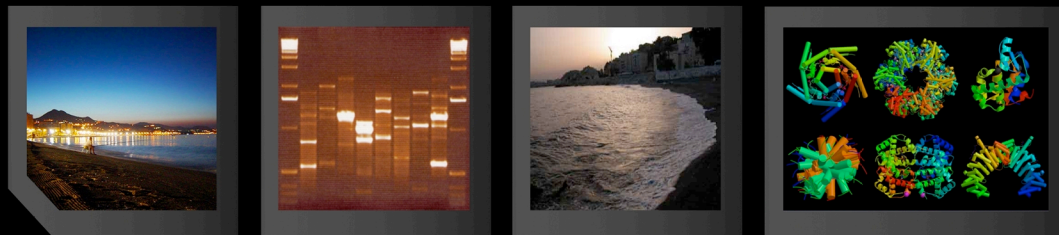


XXX CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



V JORNADAS "LA EMPRESA PUEDES SER TÚ"

MÁLAGA 12/15 SEPTIEMBRE 2007

T16-21 LOSS OF THE KINASE BUT NOT THE CYCLIZING LYASE ACTIVITY OF HUMAN DHA KINASE/FMN CYCLASE BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

A Couto, RM Pinto, MJ Costas, A Cabezas, JC Cameselle
Grupo de Enzimología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain . E-mail: camselle@unex.es
 Human Dha kinase/FMN cyclase (h-Dk/Fc) is an ATP-dependent dihydroxyacetone (Dha) kinase (EC 2.7.1.29) and a FAD-AMP lyase (cyclic FMN forming) (EC 4.6.1.15). From kinetic evidence, both activities seem to depend on the same active center, but with some enzyme group(s) playing a differential role (1). Relevant to this, ATP is a full, competitive and Dha a partial, noncompetitive Fc inhibitor, while FAD is a weak but full Dk inhibitor (2). This suggests the Dha-binding subsite of h-Dk/Fc is not involved in the Fc reaction. The structure and mechanism of h-Dk/Fc are unsolved, but the structure of a complex of *Citrobacter freundii* Dha kinase (c-Dk) with Dha and an ATP analog has been reported, and it includes a covalent intermediate of Dha with H220 (3). h-Dk/Fc is homologous to c-Dk with conservation of substrate-binding residues like H220 (H221 in h-Dk/Fc). Two h-Dk/Fc mutants (H221A and H221E) were constructed, confirmed by full double-strand sequencing, and expressed as GST-fusions. The wild-type (WT) and the mutated proteins were purified by adsorption to GSH-Sepharose and specific proteolysis which removed the GST tag. The specific activities of WT-, H221A- and H221E-h-Dk/Fc were, respectively (mU/mg): Dk, 3040 ± 1160, 22 ± 12 and 16 ± 5; Fc, 730 ± 110, 490 ± 120 and 345 ± 60 (n = 3-5 different preparations). The effect of inhibitors on Fc was (% inhibition): 0.5 mM Dha, 39 ± 4%, 0.5 ± 2.4% and 19 ± 3%; 0.01 mM ATP, 92 ± 5%, 88 ± 6%, and 86 ± 6%. In summary, the Dha subsite is not involved in Fc activity, and Fc is functionally separable from Dk.
 1. Cabezas, Costas, Pinto, Couto, Cameselle. BBRC 338:1682-9, 2005
 2. Couto, Pinto, Costas, Ribeiro, Cabezas, Cameselle. XXIX Congreso SEBBM, 2006
 3. Siebold, Arnold, Garcia-Alles, Baumann, Erni. JBC 278:48236-44, 2003

T16-22 HISTIDINA QUINASA NblS Y SU RELACIÓN CON SipA, UN NUEVO JUGADOR EN LA CLOROSIS DE CIANOBACTERIAS
M López-Redondo¹, P Salinas², D Ruiz², R Cantos², A Contreras², A Marina¹

