DE CARGAS

La figura 3.36 (páginas 166–170) muestra la predicción de la estructura secundaria y la distribución de cargas para las diferentes monofosfoglicerato mutasas secuenciadas en la actualidad. Observese la notable similitud existente entre los diferentes picos de estructuras en hélice alfa y en hoja beta, así como la parecida distribución de cargas.

PGM-B humana



ppgm.70

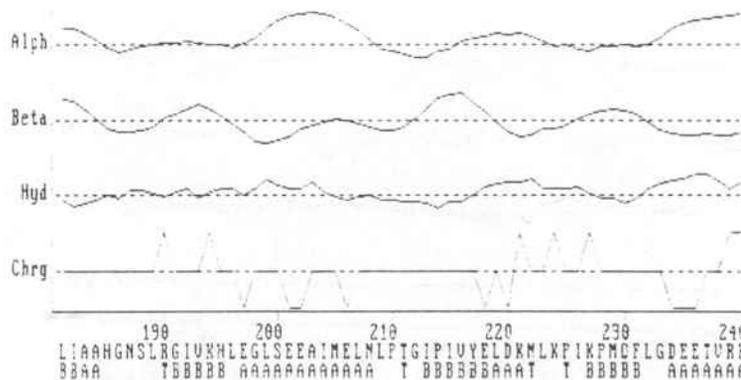
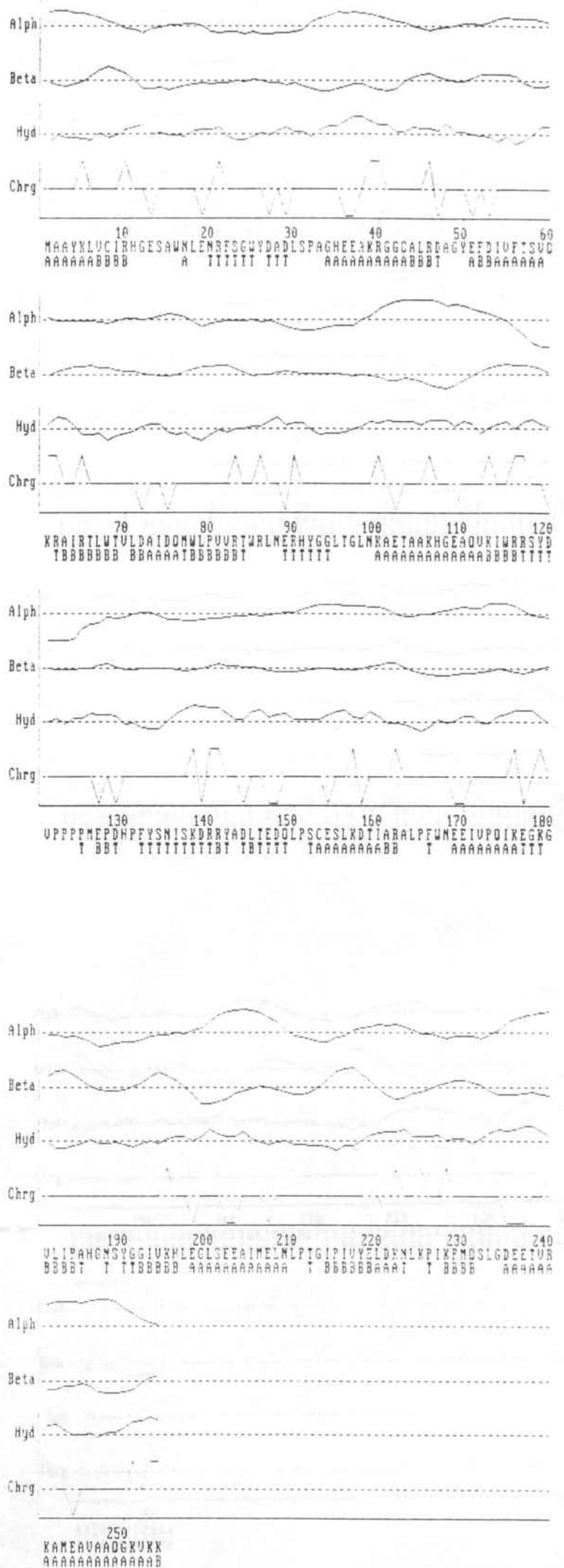
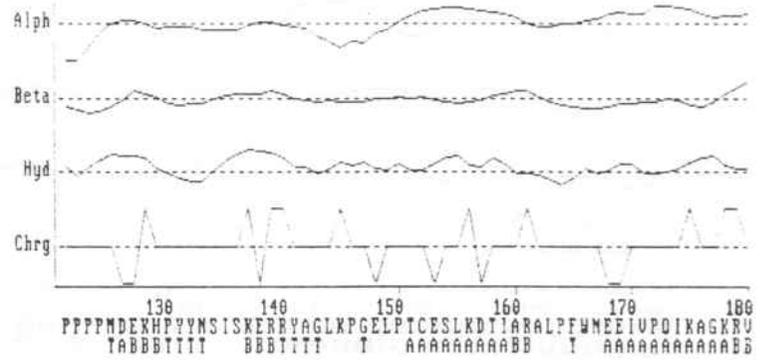
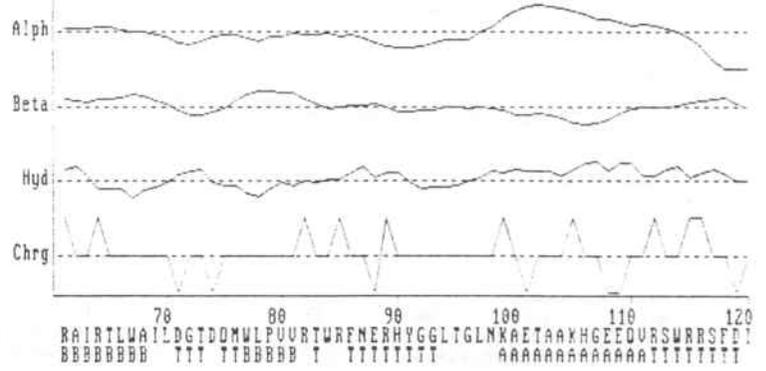
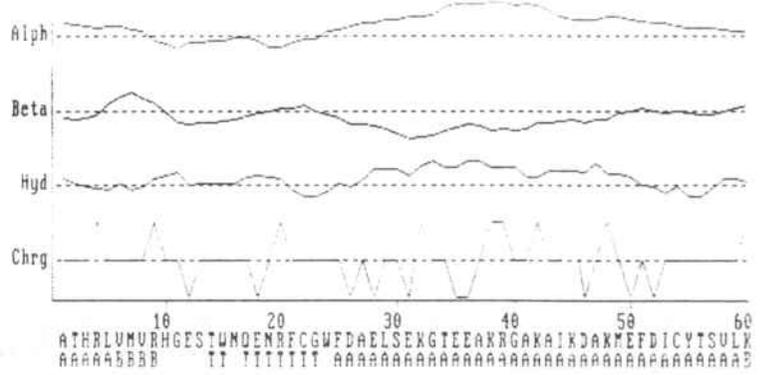


Figura 3.36

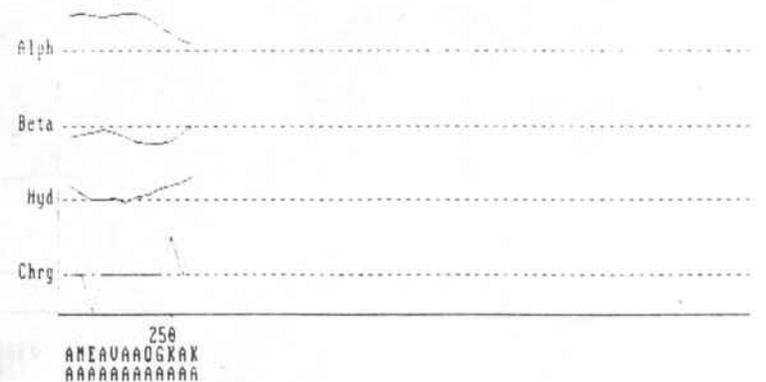
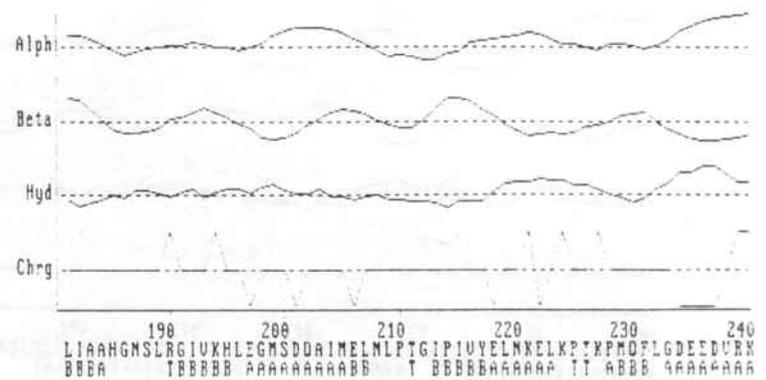
PGM-B de rata