¹Unidad de Cristalografía de Macromoléculas, Instituto de Biomedicina, Valencia, España ²Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, España . E-mail: mlopez@ibv.csic.es
 Las cianobacterias responden a ciertas condiciones de estrés por nutrientes o luz a través de la degradación de los complejos antena de su aparato fotosintético, un proceso denominado clorosis. La cascada de señal que media este proceso implica a una histidina quinasa altamente conservada llamada NblS en *Synechococcus*. Junto a NblS, el regulador de la respuesta (RR) NblR es actor principal en la clorosis. La importancia de NblS y NblR en este proceso induce a pensar que ambas proteínas podrían formar un sistema de transducción de señal de dos componentes. Otros RRs como RpaA y RpaB podrían ser candidatos para trabajar con NblS, aunque no hay dato alguno de su regulación por NblS. Búsquedas por doble híbrido no permitieron encontrar el RR de NblS, pero identificó una nueva proteína de función desconocida y con fuerte interacción con el dominio de unión a ATP de NblS, que se llamó SipA. El gen sipA está presente en todos los genomas de cianobacterias donde se encuentra nblS, apoyando la relevancia fisiológica de la interacción entre las 2 proteínas y sugiriendo un posible papel a SipA en la clorosis. Presentaremos estudios de esta interacción a nivel bioquímico, genético y estructural. Los análisis bioquímicos indican que SipA estabiliza a NblS y estimula su autofosforilación. La estabilización de NblS por SipA permitió la obtención de cristales de dicho complejo con los que se ha comenzado la caracterización estructural. Ensayos in vitro muestran que NblR, RpaA y RpaB no son los RRs de NblS, independientemente de la presencia de SipA. Los análisis genéticos y estudios de expresión indican que SipA y NblS cooperan en la regulación de funciones relacionadas con la supervivencia a estrés en *Synechococcus*.
 Financiado por BFU2006-12424 y BIO2005-00153. M.L-P becaria MMA

T16-23 PAPEL DE LOS MICRODOMINIOS LIPÍDICOS EN LA UNIÓN DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA A MEMBRANAS CELULARES

C. Martín, G. Gómez-Bilbao, F. Goñi, H. Ostolaza
Unidad de Biofísica (Centro Mixto CSIC-UPV/EHU), y Departamento de Bioquímica, Universidad del País Vasco, Aptdo. 644, 48080 Bilbao, España . E-mail: cesar.martin@ehu.es
 La toxina adenilato ciclasa (ACT) secretada por *Bordetella pertussis* pertenece a la familia de las toxinas formadoras de poro denominadas RTX (repeat in toxin) caracterizadas por la repetición de un nonapéptido que une calcio. Esta toxina presenta dos actividades distintas cuando se une a sus células diana: una actividad hemolítica producida por la unión del dominio RTX a la célula, que altera la permeabilidad de la membrana celular permitiendo la salida de componentes citoplasmáticos al exterior celular y la entrada de iones de calcio al citoplasma. Además, la toxina presenta una actividad citotóxica mediada por el dominio adenilato ciclasa. Este dominio es capaz de translocar al interior celular donde cataliza AMPc de forma incontrolada tras su activación al unirse con la calmodulina endógena. La combinación de estas dos actividades modifica severamente la fisiología de la célula ya que interfiere con las vías de señalización celular al elevar los niveles de AMPc, y por la alteración de la homeostasis del calcio. Se ha demostrado que la unión de la toxina a macrófagos, neutrófilos y células dendríticas es mediada por el receptor CD11b/CD18, aunque la ACT es capaz de unirse prácticamente a todo tipo de células con independencia de que presenten o no dicho receptor. Este último hecho nos ha llevado a estudiar si la composición de la membrana celular, en particular zonas ricas en colesterol y esfingolípidos (rafts), afecta a la unión de la toxina. Para ello hemos localizado la ACT en las etapas iniciales de adhesión mediante técnicas inmunocitoquímicas y por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa de lisados de células tratadas con la toxina.

T16-24 INFLUENCIA DE ALGUNOS POLIOLES Y LA GLUCOSA SOBRE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA α-LACTOALBÚMINA BOVINA

A. R. Albis¹, J. M. Lozano¹, C. M. Romero¹, J. Sancho²
¹Departamento de Química y Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España . E-mail: albertoalbis@gmail.com
 La α-lactoalbúmina bovina es la segunda proteína más abundante del suero de la leche. Participa en el proceso de biosíntesis de la lactosa y se le han atribuido algunas propiedades antibióticas. Es una proteína que se une a varios metales, incluido el calcio. Cuando se encuentra unida a este metal se le conoce como holo-lactoalbúmina. Ha sido una proteína ampliamente estudiada por presentar, a pHs bajos y concentraciones intermedias de desnaturizantes químicos, el estado conocido como glóbulo fundido.
 En este trabajo se estudió la desnaturalización térmica de la holo-α-lactoalbúmina bovina a pH 6.5 en la presencia de eritritol, xilitol, sorbitol, inositol y glucosa a concentraciones de hasta 1.5 molal. El proceso de desnaturalización fue seguido por espectroscopía de fluorescencia y diámetro circular a 222 y 270 nm. No se encontró dependencia de las propiedades termodinámicas del proceso de desnaturalización de la proteína disuelta en pines 5 mM y CaCl2 1 mM en el rango de concentraciones de proteína estudiado. Los resultados muestran un ligero aumento en la temperatura de desnaturalización de la proteína al aumentar la concentración de cada uno de los cosolutos.