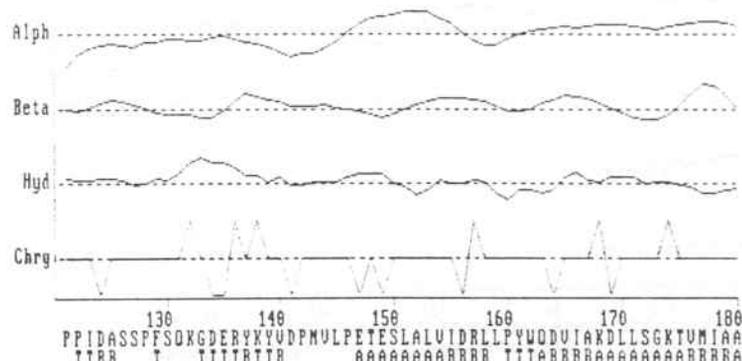
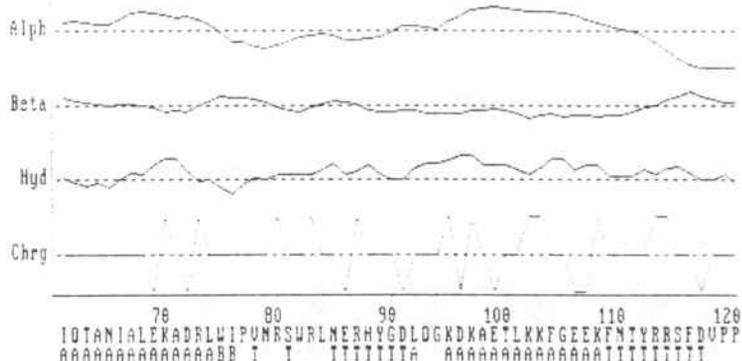
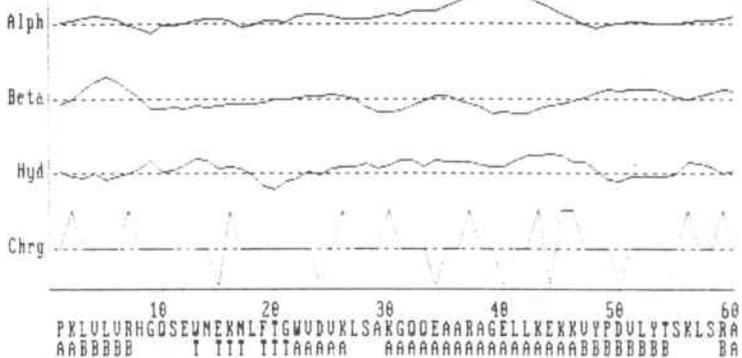
PGM-M humana



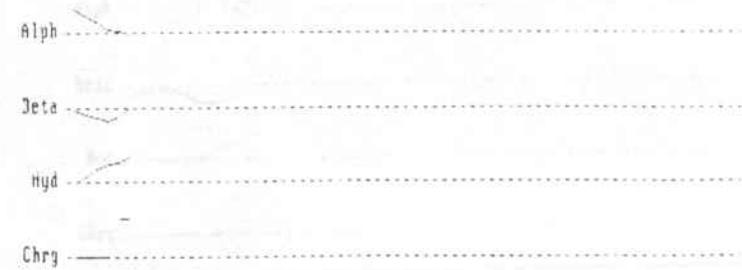
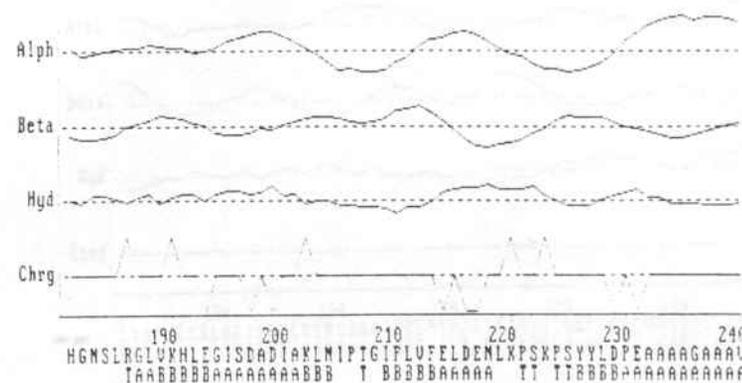
PGM.MUT



PGM-levadura

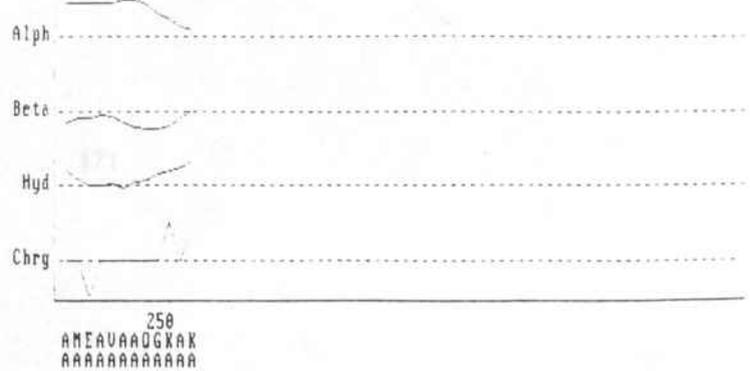
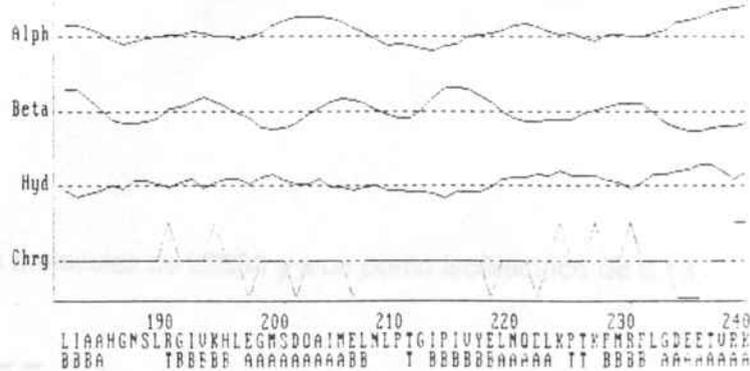
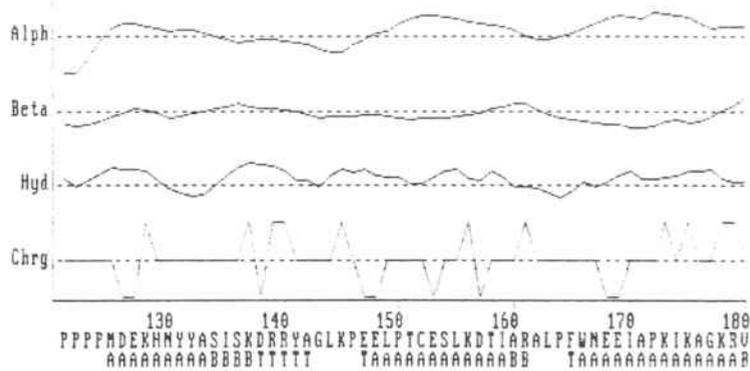
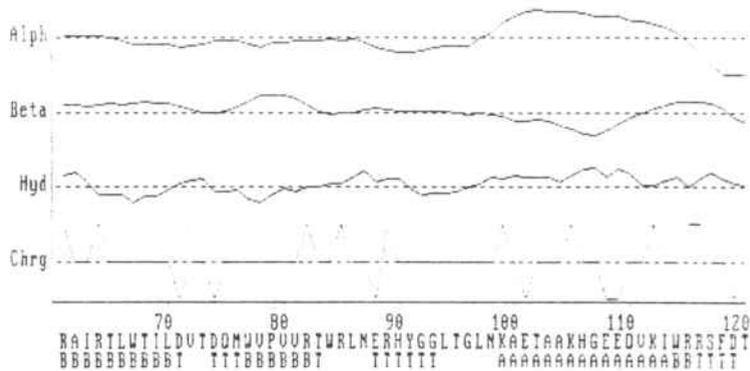
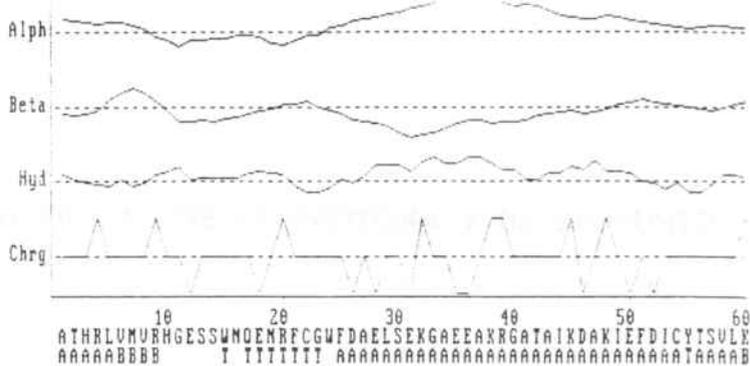


ppm. vs



ANDGXX
AARTT

PGM-M de rata



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

pgm. m

3.4.7 PREDICCIÓN DE PESO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA Y DE SU PUNTO ISOELECTRICO.

A partir de la secuencia introducida en el programa Microgenie, se han obtenido los siguientes % de aminoácidos.

	Totales	%
Ala	23	9.1
Arg	15	5.9
Asn	9	3.5
Asp	14	5.5
Cys	2	0.8
Gln	8	3.1
Glu	22	8.7
Gly	19	7.5
His	7	2.8
Ile	15	5.9
Leu	22	8.7
Lys	18	7.1
Met	6	2.4
Phe	5	2.0
Pro	16	6.3
Ser	12	4.7
Thr	10	3.9
Trp	7	2.8
Tyr	9	3.5
Val	15	5.9

Lo que corresponde a un peso molecular de 28639 y a un punto isoeléctrico de 6.13

3.4.7 COMPARACION DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES Y PUNTOS ISOELECTRICOS PREDICHOS PARA LAS DIFERENTES PGM.

La aplicación del mismo programa a las diferentes secuencias de PGM conocidas ha permitido deducir los siguientes pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos:

	Peso Molecular	Punto isoeléctrico.
PGM-B rata	28639	6.13
PGM-M rata	28627	6.26
PGM-B humana	28548	6.18
PGM-M humana	28688	6.25

3.4.8 ANALISIS NORTHERN-BLOT.

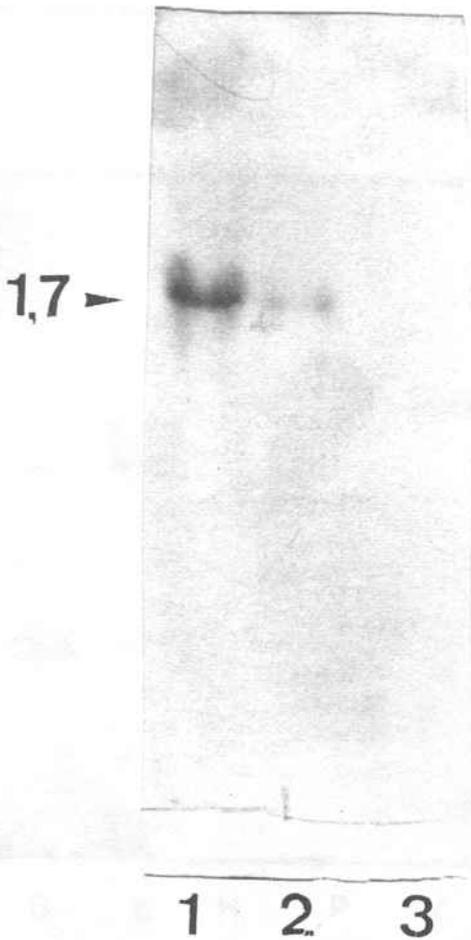
La figura 3.37 muestra el resultado del análisis Northern-blot con el cDNA correspondiente a la PGM-B de rata. Las condiciones experimentales son las descritas en 2.5.10.

Figura 3.37 Northern-blot con el cDNA de la PGM-B de rata.

1-RNA total cerebro de rata 10 μ g.

2-RNA total corazón de rata 10 μ g.

3-RNA total músculo esquelético 10 μ g.



3.4.9. ANALISIS SOUTHERN-BLOT

La figura 3.38 muestra el resultado del análisis Southern-blot con el cDNA de la PGM-B de rata. Las condiciones experimentales son las descritas en 2.5.11.

Figura 3.38. Southern-blot cDNA PGM-B.

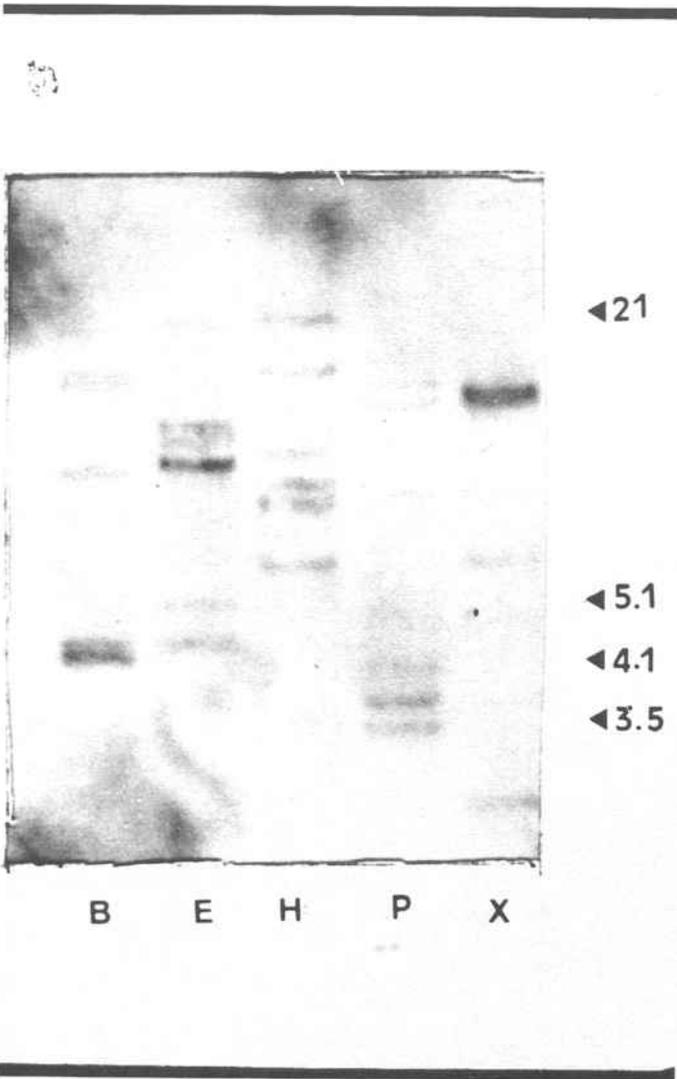
B: DNA total linfocitos digerido con Bam HI.

E: DNA total linfocitos digerido con Eco RI.

H: DNA total linfocitos digerido con Hind III.

P: DNA total linfocitos digerido con Pst I.

X: DNA total linfocitos digerido con Xba I.



4. DISCUSSION

4.1 PURIFICACION DE LA PGM-B DE RATA

La PGM-B de rata ha sido purificada a partir de cerebro aplicando un protocolo derivado del descrito por Bartrons y Carreras (1982) para la purificación de la misma isoenzima de corazón de cerdo. Dicho protocolo ha sido aplicado utilizando hígado como fuente de tejido (que contiene exclusivamente la forma isoenzimática BB), dando un conjunto de proteínas contaminantes bastante grande, seguramente por la mayor cantidad de proteínas con propiedades físico-químicas parecidas que presenta este órgano. Por esta razón se eligió el cerebro como fuente de tejido a pesar de su poco peso (1.8 g/animal por término medio), y de necesitar unos 100 g de tejido en cada purificación.

En cerebro, el protocolo aplicado muestra una purificación de 105 veces, con un rendimiento del 8.7 %, dando una proteína que mostraba ausencia de contaminación a nivel de electroforesis SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie y con plata.

Con respecto a la isoenzima muscular, presenta un comportamiento diferente en la columna de DEAE-Celulosa, ya que queda retenida en la resina, y es eluída mediante un incremento de la fuerza iónica en el tampón, que se consigue gracias a un gradiente de NaCl de 0-350 mM. La forma MM es eluída directamente con el tampón de lavado de la columna. Este distinto comportamiento cromatográfico es explicado por los diferentes puntos isoeléctricos de ambas isoenzimas, los cuales según Bartrons y Carreras (1982) son 6.3 para la forma MM y 4.8 para la forma BB. Igualmente se correlaciona con los puntos isoeléctricos teóricos calculados a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia del cDNA de la forma B y de la forma M (apartado 3.4 de esta memoria) que son respectivamente: 6.13 y 6.26. Esta diferencia de puntos isoeléctricos explicaría el que una forma quedara adsorbida a esta resina de intercambio aniónico, y la otra no.

Ambas formas isoenzimáticas tienen un comportamiento similar en la resina de hidroxilapatita. La columna de Cibacrom-blue, adsorbe específicamente las fosfoglicerato mutasas, razón por la que ambas formas quedan retenidas en la columna tal como fué observado por otros autores (Castellà, 1989), pero la elución se hace con distintos compuestos. Así, la forma MM es eluída con 2,3 BPG y la forma BB con 2-fosfoglicolato, el cual es un

compuesto que interacciona con el centro activo de la enzima tal como se describe en el apartado 2.2.2.

Tras los tres procesos cromatográficos se obtiene la proteína activa, sin que sea posible detectar contaminación de otras proteínas a nivel de SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie y tampoco con tinción argéntica (apartado 3.1). Esto diferencia de nuevo la purificación de esta forma isoenzimática respecto a la forma MM. Después de los procesos cromatográficos, en esta última, se obtiene una contaminación de peso molecular 45.000, que sólo se elimina mediante electroforesis preparativa y electroelución de la banda recortada (Castellà et al, 1988).

4.2 OBTENCION Y ANALISIS DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES

Los anticuerpos policlonales han sido obtenidos con la enzima nativa, a diferencia de los obtenidos para la isoenzima MM, que por dificultades en la purificación se obtuvieron inyectando la forma desnaturalizada (Castellà, 1989). La utilización de una especie filogenéticamente próxima a la rata, explicaría una respuesta antigénica no muy alta en comparación con otros anticuerpos fabricados contra la misma proteína de una especie filogenéticamente muy lejana (Graña et al., 1989).

Los anticuerpos presentan reacción cruzada, pues reconocen tanto a la forma MM como a la forma BB, a nivel de Western-blot, ELISA e inmunoinhibición enzimática. Sin embargo, a pesar de la reacción cruzada, no se observa reacción positiva con ninguna otra proteína de extracto de cerebro, hígado, músculo esquelético y corazón, razón por la que es posible afirmar que se trata de anticuerpos específicos contra la PGM.

La purificación de los anticuerpos de los antiseros por cromatografía de afinidad, o bien la separación de las IgG del resto de proteínas séricas, mejora la señal de la reacción antígeno-anticuerpo en Western-Blot, y hace menos probable la formación de artefactos. Por esta razón en los experimentos de inmunolocalización se ha empleado el anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad o la fracción de IgG.

Los experimentos de inmunoinhibición muestran hasta un 90 % de inhibición de la actividad enzimática, explicable por el reconocimiento bien de algún epítipo del centro activo, o bien por la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo. No se han observado diferencias entre la adición y la no adición de polientilenglicol al medio. Por este motivo, la pérdida de actividad sería probablemente debida a una inhibición más que a una precipitación del complejo.

Los experimentos de ELISA muestran una reacción más alta con las subunidades que con la proteína nativa por parte de los antiseros, lo que sugiere que algunos determinantes antigénicos quedan bloqueados en la estructura cuaternaria. Además la mayor reacción ofrecida por la subunidad M frente a la B, se explicaría por la existencia de algún epítipo adicional en esta forma que no estaría en la forma B.

Nuestros resultados muestran inequívocamente la existencia de reacción cruzada entre ambas formas. Sin embargo, Fundele y Krietsch (1985), obtuvieron anticuerpos anti PGM-M de ratón que no reaccionaba con PGM-B de la misma especie obtenida de riñón; finalmente Prehu et al. (1984), habían obtenido un antisuero contra la PGM-B de pollo que no reconocía la PGM-MM de conejo. La razón de estas divergencias de resultados tendría que ver con diferencias entre especies o bien diferencias de los métodos de obtención.

El hecho de la existencia de reacciones cruzadas frente al anticuerpo anti-fosfoglicerato mutasa, ocasionó que no pudiera utilizarse este anticuerpo como sonda para el clonaje del cDNA, viendonos obligados a utilizar otras sondas.

4.3 LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA PGM

Los primeros experimentos de fraccionamiento subcelular, en los que se obtenían los orgánulos mediante centrifugación diferencial mostraron la ausencia de actividad PGM en las fracciones mitocondrial y microsomal, y la presencia de actividad PGM significativa en la fracción nuclear. Debido a la contaminación de la fracción nuclear que se obtiene con la centrifugación del homogenado, decidimos abordar la purificación de núcleos celulares para confirmar la existencia de PGM en esta fracción.

El método de purificación de núcleos utilizado, emplea la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. En función del tejido, hemos utilizado una variación del método descrito por Kuehl (1975) para músculo esquelético y cardíaco, o bien del método descrito por Piña et al (1984) para cerebro e hígado. Tal como se muestra en el apartado 3.3, los núcleos obtenidos no presentan contaminación citoplasmática a nivel de microscopía de contraste de fases. Asimismo, los controles enzimáticos llevados a cabo (fosfatasa ácida e isocitrato deshidrogenasa) no revelan contaminación de otros orgánulos citoplasmáticos.

Los núcleos purificados, siguen manteniendo actividad enzimática tal como se representa en la tabla 3.3, aunque en una menor proporción. Además de la actividad enzimática, dan reacción antigénica contra los anticuerpos anti-PGM, tal como se muestra en la figura 3.3. Teniendo en cuenta la alta especificidad de estos anticuerpos contra la PGM, parece poco probable el que puedan reconocer otra proteína diferente a la PGM. En el caso de los núcleos musculares, reconocen por Western-blot una proteína cuyo peso molecular coincide con el monómero de la PGM, con lo cual es altamente probable que esta no sea otra más que la fosfoglicerato mutasa.

Los núcleos de otros tejidos presentan resultados más difíciles de interpretar. Así los núcleos de cerebro e hígado, dan conjuntamente actividad PGM y reacción antígeno-anticuerpo; pero en este caso, por Western-blot, se detecta no la banda de PM correspondiente al monómero de la PGM, sino varias bandas de PM comprendidos entre 60.000 y 90.000, como se observa en la figura 3.22. En primer lugar nos planteamos la posibilidad de que estas bandas correspondieran a la unión covalente de la PGM con otras proteínas; en concreto con la

ubiquitina, la cual puede unirse covalentemente a proteínas. La unión de diferentes cantidades de moléculas de ubiquitina a la PGM, podría explicar nuestro resultado. Sin embargo los experimentos de Western-blot que realizamos utilizando el anticuerpo anti-ubiquitina amablemente cedido por el Dr. C.Mezquita de Barcelona, no nos permitieron comprobar esta hipótesis. Otra hipótesis planteada sería la interacción de la PGM con material nuclear (tal vez cromatina), que se traduciría en un comportamiento electroforético trastocado. No obstante esta hipótesis tampoco ha podido ser comprobada. Posiblemente el fraccionamiento subnuclear, seguido de Western-blot ayudaría a elucidar este fenómeno.

Curiosamente, los nucleos de corazón (figura 3.22) presentan toda la colección de bandas de los restantes nucleos. Se detecta la banda de 30.000 correspondiente al monómero de la PGM, que se ve en el caso de los nucleos de músculo esquelético. Asimismo se detectan las bandas de alto peso molecular de los nucleos de cerebro e hígado, y además una banda adicional de peso molecular intermedio. Aunque esto no explica el fenómeno, esto se correlaciona con la presencia en corazón de las tres isoenzimas MM, MB, y BB. Así la isoenzima MM se detectaría de forma análoga a la citosólica y las formas BB darían la reacción mencionada.

Por otra parte, el hecho de que la electroforesis de acetato de celulosa de los nucleos purificados, presente las formas correspondientes al citosol de cada tejido (fig. 3.23), apoyaría la idea de que ambas formas provienen de la expresión del mismo gen.

4.3.2 INMUCITOQUIMICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA PGM

Los primeros resultados de microscopía óptica realizados en cerebro, mostraron la presencia de marcaje citoplasmático y nuclear. Complementado con microscopía electrónica, se detecta la presencia de marcaje en el citosol de todas las células estudiadas, así como en el nucleo, lo cual se correlaciona con los daños de fraccionamiento subcelular. No se observa marcaje en las mitocondrias ni otros orgánulos citoplasmáticos en ningun órgano estudiado: hígado, cerebro, corazón y músculo esquelético. Los controles negativos ofrecen asimismo, la ausencia de marcaje.

En músculo esquelético, no se observa asociación a estructuras contráctiles, lo que está de acuerdo con las observaciones de Clarke et al. (1975), y en contraste con la creatin-kinasa, con quien la PGM comparte gran número de analogías estructurales. La creatin-kinasa no sólo se encuentra asociada a la banda Z de las miofibrillas, sino que además se ha descrito la presencia de formas mitocondriales.

En cerebro, se detecta diferencias en cuanto a la localización en función del tipo celular observado. Así en las células gliales, detectamos PGM citosólica en todos los subtipos celulares, pero no detectamos marcaje nuclear en la oligodendroglia, y si en la astrogliá.

Los resultados de hígado y corazón son bastante similares a lo ya descrito, presentando ambos tejidos marcaje nuclear y citosólico.

4.3.3 DISCUSION DEL POSIBLE SIGNIFICADO FUNCIONAL

La presencia de enzimas glicolíticas en nucleo, fué descrita por Siebert ya en 1961. Asimismo otros autores encontraron diferentes enzimas glicolíticas en esta fracción. Kuehl, en la descripción de purificación de nucleos de músculo esquelético (1974), detecta la piruvato kinasa, lactato deshidrogenasa, y aldolasa. Posteriormente se ha visto como diferentes proteínas nucleares eran en realidad enzimas glicolíticas, como la lactato deshidrogenasa (Cattaneo et al., 1985; Grosse et al., 1986; Williams et al., 1985), y también la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Grosse et al., 1986). También se ha descrito una localización nuclear para la fosfoglicerato kinasa (Jindal et al., 1990), y para la piruvato kinasa (Kato et al., 1989). Asimismo la enolasa ha sido descrita como una enzima multifuncional (Iida et al., 1985; Piatigorsky y Wistow, 1989). La explicación de este fenómeno habría que situarla en la gran cantidad de estas proteínas que hay en la célula (por lo general una cantidad bastante mayor de la que necesita para llevar a cabo la glucólisis), en la antigüedad de estas proteínas, en la baja tasa de evolución sufrida, y en su amplia distribución por todas las células. Todo ello habría permitido que estas proteínas se hubieran adaptado a otras funciones celulares distintas a las exclusivamente citosólicas, en el amplio margen de tiempo que ha permitido la discreta tasa de evolución sufrida.

La posible función que desempeñe en el nucleo la fosfoglicerato mutasa es desconocida

hasta el momento. No se puede descartar que su localización nuclear sea debida a la gran cantidad de esta proteína existente en la célula y que pasaría al núcleo por simple difusión pues el tamaño de exclusión del poro nuclear coincide con el peso molecular de la PGM (Hunt, 1989). No obstante, la presencia en núcleos de otras proteínas glicolíticas de mayor peso molecular no apoya esta hipótesis. Un hecho a tener en cuenta, es que la PGM es fosforilada en tirosinas por el receptor de EGF, y el receptor de insulina (Cooper et al, 1983; Reiss et al, 1986; Sale et al, 1987), fenómeno que también presentan la lactato deshidrogenasa y la enolasa, las cuales son enzimas glicolíticas multifuncionales como ya se ha explicado. Este hecho, según lo propuesto por Cattaneo et al, 1985, podría regular el "pool" nuclear de estas enzimas. Si bien es prematuro aventurar actualmente alguna hipótesis acerca de la función de la PGM en el núcleo celular.

Pensamos que los próximos trabajos en esta línea deberían ir encaminados a la búsqueda de señales de transporte al núcleo en las secuencias PGM a medida que se vayan encontrando nuevas señales de este tipo. Igualmente creemos que experimentos de fraccionamiento subnuclear para comprobar en qué fracción del núcleo se encuentra la PGM deberían realizarse y finalmente, experimentos de unión al DNA por parte de la PGM posiblemente aclararían un posible papel como regulador génico por parte de ésta enzima. Sin duda sería interesante comprobar la posible fosforilación de la forma nuclear, y en caso de dar positivo, si se trata de una fosforilación en serinas, en treoninas o en tirosinas. Todos estos experimentos futuros sin duda aclararán el papel de la PGM en el núcleo.

4.4 CLONAJE Y SECUENCIACION DEL cDNA DE LA PGM-B

El abordaje experimental utilizado para el clonaje del cDNA de la PGM-B ha consistido en el screening de una librería de cDNA de cerebro de rata, con el cDNA de la forma M previamente clonado en nuestro laboratorio. Obtuvimos tres clones positivos en condiciones de hibridación muy desfavorables (0.1 SSC, 65 °C). Uno de estos positivos (B1) fué secuenciado totalmente dando una longitud de 1660 nucleótidos, con una alta homología con la forma humana descrita por Sakoda et al (1988). La alineación de estas secuencias, reveló la carencia por parte de nuestro cDNA de la zona 5' no traducida y también del codón iniciador de la traducción correspondiente a la metionina. Ante la presencia de un clon incompleto, decidimos buscar en otra librería un clon que contuviera la zona que nos faltaba, tal como se describe en la sección 3.4. El éxito de este rastreo, nos permitió completar la secuencia correspondiente al cDNA de la PGM-B de rata que se expone en la sección 3.4.

Dicho cDNA consta de 1697 pb, codificando para una proteína de 253 aminoácidos, con una zona 5' no traducida de 38 pb y una zona 3' no codificante bastante larga, de 897 bases y de función no conocida. La señal de poliadenilación se encuentra a 16 bases del final. La homología a nivel de nucleótidos con la forma humana es de un 92 % en la zona traducida, de un 65 % en la zona 3' no traducida y de un 55 % en la zona 5' no codificante. Las homologías con la forma M son de un 74 % tanto en la forma de rata como con la forma humana. La homología con las BPGM secuenciadas hasta la fecha ascienden al 50 %, y con la levadura se mantiene en un 50% también. Todo ello revela unas tasa de evolución realmente bajas.

La proteína codificada por nuestro cDNA, cambia en sólo 8 aminoácidos de los 253 totales con la homóloga humana, lo que da como resultado un 96.7 % de homología. El punto isoeléctrico teórico de esta proteína es de 6.13 frente al 6.18 de la forma humana y frente a los 6.25

de la M de rata y 6.25 de la M humana. Todo lo cual está de acuerdo con los datos experimentales de movilidades electroforéticas y comportamiento cromatográfico.

Los experimentos de Northern-blot, revelan la presencia de hibridación con una sola banda de un peso molecular de 1700 pb cuando la hibridación se hace en condiciones

estringentes, pero cuando se realiza con altas cantidades de RNA y en condiciones algo mas relajadas (1 SSC, 42 °) se detecta la hibridación con una banda de 0.8 kB de peso molecular, compatible con la forma M de la PGM de rata (Castella et al, 1989) y asimismo compatible con nuestros resultados de estrategia de clonaje (realizado en un principio con el cDNA PGM-M).

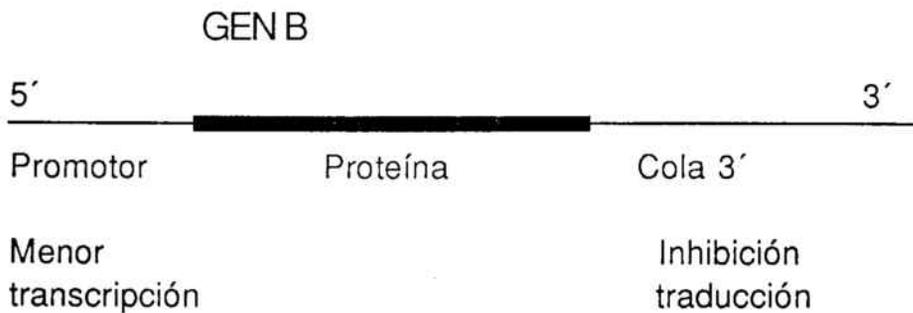
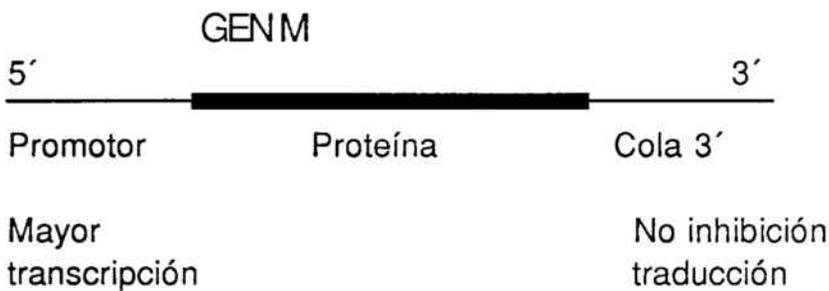
Los experimentos de Southern-blot, revelan la existencias de multiples bandas de hibridación (al menos 6), lo que concuerda con la existencia de varias copias de este gen. Una copia corresponderia al gen de la forma M, y al menos otra a la existencia como mínimo de un pseudogen de la forma B (Castellà, 1989). Por lo demás según Sakoda et al, (1988) existen varios psudogenes de la forma B que explicaría la existencia de varias bandas en los Southern.

La estructura secundaria de la proteína deducida de nuestra secuencia es similar a la forma humana. En cuanto a la estructura terciaria, el centro activo no se ve afectado y básicamente coincide con el descrito para la forma de levadura (Fotergill-Gilmore y Watson, 1989), ya que los aminoácidos esenciales estan conservados. Así la histidina 10, histidina 185, arginina 9, arginina 61 y glutámico 88 estan todos mantenidos.

En cuanto a las interacciones entre subunidades hay que constatar la ausencia en nuestra isoenzima de la cisteina 22 hipotéticamente la responsable de la formación del puente disulfuro que haría a la proteína mas sensible a los ataques por agentes tiólicos.

Como se ha dicho anteriormente, la cola 3' no traducida está relativamente bien conservada entre la rata y el hombre, con una homologia del 65 %, de forma análoga a la creatin kinasa que presenta tambien una cola 3' muy conservada (Billadello et al., 1986), y otros genes que presentan una región 3' no traducida conservada entre especies (Yaffee et al., 1985). Se ha demostrado que la estabilidad del mRNA puede ser regulada mediante interacción del extremo 3' no traducido con proteínas citosólicas (Shaw y Kamen, 1989), y que esta región puede participar en el control de la traducción (Dickey et al., 1989). Concretamente para la creatina kinasa B, se ha demostrado que el extremo 3' no traducido, de longitud muy similar al de la PGM y tambien muy conservado entre especies, se une a proteínas solubles en ciertos tipos de células (Lai C. Ch'ng et al., 1990), y que el complejo formado podría bloquear la traducción en

expresión de algunos genes y en concreto de la CK podría llevarse a cabo a través de interacciones de esta cola 3' no traducida. Teniendo en cuenta las profundas analogías existentes en el control de la expresión de la creatina kinasa y de la PGM, es muy posible que esta sufra también una regulación parecida a nivel de la cola 3'. Por lo tanto la regulación de la expresión de los genes de la PGM podría tener lugar a nivel de promotor 5', para lo cual seguramente el promotor de la forma M sería más idóneo; y a nivel de la zona 3', en este caso, la forma M al carecer de la zona 3' no sufriría la inhibición de la traducción de la forma B. Por lo tanto la regulación de la expresión de los genes de la PGM sería como sigue.



Este modelo explicaría la existencia de los dos genes para diferentes tejidos. El músculo esquelético es un tejido con necesidades energéticas mayores que el resto de tejidos. Sin embargo las constantes cinéticas de ambas isoenzimas de la PGM M y B son muy parecidas. La necesidad de mayor actividad PGM en músculo, se explicaría mediante el desarrollo de una isoenzima que puede ser regulada mediante un promotor 5' más fuerte que puede aportar mayor cantidad de mRNA, y que además no es regulado negativamente en la traducción como se ha expuesto anteriormente. Hay que recalcar sin embargo que esto no es más que una hipótesis. Habría que confirmar el papel efectivamente regulador de la cola 3' de la PGM, mediante la fabricación de un gen quimera a partir de una proteína "reporter" y la cola 3' de la PGM, comparando los efectos observados con los basales. En caso de dar resultado positivo, sería muy interesante intentar aislar las proteínas de unión que ya se ha demostrado que existen para la creatina kinasa (Lai C. Ch'ng et al., 1990), y comprobar si son las mismas o bien son diferentes. Habría que comprobar además los niveles de mRNA de la forma M para confirmar la hipótesis antes expuesta, así como medir la vida media de estos RNA mediante experimentos de run-on. Todo lo cual ayudará a entender mejor la regulación de la expresión de este grupo de genes.

5. CONCLUSIONES

1. Ha sido purificada a homogeneidad la isoenzima BB de la fosfoglicerato mutasa de rata.
2. El protocolo utilizado rinde una proteína libre de contaminación a nivel de SDS-PAGE con tinción argéntica, con una purificación de 115 veces y un rendimiento del 8 %.
3. Han sido obtenidos los anticuerpos policlonales correspondientes en conejo. Dichos anticuerpos reconocen una sóla banda a nivel de Western-blot, correspondiente al peso molecular del monómero de la PGM. Además presentan reacción cruzada entre las dos formas isoenzimáticas M y B.
4. Los antisueros obtenidos provocan una inhibición de la actividad enzimática de 11 mU/ μ l de suero y en test de ELISA reconocen hasta 50 ng de proteína pura.
5. Han sido purificados por cromatografía de afinidad los anticuerpos correspondientes a la PGM-B.
6. Ha sido realizada la localización intracelular de la PGM mediante dos abordajes independientes y complementarios: fraccionamiento subcelular e inmunocitoquímica.
7. Ambos abordajes muestran la presencia de la proteína a nivel de citoplasma y también a nivel nuclear en todos los tejidos estudiados, con la única excepción de la oligodendroglia que presenta ausencia de marcaje nuclear.
8. Ha sido demostrada la presencia en nucleos aislados de diferentes tejidos, de actividad fosfoglicerato mutasa y de reacción antígeno-anticuerpo con los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad.
9. Ha sido clonado el cDNA correspondiente a la forma B de rata. Se ha obtenido en primer lugar un cDNA incompleto, y en un segundo intento se ha obtenido un cDNA completo a partir de una librería de cDNA de corazón de rata.

10. Ha sido secuenciado el cDNA codificante para la forma B. La longitud total determinada ha sido de 1697 pb. con una zona codificante de 762 nucleótidos, una zona 5' no traducida de 38 y una zona 3' no traducida de 897.
11. El cDNA secuenciado presenta una homología del 92% en la zona traducida y del 65 % en la zona no traducida con la forma homóloga humana.
12. La proteína codificada presenta una homología del 97 % con la forma humana y del 75 % con la isoenzima M, con todos los aminoácidos correspondiente al centro activo conservados. La homología con la forma de levadura es del 50 % y con las BPGM descritas es del 50 %.
13. El cDNA aislado puede reconocer las formas M y B mediante Northern-blot en función de las condiciones de hibridación.
14. Existe una elevada homología entre las zonas 3' no traducidas de las PGM-B humana y de rata, con un posible papel regulador en la expresión de la enzima.

6.BIBLIOGRAFIA

- Adamson, E.D. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35, 355–367. (1976).
- Andrés, V. Cussó, R. y Carreras, J. *Differentiation*, 41, 72–77. (1989).
- Barichard, F.; Joulin, V.; Garel, H.I.; Valentin, C.; Rosa, R.; Cohen–Solal, M.; Junien, C. *Hum. Genet.* 77, 283–285. (1987).
- Bartlett, G.R. *Adv. Exp. Med. Biol.* 6, 245–255. (1970).
- Bartrons, R. y Carreras, J. *Biochim. Biophys. Acta.* 708, 167–177. (1982).
- Benesch, R.; y Benesch, R.E. *Nature*, 221, 618–622. (1969).
- Benesch, R.; Benesch, R.E.; y Yu, C.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 526–532. (1968).
- Bensadown, A. y Weinstein, D. *Anal. Biochem.* 70, 241–250. (1976)
- Berrocal, F. y Carreras, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B, 9–14 (1983a)
- Berrocal, F. y Carreras, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B, 795–799. (1983b).
- Berrocal, F. y Carreras, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 475–481. (1984).
- Berrocal, F. y Carreras, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 547–554. (1987).
- Beutler, E. y Stratton, G. En: Beutler, E.(ed.) *Red Cell Metabolism*, 2nd Ed. Grune and Stratton, New York, pp. 56–58. (1975).
- Billadello, J.J.; Kelly, D.P.; Roman, D.G. Strauss, A.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 392. (1986).
- Biocca, S.; Cattaneo, A.; Calissano, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2080–2084. (1984).

Blouquit, Y.; Calvin, M.C; Rosa, R. Promé, D.; Promé, J.C.; Pratbernou, F.; Cohen-Solal, M.; Rosa, R. J. Biol. Chem. 263, 16906– 16910. (1988).

Borders, C.L.; y Wilson, B.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 978–984. (1976).

Botha, F.C. y Dennis, D.T. Arch. Biochem., Biophys. 245, 96–103. (1986).

Breathnach, R. y Knowles, J.R.. Biochemistry, 16, 3054–3060. (1977).

Bressolin,N.; Ro,Y.I.; Reyes,M.; Miranda,A.F.; DiMauro,S. Neurology, 33, 1049–1053. (1983).

Brewer, G.J. y Eaton, J. W. Science, 171, 1205–1211. (1971).

Britton, H.G.; Carreras, J.; Grisolia, S. Biochemistry, 11, 3008–3014. (1972a).

Britton, H.G.; Carreras, J.; Grisolia, S. Biochim. Biophys. Acta. 289, 311–322. (1972b).

Britton, H.G.; Carreras, J. y Grisolia, S. Eur. J. Biochem. 36, 495–503. (1973).

Budgen, N. y Danson, M.J. FEBS lett. 196, 207–210. (1986).

Bunn, H.F.; Seal, U.S. y Scott, A.F. Ann. N.Y.Acad. Sci. 241, 489–512. (1974).

Calissano, P.; Volonte, C.; Biocca, S. y Cattaneo, A. Exp. Cell Res. 161, 117–129. (1985)

Campbell, J.V.; Watson, H.C.; Hodgson, G.I. Nature, 250, 301–303. (1974).

Carballo, E.; Bartrons, R. y Carreras,J. XVII Congreso de la SEB. Oviedo. (1990).

Carreras, J.; Bartrons, R.; Grisolia, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1267–1273. (1980).

Carreras, J.; Mezquita, J.; Bosch, J.; Bartrons, R. y Pons, G. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 591–597 (1982a).

Carreras, J.; Bosch, J. y Mezquita, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 57–63. (1982b).

Carreras, J.; Mezquita, J. y Pons, G. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 401–407. (1982c).

Carreras, J.; Climent, F.; Bartrons, R. y Pons, G. *Biochem. Biophys. Acta.* 705, 238–242. (1982d).

Casey, J. y Davidson, N. *Nucleic Acid Res.* 5, 1539. (1977).

Castellà, J.; Ureña, J.; Ludevid, D.; Carreras, J.; Climent, F. *Biochim. Biophys. Acta.* 956, 97–102. (1988).

Castellà–Escolà, J.; Montoliu, L.; Pons, G.; Puigdomenech, P.; Cohen–Solal, M.; Carreras, J.; Rigau, J. y Climent, F. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165, 1345–1351. (1989)

Castellà, J. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. 1989.

Castellà–Escolà, J.; Mattei, M.G.; Ojcius, D.M.; Passage, E.; Valentin, C.; Cohen–Solal, M. *Hum. Genet.* 84, 210–212. (1990a).

Castellà–Escolà, J.; Ojcius, D.M.; Le Boulch, P.; Joulin, V.; Blouquit, Y.; Garel, M.C.; Valentin, C.; Rosa, R.; Climent, F. y Cohen–Solal, M. *Gene*, 91, 225–232. (1990b).

Castellà–Escolà, J.; Ureña, J.; Alterio, J.; Carreras, J.; Martelly, I. y Climent, F. *FEBS Lett.* 268, 24–26. (1990c).

Cattaneo, A.; Biocca, S.; Corvaja, N.; Calissano, P. *Exp. Cell. Res.* 161, 130–140. (1985).

Chanutin, A.; Curnish, R.R. *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 96–102. (1967).

- Chen, S.H.; Anderson, J.; Giblet, E.R.; Lewis, M. *Am. J. Hum. Genet.* 26, 73–77. (1974).
- Chiba, H.; Sasaki, R. *Curr. Topics Cell. Regul.* 14, 75–116, 1978.
- Chiou, S.H.; Chang, W.P.; Lin, H.K. *Biochim. Biophys. Acta.* 957, 313–317. (1988).
- Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; McDonald, R.J.; Rutter, W.J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 24, 5294 (1979).
- Ch'ng, J.L.C.; Shoemaker, D.L.; Schimmel, P.; Holmes, E.W. Reversal of Creatin kinase translational repression by 3' untranslated sequences. *Science*. 248, 1003–1005. (1990).
- Clarke, F.M.; Masters, C.J. On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 381, 37–46. (1975).
- Clarke, L. y Carbon, J. *Cell (Cambridge, Mass.)* 9, 91. (1976).
- Climent, F.; Bartrons, R.; Pons, G. y Carreras, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 579–576. (1981).
- Cooper, J.A.; Reiss, N.A.; Schwartz, R.J.; Hunter. *Nature*, 302, 218–222 (1983).
- Cowgill, R.W.; Pizer, L.I. *J. Biol. Chem.* 223, 885–895. (1956).
- Craig, A., Miller, A., Goodchild, D.J. *Aust. J. Plant. Physiol.* 7, 339–351. (1980).
- D'Alessio, G. y Josse, J. *J. Biol. Chem.* 246, 4319–4325. (1971).
- Davis, R.L.; Weintraub, H.; y Lassar, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51, 987–1000. (1987).
- Davis, R.L.; Cheng, P.F.; Lassar, A.B. y Weintraub, H. The MyoD DNA binding domain

contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell*, 60, 733–746. (1990).

Dawson, R.M.; Elliot, D.C. Preparation and composition of biochemical reagents in "Data for biochemical research" 615–616 (Lavedon Press. Oxford). (1969).

De Lecea, L. Tesis Doctoral. Universitat Barcelona. (1991).

DeMarcuzzi, O. y Lindsay, J.K. *Eur. J. Biochem.* 149, 641–648. (1985).

Dennis, D.T.; Miernyk, J.A. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 33, 27–50. (1982).

De Rosa, M; Gambacorta, A; Nicolaus, B; Giardina, P.; Poerio, E.; Buonocore, V. *Biochem. J.* 224, 407–414. (1984).

Dickey, L.F.; Wang, Y.H.; Shull, G.E.; Wortman, I.A. Theil, E.C. *J. Biol. Chem.* 263, 3071. (1988).

Diederich, D.; Khan, A.; Santos, I.; Grisolia, S. *Biochem. Biophys. Acta.* 212, 441–444. (1970).

DiMauro, S.; Miranda, A.F.; Olarte, M.; Friedman, R.; Hays, A.P. *Nerology*, 32, 584–591. (1982).

Dingwall, C. y Laskey, R.A. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 367–390.

Dobzhansky. T.; Ayala, F.J.; Stebbins, G.L.; Valentin, J.W. *Evolución*. Ed. Omega. Barcelona. 1978.

Edelhoch, H.; Rodwell, V.W.; Grisolia, S. *J. Biol. Chem.* 228, 891–903. (1957).

Edwards, Y.H. y Grootegoed, J.A. A sperm-specific enolase. *J. Reprod. Fert.*, 68, 305–310. (1983).

Eppemberger, H.M.; Eppemberger, M.; Richterich, R.; Aebi, H. The ontogeny of creatin kinase isozymes. *Dev. Biol.* 10, 1–16. (1964).

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6–13 (1983).

Fernandez, M. y Grisolia, S. *J. Biol. Chem.* 235, 2188–2190. (1960).

Fothergill, L.A y Harkis, R.N. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 215, 19–44. (1982).

Fothergill–Gilmore, L.A. The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 11, 47–51, 1986.

Fothergill–Gilmore, L.A y Watson, H.C. The phosphoglycerate mutases. *Advances in Enzymology*. Ed. A. Meister, John Wiley and Sons, New York, 62, 227–313. (1989).

Fundele, R.; Bucher, T.; Gropp, A.; Winking, H. *Devel. Genet.* 2, 291–303. (1981).

Fundele, R. y Krietsch, W.K.G. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B, 965–968. (1985).

Fundele, R.; Winking, H.; Illmensee, K.; Jägerbauer, E.M. Developmental activation of phosphoglycerate mutase–2 in the testis of the mouse. *Dev. Biol.* 124, 562–566 (1987).

Gatehouse, J.A. y Knowles, J.R. *Biochemistry*, 16, 3045–3050. (1977).

Glisin, V.; Crkvenjakov, R.; Byus, C. *Biochemistry*, 13, 2633 (1974)

Goldberg, D.M.; Ellis, G. Isocitrate dehydrogenase. En: H.U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol III, pp. 183–190. Verlag Chemie. Weinheim. (1983).

Goldberg, E. Isozymes in testes and spermatozoa. En "Isozymes" (M.C. Ratazzi, J.G. Scandalios, and G.S. Whitt, Eds.), Vol. I, pp. 80–116. A.R. Liss, New York

- Goodridge et al. Arch. Biochem. Biophys. 230, 82–92, (1984).
- Gosti, F.; Marty, M.C.; Courvalin, J.C.; Maunoury, R.; Bornens, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 1000–1004. (1987).
- Graña, X.; Ureña, J.; Ludevid, D.; Carreras, J. y Climent, F. Eur. J. Biochem. 186, 149–153. (1989).
- Graña, X. 20th FEBS meeting. Budapest. 1990.
- Green, A.A. y Hughes, W.L. Methods in Enzymology, 1, 67–90 (1955)
- Grisolía, S. y Joyce, B.K. J. Biol. Chem. 234, 1335–1337. (1959).
- Grisolía, S.; Joyce, B.K.; Fernandez, M. Biochem. Biophys. Acta. 50, 81–89. (1961).
- Grisolía, J.; Diederich, D.; Grisolía, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1238–1243. (1970).
- Grisolía, S. y Carreras, J. Methods Enzymol. 42. 429–435. (1975).
- Grosse, F.; Nasheuer, H.P.; Scholtissek, S.; Schomburg, U.; Eur. J. Biochem. 169, 459–467. (1986).
- Haggarty, N.W.; Dunbar, B.; Fothergill, L.A. EMBO J. 2, 1213–1220. (1983).
- Hames, B.D. y Higgins, S.J.: Nucleic Acid Hybridization, a practical approach. IRL Press. Oxford, (1986).
- Hanahan, D. J. Mol. Biol., 166, 65, (1983).
- Harkness, D.R.; Ponce, J. y Grayson, V. Comp. Biochem. Physiol. 28, 129–138. (1989).

- Hass, L.F. y Miller, K.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 970–979. (1975).
- Hass, L.F.; Place, A.R.; Miller, K.B. y Powers, D.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1570–1576. (1980).
- Hill, B. y Atwood, M.M. *J. Gen. Microbiol.* 96, 185–193. (1976).
- Hod et al. *J. Biol. Chem.* 259, 15603. (1984).
- Hosokawa, R.; Uchida, Y.; Fujiwara, S.; Noguchi, T. *J. Biol. Chem.* 263, 10045–10047. (1988).
- Hunt, T. Cytoplasmic anchoring proteins and the control of nuclear localization. *Cell*, 59, 949–951. (1989).
- Iida, H.; Yahara, I. Yeast heat-shock protein of 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature*, 315, 688–690. (1985).
- Ikura, K.; Sasaki, R.; Narita, H.; Sugimoto, E. y Chiba, H. *Eur. J. Biochem.* 66, 515–522. (1976).
- Ito, N. Grisolfía, S. *J. Biol. Chem.* 234, 242–245. (1959).
- Jaynes, J.B.; Chamberlain, J.S.; Buskin, J.N.; Johnson, J.E.; Hauschka, S.D. Transcriptional regulation of the muscle creatine kinase gene and regulated expression in transfected mouse myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6, 8, 2855–2864. (1986)
- Jaynes, J.B.; Johnson, J.E.; Buskin, J.N.; Gartside, C.L.; Hauschka, S. The muscle creatin kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1, 62–70. (1988).
- Jindal, H.K.; Vishwanatha, J.K. *J. Biol. Chem.* 265, 6549–6543. (1990).

Johnson, C.M. y Price, M.C. *Biochem. J.* 252, 111–117. (1988).

Joulin, V.; Peduzzi, J.; Romeo, P.H.; Rosa, R.; Valentin, C.; Dubart, A.; Lapeyre, B.; Blouquit, Y.; Garel, M.C.; Goossens, M.; Rosa, J. y Cohen–Solal, M. *EMBO J.* 5, 2275–2283. (1986).

Junien, C.; Despoisse, S.; Turleau, C.; Grouchy, J.; Bucher, T. y Fundele, R. *Ann. Genet.* 25, 25–27 (1982).

Kappel, K.W.; Hass, L.F. *Biochemistry*, 15, 290–295. (1976).

Kato, H.; Fukuda, T.; Parkison, C.; McPhie, P.; Cheng, S.Y. Cytosolic Thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7861–7865. (1989).

Kissel, J.T.; Beam, W.; Bresolin, N.; Gibbons, G.; DiMauro, S.; Mendell, J.R. *Neurology*, 35, 828–833. (1985).

Kuehl, L. Isolation of skeletal muscle nuclei. *Exp. Cell. Res.* 91, 441–448 (1975).

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685. (1970).

Leadlay, P.F.; Breathnach, R.; Gatehouse, J.A.; Johnson, P.E.; Knowles, J.R. *Biochemistry*, 16, 3050–3053. (1977).

Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers Inc. New York, pag. 411. 1982.

Lowry, O.H.; Rosembrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, P.J. *J. Biol. Chem.* 193, 266–275. (1951).

Martinuzzi, S.; Askanas, V.; Kobayashi, T.; King-Engel, W. y Gorsky, J.E. *Exp. Neurology*. 96, 365–375. (1987).

McAleese, S.M.; Fothergill-Gilmore, L.A. y Dixon, H.B.F. *Biochem. J.* 230, 535–542. (1985).

McAleese, S.M.; Jutagir, V.; Blackburn, G.M. y Fothergill-Gilmore, L.A. *Biochem. J.* 243, 301–304. (1987).

McDonald, R.J.; Swift, G.H.; Przybyla, A.E.; Chirgwin, J.M. In : *Methods in Enzymology*, ed: S.L. Berger y A.R. Kimmel, vol 152, pg 219–227, Academic Press, (1987).

Messing, J.; Gronenborg, B.; Muller-Hill, B.; Hofschneider, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3642–3646. (1977).

Messing, J. in: *Methods in Enzymology* 101 (part C). Recombinant DNA 20–78. Academic Press. New York (1983).

Meyerhoff, O. y Kiessling, W. *Biochem. Z.* 276, 239–253. (1935).

Mezquita, J.; Bartrons, R.; Pons, G. y Carreras, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 247–255. (1981).

Mezquita, J. y Carreras, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 237–245. (1981).

Mokrash, L.C y McGilvery, R.N. *J. Biol. Chem.* 221, 909–917. (1956).

Moss, D.V. Acid phosphatase. En: H.U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. VI, pp. 92–106. Verlag Chemie. Weinheim. 1984.

Narita, H.Y.; Utsumi, S.; Ikura, K.; Sasaki, R.; Chiba, H. *Int. J. Biochem.* 10, 25–38. (1979).

Oshaba, K. y Ebata, I. *Anal Biochem.* 135, 409–415. (1983).

Omenn, G.S.; Cheung, S.C. *Am. J. Hum. Genet.* 26, 393–399. (1974).

Omenn, G.S. y Hermodson, M.A. In: *Isozymes III. Developmental Biology*. C.L. Market ed. Academic Press, New York, pp. 1005–1018. (1975).

Ottaway, J.H. y Mowbray, J. The role of compartmentation in the control of glycolysis. En: *Current topics in cellular regulation*. Vol. 12, pp 107–208. Academic Press. New York. (1977).

Pawluk, A.; Scopes, R.K. y Griffiths-smith, K. *Biochem. J.* 238, 275–281. (1986).

Piatigorsky, J.; Wistow, G.J. *Cell* 57, 197–199. (1989)

Piña, B.; Martínez, P.; Simón, L.; Suau, P. Differential kinetics of Histone H1. Accumulation in neuronal and glial cells from rat cerebral cortex during postnatal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 2, 697–702. (1984).

Plummer, D.T. *Practical Biochemistry*. . Ed. Mc. Graw–Hill. pp. 145–146. London. (1978).

Pons, G. y Carreras, J. *Biochim. Biophys. Acta.* 842. 56–61. (1985).

Pons, G.; Bartrons, R. y Carreras, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 658–663. (1985).

Prehu, M.O.; Calvin, M.C.; Prehu, C y Rosa, R. *Biochim. Biophys. Acta.* 787, 270–274. (1984).

Price, N.C.; Stevens, E. *Biosci. Rep.* 3, 857–861. (1983).

Price, N.C.; Duncan, D. y Ogg, D.J. *Int. J. Biochem.* 17, 843–846. (1985a).

Price, N.C.; Duncan, D. y McAlister, J.W. *Biochem. J.* 229, 167–171. (1985b).

- Rapaport, S. y Guest, G.M. *J. Biol. Chem.* 138, 269–282. (1941).
- Rapaport, S. y Luebering, J. *J. Biol. Chem.* 183, 507–516. (1950).
- Rapaport, S. y Luebering, J. *J. Biol. Chem.* 196, 583–588. (1952).
- Reiss, N.; Kanety, H.; Schlessinger, J. *Biochem. J.* 239, 691–697. (1986)
- Rodwell, V.W.; Towne, J.C.; Grisolia, S. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 394–396. (1956).
- Rodwell, V.W.; Towne, J.C.; Grisolia, S. *J. Biol. Chem.* 228, 875–890. (1957).
- Rosa, R.; Audit, I.; Rosa, J. *Isozymes*, Academic Press, Inc, New York, 1, 695–706. (1975).
- Rosa, R.; Calvin, M.C.; Prehu, M.O.; Levy–Strauss, M. y Rosa, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 715–720. (1984).
- Rose, Z.B.; Liebowitz, J. *J. Biol. Chem.* 245, 3232–3241. (1970a).
- Rose, Z.B.; Liebowitz, J. *Anal. Biochem.* 35, 177–180. (1970b).
- Rose, Z.B. y Dube, S. *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 284–292. (1976a).
- Rose, Z.B. y Dube, S. *J. Biol. Chem.* 251, 4817–4822. (1976b).
- Rose, Z.B. y Salon, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87, 869–875. (1979).
- Rose, Z. B. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 51, 211–253. (1980).
- Roth, J., Bendayan, M., Carlemaln, E., Villiger, W., Garavito, R.M. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 663–671. (1981).

Roth, J.; Bendayan, M.; Orci, L. *J. Histochem. Cytochem.* 26, 1074–1081. (1978).

Roth, J.: The protein A–gold (pAg) technique. A qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections. In: G.R. Bullock, P. Petrusz (eds): *Techniques in immunocytochemistry*. Vol 1. pp. 107–133. Academic Press. London (1982).

Sakoda, S.; Shanske, S.; DiMauro, S. y Schon, E.A. *J. Biol. Chem.* 263, 16899–16905. (1988).

Sale, E.H.; White, M.F.; Kahn, C.; Ronald, C. *J. Cell. Biochem.* 33, 15–26. (1987).

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989).

Sanger, F.; Niclen, S.; Coulson, A.R. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467. (1977).

Sanger, F. Coulson, A.R.; Barrell, B.G.; Smith, A.J.H. y Roe, B.A. *J. Mol. Biol.* 143, 161–178. (1980).

Sasaki, R.; Sugimoto, E.; Chiba, H. *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 53–61. (1966).

Sasaki, R.; Sugimoto, E.; Chiba, H. *Biochim. Biophys. Acta.* 227, 584–594. (1971).

Sasaki, R.; Ikura, K.; Sugimoto, E.; Chiba, H. *Eur. J. Biochem.* 50, 581–593. (1975).

Schulman, M.D.; Valentino, D. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5, 321–332. (1982).

Sedmak, J.J., Grossberg, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue. *Anal. Biochem.* 79, 544–552. (1978)

Shanske, S.; Sakoda, S.; Hermodson, M.A.; DiMauro, S. and Schon, E.A. *J. Biol. Chem.* 262, 14612–14617. (1987).

- Shaw, G. y Kamen, R. *Cell*, 46, 659. (1986).
- Siebert, G. *Biochem. Z.* 334, 369–387. (1961).
- Smith, A.L. en "Methods in Enzymol", 10, 81–86. (1967).
- Southern, E.M. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517 (1975).
- Sumi, T.; Kishino, Y. *Cell. Mol. Biol.* 29, 175–180. (1983).
- Sutherland, E.W.; Posternak, T.Z.; Cori, C. *J. Biol. Chem.* 179, 501–502. (1949a)
- Sutherland, E.W.; Posternak, T.Z.; Cori, C.J. *J. Biol. Chem.* 181, 153–159 (1949b).
- Tauler, A.; Pons, G. y Carreras, J. *Biochim. Biophys. Acta.* 872, 201–207. (1986).
- Tauler, A.; Raafat El-Maghrabi, M.; Pilkis, S. Functional homology of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, phosphoglycerate mutase, and 2,3-bisphosphoglycerate mutase. *J. Biol. Chem.* 262, 35, 16808–16815. (1987).
- Thompson, R.J. *J. Neurochem.* 21, 19. (1973).
- Torralba, A. y Grisolia, S. *J. Biol. Chem.* 241, 1713–1718. (1966).
- Tsujino, S.; Sakoda, S.; Mizuro, R.; Kobayashi, R.; Suzuki, T.; Kishimoto, T.; Shanske, S.; DiMauro, S.; Schon, S. Structure of the gene encoding the muscle specific subunit of the human phosphoglycerate mutase. *J. Biol. Chem.* 264, 15334–15337. (1989).
- VandeBerg, J.L.; Cooper, D.W.; Close, J.P. Testis specific phosphoglycerate kinase B in the mouse. *J. Exp. Zool.*, 198, 231–240. (1976).

Vassault, A. En: H.U. Bergmeyer (ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. II. pp. 118–126. Verlag Chemie. Weinheim. (1983).

Wahl, G.M.; Berger, S.L.; y Kimmel, A.R.: *Methods in Enzymology*, 152, 401–402. (1987).

Wahl, G.M. y Berger, S.L.: *Methods in Enzymology*, ed: S.L. Berger y A.R. Kimmel, Vol. 152, pg 415–423, Academic Press, (1987).

Walker, E.J. y Dow, J.W. *Biochem J.* 203, 361–369, (1982).

Walliman, T.; Kuhn, H.J.; Pelloni, G.; Turner, D.C.; Eppenberger, H.M. *J. Cell. Biol.* 75, 318–325. (1977).

White, M.F. y Fothergill–Gilmore, L.A. *FEBS Lett.* 229, 383–387. (1988).

Willets, A. *Biochim. Biophys. Acta.* 632, 454–463. (1982).

Williams, K.R.; Reddigari, S.; Patel, G.L. Identification of a nucleic acid helix–destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase–5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 5260–5264 (1985).

Wistow, G.J.; Mulders, J.W.; de Jong, W.W. *Nature*, 326, 622–624. (1987).

Wright, W.E.; Sassoon, D.A.; Lin, V.K. Myogenin, a factor regulating myogenesis has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607–617 (1989).

Yaffee, D.; Nudel, U.; Mayer, Y.; Neuman, A. *Nucleic Acids Res.* 13, 3723. (1985).

Yanagawa, S.; Hitomi, K.; Sasaki, R.; Chiba, H. *Gene*, 44, 185–191. (1986).

Yanisch–Perron, C.; Viera, J.; y Messing, J. *Gene*, 33, 103, (1985)